



Ozdobna forma kukurydzy (*Zea mays* L.)

Fot. Piotr Ochodzki

BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Nr 252/2009



Ozdobna forma kukurydzy (*Zea mays* L.). Fot. Piotr Ochodzki

RADZIKÓW 2009
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN — RADZIKÓW
05-870 BŁONIE pod WARSZAWĄ

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Dyrektor: Prof. dr hab. Edward Arseniuk

Komitet Redakcyjny:
Editorial Committee:

HENRYK J. CZEMBOR (Przewodniczący — Editor-in Chief),
DANUTA BOROS, WIESŁAW MĄDRY, WOJCIECH NOWACKI,
STANISŁAWA ROZTROPOWICZ-SZKUBEL, BARBARA ZAGDAŃSKA,
GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA (Sekretarz Redakcji — Editorial Secretary)

CZASOPISMO UKAZUJE SIĘ OD 1951 ROKU

Redaktor techniczny i skład komputerowy
GABRIELA WODZYŃSKA-ŁAPIŃSKA

Druk: PWR Sp. z o.o

KONFERENCJA NAUKOWA

NAUKA DLA HODOWLI ROŚLIN UPRAWNYCH

ZAKOPANE, 2. 02 — 06. 02. 2009

POD PATRONATEM PROF. DR. HAB. EDWARDA ARSENIUKA
DYREKTORA INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN

ORGANIZATOR

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
ZAKŁAD ROŚLIN ZBOŻOWYCH, KRAKÓW

WSPÓŁORGANIZATOR

KOMITET FIZJOLOGII, GENETYKI I HODOWLI ROŚLIN
WYDZIAŁU NAUK ROLNICZYCH, LEŚNYCH I WETERYNARYJNYCH
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

KOMITET NAUKOWY KONFERENCJI

PROF. DR HAB. ANDRZEJ ANIOŁ — zboża i kukurydza
PROF. DR HAB. EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA — okopowe
PROF. DR HAB. IWONA BARTKOWIAK-BRODA — oleiste
PROF. DR HAB. SŁAWOMIR PROŃCZUK — motylkowate i trawy

KOMITET ORGANIZACYJNY

DR JACEK WAGA — zhwaga@cyf-kr.edu.pl
DR ANNA STRZEMBICKA — zhstrzem@cyf-kr.edu.pl
DR TADEUSZ ŚMIAŁOWSKI — zhsmialo@cyf-kr.edu.pl
MGR TADEUSZ ZAWISKI
ZBIGNIEW GRYMEK

OFICJALNY SPONSOR KONFERENCJI

SYNGETA, CROP PROTECTION SP. Z O.O. WARSZAWA UL. POWĄZKOWSKA 44C

SPONSORZY KONFERENCJI

GRAINPOL PRZEDSIĘBIORSTWO TECHNIKI ZBOŻOWEJ
CEREUS WENA, WITKOWSCY
MERAZET S.A.
PRECOPTIC Co. WOJCIECHOWSKI SP. J.
DAR NATUREY POLSKA S.A.
TYSKIE BROWARY KSIĄŻECE

WROCLAW UL. MILICKA 38
TORUŃ UL. BIAŁA 19
POZNAŃ UL. KRAUTHOFERA 36
WARSZAWA UL. ARKUSZOWA 60
KRAKÓW UL. VETULANIEGO 1A
TYCHY UL. MIKOŁOWSKA 5

DOFINANSOWANO ZE ŚRODKÓW MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO



darnatury®

Czas na wodę, woda na czas

PRECOPTIC Co.



GRAINPOL

*Przedsiębiorstwo Techniki Zbożowej
dr inż. Jerzy Hlebionek 51-127 Wrocław ul. Milicka 38*

EDWARD S. GACEK

Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych, Słupia Wielka

Wybrane aspekty ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin i biotechnologii

Some aspects of protection of intellectual property in plant breeding and biotechnology

W artykule odniesiono się do wybranych zagadnień dotyczących ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin i w biotechnologii. Z uwagi na fakt, że odmiany roślin stanowią swoisty typ wynalazków, do ich ochrony prawnej stosuje się unikatowy system ochrony własności intelektualnej przedstawiony w Konwencji UPOV (Międzynarodowy Związek ds. Ochrony Nowych Odmian Roślin). Zgodnie z tym międzynarodowo przyjętym systemem prawnym, hodowcom odmian roślin, przyznawane jest wyłączone prawo do wytworzonych przez nich odmian. Nowe odkrycia w obszarze biotechnologii są chronione przez patenty, podobnie jak w przypadku wynalazków przemysłowych. Problematyka ochrony własności intelektualnej w obszarach zachowania i wykorzystania zasobów genowych i ochrony bioróżnorodności jest szeroko dyskutowana. Na poziomie międzynarodowym, zagadnienia ochrony prawnej są regulowane m.in. w Konwencji o Bioróżnorodności (CBD) i Międzynarodowym Traktacie ds. Zasobów Genetycznych dla Wyżywienia i Rolnictwa (FAO, ITPGRFA). W artykule przedstawiono też wybrane aspekty koegzystencji pomiędzy ochroną prawną w wymienionych obszarach i wynikającymi stąd komplikacjami komercyjnymi.

Słowa kluczowe: hodowla roślin, biotechnologia, ochrona własności intelektualnej

This article addresses some of the issues connected with the protection of intellectual property in plant breeding and biotechnology. Due to the fact that plant varieties constitute a special type of innovations, they require a unique legal protection, which is provided by the Convention of UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). New biotechnological innovations are protected by utility patents, similarly to the industrial discoveries. Intellectual property issues in the areas of genetic resources conservation and exploitation, as well as in biodiversity, are widely discussed and regulated at international level by the Convention on Biodiversity (CBD) and by International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (FAO ITPGRFA). Some of the issues of coexistence between different types of intellectual property protection used in plant breeding, biotechnology and biodiversity exploitation, as well as commercial implications arising from that coexistence, are also discussed in the article.

Key words: plant breeding, biotechnology, intellectual property rights

1. WPROWADZENIE

Systemy ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin i w biotechnologii mają specyficzny i złożony charakter. Regulacje prawne w tych obszarach wymagają ustawicznej aktualizacji i harmonizacji, z uwagi na ustawiczny rozwój hodowli i nauk biologicznych. Dotyczą one między innymi zagadnień ochrony prawnej nowych odmian roślin; ochrony patentowej wynalazków biotechnologicznych oraz prawnych aspektów zachowania i stosowania różnorodności biologicznej.

W skali międzynarodowej, doskonaleniem i harmonizacją regulacji prawnych w wymienionych obszarach zajmują się m.in.: WIPO (Międzynarodowa Organizacja Ochrony Własności Intelektualnej); WTO (Światowa Organizacja Handlu); UPOV (Międzynarodowy Związek Ochrony Nowych Odmian Roślin); FAO (Organizacja Wyżywienia i Rolnictwa przy ONZ); Konwencja CBD (Konwencja o Różnorodności Biologicznej); Konwencja UPOV; Porozumienie TRIPs (Handlowe Aspekty Ochrony Własności Intelektualnej w ramach WTO) oraz ITPGRFA (Międzynarodowy Traktat ds. Zasobów Genetycznych dla Wyżywienia i Rolnictwa) funkcjonujący pod auspicjami FAO (1, 2, 3, Agreement on Trade-Related..., 1994; International Treaty on Plant Genetic Resources..., 2004).

Celem niniejszej publikacji jest prezentacja systemowa ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin, biotechnologii i w działaniach związanych z zachowaniem i wykorzystaniem różnorodności biologicznej. Omówiono też problematykę koegzystencji pomiędzy systemami prawnymi funkcjonującymi w wymienionych obszarach.

2. SYSTEMY OCHRONY WŁASNOŚCI INTELEKTUALNEJ W HODOWLI ROŚLIN, BIOTECHNOLOGII ORAZ ASPEKTY PRAWNE ZACHOWANIA BIORÓŻNORODNOŚCI

2.1. System „sui generis” UPOV

Najpowszechniejszym sposobem ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin jest tzw. prawo hodowców do odmian roślin uregulowane w Konwencji UPOV (International Convention..., 1961, 1972, 1991). Konwencja UPOV (Akty z 1961, 1972, 1978 i 1991) jest międzynarodowo wynegocjowanym systemem prawnym przygotowanym wyłącznie do ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin i w nasiennictwie. Konwencja ta, zwana też systemem „sui generis” UPOV, dostosowanym do ochrony odmian roślin, usuwającym niedociągnięcia systemu patentowego dla ochrony odmian roślin. Na koniec 2008 roku, system ochrony prawnej typu UPOV obowiązywał w 67 krajach.

Polska jest członkiem UPOV od 1989 roku, a najnowszy Akt Konwencji z 1991 r. jest implementowany w Krajowej Ustawie o ochronie prawnej odmian (Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

W praktyce, przedmiotem ochrony prawnej w hodowli roślin i nasiennictwie są wszelkie akty komercyjnego wykorzystania materiału siewnego, materiału ze zbioru i produktów uzyskanych bezpośrednio z odmian konwencjonalnych; mieszańcowych; odmian nie różniących się wyraźnie (nieodrębnych) od odmian chronionych i odmian

pochodnych od odmian chronionych (Directive 2004/48/EC ..., 2004; Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

2.2. System wspólnotowego prawa do odmian roślin

Od 1995 roku, na obszarze UE, obok krajowych systemów ochrony prawnej odmian obowiązuje Wspólnotowy System Ochrony Prawnej Odmian (CPVR), oparty na Konwencji UPOV z 1991 roku i administrowany przez Wspólnotowy Urząd Odmian Roślin (CPVO) z siedzibą w Angers, Francja), (Council Regulation (EC), No. 2100/94..., 2004; Directive 2004/48/EC..., 2004).

Zależnie od woli hodowcy dana odmiana może być chroniona w jednym lub kilku krajach członkowskich krajowym wyłącznym prawem albo wspólnotowym wyłącznym prawem przyznanym przez CPVO, które obowiązuje równocześnie na obszarze całej wspólnoty.

Prawo wspólnotowe przyznane hodowcy do określonej odmiany ma charakter nadrzędny w stosunku do przyznanego wcześniej prawa do tej odmiany w systemie krajowym na poziomie kraju członkowskiego. Innymi słowy, prawo wspólnotowe i prawo krajowe dla tej samej odmiany mają charakter wykluczający się, na korzyść prawa wspólnotowego.

2.3. Ochrona prawna odmian zgodnie z Porozumieniem TRIPs

W 1995 roku, w związku z powstaniem Światowej Organizacji Handlu (WTO), ustanowiona została międzynarodowa regulacja prawna dotycząca zabezpieczenia własności intelektualnej podczas wymiany towarów, usług i kapitału pomiędzy sygnatariuszami WTO, a mianowicie: tzw. Porozumienie TRIPs (ang. Trade — Related Aspects of Intellectual Property Rights) (Handlowe Aspekty Praw Własności Intelektualnej), (Agreement on Trade-Related..., 1994). Zgodnie z tym porozumieniem, kraje członkowskie WTO, w tym Polska są zobowiązane do implementacji ochrony własności intelektualnej w handlu towarami i usługami we wszystkich obszarach gospodarki (Ustawa — prawo własności przemysłowej z dnia 30 czerwca 2000).

Artykuł 27.1. Porozumienia TRIPs wprowadza obowiązek stosowania w krajach członkowskich efektywnej ochrony własności intelektualnej wynalazków i procesów we wszystkich obszarach technologii, literatury i sztuki, a także ochrony odmian roślin. Jednakże w Art. 27.1., pkt 3, lit. b, tego Aktu odnoszącym się do odmian roślin pozostawia się państwom członkowskim do wyboru, bądź wdrożenie systemu „sui generis UPOV”, bądź systemu patentowego, bądź wreszcie kombinacji obu wymienionych systemów. Pomimo możliwości zamiennego stosowania systemów „sui generis” i ochrony patentowej do ochrony prawnej odmian roślin, państwa członkowskie WTO, w zdecydowanej większości wybrały system UPOV. Wynika to stąd, że odmiany roślin z uwagi na swoją naturę, w mniejszym stopniu nadają się do ochrony prawnej poprzez tradycyjne systemy patentowe, niż ma to miejsce w przypadku wynalazków i odkryć technicznych. W Europie zmodyfikowany model ochrony patentowej odmian roślin wybrały nieliczne kraje, tj. Węgry, Bułgaria i Rumunia.

W USA obowiązuje skomplikowany system pośredni, tj. patentów, patentów roślinnych i system UPOV.

2.4. Ochrona prawna wynalazków biotechnologicznych

Odkrycia w biotechnologii chronione są głównie poprzez patenty. Podstawami prawnymi patentowania w obszarze biotechnologii są:

Europejska Konwencja Patentowa (EPC) (European Patent Convention (EPC), 1973, Munich),

— Dyrektywa 98/44/EC w sprawie ochrony odkryć w biotechnologii (Directive 98/44 of the European Parliament..., 1998),

— ustawodawstwa patentowe krajów członkowskich,

— prawo własności przemysłowej (PWP) w Polsce (Ustawa — prawo własności przemysłowej z dnia 30 czerwca 2000 r.).

Zgodnie z EPC (Art. 53b) oraz PWP w Polsce (Art. 29, ust. 1, pkt 2), patentowaniu podlegają wynalazki biotechnologiczne, za wyjątkiem odmian roślin i ras zwierząt.

Najpowszechniej patentowanymi produktami biotechnologii są:

— oligonukleotydy (gen i/lub jego fragmenty),

— sondy,

— wektory zawierające geny,

— komórki, z introduktowanymi genami (tzw. komórki GM),

— rośliny uzyskane w drodze regeneracji komórek GM (rośliny GM).

Nie z każdej rośliny GM powstaje odmiana GMO, w tym także nie każda odmiana GMO jest odmianą pochodną w rozumieniu Konwencji UPOV.

O kategorii odmiany GMO w kontekście prawnym decyduje sposób jej wytworzenia. Wprowadzenie pojedynczego genu (transgenu) do odmiany chronionej skutkuje tym, że staje się ona odmianą pochodną. Rejestracja i komercyjna eksploatacja takich odmian wymaga autoryzacji ze strony właściciela wyjściowej odmiany chronionej.

Patentowane są też procesy, za pomocą których jest wytwarzany, przetwarzany i wykorzystany materiał biologiczny, zwłaszcza w procesach mikrobiologicznych.

2.5. Ochrona bioróżnorodności w kontekście ochrony własności intelektualnej

Międzynarodowe i krajowe regulacje prawne w zakresie własności intelektualnej uwzględniają problematykę ochrony bioróżnorodności i jej wykorzystania dla rozwoju hodowli roślin i biotechnologii (Convention on Biodiversity (CBD), 1992; International Treaty on Plant Genetic Resources..., 2004), a w szczególności:

— zasad ochrony bioróżnorodności,

— zachowania bioróżnorodności („*in situ*” i/lub „*ex situ*”),

— dostęp do różnorodności biologicznej i występującej na jej temat wiedzy „lokalnej” i podziału korzyści materialnych wynikających z ich stosowania w biotechnologii i hodowli nowych odmian roślin (Wielostronny System Dostępu i Podziału Korzyści tzw. MLS) i Standardowe Porozumienie Transferu Materiałów (SMTA) w ramach ITPGRFA (International Treaty on Plant Genetic Resources..., 2004),

— zasady transferu technologii do różnych krajów, w kontekście stosowanych form własności intelektualnej w krajach rozwiniętych,

— ewolucji międzynarodowych i krajowych przepisów prawnych w zakresie własności intelektualnej w obszarach bioróżnorodności (Convention on Biodiversity (CBD), 1992).

Podstawowymi regulacjami prawnymi w tych obszarach są Konwencja o Różnorodności Biologicznej (CBD) (Convention on Biodiversity (CBD), 1992) i Międzynarodowy Traktat ds. Zasobów Genetycznych dla Wyżywienia i Rolnictwa (ITPGRFA) (Agreement on Trade-Related..., 1994) oraz stosowne ustawodawstwa państw członkowskich.

3. ODSTĘPSTWA OD WYŁĄCZNEGO PRAWA DO ODMIAN

Konwencja UPOV i wywodzące się z niej wspólnotowe i krajowe przepisy prawne przewidują odstępstwa w korzystaniu z odmian chronionych, bez potrzeby autoryzacji ze strony ich właścicieli (International Convention..., 1961, 1972, 1991; Council Regulation (EC)...., 2004, Directive 2004/48/EC..., 2004). Są to tzw. odstępstwa obligatoryjne i fakultatywne. Do odstępstw obligatoryjnych zaliczamy:

- własne, niezarobkowe potrzeby,
- cele badawcze/doświadczalne,
- hodowla nowych odmian roślin (tzw. breeder's exemption), z wyjątkiem:
 - odmian pochodnych,
 - odmian nie różniących się wyraźnie (nieodrębnych) od odmian chronionych,
 - składników odmian mieszańcowych.

Odstępstwem fakultatywnym jest tzw. przywilej rolnika (farmer's privilege). Przywilej rolnika odnosi się do kilkunastu najważniejszych gospodarczo gatunków roślin rolniczych i nie dotyczy producentów roślin ogrodniczych. Daje rolnikom prawo do używania w ograniczonych prawem ilościach tzw. materiału ze zbioru jako materiału siewnego, wyłącznie we własnym gospodarstwie. Jednakże rolnicy mają obowiązek odprowadzania odpłatności za stosowanie materiału ze zbioru na rzecz hodowcy, która zwykle jest niższa od opłaty licencyjnej (Council Regulation (EC)... , 2004, 8, Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

Mimo istniejących instrumentów prawnych dotyczących ochrony wyłącznego prawa hodowców do odmian roślin, okazuje się, że nadal muszą oni bronić swojej własności intelektualnej. Nieprzestrzeganie prawa hodowców jest zjawiskiem powszechnym o rozmiarze międzynarodowym. Egzekwowane prawa do odmian leży w gestii hodowców. Hodowcy mają do dyspozycji różne instrumenty prawne, co zapewnia im prawodawstwo wspólnotowe, jak i przepisy krajowe państw członkowskich (Directive 2004/48/EC..., 2004, Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

4. ODSTĘPSTWA OD OCHRONY PATENTOWEJ

Zgodnie z prawodawstwem UE, w tym także poszczególnych krajów członkowskich istnieje możliwość stosowania opatentowanych odkryć biotechnologicznych do celów badawczych. Odkrycia takie zgodnie z postulatem Międzynarodowej Federacji Nasiennic (ISF) powinny być również stosowane w pracach hodowlanych. W praktyce, tylko niektóre kraje (Francja, Niemcy) wprowadziły stosowne zapisy w prawie patentowym. Powszechnie uznaje się, że odstępstwo od ochrony patentowej powinno być ograniczone

do etapu prac hodowlanych, a nie do komercyjnej eksploatacji odmian, zawierających opatentowane elementy.

W USA występują dwa typy patentów w odniesieniu do materiałów roślinnych, a mianowicie:

- patenty użytkowe (utility patents), regulowane ustawą o patentach użytkowych (Utility Patent Act),
- patenty roślinne (plant patents) regulowane ustawą o patentach roślinnych (Plant Patent Act).

Zdaniem Światowej Federacji Nasiennej odmiany z opatentowanymi elementami genetycznymi powinny być dostępne do dalszej hodowli roślin w ramach tzw. przywileju hodowcy (breeder's privilege), znanego z Konwencji UPOV. Jednakże komercjalizacja odmian wyhodowanych z użyciem wynalazków biotechnologicznych wymaga autoryzacji (na zasadach licencji) ze strony właścicieli opatentowanych elementów genetycznych. W praktyce oznacza to, że ochrona patentowa odkrycia biotechnologicznego nie wygasa, jeżeli wynalazek ten zostanie wprowadzony do innej nowej odmiany bez autoryzacji właściciela patentu.

Niestety większość systemów prawnych ochrony patentowej w świecie, wyklucza lub znacznie ogranicza przywilej hodowcy, co może mieć poważne reperkusje dla dalszego rozwoju hodowli roślin.

Najbardziej restrykcyjnym w tym względzie, wydaje się być system patentowy USA, w którym nie przewiduje się żadnych odstępstw, typu:

- możliwości korzystania z wynalazków do działalności badawczej i doświadczalnej,
- do własnych, niezarobkowych potrzeb,
- patenty roślinne, nie przewidują:
 - wyjątku hodowcy (breeder's exemption),
 - przywileju rolnika (farmer's privilege).

W Europie prawo patentowe jest mniej restrykcyjne i przewiduje odstępstwa w zakresie ochrony patentowej, a mianowicie:

- zgodnie z Art. 27 Europejskiej Konwencji Patentowej, a także Dyrektywy Biotechnologicznej (EC 98/44), istnieje możliwość:
 - korzystania z wynalazków biotechnologicznych chronionych patentami do własnych i niezarobkowych celów,
 - stosowania opatentowanych innowacji do celów badawczych i doświadczalnych.

Reasumując, jeżeli komercyjnie dostępna odmiana ma opatentowane elementy genetyczne, to zdaniem organizacji nasiennych, powinno być dostępne do dalszej hodowli, zgodnie z przywilejem hodowcy (Konwencja UPOV, stanowisko ISF).

5. KOEGZYSTENCJA POMIĘDZY PRAWEM HODOWCÓW DO ODMIAN I OPATENTOWANYMI ODKRYCIAMI BIOTECHNOLOGICZNYMI

Problem wzajemnych zależności prawnych i skutków komercyjnych pomiędzy wyłącznym prawem hodowców do odmian a odkryciami w biotechnologii, rozwiązuje Konwencja UPOV z 1991, wprowadzając kategorię odmian pochodnych. Odmiany

pochodne wywodzą się od odmian macierzystych. Tworzone są za pomocą rozmaitych technik hodowlanych, w tym także na drodze inżynierii genetycznej i innych metod biotechnologicznych. Odmiany pochodne różnią się od odmian macierzystych (wyjściowych), zazwyczaj pojedynczymi cechami i jednocześnie zachowują pozostałe właściwości odmian macierzystych (International Convention..., 1961, 1972, 1991; Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

Wprowadzenie koncepcji odmian pochodnych ma kluczowe znaczenie dla rozwoju hodowli roślin, produkcji rolniczej i w konsekwencji dobrobytu społeczeństw. Wprowadzenie tej koncepcji pozwala na zachowanie tzw. „prawa hodowcy” w programach hodowlanych. W praktyce oznacza to możliwość stosowania w programach krzyżowań odmian chronionych wyłącznym prawem, lub możliwość stosowania odmian z opatowanymi elementami genetycznymi (International Convention..., 1961, 1972, 1991; Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

Hodowca nowo wytworzonej odmiany pochodnej zawierającej opatentowany wynalazek biotechnologiczny, przed komercyjnym jej wykorzystaniem, wymaga autoryzacji (licencji) ze strony posiadacza patentu na ten wynalazek (Council Regulation (EC)..., 2004; Directive 2004/48/EC ..., 1998).

W dobie postępującego rozwoju biotechnologii i rozszerzającej się praktyki patentowania rozmaitych odkryć biotechnologicznych szczególnego znaczenia nabierają wzajemne relacje pomiędzy hodowcami odmian konwencjonalnych i posiadaczami patentów na produkty i procesy biotechnologiczne. Obecnie w różnych gremiach, głównie na forum Światowej Federacji Nasiennej trwa ożywiona dyskusja nad poszukiwaniem optymalnych rozwiązań w zakresie relacji prawnych pomiędzy hodowcami odmian konwencjonalnych i właścicielami patentów na procesy i produkty biotechnologii.

W praktyce, problem ten jest najczęściej rozwiązywany poprzez zawieranie stosownych umów licencyjnych, bądź przymusowych umów licencyjnych przez hodowców odmian konwencjonalnych i posiadaczy opatentowanych elementów genetycznych (Council Regulation (EC)..., 2004; Directive 2004/48/EC..., 1998; Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003; Ustawa — prawo własności przemysłowej z dnia 30 czerwca 2000 r.).

W przypadku odmian pochodnych, prawo jej hodowcy koegzystuje z prawem hodowcy odmiany wyjściowej i/lub posiadaczem patentu na odkrycie biotechnologiczne. W celu komercyjnego wykorzystania takiej odmiany niezbędne jest zawarcie stosownych umów licencyjnych pomiędzy zainteresowanymi stronami.

W przypadku braku porozumienia pomiędzy stronami, prawodawstwo UE i poszczególnych państw członkowskich przewiduje możliwość zawierania licencji przymusowych na eksploatację odmian pochodnych i/lub wynalazków biotechnologicznych mających znaczenie dla gospodarki i rozwoju społeczeństw (Council Regulation (EC)..., 2004; Directive 2004/48/EC..., 1998; Ustawa o ochronie prawnej odmian..., 2003).

Licencje przymusowe przyznaje się, jeżeli zainteresowane strony nie są w stanie zawrzeć umów licencyjnych, a mianowicie:

— jeżeli hodowca nie może wykonać posiadanego prawa do odmiany (krajowego, wspólnotowego) bez naruszenia prawa patentowanego,

— jeżeli posiadacz patentu na odkrycie biotechnologiczne nie może wykonać swojego prawa bez naruszenia prawa hodowcy do odmiany.

Zainteresowana strona może wystąpić z wnioskiem do urzędu patentowego i/lub urzędu przyznającego wyłączone prawo do odmiany o przyznanie licencji przymusowej, odpowiednio na niewyłączne stosowanie opatentowanego odkrycia, bądź na niewyłączne stosowanie odmiany chronionej wyłącznym prawem.

W obu przypadkach, wnioskujący o przyznanie licencji przymusowych muszą przedstawić dowody na brak możliwości zawarcia umowy licencyjnej i jednocześnie podać informacje, że określony patent lub odmiana chroniona wnoszą istotny postęp technologiczny i mają duże znaczenie ekonomiczne.

6. ZAMIERZENIA NA PRZYSZŁOŚĆ

Na forum międzynarodowym trwa obecnie dyskusja nad udoskonaleniem koncepcji odmian pochodnych i odmian nie różniących się wyraźnie od odmian chronionych, w kontekście tzw. progów „minimalnych dystansów” w ramach badań właściwości morfologicznych i molekularnych wymienionych kategorii odmian. W rezultacie ma to przyczynić się do poprawy efektywności ochrony prawnej odmian i dalszego rozwoju metod hodowli roślin, w tym wykorzystania wynalazków biotechnologicznych. Zagadnienie to ma także zastosowanie w kontekście zabezpieczenia materiałów dowodowych w przypadkach sporów w trakcie ewentualnego naruszenia prawa do odmian roślin i prawa patentowego.

Do wspomnianych celów powinny być stosowane urzędowe metody badawcze, wystarczająco precyzyjne i wiarygodne. W ramach UPOV funkcjonuje Grupa Robocza ds. Technik Biochemicznych i Molekularnych oraz Profilowania DNA (Grupa BMT), która ocenia stan rozwoju i możliwości zastosowania technik biochemicznych i molekularnych, w tym analiz DNA w działaniach urzędowych jednostek rejestrowych i inspekcji kontrolnych w obszarze rejestracji i ochrony prawnej odmian. Dotychczas, najbardziej popularnymi, uzupełniającymi technikami laboratoryjnymi, stosowanymi do badań odmian są metoda elektroforezy białek zapasowych, przydatna do wstępnych analiz identyczności odmian, głównie roślin zbożowych oraz metoda elektroforezy izoenzymów w badaniach tożsamości odmian kukurydzy. Obecnie trwają intensywne badania nad możliwością szerszego wprowadzenia wiarygodnych metod analiz DNA do działań urzędowych w obszarze badań i identyfikacji odmian.

W organizacjach i instytucjach sektora nasiennego prowadzona jest debata nad możliwością dalszego usprawnienia dotychczasowych regulacji cywilnych, karnych, celnych, administracyjno-prawnych oraz sankcji administracyjnych w obszarze ochrony własności intelektualnej.

Ważnym działaniem dla poprawy skuteczności egzekwowania wyłącznego prawa do odmian roślin jest zwiększenie świadomości zarówno wśród hodowców roślin, jak i szeroko rozumianych użytkowników odmian o istniejących systemach ochrony prawnej odmian i potrzebie ich przestrzegania.

LITERATURA

- Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights (TRIPs Agreement, WTO) 1994. Marrakesh.
- Convention on Biodiversity (CBD). 1992. Rio de Janeiro.
- Council Regulation (EC), No. 2100/94 on Community plant variety rights. Official Journal, L. 227, 01.09.2004 p. 0001-0030.
- Directive 98/44 of the European Parliament and of the Council of 6 July 1998 on the legal protection of biological inventions. Official Journal L. 213, 30.07.1998, p. 0013-0021.
- Directive 2004/48/EC of the European Parliament and of the Council of 20 April 2004 on the enforcement of intellectual property rights. Official Journal L. 157, 02.06.2004, p. 0045-0086.
- European Patent Convention (EPC), 1973, Munich.
- International Convention for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV Convention) of December 2, 1961, as revised at Geneva on November 10, 1972; on October 23, 1978 and on March 19, 1991, Geneva.
- International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (ITPGRFA, FAO). 2004. Rome.
- Ustawa o ochronie prawnej odmian z dnia 26 czerwca 2003 r. (Dz.U. nr 137/2003, poz. 1300; zm. Dz.U. nr 126/2006, poz. 877 i zm. Dz.U. nr 99/2007, poz. 662).
- Ustawa — prawo własności przemysłowej z dnia 30 czerwca 2000 r. (tekst jednolity, Dz.U. z 2003, Nr 119, poz. 1117 z późn. zm.).

BOGUSŁAW GOŁĘBIOWSKI

Katedra Zarządzania Przedsiębiorstwami

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Poglądy polskich hodowców na perspektywy rozwoju hodowli i nasiennictwa w Polsce

The views of Polish breeders on perspectives for development of plant breeding and seed production in Poland

Na podstawie badań ankietowych przeprowadzonych w okresie marzec-czerwiec 2008 przedstawiono poglądy kadry menedżerskiej i głównych hodowców roślin spółek, będących jednoosobowymi spółkami ANR i IHAR w kwestii oceny wybranych systemów organizacyjnych i funkcji występujących w spółkach hodowlano-nasiennych. Przedstawiono ocenę polskiej nauki pracującej na rzecz hodowli roślin oraz ocenę instytucji nadzoru nasiennego w Polsce. Z analizy uzyskanych danych wynika, że występuje konieczność indywidualnego podejścia w zakresie nowych wyzwań związanych ze strategicznym rozwojem krajowej hodowli roślin, a także potrzeba poprawy w spółkach hodowlano-nasiennych efektywności łańcucha wartości. Ponadto w celu wsparcia naukowego krajowego przemysłu hodowlano-nasiennego niezbędne jest wypracowanie nowego modelu wsparcia, zwiększającego udział nauki jako nośnika wiedzy i pozwalającego na rozszerzenie współpracy między nauką a przedsiębiorstwami hodowli roślin. Jednocześnie pod względem prawnym, na nowo powinna zostać określona rola i miejsce jaką ma spełniać Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

Słowa kluczowe: hodowca, hodowla roślin, innowacyjność, jednostka naukowa, instytucje nadzoru nasiennego

The surveys conducted in the period March-June 2008 were used to present the views of managers and principal plant breeders working for the ANR and IHAR single-owner entities on some aspects of organizational systems and functions met at breeding and seed companies. More, the role of Polish science in plant breeding and that of seed inspection institutes in Poland, are characterized. Analysis of the data shows that there is need for an individual approach to the new challenges related to the strategic development of national plant breeding and the need for improvement of value chain efficiency in breeding and seed companies. Furthermore, in order to give scientific support to national plant breeding and seed industry, it is necessary to develop a new model of support, increasing the share of science as a carrier of knowledge and allowing the extension of cooperation between science and plant breeding companies. At the same time, as a matter of law, the role and place of the Plant Health And Seed Inspection should be referred again.

Key words: breeder, plant breeding, innovation, scientific unit, seed inspection institutes

WSTĘP

W Polsce od kilku lat toczy się dyskusja nad problemem przyszłości krajowej hodowli roślin i nasiennictwa, który od 2007 roku, w wyniku usilnych działań Polskiej Izby Nasiennej, jest w coraz większym stopniu dostrzegany nie tylko przez głównych uczestników sektorów hodowli roślin i nasiennictwa, ale również przez polską naukę pracującą na rzecz krajowej hodowli roślin oraz władze rządowe.

Spowodowane jest to z jednej strony kryzysową sytuacją w tej dziedzinie, natomiast z drugiej globalnymi zmianami w światowym przemyśle nasiennym i wynikającymi stąd konsekwencjami dla Polski (Podlaski, 2005).

W warunkach postępującej globalizacji duże firmy hodowlane tracą narodowy charakter, jak również znika izolacja narodowych rynków nasiennych. Odmiany hoduje się tam, gdzie warunki zapewniają największą efektywność tego procesu, nasiona są wytwarzane w krajach o najlepszych warunkach agroekologicznych, natomiast sprzedawane na rynkach gwarantujących największe zyski firmie hodowlanej. W konsekwencji polski rynek nasienny zaczyna być stopniowo opanowywany przez firmy zagraniczne, ponieważ nabiera on coraz bardziej charakteru globalnego. Dodatkowo wspólnotowy katalog odmian umożliwia zagranicznym firmom nasiennym dostarczanie nasion bezpośrednio do odbiorców, co wymyka się oficjalnym statystykom. W związku z tym sytuacja na rynku nasiennym jest w rzeczywistości gorsza niż wynika to z oficjalnych danych (Podlaski, 2008).

Potwierdzeniem powyższego stwierdzenia jest między innymi sytuacja jaka zaistniała w 2008 roku na rynku nasion zbóż, kiedy to krajowi hodowcy konkurowali z 23 hodowcami zagranicznymi, a udział krajowych odmian, mierzony powierzchnią reprodukcji nasion, wynosił 61,1% (Marciniak, 2008). Dodatkowo należy zauważyć, że udział polskich odmian w krajowym rejestrze zmniejszył się i wynosi obecnie 51%, zaś zagranicznych 49%; sprzedaż kwalifikowanego materiału siewnego odmian krajowych sięga tylko 52,5%, a zagranicznych 47,5%; jednak znaczna część kwalifikowanego materiału siewnego należy do odmian zagranicznych, zarejestrowanych we wspólnotowym katalogu odmian (Duczmał, 2008).

Najslabszym elementem polskiego przemysłu nasiennego jest rynek, którego cechą charakterystyczną jest chaos. Chaos wynika z przyczyn subiektywnych i obiektywnych. Czynnikiem subiektywnym jest brak tradycji właściwego funkcjonowania firm hodowlanych i nasiennych. Czynniki obiektywne zależne są między innymi od funkcjonowania firm hodowlano-nasiennych (Podlaski, 2005). W Polsce programy hodowlane umieszczono w dużych przedsiębiorstwach produkcyjnych, które kierują się w swych decyzjach rynkowych bardziej doraźną potrzebą sprzedaży dużych ilości wyprodukowanych przez siebie nasion, niż zapewnieniem przychodów z opłat licencyjnych na pokrycie kosztów hodowli (Marciniak, 2005). U podstaw tworzenia firm hodowlano-nasiennych leżało przeświadczenie, że koszty hodowli można będzie pokrywać z zysku innych działów (Marciniak, 2008), tymczasem hodowla roślin w tych firmach zaczęła konkurować ze zwykłą produkcją rolniczą, a jedynym czynnikiem otoczenia ekonomicznego, mającym wiodący wpływ o potencjalnej dużej sile oddziaływania pozytywnego na

funkcjonowanie przedsiębiorstw hodowlano-nasiennych, stał się wzrost poziomu dopłat bezpośrednich do produkcji rolnej (Gołębiowski, 2006).

Problem przyszłości krajowego przemysłu hodowlano-nasiennego coraz częściej zaczyna gościć jako blok tematyczny na różnych konferencjach naukowych organizowanych przez polską naukę. Główne tematy badawcze przedstawiane w blokach tematycznych związanych z przemysłem hodowlano-nasiennym dotyczą między innymi takich zagadnień jak: efektywność hodowli roślin, konkurencyjność krajowej hodowli roślin, finansowanie działalności hodowlanej, otoczenie firm hodowlano-nasiennych, funkcjonalność struktury organizacyjnej tych firm, oceny nauki pracującej na rzecz hodowli roślin oraz luk prawnych. Praktycznie wszystkie ww. zagadnienia są opracowywane w kontekście reorganizacji krajowego sektora hodowli roślin oraz jego prywatyzacji.

Celem badawczym niniejszego artykułu było poznanie poglądów polskich hodowców w kwestii oceny wybranych systemów organizacyjnych i funkcji występujących w spółkach hodowlano-nasiennych, oceny polskiej nauki pracującej na rzecz hodowli roślin oraz oceny instytucji nadzoru nasiennego w Polsce, które to poglądy powinny stanowić punkt wyjścia do szerszej dyskusji uwzględniającej różne punkty widzenia.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy wykorzystany w niniejszej pracy został zgromadzony poprzez zastosowanie metody ankietowej, której celem było poznanie poglądów kadry menedżerskiej i głównych hodowców roślin, zarządzających i pracujących w spółkach, będących jednoosobowymi spółkami Agencji Nieruchomości Rolnych (ANR) i Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR). Ze względu na właścicieli spółek, kadra zarządzająca i główni hodowcy roślin, w niniejszym artykule (zarówno w tytule, jak i w treści) zostali określani pod jednym mianownikiem to jest jako polscy hodowcy.

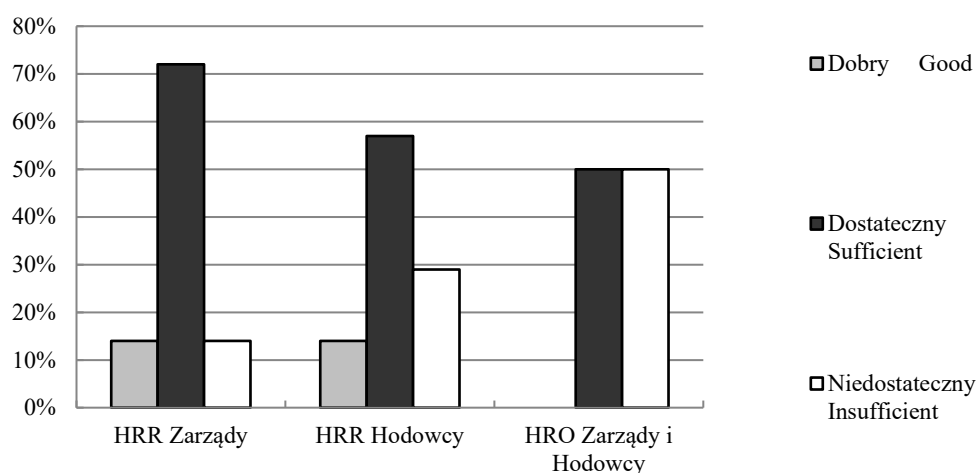
Ponieważ tematyka badawcza dotyczy perspektyw krajowego przemysłu hodowlano-nasiennego, w związku z tym, w tworzeniu próby badawczej zastosowano indywidualny dobór celowy. Do badań zaproszono prezesów i głównych hodowców 15 Spółek hodowli roślin, gdzie jednoosobowym właścicielem jest ANR i 3 Spółki, gdzie jednoosobowym właścicielem jest IHAR. W badaniach wzięły udział 22 osoby. Ze względu na reprezentację sektora i zajmowane stanowiska utworzono i poddano analizie trzy grupy badawcze. Pierwszą grupę, oznaczoną jako HRR Zarządy, stanowi 7 osób będących przedstawicielami kadry zarządzającej z sektora hodowli roślin rolniczych. Drugą grupę, oznaczoną jako HRR Hodowcy, reprezentowaną również przez 7 osób, stanowią główni hodowcy z sektora hodowli roślin rolniczych. Trzecią grupę, oznaczoną jako HRO Zarządy i Hodowcy, stanowią 4 osoby z kadry zarządzającej i 4 głównych hodowców z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych. W sektorze hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych podstawą nie wyodrębnienia w analizie badań wypowiedzi kadry zarządzającej i głównych hodowców była zbyt mała liczba respondentów zajmująca określone stanowiska w swoich spółkach oraz fakt, że odpowiedzi kadry zarządzającej były w większości przypadków zbieżne z odpowiedziami głównych hodowców.

W ankiecie zastosowano pytania zamknięte typu dysjunktywnego oraz typu alternatywnego obejmujące takie zagadnienia jak: nadzór właścicielski, struktura organizacyjna, innowacyjność krajowej hodowli roślin oraz polskiej nauki pracującej na rzecz hodowli roślin, efektywność marketingu, a także ocena instytucji nadzoru nasiennego. Badania przeprowadzono w okresie marzec-czerwiec 2008 roku.

WYNIKI I DYSKUSJA

ANR jak również IHAR przyjmując na siebie obowiązek właścicielski w spółkach prawa handlowego, których przedmiotem działalności jest między innymi hodowla roślin i nasiennictwo przyjęły na siebie również funkcję ochrony potencjału twórczego polskiej hodowli roślin. W toczącej się dyskusji na temat dalszego funkcjonowania sektora hodowlano-nasennego nie można pominąć oceny zarządów i hodowców roślin w kwestii wypełnienia przyjętej przez nadzór właścicielski funkcji ochronnej.

Korzystnie (dobrze) nadzór właścicielski w zakresie ochrony potencjału krajowej hodowli roślin ocenia grupa stanowiąca około 71% hodowców z sektora hodowli roślin rolniczych (rys. 1). Natomiast w odniesieniu do zarządów spółek z sektora hodowli roślin rolniczych, jedynie około 43% respondentów ocenia w stopniu dobrym wypełnienie funkcji ochronnej przez nadzór właścicielski. Negatywnie ochronę nadzoru właścicielskiego nad potencjałem twórczym hodowli roślin rolniczych ocenia grupa stanowiąca około 28,5% zarządów i około 14% hodowców.



Rys. 1. Ocena nadzoru właścicielskiego (ANR i IHAR) w zakresie 15-letniej ochrony polskiej hodowli roślin

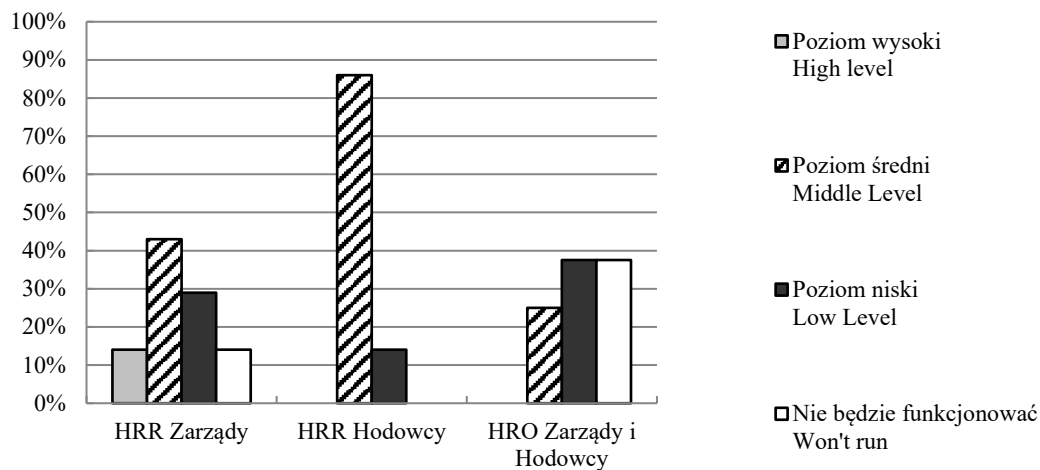
Fig. 1. Evaluation of corporate governance (ANR and IHAR) over a 15-year period of protection of Polish plant breeding

W sektorze hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych, wypełnianie funkcji ochronnej hodowli roślin przez nadzór właścicielski zostało przez zarządy oraz hodowców

praktycznie mocno skrytykowane. W badanej grupie respondentów, aż 75% oceniło nadzór właścicielski negatywnie lub bardzo źle.

