

ANNA ĆWIKLIŃSKA
ZBIGNIEW BRODA
JAN BOCIANOWSKI¹

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

¹ Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Analiza porównawcza cech dzikich gatunków rodzaju *Secale* L. w celu poszerzenia zmienności genetycznej przydatnej w hodowli

Comparative analysis of the features of wild species within the genus *Secale* for widening genetic variability to be utilized in breeding

Przedmiotem badań było 12 dzikich gatunków i podgatunków żyta. Gatunkiem kontrolnym był gatunek *Secale cereale* ssp. *cereale* odmiana Walet. Obserwacje i analizy miały na celu próbę charakterystyki biologii kwitnienia, cech struktury plonu badanych roślin oraz rozpoznania terminów kwitnienia w aspekcie przydatności do krzyżowania w rodzaju *Secale* L. W tym celu przeprowadzono obserwacje i pomiary siedmiu cech fenotypowych: liczby kłosów na roślinie, liczby źdźbeł na roślinie, liczby kłosków w kłosie, liczby ziaren w kłosie, długości kłosów, zbitości kłosów, oraz żywotności ziaren pyłku. Prowadzono również obserwacje terminu i długości kłoszenia oraz kwitnienia. Zależności między cechami fenotypowymi, a markerami molekularnymi charakteryzowano przy wykorzystaniu analizy regresji. Ocena polimorfizmu DNA pozwoliła na ustalenie podobieństwa genetycznego. Cechami, które istotnie różniły gatunek uprawny od gatunków i podgatunków dzikich były: liczba kłosków w kłosie i liczba ziaren w kłosie. W roku prowadzenia obserwacji początek kwitnienia gatunków w rodzaju *Secale* L. wahał się tak, że najwcześniejszy gatunek rozpoczął kwitnienie 18.05 (*S. c.* ssp. *ancestrale*), a najpóźniejszy 16.06 (*S. strictum* ssp. *kuprijanovii*). Badane gatunki utworzyły trzy grupy podobieństwa genetycznego. Podobieństwo genetyczne w grupie I wahało się od 57% (między *S. c.* ssp. *cereale*, a *S. s.* ssp. *ciliatoglume*) do 68% (między *S. c.* ssp. *cereale*, a *S. sylvestre*), w grupie II wyniosło 55% (między *S. c.* ssp. *dighoricum* 17785, a *S. c.* ssp. *segetale*) a w grupie III wahało się od 43% (między *S. c.* ssp. *dighoricum* 5687, a *S. c.* ssp. *ancestrale*) do 82% między gatunkami (*S. vavilovii*, a *S. c.* ssp. *dighoricum* 5687).

Słowa kluczowe: biologia kwitnienia, RAPD, *Secale* sp.

The aim of the research was to analyze some characteristics of flowering biology of 12 wild species and subspecies of rye as potential candidates to be used in crossing programmes for species of the genus *Secale*. Time and length of the flowering and heading periods were determined. Moreover, the following seven yield components were characterized: number of spikes per plant, number of stalks per plant, number of spikelets per spike, number of grains per spike, spike density, spike length and viability of pollen grains. *Secale cereale* ssp. *cereale* cv. Walet was used as a reference species. Variability of phenotypic features was assessed using RAPD molecular markers. Evaluation of the DNA

polymorphism made possible to measure genetic similarity. The wild *Secale* species and subspecies under study began flowering at different dates, between May 18th (*S. c. ssp. ancestrale*) and June 16th (*S. strictum ssp. kuprijanovii*). The wild species greatly differed from the cultivar Walet in the number of spikelets per spike and in the number of grains per spike. Based on the rates of genetic similarity, the species and subspecies were classified into three groups: I. range from 57% (similarity between *S. c. ssp. cereale* and *S. s. ssp. ciliatoglume*) to 68% (*S. c. ssp. cereale* and *S. sylvestre*), II. 55% (*S. c. ssp. dighoricum 17785* and *S. c. ssp. segetale*), III. range from 43% (*S. c. ssp. dighoricum 5687* and *S. c. ssp. ancestrale*) to 82% (*S. vavilovii* and *S. c. ssp. dighoricum 5687*).

Key words: flowering biology, RAPD, *Secale* sp.

WSTĘP

Dziki gatunki i podgatunki żyta są doskonałym materiałem wyjściowym do prac mających na celu poszerzenie zmienności rekombinacyjnej w gatunku *Secale cereale* L. Wprowadzając do prac hodowlanych cenne geny cech użytkowych, których występowanie obserwuje się u dzikich gatunków żyta, przyczyniamy się do poszerzenia zmienności genetycznej, którą następnie możemy wykorzystać w hodowli.

Ważne cechy użytkowe, których występowanie zaobserwowano u dzikich gatunków żyta, to między innymi: odporność na choroby takie, jak rdza brunatna (Kobylansky, 1987) i mączniak rzekomy (Rzepka, 1988), odporność na porastanie (Rzepka, 1993), wyleganie (Rzepka, 1993) czy męska sterylność (Łapiński, 1977).

Analizy z wykorzystaniem markerów molekularnych są powszechnie stosowane do badania podobieństwa genetycznego a tym samym do ustalenia przydatności badanych obiektów do wzajemnego krzyżowania (Broda, 2004; Sztuba-Solińska, 2005). W celu przeprowadzenia takich analiz powszechnie stosuje się markery typu RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams i in., 1990) i AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism). Dla potrzeb ustalenia podobieństwa genetycznego, ze względu na niskie koszty przeprowadzenia analizy, niewielką czasochłonność i pracochłonność, badacze częściej decydują się na wykorzystanie metody z użyciem markerów RAPD, niż markerów AFLP.

Dziki gatunki żyta nie należą do szeroko opisywanych w literaturze, dlatego autorzy pracy zdecydowali się na przeprowadzenie wstępnych obserwacji biologii kwitnienia i cech struktury plonu przed wykonaniem krzyżowań z gatunkiem uprawnym.

Celem pracy było porównanie wybranych elementów biologii kwitnienia i cech struktury plonu 12 dzikich gatunków i podgatunków żyta oraz gatunku uprawnego *Secale cereale ssp. cereale* odmiany Walet. Podjęto również próbę określenia zależności między cechami fenotypowymi a markerami molekularnymi za pomocą analizy regresji.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie zostało założone we wrześniu 2006 roku na polu doświadczalnym należącym do Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego (obecnie Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu). Doświadczenie założono w układzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach. Rozstawa, w jakiej

wysiane zostały rośliny wynosiła 15 × 20 cm. Doświadczenie polowe założone było na glebie lekkiej klasy IVb odpowiedniej do uprawy żyta. Warunki pogodowe w czasie kłoszenia, kwitnienia roślin, zapylania i nalewania ziarniaków były następujące: średnia temperatura w kwietniu wynosiła 10,9°C, w maju 15,1°C, w czerwcu 19,2°C, w lipcu 18,5°C. Średnia suma opadów w kwietniu wynosiła 7,4 mm, w maju — 82,2 mm, w czerwcu — 44,3 mm oraz w lipcu — 39,6 mm.

Gatunkami i podgatunkami z rodzaju *Secale* L. wykorzystanymi do badań były: *S. c. ssp. cereale*, odmiana Walet, *S. c. ssp. afghanicum*, *S. c. ssp. ancestrale*, *S. c. ssp. dighoricum 5687*, *S. c. ssp. dighoricum 17785*, *S. c. ssp. segetale*, *S. strictum*, *S. s. ssp. africanum*, *S. s. ssp. anatolicum*, *S. s. ssp. ciliatoglume*, *S. s. ssp. kuprijanovii*, *S. vavilovii*, *S. Sylvester*. Wzorcem w prowadzonych badaniach był gatunek *Secale cereale ssp. cereale* odmiana uprawna Walet. Każdy gatunek i podgatunek reprezentowało 60 roślin. Dzikie gatunki żyta będące obiektem badań pochodziły z terenów Europy Środkowej i Wschodniej oraz Azji. Materiały roślinne pochodziły z kolekcji prowadzonej w Ogrodzie Botanicznym — Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Warszawie. Odmiana uprawna Walet wykorzystana jako wzorzec, jest polską odmianą wytworzoną przez Hodowlę Roślin DANKO w 1999 roku.

