

DANUTA RZEPKA-PLEVNEŠZakład Hodowli Roślin Ogrodniczych
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Zmienność populacji żyta (*Secale cereale* L.) selekcjonowanych w kierunku tolerancji na niedobory azotu w kulturach hydroponicznych

Variability of rye populations selected for tolerance to nitrogen deficiency in hydroponic cultures

Obiektem badań było 9 odmian populacyjnych żyta, 2rody hodowlane oraz genotypy S₁, S₂ otrzymane na drodze selekcji w kierunku tolerancji na niedobory azotu w kulturach hydroponicznych. Materiałem wyjściowym do selekcji były 7-dniowe siewki każdej populacji, które umieszczano na 10 dni w pożywce ubogiej w azot (10,506 mg/dm³) i w pożywce kontrolnej — Hoaglanda, zawierającej 168,0 mg N/dm³. Każdą badaną populację żyta reprezentowało 500 siewek. Po selekcji opartej na ich rozwoju w warunkach niedoboru azotu wybierano 35–37% siewek o najwyższych wartościach analizowanych cech. Wyszczególniono je na poletkach hali wegetacyjnej i rozmnażano parami. Zebrane nasiona stanowiły materiał wyjściowy do następnego cyklu selekcji. Pomiar biometryczny siewek wykorzystano do oceny zmienności selekcjonowanych populacji i skuteczności przeprowadzonej selekcji. Różnice genotypowe określono w oparciu o elektroforezę białek zapasowych metodą SDS-PAGE.

Otrzymane wyniki badań wykazały zróżnicowanie badanych genotypów żyta pod względem wysokości siewek i długości ich korzeni. Różnice między cechami siewek wybranych na rodziców a ich potomstwem były istotne już po pierwszym cyklu selekcji. W drugim jej cyklu obserwowano dalsze obniżenie średnich wartości wysokości siewek i długości korzeni oraz zwiększenie liczby korzeni zarodkowych. Wśród 12 badanych genotypów żyta na szczególną uwagę zasługują odmiany Amilo, Arant, Adar, Dańkowskie Żłote, Motto i ród SMH 92. Mogą być one wykorzystane jako cenne źródło genów tolerancji. Elektroforetyczna analiza sekalin badanych populacji żyta wykazała różnice między nimi w liczbie wyodrębnionych prążków w poszczególnych frakcjach sekalin. Podobieństwo genetyczne między odmianami a S₁ wynosiło 79,3 do 97,4%, między S₁ a S₂ od 90,3 do 99,6%, i między odmianami a S₂ od 81,10 do 91,4%.

Słowa kluczowe: azot, kultury hydroponiczne, niedobór, selekcja, zmienność, żyto

Nine rye cultivars, two strains and their progeny S₁, S₂ obtained after mass selection directed towards increased tolerance to N deficit were used in the study. The selection performed in hydroponic cultures was based on the morphological traits of 7-day seedlings developed for ten days on the medium containing 10.506 mg N/dm³. The control constituted seedlings grown on the Hoagland medium (168.0 mg N/dm³). Each rye population was represented 500 seedlings. The 35–37% of well-developed seedlings considered as tolerant to N deficit, were planted on the plots in the experimental fields. After sib-crossing the collected seeds constituted the initial material for the next cycle of mass selection. Initial material (S₀) and S₁, S₂ populations

were compared for their growth characteristics and electrophoretic patterns of storage proteins obtained by SDS-PAGE method.

The results showed that differences in seedling height and root length of the parents and progeny were significant already after the first selection cycle. In the second further cycle a continuous lowering of mean values of the mentioned seedling traits and increasing of root number was observed. Among 12 rye populations produced by selection for tolerance to N deficit in the medium the following genotypes deserve special attention: Amilo, Arant, Adar, Dańkowskie Żłote, Motto and SMH 92. They represent a valuable source material of desirable genes. Electrophoretic analyses of secalin patterns showed differences between rye genotypes from S₁ and S₂ generations in comparison with the initial genotypes. Similarity index between analyzed cultivars and S₁ generation ranged from 79.3 to 97.4%, S₁ and S₂ from 90.3 to 99.6% and between cultivars and S₂ from 81.1 to 99.4%.

Key words: deficit, hydroponic culture, nitrogen, rye, selection, variability

WSTĘP

Prace zmierzające do wytworzenia roślin odznaczających się wysoką plennością, przy niższym od obecnie wymaganego poziomie nawożenia mineralnego, należą już od kilku lat do jednych z ważniejszych zadań hodowli wielu gatunków roślin uprawnych (Teyker i in., 1989; Fernandez i in., 1996; Hartmann i in., 1996; Sinclair, 1998; Raun i Johnson, 1999). O ich ważności świadczy fakt włączenia tego typu badań do programów FAO oraz projektów rządowych. Przykładem są projekty: LISA (Low-input Sustainable Agriculture) i SAFS (Sustainable Agriculture Farming System) z USA (Madden, 1994; Klonsky i Livingston, 1994) oraz TALISMAN (Towards a Lower Input System Minimising, Agrochemicals and Nitrogen) z Wielkiej Brytanii (Young i in., 1996). Są one wyrazem troski tych państw o środowisko i względy ekonomiczne, a te zdaniem Rauna i Johnsona (1999) wynikają ze strat azotu w produkcji zbóż w granicach 20–50%.

Zagadnienie tolerancji roślin na niedobory pokarmowe dotychczas nie zostało opracowane. Z dostępnej literatury wynika, że istnieje wiele jej źródeł (Górny, 1992; 1993). W przypadku żyta są nimi dostępne w kraju linie wsobne, odmiany populacyjne, a także mieszańce międzygatunkowe *Secale cereale* × *S. montanum* i *S. kuprijanovii* (Rzepka-Plevneš i in., 1997; 1998; Kulpa, 2000). Jest to jednak bogactwo względne, ponieważ z reguły nie mogą być one wykorzystane w hodowli, bez uprzedniego wyodrębnienia poszukiwanego genotypu z populacji i sprawdzenia jego przydatności. Dlatego duże znaczenie ma opracowanie prostej metody identyfikacji i selekcji tego typu genotypów.

Nie jest to łatwe zadanie z co najmniej dwóch powodów. W przypadku tolerancji na niedobory pokarmowe istnieje wysoce istotna interakcja między genotypem rośliny a środowiskiem, w którym się rozwija. Nie zawsze odporność na stres środowiskowy w fazie siewki jest skorelowana z odpornością rośliny dojrzałej (Hartmann i in., 1996). Duże możliwości w tym przypadku stwarzają nowe sposoby analizowania zmienności genetycznej, służące do wykrywania markerów sprzężonych z selekcjonowanymi cechami. W przypadku roślin zbożowych szczególnie interesującą grupę tego typu markerów stanowią prolaminy — białka zapasowe ziarniaków zbóż (Waga, 1991; Hegde i Singhal, 2000), a techniką ich identyfikacji — elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyłu sodu (Laemmli, 1970; Escribano i in., 1998; Hegde i Singhal, 2000).