Podkreślić należy fakt, że nikt z badanej grupy respondentów nie wystawił dla nadzoru właścicielskiego (w zakresie badanej funkcji) oceny bardzo dobrej. Można zatem ostrożnie wnioskować, że koniecznym staje się przeprowadzenie przez właścicieli analizowanych Spółek badań w zakresie wyłonienia przyczyn tak krytycznych ocen.

Jedną z przyczyn ogólnie słabej oceny nadzoru właścicielskiego jest brak indywidualnego podejścia do nadzorowanych spółek w zakresie strategicznego rozwoju prowadzonego działu hodowli roślin. Sugestię tę potwierdza fakt, że aż 54,5% z ogólnej liczby badanych respondentów twierdzi, iż gospodarowanie działem hodowli roślin w firmie o charakterze hodowlano-produkcyjnej było niewłaściwe. Zdaniem 77% respondentów prowadzenie w kolejnych latach działalności gospodarczej związanej z hodowlą roślin w strukturze firmy produkcyjno-handlowej spowoduje utrwalenie ubezwłasnowolnienia hodowli roślin. W opinii respondentów, trwanie w obecnej strukturze może w przyszłości doprowadzić do tak zwanej przeciętności (rys. 2) i jeszcze większej utraty udziału krajowych odmian zarówno w produkcji jak i sprzedaży kwalifikowanego materiału siewnego.



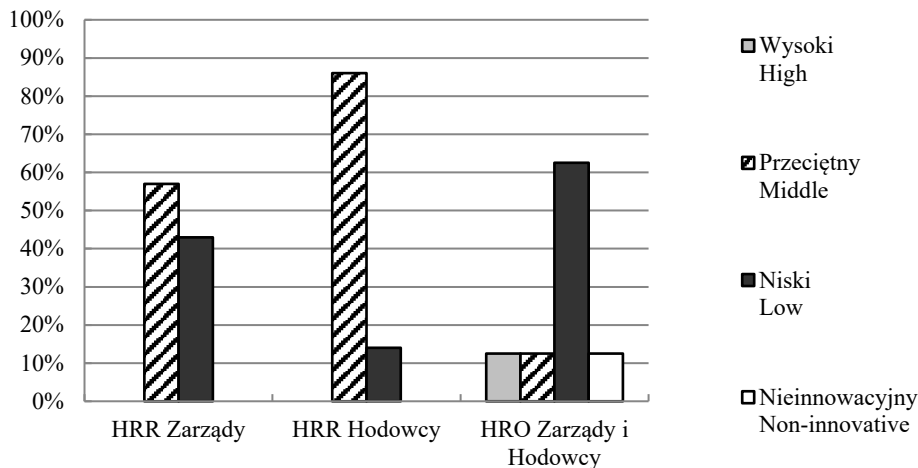
Rys. 2. Poziom na jakim może funkcjonować w przyszłości polska hodowla roślin przy zachowaniu struktury firmy hodowlano-produkcyjnej

Fig. 2. The level at which the plant breeding in Poland may operate in the future, while maintaining the structure of breeding-productive company

Konieczność zmian w najbliższych latach w strukturze organizacyjnej Spółek hodowlano-nasiennych dostrzega 68% ogółu badanych, natomiast 23% badanej grupy nie ma w tej kwestii jeszcze wypracowanego własnego zdania. Zwolennicy reform sugerują, że w obecnym stanie organizacyjnym występuje zbyt duże rozproszenie finansowych środków inwestycyjnych na różnego rodzaju prowadzone działalności, natomiast zbyt mało środków przeznacza się na inwestowanie w dział hodowli i nasiennictwa.

Z analizy uzyskanych wyników badań wynika, że kluczem do sukcesu w przyszłości powinno być pobudzenie procesów innowacyjnych, a w szczególności w zakresie innowacyjności rynkowej, gdyż posiadana własność intelektualna w obecnym otoczeniu rynkowym to za mało aby odnieść sukces.

Oceniając innowacyjność rynkową polskiej hodowli roślin grupa stanowiąca 71% respondentów z sektora hodowli roślin rolniczych uważa, że poziom ten w krajowej hodowli roślin rolniczych jest przeciętny (rys. 3). Natomiast około 63% respondentów z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych uważa, że poziom innowacyjności rynkowej w ich sektorze jest niski.



Rys. 3. Poziom innowacyjności krajowej hodowli roślin w opinii polskich hodowców
Fig. 3. The level of innovation in national plant breeding in the opinion of Polish breeders

Jedną z przyczyn przeciętnego czy też niskiego poziomu innowacyjności jest zdaniem respondentów również przeciętny (a zadaniem 36% ogólnej liczby respondentów niski) poziom innowacyjności polskiej nauki pracującej na rzecz hodowli roślin (rys. 4). Grupa stanowiąca około 64% ogółu respondentów podkreśla, że polska nauka pracująca na rzecz hodowli roślin jest źle zorganizowana. W uwagach respondenci podkreślają, że jest zbyt mała dostępność do wiedzy pozyskiwanej w badaniach naukowych (brak przełożenia wiedzy z czasopism naukowych do czasopism popularnych, zbyt mała ilość konferencji typu nauka — praktyce) oraz fakt, że wiedza zdobyta w trakcie badań naukowych często dofinansowywanych z budżetu państwa w formie grantów jest później przez jednostki naukowe wykorzystywana do konkurowania na rynku z przedsiębiorstwami hodowlanymi.

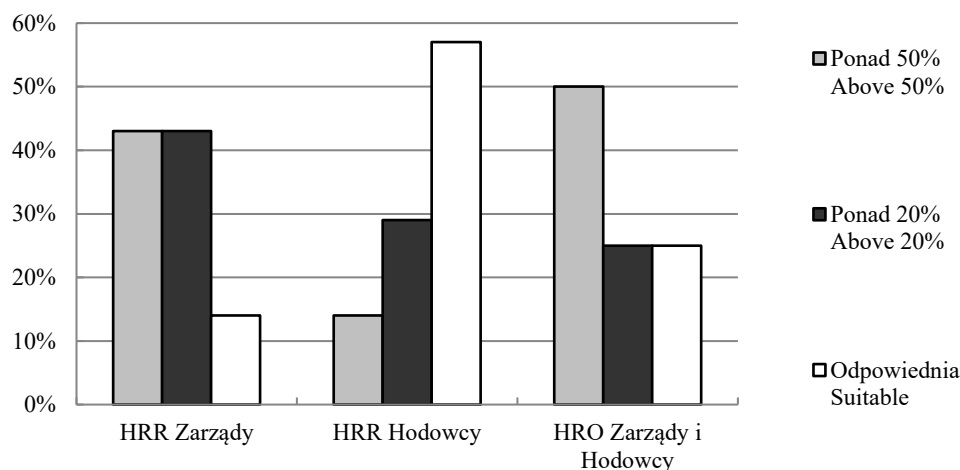
Do rozważenia przez decydentów kształtujących politykę w zakresie funkcjonowania sektora polskiej hodowli roślin jest fakt, że 50% ogólnej liczby badanych (poziom ten praktycznie dotyczy każdej badanej grupy) twierdzi, że nie ma dobrego dostępu do wyników prac badawczych oraz do materiałów wyjściowych i kolekcyjnych.



Rys. 4. Poziom innowacyjności polskiej nauki pracującej na rzecz hodowli roślin w opinii polskich hodowców

Fig. 4. The level of innovation in Polish science intended to support plant breeding in the opinion of Polish breeders

Przy podejmowaniu decyzji co do „jutra” polskiej hodowli roślin, nie bez znaczenia jest również fakt, że grupa stanowiąca około 73% ogólnej liczby badanych twierdzi, że nie jest w stanie wyegzekwować rzetelnej realizacji projektów badawczych. Sugerują oni konieczność zmiany sposobu rozliczenia realizacji projektów badawczych oraz zwiększenia nadzoru nad kosztami. Należy także podkreślić, że zdecydowana większość kadry zarządzającej z sektora hodowli roślin rolniczych oraz kadry zarządzającej i hodowców z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych jest zdania, że liczba programów hodowlanych w stosunku do potrzeb gospodarki narodowej jest zbyt duża (rys. 5). Natomiast grupa hodowców z sektora hodowli roślin rolniczych stanowiąca 75% badanej grupy stwierdza, że liczba programów hodowlanych w stosunku do potrzeb gospodarki narodowej jest odpowiednia. Z analizy uzyskanych odpowiedzi z sektora roślin rolniczych, dotyczących problemu liczebności programów hodowlanych w stosunku do potrzeb gospodarki narodowej, wyraźnie zarysowuje się odmiennosć zdań pomiędzy kadrą zarządzającą a hodowcami. Można zatem ostrożnie wnioskować, że aby stworzyć model biznesowy przyszłego stanu polskiej hodowli należy oprócz analizy otoczenia również dogłębnie zdiagnozować potencjał strategiczny obecnych spółek hodowlano-nasiennych będących w nadzorze właścicielskim ANR i IHAR. Jednak należy podkreślić, że nie bez znaczenia jest fakt, że ponad 59% ogólnej liczby respondentów twierdzi, że liczba programów hodowlanych jest zbyt duża. Można się spierać o ile, ale nie zmienia to faktu, że w przyszłości tematyka programów hodowlanych musi uwzględniać zapotrzebowanie rynku.



Rys. 5. Opinie kadry zarządzającej i hodowców w odniesieniu do nieprzydatnej gospodarczo liczby programów hodowlanych w stosunku do potrzeb gospodarki narodowej

Fig. 5. The managers' and breeders' opinions on the number of economically unsuitable breeding programs in relation to the needs of the national economy

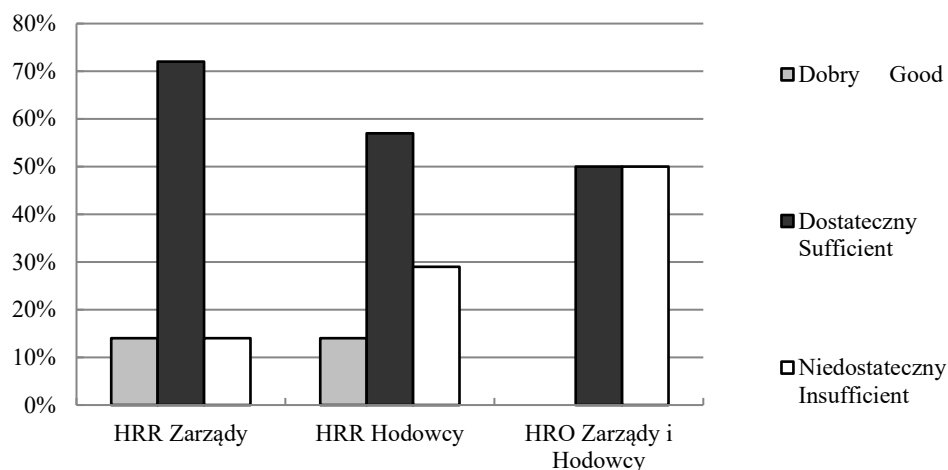
Niepokojącym zjawiskiem jest bardzo niska ocena systemu wsparcia komercyjnej hodowli roślin przez jednostki naukowo-badawcze i naukowe w zakresie badań podstawowych i tworzenia materiałów wyjściowych. Kadra zarządzająca oraz hodowcy z sektora hodowli roślin rolniczych, w tym przypadku są zgodni. Grupa stanowiąca 71% respondentów z obu badanych grup w sektorze hodowli roślin rolniczych ocenia system jako słaby lub bardzo słaby. Podobnego zdania jest grupa badawcza utworzona z kadry zarządzającej i hodowców z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych. W grupie tej 37,5% respondentów uważa, że system wsparcia hodowli roślin jest słaby, natomiast grupa stanowiąca 37,5% respondentów uważa, że system wsparcia w ogóle ich nie zadawała.

Należy jednak podkreślić, że w oparciu o polską myśl badawczą i hodowlaną, skonstruowano i zrealizowano program wspierania hodowli przez naukę. Między innymi dzięki temu programowi znacząca liczba polskich naukowców i hodowców ma ciągle szansę na wniesienie swojego pomysłu i umiejętności w tworzenie produktu o czystym polskim rodowodzie (Arseniuk, 2008).

Z analizy udzielanych odpowiedzi wynika, że respondenci nie tylko krytycznie ocenili polską naukę pracującą na rzecz hodowli roślin, ale także wytknęli braki w odpowiednim wykorzystaniu własnego potencjału strategicznego. Szczególnie dotyczy to funkcji pomocniczej jaką jest marketing (rys. 6).

Z ogólnej liczby badanych praktycznie tylko w jednej spółce prezes i główny hodowca stwierdzili, że stosowane strategie marketingowe są efektywne w stopniu dobrym. Grupa stanowiąca 59% ogólnej liczby badanych oceniła efektywność strategii marketingowych na poziomie dostatecznym. Należy uznać, że ocena dostateczna odnośnie efektywności marketingu jest oceną niezadowalającą zarówno kadrę kierowniczą jak i hodowców.

Szczególny przypadek w zakresie oceny efektywności strategii marketingowych wystąpił w spółkach z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych. Kadra zarządzająca tymi spółkami w 100% efektywność stosowanych przez siebie strategii marketingowych oceniła w stopniu dostatecznym, natomiast hodowcy z tych spółek w 100% ocenili efektywność strategii marketingowych stosowanych przez kadrę zarządzającą w stopniu niedostatecznym.



Rys. 6. Ocena stopnia efektywności strategii marketingowych w spółkach hodowli roślin
Fig. 6. Evaluation of the effectiveness of marketing strategies in plant breeding companies

Prawidłowe funkcjonowanie rynku nasiennego wiąże się również z prawidłowym funkcjonowaniem instytucji nadzoru nasiennego. Wszyscy respondenci (100%) wyrazili pogląd, że działania przepisane ustawowo Centralnemu Ośrodkowi Badania Odmian Roślin Uprawnych, obejmujące w szczególności badania odrębności, wyrównania i trwałości lub badania wartości gospodarczej odmiany, sporządzanie opisu odmiany, prowadzenie krajowego rejestru odmian, powinny pozostać w Centralnym Ośrodku. Jednocześnie badana grupa jednogłośnie stwierdziła, że Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych ze swoich zdań ustawowych wywiązuje się w sposób należyty i jako polska instytucja powinna dalej istnieć mimo, że na rynku mogą również funkcjonować odmiany ze wspólnotowego katalogu nie zarejestrowane w krajowym rejestrze odmian.

Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa jako druga instytucja nadzoru nasiennego nie jest przez respondentów postrzegana w takich superlatywach jak Centralny Ośrodek. Główny zarzut dotyczy funkcji kontrolnej w zakresie obrotu i wykorzystania materiału siewnego. Pogląd, że Wojewódzki Inspektor Ochrony Roślin i Nasiennictwa (WIORiN) nie stoi na straży prawa w zakresie obrotu i wykorzystania materiału siewnego wyraziła grupa stanowiąca 86% ogółu respondentów. Pozostałe 14% respondentów nie miało w tym względzie własnego zdania. Wielu respondentów w uwagach zaznaczało, że

Wojewódzki Inspektor dokonuje jedynie kontroli obrotu materiałem siewnym wyłącznie w przedsiębiorstwach prowadzących legalny obrót, natomiast nie jest on prowadzony tam, gdzie powstaje tak zwana szara strefa. Z tego tytułu kadra zarządzająca i hodowcy obarczają również winą Wojewódzkiego Inspektora za katastrofalnie niski poziom udziału kwalifikowanego materiału siewnego w produkcji towarowej. Można zatem wnioskować, że powyższe opinie wyrażone w stosunku do Wojewódzkiego Inspektora spowodowały, że kadra zarządzająca z sektora hodowli roślin rolniczych oraz badana grupa z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych w zdecydowanej większości jest za zniesieniem oficjalnej kwalifikacji nasion przez WIORiN i zastąpieniem jej deklaracjami jakości sprzedającego.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że kadra zarządzająca i hodowcy z sektora hodowli roślin rolniczych w 100% oraz badana grupa z sektora hodowli roślin ogrodniczo-warzywnych w 75% opowiedziała się za pozostawieniem wykonywania oceny wartości nasion przy Wojewódzkim Inspektorze Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

WNIOSKI

1. W spółkach będących jednoosobowymi spółkami ANR i IHAR występuje konieczność indywidualnego podejścia w zakresie nowych wezwań związanych ze strategicznym rozwojem hodowli roślin w tych spółkach, a także indywidualnym podejściem co do sposobów reorganizacji struktury organizacyjnej i ewentualnych sposobów prywatyzacji. Zróżnicowanie wypowiedzi kadry zarządczej i głównych hodowców świadczy o tym, że nie można stworzyć jednego idealnego modelu organizacji i funkcjonowania firmy hodowlanej.
2. Konieczna do przeprowadzenia jest głęboka analiza diagnostyczna w nauce działającej na rzecz krajowej hodowli roślin, celem której byłoby wypracowanie modelu wsparcia, zwiększającego udział nauki (jako nośnika wiedzy) w procesie tworzenia rozwiązań na rzecz postępu biologicznego, a jednocześnie pozwalającego na rozszerzenie współpracy między sferą B+R a przedsiębiorstwami hodowli roślin, w wyniku której polska hodowla roślin powinna stać się również hodowlą innowacyjną.
3. W przedsiębiorstwach hodowlano-nasiennych (w jednoosobowych spółkach ANR i IHAR) kształtujących krajowy przemysł hodowlano-nasienny powinna zostać przeprowadzona dogłębna analiza potencjału strategicznego. Ze względu na ich charakter organizacyjny w analizie tej powinna zostać wykorzystana metoda analizy łańcucha wartości, która pozwoliłaby na dokonanie poprawy efektywności całego łańcucha wartości między innymi poprzez optymalizację poszczególnych funkcji podstawowych i pomocniczych. Może się okazać, że największy przyrost efektywności można uzyskać koncentrując się na sprzedaży i strategii marketingowej.
4. Decydenci po zaciągnięciu opinii środowiska (Polskiej Izby Nasienniczej, jednostek naukowych, kadry zarządzającej) powinni na nowo określić miejsce i rolę jaką w przemyśle hodowlano-nasiennym ma spełniać Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

LITERATURA

- Arseniuk E. 2008. Ocena obecnego stanu i przyszłościowy model wspierania hodowli i nasiennictwa przez naukę. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 16 — 19.
- Duczmał K. 2008. Jutro polskiego sektora nasiennego — przewidywane zmiany wraz z modelem naukowego wsparcia. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 27 — 37.
- Gołębiowski B. 2006. Otoczenie ekonomiczne przedsiębiorstw hodowlano-nasiennych. W: „Agrobiznes 2006. Konkurencja w agrobiznesie — jej uwarunkowania i następstwa. *Prace Naukowe. Wyd. AE im. Oskara Langego, Wrocław*, t 1: 251 — 256.
- Marciniak K. 2005. Warunki kontynuacji krajowej hodowli roślin rolniczych w Polsce. *Hod. Rośl. Nasien.* 4: 28 — 32.
- Marciniak K. 2008. Stan polskiej hodowli roślin w roku 2008. *Roczn. Nauk Rol. PAN, seria G*, t. 95: 166 — 173.
- Podlaski S. 2005. Hodowla roślin w Polsce i świecie. *Hod. Rośl. Nasien.* 4: 14 — 21.
- Podlaski S. 2008. Model funkcjonowania firmy hodowlano-nasiennej w Polsce. *Roczn. Nauk Rol. PAN, seria G*, t. 95: 174 — 182.

ELŻBIETA MALUSZYŃSKA**ANNA SZYDŁOWSKA**

Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Radzików

Wstępna ocena skuteczności wybranych metod zaprawiania nasion do stosowania w rolnictwie ekologicznym Komunikat

Preliminary assessment of the effectiveness of some methods of seed treatment in organic farming Short communication

Celem badań była ocena wpływu różnych sposobów zaprawiania nasion na wartość siewną ekologicznego materiału siewnego. Materiałem doświadczalnym były nasiona pszenicy, jęczmienia, owsa i gryki pochodzące z uprawy w warunkach ekologicznych. Zastosowano następujące metody zaprawiania nasion: moczenie w roztworze preparatu Biochikol 020 PC, moczenie w roztworze preparatu Biojodis, płukanie w gorącej wodzie oraz zaprawianie wapnem hydratyzowanym. Oceniano zdolność kiełkowania, średni czas kiełkowania i indeks kiełkowania nasion. Poza tym oceniano wigor nasion w oparciu o test wzrostowy siewki i suchą masę siewki oraz wschody polowe. Po zastosowaniu badanych sposobów zaprawiania nasion, zdolność kiełkowania, jak i inne parametry dotyczące kiełkowania nie uległy znacznemu polepszeniu. Nasiona zaprawiane niezależnie od metody nie wykazały większego wigoru mierzonego długością siewki oraz suchą masą siewki. Zaprawianie nasion nie spowodowało zwiększenia wschodów polowych roślin.

Słowa kluczowe: ekologiczny materiał siewny, wigor, zaprawianie nasion, zdolność kiełkowania

The aim of the study was to compare the effects of different methods of treatment on seed value in ecological agriculture. Seeds of wheat, barley, oats and buckwheat were soaked in a solution of Biochikol 020 PC or of Biojodis, rinsed in hot water or treated with lime. Germination capacity, mean germination time and germination index were determined. Moreover, vigour of seeds, as manifested by the length of shoots and roots and by the weight of dry matter, as well as seedling field emergence, were evaluated. The treatments applied did not result in significant increase in the germination capacity and other attributes. The vigour of the treated seeds did not differ from that of the untreated seeds, irrespective of the treatment method used. No effects of the treatments upon the field emergence of plants were found.

Key words: germination capacity, organic seed, vigour, seed treatment

WSTĘP

W krajach Unii Europejskiej obserwuje się wzrost zainteresowania ekologiczną uprawą roślin, głównie na obszarach o gorszych warunkach przyrodniczo-środowiskowych (Jaczeńska-Kalicka, 2008). Również w Polsce w ostatnich latach zauważa się większe zainteresowanie rolnictwem ekologicznym. Rosnący popyt na produkty ekologiczne prawdopodobnie zwiększy znaczenie tej gałęzi rolnictwa. Liczba gospodarstw ekologicznych wzrosła z 7182 w roku 2005 do 11887 w roku 2007 (Skórnicki i in., 2008). Głównym czynnikiem wpływającym na rozwój produkcji ekologicznej jest bezpośrednie wsparcie finansowe dla producentów zdecydowanych przejść na ten system uprawy (Pawlewicz, 2007; Szmidt, 2008). Gospodarowanie metodami ekologicznymi napotyka jednak trudności między innymi z powodu rezygnacji z wielu konwencjonalnych środków do produkcji rolnej, w tym z większości środków ochrony roślin. Problem ochrony upraw ekologicznych jest bardzo złożony. Instytut Ochrony Roślin działając z upoważnienia Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi zakwalifikował do stosowania w rolnictwie ekologicznym 32 środki, co jednak nie zabezpiecza ochrony upraw w ekologicznym systemie gospodarowania (Matyjaszczyk, 2008). Dlatego istnieje stała potrzeba poszukiwania dalszych środków ochrony roślin, w tym zapraw oraz metod, które polepszą kiełkowanie nasion i wschody roślin w polu.

Celem badań była ocena wpływu czterech różnych sposobów zaprawiania nasion na kiełkowanie, wigor i wschody polowe różnych gatunków roślin pochodzących z uprawy w warunkach ekologicznych. Badania miały charakter wstępny (jednoroczny), w celu rozpoznania metod, które z pozytywnym skutkiem można by stosować do zaprawiania nasion w warunkach rolnictwa ekologicznego.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym były nasiona gryki odmiany Panda, pszenicy Torka, jęczmienia Rataj i owsa Polar, pochodzące z uprawy w warunkach ekologicznych w roku 2007.

Zastosowano następujące metody zaprawiania nasion: moczenie w 2,5% roztworze preparatu Biochikol 020 PC (zgodnie z zaleceniami producenta), moczenie w roztworze preparatu Biojodis (zgodnie z zaleceniami producenta), płukanie w wodzie o temperaturze 50°C przez 30 minut. Po zabiegu nasiona były powietrznie suszone. Czwartą metodą było zaprawianie wapnem hydratyzowanym w proporcji 0,2 g na 10 g nasion. Badanie kontrolne stanowiły nasiona niezaprawiane.

Oceniano zdolność kiełkowania wg Przepisów ISTA (2008), średni czas kiełkowania i indeks kiełkowania stosując wzory polecane przez Alvarado i wsp. (za Ruan i in., 2002). Poza tym oceniano wigor nasion w oparciu o test wzrostowy siewki i suchą masę siewki zgodnie z metodyką wg Hamptona i TeKrony (1995). W tym samym czasie wysiano także nasiona w polu (3 × 50) w celu oceny wschodów polowych.

Obliczenia statystyczne wykonano w programie SAS, a grupy jednorodne dla każdego ocenianego parametru w danym gatunku wyznaczono za pomocą testu Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

Nasiona kontrole gryki kiełkowały na poziomie 81% (tab. 1). Zastosowanie zaprawiania wapnem lub preparatem Biojodis nieznacznie polepszyło wartość tego parametru, jednak były to różnice nieistotne. Natomiast gorąca woda spowodowała istotną obniżkę zdolności kiełkowania (59%) i wydłużenie średniego czasu kiełkowania do 4 dni. Wartość indeksu kiełkowania, który jest sumą ilorazu liczby nasion skiełkowanych po określonym czasie do liczby dni (Ruan i in., 2002) była najwyższa dla nasion gryki zaprawianych Biochikolem. U pszenicy stwierdzono tendencję do nieco wyższej zdolności kiełkowania nasion zaprawianych Biochikolem, Biojodisem lub wapnem, poza moczeniem w gorącej wodzie, które istotnie obniżyło kiełkowanie i wydłużyło średni czas kiełkowania do 3 dni. Podobne wyniki dla pszenicy jarej uzyskała Kolasińska (2008 b), chociaż w literaturze są spotykane prace na temat dezynfekcyjnego wpływu gorącej wody na nasiona szczególnie warzyw (Groot i in., 2004). Już w roku 1883 Jensen zastosował gorącą wodę do usuwania zakażeń grzybowych z nasion.

Tabela 1

Wskaźniki kiełkowania w zależności od gatunku rośliny i stosowanej zaprawy
Indices of germination depending on plant species and treatment

Gatunek Species	Zaprawa Treatment	ZK (%) Germination	Średni czas kiełkowania Mean germin. time	Indeks kiełkowania Germination index
Gryka Buckwheat	kontrola — control	81 A	2,5 AB	19,6 B
	wapno — lime	83 A	2,1 B	20,4 B
	Biojodis	84 A	3,0 AB	16,4 B
	Biochikol	71 A	1,8 B	27,0 A
	gorąca woda — hot water	59 B	4,1 A	1,6 C
Pszenica Wheat	kontrola — control	81 A	2,7 B	17,9 B
	wapno — lime	83 A	2,2 C	21,7 A
	Biojodis	84 A	2,5 B	17,2 B
	Biochikol	86 A	2,2 C	21,2 A
	gorąca woda — hot water	59 B	3,1 A	11,9 C
Jęczmień Barley	kontrola — control	63 A	2,1 B	18,7 AB
	wapno — lime	72 A	2,0 BC	18,0 B
	Biojodis	65 A	2,1 B	18,0 B
	Biochikol	63 A	1,8 C	22,9 A
	gorąca woda — hot water	54 A	4,2 A	6,4 C
Owies Oats	kontrola — control	55 A	2,0 B	13,7 A
	wapno — lime	44 A	2,0 B	15,4 A
	Biojodis	50 A	2,1 B	13,7 A
	Biochikol	55 A	1,9 B	16,5 A
	gorąca woda — hot water	48 A	5,6 A	1,9 B

Wyniki oznaczone tymi samymi literami dla jednego gatunku i cechy nie różnią się istotnie ($p = 0,05$)

Values designated with the same letter (for one species and parameter) are not significantly different ($p = 0.05$)

Metodę polegającą na zastosowaniu do obróbki nasion gorącej wody, a następnie szybkim ich schłodzeniu do temperatury otoczenia nazwano termoterapią (Domoradzki, Dzieńiecki, 2008). Autorzy ci badali odporność termiczną nasion buraka ćwikłowego, pomidora, marchwi, pietruszki i kopru i wykazali możliwość stosowania na większą skalę termicznego odkażania nasion. Warunkiem rozwoju termoterapii muszą być jednak dalsze

badania mikrobiologiczne w celu wyznaczenia parametrów likwidujących patogeny zasiedlające nasiona. Andruszczak i Szymona (2008) badali wpływ nieco innych preparatów pochodzenia biologicznego, jak Bioczos i Ogrodnicze Mydło Potasowe na zdolność kiełkowania pszenicy jarej i także nie osiągnęli poprawy wartości tego parametru. Wapno hydratyzowane polecane w ekologicznej uprawie roślin (www.irene.sggw.pl) w opisanym doświadczeniu nie wykazało wpływu na zdolność kiełkowania pszenicy, jednak korzystnie oddziaływało na inne wskaźniki. W badaniach własnych średni czas kiełkowania pszenicy po zastosowaniu wapna lub Biochikolu był najkrótszy (2,2 dnia), a indeks kiełkowania uzyskany dla obu metod zaprawiania osiągnął najwyższe wartości odpowiednio 21,7 i 21,2.

U jęczmienia zdolność kiełkowania wahała się od 54% do 72%, jednak różnice nie były istotne statystycznie. Inaczej przedstawiał się średni czas kiełkowania, który był najkrótszy po zastosowaniu Biochikolu lub wapna. Także wartość indeksu kiełkowania była najwyższa u nasion traktowanych Biochikolem oraz u nasion kontrolnych. Uzyskane wyniki pokazują, że ocena zdolności kiełkowania poszerzona o inne wskaźniki kiełkowania może dać bardziej miarodajną ocenę wpływu zaprawy na przebieg kiełkowania nasion. Zastosowanie preparatu Biochikol nie obniżyło zdolności kiełkowania jęczmienia jarego, co także stwierdzili w swoich badaniach Panasiewicz i wsp. (2007). Autorzy ci stwierdzili ponadto, że zastosowanie Biochikolu obniżyło zdolność kiełkowania kukurydzy, jęczmienia ozimego i żyta.

Spośród badanych gatunków owies miał najniższą zdolność kiełkowania, a wartość tej cechy nie różniła się istotnie w zależności od zaprawy. Przyczyną tak niskiego kiełkowania było prawdopodobnie nieoplewione ziarno odmiany Polar; odmiana ta należy do słabiej kiełkujących. Płukanie nasion owsa gorącą wodą istotnie wydłużało czas kiełkowania i wyraźnie obniżało indeks kiełkowania.

Wigor nasion gryki mierzony długością siewki i średnią suchą masą siewki był najwyższy u nasion kontrolnych, ale różnił się istotnie tylko od wigoru nasion moczonych w gorącej wodzie (tab. 2). Zastosowane sposoby zaprawiania nie polepszyły wigoru nasion gryki. U jęczmienia nie stwierdzono istotnych różnic wigoru mierzonego długością części pędowej i korzeniowej siewki pomiędzy nasionami kontrolnymi i zaprawianymi różnymi sposobami. Jedynie sucha masa siewki była niższa u nasion zaprawianych Biochikolem lub traktowanych gorącą wodą w porównaniu z obiektem kontrolnym.

Długość części pędowej siewki owsa była wyższa u nasion zaprawianych wapnem w stosunku do innych sposobów zaprawiania, natomiast od kontroli nie różniła się istotnie. Analiza długości części korzeniowej, jak i średniej suchej masy siewki nie wykazała istotnych różnic w zależności od zastosowanego sposobu zaprawiania. U pszenicy zastosowanie gorącej wody spowodowało istotne obniżenie wigoru mierzonego długością części pędowej i korzeniowej siewki, jak i średniej suchej masy siewki. Natomiast zastosowanie zaprawiania Biochikolem 020 PC nieznacznie zwiększyło długość części pędowej i korzeniowej siewki w stosunku do kontroli, jednak nie była to różnica istotna statystycznie. Badania dotyczące przechowywania materiału zaprawianego zaprawami biologicznymi wykazały obniżanie się wigoru zarówno mierzonego testem wzrostowym, jak i testem szybkości wzrostu siewki, czyli średnią suchą masą siewki (Panasiewicz i in.,

2008). Dotyczyły one między innymi nasion zaprawianych Biochikolem. Biochikol 020 PC zawierający substancję aktywną chitozan jest biostymulatorem zakwalifikowanym do stosowania w rolnictwie ekologicznym, w tym do zaprawiania nasion (Pruszyński, 2008). Jednakże w prezentowanych badaniach spowodował polepszenie tylko niektórych cech i tylko u niektórych gatunków. Sulewska i Koziara (2006) oceniali wartość siewną oraz potencjał trzech frakcji kukurydzy zaprawianych Biochikolem 020 PC. Stwierdzili, że zastosowanie Biochikolu 020 PC nie prowadziło do istotnych zmian w rozwoju i zdrowotności roślin kukurydzy, ale powodowało obniżenie plonu ziarna oraz tendencję zmniejszania długości korzeni roślin w fazie 4–5 liści przy niewielkim wzroście świeżej i suchej masy części podziemnej jak i nadziemnej siewki.

Tabela 2

Wyniki testu wzrostowego i suchej masy siewki w zależności od gatunku rośliny i zaprawy
Seedling growth rate and dry matter depending on plant species and treatment

Gryka — Buckwheat		
1	2	3
cała siewka whole seedling (mm)		sucha masa siewki seedling dry matter (g)
kontrola — control 317 A		kontrola — control 0,159 A
wapno — lime 295 A		wapno — lime 0,155 A
Biojodis 282 A		Biojodis 0,141 A
Biochikol 266 A		Biochikol 0,119 A
gorąca woda — hot water 196 B		gorąca woda — hot water 0,016 B
Jęczmień — Barley		
długość części pędowej shoot length (mm)	długość części korzeniowej root length (mm)	sucha masa siewki seedling dry matter (g)
kontrola — control 102 A	kontrola — control 180 A	kontrola — control 0,291 A
wapno — lime 109 A	wapno 173 A	wapno — lime 0,270 AB
Biojodis 103 A	Biojodis 179 A	Biojodis 0,234 AB
Biochikol 112 A	Biochikol 182 A	Biochikol 0,185 B
gorąca woda — hot water 93 A	gorąca woda — hot water 171 A	gorąca woda B — hot water 0,176
Owies — Oats		
długość części pędowej shoot length (mm)	długość części korzeniowej root length (mm)	sucha masa siewki seedling dry matter (g)
kontrola — control 187 AB	kontrola — control 158 A	kontrola — control 0,128 A
wapno — lime 203 A	wapno — lime 163 A	wapno — lime 0,145 A
Biojodis 169 B	Biojodis 138 A	Biojodis 0,152 A
Biochikol 161 B	Biochikol 150 A	Biochikol 0,139 A
gorąca woda — hot water 169 B	gorąca woda — hot water 147 A	gorąca woda — hot water 0,102 A
Pszenica — Wheat		
długość części pędowej shoot length (mm)	długość części korzeniowej root length (mm)	sucha masa siewki seedling dry matter (g)
kontrola — control 126 A	kontrola — control 166 A	kontrola — control 0,276 A
wapno — lime 119 A	wapno — lime 173 A	wapno — lime 0,311 A
Biojodis 124 A	Biojodis 166 A	Biojodis 0,319 A
Biochikol 131 A	Biochikol 177 A	Biochikol 0,278 A
gorąca woda — hot water 90 B	gorąca woda — hot water 111 B	gorąca woda — hot water 0,064 B

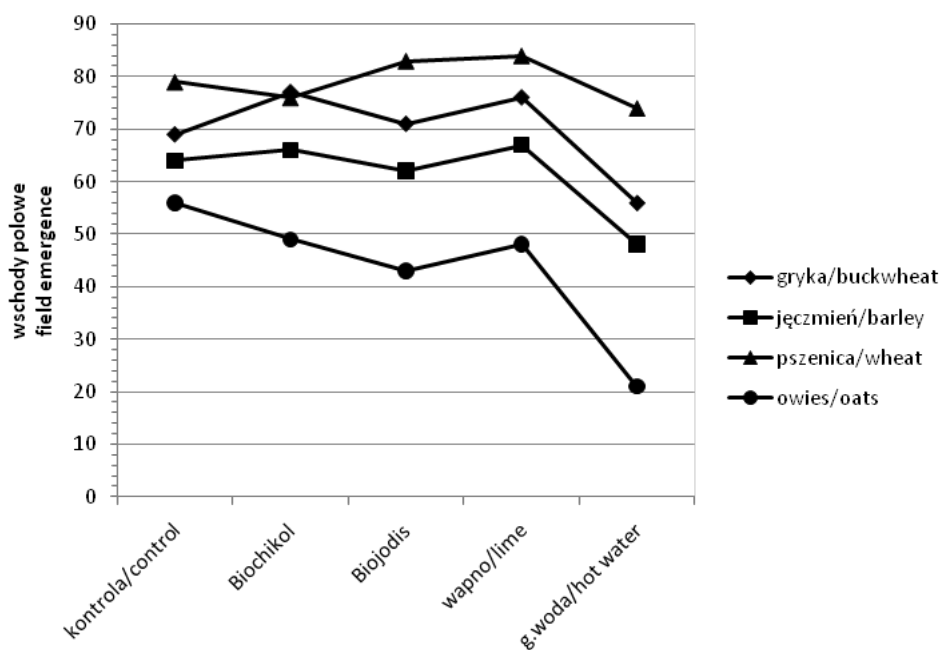
Wyniki oznaczone tymi samymi literami dla jednego gatunku i cechy nie różnią się istotnie ($p = 0,05$).

Values designated with the same letter (for one species and parameter) are not significantly different ($p = 0.05$).

W niniejszych badaniach wschody polowe roślin z nasion potraktowanych różnymi zaprawami były podobne do wschodów na obiekcie kontrolnym (rys. 1). U pszenicy

obserwowano zwiększenie wschodów polowych po zastosowaniu Biojodisu i wapna. Wyniki mieściły się również w granicach błędu. Podobnie u gryki na wschody polowe nie miał wpływu rodzaj zastosowanej zaprawy, przy czym szczególnie niekorzystnie wpłynęło zastosowanie gorącej wody. Najwyższe wschody jęczmienia uzyskano po zaprawianiu nasion wapnem i moczeniu nasion w Biochikolu, a najniższe po moczeniu w gorącej wodzie. Natomiast u owsa najwyższe wschody miały rośliny z nasion kontrolnych, a najniższe z nasion moczonych w gorącej wodzie. Ujemny wpływ gorącej wody na wschody polowe zbóż jarych potwierdziła Kolasińska (2008 a), która badała także inne sposoby naturalnego zaprawiania i nie uzyskała poprawy wartości siewnej.

Groot i wsp. (2004) twierdzą, że w ekologicznej produkcji nasiennej należy liczyć się z niższymi wschodami roślin z powodu braku chemicznej ochrony wynikającej z działania zapraw nasiennych. Autorzy widzą pilną potrzebę prowadzenia badań metodycznych nad opracowaniem sposobów zaprawiania nasion dla produkcji ekologicznej. Pięta (2006) analizowała rośliny soi wyrosłe z nasion zaprawianych biopreparatami, między innymi Biochikolem 020 PC oraz preparatami chemicznymi, które dodatkowo opryskano w okresie kwitnienia tymi samymi preparatami. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziła, że stosowanie biopreparatów do zaprawiania nasion oraz oprysku dało podobne rezultaty jak preparaty chemiczne.



Rys. 1. Wschody roślin w zależności od gatunku roślin i sposobu zaprawiania nasion

Fig. 1. Field emergence depending on plant species and seed treatment

PODSUMOWANIE

Zarówno zdolność kiełkowania, jak i inne parametry dotyczące kiełkowania nie uległy znacznemu polepszeniu po zastosowaniu badanych sposobów zaprawiania nasion. Nasiona zaprawiane nie wykazały większego wigoru mierzonego długością siewki oraz suchą masą siewki. Wschody polowe z kontroli były podobne lub wyższe niż z nasion zaprawianych. Porównywane w doświadczeniu cztery gatunki roślin różniły się reakcją na zaprawę. Zastosowane sposoby zaprawiania nasion nie wpłynęły na wzrost zdolności kiełkowania i polowych wschodów.

LITERATURA

- Andruszczak S., Szymona J. 2008. Wpływ preparatu Bioczso płynny, mieszaniny Bioczso i wyciągów roślinnych oraz potasowego mydła ogrodniczego na energię i zdolność kiełkowania pszenicy jarej. *Konf. Nauk. pt. Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych.* 8–9 września 2008. Poznań, streszczenia IOR-PIB: 202 — 213.
- Domoradzki M., Dzieńiecki P. 2008. Odporność termiczna wybranych nasion warzyw. *Konf. Nauk. Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych.* 8–9 września 2008. Poznań, streszczenia IOR-PIB: 292 — 306.
- Groot S. P. C. van der Wolf J. M., Jalink H., Langer C. J. van der Bulk R. W. 2004. Challenges for the production of high quality organic seeds. *ISTA News Bulletin* No. 127 April 2004: 12 — 15.
- Hampton J. G., TeKrony D. M. 1995. *Handbook of vigour test methods.* ISTA, Zurich, Switzerland.
- Jaczewska-Kalicka A. 2008. Znaczenie podatności odmian pszenicy ozimej na występowanie grzybów patogennych w uprawie ekologicznej. *Konf. Nauk. Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych.* 8–9 września 2008. Poznań, streszczenia IOR-PIB: 269 — 273.
- Kolasińska K. 2008 a. Wartość siewna nasion zbóż jarych wyprodukowanych na ekologicznych plantacjach nasiennych. *Hod. Rośl. Nasien.* 4: 23 — 28.
- Kolasińska K. 2008 b. Wpływ naturalnych metod zaprawiania na zdolność kiełkowania i wigor zbóż jarych wyprodukowanych na ekologicznych plantacjach nasiennych. *Biul. IHAR* 247: 15 — 29.
- Matyjaszczyk E. 2008. Kwalifikowanie środków ochrony roślin do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Polsce. *Konf. Nauk. pt. Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych.* 8–9 września 2008. Poznań, streszczenia IOR-PIB.
- Międzynarodowe Przepisy Oceny Nasion. 2008. Wersja polska: 35 — 37.
- Panasiewicz K., Koziara W., Sulewska H. 2007. Parametry wigorowe ziarna zbóż w zależności od biologicznych i chemicznych zapraw nasiennych. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* vol. 52 (4): 14 — 17.
- Panasiewicz K., Koziara W., Sulewska H., Ptaszyńska G. 2008. Wpływ zaprawiania nasion preparatami biologicznymi na ich wartość siewną w zależności od okresu przechowywania. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* Vol. 53 (4): 27 — 29.
- Pawlewicz A. 2007. Rolnictwo ekologiczne w Polsce — wybrane wskaźniki. *Problemy Rolnictwa Światowego.* t. XVII: 415 — 419.
- Pięta D. 2006. Zastosowanie Bioseptu 33 SL, Biochikolu 020 PC i Polyversum do zwalczania chorób soi (*Glycine max* (L.) Merrill). Część I. Zdrowotność i plonowanie soi po zastosowaniu biopreparatów. *Acta Scientiarum Polonorum — Hortorum Cultus (Ogrodnictwo)*, nr 5 (2): 35 — 41.
- Pruszyński S. 2008. Biostymulatory jako alternatywne środki rolnictwa ekologicznego. *Konf. Nauk. Poszukiwanie nowych rozwiązań w ochronie upraw ekologicznych.* 8–9 września 2008. Poznań, streszczenia IOR-PIB: 176 — 183.
- Ruan S., Xue Q., Tylkowska K. 2002. The influence of priming on germination of rice (*Oryza sativa* L.) seeds and seedling emergence and performance in flooded soil. *Seed Sci. & Technol.* 30: 61 — 67.