Na polu doświadczalnym prowadzono obserwacje wybranych cech struktury plonu takich, jak: liczba kłosów na roślinie, liczba źdźbeł na roślinie, liczba kłosek w kłosie, liczba ziaren w kłosie. Badano również ilościowe parametry kłosa (długość kłosów bez ostek, zbitość kłosów), oraz pobierano materiał do zbadania żywotności ziaren pyłku. Na polu doświadczalnym prowadzono również obserwację terminu i długość kłoszenia oraz kwitnienia roślin w aspekcie synchronizacji tych terminów u różnych gatunków i podgatunków żyta. Liczbę kłosów na roślinie i liczbę źdźbeł na roślinie badano na 10 roślinach w każdym gatunku i podgatunku. Liczbę kłosek w kłosie, ziaren w kłosie i długość kłosów bez ostek mierzono na 50 kłosach (po 5 kłosów na 10 roślinach).

Zbitość kłosów określona została ze wzoru (Dubas, 1997):

$$D = (n-1) \times 100/l,$$

gdzie: D oznacza zbitość kłosa, n – liczbę kłosek w kłosie, l — długość osadki kłosowej mierzonej w mm.

Do ustalenia różnic między gatunkami zastosowano skalę opisaną przez Dubasa (1997), w której zbitość <34 charakteryzowała kłosy luźne, 34–37 kłosy średnio zbite, a >37, kłosy zbite. Do określenia terminu i długości kłoszenia oraz kwitnienia roślin zastosowano skalę Zadoksa (Zadoks i in., 1974). Jest to skala 100-stopniowa, w której kłoszenie opisywane jest między 50. (widoczny wierzchołek kłosa), a 59. stopniem (cały kłos widoczny). Kwitnienie natomiast opisywane jest między 60. (ukazanie się pierwszych pylników w środkowej części najwcześniej zakwitających kłosów) i 70. stopniem (rozpoznanie pierwszych zaschniętych pylników u roślin najpóźniej zakwitających).

Żywotność ziaren pyłku określano, barwiąc je na szkiełku mikroskopowym płynem Bellinga, a następnie licząc przy użyciu mikroskopu świetlnego ziarna żywotne i nieżywotne w 10 polach widzenia. Do badań użyto mieszaniny ziaren pyłku pobranego losowo

z 5 roślin. Dla każdej cechy obliczono średnie arytmetyczne (\bar{x}) i współczynniki zmienności ze wzoru:

$$V(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100,$$

gdzie: $V\%$ oznacza współczynnik zmienności, s — odchylenie standardowe, \bar{x} — wartość średnią. Do oceny różnic między średnimi wartościami poszczególnych cech wykorzystano test Duncana.

Celem określenia współzależności obserwowanych cech przeprowadzono analizę korelacji na wartościach średnich dla obiektów. Wyniki tej analizy przedstawiono w postaci macierzy współczynników korelacji (r_{xy}).

W celu przeprowadzenia analizy markerów molekularnych RAPD, genomowy DNA z gatunków i podgatunków należących do rodzaju *Secale* L. izolowano zmodyfikowaną metodą Thompsona i Henry'ego (1995). Reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) przeprowadzano w objętości 12,5 μ l mieszaniny o następującym składzie: woda dejonizowana; 1M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl₂; BSA; 2mM dNTP; starter-5pmoli/ μ l; Taq polimeraza-5U/ μ l, ekstrakt DNA o stężeniu — 25 ng/ μ l w ilości 0,5 μ l. Elektroforezę przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 1 μ l bromku etydyny. Spośród 40 testowanych starterów do dalszych analiz wykorzystano 18. Startery wymieniono i scharakteryzowano w tabeli 1.

Tabela 1

Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm pomiędzy gatunkami i podgatunkami żyta
Primers and their nucleotide sequences creating polymorphism between rye species and subspecies

Starter Primer	Sekwencja nukleotydowa 5' – 3' Nucleotide sequence 5' – 3'
OPA 01	CAGGCCCTTC
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPA 07	GAAACGGGTG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPA 12	TCGGCGATAG
OPA 15	TTCCGACCC
OPA 20	GTTGCGATCC
OPB 10	CTGCTGGGAC
OPB 11	GTAGACCGT
OPB 17	AGGGAACGAG
OPC 18	TGAGTGGGTG
OPD 16	AGGGCGTAAG
OPG 19	GTCAGGCAA
OPH 13	GACGCCACAC
OPI 02	GGAGGAGAGG
OPJ 12	GTCCCGTGGT
OPJ 20	AAGCGGCCTC

W celu oszacowania podobieństwa genetycznego (GS) badanych obiektów wyliczono współczynniki podobieństwa według wzoru: $GS_{ab} = 2N_{ab}/(N_a + N_b)$, gdzie N_{ab} oznacza liczbę alleli obecnych zarówno u obiektu a , jak i u obiektu b , N_a — liczbę alleli obecnych u obiektu a , N_b — liczbę alleli obecnych u obiektu b (Nei i Li, 1979). Współczynniki te

posłużyły do hierarchicznego grupowania linii metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu.

Określenie wpływu obserwacji markerów molekularnych na poszczególne cechy przeprowadzono z zastosowaniem analizy regresji (Hastie i Tibshirani, 1990). Obserwacje markerów molekularnych były traktowane jako zmienne niezależne i rozpatrywane indywidualnie w modelach. Wszystkie hipotezy testowano na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wszystkie obliczenia wykonano korzystając z pakietu statystycznego GenStat v. 7.1 (Payne i in., 2003).

WYNIKI

Charakterystyka kłoszenia i kwitnienia oraz żywotności ziaren pyłku

Początek fazy kłoszenia roślin badanych gatunków mieścił się w czasie od 21.04 u gatunku *S. c. ssp. ancestrale* do 27.06, kiedy kłoszenie rozpoczynały rośliny gatunku *S. s. ssp. kuprijanovii* (tab. 2). Rośliny gatunku *Secale cereale ssp. cereale* rozpoczynały fazę kłoszenia już 30.04, a więc 27 dni wcześniej od roślin gatunku kłoszącego się jako ostatni. Długość fazy kłoszenia wahała się od 12 (dla roślin gatunku *S. vavilovii*), do 22 dni u roślin gatunków *S. strictum* i *S. s. ssp. ciliatoglume*. Średnia długość fazy kłoszenia roślin gatunków i podgatunków dzikich wyniosła 18 dni. W przypadku roślin gatunku wzorcowego kłoszenie trwało 15 dni, było więc o trzy dni krótsze niż średnia długość etapu kłoszenia roślin gatunków i podgatunków dzikich. Różnica pomiędzy długością kłoszenia roślin gatunku *Secale cereale ssp. cereale*, a roślin podgatunku *S. c. ssp. afghanicum* była istotna statystycznie (tab. 2).

Najwcześniej fazę kwitnienia rozpoczynały kłosy roślin gatunku *S. c. ssp. ancestrale* (18.05), a najpóźniej kłosy roślin gatunku *S. s. ssp. kuprijanovii* (16.06) (tab. 2). Długość okresu kwitnienia wahała się od 11 dni u roślin gatunku *S. s. ssp. anatolicum* do 20 dni u roślin gatunku *S. vavilovii* i podgatunku *S. c. ssp. segetale*. Rośliny gatunku uprawnego rozpoczynały kwitnienie 20.05, a więc tylko dwa dni później niż rośliny gatunku zakwitającego najwcześniej. Średnio u roślin gatunków i podgatunków dzikich faza kwitnienia trwała krócej niż 16 dni. Rośliny gatunku wzorcowego kwitły 17 dni (tab. 2).

Różnice między długością etapu kwitnienia roślin gatunku *S. c. ssp. cereale*, a roślin podgatunków *S. c. ssp. ancestrale* i *S. c. ssp. segetale* były istotne statystycznie. Rośliny gatunku wzorcowego kwitły istotnie dłużej niż rośliny gatunku *S. strictum* i dwóch jego podgatunków (*S. s. ssp. anatolicum* i *S. s. ssp. kuprijanovii*) oraz istotnie krócej niż rośliny gatunku *S. vavilovii* (tab. 2).

Żywotność ziaren pyłku u badanych gatunków wahała się od 64% u roślin gatunku *S. c. ssp. dighoricum 5687* do 96% u roślin gatunku *S. c. ssp. ancestrale* (tab. 3). Średnia żywotność ziaren pyłku dla gatunku *S. c. ssp. cereale* wynosiła 86%. Istotne statystycznie różnice w żywotności ziaren pyłku wystąpiły między gatunkiem wzorcowym a gatunkami i podgatunkami *S. c. ssp. afghanicum*, *S. c. ssp. ancestrale*, *S. c. ssp. dighoricum 5687*, *S. strictum*, *S. s. ssp. anatolicum*, *S. vavilovii*.

