

MARCIN STUDNICKI¹**WIESŁAW MĄDRY**¹**JAN SCHMIDT**²¹ Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki SGGW w Warszawie² Ogród Botaniczny Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy

Wielowymiarowa analiza zmienności genotypowej cech rolniczych w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.)*

Multivariate analysis of genotypic diversity of agronomic traits in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm collection

W pracy przedstawiono analizę jedno- i wielocechowej zmienności 1971 obiektów, pochodzących z polskiej kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej, pod względem 8 cech ilościowych. W pierwszym kroku analizy wykonano wstępną ocenę zmienności obiektów, oddzielnie dla każdej cechy, z wykorzystaniem metod statystyki opisowej. Dalsze kroki polegały na przeprowadzeniu analizy składowych głównych oraz analizy skupień za pomocą metody UPGMA na standaryzowanych danych dla badanych cech. Zastosowano także analizę zmiennych kanonicznych dla wydzielonych grup (skupień). Stwierdzono, że wysokość roślin i plon zielonej masy są cechami o największej zmienności genotypowej spośród wszystkich badanych cech w kolekcji. Pierwsze trzy składowe główne wyjaśniały ponad 69% ogólnej zmienności 8 cech ilościowych w badanej kolekcji. Wyniki analizy zmiennych kanonicznych wskazują, że wysokość roślin oraz liczba dni do kłoszenia i kwitnienia odznaczały się relatywnie najsilniejszą zdolnością dyskryminacyjną pomiędzy dziesięcioma grupami, wydzielonymi za pomocą analizy skupień.

Słowa kluczowe: kupkówka pospolita, wielowymiarowe metody statystyczne, zasoby genowe

In this paper an analysis of genotypic diversity for 8 quantitative agronomic traits in 1971 accessions belonging to the Polish orchardgrass germplasm collection was presented. Evaluation of diversity in the accessions was performed in four steps. In the first step a preliminary analysis of variation was done separately for each trait using descriptive statistics. Then, principal component analysis (PCA) and cluster UPGMA analysis (CA) were used on standardized data for the studied traits. Also, canonical discriminate analysis (CDA) was done to assess discriminating value of the traits to distinguish clusters delivered by CA. Plant height and total seasonal yield were most variable traits among all the traits. The first three principal components explained above 69% of the total variation

* Pracę wykonano w ramach projektu promotorskiego numer N N310 066339, przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

within the accessions in the collection for the 8 traits. The results of the CDA suggested that plant height and days to inflorescence emergence and flowering were the major discriminatory characteristics for the ten distinguished clusters.

Key words: germplasm collection, multivariate analyses, orchardgrass

WSTĘP

Kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.) jest jedną z najważniejszych wieloletnich traw pastewnych klimatu umiarkowanego, pochodzącą z północnej Afryki, zachodniej i centralnej Europy oraz obszarów Azji o klimacie umiarkowanym (Pecetti in., 2009; Xie i in., 2010 a,b). Jest to gatunek powszechnie uprawiany na świecie, dzięki szerokiemu przystosowaniu do różnych warunków środowiskowych i klimatycznych, które przejawia się wysokim i stabilnym plonem biomasy o dobrej jakości paszowej oraz odpornością na choroby i szkodniki (Casler i in., 2000; Peng i Zhang, 2003; Pecetti in., 2009; Xie i in., 2010 a,b). Kupkówka pospolita jest gatunkiem luźnokępkowym, o doskonale rozwiniętym systemie korzeniowym. Wiosną wcześniej rozpoczyna wegetację, ale spóźnione przymrozki wiosenne znacznie zmniejszają jej żywotność. Wytrzymuje mroźne zimy, niekiedy jednak podczas bardzo niskich temperatur dochodzi do uszkodzenia szyjek korzeniowych i wymarza. Jest gatunkiem wysoce azotolubnym, preferowanym do intensywnych systemów uprawy i użytkowania. Przy dużej dostępności azotu w glebie staje się bardzo ekspansywna i potrafi całkowicie opanować ruń. Wykazuje duże tempo wzrostu, zwłaszcza po kolejnych pokosach. Kupkówka pospolita od ponad 100 lat jest wykorzystywana przede wszystkim jako pasza dla zwierząt gospodarskich w postaci siana i kiszzonek, szczególnie w Północnej Ameryce i Europie (Casler i in., 2000). Znajduje ona zastosowanie głównie w mieszankach traw lub traw z roślinami motylkowatymi, przeznaczonych na trwałe użytki zielone, zarówno łąki, jak i pastwiska oraz do uprawy na gruntach ornych.

Hodowlę kupkówki pospolitej równocześnie rozpoczęto w Wielkiej Brytanii i Kanadzie w latach 30. XX wieku, a nieco później w USA (van Santen i Sleper 1996). W drugiej połowie XX wieku, była ona prowadzona także z dobrym skutkiem w Polsce, szczególnie w latach 70. Mimo dużego znaczenia gospodarczego tego gatunku traw pastewnych, jego zasoby genowe na świecie są znacznie skromniejsze, niż innych roślin rolniczych. Także wiedza na temat różnorodności genetycznej obiektów zgromadzonych w kolekcjach zasobów genowych *Dactylis glomerata* L. jest ograniczona i nie wystarczająca do efektywnej hodowli w XXI wieku (Gautier i Lumaret, 1999; Peng i Zhang, 2003; Peng i in., 2008; Xie i in., 2010 a). Dotyczy to szczególnie różnorodności genetycznej cech morfologicznych i agronomicznych. Przeglądowa praca Penga i Zhanga (2003) o badaniach nad różnorodnością genetyczną w obrębie *Dactylis glomerata* L. wskazuje, że genetyczny polimorfizm tego gatunku istnieje na każdym z trzech poziomów, tj. na poziomie morfologicznym, cytologicznym i molekularnym.

Do nielicznych publikacji, zawierających wyniki badań nad różnorodnością genetyczną cech fenotypowych kupkówki, należą prace Caslera (1991), Köllikera i in. (1999) oraz Amirouche i Misset (2007). Casler (1991) wykonał badania nad zmiennością i

współmiennością plonu biomasy paszowej, wczesności, podatności na choroby oraz zadarnienia w obrębie zbiorowości tetraploidalnych obiektów rodzaju *Dactylis* L. w kolekcji zasobów genowych, pochodzących z różnych krajów świata. Większość genetycznej zmienności tych cech między rodzinami w kolekcji (73%–93%), znajdowała się w obrębie krajów pochodzenia obiektów. Stwierdzono liczne korelacje między badanymi cechami. Wiele obiektów w rozpatrywanej kolekcji wykazywało większe walory rolnicze pod względem analizowanych cech, niż prawie wszystkie odmiany uprawne, uczestniczące w tych badaniach. Kölliker i in. (1999) badali zróżnicowanie trzech szeroko uprawianych odmian każdego z trzech gatunków traw pastewnych, tj. kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.), kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.) i życicy trwałej (*Lolium perenne* L.), za pomocą markerów RAPD oraz cech rozwoju wegetatywnego. Określili oni zmienność genetyczną wewnątrz odmian oraz porównali poziom zróżnicowania między odmianami. Genetyczna zmienność wewnątrz odmian kupkówki pospolitej, oparta na markerach RAPD, była większa, niż wewnątrz odmian kostrzewy łąkowej i życicy trwałej. Te badania wskazują na odmienne relacje zmienności wewnątrz- i międzyodmianowej rozpatrywanych gatunków traw pastewnych, co może mieć konsekwencje dla adaptacyjności i trwałości poszczególnych odmian. Amirouche i Misset (2007) analizowali zróżnicowanie cech morfologicznych i cytologicznych między 30. populacjami rodzaju *Dactylis* L. z Algierii aby rozpoznać jego różnorodność i podjąć próbę dokonania systematyki. Wykryto kilka podgatunków zarówno di- jak i tetraploidalnych.

Nieco więcej badań wykonano nad różnorodnością genetyczną obiektów kupkówki pospolitej w niektórych kolekcjach zasobów genowych, pochodzących z różnych regionów świata, stosując metodykę opartą na markerach molekularnych (Peng i in., 2008; Zeng i in., 2008; Xie i in., 2010 a,b). Peng i in., (2008) określili genetyczną różnorodność i pokrewieństwo za pomocą markerów AFLP, między 32 dzikimi obiektami kupkówki pospolitej, pozyskanymi w Chinach oraz 2 obiektami z USA. Xie i in. (2010 a) określili filogenetyczne związki między i wewnątrz 16 obiektami pozyskanymi z Chin, Rosji, Kazachstanu, Indii i Japonii, posługując się markerami SSR. Stwierdzono wysoki stopień genetycznej różnorodności badanego materiału. Analiza wariancji (AMOVA) wykryła większą genetyczną zmienność wewnątrz obiektów (65,75%) i regionów geograficznych (75,58%), niż między nimi. Wykryto także wyższy stopień genetycznej zmienności w obrębie grupy obiektów tetraploidalnych, niż grupy obiektów diploidalnych. Badane obiekty zostały podzielone na dwa główne skupienia. Wszystkie obiekty tetraploidalne, pochodzące z różnych regionów były włączone do tego samego skupienia, natomiast obiekty diploidalne zostały zaliczone do dwóch innych skupień. Te wyniki klasyfikacji według poziomu ploidalności i pochodzenia geograficznego są w pełni zgodne z rezultatami badań Penga i in. (2008). Uzyskany dendrogram był zgodny z tym uzyskanym dla zmienności cech morfologicznych i agronomicznych, podobnie jak w badaniach Zenga i in. (2008). Xie i in. (2010b) oceniali zróżnicowanie genetyczne między 74 obiektami kupkówki pospolitej, za pomocą zbożowych markerów EST-SSR i markerów SSR z kupkówki. Znacząca odmienność genetyczna została wykryta między obiektami z Ameryki i Oceanii. Stwierdzono, że warunki ekogeograficzne mogły być kluczowymi czynnikami

różnorodności genetycznej kupkówki. Badania wykazały także, że północna Afryka, Europa i Azja o klimacie umiarkowanym mogą być centrami różnicowania kupkówki.