- Skórnicki H., Litwinow A., Lesisz J. T., Gradka I. A., Krysztoforski M., Pomykała D., Schönthaler J. 2008 Technologiczno-ekonomiczne aspekty wdrażania produkcji ekologicznej w wybranych gospodarstwach rolnych. Raport za rok 2007., Centrum Doradztwa Rolniczego, Oddział w Radomiu.: 69.
- Sulewska H., Koziara W. 2006. Ocena wartości siewnej oraz potencjału plonowania trzech frakcji nasion kukurydzy traktowanych preparatem Biochikol 020 PC. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 2006, vol. 51, nr 2: 178 — 182.
- Szmidt K. 2008. Rolnictwo ekologiczne w Polsce i w krajach Unii Europejskiej. *Roczniki Nauk. Stow. Ekon. Roln. i Agrobiznesu* T. X, 1: 415 — 419.
- www.irene.sggw.pl.

SYLWIA OKOŃ¹EDYTA PACZOS-GRZĘDA¹PIOTR KRASKA²EWA KWIECIŃSKA-POPPE²EDWARD PAŁYS²¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie² Katedra Ekologii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Analiza podobieństwa genetycznego odmian orkiszu (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) za pomocą markerów RAPD

Assessment of genetic similarity of spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) cultivars based on RAPD markers

W pracy przedstawiono analizę podobieństwa genetycznego 8 odmian pszenicy orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) za pomocą markerów RAPD. Dla 17 wyselekcjonowanych starterów uzyskano 175 produktów, z których 80 było polimorficznych, zaś 7 specyficznych dla pojedynczych obiektów. Średnie podobieństwo genetyczne określone pomiędzy parami wszystkich badanych form wyniosło 0,868. Na podstawie matrycy indeksów podobieństwa genetycznego wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że analizowane odmiany orkiszu charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym.

Słowa kluczowe: podobieństwo genetyczne, RAPD, *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.

The paper contains an analysis of genetic similarity of 8 *Triticum aestivum* ssp. *spelta* cultivars done using RAPD markers. Seventeen selected primers produced 175 fragments, out of which 80 were polymorphic and 7 were genotype-specific. RAPD-based genetic similarity was estimated to be between 0.851 and 0.913. The mean genetic similarity was calculated at 0.868. Genetic similarity matrix was applied for cluster analysis through UPGMA method. The data obtained indicate that the analyzed spelt cultivars are characterized by high similarity.

Key words: genetic similarity, RAPD, *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.

WSTĘP

Triticum aestivum ssp. *spelta* L. jest podgatunkiem pszenicy zwyczajnej, należy do grupy pszenic heksaploidalnych ($2n = 42$) oplewionych o łamliwej osadce kłosowej. Orkisz jest gatunkiem odpornym na choroby i inne niekorzystne czynniki siedliska. Ziarno orkisz w porównaniu z pszenicą ozimą zawiera na ogół więcej białka, jest bogate w cynk, miedź

i selen (Baumagärtel-Blaschke, 1991). W składzie kwasów tłuszczowych przeważa kwas linolowy. Ponadto zawiera witaminy z grupy A, E i D (Grela i in., 1993).

W ostatnich latach markery molekularne znalazły szerokie zastosowanie w hodowli roślin. Są one wykorzystywane w ocenie podobieństwa genetycznego, ale także w selekcji i identyfikacji pożądanych form, ocenie czystości materiału siewnego oraz w potwierdzeniu skuteczności krzyżowań (Sztuba-Solińska, 2005; Virk i in., 1995). Podobieństwo genetyczne oceniane jest przede wszystkim na podstawie markerów molekularnych, które umożliwiają szybką identyfikację polimorfizmu DNA (Achleitner i in., 2008; Cheng i Huang, 2009; Ikegami, 2009). Jedną z metod bardzo często wykorzystywaną do analiz genomów roślin jest RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams i in., 1990). Technika ta jest prostą i efektywną metodą, pozwalającą na szybkie oszacowanie podobieństwa genetycznego wielu gatunków roślin (Marillia i Scoles, 1996; Drossou i in., 2004; Kochieva i in., 2004; Vinod i in., 2007).

Celem prezentowanej pracy była analiza podobieństwa genetycznego 8 odmian orkiszu (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) w oparciu o markery RAPD.

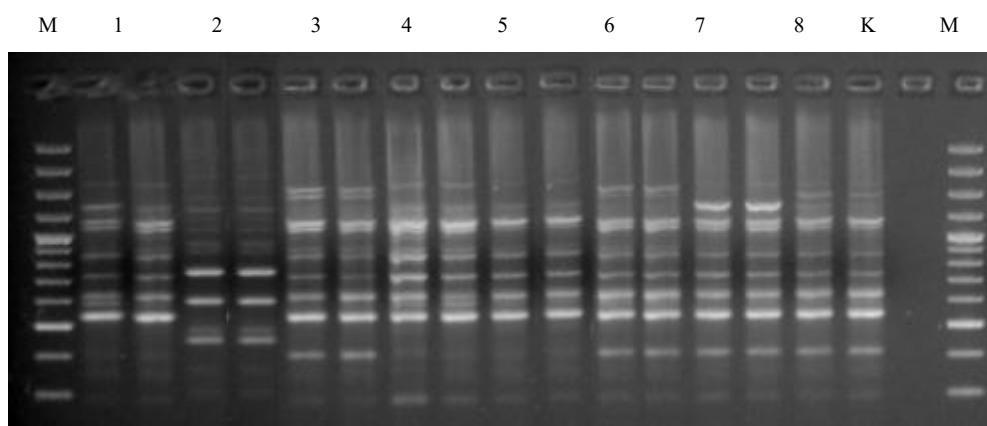
MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 8 odmian pszenicy orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*): Frankenckorn, Badengold, Schwanenspelz, Oberkulmer, Ostro, Ceralio, Schwaberncorn Dinkel, Spelt I.N.Z. Odmiany te różnią się między sobą morfologicznie i zostały wybrane do analiz molekularnych na podstawie wstępnych obserwacji prowadzonych w Katedrze Ekologii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. DNA z badanych odmian wyizolowano z kilkudniowych siewek zgodnie z metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Reakcję PCR prowadzono zmodyfikowaną metodą Williamsa i wsp. (1990). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 160 µM każdego dNTP, 5,3 pM startera, 1 mM MgCl₂, 60 ng genomowego DNA, 0,4 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcje amplifikacji przeprowadzano na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra dla dwóch prób DNA z każdej odmiany, jednocześnie prowadząc reakcję kontrolną bez matrycy DNA. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 3 min. w 94°C, 44 cykle: 94°C — 45 s, 37°C — 45 s, 72°C — 45 s, z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny. Żele podświetlano na transiluminatorze i fotografowano wykorzystując systemem dokumentacji żeli Poly Doc.

W analizie polimorfizmu obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednio wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI — similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych form oszacowano zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) stosując program NTSYS-pc 2.10q (Rohlf, 2001).

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród przeanalizowanych 40 starterów RAPD do analiz wybrano 17 generujących stabilne i polimorficzne wzory prążków (rys. 1). Przeprowadzono reakcje z tymi starterami dla badanych odmian orkisz. Całkowita liczba uzyskanych fragmentów wynosiła 175. Liczba fragmentów generowanych przy użyciu jednego startera wahała się od 7 dla starterów A16, G10, i J05 do 16 dla startera F14. Średnio na jeden starter przypadało 10,3 amplifikowanych odcinków DNA, zaś na jedną odmianę 21,9 amplikonów. Liczba prążków polimorficznych uzyskanych w wyniku reakcji PCR wyniosła 80. Sun i wsp. (1998) za pomocą markerów RAPD analizowali 46 genotypów pszenicy, wśród których znalazły się zarówno odmiany pszenicy zwyczajnej, jak i genotypy pszenicy orkisz. Autorzy wykorzystali 26 starterów, które inicjowały amplifikację 279 prążków, z których 182 było polimorficznych. Na pojedynczy starter przypadało od 2 do 20 takich produktów. Średnio na starter autorzy uzyskali 7 polimorficznych produktów. W badaniach własnych pojedynczy starter inicjował amplifikację od 2 (A16 i W02) do 12 (F14) produktów polimorficznych. Średnio na pojedynczy starter przypadało 4,7 polimorficznych fragmentów, zaś na pojedynczy genotyp 10. Frekwencja prążków polimorficznych wahała się od 22,2% dla startera W02 do 73,3% dla startera F14. Rozmiary prążków polimorficznych wahały się od 190 do 2000 par zasad. Du i wsp. (2002) do analizy zmienności genetycznej orkisz wykorzystali markery ISSR. Autorzy analizowali 47 genotypów pszenicy, w tym 10 form orkisz. Wyselekcjonowali oni 33 startery ISSR, które generowały 238 prążków, wśród których 207 było polimorficznych.



Oznaczenia: M — marker wielkości, K — kontrola negatywna, 1 — Frankenkorn, 2 — Badengold, 3 — Schwanenspelz, 4 — Oberkulmer, 5 — Ostro, 6 — Ceralio, 7 — Schwaberncorn Dinkel, 8 — Spelt I.N.Z., każdy genotyp w dwóch powtórzeniach. 207 było polimorficznych

Rys. 1. Rozdział produktów RAPD ze starterem A05

Descriptions: M— size marker, K — negative control, 1 — Frankenkorn, 2 — Badengold, 3 — Schwanenspelz, 4 — Oberkulmer, 5 — Ostro, 6 — Ceralio, 7 — Schwaberncorn Dinkel, 8 — Spelt I.N.Z., each genotype in two replications

Fig. 1. Resolution of RAPD products obtained with A05 primers

Liczba wszystkich profili prążków, czyli liczba różnych kombinacji fragmentów DNA uzyskanych dla poszczególnych odmian przy udziale badanych starterów wyniosła 93. Startery generowały od 3 do 7 profili, średnio 5,5 na starter i 11,6 na genotyp. Żaden z analizowanych starterów nie generował profili specyficznych dla wszystkich badanych odmian (tab. 1).

Tabela 1

Charakterystyka starterów RAPD
Characteristics of RAPD primers

Starter Primer	Sekwencja startera Primer sequence	Liczba prążków Number of bands		Frekwencja prążków polimorficznych Polymorphic bands frequency (%)	Liczba profili prążków Number of band profiles	Zakres wielkości prążków (pz) Range of band size (bp)
		całkowita total	polimorficz- nych polymorphic			
A05	AGGGGTCTTG	8	5	62,5	7	580-1600
A07	GAAAAGGGTG	12	5	41,6	7	500-1300
A08	GTGACGTAGG	10	4	40	6	250-1600
A12	TCGGCGATAG	9	3	33,3	5	530-1800
A16	AGCCAGCGAA	7	2	28,6	3	320-1200
A17	GACCGCTTGT	10	4	40	6	600-1900
A19	CAAACGTCGG	10	5	50	7	190-1100
F14	TGCTGCAGGT	16	12	73,3	7	250-1900
G4	GGAGTACTGG	13	9	69,2	7	300-2000
G10	CCGATATCCC	7	4	57,1	5	600-1800
H20	GGGAGACATC	12	4	33,3	5	200-1600
J05	CTCCATGGGG	7	4	57,1	3	850-1700
J10	AAGCCCGAGG	14	5	35,7	7	290-1600
T2B	CTACACAGGC	9	3	33,3	5	200-2000
U250	CGACAGTCCC	10	3	30	3	380-1500
U295	CGCGTTCCTG	12	6	50	7	300-1500
W2	ACCCCGCCAA	9	2	22,2	3	400-1300
Suma Sum		175	80	45,7	93	
Średnio / starter Mean / primer		10,29	4,70		5,47	
Średnio/genotyp Mean / genotype		21,87	10		11,62	

Tabela 2

Produkty specyficzne dla poszczególnych odmian
Genotype - specific RAPD products

Odmiana Cultivar	Produkty specyficzne Specific products
Frankenckorn	A16(4), U295(4), G4(8), G4(13)
Schwanenspelz	A08(8), F14(5),
Schwaberncorn Dinkel	G4(12)

Spośród 8 analizowanych w prezentowanej pracy odmian orkisz trzypokładowy trzy odmiany mogą być zidentyfikowane przez obecność unikalnych markerów RAPD. Łącznie uzyskano 7 specyficznych produktów generowanych przez 5 starterów RAPD. Liczba specyficznych

produktów wahała się od 1 do 3 dla pojedynczego startera. Średnio na starter przypadało 0,4 produktów specyficznych, zaś na genotyp 0,9. Odmiana Frankenckorn może być zidentyfikowana przez obecność 4 specyficznych markerów RAPD. Odmianę Schwanenspelz można zidentyfikować za pomocą dwóch specyficznych markerów, odmianę Schwaberncorn Dinkel za pomocą jednego takiego produktu (tab. 2).

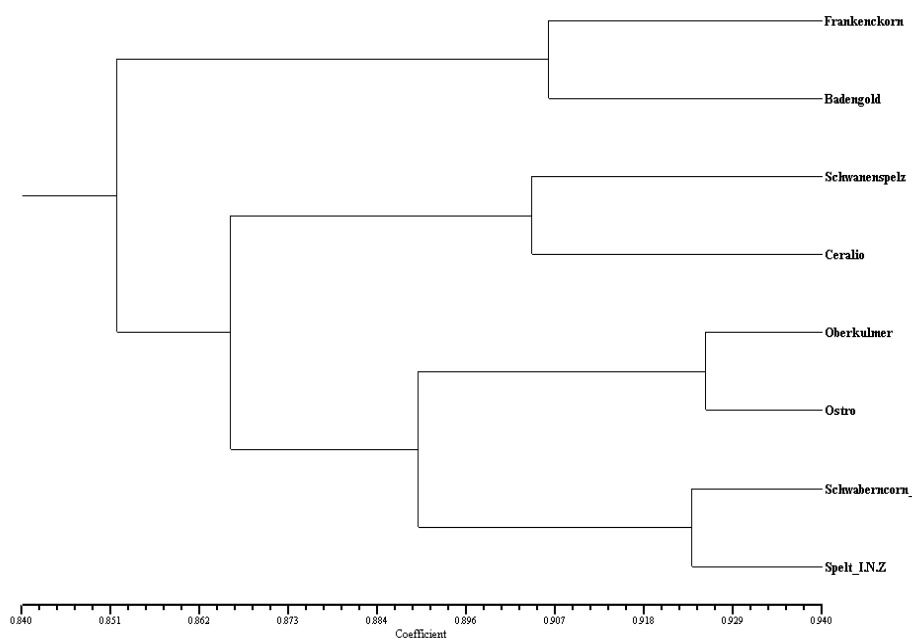
Wyniki badań polimorfizmu markerów RAPD odmian orkisz stanowią podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (tab. 3).

Tabela 3

Matryca indeksów podobieństwa odmian orkisz określonych na podstawie polimorfizmu markerów RAPD

The matrix of similarity indices for spelt cultivars determined based on RAPD markers polymorphism

Odmiana Cultivar	Franken- ckorn	Badengold	Schwa- nenspelz	Oberkulmer	Ostro	Ceralio	Schwabern- corn Dinkel	Spelt I.N.Z.
Frankenckorn								
Badengold	0,905							
Schwanenspelz	0,851	0,851						
Oberkulmer	0,851	0,851	0,866					
Ostro	0,851	0,851	0,866	0,925				
Ceralio	0,851	0,851	0,903	0,866	0,866			
Schwaberncorn Dinkel	0,851	0,851	0,866	0,889	0,889	0,866		
Spelt I.N.Z.	0,851	0,851	0,866	0,889	0,889	0,866	0,923	



Rys. 2. Dendrogram odmian orkisz uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery RAPD
Fig. 2. UPGMA dendrogram for spelt cultivars obtained based on RAPD markers

Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,851 do 0,913, a średnio wynosiła 0,868. Największe podobieństwo do wszystkich pozostałych odmian wykazały odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z., najmniejsze zaś odmiany Frankenckorn i Badengold. W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA (rys. 2). Na uzyskanym dendrogramie wyróżnić można trzy grupy skupień. Pierwsza obejmuje odmiany Frankenckorn i Badengold, druga Schwanenspelz i Ceralio. W trzeciej grupie skupień wspólnej klasteryzacji uległy odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z. Odmiany znajdujące się w tej grupie skupień można podzielić na dwie podgrupy, pierwszą tworzą odmiany Oberkulmer i Ostro, drugą Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z. Sun i wsp. (1998) stwierdzili, że analizowane przez nich genotypy orkisz charakteryzowały się większym zróżnicowaniem genetycznym, aniżeli genotypy pszenicy zwyczajnej. Autorzy stwierdzili podobnie jak Du i wsp. (2002), że na uzyskanym dendrogramie badane linie orkisz tworzyły odrębną grupę skupień. Ocenę zróżnicowania genetycznego orkisz przeprowadzono również stosując markery SSR. Yang i wsp. (2005) analizowali za pomocą markerów mikrosatelitarnych genotypy pszenicy heksaploidalnej. Autorzy analizując 20 odmian *T. aestivum*, 13 form *T. spelta* i 11 genotypów *T. compactum*. wykazali, że pszenica orkisz charakteryzowała się największym spośród badanych obiektów zróżnicowaniem genetycznym.

WNIOSKI

1. Badane odmiany orkisz charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym.
2. Za pomocą wybranych starterów możliwa była identyfikacja 6 spośród 8 badanych odmian orkisz.
3. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że największe podobieństwo do wszystkich pozostałych odmian wykazały odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z., najmniejsze zaś odmiany Frankenckorn i Badengold.

LITERATURA

- Achleitner A., Tinker N.A., Zechner E., Buerstmayr H. 2008. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1041 — 1053.
- Baumagärtel-Blaschke U. 1991. Dinkel für die neue deutsche Küche. *DLG — Mitteilungen*, 106, 12: 44 — 47.
- Cheng Z., Huang H. 2009. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. *Scientia Hort.* 120: 188 — 193.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11 — 15.
- Drossou A., Katsiotis A., Leggett J. M., Loukas M., Tsakas S. 2004. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 48 — 54.
- Du J. K., Yao Y. Y., Ni Z. F., Peng H. R., Sun Q. X. 2002. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compacted and progeny of recurrent selection. *Acta Genet. Sin.* 29 (5): 445 — 452.

- Grela E., Pałys E., Günther K. D. 1993. Skład chemiczny i wartość pokarmowa ziarna orkisz (Triticum spelta) w żywieniu świń. Mat. Sympozjum Naukowego nt.: „Produkcja zwierzęca a środowisko przyrodnicze”. Wyd. AR Lublin, 214 — 222.
- Ikegami H., Nogata H., Hirashima K., Awamura M., Nakahara T. 2009. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. Genet. Resour. Crop Evol. 56:201 — 209.
- Kochieva E. Z., Goryunova S. V., Pomortsev A. A. 2001. RAPD analysis of the genome in species of the genus *Hordeum*. Rus. J. Genet. 37 (8): 905 — 910.
- Marillia E. F., Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. Genome 39 (4): 646 — 54.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci. 76: 5269 — 5273.
- Rohlf F. J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sun Q., Ni Z., Liu Z., Gao J., Huang T. 1998. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99: 205 — 211.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54 (2-3): 227 — 239.
- Vinod K. Y., Sandeep K., Ravindra K. P. 2007. Measurement of genetic dissimilarity in fieldpea (*Pisum sativum* L.) genotypes using RAPD markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54 (6): 1285 — 1289.
- Virk P. S., Ford-Lloyd B. V., Jackson M. T., Newbury H. J. 1995 Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity 74: 170 — 179.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid. Res. 18: 6531 — 6535.
- Yang X., Liu P., Han Z., NI Z., Sun Q. 2005. Genetic diversity revealed by genomic-SSR and EST-SSR markers among common wheat, spelt and compacted. Progr. Nat. Sci. 15 (1):24 — 33.

ROMAN PRAŻAKWydział Nauk Rolniczych w Zamościu
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Zmienność i współzależność niektórych cech w mieszańcach *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka

Variability and interrelationship of some traits in *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids

Celem badań była ocena zmienności i współzależności niektórych cech ilościowych w ziarnie mieszańców F₂–F₅ *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka. Mieszańce F₂–F₅ porównano z pszenicą odmiany Rusalka. Analizowano następujące cechy: liczbę pędów produkcyjnych, długość pędu głównego, średnicę 2-go od dołu międzywęźla, długość osadki kłosowej, liczbę kłosek w kłosie głównym, zbitość kłosa głównego, liczbę ziarniaków w kłosie głównym, masę ziarniaków z kłosa głównego, płodność kłosa głównego (liczba ziarniaków przypadających na 1 kłosek) i masę tysiąca ziarniaków oraz zawartość białka ogółem. Mieszańce F₂ *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka charakteryzowały się niską płodnością oraz niektórymi cechami kozińców, np. cienkimi źdźbłami, łamliwymi osadkami kłosowymi, twardymi plewami. W kolejnych pokoleniach fenotypy mieszańców przypominały coraz bardziej pszenicę. Wynikało to być może ze stopniowej eliminacji chromosomów *Aegilops kotschy* Boiss. przez chromosomy pszenicy. Wartość współczynnika zmienności (CV%) analizowanych cech ilościowych mieszańców F₂–F₅ była zróżnicowana i wahała się od 13,87% do 243,58%, a u pszenicy Rusalka od 5,74% do 35,33%. Kłosa mieszańców różniły się zbitością, ościstością, kształtem i długością osadki kłosowej. Niektóre z nich wyróżniały się bardzo długimi (1,75 dcm) lub rozdwojonymi osadkami kłosowymi. W mieszańcach odnotowano istotne dodatnie korelacje pomiędzy długością osadki kłosowej a liczbą kłosek z kłosa głównego, liczbą i masą ziarniaków w kłosie głównym, płodnością i masą tysiąca ziarniaków (MTZ) oraz ujemną korelację pomiędzy długością osadki kłosowej a zbitością kłosa. Mieszańce *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka charakteryzowały się znacznie wyższą zawartością białka ogółem w ziarnie (18,3–24,3%) od pszenicy odmiany Rusalka (14,2–15,7%).

Słowa kluczowe: *Aegilops kotschy* Boiss., cechy ilościowe, *Triticum aestivum* L., zawartość białka, zmienność, współzależność

The investigations was undertaken to analyze the variability and interrelationship of some quantitative traits and total protein content in kernels of *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka F₂–F₅ hybrids. The F₂–F₅ hybrids were compared with Rusalka cultivar. The following characters were analyzed: productive shoots number, length of main shoot, diameter of the 2nd bottom internode, length of spike rachis, number of spikelets in main spike, main spike density, kernel number and weight per main spike, fertility (number of kernels per 1 spikelet) of main spike and weight of 1000

kernels. The *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka F₂ hybrids were characterized by low fertility and some *Aegilops* characters, such as thin shoots, brittle spike rachis and indurate glumes. Proceeding advantage of wheat phenotypes in successive generations of *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids was noted. *Aegilops kotschy* Boiss. chromosomes were probably eliminated by wheat chromosomes in hybrid genome. In *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids the values of variability coefficients (CV%) for the quantitative traits analyzed were differentiated and ranged from 13.87% to 243.58%, and in wheat cv. Rusalka from 5.74% to 35.33%. The spikes of *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids differed in density, awning, shape and length of spike rachis. Some of them were distinctive for very long (1.75 dcm) or forked spike rachis. In *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids significant positive correlations were found between the length of spike rachis in main spike and the number of spikelets, the number of kernels per main spike, the weight of kernels per main spike, the fertility, the weight of 1000 kernels as well as significant negative correlation between the length of spike rachis and the spike density. *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka hybrids were characterized by much higher total protein content in kernels (18.3–24.3%) than Rusalka cultivar (14.2–15.7%).

Key words: *Aegilops kotschy* Boiss., protein content, quantitative traits, *Triticum aestivum* L., variability, interrelationship

WSTĘP

Obecnie najpoważniejszym zagrożeniem światowego systemu żywnościowego i paszowego jest erozja genetyczna (Arseniuk, 2005). W ostatnich dekadach szczególnemu zubożeniu uległa bioróżnorodność odmian pszenicy uprawnej (Chełkowski i in., 2004). Do zwiększenia bioróżnorodności odmian pszenicy uprawnej można wykorzystać gatunki oddalone, np. z rodzaju *Aegilops* L. (kozieniec) (Barloy i in., 2000; Harjit-Singh i in., 2000; Hsam i in., 2001, 2003; Huguet-Robert i in., 2001; Gatford i in., 2002; Kozub i in., 2003; Martin-Sanchez i in., 2003; Montes i in., 2003; Chhuneja i in., 2006; Rawat i in., 2009). Najbardziej znanym przykładem przeniesienia korzystnych cech z kozieńca do pszenicy uprawnej jest translokacja z *Ae. ventricosa* Tausch. wprowadzona we Francji do linii pszenicy ozimej VPM1 dająca odporność — dzięki genom *Pch1* i *Pch2* — na łamliwość podstawy źdźbła (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton) (Doussinault i in., 1983). Na jej bazie Brytyjczycy wytworzyli odmianę Rendezvous, która znajduje się w rodowodach wielu brytyjskich, francuskich, niemieckich i szwajcarskich pszenic ozimych oraz pszenicach australijskich i północnoamerykańskich. Okazało się, że oprócz odporności na (*Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton) u wymienionych odmian występuje translokacja z *Ae. ventricosa* na chromosomie 2B, która zawiera grupę trzech genów odporności na rdze: geny *Lr 37*, *Yr 17* i *Sr 38* (Chełkowski i in., 2004). Krzyżowania oddalone wykorzystuje się również do otrzymania linii pszenicy ozimej o poprawionych parametrach plonotwórczych, wskaźnikach jakościowych oraz o zwiększonej tolerancji na stresy abiotyczne (Stefanowska i in., 1995; Pilch, 1997, 2002; Pilch i Głowacz, 1997; Tyrka i Stefanowska, 2001; Prażak, 2001, 2003, 2007 a).

Celem przeprowadzonych badań była ocena zmienności i współzależności niektórych cech ilościowych oraz analiza zawartości białka ogółem w ziarnie mieszańców F₂–F₅ *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka.

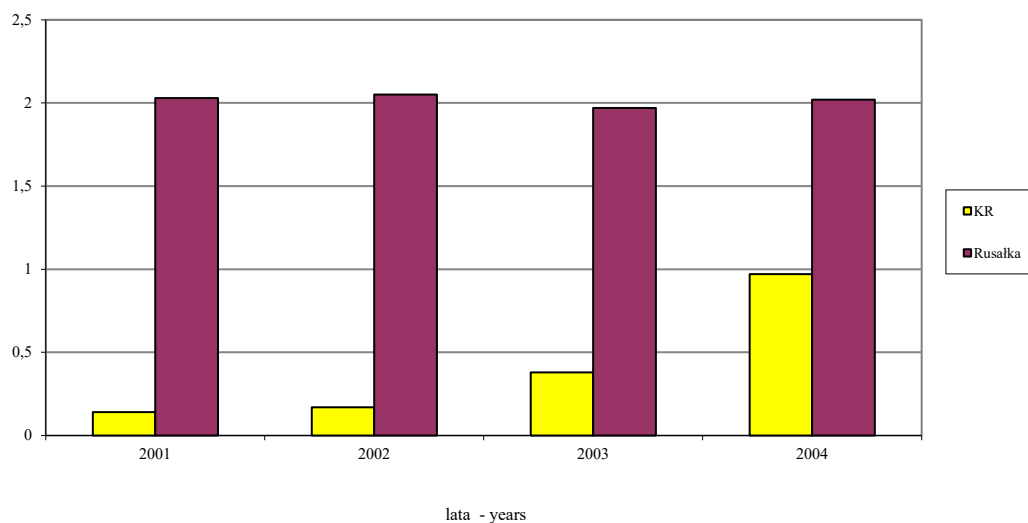
MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań były mieszańce F₂–F₅ pszenicy ozimej odmiany Rusalka (genomy AABBDD) z dzikim gatunkiem trawy z rodzaju *Aegilops* L. — *Ae. kotschy* Boiss. (genomy UUSS). Skład genomowy krzyżowanych gatunków podano za Kimber i Feldman (1987).

Do krzyżowania z kozieńcem *Aegilops kotschy* Boiss. (genomy UUSS) wybrano pszenicę odmiany Rusalka ze względu na jej dobrą zdolność krzyżowania z żytem. Stefanowska (1986) na podstawie zdolności krzyżowania z żytem zakwalifikowała tę odmianę do grupy *Kr1 Kr1 kr2 kr2* (21,55% zawiązywania ziarniaków). Mieszańca F₁ *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka (rys. 3) otrzymano wykorzystując metodę hodowli niedojrzałych zarodków *in vitro* (Prażak, 1997 b). Kolejne pokolenia mieszańców uzyskano w wyniku samozapylenia.

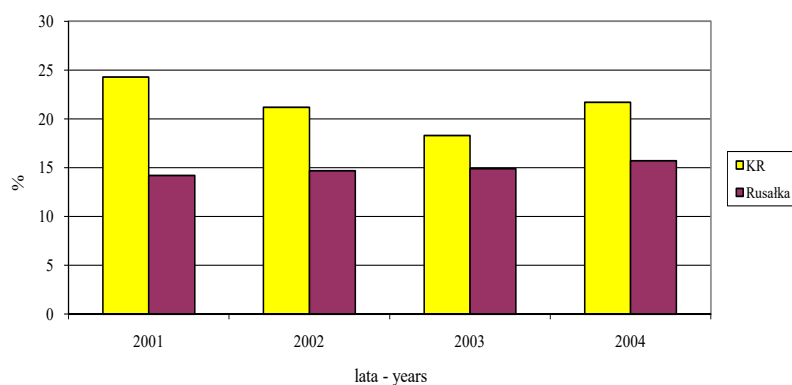
W latach 2000–2004 mieszańce i pszenicę wysiewano ręcznie, około 20 września, na polu doświadczalnym Wydziału Nauk Rolniczych w Zamościu, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, na glebie brunatnej wytworzonej z pyłów wodnego pochodzenia, dobrego kompleksu pszennego. Rośliny rosły na oddzielnych poletkach długości 2,0 m i szerokości 1,0 m, w rozstawie 20 × 10 cm. Wykonano podstawowe zabiegi agrotechniczne, nawożenie NPK = 60–90–110 kg/ha. Pomiarów cech ilościowych przeprowadzono na różnej liczbie pojedynków mieszańców F₂–F₅ *Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka (liczba pojedynków w kolejnych pokoleniach – 11, 12, 31, 68) oraz na 20 pojedynkach formy rodzicielskiej odmiany Rusalka. Corocznie na wybranych roślinach, zebranych w fazie dojrzałości pełnej, analizowano liczbę pędów produkcyjnych, długość pędu głównego, średnicę 2-go od dołu międzywęźla, długość osadki kłosowej, liczbę kłosek w kłosie głównym, zbitość kłosa głównego (liczba kłosek przypadających na 1 dcm osadki kłosowej), liczbę ziarniaków w kłosie głównym, masę ziarniaków z kłosa głównego, płodność kłosa głównego (liczba ziarniaków przypadających na 1 kłosek) i masę tysiąca ziarniaków (MTZ). Pomiarów dokonano według metodyki stosowanej przy analizie laboratoryjnej pojedynków (Tarkowski, 1994). Wyniki badań opracowano statystycznie i przedstawiono w tabelach 1–2 oraz na rysunkach 1–8. Wyliczono średnie arytmetyczne oraz współczynniki zmienności (CV%) i korelacji fenotypowych. W celu wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi cechami, wykonano analizę wariancji dla badanych cech, metodą klasyfikacji pojedynczej. Zastosowano wielokrotne przedziały Tukeya (Ansari i Bradley, 1960) dla stwierdzenia statystycznie istotnych różnic pomiędzy mieszańcami a pszenicą Rusalka.

Zawartość białka ogółem w ziarniakach mieszańców oraz pszenicy oznaczono w Centralnym Laboratorium Analitycznym Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie metodą Kjeldahla stosując przelicznik białkowy 5,7 (PN-75/A-04018). Wyniki analizy białka przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 1. Plodność kłosa głównego (liczba ziarniaków przypadających na 1 kłosek) mieszańców F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) i *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka w latach 2001–2004

Fig. 1. Main spike fertility (number of kernels per 1 spikelet) of F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) hybrids and *Triticum aestivum* L. from 2001 to 2004



Rys. 2. Zawartość białka ogółem w ziarnie mieszańców F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) i *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka w latach 2001–2004

Fig. 2. Total protein contents in grain of F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) hybrids and *Triticum aestivum* L. from 2001 to 2004

WYNIKI I DYSKUSJA

Kimber i Feldman (1987) podkreślają wysoką odporność na suszę, wysokie temperatury i zasolenie kozieńca *Ae. kotschy* Boiss. Według Thiele i wsp. (2002) jest to gatunek, który może stanowić nowe źródło odporności na łamliwość podstawy źdźbła (*Pseudocercosporella herpotrichoides* (Fron) Deighton). Pasquini (1980) oraz Frauenstein i Hammer (1985) stwierdzili u *Ae. kotschy* Boiss. odporność połową na mączniaka prawdziwego. W badaniach przeprowadzonych przez autora *Ae. kotschy* Boiss. wykazał się odpornością połową na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego (Prażak, 1997 a, 2007 b), słabą podatnością na fuzariozę kłosów (Kiecana i Prażak, 1995) oraz zawierał dużo białka w ziarniakach (Prażak, 2004). Chhuneja i wsp. (2006) oraz Rawat i wsp. (2009) stwierdzili w ziarnie i liściach *Ae. kotschy* Boiss. 3–4 razy większą zawartość żelaza i cynku w porównaniu do odmian pszenic *Triticum durum* Desf. i *Triticum aestivum* L. Wysoka istotna pozytywna korelacja pomiędzy zawartością tych mikroelementów w liściach i ziarnie pozwoliła autorom na szybkie wyselekcjonowanie płodnych mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *Triticum* o znacznie podwyższonej zawartości żelaza i cynku w ziarnie.

Gatunki z rodzaju *Aegilops* L. charakteryzują się silnym krzewieniem (Prażak, 1992). W pokoleniach F₂–F₄ liczba pędów produkcyjnych, czyli pędów zakończonych normalnie rozwiniętym kłosem, mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusałka była istotnie mniejsza od liczby pędów produkcyjnych pszenicy Rusałka (tab. 1).

W pokoleniu F₅ nie odnotowano już istotnej różnicy w liczbie pędów produkcyjnych pomiędzy roślinami mieszańcowymi a pszenicą Rusałka (tab. 1). W ciągu 4 lat badań wartość współczynnika zmienności krzewienia produkcyjnego wahała się u mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusałka od 80,57% do 243,58%, a u pszenicy Rusałka od 26,90% do 34,70% (tab. 1). Krzewienie produkcyjne mieszańców było istotnie dodatnio skorelowane z długością pędu, a ujemnie ze zbitością kłosa głównego (tab. 2). Według Stefanowskiej (1995) silniejsze krzewienie pszenicy ozimej jest korzystne, gdyż przy małym zagęszczeniu bądź dużych stratach roślin w okresie zimowym intensywne krzewienie wypełnia powstałe luki w obsadzie roślin, co w pewnym stopniu zmniejsza straty w plonach. Araki i wsp. (1999) zlokalizowali w chromosomie 4AS pszenicy QTL-e (*loci* warunkujące cechy ilościowe) sprzężone z liczbą źdźbeł z rośliny. Liczba źdźbeł i liczba kłosów z rośliny charakteryzuje się dużą zmiennością (Nawracała, 2004). Dlatego też, jako cecha kształtowana w dużej mierze przez środowisko, warunkowana jest prawdopodobnie w większej części przez nieaddytywne działanie genów (Węgrzyn i in., 1979).

W pokoleniu F₂ odnotowano bardzo duże zróżnicowanie w długości pędów mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusałka (tab. 1). Wartość współczynnika zmienności długości pędu mieszańców była blisko 4 razy większa (CV = 26,07%) od współczynnika zmienności pszenicy Rusałka (CV = 6,32%) (tab. 1).

Tabela 1

Wartości średnie i współczynnik zmienności (CV%) niektórych cech ilościowych mieszańców F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) i *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka
Mean values and variability coefficients (CV%) of some quantitative traits of F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) hybrids and *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka

Formy Forms	Lata Years	Krze- wienie produk- cyjne Produc- tive tillering	Długość pędu głównego (cm) Length of main shoot (cm)	Średnica 2-go od dołu między- węzła (mm) Diameter of 2nd bottom internode (mm)	Długość osadki kłosowej (dcm) Length of spike rachis (dcm)	Liczba kłosków w kłosie głównym No. of spikelets in main spike	Zbiłość kłosa głównego ¹ Main spike density ¹	Liczba ziaren w kłosie głównym No. of kernels per main spike	Masa ziaren z kłosa głównego (g) Weight of kernels per main spike (g)	Płodność kłosa głównego ² Main spike fertility ²	Masa tysiąca ziaren (g) Weight of 1000 kernels (g)
F ₂ KR	2001	8,91* (91,38)	66,69* (26,07)	2,71* (28,78)	0,79* (29,11)	12,82* (40,33)	16,38* (26,56)	2,09* (75,69)	0,06* (83,33)	0,14* (64,29)	18,46* (39,92)
F ₃ KR	2002	7,50* (243,58)	68,46* (19,56)	3,38* (15,09)	0,81* (22,22)	16,08* (23,22)	20,51 (22,18)	3,58* (209,50)	0,11* (218,18)	0,17* (205,88)	8,51* (152,17)
F ₄ KR	2003	5,81* (103,02)	68,50 (24,64)	3,63* (18,46)	0,89 (27,48)	16,90* (19,10)	18,67* (23,09)	6,19* (112,96)	0,17* (124,50)	0,38* (117,08)	18,54* (67,44)
F ₅ KR	2004	15,07 (80,57)	89,96* (18,86)	4,43 (15,74)	1,08* (16,56)	18,16 (13,87)	16,13* (17,67)	17,94* (76,76)	0,62* (87,47)	0,97* (76,58)	26,61* (35,94)
Rusalka	2001	16,00 (32,38)	79,93 (6,32)	5,01 (11,48)	0,98 (11,75)	19,65 (8,30)	19,07 (5,58)	39,45 (13,97)	2,15 (15,83)	2,03 (16,49)	35,30 (10,33)
Rusalka	2002	15,50 (26,90)	77,30 (14,93)	4,69 (17,80)	0,96 (11,41)	19,35 (7,36)	19,29 (5,74)	39,50 (10,28)	2,26 (10,30)	2,05 (10,23)	36,08 (16,49)
Rusalka	2003	13,70 (33,33)	73,48 (14,05)	4,39 (18,73)	0,86 (18,25)	18,90 (9,54)	21,15 (10,21)	37,25 (19,65)	1,86 (22,73)	1,97 (16,18)	41,36 (21,98)
Rusalka	2004	12,65 (34,70)	77,50 (11,45)	4,51 (15,37)	0,88 (17,04)	19,08 (8,77)	20,95 (11,89)	38,10 (25,72)	2,10 (35,33)	2,02 (28,20)	41,58 (30,39)
NIR _{0,05}	2001	5,32	11,31	0,54	0,11	1,95	2,20	13,46	0,49	0,58	4,87
LSD _{0,05}	2002	7,56	8,04	0,52	0,10	1,88	r.n.	10,44	0,51	0,99	7,08
	2003	3,49	r.n.	0,48	r.n.	1,76	2,14	9,09	0,37	0,43	7,42
	2004	r.n.	9,77	r.n.	0,10	r.n.	1,92	8,30	0,40	0,43	6,20

¹ Liczba kłosków na 1 dcm osadki kłosowej; Number of spikelets per 1 dcm of the spike rachis

² Liczba ziarniaków na 1 kłosek; Number of kernels per 1 spikelet

r.n. — Różnica nieistotna; Difference not significant

*Wynik istotnie różny od pszenicy Rusalka przy p = 0,05; Result significantly different from that for wheat cv. Rusalka at p = 0.05

Knezevic i wsp. (2000) analizując 50 odmian pszenicy pochodzących z różnych rejonów świata, oszacowali dla cechy długości pędu bardzo niski współczynnik zmienności fenotypowej (CV = 7,4%) i bardzo wysoki współczynnik odziedziczalności wynoszący (0,96). Według Węgrzyna i in. (2002) odziedziczalność tej cechy była średnio wysoka i wysoka (0,49 i 0,89). Średnia długość pędu roślin mieszańcowych *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka zwiększyła się z 66,69 cm w pokoleniu F₂ do 89,96 cm w pokoleniu F₅ (tab. 1). Długość pędu roślin mieszańcowych była istotnie dodatnio skorelowana z wieloma innymi cechami ilościowymi — ze średnicą 2-go od dołu międzywęzła, długością osadki kłosowej, liczbą kłosków w kłosie głównym, liczbą i masą

ziarniaków w kłosie głównym, płodnością i MTZ oraz ujemnie — ze zbitością kłosa głównego (tab. 2). Według Tarkowskiego (1995) krótkosłome odmiany pszenicy są odporniejsze na wyleganie. Tyrka i Stefanowska (2001) odnotowali znaczne zróżnicowanie długości pędów głównych wśród mieszańców pszenicy z *Ae. ventricosa* Tausch. (69,8–112,5 cm) i *Ae. juvenalis* (Thell.) Eig. (65,4–118,8 cm). Na wysokość roślin wpływa duża liczba genów. W roślinach pszenicy o normalnej wysokości (bez genów *Rht*) Ahmed i wsp. (2000) znaleźli w chromosomach *1A*, *1D*, *2B*, *2D* i *4B* siedem QTL-i i markerów RFLP związanych z wysokością roślin.