Tabela 2

Terminy i długość okresu kłoszenia i kwitnienia gatunków oraz podgatunków w rodzaju *Secale*
Dates and length of heading and flowering periods in the analyzed species and subspecies
of the genus *Secale*

Gatunek Species	Kłoszenie — Heading		Kwitnienie — Flowering	
	termin kłoszenia date of heading	długość okresu kłoszenia (dni) length of heading period (days)	termin kwitnienia date of flowering	długość kwitnienia (dni) length of flowering period (days)
<i>S. cereale</i> ssp. <i>cereale</i> (odm. — cv. Walet)	30.04-14.05	15d	20.05-6.06	17bc
<i>S. c.</i> ssp. <i>afghanicum</i>	26.04-16.05	21ab	22.05-8.06	18b
<i>S. c.</i> ssp. <i>ancestrale</i>	21.04-7.05	17c	18.05-31.05	14e
<i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 5687	1.05-17.05	17c	25.05-10.06	17bc
<i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 17785	3.05-19.05	17c	27.05-12.06	17bc
<i>S. c.</i> ssp. <i>segetale</i>	1.05-15.05	15d	20.05-8.06	20a
<i>S. strictum</i>	21.05-11.06	22a	15.06-26.06	12f
<i>S. s.</i> ssp. <i>africanum</i>	17.05-6.06	20b	10.06-24.06	15de
<i>S. s.</i> ssp. <i>anatolicum</i>	22.05-11.06	21ab	15.06-25.06	11f
<i>S. s.</i> ssp. <i>ciliatoglume</i>	6.05-27.05	22a	3.06-17.06	15de
<i>S. s.</i> ssp. <i>kuprijanovii</i>	27.05-13.06	18c	16.06-28.06	12f
<i>S. vavilovii</i>	19.05-30.05	12e	3.06-22.06	20a
<i>S. sylvestre</i>	29.04-15.05	18c	19.05-3.06	16cd
Średnia Mean		18		15,7
		NIR _{0,05} — LSD _{0,05} = 1,6	NIR _{0,05} — LSD _{0,05} = 1,6	

Średnie wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha=0,05$ (wg testu Duncana)

Mean values marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha=0.05$ (acc. to Duncan's test)

Tabela 3

Żywotność ziaren pyłku
Vitality of pollen grains

Gatunek Species	Żywotność ziaren pyłku Vitality of pollen grains	
	\bar{x}	min-max
<i>S. cereale</i> ssp. <i>cereale</i> (odm. — cv. Walet)	86de	76-99
<i>S. c.</i> ssp. <i>afghanicum</i>	93ab	87-99
<i>S. c.</i> ssp. <i>ancestrale</i>	96a	91-100
<i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 5687	64g	52-77
<i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 17785	90bcd	81-99
<i>S. c.</i> ssp. <i>segetale</i>	92abc	87-99
<i>S. strictum</i>	78f	80-98
<i>S. s.</i> ssp. <i>africanum</i>	87cde	80-93
<i>S. s.</i> ssp. <i>anatolicum</i>	96a	81-99
<i>S. s.</i> ssp. <i>ciliatoglume</i>	82ef	76-99
<i>S. s.</i> ssp. <i>kuprijanovii</i>	91abcd	86-98
<i>S. vavilovii</i>	95ab	89-99
<i>S. sylvestre</i>	90bcd	82-99
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}	5,2	

Średnie wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$ (wg testu Duncana)

Mean values marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0.05$ (acc. to Duncan's test)

Cechy kłosa

Długość kłosa u poszczególnych gatunków wahała się od 6 cm dla roślin gatunku *S. sylvestre* do 12,9 cm dla roślin gatunku *S. strictum*. Średnia długość kłosa roślin gatunku *S. c. ssp. cereale* wynosiła 9,6 cm i była wyższa od średniej długości kłosów u roślin trzech gatunków (*S. c. ssp. segetale*, *S. s. ssp. ciliatoglume*, *S. sylvestre*) (tab. 4). Spośród badanych roślin podgatunków gatunku *S. cereale*, tylko podgatunek *S. c. ssp. dighoricum 17785* miał istotnie różną od gatunku uprawnego, długość kłosa. Średnia zbitość kłosów u roślin badanych gatunków wahała się od 18,8 dla gatunku *S. sylvestre*, do 40,4 dla gatunku *S. c. ssp. dighoricum 5687* (tab. 4). Wynika z tego, że w rodzaju *Secale* L. można stwierdzić występowanie wszystkich trzech rodzajów kłosów — luźnych, średnio zbitych i zbitych. O dużym wyrównaniu zbitości kłosów świadczył niewielki współczynnik zmienności obliczony dla badanych gatunków i podgatunków.

Tabela 4

Ilościowe cechy kłosa
Quantitative traits of the spike

Gatunek Species	Długość kłosa Spike length			Zbitość kłosa Spike density		
	\bar{x}	min-max	V%	\bar{x}	min-max	V%
<i>S. c. ssp. cereale</i> (odm.— cv. Walet)	9,6def	7–11,3	17,8	32,6e	29,3–34	18,6
<i>S. c. ssp. afghanicum</i>	10,4bcd	7,5–16	16,3	33,4de	29,3–35,1	18,0
<i>S. c. ssp. ancestrale</i>	10cde	6,8–12	17,0	36bcd	30,1–37,2	16,7
<i>S. c. ssp. dighoricum 5687</i>	10,6bc	9,5–13	16,0	40,4a	33,5–42,8	14,9
<i>S. c. ssp. dighoricum 17785</i>	11b	7–13	15,5	29,1f	26,1–34,2	20,6
<i>S. c. ssp. segetale</i>	9,2ef	7,5–14	18,5	28,8f	27,1–32,7	20,8
<i>S. strictum</i>	12,9a	11,5–15	13,2	37,1abc	32,5–35,6	16,2
<i>S. s. ssp. africanum</i>	12,3a	8–17,5	13,8	36,2bcd	30,9–41,3	16,6
<i>S. s. ssp. anatolicum</i>	11,3b	8,5–14,5	15,0	32,4ef	26,7–36,4	18,5
<i>S. s. ssp. ciliatoglume</i>	8,7f	6–10,5	19,5	35,4cde	30–38,4	16,9
<i>S. s. ssp. kuprijanovii</i>	10,6bc	7,5–12,8	16,0	39,1ab	32,1–41,8	15,3
<i>S. vavilovii</i>	10,4bcd	7–12	16,3	24,5g	23,6–30,2	24,5
<i>S. sylvestre</i>	6g	5,7–8,2	28,3	18,8h	16,5–21,4	31,9
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}	0,9			3,3		

Średnie wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha=0,05$ (wg testu Duncana)

Mean values marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha=0.05$ (acc. to Duncan's test)

Cechy struktury plonu ziarna

Liczba źdźbeł na roślinie wahała się średnio od 6 dla *S. c. ssp. dighoricum 5687*, do 23,8 dla gatunku *S. s. ssp. africanum* (tab. 5). Gatunki i podgatunki należące do *S. cereale* charakteryzowały się mniejszą liczbą źdźbeł na roślinie niż podgatunki należące do gatunku *S. strictum*. Wysoki współczynnik zmienności wskazywał na małe wyrównanie pod względem tej cechy u badanych gatunków. Warto podkreślić, że gatunek kontrolny charakteryzował się największym wyrównaniem liczby źdźbeł na roślinie.

Średnia liczba kłosów na roślinie wahała się od 5 (dla *S. c. ssp. ancestrale*) do 22 (dla *S. strictum*) (tab. 5). Istotne różnice średniej liczby kłosów na roślinie wystąpiły między *S. c. ssp. cereale*, a gatunkami i podgatunkami: *S. c. ssp. ancestrale*, *S. c. ssp. dighoricum 5687*, *S. strictum*, *S. s. ssp. africanum*, *S. s. ssp. anatolicum*. Podobnie jak w przypadku

średniej liczby źdźbeł na roślinie zmienność dla gatunku *S. c. ssp. cereale* była mniejsza niż u pozostałych badanych gatunków i podgatunków (tab. 5).