Celem pracy była ocena zmienności fenotypowej i genotypowej odmian i rodów żyta oraz populacji S_1 i S_2 wyodrębnionych z nich na drodze selekcji prowadzonej w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu w kulturach hydroponicznych pod kątem możliwości wykorzystania wymienionej techniki uprawy do prowadzenia selekcji w kierunku tej cechy w praktyce hodowlanej.

MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań były polskie odmiany żyta (Amilo, Arant, Adar, Dańkowskie Złote, Dańkowskie Nowe, Dańkowskie Selekcyjne, Motto, Pastar, Smolickie), rody hodowlane (SMH 92, SMH 389) oraz populacje S_1 i S_2 , otrzymane z odmian w wyniku selekcji prowadzonej w kulturach hydroponicznych w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu. Selekcję przeprowadzono dwukrotnie. Każde kolejne pokolenie tworzyły siewki tolerancyjne, które wysadzano na poletkach hali wegetacyjnej i krzyżowano parami. Siewki tolerancyjne na niedobory N wyodrębnione z odmian i rodów oznaczono symbolem S_0 , a siewki kolejnych pokoleń S_1 i S_2 . Próbkę ziarna siewnego odmian żyta w stopniu elity otrzymano z Hodowli Roślin Sp. z o.o., Stacji Hodowli Roślin Choryń i Dańków, z Pracowni Zasobów Genowych IHAR Radzików i Stacji Hodowli Roślin Antoniny, rodów z Zakładu Doświadczalnego Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Smolicach.

Selekcję w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu rozpoczęto jesienią 1996 roku. Materiałem wyjściowym było 500 siewek każdej odmiany, które przez 7 dni rosły w kulturach hydroponicznych w wodzie destylowanej, przy oświetleniu 1500 lux przez 16 godzin. Test kiełkowania prowadzono na połówkach ziarniaków z dobrze wykształconym zarodkami w kiełkownikach Schmala. Po 7 dniach kiełkowania siewki o wysokości co najmniej 14 cm i długości korzeni 15 cm przenoszono na 10 dni do pojemników z dwoma rodzajami pożywek Hoaglanda. Jedna z nich zawierała pełny skład azotu ($168,0 \text{ mg/dm}^3$) i była w doświadczeniu pożywką kontrolną. Drugą o zmniejszonej do $10,506 \text{ mg/dm}^3$ zawartości azotu użyto do testowania tolerancji żyta na niedobory azotu w podłożu. Skład pożywki testującej opracowano według Moore'a (1976, cyt. za Aniołem, 1981). W obu kombinacjach doświadczenia siewki rosły w tych samych warunkach oświetlenia (1500 lux).

Po 10 dniach siewki mierzono i dzielono na klasy w zależności od ich wysokości, długości i liczby korzeni oraz różnicy między końcową (17 dni) i początkową wysokością (7 dni), nazwaną „przyrostem”, przy czym selekcję prowadzono tylko w grupie siewek testowanych na tolerancję żyta na niedobory N w podłożu. Liczebność roślin składających się na każde następne pokolenie zmieniała się ($s = 35\text{--}37\%$). Jednakowa była natomiast liczba nasion z roślin tworzących pokolenie potomne. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie. Istotność między średnimi wartościami badanych cech poszczególnych populacji żyta oraz między średnimi wartościami dla tych samych genotypów w kolejnych latach badań posłużyła do porównania pokoleń pod względem reakcji na niedobory N w podłożu oraz do oceny skuteczności prowadzonej selekcji.

Do oceny zmienności genotypowej wybrano 8 odmian (Dańkowskie Złote, Dańkowskie Nowe, Dańkowskie Selekcyjne, Amilo, Motto, Arant, Adar, Smolickie), jeden ród (SMH

92) i populacje S_1 i S_2 żyta. Określono ją w oparciu o ocenę polimorfizmu białek zapasowych techniką SDS-PAGE w układzie nieciągłym, stosując dwa rodzaje żeli: zagęszczający (4%) i rozdzielający (12%), o grubości 1 mm. Białka zapasowe do badań izolowano z losowej próby zbiorczej składającej się z 50 ziarniaków każdej populacji żyta (Laemmli, 1970; Kucharczyk, 1997). Sekaliny rozpuszczano w 70% etanolu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin, a następnie wirowano przez 15 min. w 5°C, przy obrotach 15000 rpm. Zebrany nadsącz ponownie inkubowano w 36°C przez 12 godzin. Po odparowaniu alkoholu osadzone na ściankach probówki sekaliny zadawano buforem ekstrakcyjnym składającym się z: dd H₂O, 0,5M Tris HCl o pH 6,8, gliceryny, 10% SDS (siarczan dodecylu sodu), 2-mercaptoetanolu, 1% bromophenolu blue i wytrząsano przez 40 s, a następnie przez 4 h w 95°C. Po tym czasie białko ponownie wirowano przez 2 godziny.

Do przygotowania żeli i rozdzielów elektroforetycznych wykorzystano zestaw Mini Protean II (Bio Rad). Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu 50 mA w trzech powtórzeniach. Wielkość próby białkowej nanoszonej na żel wynosiła 7 µl. Rozdział białek trwał 4 godziny. Jednorazowo badano 18 prób sekalin żyta. Żele z rozdzielonymi białkami barwiono Coomasie R-250 (Pharmacia LKB), rozpuszczonym w redetylowanej wodzie z dodatkiem 99% metanolu i 20% kwasu octowego. Żele barwiono 1 godzinę, a następnie odbarwiano płuczając w roztworze 10% etanolu i 30% kwasu octowego. Odbarwione żele suszono między dwoma arkuszami tofianu namoczonymi w 20% roztworze gliceryny w temperaturze pokojowej przez 5 dni. Żele rozdzielające z otrzymanymi obrazami elektroforetycznymi badano w świetle przechodzącym przy użyciu skanera Sharp JX330 i programu „Diversity one 1,3” (Pharmacia LKB). Masę prążków określono w kDa interpolując otrzymane wartości do wzorca białkowego. Podobieństwo między genotypami żyta określono w % na podstawie drzewa podobieństwa filogenetycznego.

WYNIKI

Zmienność fenotypowa

Przeprowadzona w latach 1996–1998 ocena odmian i rodów żyta (S_0) oraz wyselekcjonowanych z nich populacji S_1 i S_2 wykazała, że różniły się one między sobą pod względem tolerancji na niedobory azotu w fazie siewki, określonej na podstawie cech morfologicznych siewek, ich wysokości oraz długości i liczby korzeni zarodkowych (tab. 1). Dodatnią reakcję siewek na niedobory N w podłożu, wyrażającą się niewielkim wzrostem wartości ich cech morfologicznych obserwowano w przypadku wysokości i liczby korzeni w S_1 , długości korzeni w S_0 . Istotność różnic w kształtowaniu się wysokości siewek stwierdzono między pokoleniami S_1 i S_2 , przy czym pokolenie S_2 miało istotnie niższe siewki, długości korzeni — począwszy już od S_0 i S_1 , a długość korzeni malała z pokolenia na pokolenie.