Tabela 2

Wartości istotnych współczynników korelacji liniowej dla badanych cech ilościowych mieszańców F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) i *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka z lat 2001–2004

Significant values of correlation coefficients of the investigated quantitative traits of F₂–F₅ KR (*Aegilops kotschy* Boiss. × *Triticum aestivum* L. cv. Rusalka) hybrids and *Triticum aestivum* L. from 2001 to 2004

Cechy Traits	Formy Forms	X ₂ Długość pędu głównego (cm) Length of main shoot (cm)	X ₃ Średnica 2-go między- węzła (mm) Diameter of 2nd bottom internode (mm)	X ₄ Długość osadki kłosowej (dcm) Length of spike rachis (dcm)	X ₅ Liczba kłosek w kłosie głównym No. of spikelets per main spike	X ₆ Zbitość kłosa głównego ¹ Main spike density ¹	X ₇ Liczba ziaren w kłosie głównym No. of kernels in main spike	X ₈ Masa ziaren z kłosa głównego (g) Weight of kernels per main spike (g)	X ₉ Płodność kłosa głównego ² Fertility of main spike ²	X ₁₀ Masa tysiąca ziaren (g) Weight of 1000 kernels (g)
X ₁	KR Rusalka	0,267** 0,515**				-0,210* -0,532**				
X ₂	KR Rusalka		0,393** 0,537**	0,499** 0,653**	0,418** 0,586**	-0,239** -0,519**	0,470** 0,221*	0,472** 0,202*	0,444**	0,395** -0,479**
X ₃	KR Rusalka			0,382** 0,501**	0,498** 0,357**	-0,502** 0,209*	0,503** 0,209*	0,471** 0,251*	0,474**	0,360** -0,255*
X ₄	KR Rusalka				0,541** 0,857**	-0,548** -0,834**	0,354** 0,331**	0,351** 0,339**	0,315**	0,353** -0,591**
X ₅	KR Rusalka					0,282** -0,466**	0,408** 0,235*	0,367** 0,201*	0,293**	0,356** -0,537**
X ₆	KR Rusalka						-0,326**	-0,338**	-0,204*	-0,178* 0,482**
X ₇	KR Rusalka							0,966** 0,838**	0,972** 0,751**	0,514**
X ₈	KR Rusalka								0,940** 0,614**	0,486**
X ₉	KR Rusalka									0,517** 0,213*

x₁ – Krzewienie produkcyjne; productive tillering

¹ liczba kłosek na 1 dcm osadki kłosowej; number of spikelets per 1 dcm of the spike rachis

² liczba ziarniaków na 1 kłosek, * p≤0,05, ** p≤0,01; number of kernels per 1 spikelet, * p≤0.05, ** p≤0.01

Według Dolńskiego (1986) odmiany pszenicy heksaploidalnej odporne na wyleganie wyróżniają się większą średnicą 2-go od dołu międzywęźla. Gatunek *Ae. kotschy* Boiss. wytwarza cieńsze źdźbła od pszenicy (Prażak, 1992). W pokoleniach F₂–F₅ odnotowano zwiększenie średnicy 2-go od dołu międzywęźla u mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T.*

aestivum L. cv. Rusalka z 2,71 mm do 4,43 mm (tab. 1). W pokoleniu F₂ wartość współczynnika zmienności tej cechy mieszańców była wyższa, a w pokoleniach F₃–F₅ zbliżona do pszenicy Rusalka (tab. 1). Poza tym, średnica 2-go od dołu międzywęźla mieszańców była dodatnio skorelowana z większością analizowanych cech (tab. 2). Średnica 2-go od dołu międzywęźla czterech odmian pszenicy badanych przez Dolińskiego (1995) wahała się od 3,04 mm do 4,07 mm. Keller i wsp. (1999) wykazali obecność dziewięciu *loci* odporności na wyleganie w chromosomach *1BS*, *2AS*, *2D*, *3AS*, *4AS*, *5AL*, *5BL*, *6BL*, *7BL* pszenicy. Według Luthry (1987) dość wysoka odziedziczalność (0,56) dla średnicy drugiego od dołu międzywęźla wskazuje, że ta cecha powinna być brana pod uwagę w czasie selekcji.



Rys. 3. Kłosy (od lewej): forma mateczna — *Ae. kotschy* Boiss., mieszaniec F₁ — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, forma ojcowska — *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Fig. 3. Spikes (from the left): female form — *Ae. kotschy* Boiss., F₁ hybrid — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, male form — *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Morfologia kłosa (długość osadki kłosowej, liczba kłosek w kłosie głównym, zbitość kłosa) wpływa na liczbę i wypełnienie ziarniaków. Formy zbitokłose mają na ogół mniejsze i drobniejsze nasiona. Są one jednak odporniejsze na osypywanie się od form o kłosach luźnych (Stefanowska, 1995). W badaniach własnych mieszańce miały kłosy luźniejsze od pszenicy. Średnia długość osadek kłosowych mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka zwiększyła się w ciągu czterech lat badań z 0,79 dcm w pokoleniu F₂ do 1,08 dcm w pokoleniu F₅ (tab. 1). W tym czasie zmienność tej cechy uległa obniżeniu z 29,11% do 16,56% (tab. 1). W pokoleniach F₂–F₃ średnia długość osadki kłosowej mieszańców była istotnie mniejsza od długości osadki kłosowej pszenicy, w pokoleniu F₄ nie różniła się istotnie od pszenicy, natomiast w pokoleniu F₅ okazała się istotnie większa.

Długość osadek kłosowych roślin mieszańcowych wahała się od 0,60 dcm do 1,75 dcm (rys. 5, 6).



Rys. 4. Kłosy mieszańców F₂ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka
Fig. 4. Spikes of F₂ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka hybrids



Rys. 5. Kłosy (od lewej): 1–10 mieszańce F₅ — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka
Fig. 5. Spikes (from the left): 1–10 F₅ hybrids — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Długość osadki kłosowej mieszańców F_2 – F_5 *Ae. kotschy* Boiss. $\times$ *T. aestivum* L. cv. Rusałka była istotnie dodatnio skorelowana z liczbą kłosek z kłosa głównego, liczbą i masą ziarniaków w kłosie głównym, płodnością i MTZ oraz ujemnie — ze zbitością kłosa (tab. 2). Niektóre rośliny mieszańcowe miały rozdwojone osadki kłosowe (rys. 5). Ta cecha umożliwia uzyskanie większej liczby ziarniaków na 1 m². Jednak jak dotychczas mieszańce o rozgałęzionych kłosach wytwarzały bardzo drobne, pomarszczone ziarniaki (Rajaram, 2001).

W przypadku mieszańców odnotowano bardzo dużą zmienność nie tylko długości kłosa, ale jego kształtu, ościstości i zbitości (rys. 4–6). Friebe i wsp. (1995 a, b, 1996) również odnotowali dużą zmienność fenotypową kłosek mieszańców oddalonych *T. aestivum* L. $\times$ *Ae. umbellulata* Zhuk., *T. aestivum* L. $\times$ *Ae. searsii* M. Feldman & M. Kislev i *T. aestivum* L. $\times$ *Ae. variabilis* Eig. Według Muramatsu (1986) na kształt kłosa mają wpływ geny *Q* i *C*. Dominujący allel *Q* odpowiada za wykształcenie cylindrycznego, wymłacalnego kłosa, o niełamliwej osadce kłosowej i wpływa plejotropowo na jego długość. Natomiast recesywny allel *q* determinuje długi, speltoidalny (piramidalny) kształt kłosa z łamliwą osadką kłosową i oplewionym ziarnem. Allel *Q* nie dominuje w pełni nad allelem *q*, ponieważ heterozygota *Qq* ma kształt pośredni pomiędzy cylindrycznym a piramidalnym. Gen *C* warunkuje kłos zbity (maczugowaty). Geny *Q* i *C* są zlokalizowane odpowiednio na chromosomach 5A i 2D (Sears, 1947; Rao, 1972). Faris i Gill (2002) zlokalizowali gen *Q* na długim ramieniu chromosomu 5A. Pilch i Głowacz (1997) donoszą o wyselekcjonowaniu mieszańców pszenicy z *Ae. speltoides* Tausch. i *Ae. triumvidis* L. charakteryzujących się bardzo długimi kłosami. Długość osadki kłosowej decyduje o długości całego kłosa. Tę cechę warunkuje wiele genów, z których największy wpływ mają geny położone na chromosomach genomów *A* i *B*, tj. *1AL*, *1BS*, *4AL*, *7AL* i *7BL*. Występuje sprzężenie z genami wysokiej liczby kłosek w kłosie znajdującymi się w chromosomie *7AL* (Li i in., 2002). Zanetti i wsp. (2000), analizując potomstwo z kombinacji krzyżówkowych pomiędzy *T. aestivum* L. i *T. spelta* L., znaleźli trzy *QTL*-e związane z długością kłosa, z których jeden o największym wpływie na długość kłosa znajdował się w chromosomie *5AL*, w regionie lokalizacji allelu *q*.

Pokolenia F_2 – F_4 *Ae. kotschy* Boiss. $\times$ *T. aestivum* L. cv. Rusałka zawierały istotnie mniej kłosek w kłosie od pszenicy Rusałka (tab. 1). W pokoleniu F_5 mieszańców liczba kłosek z kłosa nie różniła się już istotnie od pszenicy, a zmienność tej cechy uległa zmniejszeniu z 40,33% (pokolenie F_2) do 13,87% (pokolenie F_5) (tab. 1). Liczba kłosek w kłosie głównym mieszańców F_2 – F_5 była dodatnio skorelowana ze zbitością kłosa głównego, liczbą i masą ziarniaków z kłosa głównego, płodnością i MTZ (tab. 2). Pilch (1997) odnotował u mieszańców pszenicy z *Ae. speltoides* Tausch. 28 kłosek w kłosie. Liczba kłosek w kłosie jest dodatnio skorelowana z długością kłosa. Duża liczba kłosek w kłosie związana jest z chromosomami *2DS* i *7DL* z dominującym efektem genu *Ppd-D1* niewrażliwości fotoperiodycznej znajdującymi się również w chromosomie *2DS* (Li i in., 2002). Odziedziczalność liczby kłosek w kłosie głównym w szerokim sensie jest wysoka, powyżej 80% (Nawracała, 2004).



Rys. 6. Kłosy (od lewej): 1–10 mieszańce F_5 — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Fig. 6. Spikes (from the left): 1–10 F_5 hybrids — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka

U pszenicy istnieje ujemna korelacja między zbitością kłosa a masą ziarniaków. Odmiany o zbitym kłosie mają często drobne ziarniaki i odwrotnie o kłosie luźnym — grube, dorodne (Tarkowski, 1995). W pokoleniach F_2 – F_5 zbitość kłosów mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka charakteryzowała się dużą zmiennością (tab. 1). Jednak najczęściej kłosy mieszańców były istotnie luźniejsze od kłosów pszenicy Rusalka. Zbitość kłosa mieszańców była ujemnie skorelowana z płodnością i MTZ (tab. 2). Zbitość kłosa jest uwarunkowana klasycznym epistatycznym działaniem genów. Dziedziczenie cechy luźności, zbitości i maczugowatego kształtu określono u pszenicy *Triticum dicoccum* L. już kilkadziesiąt lat temu. W pokoleniu F_2 *Triticum dicoccum* L. otrzymano rośliny o kłosach luźnych, maczugowatych i zbitych w stosunku 12:3:1. Epistatycznym jest gen warunkujący luźność kłosa (Nawracała, 2004).

Ziarniaki mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka we wcześniejszych pokoleniach były pośrednie w stosunku do form rodzicielskich, często pomarszczone, później coraz bardziej przypominały ziarniaki pszenicy (rys. 7, 8). Mimo, że średnia ich liczba z kłosa głównego w pokoleniach F_2 – F_5 mieszańców zwiększyła się z 2,09 do 17,94, to jednak pozostała istotnie mniejsza od pszenicy Rusalka (37,25–39,45) (tab. 1). Zmienność tej cechy wśród pojedynków *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka była bardzo wysoka i wahała się od 75,69% do 209,50% (tab. 1). Odnotowano istotną dodatnią korelację pomiędzy liczbą ziarniaków w kłosie głównym mieszańców a masą ziarniaków z kłosa głównego, płodnością i MTZ (tab. 2). W badaniach przeprowadzonych przez Dolińskiego (1995) liczba ziarniaków w kłosach głównych

analizowanych odmian pszenicy i ich mieszańców wahała się od 37,0 do 60,2, przy czym w przypadku mieszańców było ich mniej niż u pszenic. Według Pilcha (1997), liczba i masa ziarniaków z kłosa niektórych form mieszańcowych pszenic z gatunkami *Aegilops*, znacznie przewyższała wartości tych cech charakterystyczne dla pszenic, np. liczba ziarniaków z kłosa dochodziła do 135, a ich masa sięgała 4,6 g. Duże ziarniaki miały mieszańce z *Ae. speltoides* Tausch., natomiast znacznie mniejsze — mieszańce z *Ae. squarrosa* L. Liczba ziaren z kłosa charakteryzuje się stosunkowo wysoką odziedziczalnością w szerokim sensie (0,87 i 0,71), podobnie jak odziedziczalność masy ziarniaków z kłosa (0,86 i 0,72) (Nawracała, 2004)



Rys. 7. Ziarniaki (od lewej): górny rząd — *Ae. kotschy* Boiss., mieszaniec F₁ — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka, dolny rząd — mieszańce F₂ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka (1–9)

Fig. 7. Kernels (from the left): upper row — *Ae. kotschy* Boiss., F₁ hybrid — *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka, lower row — F₂ hybrids of *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka (1–9)

W pokoleniach F₂–F₅ średnia masa ziarniaków z kłosa głównego mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka zwiększyła się z 0,06 g do 0,62 g (tab. 1). Współczynnik zmienności tej cechy w przypadku mieszańców był bardzo wysoki i wahał się od 83,33% do 218,18% (tab. 1). Rusalka charakteryzowała się istotnie większą średnią masą ziarniaków z kłosa głównego (1,86–2,26 g) i znacznie niższą zmiennością tej cechy (CV = 10,30–35,33%) od mieszańców (tab. 1). Odnotowano istotną dodatnią korelację pomiędzy masą ziarniaków z kłosa głównego mieszańców a ich płodnością i MTZ (tab. 2).

Mieszańce F₂–F₅ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka miały istotnie niższą płodność (0,14–0,97) od pszenicy Rusalka (1,97–2,05) (tab. 1, rys. 1). Współczynnik zmienności tej cechy mieszańców był bardzo wysoki (CV = 64,29–205,88%) (tab. 1).

Gruszecka (1998) odnotowała dużą zmienność płodności roślin mieszańcowych generacji B₂/F₁ i F₂ *Ae. crassa* 4× Boiss. i *Ae. juvenalis* (Thell.) Eig. z *X Triticosecale* Wittmack. Rośliny mieszańcowe pszenżyta z *Ae. juvenalis* (Thell.) Eig. charakteryzowały się większą zmiennością płodności, a mieszańce z *Ae. crassa* 4× Boiss. — mniejszą. Odziedziczalność liczby ziaren przypadających na jeden kłosek jest wysoka, ponad 80% (Goldringer i in., 1997).



Rys. 8. Ziarniaki (od lewej): górny rząd — 1–5 mieszańce F₅ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, dolny rząd 1–4 mieszańce F₅ *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Fig. 8. Kernels (from the left): upper row — 1–5 F₅ hybrids of *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, lower row 1–4 F₅ hybrids of *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka, *T. aestivum* L. cv. Rusalka

Masa tysiąca ziarniaków należy u zbóż do cech najbardziej skorelowanych z plonem ziarna i jest w wysokim stopniu odziedziczalna (Doliński, 1995). Według Węgrzyna i in. (2002) MTZ należy, podobnie jak długość pędu głównego, do cech o odziedziczalności od średnio wysokiej do wysokiej (0,47–0,93). Otrzymywana dla MTZ, w wynikach wielu doświadczeń, wysoka odziedziczalność świadczy o silnej genetycznej determinacji tej cechy (Nawracała, 2004). W wyniku prowadzonej selekcji średnia masa tysiąca ziarniaków mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka zwiększyła się z 18,46 g w pokoleniu F₂ do 26,61 g w pokoleniu F₅. Była ona jednak nadal istotnie niższa od MTZ pszenicy Rusalka. Współczynnik zmienności MTZ mieszańców, który w pokoleniu F₃ osiągał 152,17%, w pokoleniu F₅ obniżył się do 35,94% (tab. 1).

Gatunki *Aegilops* L. charakteryzują się wysoką zawartością białka ogółem w ziarnie (Blüthner i Schumann, 1988; Holubec i in., 1992; Prażak, 2004), np. średnia zawartość białka w ziarniakach *Ae. kotschy* Boiss. wynosiła 25,74% (Prażak, 2004). Ziarniaki

mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka zawierały istotnie więcej białka ogółem od pszenicy odmiany Rusalka. W pokoleniach F₂–F₅ średnia zawartość białka w ziarniakach mieszańców wyniosła odpowiednio — 24,3%, 21,2%, 18,3% i 21,7%. Zawartość białka w ziarnie pszenicy Rusalka wahała się od 14,2% do 15,7% (rys. 2).

WNIOSKI

1. Mieszańce *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka mogą być wykorzystane do poprawienia niektórych cech w pszenicy, np. do zwiększenia długości osadek kłosowych, skrócenia źdźbeł, czy zwiększenia zawartości białka w ziarnie.
2. Z mieszańców *Ae. kotschy* Boiss. × *T. aestivum* L. cv. Rusalka o kłosach ościstych można wyhodować odmiany polecane do uprawy w rejonach zagrożonych przez zwierzęta leśne.
3. Gatunek *Ae. kotschy* Boiss. ze względu na swoją wysoką odporność na choroby i stresy abiotyczne można wykorzystywać do tworzenia linii mieszańcowych, a następnie odmian przydatnych dla gospodarstw ekologicznych.

LITERATURA

- Ahmed T. A., Tsujimoto H., Sasakuma T. 2000. QTLs associated with plant height and related characters in hexaploid wheat. *Breed. Sci.* 50 (4): 267 — 273.
- Ansari A. R., Bradley R. A. 1960. Rank-sum tests for dispersions. *Annals of mathematical statistics* 31: 1174 — 1189.
- Araki E., Miura H., Sawada S. 1999. Identification of genetic loci affecting amylose content and agronomic traits on chromosome 4A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98: 977 — 984.
- Arсениuk E. 2005. IHAR szansą dla polskiej hodowli i nasiennictwa roślin rolniczych. *Agro Serwis* 1–2 (304 — 305): 28 — 55.
- Barloy D., Lemoine J., Dredryver F., Jahier J. 2000. Molecular markers linked to the *Aegilops variabilis*-derived root-knot nematode resistance gene *Rkn-mn1* in wheat. *Plant Breed.* 119(2): 169 — 172.
- Blüthner W. D., Schumann E. 1988. Use of *Aegilops* and tetraploid wheat for wheat protein improvement. *Hod. Roślin, Aklim. i Nasien.* 32 (1/2): 203 — 206.
- Chełkowski J., Stępień Ł., Błaszczuk L. 2004. Możliwości wykorzystania markerów DNA w hodowli odpornościowej pszenicy. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 8 — 13.
- Chhuneja P., Dhaliwal H. S., Bains N. S., Singh K. 2006. *Aegilops kotschy* and *Aegilops tauschii* as sources for higher levels of grain iron and zinc. *Plant Breeding* 125 (5): 529 — 531.
- Doliński R. 1986. Wpływ środowiska na parametry mechaniczne i cechy geometryczne źdźbła 14 odmian pszenicy ozimej. *Hodowla pszenicy. Prace Grupy Problemowej w 1984 r. IHAR Radzików*: 47 — 69.
- Doliński R. 1995. Zmienność, odziedziczalność i współzależność właściwości mechanicznych i cech morfologicznych źdźbła pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) warunkujących odporność na wyleganie. *Rozprawy Naukowe. Wyd. AR w Lublinie*.
- Doussinault G., Delibes A., Sanchez-Monge R., Garcia-Olmedo F. 1983. Transfer of a dominant gene for resistance to eyespot disease from a wild grass to hexaploid wheat. *Nature* 303: 698 — 700.
- Faris J. D., Gill B. S. 2002. Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene *Q* in wheat. *Genome* 45: 706 — 718.
- Frauenstein K., Hammer K. 1985. Prüfung von *Aegilops* — Arten auf Resistenz gegen Echten Mehltau, *Erysiphe graminis* D. C., Braunrost, *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. und Spelzenbraune, *Septoria nodorum* Berk. *Kulturpflanze* 33: 155 — 163.

- Friebe B., Jiang J., Tuleen N., Gill B. S. 1995 a. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the characterization of derived chromosome addition and translocation lines in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90 (1) : 150 — 156.
- Friebe B., Tuleen N.A., Gill B.S. 1995 b. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 91: 248 — 254.
- Friebe B., Tuleen N. A., Badaeva E. D., Gill B. S. 1996. Cytogenetic identification of *Triticum peregrinum* chromosomes added to common wheat. *Genome* 39: 272 — 276.
- Gatford K. T., Hearnden P., Ogbonnaya F., Eastwood R. F., Halloran G. M. 2002. Novel resistance to pre-harvest sprouting in Australian wheat from the wild relative *Triticum tauschii*. *Euphytica* 126: 67 — 76.
- Goldringer I., Brabant P., Gallais A. 1997. Estimation of additive and epistatic genetic variance for agronomic traits in a population of doubled-haploid lines of wheat. *Heredity* 79: 60 — 71.
- Gruszecka D. 1998. Charakterystyka niektórych cech mieszańców X *Triticosecale* Wittmack z *Aegilops* sp. generacji B₂/F₁ i F₂. *Biul. IHAR* 205/206: 163 — 173.
- Harjit-Singh, Tsujimoto H., Sakhuja P. K., Singh T., Dhaliwal H. S. 2000. Transfer of resistance to wheat pathogens from *Aegilops triuncialis* into bread wheat. *Wheat Inf. Serv.* 91: 5 — 10.
- Holubec V., Hanušová R., Kostkanová E. 1992. The collection in the Praha-Ruzyně (Czechoslovakia) Gene Bank: collecting, evaluation and documentation. *Hereditas* 116: 271 — 276.
- Hsam S. L. K., Kieffer R., Zeller F. J. 2001. Significance of *Aegilops tauschii* glutenin genes on bread making properties of wheat. *Cereal Chem.* 78 (5): 521 — 525.
- Hsam S. L. K., Lapochkina I. F., Zeller F. J. 2003. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 8. Gene *Pm 32* in a wheat-*Aegilops speltoides* translocation line. *Euphytica* 133: 367 — 370.
- Huguot-Robert V., Dedryver F., Röder M. S., Korzun V., Abélard P., Tanguy A. M., Jaudeau B., Jahier J. 2001. Isolation of a chromosomally engineered durum wheat line carrying the *Aegilops ventricosa Pch1* gene for resistance to eyespot. *Genome* 44: 345 — 349.
- Keller M., Karutz Ch., Schmid J. E., Stamp P., Winzeler M., Keller B., Messmer M. M. 1999. Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat x spelt population. *Theor. Appl. Genet.* 98 (6/7): 1171 — 1182.
- Kiecana I., Prażak R. 1995. Fuzarioza kłosów kozińców. *Hod. Roślin, Aklim. i Nasien.* 39 (6): 111 — 121.
- Kimber G., Feldman M. 1987. Wild Wheat: An Introduction. College of Agriculture, University of Missouri, Columbia, Special Report 353: 1 — 146.
- Knezevic D., Zenevic V., Dmitrijevic M., Petrovic S. 2000. Variability of yield components in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eucarpia XIth Meeting of the Section Biometrics in Plant Breeding. Quantitative Genetics and Breeding Methods: The way ahead. Abstracts of presentations:* 104 — 105.
- Kozub N. A., Sozinov I. A., Sozinov A. A. 2003. Recombination of gliadin genes of chromosome 1D in the common wheat hybrid carrying the introgression from *Aegilops cylindrica*. *Plant Breed.* 122: 86 — 88.
- Li W. L., Nelson J. C., Chu C. Y., Shi L. H., Huang S. H., Liu D. J. 2002. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat. *Euphytica* 125: 357 — 366.
- Luthra O. P. 1987. Genetic architecture of characters related to lodging in wheat. *Wheat Information Servis* 64: 21 — 22.
- Martin-Sanchez, J. A., Gomez-Colmenarejo M., Del Moral J., Sin E., Montes M. J., Gonzalez-Belinchon C., Lopez-Brana I., Delibes A. 2003. A new Hessian fly resistance gene (H30) transferred from the wild grass *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1248 — 1255.
- Montes M. J., López-Braña I., Romero M. D., Sin E., Andrés M. F., Martín-Sánchez J. A., Delibes A. 2003. Biochemical and genetic studies of two *Heterodera avenae* resistance genes transferred from *Aegilops ventricosa* to wheat. *Theor. Appl. Genet.* 107: 611 — 618.
- Muramatsu M. 1986. The vulgare super gene, *Q*: its universality in durum wheat and its phenotypic effects in tetraploid and hexaploid wheats. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 30 — 41.

- Nawracała J. 2004. Genetyczne podstawy hodowli pszenicy. W: „Zarys genetyki zbóż” Tom I. Jęczmień, pszenica i żyto (praca zbior., red. A. G. Górny). Wyd. IGR PAN Poznań: 181 — 327.
- Pasquini M. 1980. Disease resistance in wheat: Behaviour of *Aegilops* species with respect to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Genet. Agr. 34: 133 — 148.
- Pilch J. 1997. Performance of interspecific and intergeneric hybrids of *Triticum aestivum* L. for wheat improvements. Plant Breeding and Seed Sci. 41/1: 3 — 15.
- Pilch J. 2002. Wartość technologiczna introgresywnych form pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). Biul. IHAR 223/224: 95 — 109.
- Pilch J., Głowacz E. 1997. Międzygatunkowe i międzyrodzajowe krzyżowania jako sposób ulepszania cech kłosa w hodowli pszenicy heksaploidalnej *Triticum aestivum* L. Biul. IHAR 204: 15 — 31.
- PN-75/A-04018. Produkty rolno-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kiejdahla i przeliczanie na białko.
- Prażak R. 1992. Cechy morfologiczne gatunków rodzaju *Aegilops* oraz pszenicy ozimej odmiany Rusalka. Biul. IHAR 183: 107 — 117.
- Prażak R. 1997a. Evaluation of brown rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) infection in *Aegilops* species and *Triticum aestivum* L. cv. Gama. J. Appl. Genet. 38 B: 123 — 127.
- Prażak R. 1997b. Zastosowanie kultur *in vitro* niedojrzałych zarodków w otrzymywaniu mieszańców międzyrodzajowych *Triticum* z *Aegilops*. Zesz. Nauk. AR w Krakowie 318/50: 47 — 53.
- Prażak R. 2001. Ocena tolerancji siewek mieszańców *Aegilops ventricosa* Tausch. i *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. z *Triticum durum* Desf. i *Triticum aestivum* L. na toksyczne stężenia jonów glinu. Biul. IHAR, 218/219: 161 — 167.
- Prażak R. 2003. Ocena tolerancji mieszańców międzygatunkowych pszenicy (*Triticum* sp.) na stres solny. Biul. IHAR 230: 95 — 102.
- Prażak R. 2004. Porównanie zawartości białka w ziarnie gatunków *Aegilops* i *Triticum*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 497: 509 — 516.
- Prażak R. 2007a. Zmienność i współzależność niektórych cech ilościowych oraz zawartość białka ogółem w ziarnie mieszańców *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. i *Aegilops ventricosa* Tausch. z wybranymi gatunkami (4x, 6x) *Triticum* L. Biul. IHAR 244: 111 — 126.
- Prażak R. 2007b. Ocena zimotrwałości, wczesności i porażania przez rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego gatunków *Aegilops* w warunkach Polski wschodniej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 517: 603 — 612.
- Rajaram S. 2001. Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. Euphytica 119: 3 — 15.
- Rao M. V. P. 1972. Mapping of the compactum gene *C* on chromosome 2D of wheat. Wheat Information Service 35: 9.
- Rawat N., Tiwari V. K., Singh N., Randhawa G. S., Singh K., Chhuneja P., Dhaliwal H. S. 2009. Evaluation and utilization of *Aegilops* and wild *Triticum* species for enhancing iron and zinc content in wheat. Genet. Resour. Crop Evol. 56: 53 — 64.
- Sears E. R. 1947. The spherococcum gene in wheat. Genetics 32: 102 — 103.
- Stefanowska G. 1986. Wpływ *Triticum aestivum* L. i *Secale cereale* L. na niektóre genetyczno-hodowlane właściwości *Triticale*. Rozprawy Naukowe. Wyd. AR w Lublinie.
- Stefanowska G. 1995. Charakterystyka niektórych cech morfologicznych i plonotwórczych mieszańców *Triticum aestivum* L. z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. i z *Aegilops ventricosa* Tausch. Biul. IHAR, 194: 35 — 43.
- Stefanowska G., Prażak R., Strzembicka A., Masłowski J. 1995. Transfer genów z *Aegilops ventricosa* Tausch. i *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. do *Triticum aestivum* L. Biul. IHAR 194 : 45 — 52.
- Tarkowski Cz. 1994. Przewodnik do ćwiczeń z genetyki, hodowli roślin i nasiennictwa. Wyd. AR w Lublinie.
- Tarkowski Cz. 1995. Genetyka, hodowla roślin i nasiennictwo. Wyd. AR w Lublinie.
- Thiele A., Schumann E., Peil A., Weber W.E. 2002. Eyespot resistance in wheat x *Aegilops kotschy* backcross lines. Plant Breed. 121: 29 — 35.

- Tyrka M., Stefanowska G. 2001. Ocena zróżnicowania cech plonotwórczych mieszańców *Aegilops juvenalis* i *Aegilops ventricosa* z pszenicą. Biul. IHAR 218/219: 57 — 68.
- Węgrzyn S., Nalepa S., Pochaba L. 1979. Ogólna i swoista wartość kombinacyjna dla plonu i jego komponentów u pszenicy ozimej. Hod. Roślin Aklim. 23: 61 — 72.
- Węgrzyn S., Wojas T., Śmiałowski T. 2002. Uwarunkowania genetyczne oraz współzależność plonu i wybranych cech użytkowych pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). Biul. IHAR 223/224: 77 — 86.
- Zanetti S., Winzeler M., Keller M., Keller B., Messmer M. 2000. Genetic analysis of pre-harvest sprouting resistance in a wheat x spelt cross. Crop. Sci. 40: 1406 — 1417.

KRZYSZTOF KOWALCZYK**SYLWIA OKOŃ**Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Analiza zmienności allelicznej w *locus* *Xgwm261* w odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006

Allelic variation at the *Xgwm261* locus in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) registered in Poland in 1978–2006

Celem pracy była analiza zmienności allelicznej w *locus* *Xgwm 261* w 45 odmianach pszenicy zwyczajnej zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006. Wyizolowany DNA poddano amplifikacji z parą specyficznych starterów Wms261. Produkty rozdzielano na żelu poliakrylamidowym. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano dużą zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm261* w badanych odmianach. Najczęściej obserwowano fragment DNA o wielkości 174pz. Zaobserwowano również fragmenty o wielkości 165 i 198 pz. Fragment o wielkości 192 pz sprzężony z genem *Rht8* stwierdzono w 7 badanych odmianach pszenicy zwyczajnej: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada i Saga.

Słowa kluczowe: pszenica zwyczajna, SSR, zmienność alleliczna, gen karłowatości *Rht8*

The aim of this study was an analysis of allelic variation in *Xgwm 261* locus, in 45 wheat cultivars registered in Poland in the years 1978–2006. After isolation, DNA was amplified with two WMS261 primers. DNA fragments were separated on polyacrylamide gel. The analysis showed a high allelic variation in *Xgwm 261* locus in these cultivars. A 174 bp DNA fragment was observed most frequently 165bp and 198bp DNA fragments were also observed. A 192 bp fragment linked with *Rht8* dwarfing gene was observed in seven cultivars: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada and Saga.

Key words: common wheat, SSR, allelic variation, *Rht8* dwarfing gene

WSTĘP

Jednym z głównych czynników ograniczających plonowanie pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest wyleganie, dlatego w hodowli poświęca się dużo uwagi na wyselekcjonowanie form krótkosłomych, a jednocześnie o wysokim potencjale plonowania. Jednym ze sposobów uzyskania roślin odpornych na wyleganie jest wprowadzanie

genów karłowatości (Gale i Youssefian, 1985; Worland i in., 1990; Kowalczyk, 1997). W celu skrócenia źdźbła w pszenicy zwyczajnej najczęściej wykorzystuje się trzy geny karłowatości: *Rht-B1b*, *Rht-D1b* i *Rht8*. Geny *Rht-B1b*, *Rht-D1b* pochodzą od odmiany Norin 10. Geny te wpływają na zwiększenie plonu roślin przy jednoczesnym skróceniu źdźbła o około 20% (Gale i Youssefian, 1985; Worland, 1987; Börner i in., 1993; Kowalczyk i in., 1997). Są one niewrażliwe na egzogeny kwas giberelinowy, dzięki czemu genotypy zawierające te geny są łatwe do zidentyfikowania (Gale i Gregory, 1977; Gale i Youssefian, 1985). Gen *Rht8* pochodzi od japońskiej odmiany Akakomugi i zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2D (Korzun i in., 1998). Powoduje on skrócenie źdźbła o około 10% (Jost i Jost, 1989; Worland i in., 1990). Gen ten jest wrażliwy na egzogeny kwas giberelinowy i nie można go zidentyfikować za pomocą GA₃.

Korzun i in. (1998) zidentyfikowali mikrosatelitarny marker WMS261 co-segregujący z genem *Rht8*. Autorzy wykazali obecność fragmentu DNA o wielkości 192 pz w liniach zawierających gen *Rht8*. Ponadto autorzy stwierdzili w *locus Xgwm261* produkty o wielkości 174 pz, których obecność nie była powiązana z redukcją wysokości roślin oraz produkty o wielkości 165 pz, których obecność skorelowana była ze wzrostem wysokości o 3–4 cm. Dalsze badania zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* wykonane w różnych ośrodkach na świecie wykazały obecność szeregu polimorficznych produktów o zróżnicowanej wielkości, (Worland i in., 2001; Ahmad i Sorrells, 2002; Schmidt i in., 2004; Liu i in., 2005).

W hodowli pszenicy zwyczajnej coraz częściej wykorzystuje się markery DNA do selekcji roślin. Identyfikacja genu *Rht8* za pomocą markerów mikrosatelitarnych może w znacznym stopniu ułatwić hodowcom wybór pożądaných form wyjściowych do krzyżowań.

Celem pracy była analiza zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* w odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 45 odmian pszenicy zwyczajnej, w których do tej pory nie określono zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* (tab. 1). DNA badanych odmian wyizolowano z liści dziesięciodniowych siewek metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Stężenie wyizolowanego DNA określono za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym przez porównanie z molekularnym wzorcem masy MassRuler™ DNA (Fermentas, Litwa). Następnie próbki rozcieńczono do stężenia DNA 20 ng/μl.

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T1 Biometra w 20μl mieszaniny o następującym składzie: 1 × PCR bufor (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20); 1,5 mM MgCl₂; 200 μM każdego dNTP; 250 nM każdego startera, 60 ng genomowego DNA, 1U *Taq* Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano startery SSR (*Simple Sequence Repeat*) WMS 261 5'-CTCCCTGTACGCCTAAGGC-3' i 5'-CTCGCGCTACTAGCCATTG-3' (Korzun i in., 1998). Amplifikacja DNA przebiegała

według następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja 1 min w 90°C, 45 cykli: 1 min -90°C, 1 min -55°C, 2 min -72°C z końcową inkubacją przez 10 min w 72°C.

Rozdział produktów prowadzono na denaturującym 6% żelu poliakrylamidowym w buforze TBE. Próbkę denaturowano w 95°C, a następnie rozdzielano przez 1–2 godziny przy 50 W. Zastosowano marker wielkości GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas).

Przed barwieniem żele utrwalano w 10% kwasie octowym, płukano w wodzie destylowanej, wysycano roztworem azotanu srebra z formaldehydem, wywoływano w roztworze węglanu sodu z formaldehydem i tiosiarczanem sodu oraz ponownie utrwalano w 10% kwasie octowym (Chalhoub i in., 1997). Po wysuszeniu otrzymane wzory prążkowe analizowano na podświetlaczu i fotografowano aparatem cyfrowym w systemie PoyDoc.

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 45 analizowanych odmian pszenicy zwyczajnej najczęściej obserwowano produkt o wielkości 174 pz. Produkt ten stwierdzono w 27 badanych odmianach. Ponadto zaobserwowano obecność fragmentów DNA o wielkości 165 pz w 6 odmianach, a o wielkości 198 pz w 5 analizowanych odmianach. Produkt wielkości 192pz wskazujący na obecność genu karłowatości *Rht8* zaobserwowano w 7 zrejonych w Polsce odmianach pszenicy zwyczajnej (tab. 1). Analizy pochodzenia tych odmian wykazały obecność francuskiej odmiany Etoile de Chiosy w rodowodach odmian Almari, Begra, Gama, Rada i Saga. Jednakże jako bezpośredni rodzic odmiana ta występuje jedynie w rodowodzie odmiany Saga. Rodowody odmian Griwa i Monsun są nieznane (tab. 2). Jednym z komponentów rodzicielskich Etoile de Chiosy była odmiana Ardito, która zawiera gen *Rht8* wprowadzony od Akakomugi. Na podstawie analizy rodowodów stwierdzono, że gen *Rht8* zawarty w odmianach Almari, Begra, Gama, Rada i Saga pochodzi od japońskiej odmiany Akakomugi.

Tabela 1

Zmienność alleliczna w locus *Xgwm 261* odmian pszenicy zwyczajnej
Allelic variation in *Xgwm 261* locus in common wheat cultivars

Odmiana Cultivar	Długość fragmentu DNA (pary zasad) DNA fragment size (base pairs)				Charakter rozwoju Growth habit	Rok rejestracji Registration year
	165	174	192	198		
Saga			X		O	1978
Gama			X		O	1979
Kamila		X			O	1979
Modra		X			O	1979
Zeta		X			O	1979
Asta				X	O	1982
Begra			X		O	1982
Beta		X			O	1982
Emika		X			O	1982
Liwillla	X				O	1982
Panda				X	O	1982

c.d. Tabela 1

Odmiana Cultivar	Długość fragmentu DNA (pary zasad) DNA fragment size (base pairs)				Charakter rozwoju Growth habit	Rok rejestracji Registration year
	165	174	192	198		
Rota		X			O	1982
Salwa		X			O	1982
Polanka		X			O	1984
Weneda		X			O	1984
Lanca		X			O	1985
Alba				X	O	1986
Niwa		X			O	1987
Parada		X			O	1987
Oda		X			O	1988
Rada			X		O	1988
Almari			X		O	1989
Nika		X			O	1989
Arda		X			O	1990
Lama		X			O	1990
Rosa		X			O	1990
Kaja		X			O	1997
Wanda		X			O	1997
Mobela	X				O	1998
Rysa		X			O	1998
Griwa			X		J	2001
Zebra	X				J	2001
Flair		X			O	2002
Triso				X	J	2002
Bryza				X	J	2003
Rapsodia	X				O	2003
Rubens		X			O	2003
Slade	X				O	2003
Trend	X				O	2003
Dorota		X			O	2004
Monsum			X		J	2004
Alcazar		X			O	2006
Anthus		X			O	2006
Boomer		X			O	2006
Ludwig		X			O	2006

X — Oznacza obecność fragmentu DNA

X — DNA fragment is present

Tabela 2

Rodowody odmian pszenicy zwyczajnej zawierających gen karłowatości *Rht8*
Pedigree of common wheat cultivars with *Rht8* dwarfing gene

Odmiana Cultivar	Rodowody Pedigree
Almari	Maris Huntsman × Alcedo
Begra	Grana × Bezostaya-1
Gama	Mironovskaya-808 × Luna
Griwa	Rodowód nieznan / Pedigree unknown
Monsum	Rodowód nieznan / Pedigree unknown
Rada	Kranich × C 568/70) × (Luna × Mironowskaja 808)] × Maris Huntsman
Saga	Etoile de Choisy × Mironowskaja 808) × Perdix

Ahmad i Sorrells (2002) wykorzystali startery WMS 261 do analizy zmienności allelicznej 71 odmian pszenicy pochodzących z 13 krajów. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy wykazali, że wśród badanych odmian najczęściej występowały fragmenty wielkości 165 i 174 pz. Częstość występowania produktu 192 pz sprzężonego z genem *Rht8* wynosiła 6%. Ponadto autorzy stwierdzili cztery nowe allele w *locus* *Xgwm261* obecne w odmianach pochodzących ze Stanów Zjednoczonych i Nowej Zelandii. Worland i wsp. (2001) analizowali za pomocą metody SSR zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm261* w 800 odmianach pszenicy zwyczajnej pochodzących z 20 krajów. Autorzy stwierdzili, że wśród badanych odmian najczęściej występowały allele o wielkości 165 pz i 174 pz. Fragment DNA o wielkości 192 pz sprzężony z genem karłowatości *Rht8* występował w odmianach pochodzących z Europy południowej. Chebotar i wsp. (2001) analizowali zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm261* w 23 ukraińskich odmianach pszenicy zwyczajnej. Uzyskane wyniki wykazały, że w większości badanych odmian obecny był allel o wielkości 192pz. Autorzy obserwowali również fragmenty wielkości 174, 165, i 206 pz. Liu i wsp. (2005) badali 408 chińskich odmian pszenicy zwyczajnej. Zidentyfikowali oni 13 różnych alleli występujących w *locus* *Xgwm261*. Allel o wielkości 192pz skorelowany z genem karłowatości *Rht8* występował w wielu chińskich odmianach. Marker WMS261 został również wykorzystany do analizy zmienności allelicznej polskich odmian pszenicy zwyczajnej. Kowalczyk (2006) analizował odmiany pszenicy zarejestrowane w Polsce do roku 1975. Autor stwierdził dużą zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm 261* i zidentyfikował szereg polimorficznych produktów. Fragment o wielkości 192pz sprzężony z genem karłowatości *Rht8* zidentyfikował tylko w trzech badanych odmianach pszenicy: Aria, Grana i Luna.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych analiz SSR wykazano dużą zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm261* w 45 odmianach pszenicy zwyczajnej zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006.
2. W analizowanych odmianach w *locus* *Xgwm261* stwierdzono obecność produktów PCR wielkości 165, 174, 192 i 198pz.
3. Produkty PCR wielkości 192pz sprzężone z genem karłowatości *Rht8* stwierdzono w odmianach: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada, Saga.