Tabela 5

Charakterystyka cech struktury plonu
Characteristics of the crop structure features

Gatunek Species	Liczba kłosów na roślinie Number of spikes per plant			Liczba źdźbeł na roślinie Number of stalks per plant			Liczba kłosków w kłosie Number of spikelets per spike			Liczba ziaren w kłosie Number of grains per spike		
	\bar{x}	min- max	V%	\bar{x}	min- max	V%	\bar{x}	min- max	V%	\bar{x}	min- max	V%
<i>S. cereale</i> ssp. <i>cereale</i> (Walet)	9,8de	8–15	28,1	9,8cd	8–15	31,1	28,6ef	22–34	19,3	42f	36–48	19,8
<i>S. c. ssp.</i> <i>afghanicum</i>	11cd	7–16	34,2	10,8c	7–16	47,8	30,6cde	22–38	18,0	48de	39–52	17,3
<i>S. c. ssp. ancestrale</i>	5f	3–10	34,4	11,3c	3–10	50,6	26,8f	12–42	20,6	44ef	40–49	18,9
<i>S. c. ssp.</i> <i>dighoricum</i> 5687	13c	7–30	60,3	5,8e	7–30	60	36b	18–54	15,3	59a	52–62	14,1
<i>S. c. ssp.</i> <i>dighoricum</i> 17785	7,9ef	5–9	35,6	15,4b	5–9	37	35,4b	18–44	15,6	56ab	51–60	14,8
<i>S. c. ssp. segetale</i>	9de	2–10	51,9	8,1de	2–10	39,2	30,2de	14–38	18,3	37g	30–46	22,4
<i>S. strictum</i>	22a	7–40	54,5	14,9b	7–40	56,7	33,6bc	22–42	16,4	53bc	47–59	15,7
<i>S. s. ssp. africanum</i>	16,5b	6–34	48,6	23,8a	6–34	48	32,2cd	20–52	17,2	46def	42–54	18,0
<i>S. s. ssp.</i> <i>anatolicum</i>	17b	10–28	36,5	17b	10–28	49,2	33,4bc	18–46	16,5	42f	38–50	19,8
<i>S. s. ssp.</i> <i>ciliatoglume</i>	11,4cd	4–21	43,5	17,3b	4–21	42,4	23,6g	16–28	23,4	46def	42–49	18,0
<i>S. s. ssp.</i> <i>kuprijanovii</i>	10,7cd e	4–17	53,6	11,8c	4–17	37,8	26,8f	14–40	20,6	50cd	43–54	16,6
<i>S. vavilovii</i>	10,2cd e	7–20	41,1	11c	7–20	40,2	40,6a	34–56	13,6	59a	51–66	14,1
<i>S. sylvestre</i>	5,7f	3–10	40,4	10,6cd	3–10	45,3	20h	20–48	27,6	31h	26–39	26,8
NIR _{0,05} — LSD _{0,05}	2,9	–	–	2,6	–	–	3,0	–	–	4,5	–	–

Średnie wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$ (wg testu Duncana)

Mean values marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0.05$ (acc. to Duncan's test)

Dla analizowanych gatunków średnia liczba kłosków w kłosie wahała się od 20 u roślin *S. sylvestre* do 40,6 dla roślin gatunku *S. vavilovii*. Badane gatunki charakteryzowały się dużym wyrównaniem wartości tej cechy, na co wskazywały niskie współczynniki zmienności (tab. 5). Istotnych różnic w średniej liczbie kłosków w kłosie nie zanotowano pomiędzy roślinami gatunku uprawnego, a *S. c. ssp. afghanicum*, *S. c. ssp. ancestrale*, *S. c. ssp. segetale* oraz *S. s. ssp. kuprijanovii*. Średnia liczba ziaren w kłosie u roślin badanych gatunków wahała się od 31 dla gatunku *S. sylvestre* do 59 dla gatunku *S. vavilovii* i podgatunku *S. s. ssp. dighoricum* 5687. Tylko u roślin gatunku *S. sylvestre* i podgatunku *S. c. ssp. segetale* stwierdzono istotnie niższą niż u gatunku uprawnego liczbę ziaren w kłosie.

Analiza korelacji

Wyniki przeprowadzonej analizy korelacji pomiędzy wszystkimi charakteryzowanymi cechami wskazują na bardzo silne dodatnie skorelowanie liczby źdźbeł na roślinie z liczbą kłosów na roślinie, długości kwitnienia z liczbą kłosów na roślinie, długości kwitnienia z

liczbą źdźbeł na roślinie oraz długości kwitnienia z długością kłosa. Obserwowano ponadto istotną współzależność długości kłosa z: liczbą kłosów na roślinie, liczbą źdźbeł na roślinie i liczbą kłosów w kłosie, długości kłoszenia z liczbą źdźbeł na roślinie, liczby kłosków w kłosie z liczbą ziaren w kłosie (na poziomie istotności $\alpha = 0,01$) oraz długości kłosa z: liczbą ziaren w kłosie i zbitością kłosów (na poziomie istotności $\alpha = 0,05$) (tab. 6). Wszystkie istotne statystycznie współczynniki korelacji miały wartości dodatnie. Długość kłosa była skorelowana z wszystkimi cechami struktury plonu i struktury kłosa. Nie stwierdzono natomiast żadnych współzależności między żywotnością ziaren pyłku, a pozostałymi badanymi cechami (tab. 6).

Tabela 6

Współczynniki korelacji pomiędzy badanymi cechami
Correlation coefficients between the examined traits

Cecha Trait	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9
c1 liczba kłosów na roślinie number of spike per plant	1								
c2 liczba źdźbeł na roślinie number of stalks per plant	0,965***	1							
c3 liczba ziaren w kłosie number of grains per spike	0,407	0,304	1						
c4 liczba kłosków w kłosie number of spikelets per spike	0,401	0,405	0,763**	1					
c5 zbitość kłosów spike density	0,523	0,468	0,423	0,134	1				
c6 długość kłosa spike length	0,729**	0,733**	0,623*	0,69**	0,626*	1			
c7 żywotność ziaren pyłku vitality of pollen grains	-0,474	-0,382	-0,394	-0,132	-0,48	-0,155	1		
c8 długość okresu kłoszenia length of heading period	0,677*	0,685**	0,258	0,208	0,242	0,486	-0,343	1	
c9 długość kwitnienia length of flowering period	0,845***	0,82***	0,353	0,306	0,583	0,831***	-0,156	0,522	1

* Istotne na poziomie $\alpha = 0,05$; Significant at $\alpha = 0,05$

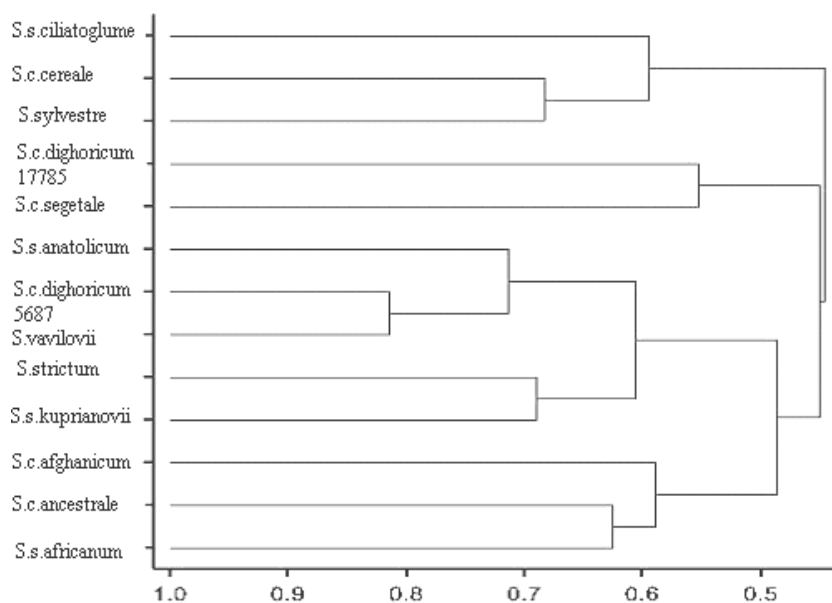
** Istotne na poziomie $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0,01$

*** Istotne na poziomie $\alpha = 0,001$; Significant at $\alpha = 0,001$

Analiza podobieństwa genetycznego

Dziewiętnaście starterów wykorzystanych do badań (sekwencję starterów podano w tabeli 1.) generowało łącznie 92 prążki polimorficzne. Jeden starter generował średnio 4,8 polimorficznych produktów amplifikacji. Najwięcej polimorficznych produktów amplifikacji (15 prążków) generował starter OPB 11.

Zależności między badanymi gatunkami przedstawiono za pomocą dendrogramu wykreślonego na podstawie indeksu podobieństwa (rys. 1). Współczynniki podobieństwa genetycznego między wszystkimi analizowanymi obiektami przedstawiono w tabeli 7.