Kupkówka pospolita, obok wiechliny łąkowej, kostrzewy czerwonej, tymotki łąkowej oraz śmiałka darniowego, należy do najczęściej występujących traw na terenach łąkowych Polski. Aby chronić i charakteryzować różnorodność genetyczną kupkówki pospolitej, w Ogrodzie Botanicznym Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy założono w 1972 roku kolekcję zasobów genowych (bank genów) tego gatunku (Majtkowski i in., 2003). Ze zgromadzonych obiektów, po ich uprzednim zwaloryzowaniu, zbierano nasiona, które były przekazywane do polskiego banku nasion w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie. W tym banku zgromadzono 6172 obiektów (co stanowi 68,2% europejskich zasobów genowych tego gatunku) (Żurek i in., 2003). Kolekcja zawiera odmiany uprawne, odmiany lokalne, klony hodowlane oraz ekotypy. Dla dużej części zgromadzonych obiektów w wymienionej kolekcji, zebrano dane z polowych obserwacji dla ilościowych cech morfologicznych, fenologicznych i agronomicznych, określone w skali ciągłej, odpowiedniej dla każdej z nich. Wymienione obserwacje cech były dokonane w czasie uprawy obiektów w celu ich regeneracji w jednym środowisku na polu Ogrodu Botanicznego IHAR w Bydgoszczy (Schmidt 1985, 1987, 2002). Jednakże, zmienność obiektów na podstawie zebranych danych została przeanalizowana tylko fragmentarycznie, w odniesieniu do wybranych grup obiektów i cech, za pomocą jednocechowych metod statystycznych (Schmidt 1985, 1987, 2002). Nie wykonano dotychczas wielocechowej analizy różnorodności zgromadzonych obiektów. Celem tej pracy jest jedno- i wielowymiarowa analiza zmienności genotypowej ośmiu ilościowych cech rolniczych w obrębie 1971 obiektów kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.), przeważnie polskich, należących do wymienionej wyżej kolekcji zasobów genowych. W pracy położono nacisk głównie na aspekty metodyczno-statystyczne, obejmujące ilustrację zastosowania i przydatności metod wielowymiarowych do wielostronnej analizy zmienności genotypowej cech ilościowych w kolekcji zasobów genowych traw.

MATERIAŁ I METODY

Material roślinny

W tej pracy rozpatrywano ocenę zmienności 1971 obiektów, pochodzących z wymienionej polskiej kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej. W tabeli 1 przedstawiono listę 19 krajów, w tym 17 krajów europejskich oraz Iranu i Nowej Zelandii, z których pochodzą badane obiekty (w sensie miejsca hodowli odmian uprawnych, pozyskania obiektów dzikich w ekspedycji albo odmian lokalnych w gospodarstwie rolnym). Najwięcej obiektów pochodziło z Polski (88%), znacznie mniejszy udział miały obiekty z Niemiec (3,7%), Francji (1,6%) i byłej Czechosłowacji (1,5%). Nieliczne obiekty (1–3) pochodziły z 8 krajów europejskich oraz Iranu i Nowej Zelandii.

Tabela 1

Rozkład liczby obiektów w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej według kraju pochodzenia
Numbers of accessions in the studied orchardgrass germplasm collection originated from various countries

Kraj Pochodzenia Country of origin	Liczba obiektów Number of accessions	Udział obiektów Percentage of accessions (%)	Kraj Pochodzenia Country of origin	Liczba obiektów Number of accessions	Udział obiektów Percentage of accessions (%)
Polska Poland	1743	88,43	Szwajcaria Switzerland	4	0,2
Niemcy Germany	74	3,75	Dania Denmark	4	0,2
Francja France	32	1,62	Bułgaria Bulgaria	3	0,15
Była Czechosłowacja Former Czechoslovakia	29	1,47	Holandia The Netherlands	3	0,15
Węgry Hungary	17	0,86	Rumunia Romania	3	0,15
Szwecja Sweden	14	0,71	Iran Iran	2	0,1
Włochy Italy	11	0,56	Nowa Zelandia New Zealand	2	0,1
Finlandia Finland	10	0,51	Portugalia Portugal	2	0,1
Belgia Belgium	9	0,46	Ukraina Ukraine	1	0,05
Norwegia Norway	8	0,4			

Jak wspomniano we wstępie, badania obserwacyjne rozważanych w tej pracy ilościowych cech fenotypowych u 1971 obiektów w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej, wykonywano w trakcie reprodukcji tych obiektów w warunkach polowych na terenie Ogrodu Botanicznego Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy (53.174 N, 18.046 E) w trzech dwuletnich seriach w latach od 1978 do 1983. Liczba obiektów badanych w seriach dwuletnich była zróżnicowana i wynosiła: 570 obiektów w latach 1978/79, 656 obiektów w latach 1980/81 i 745 obiektów w latach 1982/83. W każdej serii badań oceniano inny zbiór obiektów. Jednakże, we wszystkich latach obserwacji uczestniczyły te same obiekty wzorcowe, którymi były trzy odmiany uprawne, tj. Nakielska, Motycka oraz Taurus. Także nieliczne inne obiekty były badane przez więcej, niż jeden rok. Testowane obiekty w warunkach polowych w poszczególnych latach były wysadzane na pojedynczych poletkach o powierzchni 1m². Odmiany wzorcowe oceniano na takich samych pojedynczych poletkach w każdym roku, które były rozlosowane na polu doświadczalnym pomiędzy obiektami z kolekcji. We wspomnianych badaniach obserwowano osiem cech ilościowych w drugim roku od wysiewu nasion każdego z obiektów, czyli w roku rozwoju generatywnego roślin. Były to następujące cechy: wysokość roślin w fazie początku kłoszenia (cm), długość kwiatostanu (cm), długość liścia podflagowego (cm), szerokość liścia podflagowego (mm), plon zielonej masy (kg/poletko), masę 1000 ziarniaków (g), liczbę dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia, liczbę dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia.

Cztery cechy osobnicze badanych obiektów, tj. wysokość roślin w fazie początku kłoszenia, długość kwiatostanu, długość i szerokość liścia podflagowego określano za pomocą średniej z pomiarów dokonanych na próbie reprezentatywnej 10 roślin z poletka. Plon zielonej masy jest sumą pierwszego i drugiego pokosu. Masę 1000 ziarniaków dla obiektów oceniano na próbie reprezentatywnej, pobranej z plonu ziarniaków na całym poletku. Pomiar obu cech fenologicznych wykonano na podstawie roślin w mikrohanie (poletkach), przyjmując za datę pojawienia się danej fazy rozwojowej ten dzień, w którym 50% roślin osiągnęło fazę.

W wykonanych badaniach obserwacyjnych dla cech fenotypowych obiektów z badanej kolekcji, lata obserwacji można potraktować tak, jak niekompletne bloki z odmianami wzorcowymi. Następnie, całą strukturę empirycznych danych fenotypowych, pochodzących z obserwacyjnych badań wieloletnich, można potraktować jako podobną do tej, która odnosi się do zagnieżdżonego układu o blokach niekompletnych (ang. augmented randomized incomplete block design) — (Scott i Milliken, 1993; Hartung, 2006). W klasycznym (polowym) zagnieżdżonym układzie blokowym, w każdym bloku niekompletnym badany jest inny zbiór testowanych obiektów (Federer 1956, 1961, Petersen 1985; Padilla i in., 2005, 2007). Natomiast, w każdym bloku takich doświadczeń badane są te same, przynajmniej dwa, obiekty kontrolne (wzorcowe). Liczba obiektów kontrolnych może być różna w każdym bloku, jednak przynajmniej te same dwa obiekty muszą być wprowadzone do każdego bloku (Petersen 1985, Wolfinger i in., 1997; Sebolai i in., 2005; Hartung, 2006; Hooks i in., 2006). Wobec tego, obiekty testowane w doświadczeniu są oceniane w jednym powtórzeniu, zaś obiekty kontrolne, oceniane są w tylu powtórzeniach, co liczba niekompletnych bloków w doświadczeniu. W polowym doświadczeniu genetyczno-hodowlanym testowanymi obiektami mogą być linie podwojonych haploidów, wsobne linie hodowlane, mieszańce uzyskane z określonego układu krzyżowania lub obiekty w kolekcji zasobów genowych, zaś obiektami kontrolnymi, odmiany wzorcowe (Kempton i Gleeson, 1997; Sebolai i in., 2005; Hooks i in., 2006; Padilla i in., 2007). Biorąc pod uwagę podobieństwo konstrukcji zagnieżdżonego układu o blokach niekompletnych do statystycznego planu wieloletnich obserwacji z obiektami kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej, nazwiemy plan tych badań obserwacyjnych, niekompletnym układem zagnieżdżonym o postaci obiektów x lata.

Analiza statystyczna

Metodyka badania zmienności i różnorodności genetycznej dla cech ilościowych w kolekcji roślinnych zasobów genowych składa się z następujących składników: ocena wartości genotypowych (średnich z powtórzeń lub środowisk) obiektów, ocena zmienności genotypowej obiektów pod względem każdej cechy oddzielnie (ocena zmienności jednocechowej, analiza składowych głównych na cechach standaryzowanych (syntetyczna ocena zmienności wielocechowej), analiza skupień dla obiektów na standaryzowanych wartościach genotypowych cech lub kilku pierwszych ważnych składowych głównych (ocena wielocechowej różnorodności obiektów), analiza zmiennych kanonicznych na standaryzowanych wartościach genotypowych cech dla wydzielonych grup w analizie skupień (Mohammadi i Prasanna, 2003; Islam i in., 2007; Xu, 2010).

Aby wyznaczyć wartości genotypowe obiektów dla poszczególnych cech fenotypowych u wszystkich obiektów z rozpatrywanej kolekcji, przeprowadzono analizę danych pochodzących z wieloletnich obserwacji w niekompletnym układzie zagnieżdżonym o postaci y_{ij} lata na podstawie następującego modelu mieszanego analizy wariancji dla podwójnej klasyfikacji niekompletnej z jedną obserwacją w niepustej podklasie (Jahufer i in., 1997; Hartung i Piepho, 2005; Piepho i Mohring, 2005; Hartung, 2006; Pswarayi i in., 2008):

$$y_{ij} = m + g_i + r_j + e_{ij}$$

gdzie: y_{ij} jest obserwacją rozpatrywanej cechy u i -tego obiektu ($i = 1, \dots, a$) w j -tym roku ($j = 1, \dots, b$), m jest średnią ogólną, g_i jest losowym efektem głównym i -tego obiektu, r_j jest stałym efektem głównym j -tego roku, e_{ij} jest składnikiem losowym, obejmującym efekt interakcji i -tego obiektu ($i = 1, \dots, a$) z j -tym rokiem oraz błąd doświadczalny.