LITERATURA

- Ahmad M., Sorrells M. E. 2002. Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing gene in wheat. *Euphytica* 123: 235 — 240.
- Börner A., Worland A. J., Plaschke J., Schumann E., Law C. N. 1993. Pleiotropic effects of genes for reduced height (*Rht*) and day-length insensitivity (*Ppd*) on yield and its components for wheat grown in middle Europe. *Plant Breed.* 111: 204 — 216.
- Chalhoub B. A., Thibault S., Laucou V., Rameau C., Höfte H., Cousin R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques* 22: 216 — 220.
- Chebotar S. V., Korzun V. N., Sivolap Y. M. 2001. Allele distribution at *locus* WMS261 marking the dwarfing gene *Rht8* in common wheat cultivars of southern Ukraine. *Rus. J. Genet.* 37: 894 — 989.

- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Gale M. D., Gregory R. S. 1977. A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica* 26: 733 — 738.
- Gale M. D., Youssefian S. 1985. Dwarfing genes in wheat. In: *Progress in Plant Breeding*. I' Ed. G. E. Russell, Butterworths, London 1 — 35.
- Jost M., Jost M. 1989. Pedigrees of 142 Yugoslav winter wheat cultivars released from 1967 till 1986. *Podravka* (7) 1: 19 — 27.
- Korzun V., Röder M., Ganal M. W., Worland A. J., Law C. N. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat. (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 1104 — 1109.
- Kowalczyk K. 1997. Historia i wykorzystanie w hodowli pszenicy genów karłowatości pochodzących od Norin 10. *Post. Nauk Rol.* 1/97: 63 — 71.
- Kowalczyk K. 2006. Zmienność alleliczna w *locus Xgwm 261* w polskich odmianach pszenicy zwyczajnej zrejzonizowanych do 1975 roku. *Acta Agrophisica* 8 (2):415 — 421.
- Kowalczyk K., Worland A. J., Miazga D. 1997. Pleiotropic effects of *Rht1*, *Rht2*, and *Rht3* genes in wheat isogenic lines Maris Huntsman and Maris Widgeon. *J. Genet. & Breed.* 51: 129 — 135.
- Liu Y., Liu D., Zhang H., Wang J., Sun J., Guo X. 2005. Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the XGWM261 *locus* in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 145: 103 — 122.
- Schmidt A.L., Gale K.R., Ellis M.H., Giffard P.M. 2004. Sequence variation at a microsatellite locus (XGWM261) in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Euphytica* 135:239 — 246.
- Worland A. J. 1987. Co-operative studies on the genetics of height in European wheat varieties. *EWAC Newsletter*, Hungary 69 — 82.
- Worland A. J., Law C. N., Petrović S. 1990. Height reducing genes and their importance to Yugoslavian winter wheat varieties. *Zbornik* 38: 245 — 257.
- Worland A.J., Sayers E.J., Korzun V. 2001. Allelic variation at the dwarfing gene *Rht8* locus and its significance in international breeding programmes. *Euphytica* 119: 155 — 159.

JAN MASŁOWSKI**ZBIGNIEW SEGIT**Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Tolerancyjność wybranych linii *Triticum durum* Desf. na toksyczne działanie jonów glinu Komunikat

The tolerance of selected *Triticum durum* Desf. lines to toxic effects of aluminum ions Short communication

Materiał do badań stanowiło 12 linii *T. durum* oraz jedna odmiana pszenicy zwyczajnej — Parabola. Wzorcem była brazylijska odmiana BH 1146. Testowanie laboratoryjne przeprowadzono metodą stresu glinowego w kulturze wodnej. Czterodniowe siewki poddano działaniu glinu o stężeniach 148, 296 i 444 μM przez 24 h w pożywce standardowej o pH = 4,0 i temperaturze 25°C. Stwierdzono istotne zróżnicowanie badanych linii ze względu na długość odrostu jak i masę korzeni. Wszystkie linie *T. durum* wykazały istotnie niższą tolerancję na glin w porównaniu z odmianą Parabola. Tolerancyjność BH 1146 na wszystkie stężenia wynosiła 100%. Stężenie glinu 148 μM było progiem tolerancji dla czterech linii pszenicy twardej. Dwie linie wykazały tolerancyjność na stężenie glinu wynoszące 444 μM .

Słowa kluczowe: toksyczność glinu, tolerancyjność, *Triticum durum*

The study material consisted of 12 *Triticum durum* lines and one common wheat cultivar Parabola. Brazilian cultivar BH 1146 was used as a standard. In laboratory tests the aluminum stress method in water cultures was applied. Four-day seedlings were exposed to the influence of aluminum in standard medium of pH 4.0 at concentrations of 148, 296, and 444 μM for 24 hrs at 25°C. The examined *T. durum* lines significantly differed in the length of offshoots and the weight of roots. All the lines showed considerably lower tolerance towards aluminum as compared to cv. Parabola. A level of tolerance of BH 1146 to all aluminum concentrations applied reached 100%. The concentration of 148 μM was found to be tolerance threshold for four durum wheat lines. Two lines manifested the tolerance to aluminum at concentration as high as 444 μM .

Key words: aluminum toxicity, tolerance, *Triticum durum*

WSTĘP

Glin uważany jest obecnie za główny czynnik limitujący plonowanie roślin na kwaśnych glebach mineralnych. W wyniku przyrodniczych i antropogenicznych przyczyn zakwaszenia ponad 60% gleb Polski wykazuje odczyn kwaśny lub silnie kwaśny (Filipek

i Dechnik, 1995). Proces zakwaszania gleb w Polsce ma charakter postępujący i niejednokrotnie dotyczy głębszych warstw gleby. Poprawienie właściwości gleb silnie zakwaszonych można osiągnąć stosując odpowiednie zabiegi mające na celu podniesienie pH np. wapnowanie lub stosowanie odpowiednich form nawozów mineralnych. Z uwagi na minimalizację kosztów uzdatniania gleb stresotwórczych uważa się, że tańsze i łatwiejsze powinno być przystosowanie roślin do gleby niż odwrotnie. Prowadzone od szeregu lat badania nad wpływem glinu na rośliny, pozwoliły dość szczegółowo określić zmiany anatomiczne, morfologiczne i fizjologiczne zachodzące przede wszystkim w korzeniach, a wpływające pośrednio na wzrost i rozwój całej rośliny (Szatanik-Kloc, 2002). Konieczne są badania dotyczące sposobu dziedziczenia tolerancji na glin, jak również opracowywanie programów hodowlanych odmian o podwyższonej tolerancyjności.

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu tolerancji na glin kilkunastu linii jarej pszenicy twardej.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano 12 linii pszenicy twardej (*T. durum*) oraz jedną odmianę pszenicy zwyczajnej — Parabola. Wzorcem była brazylijska odmiana pszenicy jarej — BH 1146 o wysokiej tolerancyjności na toksyczne działanie glinu, powszechnie używana w badaniach genetycznych, jak również w hodowli (Riede i Anderson, 1996; De Sousa, 1998). Testowanie laboratoryjne przeprowadzono metodą stresu glinowego w kulturze wodnej opracowaną przez Anioła (1981). Polega ona na pomiarze odrostu korzeni głównych po 24 godzinny stresie glinowym i wybarwieniu korzeni 0,1% roztworem Eriochromu cyjaniny R przez 10 minut. Barwnik ten tworzy z glinem połączenie o barwie fioletowo-brązowej i nie powoduje uszkodzenia siewek. Glin dodawano do pożywki w formie chlorku glinu w stężeniach 148, 296 i 444 μM .

Podstawą do oceny tolerancyjności siewek (3 powtórzenia po 100 siewek) na dane stężenie był odrost korzeni poza strefę absorpcji glinu (reakcja barwna). W czasie trwania testu utrzymywano pH pożywki na poziomie 4,0 i stałą temperaturę wynoszącą 2°C.

Określono procent siewek o korzeniach odrastających, zmierzono długość odrostu korzeni głównych oraz oznaczono masę korzeni. Wykonano analizę wariancji i obliczono istotność różnic na poziomie $p = 0,05$.

WYNIKI

Niekorzystny wpływ glinu na rośliny przejawia się przede wszystkim w zmianach morfologii systemu korzeniowego. Zniekształcenia korzeni objawiają się skręcaniem, zgrubieniem a wzrost elongacyjny jest spowolniony lub całkowicie zahamowany. Przy długotrwałym stresie glinowym wierzchołki wzrostu korzeni brunatnieją, a z czasem zamierają (Foy i in., 1978; Carver i Ownby, 1995; Czembor i Anioł, 2004).

Przedstawione w tabeli 1 wyniki wskazują na istotne zróżnicowanie badanych linii ze względu na długość odrostu korzeni głównych. Średni odrost przy stężeniu glinu wynoszącym 148 μM wahał się od 3,2 mm do 10,7 mm. Wszystkie linie pszenicy twardej

miały istotnie niższy odrost w porównaniu do wzorca tolerancyjności BH 1146. Dwie linie LGR 896/23 i LGR 900/3a odznaczały się odrostem na poziomie odmiany Parabola. W stężeniu glinu 296 μM średni odrost korzeni badanych linii wahał się od 1,8 mm do 5,6 mm i był istotnie niższy zarówno od odmiany Parabola jak i wzorca BH 1146. U czterech linii nie zaobserwowano w ogóle odrostów korzeni. W stężeniu glinu wynoszącym 444 μM odrost korzeni głównych stwierdzono tylko u siewek linii LGR 896/23 i LGR 900/3a. W badaniach Wiewióry (1999) dotyczących tolerancji polskich odmian i rodów jarej pszenicy zwyczajnej odrost korzeni głównych przy stężeniu 296 μM wahał się od 0 do 12,8 mm, zaś przy stężeniu 444 μM od 3,0 mm do 4,1 mm. Stężenie 444 μM wytrzymały tylko 2 rody na 28 badanych obiektów.

Średnia masa korzeni (tab. 1) również istotnie różnicowała badane linie przy czym masa korzeni siewek pszenicy twardej była istotnie niższa od masy korzeni odmiany Parabola i BH 1146 w obu stężeniach glinu. Wyjątek stanowi linia LGR 626b/99/4 przy stężeniu glinu 296 μM , mająca przy istotnie niższym odroście korzeni w porównaniu z odmianą Parabola, wyższą (wprawdzie nieistotną) masę korzeni. Nie stwierdzono prostej zależności między wielkością odrostu korzeni głównych a masą korzeni.

Tabela 1

Odrost i masa korzeni głównych w stężeniach glinu 148, 296 i 444 μM
Regrowth and weight of primary roots at 148, 296 and 444 μM aluminum concentrations

Linia, odmiana Line, cultivar	Odrost korzeni głównych (mm) Primary roots regrowth (mm)			Masa korzeni (g) Root weight (g)		
	148	296	444	148	296	444
LGR 896/64a	7,8	5,4	0,0	2,13	1,20	—
LGR 896/23	10,7	5,6	4,0	2,17	1,23	0,90
LGR 896/62a	7,4	4,8	0,0	2,40	0,97	—
LGR 1359/8	7,5	4,9	0,0	2,07	0,93	—
LGR 1359/33	7,3	0,0	0,0	2,27	0,83	—
LGR 900/3a	9,7	5,0	2,8	1,67	1,07	0,60
LGR 626b/99/1	4,2	2,2	0,0	1,80	0,90	—
LGR 626b/99/4	5,4	2,3	0,0	2,40	2,03	—
LGR 626b/99/3	4,3	0,0	0,0	2,27	1,00	—
LGR 520/99/4	4,6	0,0	0,0	2,80	1,13	—
LGR 635/99/10	4,4	1,8	0,0	2,33	0,87	—
LGR 631/99/4	3,2	0,0	0,0	3,00	1,17	—
Parabola	10,8	7,0	5,1	3,50	1,93	1,37
BH 1146	12,4	8,4	8,0	4,17	3,60	3,26
NIR _{0,05}	1,4	1,1		0,29	0,26	
LSD _{0,05}						

Średni procent siewek tolerancyjnych przy stężeniu glinu wynoszącym 148 μM wahał się od 8,0% dla linii LGR626b/99/3 do 55,4% dla linii LGR 896/23. Nieco niższy procent siewek tolerancyjnych w tym stężeniu stwierdzono dla linii LGR 900/3a i LGR 896/64a – odpowiednio 50,1% i 49,8% (tab. 2). Wszystkie linie *T.durum* wykazały istotnie niższą tolerancję w porównaniu z odmianą Parabola. Zgodnie z przewidywaniami tolerancja BH 1146 na w/w stężenie jak również 2 i 3-krotnie wyższe wynosiła 100%. Stężenie 148 μM było progiem tolerancji dla czterech badanych linii pszenicy twardej.

Tabela 2

Procentowy udział siewek tolerancyjnych na toksyczne działanie glinu
Proportion of seedlings showing tolerance to aluminum

Linia, odmiana Line, cultivar	Stężenie jonów glinu Aluminium concentration μM		
	148	296	444
LGR 896/64a	49,8	43,8	0,0
LGR 896/23	55,4	45,4	2,9
LGR 896/62a	21,3	17,2	0,0
LGR 1359/8	15,7	7,8	0,0
LGR 1359/33	9,8	0,0	0,0
LGR 900/3a	50,1	39,6	1,8
LGR 626b/99/1	17,8	2,0	0,0
LGR 626b/99/4	25,6	1,6	0,0
LGR 626b/99/3	8,0	0,0	0,0
LGR 520/99/4	11,7	0,0	0,0
LGR 635/99/10	18,0	1,9	0,0
LGR 631/99/4	14,3	0,0	0,0
Parabola	67,5	51,3	3,6
BH 1146	100,0	100,0	100,0
NIR _{0,05}	5,1	1,4	
LSD _{0,05}			

Dla testu w stężeniu 296 μM średni procent siewek tolerancyjnych ocenianych linii wahał się od 1,6% do 45,4%, jednakże wartości te były istotnie niższe w porównaniu do pszenicy zwyczajnej. Z testowanych przez Wiewiórę (1999) odmian i rodów pszenicy jarej, 25% obiektów wykazało tolerancję na stężenie glinu wynoszące 296 μM .

Pszenica jak wskazują badania innych autorów a w szczególności pszenica twarda jest gatunkiem o dużej wrażliwości na działanie jonów glinu (Slootmaker, 1974; Anioł, 1989; Ślaski, 1993; Bona i in., 1994). Interesujące wydają się być linie LGR 896/23 i LGR 900/3a, których tolerancyjność w stężeniu glinu 444 μM wynosiła odpowiednio 2,9% i 1,8% przy 3,6% dla odmiany Parabola. Wymienione linie odznaczają się ponadto stosunkowo wysokim plonem ziarna, jak i odpowiednimi właściwościami jakościowymi (praca w druku). Wyodrębnienie form tolerancyjnych na warunki stresowe daje możliwość wykorzystania ich jako komponenty do krzyżowań w hodowli odmian przystosowanych do uprawy w siedliskach stresotwórczych.

WNIOSKI

1. Oceniane linie *Triticum durum* wykazały niską tolerancyjność na toksyczne działanie jonów glinu.
2. Linie LGR 896/23 i LGR 900/3a charakteryzujące się stosunkowo wysoką tolerancją mogą stanowić bardzo dobry materiał do dalszych prac genetyczno-hodowlanych.

LITERATURA

- Anioł A. 1981. Metody określania tolerancyjności zbóż na toksyczne działanie jonów glinu. Biul. IHAR 243: 3 — 14.
 Anioł A. 1989. Podstawy hodowli zbóż tolerancyjnych na niskie pH gleby. Biul. IHAR 171/172: 215 — 220.

- Bona L., Baligar V. C., Carver B. F. 1994. Testing cereals for acid soil tolerance. *Gen. Pol.* 35 B: 95 — 104.
- Carver B. F., Ownby J. D. 1995. Acid soil tolerance in wheat. *Adv. Agron.* 54:117 — 173.
- Czembor H. J., Anioł A. 2004. Wytwarzanie materiałów wyjściowych pszenicy ozimej tolerancyjnych na toksyczne działanie glinu. *Biul. IHAR* 231: 29 — 36.
- De Sousa C. N. A. 1998. Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminum toxicity in acid soils. *Plant Breed.* 117: 217 — 221.
- Filipek T., Dechnik I. 1995. Glin wymienny jako wskaźnik żyzności gleb. *Zesz. Probl. PNR* 421a: 67 — 76.
- Foy C. D., Chanem R. L., White M. C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29 : 511 — 566.
- Riede C. R., Anderson J. A. 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 36: 905 — 909.
- Slootmaker L. A. 1974. Tolerance to high soil acidity in wheat related species, rye and triticale. *Euphytica* 23: 505 — 513.
- Szatanik-Kloc A. 2002. Zmiany wybranych właściwości fizykochemicznych korzeni roślin pod wpływem pH i jonów glinu. *Inż. Rol.* 5, 2: 433 — 441.
- Ślaski J. 1993. Genetyczne aspekty hodowli zbóż tolerancyjnych na glin. *Biul. IHAR* 187: 29 — 35.
- Wiewióra M. 1999. Tolerancyjność polskich odmian i rodów pszenicy jarej na toksyczne działanie glinu. *Biul. IHAR* 212: 59 — 64.

TADEUSZ ADAMSKI¹**MARIA SURMA**¹**ALEKSANDRA PONITKA**¹**AURELIA ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA**¹**KAROLINA KRYSTKOWIAK**¹**ANETTA KUCZYŃSKA**¹**HANNA PUDELSKA**¹**KRZYSZTOF RUBRYCKI**²**RENETA TRZECIAK**¹**JOLANTA WOŹNA**¹¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu² Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o. o. w Tulcach

Efektywność uzyskiwania haploidów pszenicy metodą kultur pylnikowych oraz krzyżowania z kukurydzą

Production efficiency of wheat haploids by anther culture and wheat × maize crosses

Celem pracy było porównanie efektywności uzyskiwania haploidów pszenicy metodą kultur pylnikowych oraz poprzez krzyżowanie z kukurydzą. Materiałem badawczym były mieszańce F₁ pszenicy ozimej z 48 kombinacji krzyżówkowych. Oceniano efektywność uzyskiwania zielonych roślin w odniesieniu do liczby wyłożonych pylników oraz liczby zapyłonych kwiatków. Stwierdzono wyraźne różnice w efektywności otrzymywania roślin w zależności od zastosowanej metody i genotypu. Współczynnik korelacji między efektywnością otrzymywania form haploidanych dwiema zastosowanymi metodami był nieistotny ($r = -0,036$). Wykorzystanie równolegle dwóch metod haploidyzacji pozwoliło otrzymać rośliny z 89,6% badanych genotypów.

Słowa kluczowe: androgeneza, krzyżowanie oddalone, otrzymywanie haploidów, pszenica ozima

Two methods of wheat haploid production - anther culture and wheat × maize crosses were compared. Material for the study covered F₁ hybrids of winter wheat from 48 cross combinations. Efficiency of green plant regeneration was assessed in relation to anthers plated and florets pollinated. Significant differences in efficiency of wheat plant production depending on the method and plant genotype used were found. The coefficient of correlation between the effectiveness of applied methods was very low and not significant ($r = -0.036$). The parallel application of the two methods for haploid production made possible to obtain plants from 89.6% of the genotypes studied.

Key words: androgenesis, haploid production, wheat × maize crosses, winter wheat

WSTĘP

Techniki haploidyzacji roślin są już od przeszło 30 lat z powodzeniem wykorzystywane zarówno w badaniach podstawowych, jak i pracach hodowlanych. Otrzymanie form haploidalnych, a następnie podwojenie liczby chromosomów u haploidów pozwala uzyskać w ciągu jednego pokolenia formy całkowicie homozygotyczne (linie podwojonych haploidów). Haploidy pszenicy na skalę komercyjną otrzymuje się poprzez eliminację chromosomów zachodzącą po skrzyżowaniu pszenicy z kukurydzą (Barclay, 1975; Laurie i Bennett, 1988, 1989; Wędzony i in. 1996; Krystkowiak i in., 2004) lub poprzez androgenezę (Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 1996; Barnabás i in., 2001; Xynias i in., 2001; Redha i Talaat, 2008).

W wyniku zapylenia pszenicy pyłkiem kukurydzy uzyskuje się zarodek mieszańcowy, jednak podczas kolejnych podziałów mitotycznych komórek eliminowany jest selektywnie genom kukurydzy, co w konsekwencji prowadzi do powstania formy haploidalnej pszenicy. Ze względu na postępującą degenerację bielma, konieczne jest wyizolowanie zarodka w okresie 14–18 dni po zapyleniu i przeniesienie go na pożywkę celem uzyskania w warunkach *in vitro* ukorzonej rośliny. Wszystkie otrzymane tą metodą rośliny są zielone, nie ma zmienności w liczbie chromosomów wynikającej z zastosowania kultury *in vitro*. Ponadto nie występują tzw. genotypy odporne, z których nie można uzyskać form haploidalnych (co często ma miejsce w metodzie kultur pylnikowych). Na efektywność uzyskiwania roślin haploidalnych tą techniką istotny wpływ mają zarówno czynniki abiotyczne (pożywka, warunki wzrostu roślin donorowych, technika kastrowania itp.) jak i genotyp roślin (Suenaga, 1994; Lei i in., 1996; Krystkowiak i in., 2004).

W procesie androgenезы następuje zahamowanie normalnego rozwoju mikrospor, które w kulturach *in vitro* zostają pobudzone do rozwoju w struktury wielokomórkowe (embrioidy) i poprzez androgeniczne zarodki lub kalus różnicują się rośliny haploidalne lub spontanicznie podwojone haploidy. Do indukcji androgenезы wykorzystuje się kultury pylnikowe lub kultury izolowanych mikrospor, które stwarzają możliwość regeneracji dużej liczby haploidalnych roślin z jednego pylnika. Uzyskiwanie haploidów jest procesem złożonym, uzależnionym od wielu czynników, między innymi stanu fizjologicznego rośliny, z której pobierane są pylniki, sposobu traktowania kłosów, stadium rozwojowego pyłku, komponentów pożywek indukcyjnych i regeneracyjnych (różniących się zawartością i stężeniem mikro- i makroelementów, substancji wzrostowych, witamin i cukrów), warunków fizycznych hodowli pylników jak temperatura, długość fotoperiodu i intensywność oświetlenia (Ghaemi i in., 1993; Karsai i in., 1994; Kang i in., 2003).

Celem badań było porównanie efektywności otrzymywania form haploidalnych pszenicy ozimej z wybranych mieszańców F₁ metodą krzyżowania z kukurydzą oraz metodą kultur pylnikowych. Dokonano także ich oceny pod względem parametrów związanych z efektywnością uzyskiwania roślin.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były mieszańce pokolenia F_1 pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) uzyskane w wyniku krzyżowań prostych i złożonych odmian oraz zaawansowanych rodów (łącznie 48 kombinacji krzyżówkowych). Mieszańce pochodziły z HR DANKO sp. z o.o. (CHD), HR Strzelce sp. z o.o. (STH), HR Smolice sp. z o.o. (SM), MHR Polanowice sp. z o.o. (P), Poznańskiej Hodowli Roślin Oddz. Antoniny (AND), HRR Nasiona Kobierzyc sp. z o.o. (K). Przeznaczone do badań rośliny jarowizowano w okresie zimowym w warunkach polowych. Wiosną rośliny przesadzano do doniczek w szklarni. W prowadzonych pracach nad uzyskaniem form homozygotycznych poprzez krzyżowanie pszenicy z kukurydzą i metodą kultur pylnikowych, korzystano z roślin donorowych wprowadzanych w tych samych warunkach środowiskowych.

Metoda krzyżowania pszenicy z kukurydzą

Materiał do badań stanowiły mieszańce F_1 z 35 kombinacji krzyżówkowych. Stosowano standardową procedurę otrzymywania form haploidalnych pszenicy drogą krzyżowań z kukurydzą (Laurie i Bennett, 1988). Pyłkiem kukurydzy odmiany Waza zapylano od 40 do 60 kłosów z każdej kombinacji krzyżówkowej. Kłosa po zapyleniu traktowano roztworem 2,4-D zgodnie z procedurą opisaną w pracy Krystkowiak i wsp. (2004). Zarodki izolowano na pożywkę B5 (Gamborg i in., 1968) po 15–18 dniach od zapylenia.

Metoda kultur pylnikowych

Z roślin pokolenia F_1 z 33 kombinacji krzyżówkowych rosnących w szklarni ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki w stadium jednojądrowych ziaren pyłku. Kłosa umieszczano przez 7 dni w roztworze inkubacyjnym zawierającym mikro- i makroelementy wg pożywki N6 (Chu i in., 1975) z dodatkiem 2 mg l^{-1} 2,4-D, w temperaturze 4°C . W sterylnych warunkach izolowano po około 1500 pylników z każdego genotypu i wykładano na pożywkę PII (Chuang i in., 1978) indukującą proces androgenezy (po około 200 pylników na szalkę o średnicy 6 cm). Kultury pylnikowe inkubowano w termostacie, w temperaturze 28°C . Po miesiącu androgeniczne struktury przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 (Zhuang i Xu, 1983) zawierającą $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ KIN + $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Dalszą hodowlę prowadzono w temperaturze 22°C , przy oświetleniu 4000 Lx, przez 12 godzin na dobę w celu zaindukowania organogenezy. Zielone, ukorzenione w warunkach *in vitro* roślinki wysadzano do ziemi i aklimatyzowano do naturalnych warunków.

Efektywność uzyskiwania roślin z wykorzystaniem kultur pylnikowych i krzyżowania z kukurydzą porównano dla 20 wybranych mieszańców, które stanowiły wspólny dla obu metod materiał badawczy. W metodzie krzyżowania pszenicy z kukurydzą oceniano stosunek zarodków oraz roślin haploidalnych do liczby zapylnych kwiatków, natomiast w metodzie kultur pylnikowych stosunek androgenicznych struktur i zielonych roślin do liczby wyłożonych pylników.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 podano liczbę kwiatków zapylnych pyłkiem kukurydzy oraz liczbę zarodków i roślin haploidalnych uzyskanych z każdej kombinacji krzyżówkowej. Z zapylnych 59221

kwiatków otrzymano 38000 rozrośniętych załączni, z których wyizolowano ponad 5800 zarodków. Rośliny uzyskano z każdej kombinacji krzyżówkowej, łącznie 1121 haploidów.

Tabela 1

Rezultaty krzyżowania badanych mieszańców pszenicy z kukurydzą
Effects in crosses between wheat hybrids and maize

Genotyp Genotype	Liczba zapylnych kwiatków Pollinated florets	Liczba zarodków Embryos (no.)	Liczba otrzymanych roślin haploidalnych Haploid plants (no.)	Liczba roślin haploidalnych /100 zarodków Haploids/100 embryos	Liczba roślin haploidalnych /100 kwiatków Haploids/ 100 florets pollinated
CHD 4047	680	38	16	42,1	2,3
CHD 4070	1062	89	12	13,5	1,1
CHD 4103	754	69	12	17,4	1,6
CHD 4143	1676	126	20	15,9	1,3
CHD 4172	845	92	4	4,3	0,5
CHD 4173	606	21	9	42,9	1,5
CHD 4265	886	120	5	4,2	0,6
CHD 4310	716	36	2	5,6	0,3
AND 34	2776	129	72	55,8	2,6
AND 170	2416	184	65	35,3	2,7
AND 79	2372	149	57	38,3	2,4
K 317	3715	558	103	18,5	2,8
K 267	2217	251	69	27,5	3,1
K 96	2838	479	104	21,7	3,7
SM 14	3807	444	86	19,4	2,3
SM 15	4192	348	70	20,1	1,7
SM 16	3942	337	66	19,6	1,7
STH 268	4126	413	24	5,8	0,6
STH 506	2267	218	22	10,1	1,0
STH 206	356	14	3	21,4	0,8
STH 208	386	43	9	20,9	2,3
STH 21	246	11	2	18,2	0,8
STH 232	622	64	18	28,1	2,9
STH 25	516	48	15	31,2	2,9
STH 265	384	44	6	13,6	1,6
STH 35	890	115	50	43,5	5,6
STH 358	576	100	27	27,0	4,7
STH 73	670	43	13	30,2	1,9
STH 98	412	74	20	27,0	4,8
STH 1364J	768	65	1	1,5	0,1
STH 1374J	381	58	5	8,6	1,3
STH 1420J	493	32	2	6,2	0,4
P 25566	3429	322	45	13,4	1,3
P 25579	3690	352	52	14,8	1,4
P 25590	3509	343	35	10,2	1,0
Suma — Total	59221	5829	1121	-	-
Średnia — Mean	1692,0	166,5	32,0	21,0	1,9

Czcionka pogrubiona — genotypy, dla których zastosowano obie metody

Bold characters — genotypes examined using both methods

Procent otrzymanych roślin w stosunku do izolowanych zarodków, w zależności od badanych form, wahał się od 1,5 (STH1364) do 55,8 (AND34). Średnia efektywność uzyskiwania haploidów, mierzona liczbą roślin na 100 zapylnych kwiatków, wynosiła

1,9. Wystąpiły znaczne różnice w efektywności, w zależności od genotypu badanych form od 0,1 (STH1364J) do 5,6% (STH35).

Tabela 2

Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i roślin z 33 mieszańców pszenicy ozimej
Frequencies of embryo-like structures and plants obtained from anther culture of 33 winter wheat hybrids

Genotyp Genotype	Liczba wyłożonych pylników Number of anthers plated	Androgeniczne struktury Embryo-like structures		Zielone rośliny Green plants	
		liczba number	%	liczba number	%
CHD 4047	1555	237	15,2	4	0,3
CHD 4070	1711	389	22,7	138	8,1
CHD 4103	1435	82	5,7	9	0,6
CHD 4143	1599	174	10,9	10	0,6
CHD 4172	1604	104	6,5	15	0,9
CHD 4173	1600	19	1,2	0	0
CHD 4265	1506	166	11,0	8	0,5
CHD 4310	1490	51	3,4	8	0,5
AND 34	1500	476	31,7	86	5,7
AND 170	1541	109	7,1	41	2,7
AND 79	1869	70	3,7	13	0,7
K 317	1588	20	1,3	0	0
K 109	1856	184	9,9	71	3,8
K 234	1710	72	4,2	0	0
K 297	1603	41	2,6	0	0
SM 14	1740	48	2,8	33	1,9
SM 15	1656	68	4,1	41	2,5
SM 16	1522	85	5,6	11	0,7
STH 268	1515	639	42,2	14	0,9
STH 506	1535	630	41,0	164	10,7
STH 10	1607	26	1,6	13	0,8
STH 60	1523	70	4,6	116	7,6
STH 63	1505	35	2,3	17	1,1
STH 121	1500	0	0	0	0
STH 130	1400	0	0	0	0
STH 207	1478	23	1,6	46	3,1
STH 226	1501	301	20,1	3	0,2
STH 231	1532	128	8,4	13	0,8
STH 315	1500	16	1,1	12	0,8
STH 517	1498	186	12,4	6	0,4
P 25566	1303	82	6,3	13	1,0
P 25579	1666	99	5,9	15	0,9
P 25590	1607	133	8,3	36	2,2
Suma Total	51755	4763	—	956	—
Srednia Mean	1568,3	144,3	9,2	29,0	1,8

Czcionka pogrubiona — genotypy, dla których zastosowano obie metody

Bold characters — genotypes examined using both methods

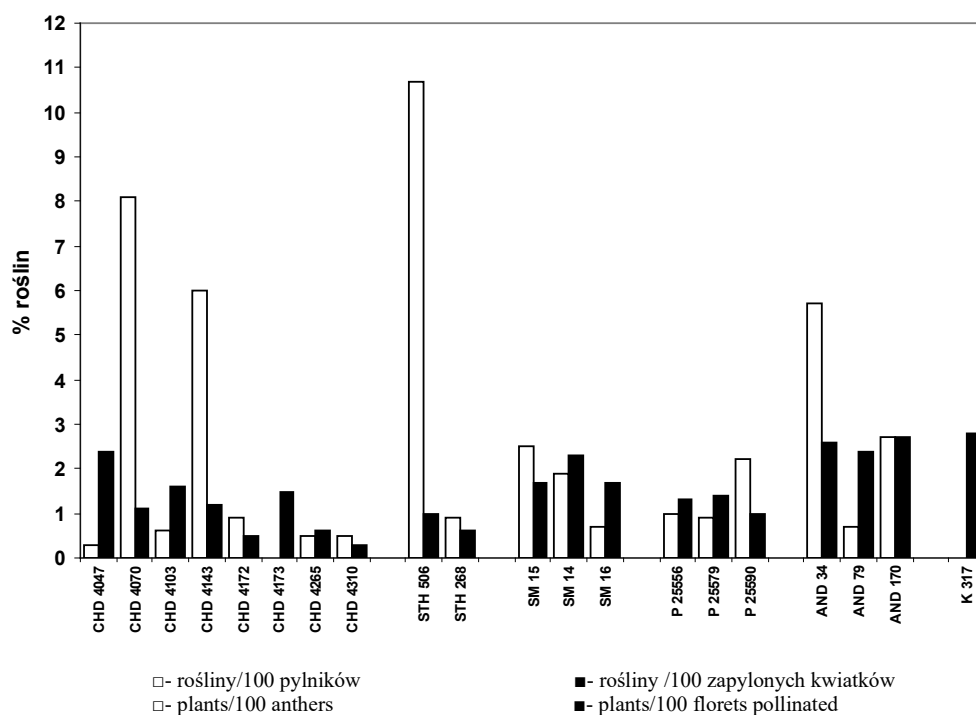
Badania prowadzono na mieszańcach pokolenia F₁ uzyskanych z 5 firm hodowlanych. Obserwując efektywność uzyskiwania form haploidalnych z kombinacji krzyżówkowych pochodzących z tej samej stacji najwięcej roślin na 100 zapylonych kwiatków uzyskano z mieszańców wytworzonych w HR Nasiona Kobierzyc, HR Strzelce oraz Poznańskiej Hodowli

Roślin Oddział Antoniny (od 2,6 do 3,2 roślin/100 zapylonych kwiatków). Należy zwrócić uwagę, że rośliny donorowe pochodziły z doświadczeń zakładanych w różnych miejscowościach, a pobieranie roślin z pola nie następowało w tym samym terminie (decydowały o tym warunki pogodowe). Różnice w efektywności uzyskiwania roślin między materiałami pochodzącymi z poszczególnych stacji mogą mieć podłoże zarówno genetyczne, jak i być wynikiem występowania interakcji genotypowo-środowiskowej.

Z trzydziestu trzech mieszańców pszenicy ozimej wyłożono 51755 pylników na pożywkę indukcyjną, z których po miesiącu uzyskano 4763 androgenicznych struktur (średnio 9,2%). Obserwowano duże zróżnicowanie w indukcji androgenezy, w zależności od genotypu otrzymano od 1,1 do 42,2% androgenicznych struktur. Po 3–4 tygodniach kultury tych struktur na pożywce regeneracyjnej uzyskano 956 zielonych roślin (średnio 1,9% w stosunku do wyłożonych pylników). Rośliny otrzymano z 27 mieszańców, przy czym efektywność wahała się od 0,2 do 10,7% w zależności od genotypu. Wysoką częstotliwość (powyżej 5,5%) uzyskiwania zielonych roślin w stosunku do wyłożonych pylników stwierdzono dla 5 genotypów: STH 506 (10,7%), C 4070/07 (8,1%), STH 60 (7,6), C 4143/07 (6,0%) i AND 34/07 (5,7%). Efektywność powyżej 2% zanotowano dla kolejnych 5 genotypów, natomiast największą grupę (23 genotypy) stanowiły formy, z których otrzymano od 0,2 do 2,0% zielonych roślin (tab. 2).

Porównanie efektywności uzyskiwania roślin obiema metodami przedstawiono na rysunku 1. Obserwowana zmienność w liczbie uzyskanych roślin metodą kultur pylnikowych była znacznie większa, niż metodą wykorzystującą zjawisko eliminacji chromosomów (tab. 3). Świadczą o tym uzyskane wartości współczynników zmienności (odpowiednio 137,8 i 51,2%) oraz uzyskane wartości minimalne i maksymalne (odpowiednio 0–10,7% oraz 0,3–2,8). Nie stwierdzono zależności w efektywności otrzymywania roślin między stosowanymi technikami. Współczynnik korelacji wynosił -0,03 i był nieistotny. Obserwowano genotypy, z których otrzymano rośliny z wysoką efektywnością tylko jedną z metod: w kulturach pylnikowych — CHD 4070 i STH 506, metodą krzyżowania z kukurydzą — CHD 4047, CHD 4173, AND 79 i K 317. Z kilku genotypów otrzymano rośliny ze zbliżoną, w porównaniu do średniej dla każdej techniki efektywnością (AND 170, SM 14 i SM 15).

W pracach nad uzyskiwaniem linii homozygotycznych pszenicy na skalę komercyjną wydaje się uzasadnione stosowanie obu technik równocześnie. Metodą krzyżowania pszenicy z kukurydzą otrzymuje się rośliny z każdego genotypu, podczas gdy metodą kultur pylnikowych nie jest to możliwe. Metoda ta jednak w porównaniu z kulturami pylnikowymi jest bardziej pracochłonna. Natomiast poprzez androgenezę można uzyskać wyższą wydajność regeneracji roślin z jednego kłosa, ponieważ w każdym wyłożonym na pożywkę pylniku możliwe jest zaindukowanie dużej liczby jednojądrowych ziaren pyłku do rozwoju w androgeniczne struktury. Ponadto u pszenicy, podobnie jak u innych zbóż, część uzyskanych tą techniką roślin stanowią spontanicznie podwojone haploidy (Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 1996; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Soriano i in., 2007).



Rys. 1. Porównanie efektywności uzyskiwania roślin metodą kultur pylnikowych oraz metodą krzyżowania z kukurydzą u wybranych mieszańców pszenicy ozimej
Fig. 1. Efficiency of wheat plant regeneration by means of anther culture and wheat x maize crosses for selected wheat hybrids

Tabela 3

Zmienność efektywności uzyskiwania roślin pszenicy metodą krzyżowania z kukurydzą oraz kultur pylnikowych dla 20 wybranych mieszańców F₁
Variability in production efficiency of wheat plants by wheat x maize crosses and anther culture for 20 selected F₁ hybrids

Metoda Method	Cecha Trait	Średnia ± SE Mean ± SE	Współczynnik zmienności Coefficient of variability (%)	Zakres Range	Współczynnik korelacji Correlation coefficient
Krzyżowanie z kukurydzą Wheat × maize crosses	Liczba roślin/100 zapylnych kwiatków Plants/100 pollinated florets	1,52 ± 0,17	51,20	0,28-2,77	-0,036
Kultury pylnikowe Anther culture	Liczba roślin/100 pylników Plants/100 anthers	2,07 ± 0,64	137,80	0,00-10,70	

WNIOSKI

1. Zakres zmienności efektywności uzyskiwania roślin metodą kultur pylnikowych jest znacznie szerszy w porównaniu z metodą wykorzystującą zjawisko eliminacji chromosomów.
2. Stwierdzono brak korelacji między efektywnością uzyskiwania roślin metodą kultur pylnikowych i metodą krzyżowania z kukurydzą.
3. W pracach nad uzyskiwaniem form homozygotycznych pszenicy na skalę komercyjną wydaje się uzasadnione równoczesne stosowanie krzyżowania z kukurydzą oraz kultur pylnikowych.

LITERATURA

- Barclay I. R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410 — 411.
- Barnabás B., Szakács E., Karsai I., Bedő Z. 2001. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica* 119: 211 — 216.
- Chuang C. C., Ouyang J., Chia H., Chou S. M., Ching C. K. 1978. A set of potato media for wheat anther culture. In: *Proc. China – Australia, Plant Tissue Culture Symp.*, Peking 1978: 51 — 66.
- Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659 — 668.
- Ghemi M., Sarrafi A., Alibert G. 1993. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anthers on tetraploid wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica* 65: 81 — 85.
- Kang T. J., Yang M. S., Deckard E. L. 2003. The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 75: 35 — 40.
- Karsai I., Bedő Z., Hayes P. M. 1994. Effect of induction medium, pH and maltose concentration on *in vitro* androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 39: 49 — 53.
- Krystkowiak K., Kuczyńska A., Rębarz M., Trzeciak R. 2004. Efektywność uzyskiwania haploidów pszenicy z mieszańców F₁ i ich form wyjściowych poprzez krzyżowanie z kukurydzą. *Biul. IHAR* 231: 37 — 41.
- Laurie D. A., Bennett M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Teor. Appl. Genet.* 76: 393 — 397.
- Laurie D. A., Bennett M. D. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32: 953 — 961.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 1996. Anther culture response in F₁ hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* 37: 253 — 260.
- Redha A., Talaat A. 2008. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 92: 141 — 146.
- Soriano M., Cistué L., Vallés M.P., Castillo A.M. 2007. Effects of colchicines on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 91: 225 — 234.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2003. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture. *Cereal Res. Commun.* 31: 289 — 296.
- Wędzony M., Van Lammeren A. A. M. 1996. Pollen tube growth and embryogenesis in wheat x maize crosses influenced by 2,4-D. *Annals of Botany* 77: 639 — 649.
- Zhuang J. J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*, Science Press. Beijing: 431.
- Xynias I. N., Zamani I. A., Gouli-Vavdinoudi E., Roupakias D. G. 2001. Effect of cold pre-treatment and incubation temperature on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Cereal Res. Commun.* 29: 331 — 338.

RYSZARD WEBER**GRAŻYNA PODOLSKA**Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Herbolgii i Technik Uprawy Roli, Wrocław

Wpływ terminu i gęstości siewu na wielkość i strukturę plonu pszenicy ozimej*

The effects of sowing term and density on size and structure of yield of winter wheat

Celem pracy była analiza wpływu gęstości i terminu siewu na plon ziarna i jego składowych sześciu odmian pszenicy ozimej w warunkach uprawy bezplużnej. Doświadczenie przeprowadzono w latach 2005–2007 na glebach zaliczanych do kompleksu żytniego dobrego. Analizowano następujące czynniki doświadczenia: Czynniki I — Terminy siewu pszenicy ozimej a) 14–16 września (siew wczesny); b) 1–3 października (siew w optymalnym terminie); c) 15–17 października (siew opóźniony); Czynniki II — dwie gęstości siewu: 1_1 — 300 ziaren na 1 m^2 ; 1_2 — 450 ziaren na 1 m^2 ; Czynniki III — odmiany pszenicy ozimej: Finezja, Rywarka, Kobiera, Satyna, Bogatka i Zawisza. Siewy wczesne w porównaniu do optymalnego terminu nie wpłynęły na obniżenie plonów odmian pszenicy. Natomiast w warunkach siewu opóźnionego o dwa tygodnie odmiany reagowały znacznym spadkiem plonów. Niezależnie od terminu siewu, istotnie wyższym plonowaniem w porównaniu do innych odmian wyróżniała się Satyna. Odmiany Satyna i Zawisza wykazywały nawet tendencję do wyższych plonów w warunkach siewów wczesnych niż w optymalnym terminie. Wyższe plony odmiany Satyna w uprawie uproszczonej w porównaniu do pozostałych odmian uwarunkowane były zwiększoną masą i liczbą ziaren z kłosa oraz liczbą kłosów z jednostki powierzchni. Finezja, Rywarka i Kobiera wykazywały porównywalne plony niezależnie od gęstości siewu, natomiast pozostałe odmiany odznaczały się wyższym plonowaniem przy zwiększonej gęstości siewu.