Rys. 1 Dendrogram podobieństwa genetycznego dzikich gatunków i podgatunków żyta
 Fig. 1. Dendrogram of genetic similarity between wild species and subspecies of rye

Tabela 7

Współczynniki podobieństwa genetycznego między gatunkami i podgatunkami żyta
 Genetic similarity coefficients between species and subspecies of rye

Gatunek Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1- <i>S. cereale</i> ssp. <i>cereale</i> (Walec)	1,00												
2- <i>S. c. ssp. afghanicum</i>	0,32	1,00											
3- <i>S. c. ssp. ancestrale</i>	0,46	0,55	1,00										
4- <i>S. c. ssp. dighoricum</i> 5687	0,52	0,44	0,47	1,00									
5- <i>S. c. ssp. dighoricum</i> 17785	0,51	0,38	0,34	0,51	1,00								
6- <i>S. c. ssp. segetale</i>	0,44	0,46	0,35	0,51	0,55	1,00							
7- <i>S. strictum</i>	0,47	0,45	0,35	0,60	0,52	0,41	1,00						
8- <i>S. s. ssp. africanum</i>	0,43	0,63	0,63	0,51	0,51	0,45	0,54	1,00					
9- <i>S. s. ssp. anatolicum</i>	0,48	0,52	0,36	0,68	0,58	0,45	0,69	0,58	1,00				
10- <i>S. s. ssp. ciliatoglume</i>	0,58	0,52	0,61	0,49	0,44	0,46	0,33	0,41	0,39	1,00			
11- <i>S. s. ssp. kuprianovii</i>	0,49	0,43	0,57	0,54	0,47	0,38	0,69	0,58	0,59	0,38	1,00		
12- <i>S. vavilovii</i>	0,49	0,48	0,48	0,81	0,52	0,37	0,64	0,55	0,74	0,40	0,58	1,00	
13- <i>S. sylvestre</i>	0,68	0,37	0,42	0,53	0,39	0,37	0,39	0,39	0,42	0,61	0,53	0,50	1,00

Badane gatunki i podgatunki utworzyły trzy grupy podobieństwa. W grupie I znalazły się dwa gatunki: *S. c. ssp. cereale*, *S. sylvestre* podobne do siebie w 68% oraz jeden podgatunek *S. s. ssp. ciliatoglume* podobny do dwóch pozostałych w 60% (tab. 7). Grupę drugą stanowiły dwa podgatunki (*S. c. ssp. dighoricum* 17785 i *S. c. ssp. segetale*) należące

do gatunku *S. cereale*. Podobieństwo genetyczne między tymi gatunkami wyniosło 58% (tab. 7) Trzecią najbardziej różnorodną grupę podobieństwa utworzyły pozostałe gatunki i podgatunki. Znalazły się w niej trzy podgrupy: podgrupa 1 – *S. s. ssp. anatolicum*, *S. s. ssp. dighoricum 5687*, *S. vavilovii*, podgrupa 2: *S. strictum* i *S. s. ssp. kuprijanovii*, podgrupa 3: *S. c. ssp. afghanicum*, *S. c. ssp. ancestrale* i *S. s. ssp. africanum*. Podobieństwo w tej grupie wahało się od 62% między *S. c. ssp. ancestrale* i *S. s. ssp. africanum* do 81% między *S. s. ssp. dighoricum 5687* i *S. vavilovii* (tab. 7).

Wszystkie trzy wydzielone na podstawie analiz markerowych grupy podobne były do siebie w około 45% (tab. 7).

Spośród wszystkich badanych gatunków najmniej podobne okazały się gatunki *S. c. ssp. cereale* i *S. c. ssp. afghanicum*. Gatunki te były podobne do siebie tylko w 32%. Najwyższe spośród wszystkich badanych gatunków podobieństwo wykazały *S. s. dighoricum 5687* i *S. vavilovii*. Wynosiło ono około 81% (tab. 7).

Wstępna molekularna charakterystyka zależności polimorfizmu DNA z cechami biologii i struktury plonu

Ze wszystkich rozważanych w pracy markerów 11 istotnie statystycznie charakteryzowało liczbę kłosów na roślinie (tab. 8). Współczynnik determinacji wynosił od 25,4% (dla OPA12 ~995 i OPA12 ~1100) do 47% (dla OPA09 ~398). Obecność prążków dla wszystkich markerów związana była ze wzrostem liczby kłosów na roślinie. Liczbę źdźbeł na roślinie charakteryzowało 9 markerów (tab. 8). Wyjątek stanowił marker OPA09 ~700, który wskazywał na obniżenie wartości tej cechy. Wartości R^2 wynosiły od 25,1% (dla OPI02 ~515) do 52,8% (dla OPA09 ~398). Zmienność wartości liczby ziaren w kłosie charakteryzowana była przez osiem produktów amplifikacji (tab. 8). Procent zmienności cechy objaśnianej przez poszczególne markery wynosił od 24,9% (dla OPA15 ~400 i OPI02 ~515) do 38,1% (dla OPI02 ~360). Cztery markery związane były z obniżeniem wartości cechy i cztery ze wzrostem liczby ziaren w kłosie. Markery zamieszczone w tabeli 8 istotnie charakteryzowały współczynnikiem regresji liczbę kłosków w kłosie. Z osiemnastu starterów siedem wskazywało na redukcję wartości cechy. Wartości R^2 wynosiły od 25,6% (dla OPI02 ~515) do 62,6% (dla OPA12 ~1300).

Zbitość kłosów charakteryzowana była przez trzy markery (tab. 9), a każdy z nich wyjaśniał zmienność wartości zbitości kłosów w 42,2%. Tylko marker OPD16 ~506 wskazywał na wzrost wartości obserwowanej cechy. Najwięcej markerów istotnych (dziewiętnaście) charakteryzujących cechę fenotypową uzyskano rozważając długość kłosów bez ostek (tab. 9). Dziesięć z nich związanych jest z obniżeniem wartości obserwowanej cechy. Zmienności długości kłosa charakteryzowanej przez poszczególne markery wahała się od 25,7% (dla OPI02 ~515) do 51,7% (dla OPC18 ~498). Procent zmienności żywotności ziaren pyłku scharakteryzowanej przez poszczególne markery kształtował się od 25,2% (dla OPB11 ~396) do 60,7% (dla OPD16 ~344 i OPG19 ~396) (tab. 9). Długość kłoszenia charakteryzowana była przez siedem markerów (tab. 9), przy czym jedynie OPA12 ~344 związany był z obniżeniem wartości cechy. Na szczególną uwagę zasługuje marker scharakteryzowany symbolem OPA17 ~1100, który w aż 98,7% wyjaśniał zmienność długości kłoszenia.

Markery molekularne związane z cechami struktury plonu
Molecular markers associated with the features characterizing the yield

Symbol markera Marker symbol	Ocena współczynnika regresji Estimates of regression coefficients	Procent wyjaśnianej zmienności Percentage of variation accounted
Markery molekularne związane z liczbą kłosek w kłosie Molecular markers associated with number of spikelets per spike		
OPA12 ~1300	8,84***	62,6
OPA20~700	-7,92**	51,4
OPB11 ~390, OPB11 ~490	-9,27**	50,1
OPA12 ~510	8,45**	49,8
OPA12 ~420	8**	49,5
OPC18 ~496	10,4**	45,5
OPA12 ~396	8,49*	40,5
OPB11 ~700	-8,49*	40,5
OPB17 ~506, OPJ20 ~370	7,66*	39,3
OPG19 ~750	6,93*	30,6
OPB10 ~680	6,25*	28,6
OPA20 ~600	-8,51*	27,4
OPD16 ~506	11,48*	27,2
OPA09 ~2036, OPJ12 ~940	-11,48*	27,2
OPI02 ~515	7,11*	25,6
Markery molekularne związane z liczbą ziaren w kłosie Molecular markers associated with number of grains per spike		
OPI02 ~360	10,55*	38,1
OPB10 ~680	9,57*	29,7
OPA09 ~2036, OPJ12 ~940	-17,5*	28
OPD16 ~506	17,5*	28
OPB11 ~1636	-12,59*	26,1
OPA15 ~400	-8,95*	24,9
OPI02 ~515	10,6*	24,9
Markery molekularne związane z liczbą źdźbeł na roślinie Molecular markers associated with number of stalks per plant		
OPA12~1636	7,44**	53,2
OPA09 ~398	9,48**	52,8
OPA02 ~370	9,19**	49
OPA07 ~1100	11,4*	39,7
OPD16 ~1018	6,75*	33,6
OPB17 ~506, OPJ20 ~370	5,88*	29,9
OPA09 ~700	-5,43*	27,8
OPI02 ~515	6,04*	25,1
Markery molekularne związane z liczbą kłosów na roślinie Molecular markers associated with number of spikes per plant		
OPA09 ~398	10,32**	47
OPA12~1636	7,99**	45,9
OPA02 ~370	10,15**	45,1
OPA07 ~1100	12,98*	39,3
OPB17 ~506, OPJ20 ~370	7,16*	35,1
OPD16 ~1018	7,35*	29,6
OPA09 ~850, OPB10 ~900	6,18*	27,5
OPA12~995, OPA12~1100	6*	25,4

Istotny statystycznie związek z długością kłoszenia wykazywało 11 markerów (tab. 9).
 Wydłużenie czasu kłoszenia charakteryzowało współczynnikiem regresji osiem markerów.