Losowe efekty główne dla obiektów, g_i , dotyczące każdej cechy, ze względu na niekompletność danych w klasyfikacji dwukierunkowej obiekty \times lata, zostaną oszacowane za pomocą najlepszego nieobciążonego liniowego predyktora BLUP (ang. *The Best Linear Unbiased Predictor*) — (Robinson 1991, Scott i Milliken, 1993; Wolfinger i in., 1997; Hartung, 2006; Hartung i in., 2006; Littell i in., 2006).

Do wyznaczenia wartości BLUP dla obiektowych efektów głównych, g_i , zastosowano metodę największej wiarygodności z restrycją REML (ang. *Restricted Maximum Likelihood*) — (Robinson, 1991; Wolfinger i in., 1997; Federer i in., 2001; Littell i in., 2006). Uzyskane wartości BLUP dla obiektowych efektów głównych oznaczamy za pomocą symbolu \hat{g}_i^{BLUP} .

W drugim kroku wyznaczono oceny wartości (średnich) genotypowych badanych obiektów, $m_i = m + g_i$, (Hu i in., 2000; Li i in., 2004; Hartung i Piepho, 2005; Piepho i Mohring, 2005; Wang i in., 2007), stosując następujący estymator:

$$\hat{m}_i = \hat{m} + \hat{g}_i^{BLUP}$$

gdzie: \hat{m}_i jest nieobciążoną oceną wartości (średniej) genotypowej dla danej cechy u i -tego obiektu (oceną średniej cechy i -tego obiektu w zbiorze badanych lat), \hat{m} jest oceną średniej ogólnej, \hat{g}_i^{BLUP} jest oceną BLUP losowego efektu głównego dla i -tego obiektu.

Tak wyznaczone średnie genotypowe badanych obiektów, \hat{m}_i , oparte na wartościach BLUP dla genotypowych efektów głównych każdej cechy, zostały wykorzystane do jedno- i wielocechowej oceny różnorodności genetycznej w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej, a także do dalszych prac nad badaniem efektywności proponowanych metod pobierania próby w tworzeniu kolekcji podstawowej (Jahufer i in., 1997; Hooks i in., 2006; Xu in., 2006; Pswarayi i in., 2008; Upadhyaya i in., 2009).

Wielocechowa ocenę zmienności i różnorodności genetycznej obiektów pod względem badanych cech ilościowych w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej przeprowadzono w czterech krokach. W pierwszym kroku wykonano wstępną ocenę zmienności zbioru obiektów, oddzielnie dla każdej cechy, z wykorzystaniem metod statystyki opisowej. Wyznaczono podstawowe parametry statystyczne, takie jak średnia, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności dla wszystkich 8 cech fenotypowych.

W drugim kroku przeprowadzono wielocechową ocenę zmienności obiektów za pomocą analizy składowych głównych (ang. principal component analysis, PCA). Analiza składowych głównych (zwana metodą PCA), służy do zredukowania danej liczby zmiennych pierwotnych (oryginalnych, wyjściowych, tj. obserwowanych w badaniach), opisujących badane obiekty, które są wzajemnie skorelowane w różnym stopniu, do mniejszej liczby nowych zmiennych syntetycznych (składowych głównych) wzajemnie nieskorelowanych, które są kombinacjami liniowymi zmiennych oryginalnych o możliwie największej zmienności wśród liniowych funkcji tych zmiennych oryginalnych (Krzyszowski, 1988; Johnson i Wichern, 2002; Rencher, 2002).

W praktycznych zastosowaniach metody PCA, co najmniej niektóre składowe główne są znacząco skorelowane z pewnymi podzbiorami zmiennych oryginalnych. Każda ze składowych głównych wyjaśnia (absorbuje, opisuje) określoną część międzyobiektywnej (całkowitej) zmienności wielocechowej. Jeśli stopień wyjaśnianej zmienności całkowitej badanych obiektów przez pierwsze dwie lub trzy składowe główne jest duży (przyjmuje się w praktyce, że powinien on przekraczać znacznie 50%), to możemy wystarczająco rzetelnie ocenić wielocechową zmienność badanych obiektów w dwu- lub trójwymiarowym układzie współrzędnych prostokątnych dla dwóch lub trzech pierwszych składowych głównych. Najbardziej pożądane jest rozwiązanie z dwiema składowymi głównymi, choć jest ono możliwe w przypadku występowania dość silnych korelacji między przynajmniej niektórymi zmiennymi oryginalnymi (Mohammadi i Prasanna, 2003). Zatem, główną zaletą metodyczną analizy składowych głównych jest umożliwienie uproszczonej, choć tylko akceptowalnie przybliżonej, oceny wizualnej wielocechowego zróżnicowania i podobieństwa badanych obiektów w układzie współrzędnych kartezyjskich o dwóch lub trzech wymiarach, którymi są odpowiednio dwie lub trzy składowe główne.

W analizie zmienności obiektów w kolekcjach zasobów genowych różnych gatunków roślin uprawnych analiza składowych głównych jest powszechnie stosowana do 1) syntetycznego opisu związków między cechami ilościowymi w obrębie zbioru obiektów, czyli wykrywania struktury korelacji lub czynników wspólnych, warunkujących zmienność wzajemnie silnie lub dość silnie skorelowanych podzbiorów cech, 2) wykrywania cech posiadających relatywnie największe znaczenie (udział) w wielocechowej zmienności badanych obiektów w kolekcji, czyli największą moc dyskryminacyjną, wśród wszystkich rozpatrywanych cech, 3) oceny przybliżonego zróżnicowania i podobieństwa wielocechowego badanych obiektów w układzie współrzędnych kartezyjskich o dwóch lub trzech wymiarach, którymi są odpowiednio dwie lub trzy składowe główne (Mohammadi i Prasanna, 2003; Di Giorgio i in., 2009; Upadhyaya i in., 2011 a,b,c).

W trzecim kroku przeprowadzono badanie wielocechowej różnorodności obiektów w kolekcji w postaci grupowania (klasyfikacji) obiektów za pomocą dwóch metod analizy skupień, tj. metody UPGMA (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean) na podstawie danych dotyczących „istotnych” składowych głównych uzyskanych w analizie PCA na standaryzowanych średnich genotypowych badanych obiektów dla ośmiu cech, obliczonych przy użyciu wartości BLUP (Di Giorgio i in., 2009; Upadhyaya i in., 2011 a,b). Jako miarę wielocechowego niepodobieństwa obiektów zastosowano kwadrat

odległości Euklidesowej (Casler i van Santen, 2000; Crossa i Franco, 2004; Mohammadi i Prasanna, 2003; Di Giorgio i in., 2009). Analiza skupień została przeprowadzona w dwóch fazach (Jaynes i in., 2003). W pierwszej fazie podzielono wszystkie badane obiekty w kolekcji na grupy (skupienia). Skupienia były otrzymane przez przecięcie dendrogramu w miejscu, które odpowiadało liczbie warstw (grup, skupień), wyjaśniających dominującą część (około 70%) całkowitej sumy kwadratów odchyleń pomiędzy rozpatrywanymi obiektami (Casler i van Santen, 2000; Mahalakshmi i in., 2007; Upadhyaya i in., 2009, 2011 a,b). To kryterium jest zaimplementowane w pakiecie statystycznym SAS i jest określane jako współczynnik determinacji R^2 (Ward, 1963; SAS Institute, 2004). W drugiej fazie, próbowano scharakteryzować naturę i wielocechową odrębność obiektów w każdej grupie, za pomocą podstawowych parametrów statystycznych, jak średnia, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności, obliczonych dla obiektów w każdej grupie. Taką interpretację wydzielonych jednorodnych grup obiektów można znacząco wesprzeć i wzbogacić o nowe kategorie poznawcze za pomocą kolejnej metody wielowymiarowej, którą jest analiza zmiennych kanonicznych, zwana też kanoniczną analizą dyskryminacyjną (Krzanowski, 1988; Vaylay i van Santen, 2002; Jaynes i in., 2003; Hooks i in., 2006).

Zatem, w czwartym kroku wielocechowej oceny różnorodności obiektów w kolekcji zastosowano analizę zmiennych kanonicznych (ang. canonical variate analysis, CVA), zwaną też kanoniczną analizą dyskryminacyjną (ang. canonical discriminant analysis, CDA) lub kanoniczną wielokrotną analizą dyskryminacyjną (ang. canonical multiple discriminant analysis) — (Hair i in., 1987; Krzanowski, 1988; Khattree i Naik, 2000; Johnson i Wichern, 2002; Vaylay i van Santen, 2002; Yeater i in., 2004). Głównym celem zastosowania tej wielocechowej metody jest rozpoznanie cech badanych obiektów, posiadających relatywnie (wśród badanych cech) największą moc dyskryminującą pojedyncze obiekty lub grupy obiektów oraz umożliwienie graficznej prezentacji, zwykle w dwóch wymiarach, dobrze przybliżonego wielocechowego podobieństwa obiektów lub ich grup, ze szczególnym uwzględnieniem cech o największej mocy dyskryminującej (Hair i in., 1987; Krzanowski, 1988; Rencher, 1992; Vaylay i van Santen, 2002; Yeater i in., 2004; Hooks i in., 2006).

Podobnie jak w trakcie analizy składowych głównych, w trakcie interpretacji otrzymanych wyników analizy zmiennych kanonicznych, praktycznie większą przydatność posiadają współczynniki korelacji pomiędzy zmiennymi oryginalnymi, a zmiennymi kanonicznymi, nie zaś standaryzowane współczynniki zmiennych kanonicznych (Rencher, 1992; Vaylay i van Santen, 2002; Prasanna i Mohammadi, 2003). Cechy oryginalne silnie skorelowane z pierwszą zmienną kanoniczną posiadają relatywnie największy udział w tych zmiennych kanonicznych i, przez to, relatywnie największą moc dyskryminującą grupy obiektów (Hair i in., 1987; Rencher, 1992, 2002; Krzanowski, 1988; Vaylay i van Santen, 2002). Cechy silnie skorelowane z drugą i kolejnymi zmiennymi kanonicznymi posiadają odpowiednio mniejszą moc dyskryminującą grupy obiektów.