Tabela 1

Średnie wartości ($\bar{x}$) i różnice w morfologicznych cechach siewek w populacjach wyjściowych (S_0) i kolejnych pokoleniach (S_1 , S_2) otrzymanych w wyniku selekcji w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu
 Mean values ($\bar{x}$) and differences of morphological traits of seedling in initial populations (S_0) and successive generations (S_1 , S_2) selected for toleration of N deficit in medium

Genotyp Genotype	Wysokość siewek Seedling height					Długość korzeni Root length					Liczba korzeni Roots number				
	S_0	S_1		S_2		S_0	S_1		S_2		S_0	S_1		S_2	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	d	$\bar{x}$	d	$\bar{x}$	$\bar{x}$	d	$\bar{x}$	d	$\bar{x}$	$\bar{x}$	d	$\bar{x}$	d
Motto	15,0	19,5	4,5**	14,2	-5,3**	16,8	15,6	-1,2**	9,6	6,0**	4,2	5,1	-0,9**	4,6	-0,5**
Dańkowskie Złote	14,2	17,4	3,2**	14,9	-2,5**	15,1	13,4	-1,7**	9,3	4,1**	4,2	4,8	-0,6**	4,7	-0,1
Arant	14,9	18,0	3,1**	13,4	-5,4**	15,6	15,5	-0,1	9,3	6,2**	3,8	4,4	-0,6**	4,3	-0,1
Amilo	15,4	18,0	2,6**	15,0	-3,0**	15,7	15,4	-0,3	9,7	5,7**	4,0	4,6	-0,6**	4,7	0,1
Dańkowskie Nowe	17,4	18,5	1,1	14,1	-4,4**	15,4	16,4	1,0**	9,1	7,3**	4,2	4,4	-0,2	4,7	0,3**
Pastar	20,8	20,7	-0,1	16,6	-4,1**	16,6	15,5	-1,1**	8,8	6,7**	4,3	4,8	-0,5**	4,4	-0,4**
SMH 92	19,5	18,0	-1,5	14,0	-4,0**	17,9	16,2	-1,7**	10,7	5,5**	4,7	4,7	0,0	3,9	-0,8**
Adar	19,1	17,4	-1,7	16,0	-1,4**	17,3	15,3	-2,0**	10,5	4,8**	4,4	4,4	0,0	4,3	-0,1
Smolickie	21,5	19,2	-2,3*	13,8	-5,4**	17,0	15,2	-1,8**	9,1	6,1**	5,3	4,3	1,0**	4,2	-0,1
Dańkowskie Selekcyjne	19,4	16,3	-3,1**	14,3	-2,0**	16,8	12,4	-4,4**	8,4	4,0**	4,2	4,8	-0,6**	4,5	-0,3**
SMH 389	19,6	16,4	-3,2**	14,9	-1,5**	19,3	16,0	-3,3**	10,2	5,8**	4,6	4,5	0,1	4,5	0,0
x	17,9	18,1	0,2	14,7	-3,4**	16,7	15,2	-1,5**	9,5	5,7**	4,4	4,6	-0,2	4,4	-0,2

d — Różnica między średnimi kolejnych pokoleń

d — Differences between means of successive generations

* — Różnica istotna przy $\alpha = 0,05$, ** — $\alpha = 0,01$

* — Difference significant at $\alpha=0,05$, ** — $\alpha = 0.01$

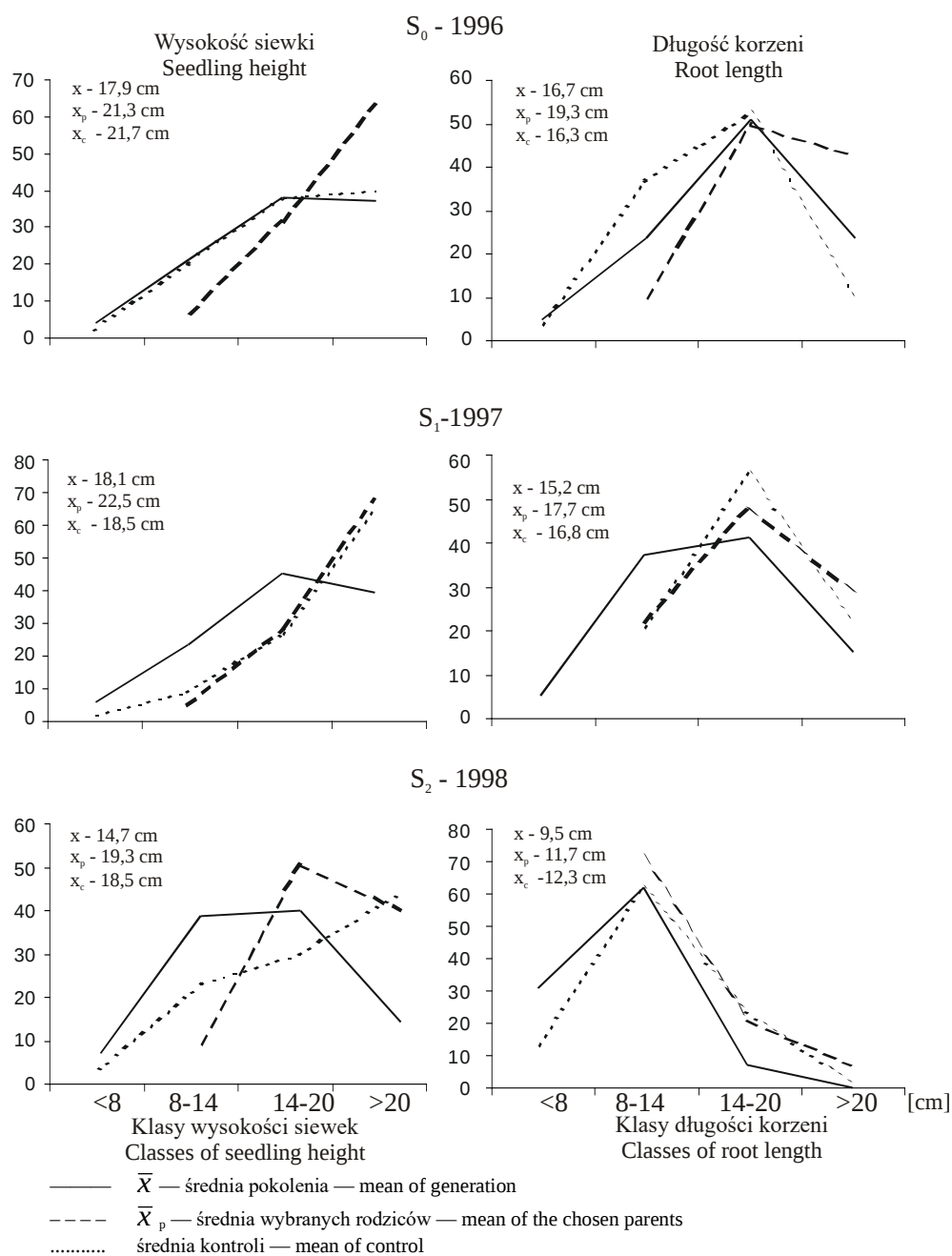
Badane genotypy żyta reagowały niejednakowo na niedobory azotu w podłożu. W pokoleniu S_1 siewki istotnie wyższe, od populacji S_0 , stwierdzono u odmian Amilo, Arant, Dańkowskie Złote i Motto, istotnie niższe u odmian Dańkowskie Selekcyjne, Smolickie i ród SMH 389. W pokoleniu S_2 siewki wszystkich badanych populacji żyta były istotnie niższe od populacji S_1 . Brak istotnych różnic w długości korzeni między pokoleniami S_0 i S_1 stwierdzono tylko u dwóch odmian żyta: Amilo i Arant.