Procent zmienności obserwowanej cechy przez poszczególne markery wynosił od 24,9% do 59,5% (tab. 9).

Tabela 9

Markery molekularne związane z biologią kwitnienia
Molecular markers associated with flowering biology

Symbol markera Marker symbol	Ocena współczynnika regresji Estimates of regression coefficients	Procent wyjaśnianej zmienności Percentage of variation accounted
Markery molekularne związane ze zbitością kłosów Molecular markers associated with spike density		
OPD16 ~506	14,95*	42,2
OPA09 ~2036, OPJ12 ~940	-14,95*	42,2
Markery molekularne związane z długością kłosa Molecular markers associated with spike length		
OPC18 ~496	3,405**	51,7
OPD16 ~506	4,58**	51
OPA09 ~2036, OPJ12 ~940	-4,58**	51
OPA12 ~396	2,77**	45,7
OPB11 ~700	-2,77**	45,7
OPD16 ~720	2,255*	41,8
OPA12 ~510	2,392*	40
OPA09 ~700	-2,258*	39,5
OPB11 ~1636	-2,87*	34,2
OPA02 ~370	2,8*	32
OPB11 ~396	-2,175*	31,5
OPA12 ~1636	2,158*	30,9
OPA12 ~1300	2,033*	30,3
OPB11 ~390, OPB11 ~490	-2,337*	29,9
OPA09 ~506	-1,955*	29,1
OPB11 ~900	-2,031*	26,3
OPI02 ~515	2,207*	25,7
Markery molekularne związane z żywotnością ziaren pyłku. Molecular markers associated with viability of pollen grains		
OPD16 ~344, OPG19 ~396	-25,67**	60,7
OPB11 ~1400	-10,57*	32,3
OPB11 ~396	-10,39*	25,2
Markery molekularne związane z długością okresu kłoszenia Molecular markers associated with length of heading period		
OPA07 ~1100	14,25***	98,7
OPA09 ~398, OPA07 ~760, OPA15 ~370, OPB11 ~506	7,27**	42,4
OPA12 ~344	-7,27**	42,4
OPA02 ~370	6,68*	34,4
Markery molekularne związane z długością okresu kwitnienia Molecular markers associated with length of flowering period		
OPA02 ~370	2**	59,5
OPA09 ~700	-1,45**	56,4
OPA09 ~506	-1,286**	45
OPA12 ~1636	1,361**	42,9
OPD16 ~720	1,19*	37,3
OPH13 ~800, OPH13 ~900	1,125*	30,4
OPA09 ~398, OPA07 ~760, OPA15 ~370	1,409*	24,9
OPA12 ~344	-1,409*	24,9

Startery OPA12, OPA9 i OPA11 charakteryzowały się największą liczbą uzyskanych z nich markerów, które istotnie wpływały na zmienność dziewięciu rozważanych w pracy cech fenotypowych (liczby kłosów na roślinie, liczby źdźbeł na roślinie, liczby kłosek w kłosie, liczby ziaren w kłosie, długości kłosów, zbitości kłosów, żywotności ziaren pyłku długości kłoszenia oraz długość kwitnienia). Startery te generowały odpowiednio 15, 14 i 13 markerów.

DYSKUSJA

Współczesna hodowla zbóż zmierza w kierunku otrzymywania nowych jeszcze lepiej niż dotychczas plonujących odmian, charakteryzujących się dużą odpornością na choroby, patogeny i niekorzystne warunki abiotyczne. Problem z osiągnięciem tych celów w hodowli żyta jest ściśle powiązany z małą zmiennością w gatunku *Secale cereale*. O problemie niewielkiej zmienności genetycznej w rodzaju *Secale* pisali już Ruebenbauer (1975), Koczowska (1977), czy Wolski (1983). Łapiński (1977), Kobylansky (1987), Węgrzyn (1988) i Rzepka-Plevnes (1995) stwierdzili, że dzikie gatunki żyta mogą stanowić cenne źródło genów cech użytkowych przydatnych w hodowli, a wykorzystanie ich jako materiału wyjściowego do krzyżowań mogłoby znacznie poszerzyć pulę genową gatunku *S. c. ssp. cereale*. Krzyżowania prowadzone między gatunkami dzikimi i uprawnymi często nie były uwieńczone sukcesem. Wiązało się to z dwoma zasadniczymi problemami: obniżoną płodnością mieszańców (poprzez zaburzenia w podziałach komórkowych) (Ruebenbauer, 1971) oraz słabą jakością otrzymanego plonu (Węgrzyn, 1988). Rzepka-Plevnes (1995) zwracała również uwagę na bardzo niską odziedziczalność cech o dużym znaczeniu dla hodowli żyta. W celu uniknięcia wyżej opisanych problemów warto jak najlepiej scharakteryzować dzikie gatunki i podgatunki żyta przed przeprowadzeniem krzyżowań w obrębie rodzaju *Secale*. Przydatne wydaje się dobre scharakteryzowanie zarówno terminów kwitnienia i kłoszenia, ilościowych parametrów kłosa takich jak długość i zbitość kłosa, ale także żywotności ziaren pyłku.

Długość kłosów żyta uprawnego waha się od 5 do 15 cm (Jasińska i Kotecki, 1999). Dużą zmienność tej cechy można stwierdzić zapoznając się z pracami Mackiewicz i Brody (2004), Galek (2003) czy Kubickiej (2006). Długości kłosa uzyskane w niniejszej pracy mieszczą się w zakresie długości podanym przez cytowanych wyżej autorów. Warto podkreślić, że gatunki i podgatunki dzikie charakteryzowały się kłosami dłuższymi niż gatunek uprawny. Zbitość kłosa jest cechą często określaną w badaniach mających na celu charakterystykę zbóż. Badania podają, że zbitość kłosów u żyta waha się od 28,2 (Galek, 2003) do 68,6 (Mackiewicz i Broda, 2004). Wyniki uzyskane w badaniach własnych wskazują, że rodzaj *Secale* L. charakteryzuje się kłosami zarówno luźnymi, średnio zbitymi, jak i zbitymi. Zarówno kłosy luźne, jak i silnie zbite nie są pożądane w praktyce rolniczej. Kłosy luźne ulegają częściej osypywaniu się, natomiast kłosy zbyt zbite są bardziej podatne na porastanie a ziarniaki rozwijające się w tego typu kłosach są mniej dorodne (Jasińska i Kotecki; 1999). W świetle tych informacji można sądzić, że badane w tej pracy gatunki i podgatunki dzikie mogą być materiałem do dalszych prac, charakteryzującym się pożądaną zbitością kłosa. Wyjątkiem może być jedynie gatunki *S.*

sylvestre i *S. vavilovii*, których luźne kłosy mogą okazać się przeszkodą w uzyskaniu cennego materiału do hodowli.

Termin początku kłoszenia i kwitnienia zależy od warunków pogodowych i temperatury powietrza (Plarre i in., 1979). W każdym roku data rozpoczęcia kłoszenia i kwitnienia może być inna. W pracy Mackiewicz i Brody (2004) kłoszenie rozpoczynało się już 4.05 i trwało 3 do 9 dni. W roku prowadzenia badań gatunki i podgatunki dzikie kłosiły się nawet 14 dni wcześniej i ten etap rozwoju generatywnego trwał nawet do 22 dni. Literatura podaje, że bez względu na datę rozpoczęcia kłoszenia, kwitnienie rozpoczyna się 7-15 dni po wykłoszeniu jak podają Jasińska i Kotecki (1999), lub według Dubasa (1997) 10-14 dni po wykłoszeniu. Kwitnienie w warunkach polowych, w zależności od pogody i temperatury trwa zaś od 5-10 dni (Ruebenbauer, 1971). Wyniki otrzymane w niniejszej pracy wskazują na wydłużenie długości kłoszenia u gatunków i podgatunków dzikich nawet do 20 dni. Znaczne zwiększenie długości trwania kwitnienia może być niewątpliwie zaletą i pozwolić na lepszą organizację prac hodowlanych mających na celu przeprowadzenie krzyżowań międzygatunkowych w rodzaju *Secale* L. W praktyce ze względu na późny termin kwitnienia podgatunków należących do gatunku *S. strictum* otrzymanie mieszańców tychże podgatunków może okazać się trudne ze względu na synchronizację terminów kwitnienia. Jednak nie jest niemożliwe. Pomocna może okazać się tutaj wiedza dotycząca przyspieszania lub opóźniania wegetacji żyta poprzez wcześniejszy lub opóźniony siew ziarna jesienią (Tarkowski, 1983).