W prezentowanych badaniach, analizę składowych głównych wykonano na podstawie macierzy kowariancji w próbie standaryzowanych średnich genotypowych badanych obiektów dla ośmiu cech, obliczonych przy użyciu wartości BLUP, tj. na podstawie

macierzy korelacji, \mathbf{R} , średnich genotypowych badanych obiektów, \hat{m}_i , w skalach pierwotnych (Johnson i Wichern, 2002; Hooks i in., 2006), posługując się procedurą SAS PROC PRINCOMP (SAS Int., 2004).

Analiza zmiennych kanonicznych w prezentowanych badaniach była wykonana za pomocą procedury SAS PROC CANDISC (SAS Int., 2004) dla otrzymanych grup przy użyciu obu metod analizy skupień. W tej analizie były wzięte także standaryzowane średnie genotypowe $N = a$ obiektów, podzielonych na skupienia, dla ośmiu rozpatrywanych cech fenotypowych, podobnie jak w analizie składowych głównych.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zmienność jednocechowa

W tabeli 2 przedstawiono wartości podstawowych parametrów statystycznych (średniej, odchylenia standardowego, współczynnika zmienności (CV%), wartości maksymalnej i minimalnej) dla badanych cech w kolekcji 1971 obiektów kupkówki pospolitej.

Tabela 2

Charakterystyka zmienności genetycznej pod względem 8 fenotypowych cech ilościowych w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej pod względem 8 cech
Summary statistics for the 8 quantitative traits recorded in the studied orchardgrass germplasm collection

Cechy Traits	Średnia Mean	Odchylenie standardowe SD	Współczynnik zmienności CV%
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	60,44	14,81	24,5
Długość kwiatostanu (cm) Inflorescence length (cm)	15,1	2,52	16,7
Długość liścia podflagowego (cm) Leaf length (cm)	22,93	0,83	3,61
Szerokość liścia podflagowego (cm) Leaf width (cm)	0,8	0,02	2,27
Plon zielonej masy (kg /poletko) Total seasonal yield (kg per plot)	2,65	0,88	33,05
Masa 1000 ziarniaków (g) 1000 kernel weight (g)	1,16	0,16	14,23
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia Number of days to inflorescence emergence (since the 1 st April)	52,34	0,91	1,74
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia Number of days to flowering (since the 1 st April)	67,06	0,81	1,21

Największą zmiennością charakteryzował się plon zielonej masy (CV% równy 33,05%) oraz wysokość roślin (CV% równy 24,5%). Także znacząco dużą zmiennością charakteryzowały się długość kwiatostanu (CV% równy 16,70%) oraz masa 1000 ziarniaków (CV% równy 14,23). Wyniki te wskazują, że obiekty zgromadzone w krajowej kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej odznaczają się znaczną różnorodnością genetyczną dla cech produktywności rolniczej, tj. plonu zielonej masy oraz ważnych cech

plonotwórczych względem biomasy pastewnej i plonu nasion na roślinie, czyli wysokości roślin, długości kwiatostanu (skorelowanej z liczbą ziarniaków w kwiatostanie) i masy 1000 ziarniaków. Małą zmienność obiektów stwierdzono dla długości i szerokości liścia podflagowego (CV% równy odpowiednio 3,61 oraz 2,27), a szczególnie dla liczby dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia i do początku kwitnienia (CV% równy odpowiednio 1,75% oraz 1,21%). Stwierdzone w prezentowanych badaniach duże wyrównanie obiektów kupkówki pospolitej pod względem dwóch cech fenologicznych, mogą wynikać z faktu, że większość z nich pochodzi z tej samej strefy klimatycznej, do której zostały przystosowane na drodze ewolucji w warunkach naturalnych. Annese i in. (2006) również stwierdzili małą różnorodność pod względem liczby dni do początku kwitnienia (wartość współczynnika zmienności kształtowała się na poziomie 2,8%) w kolekcji obiektów kupkówki pospolitej, zebranych w południowych Włoszech.

Analiza składowych głównych

W celu wykrycia cech posiadających relatywnie największe znaczenie w ogólnej (wielocechowej) zmienności badanych obiektów, czyli największą moc dyskryminacyjną wśród wszystkich rozpatrywanych cech w kolekcji kupkówki pospolitej, przeprowadzono analizę składowych głównych. Dla pierwszych trzech składowych głównych wartości własne macierzy korelacji 8 cech były wyższe od jedności (tab. 3).

Trzy pierwsze składowe główne wyjaśniały 69,58% zmienności ogólnej między obiektami. Pierwsza składowa główna wyjaśniała 34,48% ogólnej zmienności obiektów, druga składowa wyjaśniała 20,02%, a trzecia 15,08% tej zmienności w kolekcji kupkówki pospolitej. Z pierwszą składową główną relatywnie (wśród badanych cech) najsilniej ujemnie skorelowane były cztery cechy, tj. wysokość roślin ($r = -0,49$), długość kwiatostanu ($r = -0,48$) i liścia podflagowego ($r = -0,45$) oraz plon zielonej masy ($r = -0,41$).

Z jednakowego znaku współczynnika korelacji między każdą z wymienionych cech i pierwszą składową główną wynika, że te cechy były dość silnie wzajemnie skorelowane dodatnio. Zatem, pierwsza składowa główna wskazuje na istnienie tzw. wspólnego czynnika genetycznego, który warunkował jednocześnie zmienność plonu zielonej masy w drugim roku wegetacji (pierwszego roku rozwoju generatywnego roślin) i skorelowanych z nim oraz wzajemnie skorelowanych trzech wymienionych składowych plonu w badanej kolekcji. Ten wspólny czynnik genetyczny (rozumiany jako zespół poligenów) poprzez plejotropowe i (lub) sprzężone dziedziczenie był odpowiedzialny w największym stopniu za ogólną zmienność pod względem 8 cech między obiektami w kolekcji.

Z konstrukcji pierwszej składowej głównej wynika także, że wymienione 4 cechy, skorelowane relatywnie znacząco z tą składową główną, miały największe znaczenie w ogólnej (wielocechowej) zmienności obiektów zgromadzonych w badanej kolekcji, czyli najbardziej dyskryminowały te objekty. Większość tych cech odznaczała się relatywnie dużym współczynnikiem zmienności, czyli dużą zmiennością międzyobiekтовую (tab. 2).

Tabela 3

Współczynniki korelacji między badanymi cechami, a każdą z trzech pierwszych składowych głównych oraz wartości własne macierzy korelacji i procent ogólnej zmienności międzyobiektywnej wyjaśnionej przez te składowe główne

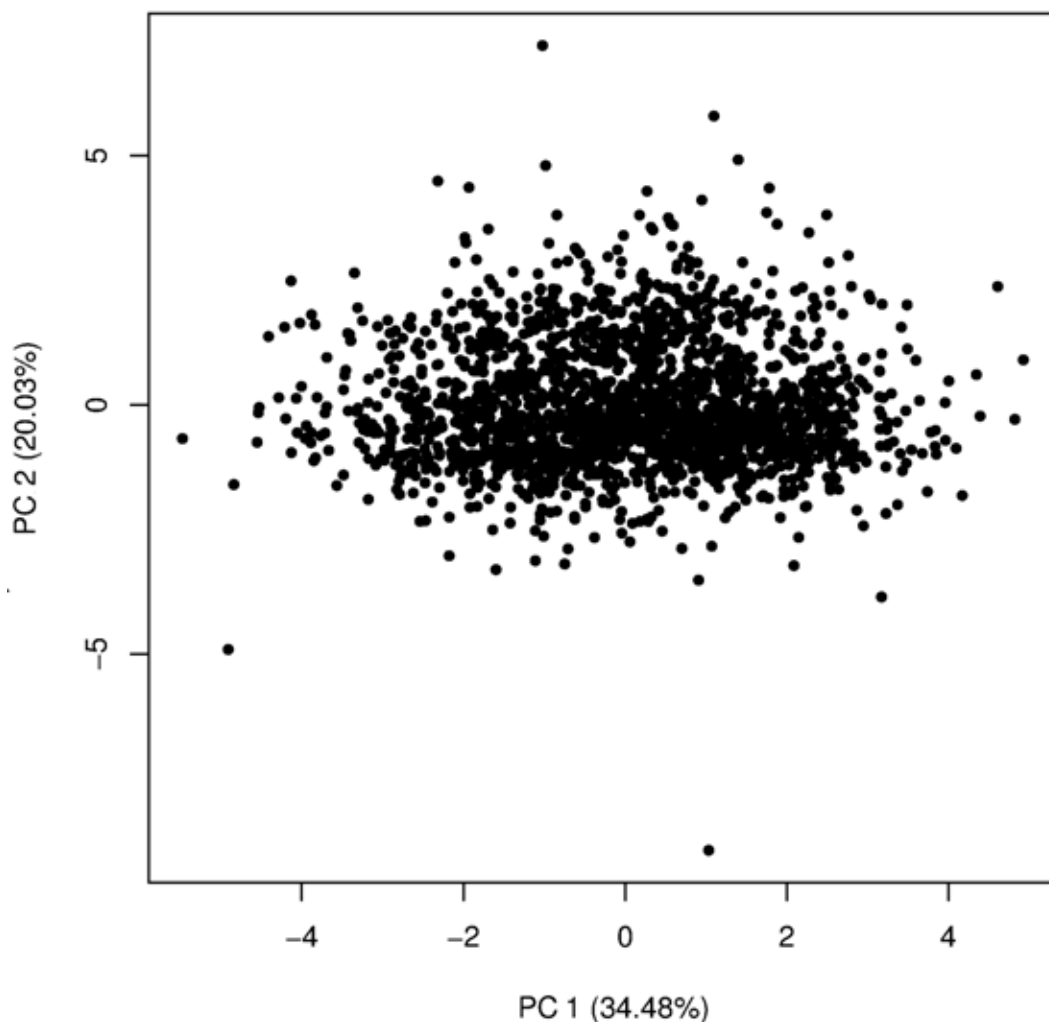
Correlation coefficients between the first three principal components and the observed traits, including also the percent of the explained total variation among the accessions