Słowa kluczowe: gęstość siewu, odmiany, pszenica ozima, termin siewu

The aim of this research was to analyze the influence of sowing date and density on yield size and components in six cultivars of winter wheat in conditions of ploughless soil tillage. The experiments were carried out in the years 2005–2007 at the Agricultural Experimental Station of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Jelcz-Laskowice on good rye complex soil. The effects of the following factors were evaluated: I — term of sowing: a) 14–16 September, b) 1–3 October, c) 15–17 October; II — two seeding densities: a) 300 grains·m⁻², b) 450 grains·m⁻²; III — six winter wheat cultivars: Finezja, Rywarka, Kobiera, Satyna, Bogatka and Zawisza. As compared to the optimum term of sowing, the early term did not result in reducing the grain yield, whereas comparatively lower yield was obtained when the sowing date was delayed by 2 weeks. Cultivar Satyna produced significantly higher yield than the other cultivars, irrespective of the date of sowing. This resulted from the increased number of ears per unit of surface area and from the increased weight and number of grains per ear.

* Opracowanie wykonane w ramach zadania 2.4 w programie wieloletnim IUNG-PIB

Cultivars Finezja, Rywalka and Kobiera yielded comparably at the sowing densities of 300 and 450 grains·m⁻², whereas the three other cultivars gave higher yield at the sowing density of 450 grains·m⁻².

Key words: cultivars, seeding rate sowing term, winter wheat

WSTĘP

Pszenica ozima należy do roślin o wysokich wymaganiach glebowych. Zadawalające plony można również uzyskać na glebach zaliczanych do kompleksu żytniego bardzo dobrego lub dobrego przy wysokiej kulturze gospodarowania i odpowiednim nawożeniu organiczno-mineralnym. Intensywna, konwencjonalna uprawa roli prowadzi jednak do silnego zagęszczenia nie tylko warstwy ornej, lecz także podglebia (Akker i in., 2003). Ugniatanie gleby przez ciężkie maszyny rolnicze niszczy strukturę porów glebowych i powoduje zakłócenia w gospodarce wodno-powietrznej (Lipiec i Hakansson, 2000). Uprawa płuzna zwiększa również niebezpieczeństwo erozji wietrznej i wodnej, która może być w dużym stopniu ograniczona poprzez bezpłuzne systemy uprawy roli.

Stosowanie systemów bezpłuznych, w znacznym stopniu ograniczających koszty produkcji, nie musi przyczyniać się do znacznych spadków plonu pszenicy (Camara i in., 2003). Badania wykazały, że wieloletnia uprawa bezpłuzna wpływa na stabilność i zwiększenie plonów roślin w porównaniu do efektu uzyskanego w pierwszych latach jej stosowania (Mc Vay i in., 2006). Wprawdzie w trakcie trwania okresu przejściowego (4–5 lat) obserwuje się wzrost gęstości i związku gleby (Blecharczyk i in., 2007), jednak po kilku latach następuje poprawa struktury gleby w wyniku zwiększonej zawartości substancji organicznej w jej wierzchnich warstwach (Wilkins, 2003). Uprawa bezpłuzna przyczynia się również do lepszego zaopatrywania roślin w wodę w okresie wegetacji (López-Bellido i in., 2007). Termin siewu, szczególnie w warunkach uproszczonych systemów uprawy, jest podstawowym czynnikiem plonotwórczym w uprawie pszenicy (Dobers i in., 2004; Oleksiak, Mańkowski, 2007).

Badania wykazały, że odmiany pszenicy różnią się znacznie pod względem wrażliwości zarówno na opóźnienie terminu siewu (Podolska i in., 2002), jak również na systemy uprawy roli (Mittler, 2000). Obecnie poszukuje się form pszenicy odznaczających się dobrym przystosowaniem do bezpłuznych systemów uprawy i dużą tolerancją na termin siewu (Arun i in., 2007). Zmiany warunków klimatycznych Polski i Europy w ostatnich 10 latach wskazują, że należy powtórnie przeanalizować zalecenia dotyczące terminu siewu zbóż (Oleksiak i Mańkowski, 2007; Sorteninformation, 2004). Odmiany wykazują zróżnicowaną reakcję na zmiany warunków środowiskowych. Badania z Europy Zachodniej podkreślają, że przyspieszone terminy siewu przy zredukowanej gęstości mogą przyczynić się do wyższych plonów niektórych odmian pszenicy (Sainit i in., 2006; Theobald i in., 2006). Plon ziarna jest cechą złożoną, uwarunkowaną liczbą kłosów z jednostki powierzchni, liczbą ziaren z kłosa i masą ziarniaka (MTZ). Składowe te podlegają istotnym zmianom w zależności od odmiany i warunków glebowo-klimatycznych.

Celem pracy była analiza plonu i jego składowych dla sześciu odmian pszenicy ozimej pod wpływem zróżnicowanych terminów i gęstości siewu w bezpłuznej uprawie roli.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono w trzech sezonach wegetacyjnych (2004/2005, 2005/2006 i 2006/2007) w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Jelczu — Laskowicach na glebie kompleksu żytńskiego dobrego. Doświadczenia polowe założono w układzie split — split — plot w 4 powtórzeniach, na glebie płowej — piasku gliniastym mocnym zalegającym na glinie lekkiej. W ramach trzech terminów siewu rozlosowano podbloki pierwszego rzędu — gęstości siewu. W obrębie każdej gęstości rozlosowano podbloki drugiego rzędu — odmiany pszenicy ozimej. Na polu wykonano w ramach bezpłużnej uprawy roli następujące zabiegi :

- uprawę poźniwną — gruber na głębokość 15 cm + wał strunowy,
- uprawę przedsewną — agregat uprawowy (kultywator + wał strunowy).

Nawożenie mineralne oraz chemiczną ochronę plantacji przeprowadzono zgodnie z zasadami opartymi na zaleceniach agrotechnicznych programu NAW-2, opracowanego przez IUNG.

Badano następujące czynniki doświadczenia:

- Czynniki I — Terminy siewu pszenicy ozimej:
 - a) 14–16 września (siew wczesny),
 - b) 1–3 października (siew w optymalnym terminie),
 - c) 15–17 października (siew opóźniony).
- Czynniki II — dwie gęstości siewu: 1_1 — 300 ziaren na 1 m²; 1_2 — 450 ziaren na 1 m².
- Czynniki III — odmiany pszenicy ozimej (dobór odmian losowy): Finezja, Rywarka, Kobiera, Satyna, Bogatka i Zawisza.

Powierzchnia poletka wynosiła 30 m². Z każdego poletka zbierano losowo po 35 kłosów. W analizach statystycznych danych dla plonu i jego składowych zastosowano model stały analizy wariancji adekwatnie odzwierciedlający charakter trzech badanych czynników. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy pomocy programu AWAR opracowanego przez Zakład Zastosowań Matematyki i Informatyki w IUNG Puławy.

WYNIKI BADAŃ

Siew w 2004 roku w terminach optymalnym i opóźnionym wykonywano w warunkach suszy glebowej, która spowodowała słabsze rozkrzewienie roślin w porównaniu do terminu przyspieszonego o dwa tygodnie. Łagodna zima pozwoliła na osiągnięcie istotnie wyższych plonów odmian wysianych w połowie września w porównaniu do późniejszych terminów siewu. Również warunki atmosferyczne w zimie na przełomie roku 2004/2005 nie stwarzały zagrożeń dla odmian pszenicy ozimej. Natomiast późna i chłodna wiosna oraz niekorzystny rozkład opadów w trakcie wegetacji pszenicy spowodowały znaczne zróżnicowanie plonów szczególnie na poletkach z opóźnionym terminem siewu. Deficyt wody w maju w 2005 roku wpłynął na redukcję masy tysiąca ziaren odmian wysianych zarówno w optymalnym, jak również w opóźnionym terminie. Zima na przełomie roku 2005/2006 oznaczała się znacznymi opadami lecz susza pod koniec wegetacji roślin spowodowała także ograniczenie plonowania odmian pszenicy ozimej nie zależnie od

terminu siewu. Pomimo bezśnieżnej i ciepłej zimy 2006/2007 zanotowano podczas wegetacji pszenicy mniejsze niedobory opadów w porównaniu do roku poprzedniego i uzyskano wyższe plony w stosunku do roku 2006.

Łączna analiza wariancji plonów odmian pszenicy ozimej z trzech lat badań (tab. 1), umożliwiła weryfikację następujących hipotez:

- o równości wszystkich efektów głównych dla lat,
- o równości wszystkich efektów głównych dla gęstości siewu,
- o równości wszystkich efektów głównych dla terminów siewu,
- o równości wszystkich efektów głównych dla odmian,
- o braku interakcji odmian z latami,
- o braku współdziałania odmian z gęstościami siewu,
- o braku interakcji odmian ze terminami siewu,
- o braku interakcji gęstości i terminów siewu.

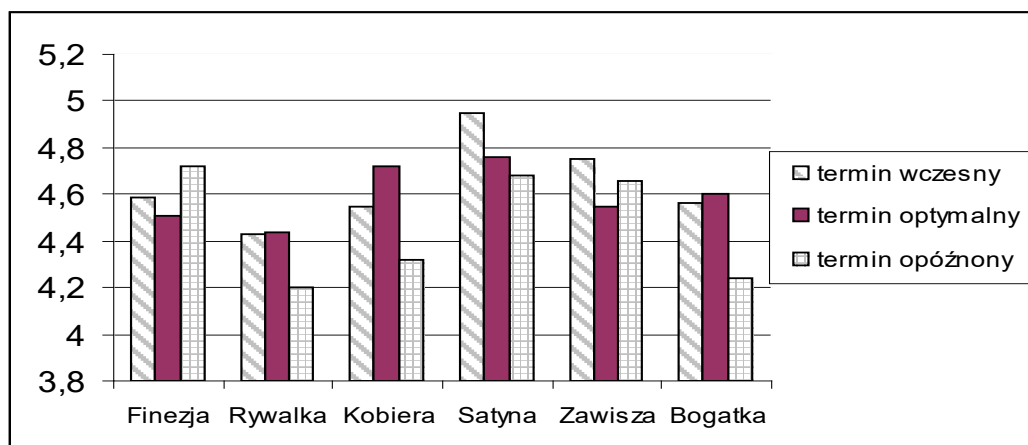
Wszystkie hipotezy o równości efektów głównych dla lat, gęstości siewu, terminu siewu i odmian oraz o braku interakcji dwuczynnikowych i trójczynnikowych zostały odrzucone na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Tabela 1

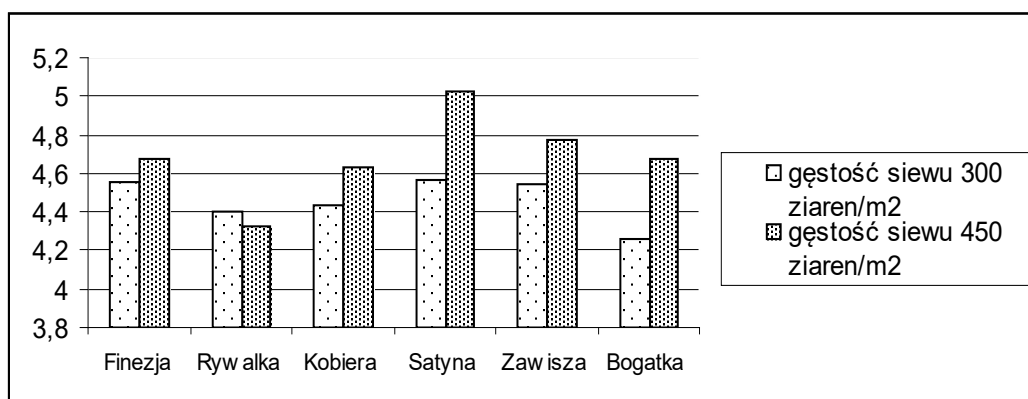
Zmienność plonu odmian pszenicy ozimej w zależności od terminu i gęstości siewu
Yield variability of winter wheat cultivars depending on density and term of sowing

Zróżnicowanie Sources of variation	Stopnie swobody Degrees of freedom	Średni kwadrat Mean square
Lata — Years (L)	2	18,30**
Terminy siewu — Term of seeding (A)	2	2,54**
L × A	4	25,91**
Błąd Error	18	0,35
Gęstości siewu — Density of seeding (B)	1	11,88**
L × B	2	0,31
A × B	2	7,92**
L × A × B	4	2,43**
Błąd Error	27	0,39
Odmiany — Cultivars (C)	5	3,81**
L × C	10	3,97**
A × C	10	0,97**
L × A × C	20	0,79**
B × C	5	1,50**
L × B × C	10	0,01
A × B × C	10	0,42*
L × A × B × C	20	0,47**
Błąd Error	270	0,21

Łączna analiza wariancji wykazała znaczny wpływ wszystkich czynników doświadczenia na plony pszenicy ozimej. Istotne interakcje odmian z gęstościami i terminami siewu wskazują na odmienne reakcje poszczególnych odmian (pod względem plonów) na zróżnicowane czynniki agrotechniczne (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Zmienność plonu odmian pszenicy ozimej w zależności od terminu siewu
Fig.1 Yield variability of winter wheat cultivars depending on term of sowing



Rys. 2 Zmienność plonu odmian pszenicy ozimej w zależności od gęstości siewu
Fig. 2 Yield variability of winter wheat cultivars depending on seeding rates

Również wysoka interakcja gęstości i terminów siewu odzwierciedla istotny wpływ obsady roślin na plony pszenicy w zależności od terminów siewu. Wykonano także analizy wariancji dla poszczególnych składowych plonu badanych odmian, które również wykazały istotność różnic wszystkich analizowanych czynników doświadczenia i ich interakcji. Na podstawie tabeli 2 można stwierdzić, że odmiana Finezja, Rywalka i Kobiera wykazywały porównywalne plony zarówno przy zwiększonej, jak również przy zmniejszonej gęstości siewu (tab. 2). Natomiast pozostałe odmiany charakteryzowały się wyższymi plonami przy zwiększonej obsadzie roślin na jednostce powierzchni.

Tabela 2

Składowe plonu odmian pszenicy ozimej w zależności od gęstości siewu (średnie dla lat i terminów siewu 2005–2007)
Yield structure of winter wheat cultivars depending on density of seeding (means for years and seeding term 2005–2007)

Odmiana Cultivar	GS	Plon Yield (t·ha ⁻¹)		LK	LK Średnie Means	LZK	LZK Średnie Means	MZK	MZK Średnie Means	MTZ	MTZ Średnie Means
Finezja	300	4,55	4,61	218,7	225,5	34,4	33,2	1,40		42,7	42,2
	450	4,67		232,3		32,2		1,28	1,34	41,6	
Rywalka	300	4,40	4,36	185,9	188,2	37,4	36,0	1,57		44,2	44,1
	450	4,32		190,6		35,4		1,49	1,53	44,0	
Kobiera	300	4,43	4,53	196,4	197,3	38,8	36,7	1,54		42,2	42,0
	450	4,63		198,3		35,5		1,38	1,47	41,9	
Satyna	300	4,57	4,80	180,0	211,2	38,3	38,1	1,66	1,64	44,8	44,7
	450	5,02		242,4		37,4		1,63		44,5	
Zawisza	300	4,54	4,65	198,6	216,1	38,0	35,5	1,56	1,45	42,5	42,3
	450	4,77		233,6		33,5		1,33		42,1	
Bogatka	300	4,26	4,46	173,9	187,2	36,0	35,4	1,71	1,68	47,8	48,0
	450	4,67		200,4		33,9		1,65		48,2	
NIR LSD		0,21	0,15	32,08	25,01	4,27	2,42	0,33	0,21	3,62	1,46
Średnia Mean	300	4,46	4,57	192,3	204,3	37,2	35,8	1,58	1,52	44,0	43,9
	450	4,68		216,3		34,6		1,46		43,7	
NIR; LSD $\alpha = 0,05$		0,08		r.n.		1,27		r.n.		r.n.	

WR — Wysokość roślin (cm); Plant height

LK — Liczba kłosów na 0,5 m²; Number of heads per 0.5 m²

LZK — Liczba ziaren z kłosa; Number of grains per head

MZK — Masa ziaren z kłosa (g); Weight of grains per head

MTZ — Masa 1000 ziaren (g); weight of 1000 grains

r.n. — Różnica nieistotna; Not significant difference

Wysokie plony odmiany Satyna uzależnione były w znacznym stopniu od liczby kłosów na 1 m², jak również od masy i liczby ziaren z kłosa. Największą masą tysiąca ziaren i masą ziarna z kłosa odznaczała się odmiana Bogatka, lecz zmniejszona liczba kłosów na jednostce powierzchni (w porównaniu do innych odmian) zadecydowała o niższych plonach tego genotypu. Odmiana Satyna cechowała się najwyższym plonem spośród badanych odmian niezależnie od terminu siewu (tab. 3). Natomiast Rywalka plonowała znacznie niżej w porównaniu do pozostałych odmian. Na uwagę zasługują odmiany Zawisza i Finezja, które w warunkach opóźnionego siewu o dwa tygodnie odznaczały się tendencją do wyższych plonów niż w optymalnym terminie. Prawdopodobnie niższe porażenie tych odmian grzybami wywołującymi kompleks chorób podstawy źdźbła w terminie opóźnionym siewu przyczyniło się do wyższych plonów tych genotypów. Siew w połowie września nie powodował obniżenia plonów pszenicy ozimej. Odmiany Satyna i Zawisza wykazywały nawet tendencję do wyższych plonów w warunkach siewów wczesnych niż w optymalnym terminie. Analizując komponenty plonu w poszczególnych terminach siewu nie stwierdzono znaczących ujemnych zależności pomiędzy liczbą kłosów na 1 m² a liczbą lub masą ziaren z kłosa. Prawdopodobnie masa i liczba ziaren z kłosa u

niektórych odmian były w większym stopniu cechami uwarunkowanymi genetycznie i nie ulegały zmianom przy zmniejszeniu liczby kłosów z jednostki powierzchni.

Tabela 3

Składowe plonu odmian pszenicy ozimej w zależności od terminu siewu (średnie dla lat i gęstości siewu 2005–2007)
Yield structure of winter wheat cultivars depending on sowing term (means for years and density of seeding 2005–2007)

Odmiana Cultivar	Termin siewu — Sowing term														
	wczesny — early					optimalny — optimum					opóźniony — delayed				
	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ
Finezja	4,59	204,6	33,9	1,38	43,0	4,51	213,5	31,2	1,25	42,1	4,72	258,3	34,4	1,39	41,4
Rywalka	4,43	197,1	34,3	1,47	44,4	4,44	166,9	34,6	1,51	44,7	4,20	200,8	39,2	1,63	43,2
Kobiera	4,55	194,7	36,0	1,45	42,9	4,72	193,9	36,4	1,44	41,8	4,32	203,5	37,9	1,51	41,4
Satyna	4,95	212,0	36,1	1,58	45,4	4,76	224,2	37,9	1,65	44,6	4,68	197,4	40,4	1,71	44,0
Zawisza	4,75	237,0	33,7	1,34	42,7	4,55	203,1	34,4	1,42	41,8	4,66	208,3	38,3	1,59	42,4
Bogatka	4,56	198,1	33,5	1,63	48,9	4,60	185,5	33,6	1,60	47,9	4,24	177,9	39,2	1,81	47,1
Średnia Mean	4,64	207,3	34,6	1,47	44,5	4,60	197,9	34,7	1,47	43,8	4,47	207,7	38,2	1,60	43,2
NIR; LSD $\alpha = 0,05$	0,22	22,4	r.n.	0,21	3,18	0,21	29,2	3,7	0,25	2,22	0,23	43,8	4,2	0,34	2,25

WR — Wysokość roślin (cm); Plant height

LK — Liczba kłosów na 0,5 m²; Number of heads per 0.5 m²

LZK — Liczba ziaren z kłosa; Number of grains per head

MZK — Masa ziaren z kłosa (g); Weight of grains per head

MTZ — Masa 1000 ziaren (g); weight of 1000 grains

r.n. — Różnica nieistotna; Not significant difference

NIR — (plony) termin siewu × odmiany; LSD — (yields) sowing term × cultivars = 0,25

Tabela 4

Składowe plonu pszenicy ozimej w zależności od terminu i gęstości siewu (średnie dla lat i odmian 2005–2007)
Winter wheat yield structure depending on the term and density of seeding (means for years and cultivars 2005–2007)

Gęstość siewu Density of seeding	Termin siewu Sowing term														
	wczesny — early					optimalny — optimum					opóźniony — late				
	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ	plon yield	LK	LZK	MZK	MTZ
300	4,71	202,0	34,7	1,48	44,6	4,40	181,4	35,9	1,53	44,1	4,27	193,4	40,9	1,72	43,3
450	4,57	212,5	34,4	1,47	44,4	4,80	214,3	33,5	1,42	43,5	4,67	222,0	35,6	1,49	43,2
Średnia; Mean	4,64	207,3	34,6	1,47	44,5	4,60	197,9	34,7	1,47	43,8	4,47	207,7	38,2	1,60	43,2
NIR; LSD $\alpha = 0,05$	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	0,196	27,4	r.n.	r.n.	r.n.	0,252	26,2	2,83	0,19	r.n.

Oznaczenia patrz tabela 2 i 3; For explanations see Table 2 and Table 3

NIR termin siewu × gęstość siewu (plon); LSD sowing term × density of seeding (yield) = 0,264

r.n. — Różnica nieistotna; Not significant difference

Również masa 1000 ziaren szczególnie odmiany Bogatka charakteryzowała się małym zróżnicowaniem, niezależnie od gęstości i terminu siewu. W warunkach siewów przy-

śpieszonych o 2 tygodnie odmiany odznaczały się porównywalnym plonowaniem w obu gęstościach siewu (tab. 4).

Natomiast w terminie optymalnym i opóźnionym siewu pszenica ozima plonowała generalnie istotnie wyżej przy zwiększonej liczbie roślin na jednostce powierzchni. Zmniejszone plony pszenicy były głównie spowodowane mniejszą liczbą kłosów na jednostce powierzchni. Niższa liczba kłosów z 1 m² spowodowała zwiększenie liczby i masy ziaren z kłosa jedynie na poletkach wysianych w połowie października. Reasumując, plony odmian przy obniżonej gęstości siewu w terminie przyspieszonym nie różniły się istotnie od wyników uzyskanych w optymalnym terminie siewu.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Przedstawione wyniki badań wskazują, że przyspieszony termin siewu oraz obniżona liczba ziaren na 1 m² nie muszą powodować zmniejszenia plonów pszenicy ozimej. Analiza doświadczeń polowych z północnej Dakoty potwierdziła także brak istotnej zależności plonów pszenicy ozimej i jej komponentów od gęstości siewu lub systemu uprawy (Carr i in., 2003). Również badania na obszarze Grecji w warunkach zróżnicowanych sposobów uprawy wykazały porównywalne wielkości plonów pszenicy zarówno w zmniejszonej jak również zwiększonej gęstości siewu (Lithourgidis i in., 2006). Wysokość plonowania przy wczesnym terminie siewu i obniżonej gęstości uzależniona jest więc w głównej mierze od genotypu odmiany. Liczba kłosów na 1 m² decydowała o wysokości plonowania badanych odmian. Składowa ta odegrała również decydującą rolę w kształtowaniu plonu w innych badaniach (Bavec i in., 2002, Lithourgidis i in., 2006). Analiza zmienności masy tysiąca ziaren odmiany Bogatka wskazuje, że składowa ta w mniejszym stopniu podlega wpływom środowiska i uzależniona jest w dużej mierze od genotypu rośliny. Badania Noworolnika (2007) potwierdzają, że liczba ziaren z kłosa i masa tysiąca ziaren są słabiej skorelowane z plonem. Natomiast Neuman (2005) analizując składowe plonu trzech odmian pszenicy ozimej w warunkach uprawy bezpługowej i siewów rzadkich stwierdza, że plony niektórych odmian uzależnione są od liczby kłosów na 1 m², liczby ziaren w kłosie i masy tysiąca ziaren. Liczba kłosów na jednostce powierzchni była w małym stopniu uzależniona od terminu i gęstości siewu. Nie stwierdzono również znaczących współzależności między liczbą kłosów z jednostki powierzchni a liczbą ziaren i masą ziarna z kłosa. Natomiast badania Dubisa i Budzyńskiego (2006) wykazały, że przyspieszenie siewu o 14 dni wpływa na zwiększenie zwartości kłosów w łanie, liczby ziaren w kłosie i obniżenie masy tysiąca ziaren. Odmienne rezultaty mogą wynikać ze różnicowanego porażenia doświadczeń kompleksem chorób podstawy źdźbła i kłosa. Głównym czynnikiem obniżającym masę tysiąca nasion, w badaniach Dubisa i Budzyńskiego (2006), był grzyb *Septoria nodorum*. Natomiast w badaniach własnych nie stwierdzono znaczącego porażenia odmian pszenicy ozimej grzybami wywołującymi choroby kłosa i liści.

WNIOSKI

1. Siewy wczesne w porównaniu do optymalnego terminu nie spowodowały obniżenia plonów odmian pszenicy ozimej, natomiast w warunkach siewu opóźnionego o dwa tygodnie odmiany reagowały znacznym spadkiem plonów, chociaż ilościowo niejednakowym.
2. Niezależnie od terminu siewu, istotnie wyższym plonowaniem wyróżniała się Satyna. Odmiany Satyna i Zawisza wykazywały nawet tendencję do wyższych plonów w warunkach siewów wczesnych niż w optymalnym terminie. Wyższe plony odmiany Satyna w uprawie uproszczonej w porównaniu do pozostałych odmian uwarunkowane były zwiększoną masą i liczbą ziaren z kłosa oraz liczbą kłosów z jednostki powierzchni.
3. Odmiany Zawisza i Finezja w warunkach opóźnionego siewu o dwa tygodnie odznaczały się tendencją do wyższych plonów niż w optymalnym terminie. Opóźnienie siewu o dwa tygodnie spowodowało zmniejszenie plonowania odmian Kobiera i Bogatka, natomiast Satyna wykazywała zwiększoną tolerancję na późne siewy.
4. Finezja, Rywalka i Kobiera wykazywały porównywalne plony zarówno przy zwiększonej jak również przy zmniejszonej gęstości siewu, natomiast pozostałe odmiany charakteryzowały się wyższymi plonami przy zwiększonej obsadzie roślin na jednostce powierzchni.

LITERATURA

- Akker J. J. H., Arvidsson J., Horn R. 2003. Introduction to special issue on experiences with the impact and prevention of soil compaction in the European Union. *Soil and Tillage Research* 73: 1 — 8.
- Arun B., Singh B. D., Sharma S., Paliwal R., Joshi A. K. 2007. Development of somaclonal variants of wheat (*Triticum aestivum* L.) for yield traits and disease resistance suitable for heat stressed and zero-till conditions. *Field Crops Research* 103, (1): 62 — 69.
- Bavec M., Bavec F., Vraga B., Kovacevic V. 2002. Relationships among yield its quality and yield components in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars affected by seeding rates. *J. Agron. Crop Sci.* 191, 2: 130 — 137.
- Blecharczyk A., Malecka I., Sierpowski J. 2007. Wpływ wieloletniego oddziaływania systemów uprawy roli na fizyko-chemiczne właściwości gleby. *Frag. Agr.* 1, (93): 7 — 13.
- Camara K. M., Payne W. A., Rasmussen P. E. 2003. Long-Term effects of tillage, nitrogen and rainfall on winter wheat yields. *Agron. J.* 95: 828 — 835.
- Carr P. M., Horsley R. D., Poland W. W. 2003. Tillage and seeding rate effects on wheat cultivars. *Crop Science* 43: 202. — 209.
- Dobers E. S., Roth R., Meyer B., Becker K. W. 2004. Leitfaden für die Umstellung auf Systeme der nicht wendenden Bodenbearbeitung. Ministerium für Landwirtschaft Umweltschutz und Raumordnung des Landes Brandenburg: 1 — 57.
- Dubis B., Budzyński W. 2006. Reakcja pszenicy ozimej na termin i gęstość siewu. *Acta Sci. Agricultura.* 5, 2: 15 — 24.
- Lipiec J., Hakansson I. 2000. Influence of degree of compactness and matrix water tension on some important plant growth factors. *Soil and Tillage Research* 35: 87 — 94.
- Lithourgidis A. S., Dhima K. V., Damalas C. A., Vasilakoglou I. B., Eleftherohorinos I. G. 2006. Tillage effects on wheat emergence and yield at varying seeding rates, and on labor and fuel consumption. *Crop Science* 46:1187 — 1192.

- López- Bellido R., López- Bellido L. Benitz-Vega J., López- Bellido J. 2007. Tillage system preceding crop, and nitrogen fertilizer in wheat crop: I Soil water content. *Agron. J.* 99: 59 — 65.
- Mc Vay K. , Budde J., Fabrizzi K., Mikha M., Rice C., Schlegel A., Peterson D., Sweeney D., Thompson M.. 2006. Management effects on soil physical properties in long-term tillage in Kansas. *Soil Sci. Am. J.* 70: 434 — 438.
- Mittler S. 2000. Ökovariabilität von Winterweizen unter Standortbedingungen Nordostdeutschlands. Dissertation Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin: 4 — 155.
- Neumann H. J. 2005. Optimierungsstrategien für den Getreide in ökologischen Landbau: System „weite Reihe“ und Direktsaat in ausdauernden Weissklee (Bi-cropping): 3 — 128.
- Noworolnik K. 2007. Podstawy optymalnych technologii produkcji zbóż. *Post. Nauk Rol.* 1: 23 — 30.
- Oleksiak T., Mańkowski D. 2007. Wpływ terminu siewu na plonowanie pszenicy ozimej na podstawie wyników badań ankietowych . *Biul. IHAR* 244: 21 — 32.
- Podolska G., Sulek A., Stankowski S. 2002. Obsada kłosów — podstawowy parametr plonotwórczy pszenicy ozimej. *Acta Scient. Pol. Agricultura* 1 (2): 5 — 14.
- Sainis J. K., Shouche S. P., Bhagwat S. G. 2006. Image analysis of wheat grains developed in different environments and its implications for identification. *J. of Agricultural Sci. Cambridge University* 144: 221 — 227.

MARCIN STUDNICKI¹**WIESŁAW MĄDRY**¹**TADEUSZ ŚMIAŁOWSKI**²¹ Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki, SGGW w Warszawie² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Zbożowych w Krakowie

Wielocechowa analiza różnorodności fenotypowej w kolekcji roboczej pszenicy jarej

Multivariate analysis of phenotypic diversity in Polish spring wheat collection

Sukces programów hodowlanych roślin jest uzależniony między innymi od wiedzy o zmienności fenotypowej i genetycznej posiadanych kolekcji zasobów genowych oraz stopnia jej wykorzystania. Zastosowanie wielocechowych metod statystycznych jest ważnym składnikiem oceny różnorodności oraz klasyfikacji i typologii obiektów w obrębie zgromadzonych kolekcji zasobów genowych danego gatunku roślin lub materiałów hodowlanych w kolekcjach roboczych. Celem tej pracy jest ocena różnorodności fenotypowej 149 obiektów pszenicy jarej pod względem 12 cech ilościowych. Obiekty te zostały zgromadzone w kolekcji roboczej Zakładu Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie. Niekompletną serię wieloletnią doświadczeń polowych przeprowadzono w miejscowości Kończewice w województwie Kujawsko-Pomorskim w latach 1996–1998. Niekompletność serii i danych sklasyfikowanych dwukierunkowo wynikała stąd, że niektóre obiekty badano nie we wszystkich latach. W pracy wykorzystano analizę skupień Warda i analizę składowych głównych, które pozwalają na komplementarne wnioski. Pierwsze cztery składowe główne wyjaśniły 67% ogólnej zmienności wielocechowej między badanymi obiektami. Pierwsza składowa wyjaśniająca 24% zmienności wielocechowej, była ona skorelowana głównie z plonem ziarna z poletka oraz masą ziarna z kłosa. Badane obiekty podzielono na 9 grup jednorodnych wielocechowo. Przedstawiono charakterystykę wielocechową obiektów w wydzielonych grupach oraz ocenę wielocechowego podobieństwa tych grup.

Słowa kluczowe: analiza składowych głównych, analiza skupień, BLUP, cechy rolnicze, kolekcja robocza, pszenica jara, różnorodność fenotypowa

The success of crop improvement programs depends among others on the knowledge of both phenotypic and genetic diversity within the maintained plant genetic resources and from the degree of their utilization. The use of multivariate statistical methods is an important strategy for assessment of within- collection diversity, classification and typology of accessions. The purpose of the paper was to evaluate phenotypic diversity for selected quantitative agronomic traits in a spring wheat collection (so-called “working” collection) maintained by the Department Unit of Cereal Breeding and Quality Evaluation of the Plant Breeding and Acclimatization Institute in Kraków. A field trial including 149 accessions (released cultivars and advanced breeding lines) was conducted across three seasons (1996–

1999) in Kończewice, Kujawy-Pomerania province. In each year 12 agronomic quantitative traits were evaluated. The data were put into incomplete two-way accession $\times$ year classification for each trait. Two complementary multivariate methods including cluster analysis and principal component analysis were used. The first four principal components captured 67% of the total multivariate variability among the accessions. The first principal component accounted for 24% of the total variability and it was mostly correlated with grain yield and weight of grain per ear as the traits with the largest contribution to the multivariate variability among the accessions. The accessions were grouped into nine clusters based on Ward's clustering method. The clusters (groups) were then characterized with regard to all the studied traits, and multivariate similarities among the groups were described using the biplot in principal component analysis.

Key words: agronomic traits, BLUP, cluster analysis, genetic resources, phenotypic diversity, principal component analysis, spring wheat

WSTĘP

Ważnym czynnikiem rozwoju programów hodowlanych roślin jest stopień wykorzystania różnorodności biologicznej (genetycznej i fenotypowej) w kolekcjach dotychczas zgromadzonych zasobów genowych. Jednym z ważnych elementów strategii wykorzystania obiektów w tych kolekcjach jest ocena genetyczna i fenotypowa ich różnorodności. W wielu przypadkach zadanie to jest ograniczone tylko do pozyskania danych paszportowych dla obiektów w kolekcjach. Kompleksowa, tzn. genetyczna i fenotypowa ocena różnorodności kolekcji roślinnych zasobów genowych wymaga współpracy specjalistów z wielu dziedzin, tj. genetyków, hodowców, biochemików, fitopatologów, fizjologów roślin, biometryków i innych (Mazurkiewicz i Struś, 1997; Brown-Guedira i in., 2000; Mohammadi i Prasanna, 2003; Mądry, 2007; Sorrells, 2007; Damania, 2008). Wkład biometrii do tej współpracy polega na opracowywaniu, doskonaleniu i zastosowaniu efektywnych metod statystycznych (Mohammadi i Prasanna 2003, Crossa i Franco, 2004; Martinez-Calvo i in., 2007; Mądry, 2007).

W ramach systematycznych i zintegrowanych prac nad gromadzeniem, przechowywaniem, oceną oraz wykorzystaniem pozyskanych lub wytworzonych dotychczas obiektów pszenicy w Polsce, utworzono w 1970 roku kolekcję roboczą przy Zakładzie Roślin Zbożowych IHAR. Do tego czasu polskie ośrodki hodowli prowadziły własne kolekcje (Mazurkiewicz i Struś, 1997). Kolekcja robocza jest to zbiór wartościowych obiektów genetycznie utrwalonych, które mogą być źródłem materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian (Mohammadi i Prasanna, 2003; Damania, 2008). W skład takiej kolekcji wchodzi zarówno odmiany zarejestrowane w kraju, odmiany pochodzące z zagranicznych ośrodków hodowli oraz wartościowe linie zdeponowane przez hodowców. Zgromadzone obiekty są badane pod względem wielu rolniczych cech ilościowych w okresie kilku lat w jednej miejscowości (Kubicka i in., 2004; Hartung i Piepho, 2005; Mądry, 2007). W kolejnych latach badań obserwuje się obiekty na pojedynczych poletkach. Dane z takiej serii lat stanowią niekompletną klasyfikację dwukierunkową krzyżową z jedną obserwacją w podklasie w niepustych podklasach. Niekompletność danych wynika z tego, że w poszczególnych latach nie są badane wszystkie obiekty.

Wielocechowa analiza statystyczna danych z obserwacji fenotypowych cech obiektów w kolekcji, wykonywana przy użyciu metod wielowymiarowych, jest bardzo wartościowa

wym podejściem do oceny różnorodności, pozwalającym na pogłębioną i wyczerpującą ocenę kolekcji zasobów genowych roślin uprawnych (Mohammadi i Prasanna, 2003; Crossa i Franco, 2004; Martinez-Calvo i in., 2007; Mądry, 2007). Umożliwia ona klasyfikację obiektów zgromadzonych w kolekcji na grupy jednorodne pod względem wielu cech jednocześnie oraz ich charakterystykę, zwaną też typologią, które ułatwiają jasne opisanie podobieństwa pomiędzy obiektami. Za pomocą metod wielowymiarowych można określić także związki pomiędzy cechami, względną moc dyskryminacyjną (rozdzielającą obiekty) badanych cech i charakter podobieństwa pomiędzy obiektami pod względem najważniejszych cech, czyli tych o największej mocy dyskryminacyjnej.

Wielowymiarowe metody statystyczne z sukcesem zostały zastosowane do klasyfikacji i charakterystyki zmienności fenotypowej kolekcji wielu gatunków roślin, między innymi pszenicy (DeLacy i in., 2000; Hailu i in., 2006), jęczmienia (Žáková i Benkova, 2006; Ruiz i in., 1997; Manjunatha i in., 2007), żyta (Kubicka, 2004), czy amarantusa (Mapes i in., 1996).

Celem tej pracy jest ocena różnorodności fenotypowej pod względem 12 rolniczych cech ilościowych obiektów w kolekcji roboczej pszenicy jarej, zgromadzonej w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, za pomocą wielowymiarowych metod statystycznych, tj. analizy skupień i analizy składowych głównych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy i doświadczenia polowe

Materiał badawczy obejmował 149 obiektów kolekcji roboczej pszenicy jarej (tab. 3), zgromadzonej i ocenianej w Zakładzie Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie. Doświadczenia polowe przeprowadzono w latach 1996–1998 w Kończewicach, w województwie kujawsko-pomorskim. Ziarniaki z każdego obiektu wysiano na pojedynczych poletkach o powierzchni 10 m².

W trakcie doświadczenia na poletkach obserwowano 12 następujących rolniczych cech ilościowych: liczbę dni od 1.IV. do kłoszenia i dojrzałości oraz wysokość roślin w łanie w centymetrach. Pomiary te dokonywano na podstawie obserwacji 50 roślin losowo wybranych z poletka. W czasie wegetacji roślin określono porażenie chorobami liści oraz porażenie chorobami kłosa w 9-stopniowej skali bonitacyjnej, w której 1 — oznacza największe porażenie chorobą, a 9 — najmniejsze porażenie. Po zbiorze określono plon ziarna w dt/ha i jego składowe — liczbę ziaren z kłosa, masę ziarna z kłosa w g i masę 1000 ziaren w g. Oceniano także cechy technologiczne ziarna, takie jak procentowa zawartość białka w ziarnie — oznaczona metodą bliskiej podczerwieni NIR, liczba opadania — oznaczona metodą Hagberga-Pertena, liczba sedymentacji — oznaczona metodą Axforda z wykorzystaniem siarczanu dodecylosodowego SDS.

Analiza statystyczna danych

Jednocechowa analiza zmienności kolekcji

Obserwacje fenotypowe badanych cech u 149 obiektów były analizowane na podstawie modelu mieszanego analizy wariancji dla niekompletnej klasyfikacji podwójnej z jedną

obserwacją w podklasie o postaci obiekty x lata. Model ten ma następującą postać (Jahufer i in., 1997; Piepho i Mohring 2005; Littell i in., 2006):

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

gdzie:

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

Analizę wariancji według przyjętego powyżej modelu mieszanego wykonano za pomocą pakietu statystycznego SAS 9.1, wykorzystując procedurę GLM (SAS Institute Inc. 2004, Littell i in. 2006).

Losowe efekty główne dla obiektów g_i dla każdej cechy, ze względu na niekompletność danych, zostały oszacowane za pomocą najlepszego nieobciążonego liniowego predyktora, oznaczanego w skrócie BLUP (ang. the Best Linear Unbiased Predictor) (Robinson 1991, Jahufer i in. 1997, Hartung i Piepho 2005, Hartung i in. 2006). Do wyznaczenia estymatorów BLUP zastosowano metodę największej wiarygodności z restrycją REML (ang. Restricted Maximum Likelihood). Estymatory BLUP dla efektów losowych, dotyczących poziomów danego czynnika, posiadają mniejszy standardowy błąd oszacowania, niż najlepsze nieobciążone liniowe estymatory typu BLUE (ang. the Best Linear Unbiased Estimators), stosowane dla efektów stałych, dotyczących poziomów tego samego czynnika (Robinson, 1991; Hartung i Piepho, 2005). Obliczenia numeryczne wykonano za pomocą pakietu statystycznego SAS 9.1, wykorzystując procedurę MIXED, pozwalającą wyznaczyć estymatory typu BLUP dla efektów losowych badanych obiektów (Littell i in., 2006; SAS Institute Inc., 2004).

Dla potrzeb jednocechowej i wielocechowej analizy zmienności fenotypowej obiektów zgromadzonych w kolekcji pszenicy jarej wyznaczono oceny średnich genotypowych, posługując się estymatorem:

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

gdzie:

$\hat{m}_i$ jest oceną nieobciążoną średniej genotypowej dla danej cechy (oceną średniej cechy w populacji lat) dotyczącej i -tego obiektu, $\hat{m}$ jest oceną średniej ogólnej, $\hat{g}_i$ jest oceną BLUP losowego efektu głównego dotyczącego i -tego obiektu.

Oceny średnich genotypowych $\hat{m}_i$ dla obiektów posłużyły do określenia podstawowych charakterystyk (średnia, wariancja, współczynnik zmienności CV, minimalna i maksymalna wartość) obserwowanych cech w obrębie zbioru badanych obiektów. Średnie genotypowe $\hat{m}_i$ będą wykorzystywane także w wielocechowej analizie zmienności rozpatrywanej kolekcji.