Produkcja dużej ilości wysoce żywotnego pyłku daje gwarancję wysokiej efektywności zawiązywania ziarniaków w trakcie krzyżowań. Żywotność ziaren pyłku dzikich gatunków i podgatunków żyta opisywana powyżej jest wyższa niż żywotność ziaren pyłku tychże gatunków opisana, przez Mackiewicz-Karolczak i Brodę (2002). W badaniach Mackiewicz-Karolczak i Brody (2002) żywotność ziaren pyłku dzikich gatunków i podgatunków wahała się od 81% do 89%, była więc średnio o 8%-10% niższa niż ta, którą otrzymano w trakcie prowadzenia badań własnych. Różnice w żywotności ziaren pyłku mogły być wywołane warunkami prowadzenia doświadczenia. Badania Mackiewicz-Karolczak i Brody (2002) prowadzone były w warunkach szklarniowych, a więc niekorzystnych ze względu na podwyższoną temperaturę.

Chęć uzyskania z jednej rośliny dużej liczby ziarniaków dobrej jakości o wysokiej zdolności do kiełkowania uzasadnia konieczność scharakteryzowania badanego materiału roślinnego pod kątem wybranych elementów struktury plonu takich, jak: liczba kłosów i źdźbeł na roślinie oraz liczba kłosków i ziaren w kłosie. O tym jak duże może być znaczenie wartości ważniejszych cech plonotwórczych przy doborze komponentów do krzyżowania wspominała Chrząstek (2006), w swojej pracy nad owsem.

Dane literaturowe wskazują, że w zależności od gęstości siewu żyto uprawne wytwarza od trzech do nawet kilkudziesięciu pędów bocznych u jednej rośliny (Kubicka, 2004), a w warunkach polowych wytwarza najczęściej średnio cztery pędy boczne (Dubas, 1997). Przy rozstawie zastosowanej w doświadczeniu (15 × 20 cm) uzyskiwano średnio od 4,9 do 23,8 źdźbeł. Gatunek uprawny tworzył średnio prawie jedenaście źdźbeł, tym samym wynik ten był w niniejszych badaniach prawie dwukrotnie wyższy od wyników

uzyskanych przez badaczy wspomnianych wyżej. Wyniki otrzymane w warunkach doświadczalnych są wyższe od tych otrzymywanych w warunkach polowych ze względu na większą rozstawę rzędów zastosowaną w doświadczeniach niż tą, którą powszechnie stosuje się w rolnictwie (12-15 cm) (Jasińska i Kotecki, 1999). Analizując wyniki uzyskane w trakcie badania liczby kłosów na roślinie stwierdzono, że są one zbliżone do omawianej wcześniej liczby źdźbeł na roślinie. Na istniejące między tymi dwoma cechami zależności wskazuje między innymi wysoki współczynnik korelacji (istotny na poziomie 0,001). Liczba kłosków w kłosie uzyskana w opisanym doświadczeniu wahała się w od 20 do 40 kłosków w jednym kłosie. Gatunek uprawny charakteryzował się średnio liczbą 28,6 kłosków w kłosie. Prace innych autorów wskazują na podobne wartości tej cechy u żyta uprawnego: 26,9-30,6 (Kociuba, 2004), 31,3 (Mackiewicz i Broda, 2004). Na tle tych danych znaczna liczba gatunków i podgatunków dzikich charakteryzuje się wyższą wartością tej cechy. Obecność istotnych korelacji między liczbą kłosków i ziaren w kłosie wykazywali między innymi Szwed-Urbaś i Segit (2004) i Dopka (2004). Podobne zależności wykazano również w przeprowadzonych badaniach.

Nowoczesna hodowla roślin prowadzi selekcję przy pomocy narzędzi biotechnologicznych wykorzystujących między innymi markery molekularne. O ich dużym znaczeniu w badaniu podobieństwa genetycznego oraz określaniu przydatności poszczególnych gatunków do prac hodowlanych ze względu na ich cenne właściwości pisali między innymi Masojć (2002), Broda (2004) oraz Sztuba-Solińska (2005). Często autorzy wskazują na niemożność otrzymania płodnych mieszańców w krzyżówkach międzygatunkowych. Wiąże się to niejednokrotnie z dystansem genetycznym między gatunkami uniemożliwiającym zawiązywanie się ziarniaków. Przeprowadzenie prostych i skutecznych analiz molekularnych pozwoli na ustalenie podobieństwa pomiędzy gatunkami a tym samym wstępne ustalenie, które z krzyżowań mogą okazać się niewykonalne.

Podobieństwo genetyczne między gatunkami żyta ustalone na podstawie markerów RAPD wskazuje na to, że odmiany w obrębie gatunku uprawnego są do siebie bardzo podobne. Podobieństwo to waha się w różnych pracach od 72%-83% (Matos i in., 2001) czy od 39,4 % aż do 92% między gatunkami pochodzącymi z Europy Azji i Ameryki Północnej. Tak duża rozpiętość podobieństwa między gatunkami potwierdza teorię o silnym różnicowaniu się wspólnej puli genów i ewolucji gatunków żyta. Badanie podobieństwa genetycznego dzikich gatunków w rodzaju *Secale* L. nie jest powszechne i szeroko opisywane w literaturze. Próbę ustalenia podobieństwa genetycznego z użyciem markerów innych niż RAPD podjęli Chikmawati i wsp. (2005) i Shang (2006). W tym celu wykorzystano rzadziej używane do określenia podobieństwa markerów AFLP i mikrosatelitarnych. W pracy Shang (2006) podobieństwo genetyczne między gatunkami i podgatunkami dzikimi żyta wahało się od 20% do 55%. W pracy, w której użyto markerów AFLP (Chikmawati i in., 2005) podobieństwo wahało się od 16% między *S. c. ssp. cereale*, a *S. c. ssp. ancestrale* do 99% pomiędzy *S. c. ssp. anatolicum*, a *S. s. ssp. kuprijanovii*. Otrzymane wyniki wskazują na istnienie silnych zależności filogenetycznych między badanymi gatunkami i podgatunkami. Wyniki analizy podobieństwa genetycznego

wskazywałyby na to, że krzyżowanie gatunków i podgatunków w rodzaju *Secale*, ze względu na ich znaczne podobieństwo powinno być możliwe i dać pożądane efekty.

Warto zwrócić uwagę na różną liczbę starterów użytych w analizach. Wahała się ona od 4 w pracy Matos i wsp. (2001) do 80 starterów w badaniach Ma i wsp. (2004). W związku z tym spora była też rozpiętość liczby prążków polimorficznych generowanych przez jeden starter w tych badaniach. Wahała się ona od 2 produktów amplifikacji generowanych przez jeden starter (Shang, 2006) do 43 produktów (Matos i in., 2001). Liu (1994) wskazuje, że aby wyniki analizy podobieństwa genetycznego uznać za wiarygodne należy zastosować 10-15 starterów generujących łącznie przynajmniej 60-100 produktów amplifikacji. Na tle tych danych wyniki opisywane w niniejszej pracy wydają się być wiarygodne, a założenia metodyczne poprawne.

Nie tylko metoda, ale także różna liczba stosowanych starterów i tym samym generowanych produktów amplifikacji, oraz inna niż u pozostałych autorów liczba badanych gatunków i podgatunków mogła mieć wpływ na tak różne wyniki podobieństwa genetycznego między tymi samymi gatunkami, podgatunkami czy odmianami uzyskanymi przez różnych autorów.

W celu wstępnego scharakteryzowania zależności istniejących między cechami fenotypowymi warunkowanymi wielogenowo a markerami molekularnymi stosuje się analizę regresji. Mimo pewnych niedoskonałości tej metody (Gupta, 2002) analiza regresji jest narzędziem wspomagającym mapowanie cech ilościowych warunkowanych wielogenowo (Roy, 2006). Tego typu analizy są powszechne w badaniach fitopatologicznych (Irzykowska i Bocianowski, 2008; Miano, 2008) czy badaniach nad zwierzętami (Korwin-Kossakowska, 2006) i od dawna w badaniach nad roślinami (Gupta, 2002). Badania z wykorzystaniem markerów molekularnych i dodatkowym wykorzystaniem analizy regresji prowadzono między innymi u gatunków zbożowych (Sari-Gorla, 1996; Roy, 2006). Analiza regresji wydaje się być przydatnym narzędziem do wstępnej charakterystyki genomu dzikich gatunków i podgatunków, szczególnie do analizy cech ilościowych. Dodatnie wartości współczynników regresji świadczą, że występowanie produktu amplifikacji związane jest ze wzrostem wartości danej cechy ilościowej. Konsekwentnie, ujemna wartość współczynnika regresji, to mniejsza średnia wartość dla obiektów, które charakteryzują się występowaniem produktu amplifikacji danego markera. Uzyskane wartości determinacji R^2 wynosiły od 24,9% do 98,7%. Biorąc pod uwagę fakt, iż rozważane w naszych badaniach cech determinowane są w rzeczywistości przez wiele genów oraz, że liczba badanych obiektów nie jest zbyt duża wyjaśnianie zmienności danej cechy w co najmniej 25% przez jeden marker molekularny należy uznać za duży sukces, w pełni wiarogodny i akceptowalny w badaniach rolniczych.