Cecha Traits	Składowa główna Principal components		
	PC1	PC2	PC3
Wysokość roślin Plant height (cm)	-0,49	-0,16	0,29
Długość kwiatostanu Inflorescence length (cm)	-0,48	-0,05	-0,26
Długość liścia podflagowego Leaf length (cm)	-0,45	0,14	-0,24
Szerokość liścia podflagowego Leaf width (cm)	-0,27	0,06	-0,68
Plon zielonej masy (kg /poletko) Total seasonal yield (kg per plot)	-0,41	-0,17	0,43
Masa 1000 ziarniaków (g) 1000 kernel weight (g)	-0,22	-0,38	0,21
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia Number of days to inflorescence emergence (since the 1 st April)	-0,17	0,63	0,14
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia Number of days to flowering e (since the 1 st April)	-0,12	0,61	0,28
Wartość własna macierzy korelacji 8 cech Eigenvalues of the correlation matrix for the 8 traits	1,66	1,27	1,10
Procent wyjaśnionej zmienności ogólnej The percent of the explained total variation	34,48	20,02	15,08
Skumulowany procent wyjaśnionej zmienności The cumulative percent of the explained total variation	34,48	54,50	69,58

Druga składowa główna była relatywnie najsilniej dodatnio skorelowana z dwiema cechami fenologicznymi, tj. z liczbą dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia i kwitnienia (odpowiednio $r = 0,63$ i $r = 0,61$). Druga składowa główna warunkowała cechy fenologiczne, więc można ją nazwać czynnikiem genetycznym odpowiedzialnym za długość okresu wegetacji obiektów, pochodzących z kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej. Natomiast, trzecia składowa główna była najsilniej ujemnie skorelowana ($r = -0,68$) z szerokością liścia podflagowego. Te wyniki wskazują, że cechy określające długość okresu wegetacji obiektów oraz szerokość liścia podflagowego miały znacznie mniejsze w ogólnej zmienności obiektów zgromadzonych w badanej kolekcji, czyli mniej dyskryminowały te obiekty, niż 4 cechy określające produktywność zielonej masy w pierwszym roku rozwoju generatywnego roślin.

Rozmieszczenie obiektów w badanej kolekcji kupkówki pospolitej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych przedstawiono na rysunku 1. Każdy punkt na wykresie odpowiada konkretnemu obiektowi, pochodzącemu z tej kolekcji. Odległość między punktami określa w przybliżeniu wielocechowe podobieństwo pomiędzy obiektami pod względem 8 badanych cech. To przybliżenie podobieństwa obiektów jest umiarkowane, z racji tego, że dwie pierwsze składowe główne wyjaśniają około 54% ogólnej zmienności między obiektami. Zatem, im dwa obiekty są bliżej siebie na rysunku 3, tym ich wartości

dla rozpatrywanych cech są bardziej zbliżone do siebie, takie obiekty charakteryzują się dużym podobieństwem (małym zróżnicowaniem).



Rys. 1. Rozmieszczenie 1971 obiektów w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych, PC1 i PC2

Fig. 1. Scatter plot of 1971 accessions of orchardgrass germplasm on the plane of the first two principal components, PC1 and PC2

Obiekty znacznie oddalone od siebie na wykresie dwóch pierwszych składowych głównych, są mało podobne do siebie, charakteryzują się one dużym zróżnicowaniem. Większość obiektów zgromadzonych w badanej kolekcji charakteryzowała się wartościami dla pierwszej i drugiej składowej głównej w okolicach zera. To znaczy, że charaktery-

zowały się one wartościami bliskimi średnich dla cech znacząco skorelowanych z tymi składowymi głównymi. Ponadto, na rysunku 1 jest zobrazowany rozkład częstości obiektów pod względem każdej z dwóch pierwszych składowych głównych, który jest zbliżony do rozkładu normalnego. Ten fakt podkreśla wyraźnie dobrą reprezentatywność analizowanej kolekcji kupkówki pospolitej w stosunku do zasobów genowych tego gatunku roślin.

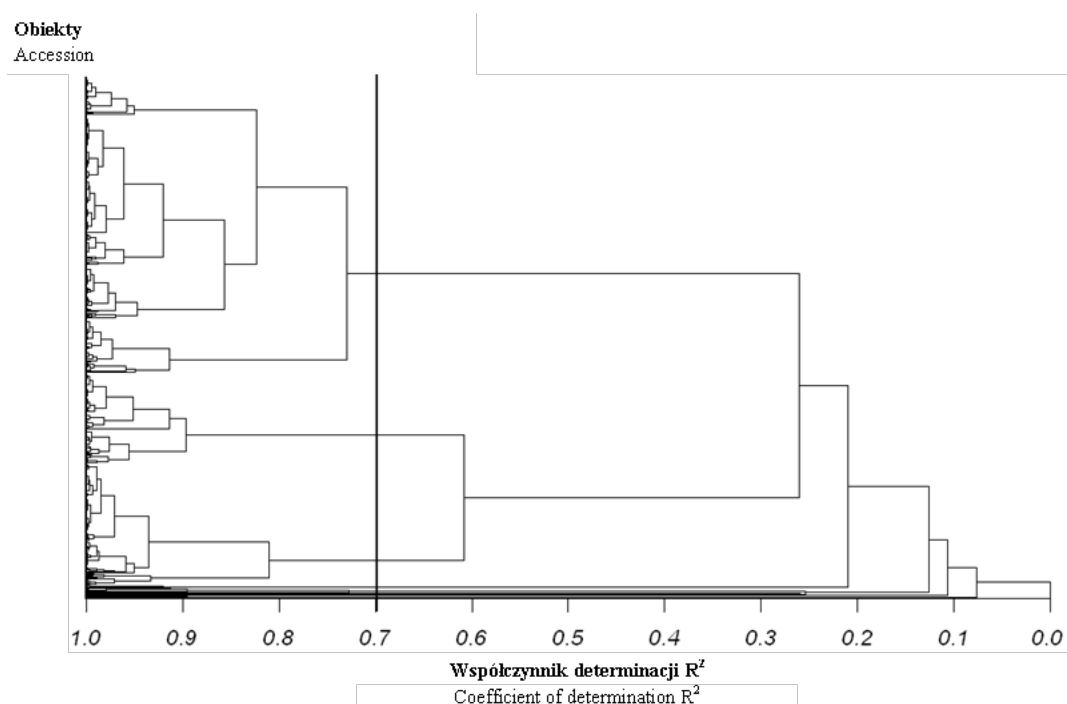
Obiekty posiadające ujemne wartości pierwszej składowej głównej charakteryzowały się wartościami powyżej średniej, czyli relatywnie dużymi, dla cech znacząco skorelowanych ujemnie z tą składową główną, tj. wysokości roślin, długości kwiatostanu i liścia podflagowego oraz plonu zielonej masy, które odznaczały się relatywnie dużą zdolnością dyskryminacyjną. Natomiast, obiekty posiadające dodatnie wartości pierwszej składowej głównej charakteryzowały się wartościami poniżej średniej dla wymienionych wyżej cech. Druga składowa główna rozróżnia obiekty szczególnie pod względem liczby dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia i kwitnienia, które są z nią najsilniej skorelowane dodatnio. Zatem, Obiekty, dla których stwierdzono ujemne wartości pierwszej składowej, a dodatnie dla drugiej składowej (lewa górna ćwiartka w układzie współrzędnych na rysunku 1), charakteryzowały się relatywnie dużymi wartościami dla wysokości roślin, długości kwiatostanu i liścia podflagowego, plonu zielonej masy oraz dwóch cech fenologicznych. Obiekty, dla których punkty leżą w prawej dolnej ćwiartce w układzie współrzędnych na rysunku 1 odznaczały się relatywnie małymi wartościami wszystkich sześciu wymienionych cech o najwyższej zdolności dyskryminacyjnej. Natomiast obiekty, dla których punkty leżą w prawej górnej i lewej dolnej ćwiartce w układzie współrzędnych na rysunku 1 odznaczały się wartościami o relatywnie przeciwnych kierunkach dla cech skorelowanych znacząco z pierwszą i drugą składową główną. Warto zauważyć także, że frekwencja obiektów każdej ćwiartce rysunku 1 jest podobna.

Analiza składowych głównych pozwoliła wskazać te obiekty, które posiadają zróżnicowane (odmienne, różnorodne) i przeciwstawne wartości badanych cech. Takie obiekty mogą być wartościowymi, komplementarnymi, formami rodzicielskimi w programach hodowlanych kupkówki pospolitej.

Grupowanie obiektów w kolekcji

W wyniku analizy skupień, przeprowadzonej metodą UPGMA, dla 1971 obiektów w kolekcji kupkówki pospolitej, uzyskano dendrogram (rys. 2), określający kolejne aglomeracje (fuzje) tych obiektów w skupienia. Badane obiekty zostały podzielone na 10 skupień, czyli grup (warstw). Między-grupowa suma kwadratów odchyleń dla tego podziału obiektów na grupy wyjaśniała 70% całkowitej sumy kwadratów odchyleń między obiektami (Casler i van Santen, 2000; Mahalakshmi i in., 2007; Upadhyaya i in., 2009, 2011 a,b). Liczba obiektów w poszczególnych grupach wahała się w zakresie od 1118 obiektów w grupie I do jednego obiektu w grupach VIII, IX, X (tab. 4). Natomiast, zbiór badanych obiektów podzielono na 5 grup, stosując metodę Warda analizy skupień. Wyniki tworzenia skupień różnych krokach aglomeracji obiektów i grup przedstawiono w formie dendrogramu na rysunku 2. Zmienność pomiędzy pięcioma grupami wyjaśniała 70% całkowitej sumy kwadratów odchyleń między obiektami, podobnie jak w przypadku podziału obiektów na dziesięć grup za pomocą metody UPGMA. Liczebność utworzonych

grup kształtowała się w zakresie od 552 obiektów w warstwie I, do 171 obiektów w warstwie V (tab. 4).