Wielocechowa analiza różnorodności kolekcji

Analiza skupień

Badane obiekty podzielono na grupy (skupienia) o małej wielocechowej różnorodności genotypowej, posługując się metodą Warda analizy skupień (Jahufer i in., 1997; Casler i van Santen, 2000; Mohammadi i Prasanna, 2003; Crossa i Franco, 2004; Mądry, 2007). W

tej hierarchicznej metodzie analizy skupień w czasie aglomeracji wykorzystywane jest podejście analizy wariancji, oparte na minimalizacji sumy kwadratów odchyłeń wewnątrz grup (ang. within-group error sum of squares). W każdym kroku aglomeracji następuje połączenie takich dwóch grup, dla których suma kwadratów odchyłeń jest najmniejsza spośród wszystkich możliwych do utworzenia grup (Johnson i Wichern, 2002). Ta metoda charakteryzuje się podziałem obiektów na grupy o podobnej i małej liczbie relatywnie wyrównanych (jednorodnych) obiektów. Z tego powodu jest ona uznana za bardzo efektywną przy podziale obiektów na grupy jednorodne i najczęściej stosowana w ocenie zarówno genotypowej, jak i fenotypowej zmienności kolekcji roślinnych zasobów genowych (Mohammadi i Prasanna, 2003; Crossa i Franco, 2004; Mądry, 2007). Jako miarę podobieństwa pomiędzy obiektami zastosowano kwadrat odległości euklidesowej, wyznaczonej na podstawie standaryzowanych ocen średnich genotypowych, dotyczących rozpatrywanych cech (Mohammadi i Prasanna, 2003; Crossa i Franco, 2004; Mądry, 2007). Ważnym problemem w analizie skupień jest wyznaczenie właściwej (rozsądnej merytorycznie i uzasadnionej statystycznie) liczby grup, często określanym jako miejsce przecięcia dendrogramu. W celu wyznaczenia uzasadnionej statystycznie liczby skupień, zastosowano w pracy kryterium oparte na statystyce pseudo F i pseudo t^2 . Kryteria te nie pozwoliły jednak jednoznacznie podjąć decyzję o liczbie skupień. Zastosowano drugie kryterium zaproponowane przez Caslera i van Santena (2000) oraz Upadhyaya i wsp. (2003). Jest ono oparte na relacji międzygrupowej sumy kwadratów odchyłeń do całkowitej sumy kwadratów odchyłeń dla wszystkich badanych cech. Przyjmuje się zwykle, że obiekty mogą być podzielone na taką liczbę skupień, aby wewnątrzgrupowa suma kwadratów wyjaśniła znaczącą część całkowitej sumy kwadratów odchyłeń, zwykle około 75%.

Analiza składowych głównych

Ta metoda jest stosowana do:

- syntetycznej oceny związków pomiędzy badanymi cechami ilościowymi, polegającej na wykryciu tzw. czynników — składowych głównych, rozumianych jako zespoły cech wzajemnie skorelowanych,
- określenia względnej mocy dyskryminacyjnej (rozdzielającej obiekty) każdej z badanych cech, prowadzącej do wykrycia cech o największym znaczeniu w wielocechowej zmienności między obiektami,
- charakterystyki podobieństwa pomiędzy obiektami pod względem najważniejszych cech, czyli tych o największej mocy dyskryminacyjnej za pomocą narzędzi graficznych, tj. wykresu rozmieszczenia obiektów w układzie dwóch lub trzech składowych głównych (Ruiz i in., 1997; Assafa i in., 2001, 2003; Johnson i Wichern, 2002; Mohammadi i Prasanna, 2003; Kubicka i in., 2004; Mądry, 2007).

Analiza składowych głównych została przeprowadzona za pomocą procedury PRINCOMP pakietu statystycznego SAS 9.1 (SAS Institute Inc., 2004).

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza wariancji i parametry zmienności cech

Wyniki analizy wariancji dla 12 rozpatrywanych cech, opartej na modelu mieszanym, przedstawiono w tabeli 1. Stwierdzono istotną zmienność genotypową obiektów dla każdej z rozpatrywanych cech.

Tabela 1

Analiza wariancji dla 12 cech rolniczych badanych obiektów w kolekcji roboczej pszenicy jarej
Analysis of variance for 12 agronomic traits of studied accessions in a spring wheat collection

Źródła zmienności Sources of variation	D.F.	Średnie kwadraty Mean squares											
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂
Obiekty Object	148	211,93*	5881,32*	165,11*	15,69*	22,09*	191,96*	443,69*	32,53*	2,16*	362,91*	1,80*	1,35*
Lata Years	2	17,78*	26179,82*	11224,65*	3529,45*	2383,28*	8649,51*	104,59*	386,55*	0,080*	31,96*	62,09*	4,29*
Resztowa Residual	148	0,56	1787,30	64,64	2,84	3,16	53,41	14,64	9,91	0,03	5,51	1,02	0,61

* Istotne przy $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0.01$

D.F. — Stopnie swobody; Degrees of freedom

Tabela 2

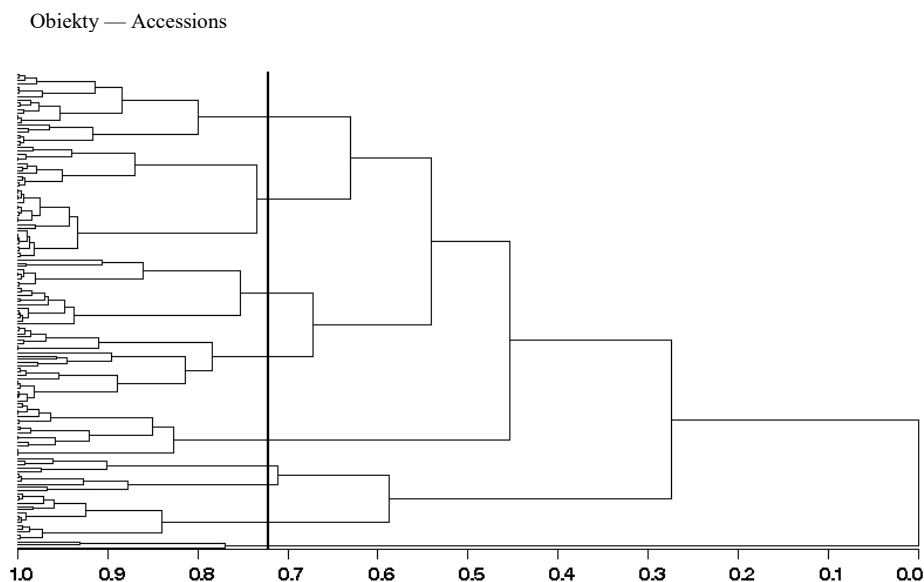
Charakterystyka zmienności kolekcji roboczej pszenicy jarej pod względem 12 cech rolniczych
Variability characterization for 12 agronomic traits in a spring wheat collection

Cecha Trait	Średnia Mean	Wariancja Variance	Współczynnik zmienności (%) Coefficient of variability (%)	Min. Min	Maks. Max
Zawartość białka w ziarnie Grain protein content	12,96	0,25	3,87	11,73	15,04
Liczba opadania Falling number	295,45	1285,49	12,14	174,53	351,00
Test sedimentacji Sedimentation test	45,37	28,10	11,68	28,66	61,75
Dni do dojrzałości Days to maturity	102,31	5,18	2,23	97,55	107,65
Dni do kłoszenia Days to heading	48,19	7,66	5,74	41,92	54,80
Plon ziarna Grain yield	72,64	47,56	9,49	46,65	87,09
Wysokość rośliny Plant height	95,40	37,09	6,38	70,42	110,97
Liczba ziaren w kłosie Grain number per ear	41,52	7,36	6,53	33,98	49,78
Masa ziaren w kłosie Grain weight per ear	1,84	0,02	7,23	1,34	2,20
Masa 1000 ziaren Weight of 1000 grains	44,47	10,14	7,16	37,27	53,74
Porażenie chorobami liści Resistance to leaf diseases	5,57	0,18	7,69	4,27	6,71
Porażenie chorobami kłosa Resistance to ear diseases	6,21	0,20	7,13	4,75	7,24

Na podstawie ocen odchyłeń standardowych i współczynników zmienności dla średnich genotypowych, otrzymanych za pomocą BLUP-ów (tab. 2) możemy wnioskować, że największą zmiennością charakteryzowała się liczba opadania, (współczynnik zmienności był równy 12%), liczba sedymentacji, (współczynnik zmienności był równy 11,7%), a także plon ziarna z poletka, (współczynnik zmienności był równy 9,5%). Najmniejszą zmiennością charakteryzowały się następujące cechy: liczba dni do kłoszenia, (współczynnik zmienności był równy 5,7%), zawartość białka w ziarnie, (współczynnik zmienności kształtował się na poziomie 3,9%) oraz liczba dni do dojrzałości pełnej, (współczynnik zmienności był równy 2,2%).

Grupowanie obiektów wielocechowo jednorodnych

Na rysunku 1 przedstawiono dendrogram, obrazujący proces grupowania ocenianych obiektów za pomocą metody Warda, wraz z miejscem przecięcia jego gałęzi na poziomie 71% całkowitej sumy kwadratów odchyłeń cech (zmienności całkowitej), wyjaśnionej przez skupienia. Podobny poziom wyjaśnionej zmienności przez skupienia stanowił kryterium do wydzielania skupień w pracach Caslera i van Santena (2000) oraz Upadhyaya i wsp. (2003). Zatem 149 obiektów podzielono na 9 grup jednorodnych pod względem wszystkich 12 ocenianych cech.



Udział międzygrupowej zmienności cechy w całkowitej zmienności obiektów
The proportion of variance accounted for by the clusters

Rys. 1. Dendrogram uzyskany za pomocą metody Warda analizy skupień dla 149 obiektów pszenicy jarej (linia pionowa obrazuje przecięcie gałęzi na poziomie 71% zmienności całkowitej wyjaśnionej przez skupienia)

Fig. 1. Dendrogram generated by Ward cluster analysis for 149 accessions of spring wheat (vertical line shows a cutting point at the level of 71% variability explained by clusters)

W tabeli 3 zaprezentowano skład obiektów w poszczególnych grupach jednorodnych, w których znalazły się obiekty pochodzące z różnych źródeł. Liczebność wydzielonych grup wahała się od 35 obiektów w grupie 1, do 3 obiektów w grupie 9. W każdej grupie znajdowały się zarówno linie hodowlane, wytworzone w różnych ośrodkach hodowlanych oraz odmiany zarejestrowane w kraju i zagranicą. Oznacza to, że hodowcy w różnych ośrodkach hodowlanych korzystali z tej samej lub spokrewnionej bazy genetycznej pszenicy. Do stwierdzenia faktycznego spokrewnienia niektórych obiektów w tej kolekcji konieczne jest badanie ich podobieństwa genetycznego za pomocą markerów molekularnych (Brown-Guedira i in., 2000; Mohammadi i Prasanna, 2003; Mądry, 2007; Damania, 2008) lub prześledzenie rodowodów zgromadzonych obiektów.

Tabela 3

Grupy jednorodne obiektów pszenicy jarej wydzielone na podstawie 12 cech rolniczych za pomocą metody Warda analizy skupień
Homogeneous groups of spring wheat accessions revealed on the basis of 12 agronomic traits using the Ward clustering method

Grupa Group	Nazwa obiektu Name of accession
1	CSW92, ETA, Frisal, HEC 1341/90, HEC 2527/91, HEC 347/90, Henika, Ibwsn 383/81, Jasna, KOC 1887/84, KOC 1997/92, KOC 279, KOC 3612/88, KOC 3708/94, KOC 4162/90, KOH 1749, KOH 1809, KOH 1813, KOH 1831, KOH 2365, KOH 393, LONA, Munk, NAD 196, NAD 297, Nemares, Omega, Planet, SOA 2896/87, Thasos, Tinos, Turbo, VDH 3022/89, WYS. z KEN.LEOP., Zena
2	ALSN 11, ALSN 26, ANDUSIL, Cadenza, Contesa, CSW 91/B, IBWSN 144/79, KOC 1660/93, KOC 2083/90, KOH 2242, KOH 2254, KOH 263/15/89, KOH 272/11/83, KOH 391/16/82, RAH 15393, RAH 3794, RAH 63593, RAH 66493, Sigma, SOA 2531/85, SOA 280/R/91, Sunnan, Troy, Waller
3	Alkora, Erwin, HEC 425/93, HEC 493, HEC 587/87, IGNA, KOC 2391/89, KOC 2612/88, KOC 2775/87, KOC 2823/92, KOC 3024/90, KOC 3317/89, KOH 1671, KOH 2182, KOH 253/13/88, KOH 60/13/88, KOH 800
4	6/b40, AL SN-11, ALBIS, COMBI, FAVORIT, HEC 1941/92, HEC 1945/91, HEC 2530/91, HENA, Hermes, IBWSN 260/81, JOAN DOLLAR, KOC 2892, KOC 3277/92, KOC 3395, KOH 1094, KOH 696, KRJ 7/95, M 104/77, M 159/75, LANDU
5	2/B/19, Artis, Attis, Devon, Dragon, Hanno, HEC 1396/80, HEC 393, HEC 594, HEC 961/88, Hezja, Klaros, KOC 1177/92, KOC 2815/89, KOC 4798/90, KOH 1373, KOH 1895, Quatro, Ralle, Remia, Santa, Torka, VDH 83/2014/1/3
6	Banti, Ismena, Kenya Tembo, KOC 3516/86, Naxos, S-55
7	Helia, KOC 4479/90, KOH 1766, KOH 1767, KOH 1962, KOH 1995, KOH 2384, KOH 2391, KOH 495 / Nawra, KOH 596, KOH 742, KOH 797, M 151/76, M 279/74, Rubino
8	Arkada, IBWSN 390/81, M 203/78, M 70/78, Remus
9	ALSN 25, KRJ 4/95, KRJ 9/95

Analiza składowych głównych

Wyniki analizy składowych głównych na podstawie standaryzowanych wartości BLUP-ów dla średnich genotypowych, dotyczących badanych cech, przedstawiono w tabeli 4. Do dalszej analizy wybrano cztery pierwsze składowe główne, ponieważ dla nich wartości własne były większe od 1 (Assefa i in., 2003; Mohammadi i Prasanna, 2003; Kubicka i in., 2004; Okpul i in., 2004; Mądry, 2007).

Cztery pierwsze składowe główne wyjaśniły 67% ogólnej zmienności międzyobiektowej dla wszystkich rozpatrywanych cech. Pierwsza z tych składowych wyjaśniła 24% łącznej zmienności BLUP-ów dla efektów genotypowych, natomiast dwie pierwsze

wyjaśniły łącznie 44% tej zmienności. Trzy pierwsze składowe wyjaśniły łącznie 56% ogólnej zmienności obiektów.

Tabela 4

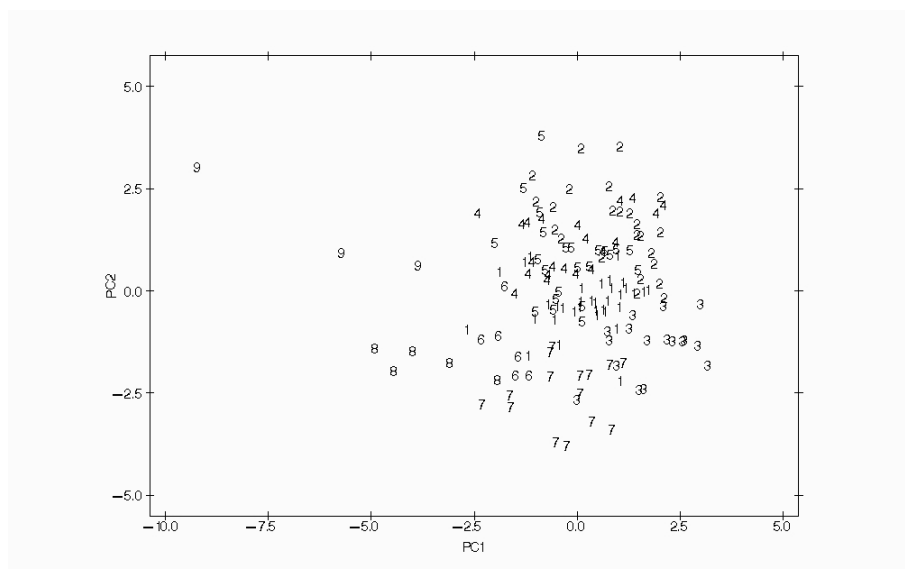
Współczynniki korelacji między cechami a każdą z czterech pierwszych składowych głównych (PC) oraz wartości własne i procent wyjaśnionej zmienności przez te składowe główne
Correlation coefficients between traits and each of the first four principal components (PC), eigenvalues and parts of multivariate variability explained by these components

Cechy — Traits	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4
Zawartość białka w ziarnie — Grain protein content	-0,30	0,25	0,35	-0,05
Liczba opadania — Falling number	0,32	-0,01	-0,40	0,29
Test sedymentacji — Sedimentation test	-0,25	-0,02	0,07	0,21
Dni do dojrzałości — Days to maturity	0,26	0,49	0,06	0,00
Dni do kłoszenia — Days to heading	0,31	0,45	-0,06	0,18
Plon ziarna — Grain yield	0,41	-0,15	-0,06	0,20
Wysokość rośliny — Plant height	0,13	0,20	0,61	-0,03
Liczba ziaren w kłosie — Grain number per ear	0,30	-0,05	-0,10	-0,69
Masa ziaren w kłosie — Grain weight per ear	0,37	-0,32	0,28	-0,34
Masa 1000 ziaren — Weight of 1000 grains	0,15	-0,37	0,46	0,34
Porażenie chorobami liści — Resistance to leaf diseases	0,32	0,31	0,14	0,13
Porażenie chorobami kłosa — Resistance to ear diseases	0,24	-0,31	0,05	0,27
Wartość własna Eigenvalues	2,93	2,42	1,39	1,30
Wyjaśniona część zmienności wielocechowej obiektów Explained part of multivariate variability of accessions	0,24	0,20	0,12	0,11
Skumulowana część zmienności wielocechowej Cumulative part of multivariate variability	0,24	0,45	0,56	0,67

Pierwsza składowa główna była stosunkowo silnie skorelowana dodatnio z plonem ziarna ($r = 0,41$), masą ziarna z kłos ($r = 0,37$), liczbą opadania ($r = 0,32$), a także porażeniem przez choroby liści ($r = 0,32$). Wskazuje to, że wymienione cztery cechy były wzajemnie dość silnie skorelowane dodatnio. Są one oznaką istnienia czynnika genetycznego (także w części środowiskowego), który w znacznym stopniu warunkuje jednocześnie wszystkie te cztery cechy. Ten czynnik może obejmować poligeny sprzężone lub/oraz działające plejotropowo. Cechy najsilniej skorelowane z pierwszą składową główną miały największy udział w wielocechowym zróżnicowaniu obiektów (tab. 5, rys. 2 i 3). Stosunkowo duże wartości pierwszej składowej głównej dla rozpatrywanych obiektów oznaczają dość często duże wartości dodatnio skorelowanych z nią cech, zaś małe wartości ujemnie skorelowanych z nią cech. Natomiast małe wartości pierwszej składowej głównej dla obiektów, wskazują dość często na małe wartości dodatnio skorelowanych z nią cech, zaś duże wartości ujemnie skorelowanych z nią cech.

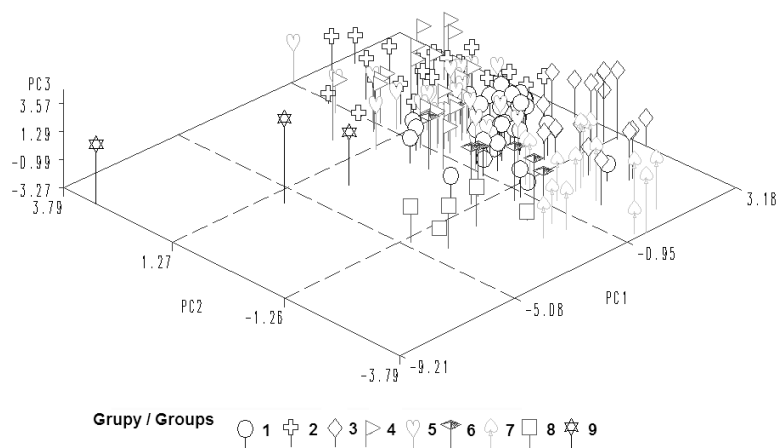
Dla drugiej składowej głównej stwierdzono dodatnią korelację z liczbą dni do dojrzałości ($r = 0,49$) oraz liczbą dni do kłoszenia ($r = 0,45$), natomiast ujemną korelację ($r = -0,37$) dla masy 1000 ziaren. Wskazuje to na ujemne korelacje między długością każdej z dwóch faz rozwojowych a masą 1000 ziaren. Stwierdzony związek odmienny w stosunku do wielu badań, potwierdzających korelacje dodatnie między długością faz rozwojowych a masą 1000 ziaren u zbóż (DeLacy i in., 2000; Hailu i in., 2006). Zatem obiekty o relatywnie dużych wartościach drugiej składowej głównej wyróżniały się często relatywnie

długim okresem wegetacji oraz charakteryzowały się niską masą 1000 ziaren (grupa 2), i odwrotnie (grupa 7), co dobrze obrazuje tabela 5.



Rys. 2. Rozmieszczenie 9 grup obiektów pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych

Fig. 2. Scatter plot for 9 groups of spring wheat in axes of the first two principal components



Rys. 3. Rozmieszczenie 9 grup obiektów pszenicy jarej w układzie trzech pierwszych składowych głównych

Fig. 3. Scatter plot for 9 groups of spring wheat in axes of the first three principal components

Tabela 5

Charakterystyka wielocechowa wydzielonych grup obiektów pszenicy jarej
Characteristics of separated accession groups for 12 agronomic traits in a spring wheat collection

Cechy Traits	Grupy Groups					
	I		II		III	
	średnia mean	wariancja variance	średnia mean	wariancja variance	średnia mean	wariancja variance
1	2	3	4	5	6	7
X ₁	12,83	0,15	12,87	0,11	12,60	0,13
X ₂	312,64	317,29	308,85	797,63	303,69	1334,21
X ₃	45,06	15,65	40,39	30,86	43,38	26,40
X ₄	101,68	1,73	104,58	1,97	101,41	1,65
X ₅	48,13	4,32	51,17	3,25	47,13	5,70
X ₆	74,81	16,20	71,73	34,90	79,34	10,72
X ₇	93,09	23,44	95,44	36,71	98,01	18,49
X ₈	42,34	2,94	42,05	3,31	44,90	3,51
X ₉	1,83	0,00	1,80	0,01	2,04	0,01
X ₁₀	42,93	3,22	42,48	9,35	46,08	6,32
X ₁₁	5,45	0,08	5,84	0,08	5,71	0,11
X ₁₂	6,31	0,21	6,01	0,12	6,40	0,11
IV			V		VI	
X ₁	13,41	0,10	12,95	0,29	12,94	0,27
X ₂	282,37	1076,95	298,23	445,50	220,63	897,81
X ₃	48,98	17,34	48,16	13,71	41,56	7,19
X ₄	104,36	4,11	103,06	2,84	99,65	2,46
X ₅	49,02	2,57	49,36	2,90	43,80	3,85
X ₆	69,85	38,08	73,70	19,99	70,51	89,74
X ₇	98,58	25,56	97,67	16,43	96,43	19,71
X ₈	42,67	6,87	38,46	2,51	39,87	1,68
X ₉	1,87	0,01	1,73	0,01	1,79	0,00
X ₁₀	44,04	4,67	45,05	6,74	45,21	2,69
X ₁₁	5,70	0,05	5,84	0,11	5,44	0,18
X ₁₂	5,97	0,09	6,26	0,14	6,33	0,13
	13,41	0,10	12,95	0,29	12,94	0,27
VII			VIII		IX	
X ₁	12,89	0,07	12,99	0,34	14,51	0,40
X ₂	295,79	703,82	266,64	1991,35	207,20	2726,18
X ₃	46,91	19,04	46,39	5,71	51,75	75,33
X ₄	100,03	0,86	98,75	0,34	99,13	0,61
X ₅	45,94	3,44	43,32	1,13	44,34	0,64
X ₆	72,74	26,64	61,44	36,30	50,50	41,05
X ₇	91,55	25,02	82,97	58,15	105,65	23,87
X ₈	40,35	2,26	38,52	1,02	38,35	20,42
X ₉	1,95	0,01	1,73	0,00	1,61	0,06
X ₁₀	49,54	7,39	44,87	6,79	40,62	10,41
X ₁₁	5,14	0,22	4,73	0,13	4,75	0,01
X ₁₂	6,66	0,04	5,80	0,03	5,09	0,17

Trzecia składowa główna była dodatnio skorelowana z wysokością roślin ($r = 0,61$), ujemnie zaś z liczbą opadania ($r = -0,40$). To świadczy, że obiekty o relatywnie wysokich źdźbłach, posiadały często relatywnie niską wartość liczby opadania. Natomiast czwarta składowa główna była dość silnie skorelowana ujemnie z liczbą ziaren w kłosie ($r = -0,69$).

Brak silnych korelacji pomiędzy składowymi głównymi a cechami, świadczą o tym, że nie ma wśród badanych cech takich, które mają stosunkowo duży udział w wielocechowym zróżnicowaniu obiektów. Żadna z badanych cech nie posiadała dominującego udziału w ogólnej zmienności obiektów.

Z rysunków 2 i 3 wynika, że większość obiektów zlokalizowana jest w okolicach wartości średnich dla trzech pierwszych składowych głównych, zwłaszcza pierwsza, czwarta i piąta grupa obiektów. Obiekty w tych grupach odznaczały się średnimi wartościami dla cech znacząco skorelowanych z pierwszą i drugą składową główną.

Grupa 2 obiektów charakteryzowała się dużymi dodatnimi wartościami pierwszej i drugiej składowej głównej, stwierdzono u nich relatywnie duże wartości dla liczby opadania, liczby dni do kłoszenia i dojrzałości, plonu ziarna, masy ziarna z kłosa i porażenia chorobami liści (małe porażenie), a także poniżej średniej ogólnej wartości dla masy 1000 ziaren. Potwierdzają to średnie grupowe tych cech, podane w tabeli 5. Te relacje wartości cech obiektów w grupie 2 wynikają z siły i znaku korelacji z pierwszymi dwiema składowymi głównymi (tab. 4). Obiekty w grupie 9 (najbardziej odstające od pozostałych) miały najniższe (ujemne) wartości pierwszej składowej głównej i jedne z najwyższych wartości drugiej składowej głównej. Wyróżniały się one relatywnie długim okresem do kłoszenia i dojrzałości i niską masą 1000 ziaren oraz relatywnie dużą wysokością roślin, co przedstawia tabela 5. Grupa 3 zawierała przede wszystkim obiekty o dużej liczbie opadania i plonie ziarna, które posiadają najwyższe wartości dla pierwszej składowej głównej (cechy stosunkowo silnie skorelowane z tą składową główną), a także krótkim okresem wegetacji (niskie wartości dla drugiej składowej głównej). Niskimi roślinami były przede wszystkim obiekty należące do grupy 1 oraz 8, obiekty te posiadały niskie wartości dla cech ujemnie skorelowanych z trzecią składową główną.

Wśród 149 ocenianych obiektów w kolekcji roboczej występują takie, które znacznie odbiegają od średnich wartości zarówno dla pierwszej, drugiej jak i trzeciej składowej głównej. Analizując rysunki 2 i 3 możemy takie obiekty wyłonić. Należały one przeważnie do grupy 3, 8 i 9. Obiekty z tych grup różnią się najbardziej od innych badanych obiektów w kolekcji, odznaczając się kontrastowymi poziomami cech najsilniej skorelowanych z dwiema pierwszymi składowymi głównymi, tzn. cech o relatywnie największej mocy dyskryminacyjnej (tj. plon ziarna, masa ziaren z kłosa, masa 1000 ziaren, liczba opadania, liczba dni do kłoszenia i dojrzałości, a także oporność na porażenie przez choroby liści). Mogą one zostać wykorzystane jako komponenty rodzicielskie w trakcie hodowli nowych odmian pszenicy jarej. Przede wszystkim są to następujące obiekty Alkora, Erwin, HEC 425/93, HEC 493, HEC 587/87, KRJ 4/95, KRJ 9/95, M 203/78, M 70/78, Remus.

WNIOSKI

Wykorzystanie najlepszych liniowych nieobciążonych predyktorów (estymatorów BLUP) dla średnich genotypowych badanych cech na podstawie danych niekompletnych w tablicy dwukierunkowej o postaci obiekty $\times$ lata, pozwala efektywnie i poprawnie pod względem statystycznym, zastosować wielocechowe metody oceny fenotypowej

różnorodności obiektów, zgromadzonych w kolekcjach zasobów genowych lub kolekcjach roboczych.

Obydwie metody wielocechowe (analiza skupień i analiza składowych głównych), uzupełniają się wzajemnie (są komplementarne) w efektywnej ocenie różnorodności fenotypowej obiektów, zgromadzonych w kolekcjach zasobów genowych. Taka ocena dostarcza informacji, które mogą być wykorzystane do lepszego zarządzania kolekcją zasobów genowych lub kolekcją roboczą, a także ułatwia wykorzystanie obiektów z takich kolekcji w hodowli roślin do wyboru form rodzicielskich.

Badana kolekcja robocza pszenicy jarej odznaczała się dużą zmiennością fenotypową obiektów dla rozpatrywanych cech rolniczych - zastosowanie analizy skupień i analizy składowych głównych pozwalają na wyróżnienie grup obiektów interesujących pod względem cech plonotwórczych i odpornościowych.

Cennymi obiektami, które z mogą przyczynić się do postępu hodowlanego pszenicy jarej są Alkora, Erwin, HEC 425/93, HEC 493, HEC 587/87, KRJ 4/95, KRJ 9/95, M 203/78, M 70/78, Remus. Cechy takie jak plon ziarna, masa ziarna z kłosa, liczba opadania i stopień porażenia przez choroby liścia posiadały największy udział w wielocechowej zmienności zgromadzonych w kolekcji roboczej pszenicy jarej obiektów.

LITERATURA

- Assefa K., Tefera H., Merker A., Kefyalew T., Hundera F. 2001. Quantitative trait diversity in tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) germplasm from Central and Northern Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 53 — 61.
- Bennett S. J. 2000. Genetic variation of five species of *Trifolium* L. from south-west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 81 — 91.
- Brown-Guedira G. L., Thompson J. A., Nelson R. L., Warburton M. L. 2000. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American Ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40: 815 — 823.
- Casler M. D., van Santen E. 2000. Patterns of variation in a collection of meadow fescue accessions. *Crop Sci.* 40: 248 — 255.
- Crossa J., Franco J. 2004. Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica* 153: 19 — 37.
- Damanian A. D. 2008. History, achievements, and current status of genetic resources conservation. *Agron. J.* 100: 9 — 21.
- DeLacy J.H., Skovmand B., Huerta J. 2000. Characterization of Mexican wheat landraces using agronomically useful attributes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 591 — 602.
- Hailu F., Merker A., Harjit-Singh., Belay G., Johansson E. (2006) Multivariate analysis of diversity of tetraploid wheat germplasm from Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1089 — 1098
- Hartung K., Piepho H. P. 2005. A threshold model for multiyear genebank data based on different rating scales. *Crop Sci.* 45: 1045 — 1051.
- Hartung K., Piepho H. P., Knapfner H. 2006. Analysis of genebank evaluation data by using geostatistical methods. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 737 — 751.
- Jahufer M. Z. Z., Cooper M., Harch B. D. 1997. Pattern analysis of the diversity of morphological plant attributes and herbage yield in a world collection of white clover (*Trifolium repens* L.) germplasm characterised in a summer moisture stress environment of Australia. *Genetic resources and crop evolution* 44: 289 — 300.
- Johnson R. A., Wichern D. W. 2002. Applied multivariate statistical analysis. Prentice – Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ.

- Kubicka H., Mądry W., Sieczko L., Komar L., Puchalski J. 2004. Wielowymiarowa analiza różnorodności genotypowej linii wsobnych żyta ozimego (*Secale cereale* L.) dla cech rolniczych i fenologicznych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. Seria A 497: 375 — 389.
- Littell R. C., Milligan G.A., Stroup W. W., Wolfinger R.D., Schabenberger O. 2006. SAS for mixed models. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Manjunatha T., Bisht I. S., Bhat K. V., Singh B. P. 2007. Genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) landraces from Uttaranchal Himalaya of India. Genetic resources and crop evolution 54: 55 — 65.
- Mapes C., Caballero J., Espitia E., Bye R.A. (1996) Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: evolutionary tendencies under domestication. Genetic resources and crop evolution 43: 283 — 290.
- Martinez-Calvo J., Gisbert A. D., Carmen Alamar M., Hernandorena R., Romeo C. 2007. Study of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by multivariate analysis. Genetic Resources and Crop Evolution 55: 695 — 703.
- Mazurkiewicz B., Struś M. (1997) Kolekcje robocze pszenicy ozimej jako czynnik postępu hodowlanego. Biuletyn IHAR 204: 81 — 87.
- Mądry W. 2007. Metody statystyczne do oceny różnorodności fenotypowej dla cech ilościowych w kolekcjach roślinnych zasobów genowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 517:21 — 41.
- Mohammadi S. A., Prasanna B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants — salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43: 1235 — 1248.
- Okpul T., Singh D., Gunua T., Wagih M. E. 2004. Assessment of diversity using agro-morphological traits for selecting a core sample of Papua New Guinea taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) collection. Genetic Resources and Crop Evolution 51: 671 — 678.
- Piepho H. P., Mohring J. 2005. Best Linear Unbiased Prediction of cultivar effects for subdivided target regions. Crop Sci. 45:1151 — 1159.
- Robinson G. K. 1991. That BLUP is a good thing: the estimation of random effects Statistical Science 6:15 — 51.
- Ruiz M., Ravela F., Carrillo J. M. 1997. Analysis of the discriminating power of agro-morphological and biochemical descriptors in a sample of the Spanish collection of barley (*Hordeum vulgare* L.). Genetic Resources and Crop Evolution 44: 247 — 255.
- SAS Institute Inc. (2004) SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC.
- Sorrells M. E. 2007. Application of new knowledge, technologies, and strategies to wheat improvement. Euphytica 157: 299 — 306.
- Upadhyaya H. D., Ortiz R., Bramel P. J., Singh S. 2003. Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. Genetic Resources and Crop Evolution 50:139 — 148.
- Žáková M., Benková M. 2006. Characterization of spring barley accessions based on multivariate analysis. Commun. Biometry Crop Sci. 1 (2): 124 — 134.

MARCIN STUDNICKI¹**WIESŁAW MĄDRY**¹**TADEUSZ ŚMIAŁOWSKI**²¹ Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki, SGGW Warszawa² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Zbożowych w Krakowie

Porównanie efektywności metod statystycznych tworzenia kolekcji podstawowej na przykładzie pszenicy jarej

Comparison of statistical methods to development of a core collection for a spring wheat collection

Kolekcje podstawowe powstają z ograniczonej liczby obiektów zgromadzonych dotychczas w kolekcji zasobów genowych, wybranych tak aby reprezentowały zmienność całej kolekcji. Celem tworzenia kolekcji podstawowych jest efektywniejsze wykorzystanie aktualnie zgromadzonych zasobów genowych w programach hodowlanych roślin. Celem pracy było zaprezentowanie, a także ocena efektywności różnych metod wyboru obiektów, metod grupowania i wielkości kolekcji podstawowych. W pracy, kolekcje podstawowe, powstały w oparciu o kolekcję roboczą pszenicy jarej, zgromadzoną w Zakładzie Roślin Zbożowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie. 196 obiektów pszenicy jarej było ocenionych pod względem 10 cech fenotypowych w latach 1996–2001. Kolekcja podstawowa pszenicy jarej powstała w wyniku trzyetapowego podejścia. W pierwszej kolejności przeprowadzono grupowanie 196 obiektów. Oceniono dwie metody analizy skupień — metodę Warda i metodę UPMGA (średniej odległości między obiektami w skupieniach). W drugim kroku wyznaczono liczbę obiektów wchodzących do kolekcji podstawowej z wcześniej wyznaczonych grup. W pracy zastosowano dwa podejścia metodę proporcjonalną i metodę logarymiczną. W ostatnim etapie wybrano obiekty z kolekcji wyjściowej do tworzonej kolekcji podstawowej. Wielkość utworzonych kolekcji podstawowych wynosiła 10%, 15%, 20%, 25% i 30% kolekcji wyjściowej. Procent istotnie zróżnicowanych średnich oraz procent istotnie zróżnicowanych wariancji, zostały wykorzystane do wskazania najbardziej efektywnej metody wyboru obiektów, techniki grupowania i wielkości utworzonych kolekcji podstawowych.

Słowa kluczowe: analiza skupień, kolekcje podstawowe, pszenica jara, zasoby genowe roślin uprawnych

A core collection consists of a limited number of the accessions gathered in an existing collection, chosen to represent the genetic variability within the whole collection of plant genetic resources. The purpose of creating core collections is to improve the utilization of genetic resources in crop improvement programs. The aim of this work was both to present and evaluate different procedures of sampling and clustering and to assess the size of core collections. This paper describes the development of a core subset of the spring wheat germplasm collection maintained at the Department of Cereal

Breeding and Quality Evaluation of the Plant Breeding and Acclimatization Institute in Kraków. 196 accessions of spring wheat were evaluated for 10 phenotypic traits in the seasons 1996–2001. The spring wheat core collection was established in three steps. In the first step a total of 196 accessions were stratified into homogenous groups. Two methods of cluster analysis: Ward's method and UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) were comparatively used. In the second step, a number of entries per group was determined. Two strategies: proportional and logarithmic were used. In the final step of establishing core collections the actual entries were chosen. Five core collections contained 10%, 15%, 20%, 25% and 30% of objects from the whole collection. The mean percentage difference (MD%) and the variance difference percentage (VD%) were applied for screening optimal sampling strategy, cluster methods and size of core collections.

Key words: cluster analysis, core collections, plant genetic resources, spring wheat

WSTĘP

Kolekcje roślinnych zasobów genowych, zwane też bankami genów, zakładane są na całym świecie, zabezpieczają istniejącą zmienność biologiczną roślin uprawnych i roślin spokrewnionych z nimi oraz innych ważnych roślin, w celu jej długoterminowego zabezpieczenia, oceny oraz przekazania dla potrzeb hodowców i innych badaczy. Od ponad 30 lat obserwujemy rozwój działalności na rzecz zasobów genowych, która polega przede wszystkim na systematycznym włączaniu nowych obiektów do kolekcji. W wyniku tych działań wiele kolekcji roślinnych zasobów genowych staje przed problemami związanymi z dużą liczbą zgromadzonych obiektów, polegającymi na trudnościach w realizacji podstawowych celów, dla jakich zostały one stworzone (Brown 1989; Frankel, 1984; Frankel i Brown, 1984; van Hintum i in., 2000). Utrzymanie dużych kolekcji przyczynia się do powstawania trudności w zachowaniu na odpowiednim poziomie żywotności zgromadzonych obiektów, utrudnione jest także pełne i właściwe wykorzystanie zgromadzonej tam zmienności przez hodowców i badaczy. Prowadzenie bardzo licznych kolekcji jest często nieuzasadnione ekonomicznie i trudne organizacyjnie (Frankel, 1984; Frankel i Brown, 1984).

W celu rozwiązania problemów związanych z dużą liczbą obiektów w kolekcjach zasobów genowych roślin uprawnych, proponuje się tworzenie kolekcji podstawowych (ang. core collection). Kolekcja podstawowa powstaje z określonego wyboru pewnej liczby obiektów spośród znajdujących się w kolekcji wyjściowej zasobów genowych (kolekcji aktualnie zgromadzonej), zwanej też kolekcją całkowitą (Frankel i Brown, 1984). Wybór obiektów powinien być tak przeprowadzony, aby reprezentowały one dobrze zmienność fenotypową i genotypową kolekcji wyjściowej, zawartą w stosunkowo małej liczbie obiektów. Kolekcje podstawowe tworzy się metodami próby warstwowej (Brown, 1989; Frankel i Brown, 1984; van Hintum i in., 2000).

Opracowano wiele technik służących do tworzenia kolekcji podstawowych, wykorzystują one różne kryteria oceny zmienności zgromadzonych obiektów. Stosowana jest ocena różnorodności fenotypowej, ocena zmienności genotypowej w oparciu o markery molekularne, a także ocena zmienności na podstawie danych ekologiczno-geograficznych (Balakrishnan i in., 2000; Crossa i in., 2005; Ghamkhar i in., 2008; Hu i in., 2000; Upadhyaya i in., 2007; van Hintum i in., 2000; Xu i in., 2006).

Celem pracy było badanie efektywności 8 technik statystycznych proponowanych do tworzenia kolekcji podstawowej, na podstawie obserwacji cech fenotypowych hodowlanej kolekcji roboczej pszenicy jarej. Każdą technikę stosowano dla pięciu wielkości kolekcji podstawowej, tj. 10, 15, 20, 25 i 30% kolekcji wyjściowej.

MATERIAŁ I METODY

Opis kolekcji wyjściowej

Materiałem źródłowym, stanowiącym kolekcję wyjściową do tworzenia kolekcji podstawowych za pomocą badanych technik statystycznych, była kolekcja robocza pszenicy jarej, zgromadzona i prowadzona dla celów hodowlanych w Zakładzie Roślin Zbożowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie. Kolekcja wyjściowa zawierała 196 obiektów, które były zarówno liniami hodowlanymi przekazanymi przez hodowców z różnych ośrodków, odmianami zarejestrowanymi w Polsce i zagranicą, jak i obiektami uzyskanymi z różnych banków genów. Doświadczenia polowe z tymi obiektami przeprowadzono w latach 1996–2001 w miejscowości Kończewice, położonej w województwie kujawsko-pomorskim, w powiecie toruńskim w gminie Chełmża, na terenie oddziału Spółki Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. należącej do Grupy IHAR. Materiał siewny z każdego obiektu wysiano na pojedynczych (jednopowtórzeniowych) poletkach o powierzchni 10 m². Poszczególne obiekty były badane przez różną liczbę lat, od 2 do 6. Zatem, jednostki doświadczalne (poletka) w całym doświadczeniu stanowiły niekompletną klasyfikację podwójną o postaci obiekty × lata, z co najwyżej jedną obserwacją w podklasie.

W trakcie doświadczenia obserwowano 10 ilościowych cech rolniczych. Na polu oceniano liczbę dni od 1.V. do terminu kłoszenia i dojrzałości oraz wysokość roślin. Pomiary te dokonywano na podstawie obserwacji 50 roślin losowo wybranych z poletka. W czasie wegetacji roślin określono porażenie chorobami liści i porażenie chorobami kłosa, według 9-stopniowej skali bonitacyjnej (porządkowej). W czasie zbioru określono plon ziarna z poletka i jego składowe — liczbę ziaren z kłosa, masę ziaren z kłosa i masę 1000 ziaren. Oceniano także cechę technologiczną ziarna, tj. procentową zawartość białka w ziarnie, oznaczoną metodą bliskiej podczerwieni NIR.