Całościowa charakterystyka wybranych cech ilościowych rośliny, ze szczególnym uwzględnieniem kłosów, biologii kwitnienia, oraz analiza podobieństwa genetycznego wskazywałaby na wysoką przydatność badanych gatunków i podgatunków dzikich do przeprowadzenia krzyżowań z gatunkiem *Secale cereale* ssp. *cereale*.

WNIOSKI

1. Na podstawie otrzymanych wyników, analizy zróżnicowania fenotypowego i analizy molekularnej można stwierdzić, że możliwe jest poszerzenie zmienności genetycznej poprzez wprowadzenie korzystnych genów na drodze rekombinacji z gatunków dzikich. Istotne wydaje się wprowadzenie z gatunków dzikich do gatunków uprawnych takich cech jak długość kłosa i liczba kłosów na roślinie (z gatunku *S. strictum*), oraz liczba ziaren w kłosie (z gatunku *S. c. ssp. dighoricum 5687*).
2. Dzikie gatunki i podgatunki żyta badane markerami RAPD, wykazywały duże podobieństwo genetyczne w stosunku do gatunku uprawnego *Secale cereale* ssp. *cereale*, mimo ich zróżnicowania fenotypowego.

LITERATURA

- Broda Z. 2004. Przyszłość hodowli roślin w diagnostyce molekularnej. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 16 — 18.
- Chikmawati T., Skowmand B., Gustafson J. P. 2005. Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphisms. *Genome* 48: 792 — 801.
- Chrzastek M. 2006. Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian owsa (*Avena sativa* L.) *Acta Agrophysica* 8 (2): 319 — 326.
- Dopka D. 2004. Ocena zróżnicowanej uprawy przedsięwnej na przykładzie pszenżyta ozimego a plonowanie i zmiany składowych plonu. *Annales UMCS Sec. E* 59 (4): 2015 — 2022.
- Dubas A. 1997. Szczegółowa uprawa roślin rolniczych. Wydawnictwo AR Poznań.
- Galek R. 2003. Analiza zmienności cech struktury plonu w kolekcji żyta jarego. *Biul. IHAR 226/227/2*: 79 — 84.
- Gupta P. K. 2002. Molecular markers and QTL analysis in crop plants. *Current Science* 83, 2, 25: 113 — 114.
- Hastie T. J., Tibshirani R. J. 1990. *Generalized Additive Models*. Chapman and Hall, London.
- Irzykowska L., Bocianowski J. 2008. Genetic variation pathogenicity and mycelial growth rate differentiation between *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates derived from winter and spring wheat. *Ann. Appl. Biol.* 152: 369 — 375.
- Jasińska Z., Kotecki A. 1999. Szczegółowa uprawa roślin. Tom 1: 131 — 153.
- Liu Z. W. 1994. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome* 37: 1011 — 1017.
- Kobylansky V. D. 1987. Studies of rye and their relations to aspects of breeding. *Vestn. Selsch. Nauki* 111: 35 — 41.
- Kociuba W., Kramek A. 2004. Analiza niektórych właściwości biologii kwitnienia pszenżyta przydatnych dla hodowli i reprodukcji odmian. *Annales UMCS Sec. E*, 59, 1: 115 — 122.
- Koczowska I. 1977. Badania nad otrzymaniem materiałów wyjściowych żyta ozimego do hodowli odmian plennych, odpornych na wyleganie i pleśń śniegową. I. Zmienność i odziedziczalność ważniejszych cech mieszańców żyta ozimego. *Zesz. Nauk. ART Olsztyn* 19: 3 — 43.
- Korwin-Kossakowska A. 2006. Badanie polimorfizmu wybranych genów i poszukiwanie ich powiązań z cechami reprodukcyjnymi loch. *Medycyna Wet.* 62(4): 468 — 470.
- Kubicka H. 2004. *Zarys genetyki zbóż*. Tom 1, IGR PAN: 331 — 423.
- Kubicka H. 2006. Gromadzenie i ocena zasobów genowych żyta. *Biul. IHAR 240/241*: 141 — 149.
- Łapiński M. 1977. Wstępne wyniki badań nad krzyżówkami oddalonymi z rodzaju *Secale*. *Pr. Zesp. Hod. Żyta w 1975 r. IHAR Radzików*: 89 — 95.
- Ma R., Yli-Matila T., Pulli S. 2004. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas* 140: 210 — 221.
- Mackiewicz-Karolczak D., Broda Z. 2002. Ocena efektywności krzyżowań międzygatunkowych w rodzaju *Secale*. *Biul. IHAR 221*: 73 — 82.

- Mackiewicz D., Broda Z. 2004. Ocena przydatności hodowlanej mieszańców żyta uprawnego *Secale cereale* L. z dzikimi gatunkami z rodzaju *Secale*” Biul. IHAR 231: 265 — 277.
- Masojć P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. Cell. Mol. Biol. Lett. 7, 499 — 509.
- Matos M., Pinoto Carnide O., Benito C. 2001. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isoenzyme, RAPD and ISSR markers. Hereditas 134: 299 — 236.
- Miano D. W. 2008. Identification of molecular markers associated with sweet potato resistance to sweet potato virus disease in Kenya. Euphytica 160: 15 — 24.
- Mudra K. 1979. Szczegółowa hodowla roślin. PWRiL, Warszawa.
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5256 — 5273.
- Payne R., Murrey D., Harding S., Baird D., Soutou D., Lane P. 2003. GenStat for Windows (7th edition) – Introduction. VSN International, Oxford, England.
- Plarre W. 1979. Szczegółowa hodowla roślin. PWRiL, Warszawa: 254 — 264.
- Roy J. K. 2006. Association analysis of agronomical important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science, 90, 5, 10: 683 — 689.
- Ruebenbauer T. 1975. Podstawowe problemy genetyki zbóż. Post. Nauk Rol. 2: 3 — 4.
- Ruebenbauer T. 1971. Szczegółowa hodowla roślin. PWRiL, Warszawa: 65 — 75.
- Rzepka D. 1988. Przydatność międzygatunkowych mieszańców żyta (*Secale* sp.) w hodowli odmian odpornych na mączniaka (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *secalis* Marchal). Hod. Rośl. Aklim 3/ 4: 39 — 48.
- Rzepka D. 1993. Badania nad mieszańcami *S. cereale* × *S. vavilovii* Gross. w aspekcie ich przydatności do hodowli odmian odpornych na porastanie. Część I: Ocena odporności na porastanie mieszańców międzygatunkowych żyta. Hod. Rośl. Aklim. 37 (6/5): 69 — 79.
- Rzepka-Plevnes D. 1995. Możliwość wykorzystania mieszańców międzygatunkowych żyta w hodowli odmian plennych i odpornych na mączniaka prawdziwego (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *secalis* Marchal). Hod. Rośl. Aklim. 39 (6): 68 — 80
- Sari-Gorla M. 1996. Identification of genetic factors foralachlor tolerance in maize by molecular markers analysis. Mol. Gen. Genet. 251: 551 — 555.
- Shang H. Y. 2006. Genetic diversity and polygenetic relationship in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. Gen. Mol. Biol. 29, 4: 685 — 691.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos - Problemy Nauk Biologicznych 54: 227 — 239.
- Szwed-Urbaś K., Segit Z. 2004. Charakterystyka wybranych cech ilościowych u mieszańców pszenicy twardej. Annales UMCS Sec. E, 59, 1: 101 — 113.
- Tarkowski C. 1983. Biologia żyta. PWN, Warszawa.
- Thompson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. Biotechniques 19: 394 — 400.
- Węgrzyn S. 1988. Synteza i wyodrębnianie materiałów wyjściowych dla hodowli zbóż. Zesz. Probl. IHAR Radzików: 33 — 40.
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. Lival K DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531 — 6535.
- Wolski T. 1983. Kierunki hodowli oraz metody oceny żyta. Biologia żyta. Tarkowski Cz. (red) PWN Warszaw: 153 — 185.
- Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F. 1974. Decimal code for growth stages of cereals. Weed. Res. 14: 415 — 431.