Rys. 2. Dendrogram prezentujący 1971 obiektów kupkówki pospolitej, podzielonych za pomocą metody UPGMA analizy skupień

Fig. 2. Fig. 2. UPGMA clustering tree relating the 1971 orchardgrass accessions

Tabela 4

Liczba obiektów w poszczególnych grupach wydzielonych za pomocą metody UPGMA analizy skupień
Number of accessions in groups as revealed using the UPGMA clustering method

Grupa Groups	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Liczba obiektów Number of accessions	1118	14	800	20	5	6	5	1	1	1

Różne metody analizy skupień oprócz odmiennych podstaw matematycznych, posiadają różne właściwości aplikacyjne (Crossa i Franco, 2004; Padilla i in., 2007). Metoda UPGMA posiada zdolność dzielenia obiektów na większą liczbę grup, których liczebność jest bardzo zróżnicowana. Przy użyciu tej metody zazwyczaj wydziela się od 1 do 3 grup, zawierających ponad połowę grupowanych obiektów, pozostałe grupy są znacznie mniej liczne.

Analiza zmiennych kanonicznych

Analizę zmiennych kanonicznych przeprowadzono w celu wyznaczenia cech najsilniej różnicujących (dyskryminujących) grupy obiektów, uzyskane za pomocą metody UPGMA analizy skupień, a także w celu przedstawienia dobrze przybliżonego, wielocelowego podobieństwa między grupami i wewnątrz grup oraz ich charakterystyki pod względem cech najsilniej różnicujących grupy (Hair i in., 1987; Krzanowski, 1988; Yeater i in., 2004; Hooks i in., 2006).

Pierwsze dwie zmienne kanoniczne dla 10 grup obiektów, otrzymanych metodą UPGMA, wyjaśniają 91,21% zmienności wielocelowej (w kategoriach odległości Mahalanobisa) między utworzonymi grupami, zaś tylko jedna, pierwsza, zmienna kanoniczna wyjaśnia aż 73,55% tej zmienności (tab. 5). Pierwsza zmienna kanoniczna była najsilniej dodatnio skorelowana z wysokością roślin ($r = 0,47$) oraz z liczbą dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia ($r = 0,50$). Te dwie cechy były w największym stopniu odpowiedzialne za zróżnicowanie między 10. grupami, na które podzielono 1971 obiektów w kolekcji kupkówki pospolitej, stosując metodą UPGMA. Druga zmienna kanoniczna była znacząco skorelowana tylko z liczbą dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia ($r = 0,42$). Zatem, ta cecha w znacznie mniejszym stopniu decydowała o wydzieleniu (zróżnicowaniu) grup obiektów, ponieważ druga zmienna kanoniczna wyjaśniała tylko 17,87% zmienności wielocelowej między 10. utworzonymi grupami.

Zatem, dwie spośród sześciu cech o relatywnie największej mocy dyskryminacyjnej pomiędzy obiektami w kolekcji kupkówki pospolitej, miały także relatywnie największą moc dyskryminacyjną pomiędzy 10. grupami obiektów. Tymi cechami są liczba dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia oraz wysokość roślin. Zwykle nie te same cechy wykazują relatywnie największą moc dyskryminacyjną pomiędzy obiektami i grupami obiektów otrzymanymi z analizy skupień (Islam i in., 2007). Rozmieszczenie obiektów w kolekcji kupkówki pospolitej podzielonych na 10 grup metodą UPGMA przedstawiono na rysunku 6 w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych.

Rysunek 3 obrazuje wielocelowe podobieństwo między grupami obiektów wydzielonymi za pomocą analizy skupień oraz wewnątrz grup. Krzanowski (1988) zaobserwował, że metoda UPGMA tworzyła grupy charakteryzujące się dużą wewnątrz-grupową jednorodnością obiektów. Grupy wydzielone tą metodą składały się z obiektów wielocelowo bardziej podobnych do siebie, niż te wydzielone za pomocą innych stosowanych metod analizy skupień. Na podstawie wykonanych badań nad empirycznym porównaniem efektywności dwóch metod analizy skupień, najczęściej stosowanych do oceny różnorodności genetycznej w kolekcjach roślinnych zasobów genowych, można uznać metodę UPGMA za bardziej skuteczną w takiej ocenie, niż metoda na przykład metoda Warda. Dotychczas przeprowadzone badania porównawcze metod analizy skupień, wykorzystywanych do klasyfikacji obiektów genetycznych roślin uprawnych na podstawie obserwacji cech fenotypowych, potwierdzają wyniki badań Krzanowskiego (1988). Wskazują one na lepsze odzwierciedlenie struktury różnorodności obiektów przez ich podział za pomocą metody UPGMA (Crossa i Franco, 2004; Padilla i in., 2007), niż przy użyciu innych metod analizy skupień. Dla pełnej i wiarygodnej klasyfikacji obiektów na grupy jednorodne genetycznie zaleca się wykorzystanie zarówno cech ilościowych, jak i

jakościowych pochodzących z oceny fenotypowej, czy też łączenie informacji pochodzących z oceny cech fenotypowych i własności genetycznych, dokonanej za pomocą metod inżynierii genetycznej (Franco i in., 1998; Crossa i Franco, 2004).

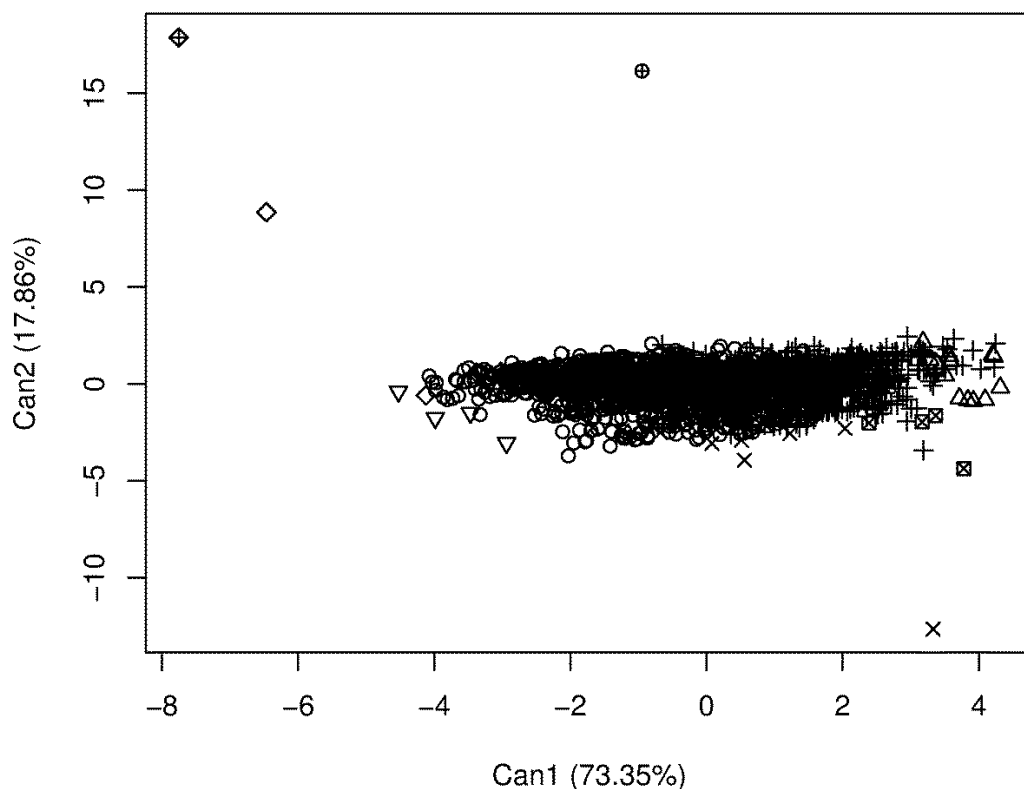
Charakterystyka wielocechowa grup obiektów

W tabeli 6 przedstawiono średnie rozpatrywanych cech dla obiektów zaliczonych do każdej grupy. Grupa 1 zawiera obiekty będące zarówno ekotypami jak i odmianami uprawnymi zebrane w Europie ale także poza nią, posiadające przeważnie ujemne, ale także dodatnie wartości dla pierwszej zmiennej kanonicznej (rys. 3). Biorąc pod uwagę dodatnie skorelowanie tej zmiennej kanonicznej z wysokością roślin i liczbą dni do kwitnienia (tab. 5), wnioskujemy, że obiekty z tej grupy charakteryzowały się relatywnie średnimi wartościami dla tych najbardziej dyskryminujących cech fenotypowych (widać to także w tabeli 6).

Tabela 5

Współczynniki korelacji między cechami, a każdą z dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych oraz wartości własne i procent wyjaśnionej zmienności między utworzonymi grupami za pomocą metody UPGMA analizy skupień
Correlation coefficients between the first two canonical variables and the observed traits, including also the percent of the explained total variation between the 10 groups distinguished using UPGMA clustering method

Cecha Traits	Zmienne kanoniczne — Canonical variables	
	Can1	Can2
Wysokość roślin Plant height (cm)	0,47	0,15
Długość kwiatostanu Inflorescence length (cm)	0,34	0,13
Długość liścia podflagowego Leaf length (cm)	0,22	0,10
Szerokość liścia podflagowego Leaf width (cm)	0,29	0,01
Plon zielonej masy (kg /poletko) Total seasonal yield (kg per plot)	0,16	0,11
Masa 1000 ziarniaków (g) 1000 kernel weight (g)	0,12	-0,01
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia Number of days to inflorescence emergence (since the 1 st April)	0,17	0,42
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia Number of days to flowering (since the 1 st April)	0,50	-0,02
Wartość własna Eigenvalues	1,61	1,42
Procent wyjaśnionej różnorodności między skupieniami The percent of the explained diversity among clusters	73,35	17,87
Skumulowany procent wyjaśnionej różnorodności między skupieniami Cumulative percent of the explained diversity among clusters	73,35	91,22



- Grupa / Group 1 ◇ Grupa / Group 5 ◆ Grupa / Group 9
- △ Grupa / Group 2 ▽ Grupa / Group 6 ● Grupa / Group 10
- + Grupa / Group 3 ■ Grupa / Group 7
- × Grupa / Group 4 * Grupa / Group 8