Istotnie wyższą od S_0 liczbą korzeni w S_1 charakteryzowała się większość badanych genotypów żyta. Cztery z nich nie różniły się pod tym względem od S_0 . Istotnie mniejszą od S_0 liczbę korzeni stwierdzono tylko u odmiany Smolickie. W pokoleniu S_2 istotnie więcej, niż w S_1 , korzeni stwierdzono u odmiany Dańkowskie Nowe, na poziomie S_1 u większości badanych populacji. Średnia liczba korzeni w populacji S_2 kształtowała się na poziomie S_0 (tab. 1).

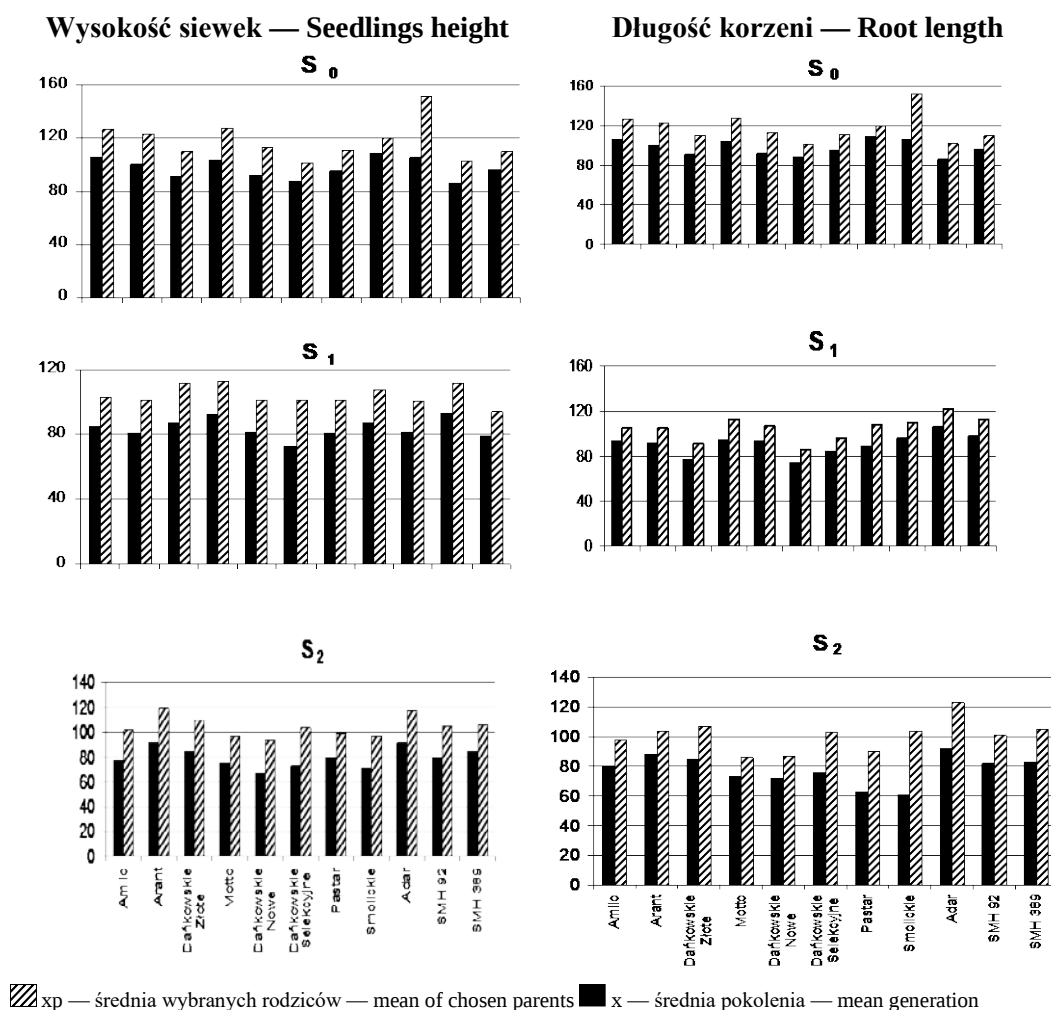
Badania wykazały, że wyliczone dla testowanych cech średnie pokoleń S_0 ($\bar{x}$), S_1 ($\bar{x}$), i S_2 ($\bar{x}$) były niższe od średnich rodziców ($\bar{x}_p$) i to niezależnie od badanej cechy i pokolenia (rys. 1). Populacje rodzicielskie charakteryzowały się też większą od otrzymanych potomstw częstotliwością siewek o najwyższych wartościach badanych cech. Porównanie siewek populacji S_0 , S_1 i S_2 testowanych w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu z kontrolą wykazało, że różnice między nimi w kształtowaniu się cech morfologicznych zależały od cechy i badanego pokolenia (rys. 2). W pokoleniu S_0 wysokość siewek testowanych na tolerancję większości populacji żyta kształtowała się na poziomie kontroli. U odmian Amilo, Smolickie i Adar były one istotnie wyższe od kontroli, u ród SMH 92 — istotnie niższe. Średnie siewek rodzicielskich z tego pokolenia ($\bar{x}_p$) były na ogół wyższe od kontroli, a ich istotne wartości stwierdzono u odmian: Amilo, Arant, Motto, Smolickie i Adar.

W pokoleniach S_1 i S_2 siewki badanych populacji żyta były niższe od kontroli. Wyjątek stanowiły trzy populacje pokolenia S_2 : Arant, Adar i SMH 92, o wysokości siewek na poziomie kontroli. Brak istotnych, w stosunku do kontroli, różnic w wysokości siewek stwierdzono również w przypadku siewek rodzicielskich większości genotypów wymienionych pokoleń. W pokoleniu S_1 wyjątek stanowiły populacje siewek rodzicielskich wyodrębnionych z odmian Dańkowskie Złote, Motto, Smolickie i z ród SMH 92, w S_2 z Arant, Dańkowskie Złote i Adar.

Podobnie do wysokości siewek w kolejno następujących po sobie pokoleniach badanych genotypów żyta kształtowała się długość korzeni. W pokoleniu S_0 w większości populacji nie odbiegała ona od kontroli. Natomiast korzenie populacji S_1 i S_2 były od kontroli istotnie krótsze. Wyjątek w S_0 stanowiły dwie odmiany (Amilo i Dańkowskie Złote) oraz ród SMH 389, o korzeniach istotnie dłuższych od kontroli, a w S_1 odmiana Smolickie i ród SMH 389, o korzeniach na poziomie kontroli. Porównując w stosunku do kontroli długość korzeni siewek rodzicielskich, tworzących kolejne pokolenie badanych populacji żyta stwierdzono, że przewyższały one istotnie długością korzenie siewek kontrolnych. W pokoleniu S_1 istotnie krótsze od kontroli korzenie miały siewki rodzicielskie żyta Dańkowskiego Złotego i Dańkowskiego Selekcyjnego. W pokoleniu S_2 cecha ta w badanych populacjach żyta kształtowała się na poziomie kontroli. Wyjątek stanowiła odmiana Adar, o korzeniach istotnie od niej dłuższych (rys. 2).



Rys. 1. Zmienność wysokości siewek i długości korzeni w populacjach wyjściowych S₀ i w populacjach S₁, S₂ żyta selekcionowanych w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu
Fig. 1. Variability of seedling height and root length in initial material S₀ and populations S₁, S₂ of rye selected for tolerance to N deficit in media



Rys. 2. Średnie wartości ($\bar{X}$) wysokości siewek i długości korzeni w populacjach wyjściowych S_0 i w populacjach S_1 , S_2 żyta selekcionowanych w kierunku tolerancji na niedobory N w procentach kontroli
Fig. 2. Mean values ($\bar{X}$) of seedling height and root length of roots in initial material (S_0) and S_1 , S_2 populations of rye selected for tolerance to N deficit in percent of control

Niedobory azotu w podłożu nie miały na ogół większego wpływu na liczbę wykształconych przez siewki korzeni zarodkowych. W pokoleniu S_0 wartości tej cechy były istotnie wyższe od kontroli tylko u odmian Smolickie i Adar, istotnie niższe — u odmiany Arant (rys. 2). Wśród siewek wybranych na rodziców tworzących kolejne pokolenie istotnie wyższą od kontroli liczbę korzeni zarodkowych charakteryzowały się trzy odmiany: Dańkowskie Złote, Smolickie i Adar. U pozostałych populacji rodzicielskich różnic nie stwierdzono. W pokoleniu S_1 istotnie mniej od kontroli korzeni miały genotypy wyodrębnione z odmian: Amilo, Arant, Smolickie i z rodu SMH 389. Natomiast siewki

rodzicielskie tego pokolenia istotnie przewyższały kontrolę pod tym względem, z wyjątkiem odmiany Arant, u której liczba korzeni kształtowała się na poziomie kontroli. W pokoleniu S_2 u żadnej z badanych populacji żyta nie stwierdzono mniej od kontroli korzeni, a siewki rodzicielskie przewyższały ją, niezależnie od populacji, z której zostały wyselekcjonowane.

Reakcją badanych populacji żyta na obniżoną zawartość azotu w podłożu był ich mniejszy w porównaniu do siewek kontrolnych przyrost siewek na wysokość (tab. 2). Niemniej jednak spośród wszystkich badanych populacji żyta i to niezależnie od analizowanego pokolenia udało się wyselekcjonować siewki tworzące kolejne pokolenie, o podobnym do kontroli lub istotnie od niej wyższym przyroście na wysokość. Istotnie wyższe od kontroli wartości tej cechy w S_0 stwierdzono u trzech odmian: Amilo, Dańkowskie Złote i Adar, w S_1 — u odmian: Amilo, Arant, Dańkowskie Złote, Motto, Pastar, Smolickie i Adar, a w S_2 — u odmian: Smolickie i Adar oraz obu rodów — SMH 92 i SMH 389. Badane populacje żyta charakteryzowały się na ogół dość dużą zmiennością pod względem omawianej cechy (tab. 3). Świadczą o tym wyliczone współczynniki zmienności. Dla siewek kontrolnych wahały się one od 22 do 45%, dla S_0 35 do 73%, S_1 — 25 do 43% i S_2 — od 37 do 50%. Zmienność osobnicza w obrębie siewek wybranych na rodziców wynosiła, w zależności od pokolenia, odpowiednio: 19 do 40%, 19 do 35% i 20 do 35%.

Na podstawie wyliczonych współczynników korelacji miejsc r_s stwierdzono, że selekcjonowane w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu populacje żyta zachowywały się różnie pod względem analizowanych cech siewek w latach badań. Nie stwierdzono też zgodności między siewkami tworzącymi kolejne pokolenia. Wyjątek stanowiły populacje S_0 i S_2 , u których zgodność między pokoleniami dotyczyła kształtowania się długości korzeni populacji rodzicielskich. Współczynniki korelacji r_s wynosiły dla wysokości siewek populacji

(x) $S_0 - S_1 = 0,12$, $S_0 - S_2 = 0,45$, $S_1 - S_2 = 0,29$,

populacji rodzicielskich

(x_p): $S_0 - S_1 = 0,08$, $S_0 - S_2 = 0,25$, $S_1 - S_2 = 0,10$;

dla długości korzeni

(x): $S_0 - S_1 = 0,12$, $S_0 - S_2 = 0,45$, $S_1 - S_2 = 0,29$

i dla populacji rodzicielskich (x_p), odpowiednio: 0,40, 0,57* i 0,40.

Zmienność genotypowa

Na podstawie analizy obrazów elektroforetycznych białek zapasowych odmian i rodów żyta (S_0) oraz populacji S_1 i S_2 otrzymanych w wyniku selekcji prowadzonej w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu stwierdzono, że różniły się one między sobą ogólną liczbą wyodrębnionych na elektroforegramach polipeptydów (tab. 3). Inne też były u nich wzory prążkowe określone w oparciu o liczbę prążków białkowych w poszczególnych frakcjach sekalina, a największym polimorfizmem charakteryzowała się frakcja białek najbliższych γ_{45} . W pokoleniu S_1 u większości badanych genotypów żyta obserwowano wzrost liczby prążków i tendencja ta utrzymywała się na ogół również w pokoleniu S_2 .

Tabela 2

Średnie wartości ($\bar{x}$) przyrostu wysokości siewek żyta populacji S₀, S₁ i S₂ po 10 dniach ich wzrostu na pożywce ubogiej w N w procentach średniej wzorca z lat badań. Współczynnik zmienności (WZ%) dla badanej cechy i populacji żyta
 Mean values ($\bar{x}$) of seedling height increase of the S₀, S₁, S₂ rye populations after 10 days of growing in the medium with the N deficit, in percent of the control mean from the years of study. Variability coefficients for tested trait and populations