Rys. 3. Rozmieszczenie 1971 obiektów w kolekcji kupkówki pospolitej w układzie dwóch pierwszych zmiennych kanonicznych (Can1 i Can2), otrzymanych dla 10 grup wydzielonych za pomocą metody UPGMA analizy skupień

Fig. 3. Scatter plot for 1971 accessions of orchardgrass germplasm on a plane of the first two canonical variables (Can1 and Can2) obtained for 10 groups distinguished using UPGMA cluster analysis

Grupa 2 zawiera ekotypy pochodzące z europy środkowo-wschodniej, posiadające duże dodatnie wartości dla pierwszej zmiennej kanonicznej i przeciętne wartości (bliskie zera) dla drugiej zmiennej kanonicznej. Obiekty pochodzące z tej grupy odznaczały się największą wysokością roślin (średnio 72,57 cm) spośród wydzielonych grup obiektów w kolekcji oraz dość późno zakwitły (średnia grupowa liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosiła 67,7), są to cechy znacząco skorelowane dodatnio z pierwszą zmienną kanoniczną. Obiekty z grupy 3 w większości posiadają dodatnie wartości dla pierwszej

zmiennej kanonicznej oraz bliskie zero wartości dla drugiej zmiennej kanonicznej. Obiekty z tej grupy odznaczały się relatywnie dużą wysokością roślin (średnia grupowa wynosiła 71,35 cm) oraz jednym z najdłuższych okresów wegetacji (średnia grupowa liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosiła 67,34), podobnie jak obiekty w grupie 2. W skład tej grupy wchodziły zarówno ekotypy, jak i odmiany pochodzące z obszaru Polski oraz różnych regionów Europy. W tej grupie znalazły się także odmiany wzorcowe: Nakielska i Motycka.

Obiekty z grupy 4 pochodziły z obszaru Polski, głównie zaś ekotypy z terenów dzisiejszych trzech województw, tj. kujawsko-pomorskiego, pomorskiego oraz warmińsko-mazurskiego. Do tej grupy została włączona także trzecia odmiana wzorcowa, Taurus. Obiekty z grupy 4 charakteryzowały się dodatnimi wartościami pierwszej zmiennej kanonicznej oraz ujemnymi dla drugiej zmiennej kanonicznej. Obiekty z tej grupy wyróżniały się najpóźniejszym kwitnieniem (średnia grupowa liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosiła 69,9) spośród wszystkich grup obiektów w rozpatrywanej kolekcji kupkówki pospolitej, przy jednym z najniższych średnich wartości dla liczby dni od 1 kwietnia do kłoszenia (52,63).

Tabela 6

Charakterystyka fenotypowa 10. grup obiektów w kolekcji kupkówki pospolitej
Phenotypic characterization of the 10 groups in orchardgrass germplasm collection

Cechy Traits	Średnie obiektów w grupach — Mean of accession in group									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wysokość roślin Plant height (cm)	52,87	78,74	71,35	46,07	41,58	41,17	49,59	39,70	74,94	96,04
Długość kwiatostanu Inflorescence length (cm)	13,92	19,91	16,73	13,69	13,15	9,15	16,79	17,32	15,85	26,95
Długość liścia podflagowego Leaf length (cm)	22,58	24,86	23,41	22,74	22,30	20,92	23,92	22,94	21,95	25,97
Szerokość liścia podflagowego Leaf width (cm)	0,79	0,83	0,80	0,79	0,79	0,74	0,82	0,85	0,80	0,83
Plon zielonej masy (kg /poletko) Total seasonal yield (kg per plot)	2,32	3,37	3,14	1,69	0,91	2,10	2,08	1,45	3,57	3,87
Masa 1000 ziarniaków (g) 1000 kernel weight (g)	1,13	1,14	1,21	0,93	1,16	1,05	0,76	0,76	1,14	0,89
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kłoszenia Days to inflorescence emergence (since the 1 st April)	52,07	53,60	52,63	54,29	50,26	52,58	55,30	53,00	52,40	54,06
Liczba dni od 1 kwietnia do początku kwitnienia Days to flowering (since the 1 st April)	66,83	67,70	67,34	69,90	64,67	67,34	69,59	67,94	55,82	58,51

W grupie 5 zgromadzono ekotypy pochodzące z terenów Wielkopolski oraz jeden obiekt z Węgier. Grupa 5 zawierała obiekty o stosunkowo małej wysokości roślin (średnio 41,58 cm). Ekotypy zgromadzone w grupie 6 pochodziły głównie z Polski oraz po jednym obiekcie z Niemiec i Francji. Uzyskano dla nich ujemne wartości pierwszej zmiennej kanonicznej oraz bliskie zera wartości dla drugiej zmiennej kanonicznej.

Obiekty z tej grupy charakteryzowały się średnio niską wartością dla wysokości roślin (41,17 cm), oraz najkrótszym kwiatostanem (średnio 9,15 cm) spośród wszystkich wydzielonych grup obiektów w rozpatrywanej kolekcji. Obiekty z grupy 7 były ekotypami pochodzącymi z Finlandii, Norwegii, Polski oraz Rosji. Odznaczały się one stosunkowo

dużymi dodatnimi wartościami dla pierwszej zmiennej kanonicznej, przyjmowały zaś przeciętne wartości (bliskie zera) dla drugiej zmiennej kanonicznej.

Obiekty włączone do grupy 7 cechowały się późnym kwitnieniem (średnia liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosiła 69,59). Grupy 8, 9 i 10 zawierały po jednym obiekcie. Obiekt w grupie 8 będący ekotypem pochodzącym z okolic Szczecina, charakteryzował się najniższymi roślinami (39,7 cm) oraz późnym kwitnieniem (liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosił 67,94). Obiekt będący ekotypem w grupie 9 pochodził z terenów dzisiejszego województwa kujawsko-pomorskiego. Odznaczał się on najwcześniejszym terminem kwitnienia (liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia była równa 55,82). Natomiast, obiekt pochodzący z Polski, zaliczony do grupy 10, cechował się najwyższymi roślinami (96,04 cm) oraz był jednym z najpóźniej kwitnących genotypów (liczba dni od 1 kwietnia do kwitnienia wynosiła 58,51).

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych wyników, które dotyczą zmienności genotypowej ośmiu ilościowych cech rolniczych w rozpatrywanej kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej, można wyprowadzić następujące wnioski. Wysokość roślin i plon zielonej masy, są cechami o największej zmienności genotypowej spośród ośmiu badanych cech. Długość i szerokość liścia podflagowego mają, wśród badanych cech, relatywnie największe znaczenie w ogólnej (wielocechowej) zmienności obiektów, zgromadzonych w kolekcji zasobów genowych kupkówki pospolitej. Grupowanie obiektów w tej kolekcji za pomocą metody UPGMA pozwoliło utworzyć grupy o dużej wewnętrznej jednorodności i wyraźnym zróżnicowaniu międzygrupowym. Wysokość roślin, liczba dni do początku kłoszenia oraz liczba dni do początku kwitnienia miały relatywnie największe znaczenie, czyli udział w wielocechowej dyskryminacji (wydzieleniu) 10 grup obiektów w badanej kolekcji, za pomocą analizy skupień metodą UPGMA.

LITERATURA

- Amirouche N., Missot M.T. 2007. Morphological variation and distribution of cytotypes in the diploid-tetraploid complex of the genus *Dactylis* L. (*Poaceae*) from Algeria. *Plant Systematics and Evolution* 264: 157 — 174.
- Annese V., Cazzato E., Corleto A. 2006. Quantitative and qualitative traits of natural ecotypes of perennial grasses (*Dactylis glomerata* L., *Festuca arundinacea* Schreb., *Phalaris tuberosa* L., *Brachypodium rupestre* (Host) R. et S.) collected in Southern Italy. *Genetic Res. Crop Evol.* 53: 431 — 441.
- Casler M.D. 1991. Genetic variation and covariation in a population of tetraploid *Dactylis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* 81: 253 — 264.
- Casler M.D., Fales S.L., McElroy A.R. 2000. Genetic progress from 40 years of orchardgrass breeding in North America measured under hay management. *Crop Sci.* 40: 1019 — 1025.
- Casler M. D., van Santen E. 2000. Patterns of variation in a collection of meadow fescue accessions. *Crop Sci.* 40: 248 — 255
- Crossa J., Franco J. 2004. Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica* 153: 19 — 37.
- Di Giorgio G., Graziano D., Ruisi P., Amato G., Giambalvo D. 2009. Pheno-morphological and agronomic diversity among *Scorpiurus muricatus* (*Fabaceae*) natural populations collected in Sicily. *J. Agric. Sci.* 147: 411 — 422.