Genotyp Genotype	Przyrost siewki na wysokość Increase of seedling height							Współczynnik zmienności Variability coefficient (%)								
	kontrola control	S ₀		S ₁		S ₂		kontrola control	S ₀		kontrola control	S ₁		kontrola control	S ₂	
		$\bar{x}$	x_p	$\bar{x}$	$\bar{x}_p$	$\bar{x}$	$\bar{x}_p$		$\bar{x}$	x_p		$\bar{x}$	$\bar{x}_p$		$\bar{x}$	$\bar{x}_p$
Amilo	9,8cm = 100%	79**	110*	92	116**	80**	98	31	48	32	35	34	27	37	40	24
Arant	8,8	76**	108	100	133**	88	109	32	48	31	36	43	35	58	47	35
Dańkowskie Złote	9,5	82**	112*	95	135**	82**	104	34	48	29	30	42	31	44	47	32
Motto	9,5	77**	104	107	136**	84*	103	35	45	31	40	35	24	44	41	31
Dańkowskie Nowe	11,6	66**	99	85**	105	81**	99	27	37	22	31	40	25	39	50	20
Dańkowskie Selekcyjne	11,7	63**	95	67**	103	91	105	46	73	40	25	37	27	46	50	32
Pastar	12,5	75**	97	86**	113**	83**	102	30	40	23	39	38	26	45	39	22
Smolickie	11,0	64**	85	91*	114**	104	125**	36	46	34	31	30	21	39	45	34
Adar	10,3	89*	115**	88**	113**	105	123**	33	45	33	30	29	19	43	38	22
SMH92	11,1	72**	99	82**	103	95	114*	27	35	19	31	33	21	35	40	28
SMH389	10,5	80**	99	83**	102	103	119**	35	50	37	23	25	19	38	37	29
Średnia Mean	10,6	75**	101	88**	113**	91	108	33	47	31	32	35	25	43	43	28

$\bar{x}$ — Średnia pokolenia; $\bar{x}_p$ — Mean of generation

* — Różnica istotna przy $\alpha = 0,05$, ** — przy $\alpha = 0,01$;

$\bar{x}_p$ — Średnia wybranych rodziców; $\bar{x}_p$ — Mean of the chosen parents

* — Difference significant at $\alpha = 0.05$, ** — at $\alpha = 0.01$

Tabela 3

Zmienność liczby prążków białkowych w populacjach wyjściowych S_0 i w populacjach S_1 , S_2 żyta selekcionowanych w kierunku tolerancji na niedobory N w podłożu oraz genetyczne podobieństwo (%) między nimi
Variability of protein bands number in the initial material S_0 and populations S_1 , S_2 of rye selected for tolerance to N deficit in a medium and genetic similarity (%) between them

Genotyp Genotype	Pokolenia Generations																	
	S ₀					S ₁					S ₂					podobieństwo- similarity (%)		
	frakcja białkowa protein group																	
	HMW	ω	γ ₇₅	γ ₄₅	suma total	HMW	ω	γ ₇₅	γ ₄₅	suma total	HMW	ω	γ ₇₅	γ ₄₅	suma total	S ₀ -S ₁	S ₁ -S ₂	S ₀ -S ₂
Smolickie	2	1	3	7	13	2	2	2	6	12	1	2	1	7	11	97,4	90,3	93,0
Motto	3	1	2	6	12	2	2	2	5	11	2	3	1	7	13	94,3	94,9	99,4
Arant	1	1	1	7	10	1	1	3	9	14	1	1	3	9	14	79,3	97,9	81,1
Adar	2	2	2	4	10	2	2	3	7	14	1	2	2	2	7	87,3	99,1	86,4
Dańkowskie Nowe	2	2	2	3	9	2	2	4	5	13	1	1	4	5	11	97,9	91,8	93,9
Amilo	1	2	2	3	8	2	1	2	6	11	3	2	2	7	14	89,1	99,6	89,5
Dańkowskie Złote	2	1	2	2	7	1	2	2	3	8	1	2	2	5	10	99,2	95,7	94,9
Dańkowskie Selekcyjne	2	1	1	3	7	1	3	1	6	11	1	2	2	7	12	92,8	99,0	93,8
SMH 92	1	1	1	6	7	1	1	2	8	12	1	3	3	9	16	95,2	91,2	96,0
Średnia Mean	1,7	1,3	1,7	4,6	9,4	1,5	1,8	2,3	6,1	11,8	1,3	2,0	2,2	6,4	12,0	92,5	95,5	92,0

Mniejszą w porównaniu z S_1 i S_0 ich liczbę stwierdzono na elektroforegramach odmiany Adar, większą u odmian: Dańkowskie Żłote i Amilo oraz rodu SMH 92. Wzrost liczby polipeptydów dotyczył przede wszystkim frakcji γ_{45} . Wyjątek stanowiły: w S_1 odmiany Motto i Smolickie, w S_2 odmiana Adar (tab. 3).

W oparciu o opracowane drzewa podobieństwa filogenetycznego wykazano, że genotypy żyta z S_0 i S_1 były do siebie podobne, średnio w 92,5%, S_1 i S_2 — w 95,5%, a S_0 i S_2 — w 92,0% (tab. 3). Najmniejsze podobieństwo między genotypami S_0 i S_1 stwierdzono w przypadku odmian: Arant, Adar i Amilo, największe u odmiany Dańkowskie Żłote, a między S_0 i S_2 , odpowiednio: Arant, Adar, Amilo i Motto. Najbardziej zbliżone do siebie były genotypy S_1 i S_2 . Ich podobieństwo mieściło się w granicach 90,3%–97,9%.

DYSKUSJA

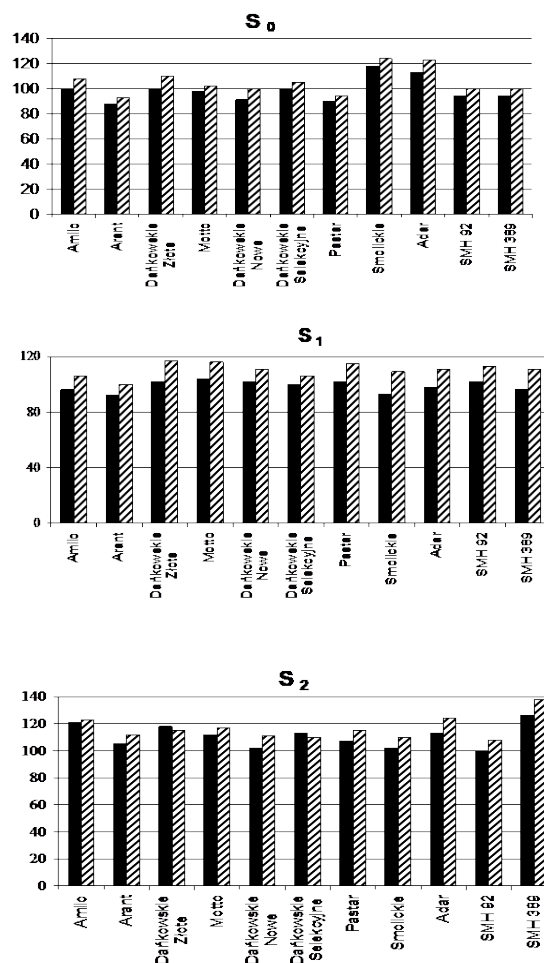
Z badań Górnego (1992; 1993; 1995) oraz Górnego i Szolłowskiej (1996) nad możliwością hodowli odmian owsa i jęczmienia charakteryzujących się efektywniejszym, od obecnie uprawianych odmian, wykorzystaniem składników mineralnych wynika, że selekcja w kierunku tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu winna być oparta na obserwacji systemu korzeniowego roślin. Dowodzą tego także badania Caradusa i Woodfielda (1998).

Niniejsze badania dotyczą żyta, rośliny obcopolnej, stanowiącej trudniejszy od wymienionych wyżej gatunków obiekt hodowli i charakteryzującej się dużą zależnością ekspresji genów warunkujących zmienność cech ilościowych od środowiska. W pracy do selekcji genotypów tolerancyjnych na niedobory N w podłożu zastosowano kultury hydroponiczne, dające możliwość zapewnienia roślinom podobnych warunków wzrostu jednakową ilość składników pokarmowych przypadających na jedną roślinę i równomierne oświetlenie. Zmienne w latach były temperatura i wilgotność powietrza.

Przeprowadzona ocena cech morfologicznych siewek, w tak przygotowanej kulturze wykazała, że reakcja żyta na zastosowany w doświadczeniu stres, jakim był niedobór azotu w pożywce zależała od genotypu rośliny i badanego pokolenia. Badane populacje żyta charakteryzował duży zakres zmienności międzyodmianowej i osobniczej pod względem wszystkich analizowanych cech morfologicznych siewek. Ten ostatni pozwalał szybko, poprzez selekcję w obrębie populacji, wyodrębnić genotypy, o podobnych lub wyższych od kontroli, wartościach analizowanych cech siewek, przyjętych za wskaźnik tolerancji na niedobory azotu w podłożu. Odziedziczalność cech rodziców była u otrzymanego potomstwa na ogół niska, przy czym na uwagę zasługują cztery spośród badanych odmian: Amilo, Arant, Dańkowskie Żłote i Motto. Średnia wysokość siewek potomstwa S_1 pochodzącego po rodzicach z wybranych z odmian i rodów hodowlanych żyta (S_0) była tylko u niektórych z nich istotnie wyższa. Natomiast siewki potomstw S_2 były istotnie niższe od swoich rodziców, niezależnie od badanego genotypu. Podobne obniżenie się wartości danej cechy potomstwa w stosunku do roślin rodzicielskich i populacji, z których one pochodziły stwierdzono dla długości korzeni. W S_1 dotyczyło ono większości, a w S_2 wszystkich badanych genotypów żyta. Wysoką odziedziczalność selekcyjonowanej cechy

obserwowano u badanych genotypów żyta w przypadku liczby korzeni (rys. 3). Wyniki niniejszych badań pozostają w zgodności z wynikami dotyczącymi zmienności tolerancji żyta na niedobory azotu i potasu w podłożu, określoną w kulturach dojrzałych zarodków *in vitro* (Rzepka-Plevneš, 1999). Należy przy tym podkreślić, że kultury *in vitro* wydają się być doskonalszą techniką selekcji od kultur hydroponicznych, ze względu na możliwość zastosowania większej liczby stałych dla wszystkich badanych genotypów czynników środowiska, w tym również temperatury i wilgotności powietrza.

Liczba korzeni — Roots number



▨ xp — średnia wybranych rodziców — mean of chosen parents ■ x — średnia pokolenia — mean generation

Rys. 3. Średnie wartości ($\bar{X}$) liczby korzeni w populacjach wyjściowych S₀ i populacjach S₁, S₂ żyta selekcionowanych w kierunku tolerancji na niedobory N w procentach kontroli

Fig. 3. Mean values ($\bar{X}$) of roots number for the initial material S₀ and S₁, S₂ populations of rye selected for tolerance to N deficit, in percent of control

Duży wpływ na kształtowanie się cech morfologicznych siewek populacji S_0 , S_1 i S_2 miał sposób rozmnażania wybranych na rodziców roślin. Świadczą o tym ich wartości dla populacji S_0 , którą stanowiły siewki wyodrębnione z odmian żyta. Populacje S_1 i S_2 otrzymano w wyniku rozmnożeń roślin rodzicielskich parami prowadzonych w obrębie niewielkich populacji roślin (35–37% z 500 testowanych na tolerancję siewek), a więc populacje zawężone genetycznie, ze zmienioną w stosunku do populacji panmiktycznych dynamiką. To może między innymi tłumaczyć małą skuteczność selekcji w S_1 i S_2 (Falconer, 1974; Sperlich, 1977; Bos i Henninks, 1991).

Prowadzenie selekcji w kierunku tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu w oparciu o ocenę cech morfologicznych siewek w kulturach hydroponicznych, czy też *in vitro* jest łatwe i możliwe do przeprowadzenia w okresie poprzedzającym wegetację roślin. Współczesna hodowla preferuje jednak selekcję opartą na analizie genotypów technikami biologii molekularnej pod warunkiem, że znane są hodowcom markery genetyczne sprzężone z selekcionowaną cechą (Waga, 1991; Escibano i in., 1998; Przybylska, 2000).

W niniejszej pracy ograniczono się do porównania ze sobą niektórych biorących udział w doświadczeniu odmian (S_0) oraz ich potomstw S_1 i S_2 . Wykorzystano do tego celu analizę obrazów elektroforetycznych otrzymanych z rozdziałów białek zapasowych metodą SDS-PAGE. Metoda ta jest obecnie stosowana do identyfikacji odrębności odmianowej pszenicy i innych roślin uprawnych (Niedzielski i in., 1996; Radić i in., 1998; Hegde i Singhal, 2000)). Zdaniem Niedzielskiego i wsp. (1996) można ją również z powodzeniem wykorzystać do identyfikacji tożsamości odmianowej żyta pod warunkiem prowadzenia rozdziałów elektroforetycznych sekalin na zbiorczych próbach ziarniaków tej rośliny, co uczyniono w prezentowanych badaniach.

Porównanie elektroforegramów wybranych genotypów żyta wykazało duże ich zróżnicowanie genetyczne pod względem ogólnej liczby wyodrębnionych prążków białkowych, jak również ich liczebności, w poszczególnych frakcjach sekalin. Różnice te dotyczyły zarówno genotypów w obrębie jednego pokolenia, jak i między pokoleniami. Pokolenia S_1 i S_2 charakteryzował wzrost liczebności identyfikowanych na elektroforegramach większości badanych populacji żyta polipeptydów frakcji białek niskocząsteczkowych. Największe podobieństwo genetyczne wykazano między pokoleniami S_1 i S_2 , najmniejsze między S_0 – S_1 i S_0 – S_2 .

Założenie, że obserwowany w populacji S_1 i S_2 wzrost liczby polipeptydów we frakcji białek niskocząsteczkowych może wskazywać na możliwość wykorzystania techniki SDS-PAGE w selekcji genotypów żyta tolerancyjnych na niedobory azotu w podłożu okazało się błędne. Smolik (2001), oceniając polimorfizm białek zapasowych żyta odmian oraz populacji S_1 – S_3 otrzymanych w wyniku selekcji prowadzonej w kierunku podwyższonej tolerancji na niedobory N i K w podłożu w kulturach dojrzałych zarodków *in vitro*, zidentyfikował na elektroforegramach populacji S_2 – S_3 dodatkowy prążek o masie 43 kDa. Polipeptyd ten nie jest jednak sprzężony z tolerancją na niedobory w podłożu, gdyż jest również łatwy do identyfikacji na elektroforegramach linii wsobnych żyta, niezależnie od ich tolerancyjności.