- Federer W.T. 1956. Augmented (or hoonuiaku) designs. *Hawaiian Planters Record* 2:191 — 208.
- Federer W.T. 1961. Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. *Biometrics* 17:447 — 473.
- Federer W.T., Reynolds M., Crossa J. 2001. Combining results from augmented designs over sites. *Agron. J.* 93: 389 — 395.
- Franco J., Crossa J., Villasenor J., Taba S., Eberhart S.A. 1998. Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Sci.* 38: 1688 — 1696.
- Gauthier M.F., Lumaret R. 1999. Genetic introgression on between tetraploid *Dactylis glomerata* sp. *reichenbachii* and *glomerata* in the French Alps. Insight from morphological and isoenzyme variation, plant systematic and evolution. *Plant Systematics and Evolution* 241: 219 — 234.
- Gutierrez L., Franco J., Crossa J., Abadie T. 2003. Comparing a preliminary racial classification with a numerical classification of the maize landraces of Uruguay. *Crop Sci.* 43: 718 — 727.
- Hair J. F., Anderson R.E., Tatham R. L. 1987. *Multivariate data analysis with readings*. 2nd ed. Macmillan Publ. Co., New York, USA.
- Hartung K. 2006. Biometrical approaches for analysing gene bank evaluation data on barley (*Hordeum spec.*). Ph.D Dissertation, Hohenheim University, Stuttgart, Germany.
- Hartung K., Piepho H.P. 2005. A threshold model for multiyear genebank data based on different rating scales. *Crop Sci.* 45:1045 — 1051.
- Hartung K., Piepho H.P., Knupffer H. 2006. Analysis of genebank evaluation data by using geostatistical methods. *Genetic Res. Crop Evol.* 53: 737 — 751
- Hooks T., Pedersen J.F., Marx D. B., Vogel K. P. 2006. Variation in the U.S. photoperiod insensitive sorghum collection for chemical and nutritional traits. *Crop Sci.* 46:751 — 757.
- Hu J., Zhu J., Xu H. 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theor. Appl. Genet.* 101:264 — 268
- Humphreys M.O. 1991. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. *Heredity* 66:437 — 443.
- Islam M. R., Hamid A., Khaliq O. A., Ahmed J. U., Haque M. M., Karim M. A. 2007. Genetic variability in flooding tolerance of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) genotypes. *Euphytica* 156: 247 — 255.
- Jahufer M. Z. Z., Cooper M., Harch B. D. 1997. Pattern analysis of the diversity of morphological plant attributes and herbage yield in a world collection of white clover (*Trifolium repens* L.) germplasm characterised in a summer moisture stress environment of Australia. *Genet. Res. Crop Evol.* 44: 289 — 300.
- Jaynes D. B., Kaspar T.C., Colvin T.S., James D.E. 2003. Cluster analysis of spatiotemporal corn yield patterns in an Iowa field. *Agron. J.* 95: 574 — 586.
- Johnson R.A., Wichern D. W. 2002. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New York, USA.
- Kempton R.A., Gleeson A.C. 1997. Unreplicated trials. In: Kempton R.A., Fox P.N. *Statistical methods for plant variety evaluation*. Chapman & Hall, London, UK: 86 — 100.
- Khattree R., Naik D. N. 2000. *Multivariate data reduction and discrimination with SAS software*. SAS Institute Inc., Cary, USA.
- Kölliker R., Stadelmann F. J., Reidy B., Nösberger J. 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L. *Euphytica* 106: 261 — 270.
- Krzanowski W.J. 1988. *Principles of multivariate analysis: a users's perspective*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Li C.T., Shi, C.H., Wu, J. G., Xu, H.M., Zhang, H. Z., Ren, Y.L. 2004. Methods of developing core collections based on the predicted genotypic value of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108: 1172 — 1176.
- Liakat A. M., McClung A. M., Jia M. H., Kimball J. A., McCouch S. R., Eizenga G. C. 2011. A rice diversity panel evaluated for genetic and agro-morphological diversity between subpopulations and its geographic distribution. *Crop Sci.* 51: 2021 — 2035.
- Littell R. C., Milligan G. A., Stroup W. W., Wolfinger R. D., Schabenberger O. 2006. *SAS for mixed models*. SAS Institute Inc. Cary, USA.

- López I. F., Balocchi O.A., Kemp P.D., Valdés C. 2009. Phenotypic variability in *Holcus lanatus* L. in southern Chile: a strategy that enhances plant survival and pasture stability. *Crop & Pasture Sci.* 60: 768 — 777.
- Mahalakshmi V., Ng Q., Atalobhor J., Ogunsola D., Lawson M., Ortiz R. 2007. Development of a West African yam *Dioscorea spp.* core collection. *Genetic Res. Crop Evol.* 54: 1817 — 1825.
- Mohammadi S. A., Prasanna M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants -salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43: 1235 — 1248.
- Majtkowski W., Żurek G., Schmidt J., Majtkowska G. 2003. Collections of grass genetic resources in Poland – source of information for distribution of species. In: Problem of grass biology Frey L. (ed.). W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków: 219 — 227.
- Padilla G., Cartea M. E., Ordas A. 2007. Comparison of several clustering methods in grouping kale landraces. *Journal of American Society for Horticultural Science* 132: 387 — 395.
- Padilla G., Cartea M. E., Rodriguez V. M., Ord A. 2005. Genetic diversity in a germplasm collection of *Brassica rapa subsp. rapa* L. from northwestern Spain. *Euphytica* 145: 171 — 180.
- Pecetti L., Annicchiarico P., Porqueddu C., Khedim A., Abdelguerfi A. 2009. Fitting germplasm types of tall fescue and orchardgrass to different cropping environments of the Mediterranean region. *Crop Sci.* 49: 2393 — 2399.
- Peng Y., Zhang X. 2003. Progress in studies on genetic diversity of *Dactylis glomerata* L. *Journal of Plant Genetic Resources* 02: 19 — 41.
- Peng Y., Zhang X.Q., Deng Y.L., Ma X. 2008. Evaluation of genetic diversity in wild orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) based on AFLP markers. *Hereditas* 145: 174 — 181.
- Petersen R. G. 1985. Augmented designs for preliminary yield trials. *ICARDA Barley Wheat and Triticale Newsletter* 4: 27 — 32.
- Piepho H. P., Mohring J. 2005. Best Linear Unbiased Prediction of cultivar effects for subdivided target regions. *Crop Sci.* 45: 1151 — 1159.
- Pswarayi A., Eeuwijk van F.A., Ceccarelli S., Grando S., Comadran J., Russell J.R., Stanca A.M., Francia E., Pecchioni N., Akar T., Al-Yassin A., Benbelkacem A., Choumane W., Karrou M., Ouabbou H., Bort J., Araus J. L., Molina-Cano J. L., Thomas W. T. B., Romagosa I. 2008. Barley adaptation and improvement in the Mediterranean basin. *Plant Breeding* 127: 554 — 560.
- Rencher A.C. 1992. Interpretation of canonical discriminant functions, canonical varieties, and principal components. *Journal of the American Statistical Association* 46: 217 — 225.
- Rencher A.C. 2002. *Methods of multivariate analysis.* J. Wiley & Sons, New York.
- Robinson G.K. 1991. That BLUP is a good thing: the estimation of random effects. *Statistical Science* 6:15 — 51.
- Rojas W., Barriga P., Figueroa H. 2000. Multivariate analysis of the genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm. *Plant Genetic Resources Newsletter* 122: 16 — 23.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS on-line Doc 9.1.3 Cary, USA.
- Schmidt J. 1985. Analiza zmienności ekotypów kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.) na podstawie materiałów z kolekcji traw. *Biul. IHAR* 158: 117 — 121.
- Schmidt J. 1987. Zmienność kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.). *Biul. IHAR* 162: 83 — 88.
- Schmidt J. 2002. The evaluation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from Bieszczady Mountains. In: Świąćicki W., Naganowska B., Wolko B. (Eds.). *Broad Variation and Precise Characterization — Limitation for the Future.* Eucarpia Section Genetic Resources, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań: 268.
- Scott R.A., Milliken G. A. 1993. A SAS program for analysing augmented randomized complete block design. *Crop Sci.* 33: 865 — 867.
- Searle S. R. 1987. *Linear models for unbalanced data.* Wiley, New York, USA.
- Sebolai B., Pedersen J. F., Marx D.B., Boykin D.L. 2005. Effect of grid size, control plot density, control plot arrangement, and assumption of random or fixed effects on non-replicated experiments for germplasm screening. *Crop Sci.* 45: 1978 — 1984.
- Upadhyaya H. D., Dwivedi S. L., Nadaf H.L., Singh S. 2011 a. Phenotypic diversity and identification of wild *Arachis* accessions with useful agronomic and nutritional traits. *Euphytica* 118: 103 — 115.

- Upadhyaya H.D., Gowda C.L.L., Reddy K.N., Singh S. 2009. Augmenting the pearl millet core collection for enhancing germplasm utilization in crop improvement. *Crop Sci.* 49: 573 — 580.
- Upadhyaya H. D., Ravishankar C.R., Narasimhudu Y., Sarma N.D.R.K., Singh S. K., Varshney S.K., Reddy V.G., Singh S., Parzies H.K., Dwivedi S.L., Nadaf H.L., Sahrawat S., Gowda C.L.L. 2011 b. Identification of trait-specific germplasm and developing a mini core collection for efficient use of foxtail millet genetic resources in crop improvement. *Field Crops Res.* 124: 459 — 467.
- Upadhyaya H.D., Reddy K.N., Gowda C. L. L., Singh S. 2011c. Development of pearl millet minicore collection for enhanced utilization of germplasm. *Crop Sci.* 51:217 — 223.
- van Santen E., Sleper D.A. 1996. Orchardgrass. p. 503–534. In: L. E. Moser et al (ed.) Cool-season forage grasses. *Agron. Monogr.* 34. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Vaylay R., van Santen E. 2002. Application of canonical discriminant analysis for the assessment of genetic variation in tall fescue. *Crop Sci.* 42: 534 — 539.
- Wang J. C., Hu J., Xu H. M., Zhang S. 2007. A strategy on constructing core collections by least distance stepwise sampling. *Theor. Appl. Genet.* 115: 1 — 8.
- Ward J. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 38: 236 — 244.
- Wolfinger R.D., Federer W.T., Cordero-Brana O. 1997. Recovering information in augmented designs, using SAS PROC GLM and PROC MIXED. *Agron. J.* 89: 856 — 859.
- Xie W.G., Zhang XQ., Cai H.W., Liu W., Peng Y. 2010 a. Diversity comparison and phylogenetic relationships of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) germplasm as revealed by SSR markers. *Canadian J. Plant Sci.* 90: 13 — 21.
- Xie W.G., Zhang XQ., Cai H.W., Liu W., Peng Y. 2010 b. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 740 — 749.
- Xu Y. 2010. *Molecular plant breeding*. CAB International, Wallingford, UK.
- Yeater K. M., Bollero G.A., Bullock D.G., Rayburn A.L., Rodriguez-Zas S. 2004. Assessment of genetic variation in hairy vetch using canonical discriminant analysis. *Crop Sci.* 44: 185 — 189.
- Zeng B., Zhang X.Q., Lan Y. 2008. Evaluation of genetic diversity and relationships in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm based on SRAP markers. *Canadian J. Plant Sci.* 88: 53 — 60.
- Žurek G., Majtkowski W. 2003. European *Dactylis* and *Festuca* database. In: Boller B., Willner E., Maggioni L., Lipman E. Report of a Working Group on Forages. Eight meeting, 10–12 April 2003, Linz, Austria. International Plant Genetic Resources Institute, Rome: 26 — 28.