Otrzymane wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, którą z badanych cech można uznać za dobry wskaźnik selekcyjny i jakie praktyczne znaczenie może mieć

dla hodowli test tolerancji żyta na niedobory pokarmowe w przedstawionych warunkach laboratoryjnych. Uzyskanie ostatecznej odpowiedzi będzie możliwe po zakończeniu wszystkich realizowanych obecnie badań dotyczących genetycznego podłoża omawianej właściwości żyta i możliwości prowadzenia prac hodowlanych w tym zakresie.

WNIOSKI

1. W badanych populacjach żyta stwierdzono istotne obniżenie długości korzeni już w wyniku jednorazowych zabiegów selekcyjnych. Dalszy etap selekcji utrwalał tę cechę na istotnie niskim poziomie.
2. Populacje siewek przeznaczone na materiały wyjściowe następnego etapu selekcji charakteryzowały się wyższymi wartościami cech morfologicznych od populacji, z których zostały one wybrane. Otrzymane potomstwa wyraźnie im ustępowały.
3. Wydaje się, że u przynajmniej sześciu spośród badanych odmian (Amilo, Arant, Adar, Dańkowskie Złote, Motto, SMH 92) można szybko poprawić tolerancję na niedobory N w podłożu, stosując opisaną technikę selekcji masowej przy łagodnym współczynniku selekcji i rozmnożeniu wybranych pojedynków w panmiksji.
4. Żadna z badanych populacji żyta nie miała identycznego obrazu elektroforetycznego białek zapasowych. Stwierdzono istotne różnice w liczbie i układzie prążków w poszczególnych frakcjach sekalin. Zmiany w liczbie polipeptydów we frakcjach białek niskocząsteczkowych między badanymi populacjami, a ich potomstwem wystąpiły już po pierwszym etapie selekcji. Prawdopodobnie są jednak następstwem zawężenia genetycznego populacji S_1 i S_2 żyta.

LITERATURA

- Anioł A. 1981. Metody określania tolerancyjności zbóż na toksyczne działanie jonów glinu. Biul. IHAR 143: 3 — 14.
- Bos I., Henninks S. 1991. A comparison of several procedures for mass selection in winter rye. II. What are the merits of adjusting phenotypic values? Euphytica 52: 57 — 64.
- Caradus J. R., Woodfield D. R. 1998. Genetic control of adaptive root characteristics in white clover. Plant and Soil 200: 63 — 69.
- Escribano M. R., Santalla M., Casquero P. H., de Ron A. M. 1998. Patterns of genetic diversity in landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. Plant Breeding 117: 449 — 456.
- Falconer D. S., 1974. Dziedziczenie cech ilościowych. PWN, Warszawa
- Fernandez C. J., McInnes K. J., Cothren J. T. 1996. Water status and leaf area production in water — and nitrogenstressed cotton. Crop Sci. 36: 1224 — 1233.
- Górny A. G. 1992. Genetic variation of the root system on spring barley and oat. Rozprawy Naukowe Instytutu Genetyki PAN, Poznań: 5 — 89.
- Górny A. G., 1993. Differences in root and shoot response to limited N-supply in oat and spring barley. J. Agron. Crop Sci. 171: 161 — 167.
- Górny A. G. 1995. Cechy korzeni w hodowli roślin o obniżonych wymaganiach pokarmowych. Post. Nauk Rol. 1: 67 — 91.
- Górny A. G., Szolkowska A. 1996. Effects of selection for more vigorous seminal roots in two cross populations of oat (*Avena sativa* L.). J. Appl. Genet. 37, 4: 331 — 334.
- Hartmann A., Miedaner T., Geiger H. H. 1996. Genetic variability of rye under low nitrogen condition. Vort. Pflanzenzücht. 35:212 — 213.

- Hegde V. S., Singhal N. C. 2000. Identification and cluster analysis of Indian bread wheat varieties by acid PAGE of gliadin marker. *Plant Varieties Seeds* 13: 1 — 9.
- Klonsky A., Livingston P. 1944. Alternative systems aim to reduce inputs, maintain profits. *California Agriculture* 48: 5.
- Kucharczyk K. 1997. Elektroforetyczne metody analizy białek. *Mat. kursu „Metody biologii molekularnej”*, Gdańsk :9 — 15.
- Kulpa D. 2000. Badania nad tolerancją żyta (*Secale sp.*) na niedobory pokarmowe w podłożu i możliwością jej wykorzystania w hodowli. Pr. doktorska, AR, Szczecin.
- Laemmli V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 — 685.
- Madden J. P. 1994. Reforming science and education in an effort to make world agriculture more sustainable. *Agric. Progress* 69: 11 — 24.
- Niedzielski M., Bednarek P. T., Puchalski J. 1996. Zastosowanie elektroforezy białek zapasowych nasion do identyfikacji odmian żyta. *Mat. IV Ogólnopol. Symp. Genetyka ilościowa roślin uprawnych*, Polanica Zdrój, 22–25. 05. 1996: 49.
- Przybylska J., Zimniak – Przybylska Z., Krajewski P. 2000. Electrophoretic seed albumin patterns in the (*Vicia sativa* L.) aggregate. *J. Appl. Genet.* 4 1/3: 267 — 269.
- Radić-Mieble H., Saam C., Hils R., Kling Ch. L., Hesemann C. U. 1998. Characterization of spelt (*Triticum spelta* L.) forms by gel-electrophoretic analyses of seed storage proteins. III. Comparative analyses of spelt and Central European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars by SDS-Page and acid-PAGE. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1340 — 1348.
- Raun W. R., Johnson G. V. 1999. Improving nitrogen use for cereal production. *Agron. J.* 91: 357 — 363.
- Rzepka-Plevneš D., Marciniak H., Smiech M. 1997. Ocena tolerancji linii wsobnych żyta (*S. cereale* L.) na niedobory pokarmowe testem *in vitro*. *Biul. IHAR* 203: 137 — 146.
- Rzepka-Plevneš D., Tomczak P. 1988. Tolerancja różnych genotypów żyta na niedobory pokarmowe w kulturach wodnych. *Biul. IHAR* 200: 125 — 131.
- Rzepka-Plevneš D. 1999. Variability of tolerance to nitrogen and potassium deficiencies in original (S_0) and selected (S_1 – S_3) rye populations, assessed during *in vitro* cultures. *Plant Breed. Seed Sci.* 43, 1: 47 — 63.
- Sinclair T. R. 1998. Historical changes in harvest index and crop nitrogen accumulation. *Crop Sci.* 38: 638 — 643.
- Smolik M. 2001. Zmienność genotypów żyta *Secale cereale* L. o różnej tolerancji na niedobory pokarmowe w podłożu. Praca doktorska. AR, Szczecin: 121 — 130.
- Sperlich D. 1972. Genetyka populacji. PWN, Warszawa.
- Teyker R. H., Moll R. H., Jackson W. A. 1989. Divergent selection among maize seedlings for nitrate uptake. *Crop Sci.* 29: 879 — 884.
- Waga J. 1991. Zróżnicowanie frakcji białek gliadynowych u wybranych form pszenicy ozimej i jarej. *Hod. Rośl. Aklim.* 35, 1/2: 59 — 63.
- Young J. E. B., Cook S. K., Green S. M. 1996. Rotations and cropping systems. *Aspects Appl. Biology* 47: 137 — 144.