Metody statystyczne do tworzenia kolekcji podstawowych

Ocena średnich i parametrów zmienności badanych cech w kolekcji wyjściowej

Obserwacje badanych cech 196 obiektów w niekompletnej klasyfikacji podwójnej o postaci obiekty × lata z co najwyżej jedną obserwacją w podklasie, były analizowane na podstawie następującego modelu mieszanego analizy wariancji (Hartung i Piepho, 2005; Littell i in., 2006; Piepho i Mohring, 2005):

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

gdzie:

y_{ij} — jest obserwacją danej cechy u i -tego obiektu ($i = 1, \dots, a$) w j -tym roku ($j = 1, \dots, b$),

m — jest średnią ogólną,

g_i — jest losowym efektem głównym i -tego obiektu,

r_j — jest stałym efektem głównym j -tego roku,

e_{ij} — jest składnikiem losowym, obejmującym efekty interakcji obiekt x rok oraz błąd doświadczalny,

Ze względu na niekompletność sklasyfikowanych danych, losowe efekty główne dla obiektów g_i , dotyczące każdej cechy, zostały oszacowane za pomocą najlepszych nie-obciążonych liniowych predyktorów, nazywanych BLUP (ang. the best linear unbiased predictor) (Hartung i Piepho, 2005; Piepho i Mohring, 2005). W celu wyznaczenia estymatorów BLUP zastosowano metodę największej wiarygodności z restrykcją REML (ang. Restricted Maximum Likelihood). Oceny typu BLUP dla efektów obiektowych g_i każdej cechy posłużyły do wyznaczenia ocen średnich genotypowych, według wzoru:

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

gdzie:

$\hat{m}_i$ jest nieobciążoną oceną średniej genotypowej dla danej cechy (oceną średniej cechy w populacji lat) dotyczącej i -tego obiektu, $\hat{m}$ jest oceną średniej ogólnej, $\hat{g}_i$ jest oceną BLUP losowego efektu głównego, dotyczącego i -tego obiektu.

Tak wyznaczone średnie genotypowe, $\hat{m}_i$, dla każdej cechy zostały wykorzystane do oceny średnich i zmienności cech w kolekcji roboczej, stanowiącej kolekcję wyjściową oraz do dalszych prac nad utworzeniem kolekcji podstawowych.

Opis technik statystycznych do tworzenia kolekcji podstawowych

Techniki te były kombinacjami metod lub kryteriów, stosowanych w każdym z trzech etapów tworzenia kolekcji podstawowej. Dla pierwszego etapu, polegającego na grupowaniu obiektów jednorodnych (tworzenie warstw w próbie reprezentatywnej) zastosujemy dwie metody hierarchicznej analizy skupień, tj. metodę UPGMA - średniej odległości między obiektami w skupieniach (ang. unweighted pair group method with arithmetic mean) oraz metodę Warda. Metoda UPGMA była efektywnie stosowana między innymi przez Ghamkhar i wsp. (2008), Hu i wsp. (2000), Xu i wsp. (2006) i Li i wsp. (2004). Metoda Warda jest oparta na statystycznym kryterium minimalizacji sumy kwadratów odchyleń wewnątrz grup (ang. error sum of squares — ESS). Stosowana była do tworzenia kolekcji podstawowych w wielu pracach (van Hintum i in., 2000; Crossa i Franco, 2004; Crossa i in., 2005; Hu i in., 2000; Xu i in., 2006; Li i in., 2004; Balakrishnan i in., 2000; Mahalakshmi i in., 2007; Padilla i in., 2007). W obu metodach analizy skupień oparto się na macierzy kwadratów odległości euklidesowej (Crossa i Franco, 2004). Natomiast, przecięcie dendrogramu następowało w miejscu, które odpowiadało liczbie grup (skupień), wyjaśniającej dominującą część (około 70%) całkowitej sumy kwadratów odchyleń między obiektami (Casler i van Santen, 2000; Mahalakshmi i in., 2007).

Drugi etap polega na wyznaczaniu liczby obiektów z każdej grupy (warstwy), wchodzących w skład kolekcji podstawowej. Zastosujemy w nim dwa kryteria, tj. kryterium proporcjonalności (P) i logarytmicznej proporcjonalności (L), które zaproponował Brown (1989). Według kryterium proporcjonalności z poszczególnych grup bierze się liczbę obiektów wchodzących do kolekcji podstawowych, która jest taką samą frakcją (częścią) liczby obiektów w grupie, jak frakcja obiektów z całej kolekcji wyjściowej, przechodzącej do kolekcji podstawowej. Zatem, im większa jest grupa jednorodna, tym więcej obiektów z niej przejdzie do tworzonej kolekcji podstawowej. Według kryterium

logarytmicznej proporcjonalności liczba obiektów z każdej grupy, przeznaczonych do kolekcji podstawowej jest taką samą frakcją logarytmu liczby obiektów w grupie, jak frakcja obiektów z całej kolekcji wyjściowej. Zatem, przy użyciu kryterium logarytmicznej proporcjonalności grupy mniej liczne są liczniej reprezentowane w kolekcji podstawowej, niż przy użyciu kryterium proporcjonalności (Brown, 1989; van Hintum i in., 2000).

W trzecim etapie przeprowadzony jest wybór obiektów z poszczególnych grup, o wyznaczonej liczebności (w drugim etapie), do tworzonej kolekcji podstawowej. W tej pracy stosowano dwie metody wyboru obiektów z grup (ang. sampling strategies), tj. metodę całkowicie losowego wyboru (van Hintum i in., 2000) oraz metodę preferowanego wyboru obiektów, w której badacz tworzący kolekcję podstawową subiektywnie decyduje jakie obiekty w grupach mają być wybrane. W klasycznym podejściu do metody preferowanego wyboru istnieje kilka kryteriów, pozwalających podjąć decyzję, który obiekt zostanie przekazany do kolekcji podstawowej, np.: wybierane są takie obiekty, które posiadają wartości skrajne (maksymalne lub minimalne) dla jednej lub kilku ocenianych cech (Li i in., 2004; van Hintum i in., 2000; Xu i in., 2006). Aby zobiektywizować ten sposób wyboru obiektów do kolekcji podstawowej, zaproponowaliśmy jako kryterium wyboru wartość pierwszej zmiennej kanonicznej obliczoną dla obiektów w kolekcji wyjściowej. Analiza zmiennych kanonicznych pozwala zidentyfikować cechy o dużym znaczeniu w wielocechowym różnicowaniu grup (Krzanowski, 1993). Do kolekcji podstawowej włączono obiekty o skrajnych (maksymalnych i minimalnych) wartościach pierwszej zmiennej kanonicznej.

W wyniku skojarzenia każdej z dwóch metod lub kryteriów, stosowanych w poszczególnych etapach tworzenia kolekcji podstawowej, uzyskano 8 technik statystycznych, których efektywność badano dla każdej z pięciu wielkości kolekcji podstawowej, tj. 20 obiektów (frakcja 10,2% kolekcji wyjściowej), 30 obiektów (frakcja 15,3% kolekcji wyjściowej), 40 obiektów (frakcja 20,4% kolekcji wyjściowej), 50 obiektów (frakcja 25,51% kolekcji wyjściowej) oraz 60 obiektów (frakcja 30,61% kolekcji wyjściowej). Zatem, zastosowano 40 postępowań (procedur) przy tworzeniu kolekcji podstawowych, powstałych jako kombinacje 5 wymienionych wielkości kolekcji podstawowych, dwóch metod wielocechowej analizy skupień (metoda UPMGA, metoda Warda), dwóch kryteriów wyznaczenia liczby obiektów z poszczególnych grup, wchodzących w skład kolekcji podstawowej (kryterium proporcjonalności – P, kryterium logarytmicznej proporcjonalności – L), a także dwóch metod wyboru obiektów z każdej grupy (wyboru losowego, wyboru preferowanego opartego na pierwszej zmiennej kanonicznej). Za pomocą każdej procedury utworzono jedną kolekcję podstawową.

Ocena efektywności 40 procedur przy tworzeniu kolekcji podstawowych

Ocenę efektywności i skuteczności badanych 40 procedur do tworzenia kolekcji podstawowych oparto na 2 kryteriach, stosowanych w wielu pracach (Hu i in., 2000; Li i in., 2004; Xu i in., 2006). Pierwszym z nich był procent istotnie zróżnicowanych średnich – MD%. Kryterium to opisuje procent liczby cech dla których stwierdzono istotnie zróżnicowanie średnich pomiędzy kolekcją wyjściową a kolekcją podstawową. Kolekcja podstawowa lepiej przenosi zmienność kolekcji wyjściowej, gdy wartość tego parametru jest bliższa zeru. Kryterium nie powinno przekraczać 20% cech istotnie zróżnicowanych,

aby uznać kolekcję podstawową za dobrze reprezentującą wielocechową zmienność aktualnie zgromadzonych obiektów (Hu i in., 2000). W celu zbadania istotności różnicy średnich pomiędzy kolekcją wyjściową a kolekcją podstawową, zastosowano test t-Studenta (Hu i in., 2000; Li i in., 2004; Xu i in., 2006), w przypadku nie stwierdzenia istotnego zróżnicowania wariancji dla cech w kolekcji wyjściowej i kolekcji podstawowej (spełnienia jednego z warunków do stosowania testu t-Studenta). W przeciwnym przypadku, zastosowano test t-Studenta z aproksymacją Cochra i Coxa (SAS Institute Inc. 2004).

Drugim zastosowanym kryterium do oceny efektywności proponowanych procedur tworzenia kolekcji podstawowej, był procent istotnie zróżnicowanych wariancji — VD%, opisujący procent liczby badanych cech dla których stwierdzono istotnie zróżnicowane wariancje pomiędzy kolekcją wyjściową a wyznaczoną kolekcją podstawową. Im niższa jest wartość tego kryterium (bliższa zero), tym kolekcja podstawowa lepiej reprezentuje wielocechową zmienność aktualnie zgromadzoną kolekcję zasobów genowych roślin uprawnych. Istotność różnicy wariancji pomiędzy kolekcją podstawową a wyjściową, zbadano za pomocą testu F (Hu i in. 2000, Li i in. 2004, SAS Institute Inc. 2004, Xu i in. 2006).

Aby obiektywnie wskazać, która z metod tworzenia kolekcji podstawowych, stosowanych w różnych etapach, istotnie różnicuje skuteczność (reprezentatywność kolekcji) zastosowano czteroczynnikową analizę wariancji. Badanymi czynnikami były trzy metody (lub kryteria) statystyczne oraz wielkość kolekcji podstawowej, zaś zmiennymi zależnymi były dwa stosowane kryteria efektywności procedur, tj. MD% i VD%.

Wszystkie obliczenia numeryczne wykonano za pomocą pakietu statystycznego SAS 9.1 (Littell i in., 2006; SAS Institute Inc., 2004). Wykorzystano następujące procedury statystyczne: MIXED — do estymacji efektów obiektowych g_i typu BLUP; CLUSTER — do przeprowadzenia analizy skupień metodą Warda i UPGMA; CANDISC — do wyznaczenia pierwszej zmiennej kanonicznej; TTEST — do wyznaczenia MD% oraz VD%, jako kryterium oceny efektywności procedur do tworzenia kolekcji podstawowej.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 zaprezentowano charakterystykę zmienności kolekcji roboczej pszenicy jarej (kolekcja wyjściowa) pod względem 10 ocenianych cech, na podstawie ocen średnich genotypowych otrzymanych za pomocą estymatorów typu BLUP dla wszystkich 196 obiektów. Największą zmiennością obiektową charakteryzowała się liczba dni do kłoszenia (współczynnik zmienności CV był równy 20,14%) oraz plon ziarna (współczynnik zmienności CV był równy 8,08%). Najmniejszą zmiennością charakteryzowały się następujące cechy: liczba dni do dojrzałości (współczynnik zmienności CV był równy 1,81%), zawartość białka w ziarnie (współczynnik zmienności CV był równy 3,56%). Wartość średnią plonu ziarna z poletka oszacowano na poziomie 67,1 dt/ha, natomiast kształtował się on w zakresie od 44,10 dt/ha do 79,16 dt/ha. Średnia wysokość 196 obiektów pszenicy jarej wynosiła 95,54 cm, minimalną zaobserwowaną wartość to 70,35 cm, natomiast maksymalną wartość to 111,53 cm. Kolekcja robocza pszenicy jarej

charakteryzowała się dużą zmiennością badanych cech, może się okazać doskonałym źródłem komponentów rodzicielskich w trakcie hodowli nowych odmian. Zwłaszcza dla takich cech jak długość okresu wegetacji i plon ziarna z poletka. Przyczyniając się jednocześnie do postępu biologicznego i hodowlanego w obrębie tego gatunku.

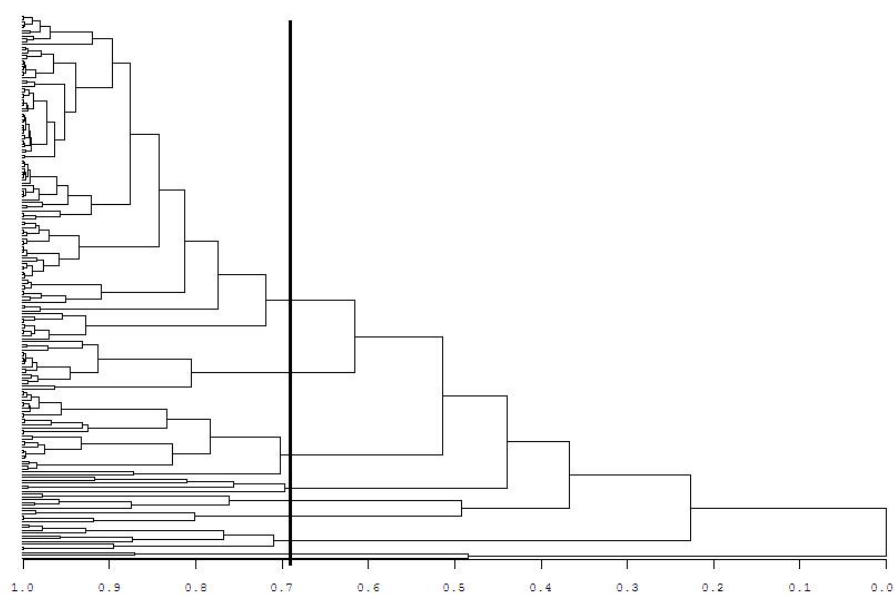
Tabela 1

Charakterystyka zmienności kolekcji roboczej pszenicy jarej pod względem 10 cech
Characteristics of variability of 10 traits in a spring wheat collection

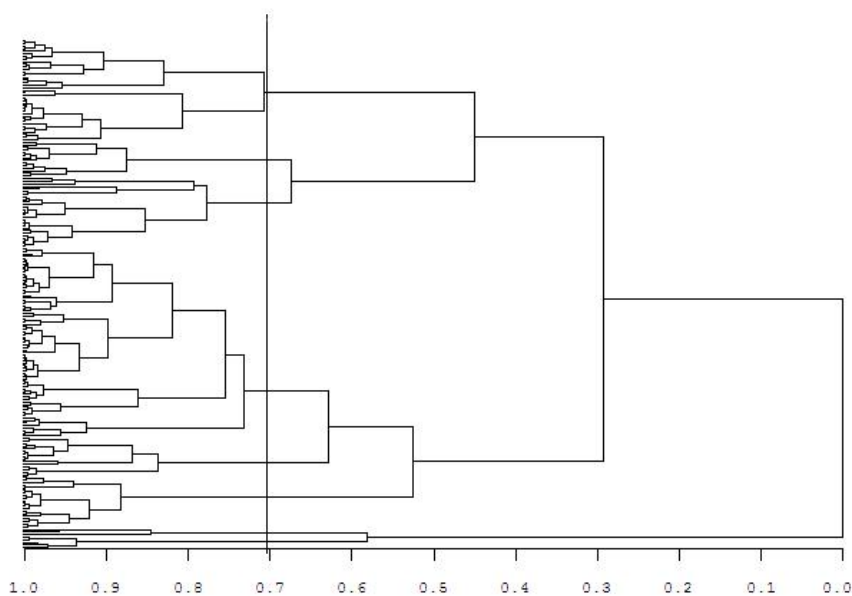
Cechy Traits	Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik Zmienności Coefficient of variability	Min	Max
Zawartość białko w ziarnie Protein content in grain	13,38	0,48	3,56	12,09	15,44
Liczba dni do dojrzałości Number of days to maturity	107,05	1,94	1,81	102,56	111,14
Liczba dni do kłoszenia Number of days to heading	13,38	2,69	20,14	6,94	19,93
Plon ziarna z poletka Grain yield	67,1	5,42	8,08	44,10	79,16
Wysokość rośliny Plant height	95,54	6,43	6,73	70,35	111,53
Liczba ziaren w kłosie Number of grains per spike	39,46	2,82	7,15	32,02	47,25
Masa ziaren w kłosie Weight of grains per spike	1,64	0,12	7,19	1,20	1,97
Masa 1000 ziaren 1000 grain weight	41,57	3,14	7,55	34,55	49,56
Porażenie chorobami liści Resistance to leaf diseases	5,02	0,39	7,69	3,82	6,01
Porażenie chorobami kłosa Resistance to spike diseases	6,1	0,44	7,18	4,62	6,94

W wyniku pierwszego etapu tworzenia kolekcji podstawowej, analizy skupień metodą UPGMA, 196 obiektów kolekcji wyjściowej zostało podzielonych na 9 grup jednorodnych. Przy takiej liczbie grup jednorodnych sumy kwadratów odchyłeń pomiędzy grupami wyjaśniły 70% całkowitej sumy kwadratów odchyłeń. Na rysunku 1 przedstawiono dendrogram podziału 196 obiektów pszenicy jarej, wraz z miejscem jego przecięcia, wykorzystując metodę UPGMA. Liczebność wyznaczonych grup kształtowała się w zakresie od 117 obiektów w grupie pierwszej, do 1 obiektu w grupie dziewiątej.

Natomiast analiza skupień metodą Warda pozwoliła wyznaczyć w kolekcji wyjściowej pszenicy jarej 8 grup jednorodnych. Podział na taką liczbę grup pozwoliła międzygrupowej sumie kwadratów odchyłeń dla wszystkich ocenianych cech wyjaśnić 71% całkowitej sumy kwadratów odchyłeń. Proces aglomeracji z wykorzystaniem tej metody 196 obiektów pszenicy jarej został zaprezentowany w postaci dendrogramu na rysunku 2. Największa liczba obiektów zostało zgromadzonych w grupie pierwszej — 73, najmniejszą liczbę obiektów stwierdzono w grupie ósmej — 3 obiekty pszenicy jarej.



Rys. 1. Dendrogram uzyskany za pomocą metody UPMGA analizy skupień dla 196 obiektów pszenicy jarej
Fig. 1. Dendrogram generated using UPMGA cluster analysis for 196 accessions



Rys. 2. Dendrogram uzyskany za pomocą metody Warda analizy skupień dla 196 obiektów pszenicy jarej
Fig. 2. Dendrogram generated using Ward's cluster analysis for 196 accessions

W tabeli 2 zaprezentowano wyniki analizy wariancji dla współczynnika istotnie zróżnicowanych średnich MD%. Stwierdzono istotny wpływ współdziałania pomiędzy rodzajem wykorzystywanej analizy skupień a sposobem wyboru obiektów ze skupień. Dla metody UPGMA lepszą (posiadała mniejszą wartość dla tego kryterium) okazała się metoda perforowanego wyboru obiektów do kolekcji podstawowej — średnia wartość badanego parametru wynosiła 2%. Natomiast dla metody Warda analizy skupień bardziej efektywną okazała się metoda losowego doboru obiektów ze skupień — średnia wartość badanego parametru 2%. Na podstawie tego parametru oceny efektywności technik służących do tworzenia kolekcji podstawowych, nie udało się stwierdzić innych zależności. Dla wszystkich utworzonych kolekcji podstawowych pszenicy jarej, procent istotnie zróżnicowanych średnich kształtował się w zakresie od 0 do 20%. Spełniając warunek opisany przez Hu i wsp. (2000) świadczący o dużej efektywności utworzonych kolekcji podstawowej i dobrze zachowujące zmienność biologiczną obiektów zgromadzonych w kolekcji wyjściowej. W dwudziestu czterech z pośród czterdziestu powstałych kolekcjach podstawowych nie stwierdzono istotnie różnych średnich, współczynnik MD% był równy zero. Parametr MD% w małym stopniu różnicował metody do tworzenia kolekcji podstawowych. Okazał się mało przydatny w badaniu efektywności technik statystycznych wykorzystywanych w trakcie naszych badań.

Tabela 2

Analiza wariancji dla procentu istotnie zróżnicowanych średnich MD%
Analysis of variance for the mean percentage difference MD%

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Średnie kwadraty Mean squares	F-emp
Analiza skupień — A Cluster analysis — A	1	40	1,1
Liczba obiektów z grup — B Number of entries per group — B	1	90	2,47
Sposób wyboru z grup — C Sampling strategy — C	1	40	1,1
Wielkość kolekcji podstawowej — D Size of core collection — D	4	18,75	0,51
A×B	1	10	0,27
A×C	1	360	9,87*
B×C	1	10	0,27
A×D	4	33,75	0,93
B×D	4	46,25	1,27
C×D	4	58,75	1,61
Błąd — Error	17	36,47	

*Istotne przy $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0.01$

W wyniku przeprowadzonej analizy wariancji dla współczynnika istotnie zróżnicowanych wariancji VD% (tab. 3), stwierdzono istotny wpływ sposobu wyboru liczby obiektów z liczby obiektów ze skupień. Bardziej efektywnym postępowaniem okazała się metoda proporcjonalna do wyznaczania liczby obiektów z grup, średnia wartość dla parametru VD% wynosiła 10,5% cech. Dla metody logarytmicznej, kryterium to oszacowano na poziomie 29%.

Tabela 3

Analiza wariancji dla procentu istotnie zróżnicowanych wariancji VD%
Analysis of variance for the variance difference percentage VD%

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Średnie kwadraty Mean squares	F-emp
Analiza skupień — A Cluster analysis — A	1	2,5	0,02
Liczba obiektów z grup — B Number of entries per group - B	1	3422,5	26,98*
Sposób wyboru z grup — C Sampling strategy — C	1	3802,5	29,97*
Wielkość kolekcji podstawowej — D Size of core collection — D	4	108,75	0,86
A×B	1	422,5	3,33
A×C	1	62,5	0,49
B×C	1	2722,5	21,46*
A×D	4	158,75	1,25
B×D	4	566,25	4,46*
C×D	4	8,75	0,07
A×B×C	1	62,5	0,49
Błąd — Error	16	126,875	

*Istotne przy $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0.01$

W tabeli 4 zaprezentowano porównanie pomiędzy tymi dwiema zastosowanymi metodami wyznaczenia liczebności obiektów z poszczególnych grup. W kolekcjach podstawowych tworzonych z wykorzystaniem metody logarytmicznej, większe znaczenie (więcej obiektów z takiej grup zostało włączonych to kolekcji podstawowej) odgrywały obiekty pochodzące z grup mniej licznych. Obiekty w grupach o małej liczebności charakteryzują się bardzo dużą jednorodnością (są wielocechowo bardzo podobne do siebie). Takie postępowanie wpływa na zubożenie zmienności w powstałej kolekcji podstawowej. Do kolekcji podstawowej włączane są obiekty podobne, nie wnoszące nowej zmienności. Powstałe kolekcje podstawowe, w których do wyznaczania liczby obiektów z grup wykorzystano metodę logarytmiczną słabo reprezentują kolekcję wyjściową, o czym świadczy wysoka wartość parametru VD%.

Tabela 4

Przykład wyznaczenia liczby obiektów z grup do kolekcji podstawowej z zastosowaniem metody proporcjonalnej i logarytmiczno-proporcjonalnej, jeśli należy wybrać 60 z 196 obiektów kolekcji roboczej pszenicy jarej. (analiza skupień — metoda Warda)

Allocation of entries from groups to a core collection according to the proportional and logarithmic method, if 60 entries are to be selected from 196 accessions (cluster analysis — Ward's method)

Grupa Group	Liczebność No. of accessions	Metoda proporcjonalna Proportional method	Metoda logarytmiczna Logarithmic method
1	73	22	12
2	39	12	10
3	27	8	9
4	20	6	8
5	15	5	7
6	14	4	7
7	5	2	4
8	3	1	3

Istotny wpływ na zróżnicowanie kryterium VD% posiadał również sposób wyboru obiektów z grup. Lepszą, bardziej efektywną była metoda losowego doboru obiektów do kolekcji podstawowej (wartość współczynnika VD% — 10%), od metody preferowanego doboru obiektów do kolekcji (wartość współczynnika VD% — 29,5%). Metoda preferowanego wyboru okazała się mniej efektywna, gorzej reprezentowała zmienność fenotypową kolekcji wyjściowej, podobnie jak w pracach Li i wsp. (2004), Xu i wsp. (2006). Zastosowanie obiektywnego kryterium, jakim była wartość dla pierwszej zmiennej kanonicznej, nie poprawiło efektywności rozpatrywanej techniki do tworzenia kolekcji podstawowej.

Stwierdzono również istotną interakcję pomiędzy sposobem wyznaczenia liczby obiektów z poszczególnych skupień i metodami wyboru obiektów do kolekcji podstawowej. Losowy wybór obiektów okazał się korzystniejszy zarówno dla proporcjonalnego podejścia do wyznaczenia liczby obiektów z grup (średnia wartość współczynnika VD% — 9%) oraz metody logarytmicznej (średnia wartość współczynnika VD% — 11%). Istotny wpływ na kształtowanie się wartości VD% stwierdzono dla współdziałania pomiędzy sposobem wyznaczania liczby obiektów z poszczególnych skupień a wielkością kolekcji podstawowej. Najkorzystniejszą wielkością kolekcji podstawowej dla logarytmicznego podejścia do wyznaczenia liczby obiektów ze skupień okazała się liczba obiektów stanowiącej 10% kolekcji wyjściowej. Natomiast podejścia proporcjonalnego optymalną wielkością była kolekcja podstawowa stanowiąca 50 obiektów z kolekcji wyjściowej (25% aktualnie zgromadzonej kolekcji wyjściowej).

Wartości średnie współczynnika VD% dla obydwu zastosowanych metod analizy skupień nie różniły się istotnie. Na efektywność technik do tworzenia kolekcji podstawowej nie miała wpływu zastosowana metoda analizy skupień. Metoda Warda w porównaniu z metodą UPGMA tworzy grupy o zbliżonej do siebie oraz o stosunkowo małej liczebności. A dzięki zastosowaniu w trakcie procesu aglomeracji kryterium statystycznego opartego na minimalizacji sumy kwadratów odchyłeń wewnątrz grup, powstałe grupy są bardziej jednorodne. Z tych ze względów jest to metoda bardziej optymalna do zastosowania w trakcie tworzenia kolekcji podstawowych roślin uprawnych (Crossa i Franco, 2004; Crossa i in., 2000; Li i in., 2004). Powszechnie i często stosowaną metodą analizy skupień jest metoda UPGMA, uznana przez Xu i wsp. (2006) za najbardziej efektywną w trakcie tworzenia kolekcji podstawowej. W celu pogrupowania obiektów w kolekcji wyjściowej (aktualnie zgromadzonej) oprócz metod analizy skupień wykorzystuje się również podział formalny obiektów (van Hintum i in., 2000). Najczęściej obiekty grupowane są ze względu na rejon występowania czy pochodzenie botaniczne. Mogą być także klasyfikowane na podstawie cech jakościowych badanych roślin np.: barwy owoców, kwiatów czy kształtu liści.

Wielkość tworzonych kolekcji podstawowych nie miała wpływu na stopień reprezentatywności kolekcji wyjściowej. Najmniejsze kolekcje podstawowe liczące 20 obiektów (10% kolekcji wyjściowej) w były tak samo efektywne jak duże kolekcje liczące 60 obiektów (30% kolekcji wyjściowej). Duża redukcja liczebności (o 90%) kolekcji wyjściowej pszenicy jarej, w małym stopniu wpływała na zubożenie zmienność fenotypowej zgromadzonych dotychczas zasobów genowych pszenicy jarej. Decyzja o

wielkości tworzonych kolekcji podstawowych jest uzależniona od liczebności kolekcji wyjściowej i celu dla którego one powstają. Brown (1989) proponuje aby kolekcje podstawowe stanowiły około 10% dotychczas zgromadzonych zasobów genowych. Większość tworzonych kolekcji podstawowych stanowiło od 5% do 25% kolekcji wyjściowej, dla przykładu międzynarodowa kolekcja podstawowa jęczmienia (The International Barley Core Collection) stanowi 0,3% zgromadzonych na świecie zasobów tego gatunku (van Hintum i in., 2000).

WNIOSKI

1. Zachowanie (reprezentatywność) różnorodności fenotypowej w kolekcji podstawowej pszenicy jarej było niezależne od jej wielkości, już najmniejsze kolekcje podstawowe (około 10% kolekcji wyjściowej) dobrze reprezentowały zmienność fenotypową całej kolekcji pszenicy jarej.
2. Zmienność fenotypową kolekcji wyjściowej najlepiej reprezentowały kolekcje podstawowe, w których liczbę obiektów ze skupień wyznaczano zgodnie z zasadą proporcjonalności.
3. Lepszym sposobem wyboru obiektów ze skupień okazała się metoda losowa.
4. Przeprowadzone badania nie uzasadniają zalecania jednej konkretnej procedury, spośród badanych, wiele z nich ma podobną efektywność.

LITERATURA

- Balakrishnan R., Nair N., Sreenivasan T. 2000. A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum* L. germplasm based on quantitative-morphological data. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 1 — 9.
- Brown A. H. D. 1989. Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31:818 — 824.
- Casler M. D., van Santen E. 2000. Patterns of variation in a collection of meadow fescue accessions. *Crop Sci.* 40: 248 — 255.
- Crossa J., Franco J. 2004. Statistical methods for classifying genotypes. *Euphytica* 153: 19 — 37.
- Crossa J., Franco J., Taba S., Shands H. 2005. A sampling strategy for conserving genetic diversity when forming core subsets. *Crop Science* 45: 1035 — 1044.
- Frankel O. H. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. *Genetic Manipulation: Impact on Man and Society*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankel O. H., Brown A.H.D. 1984. Plant genetic resources today: A critical appraisal. *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. Allen and Unwin, Massachusetts.
- Ghamkhar K., Snowball R., Wintle B. J., Brown A. H. D. 2008. Strategies for developing a core collection of bladder clover (*Trifolium spumosum* L.) using ecological and agro-morphological data. *Australian Journal of Agricultural Research* 59: 1103 — 1112.
- Hartung K., Piepho H. P. 2005. A threshold model for multiyear genebank data based on different rating scales. *Crop Sci.* 45:1045 — 1051.
- Hu J., Zhu J., Xu H. 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 264 — 268.
- Krzanowski W.J. 1993. Principles of multivariate analysis, a user's perspective. Clarendon Press, Oxford
- Li C. T., Shi C. H., Wu J. G., Xu H. M., Zhang H. Z., Ren Y. L. 2004. Methods of developing core collections based on the predicted genotypic value of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1172 — 1176.

- Littell R. C., Milligan G. A., Stroup W. W., Wolfinger R. D., Schabenberger O. 2006. SAS for mixed models. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Mahalakshmi V., Ng Q., Atalobhor J., Oguniola D., Lawson M., Ortiz R. 2007. Development of a West African yam *Dioscorea* spp. core collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 1817 — 1825.
- Padilla G., Carrea M. E., Ordas A. 2007. Comparison of several clustering methods in grouping kale landraces. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132: 387 — 395.
- Piepho H. P., Möhring J. 2005. Best Linear Unbiased Prediction of cultivar effects for subdivided target regions. *Crop Sci.* 45:1151 — 1159.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS OnlineDoc® 9.1.3 Cary, NC.
- Upadhyaya H., Dwivedi S., Gowda C., Singh S., 2007. Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. *Field Crops Research* 100: 320 — 326.
- van Hintum T., Brown A., Spillane C., Hodgkin T. 2000. Core collections of plant genetic resources. PGRI Technical Bulletin No. 3. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Xu H., Mei Y., Hu J., Zhu J., Gong P. 2006. Sampling a core collection of Island cotton (*Gossypium barbadense* L.) based on the genotypic values of fiber traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 515 — 521.

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 kłosek 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 kłosek 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

Dzikie 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.

Dzikie 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 $10,9^{\circ}\text{C}$, w maju $15,1^{\circ}\text{C}$, w czerwcu $19,2^{\circ}\text{C}$, w lipcu $18,5^{\circ}\text{C}$. 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 kłosków 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 kłosków 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 kłosków 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		18		15,7
Mean				
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 $\alpha = 0,05$

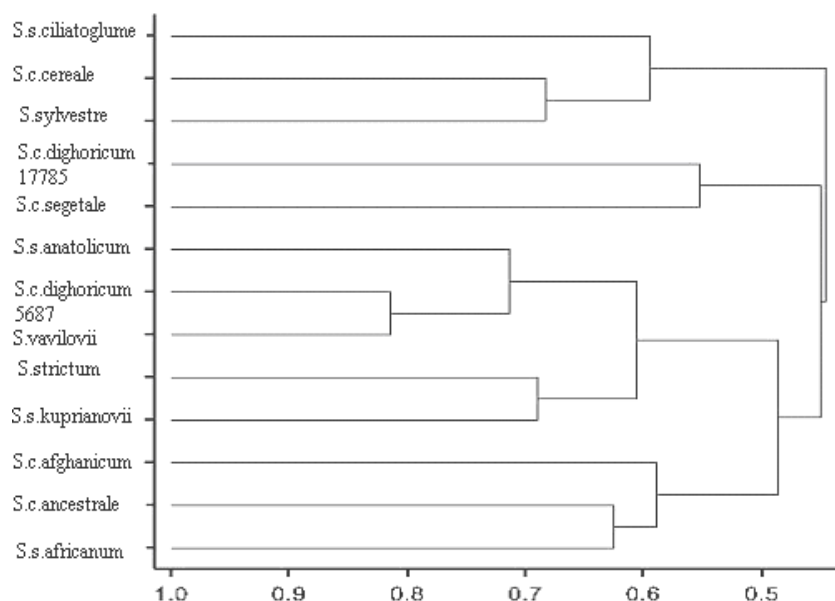
** Istotne na poziomie $\alpha = 0,01$; Significant at $\alpha = 0,01$

*** 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.</i> ssp. <i>afghanicum</i>	0,32	1,00											
3– <i>S. c.</i> ssp. <i>ancestrale</i>	0,46	0,55	1,00										
4– <i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 5687	0,52	0,44	0,47	1,00									
5– <i>S. c.</i> ssp. <i>dighoricum</i> 17785	0,51	0,38	0,34	0,51	1,00								
6– <i>S. c.</i> ssp. <i>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.</i> ssp. <i>africanum</i>	0,43	0,63	0,63	0,51	0,51	0,45	0,54	1,00					
9– <i>S. s.</i> ssp. <i>anatolicum</i>	0,48	0,52	0,36	0,68	0,58	0,45	0,69	0,58	1,00				
10– <i>S. s.</i> ssp. <i>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.</i> ssp. <i>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.

Tabela 8

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 kłosków 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 kłosek i ziaren w kłosie. O tym jak duże może być znaczenie wartości ważniejszych cech plonotwórczych przy doborze komponentów do krzyżowania wspominała Chrzastek (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 wiarygodny 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 przedsięwziętej 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.

MONIKA KOCIUBA**STEFAN STOJAŁOWSKI**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Efektywność markerów molekularnych SCAR z chromosomu 4RL w selekcji genotypów męskopłodnych oraz ich związek z wybranymi cechami morfologicznymi żyta (*Secale cereale* L.)

Efficiency of the SCAR markers from 4RL chromosome in selection of male fertile genotypes and their relation to some morphological traits in rye (*Secale cereale* L.)

Celem prezentowanych badań było sprawdzenie efektywności znanych wcześniej z literatury oraz nowo opracowanych markerów SCAR z chromosomu 4RL przy selekcjonowaniu męskopłodnych genotypów posiadających cytoplazmę Pampa. Materiał badawczy stanowiła populacja F₂ mieszańca pomiędzy męskosterylną linią wsobną 541P, a pojedynczą, losowo wybraną rośliną z populacji prymitywnego żyta irańskiego — IRAN IX. W pracy oceniono też związek pomiędzy płodnością roślin, a kilkoma cechami morfologicznymi mieszańca: liczbą kłosek w kłosie, długością kłosa oraz wysokością roślin, ale nie wykryto pomiędzy nimi silnych zależności. Z czternastu testowanych markerów zmapowanych na długim ramieniu chromosomu 4R jedynie cztery ujawniły polimorfizm w badanym materiale i utworzyły grupę sprzężeń. Skonstruowana w oparciu o segregację tych markerów mapa genetyczna obejmuje obszar 24cM, a wszystkie markery należące do tej grupy wykazują statystycznie istotny związek z płodnością roślin badanego mieszańca. Najefektywniejszy przy ewentualnym selekcjonowaniu genotypów męskopłodnych okazał się marker SCP16M58. Średnio, w badanej populacji rośliny posiadające prązek markerowy zawiązywały czterokrotnie więcej ziaren pod izolatorami w porównaniu do osobników bez prązka. Marker ten wykazywał równocześnie istotny statystycznie związek z *locus* kontrolującym długość źdźbła, pomimo że współczynnik korelacji między płodnością roślin, a ich wysokością nie osiągał w badanej populacji wysokich wartości.

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, cytoplazma Pampa, markery molekularne, żyto

The study aimed at a verification if previously published as well as newly developed SCAR markers located on the 4RL chromosome can be efficient in selecting male fertile genotypes with the Pampa cytoplasm. Research material constituted a F₂ population developed after crossing the male sterile inbred line 541 with a single randomly chosen plant from the IRAN IX population of primitive rye. Correlations between male fertility and some morphological traits of plants i.e.: number of spikelets per ear, length of ear and plant height were also examined but no strong dependences were detected.

Only 4 out of 14 tested markers mapped on the long arm of 4R chromosome revealed polymorphism between parental genotypes of the studied hybrid. These four SCAR markers formed one linkage group. The constructed genetic map covered the distance of 24cM and all markers belonging to this linkage group showed a statistically significant relation to male fertility of the studied individuals. The most effective tool for selection of male fertile genotypes proved to be the SCP16M58 marker. On average, in the analyzed population, seed set under bags was four times higher on plants with the marker band vs. individuals without the band. This marker showed as well a significant relation to the *locus* controlling plant height, although the correlation coefficient between male fertility of plants and their height was rather low.

Key words: cytoplasmic male sterility, Pampa cytoplasm, molecular markers, rye

WSTĘP

Znaczący postęp hodowlany, jaki został dokonany w europejskiej hodowli żyta na przestrzeni ostatniego ćwierćwiecza jest w dużym stopniu rezultatem wprowadzenia do uprawy odmian mieszańcowych (Geiger, 2007). Pierwsze odmiany mieszańcowe żyta zostały zarejestrowane w Niemczech w połowie lat 80. XX wieku, a główną zaletą decydującą o ich wciąż rosnącej popularności jest wysoki potencjał plonotwórczy wynikający z wykorzystania efektu heterozji w stopniu pełniejszym niż to było możliwe w tradycyjnych odmianach populacyjnych.

Od chwili zarejestrowania pierwszych odmian mieszańcowych żyta ich produkcja nasienna bazuje głównie na odkrytej przez Geigera i Schnella (1970) cytoplazmie sterylizującej typu Pampa (CMS-P). Utrzymanie męskiej sterility u roślin z tą cytoplazmą nie nastręcza większych trudności, a genotypy dopełniające występują powszechnie we wszystkich europejskich populacjach hodowlanych (Geiger i Miedaner, 1996). Poważnym problemem w hodowli mieszańców żyta z cytoplazmą Pampa jest natomiast skuteczne przywracanie płodności. Allele płodności wprowadzane są do genotypu mieszańca przez komponenty ojcowskie. Trudności w znajdowaniu form ojcowskich, które gwarantowałyby potomstwu wysoki efekt heterozji i jednocześnie pełną zdolność do produkcji pyłku, spowodowały, iż większość zarejestrowanych aktualnie mieszańców pyli wyraźnie słabiej niż odmiany populacyjne. Według Geigera i Miedanera (1996) częściowa płodność odmian mieszańcowych żyta otrzymywanych przy wykorzystaniu cytoplazmy Pampa, przeważnie nie wpływa negatywnie na zawiązywanie ziaren w kłosie, ale niebezpiecznie zwiększa poziom porażenia przez sporysz (*Claviceps purpurea*). Rozwiązanie tego problemu wymagało znalezienia źródeł genów efektywnie przywracających płodność pyłku u roślin z CMS-Pampa. Źródła takie zidentyfikowano wśród prymitywnych populacji żyta uprawnego pochodzących z Ameryki Południowej i Iranu (Geiger i Miedaner, 1996). Przeniesienie pojedynczych genów pochodzących z populacji nieprzystosowanych do uprawy w warunkach intensywnej gospodarki rolnej do elitarnych materiałów hodowlanych jest procesem długotrwałym. Jego powodzenie zależy w dużym stopniu od skutecznego oddzielenia interesujących nas *loci* od sprzężonych z nimi genów determinujących niekorzystne z agronomicznego punktu widzenia cechy. Według Miedanera i wsp. (2000) efektywne allele płodności pochodzące z południowoamerykańskiej populacji Pico Gentario zlokalizowane są na długim ramieniu

chromosomu 4R w bliskim sąsiedztwie genu warunkującego wysokość roślin. W tym samym obszarze genomu żyta zmapowany został równie efektywny w przywracaniu płodności gen pochodzący z irańskiej populacji o nazwie IRAN IX (Miedaner i in., 2000). W celu usprawnienia procesu przenoszenia alleli płodności pochodzących z prymitywnych form żyta do linii wsobnych wykorzystywanych przy tworzeniu odmian mieszańcowych opracowane zostały markery molekularne SCAR sprzężone z tymi genami (Stracke i in., 2003; Hackauf i in., 2009). Zestaw znanych markerów molekularnych niezbędnych do prowadzenia precyzyjnej hodowli z ich wykorzystaniem (ang. Marker Assisted Breeding) można rozszerzyć sięgając po kolejne markery zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4R, których związek z genami kontrolującymi płodność w systemie CMS-P nie był dotąd badany.

Celem niniejszej pracy była ocena męskiej płodności oraz kilku mających znaczenie agronomiczne cech morfologicznych w populacji F_2 mieszańca między męskosterylną linią wsobną z cytoplazmą Pampa, a prymitywnym żytem IRAN IX będącym źródłem efektywnych genów przywracających płodność przecikowia w systemie CMS-P. W oparciu o dane fenotypowe oraz wyniki analiz PCR-SCAR podjęto próbę:

- zweryfikowania, które z opisanych wcześniej markerów sprzężonych z *locus* płodności/sterylności (Stracke i in., 2003) mogą być najbardziej przydatne w hodowli mieszańców z cytoplazmą Pampa,
- sprawdzenia czy zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4R markery (Stojałowski, 2007), których wcześniej nie wykorzystywano do badań nad żytem z cytoplazmą P, mogą zostać użyte do selekcjonowania genotypów męskopłodnych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła populacja F_2 mieszańca otrzymanego po ręcznym zapyleniu posiadającej cytoplazmę Pampa męskosterylnej linii wsobnej 541P (B_{17}) pyłkiem zebrany z losowo wybranej rośliny (oznaczonej numerem 269-4) pochodzącej z populacji IRAN IX. Linia 541P jest męskosterylnym analogiem linii wsobnej 541, która została wytworzona w macierzystej jednostce autorów niniejszej pracy przez prof. M. Łapińskiego i posiada złożony rodowód (Łapiński i Stojałowski, 1996). Populacja prymitywnego żyta irańskiego IRAN IX, będąca źródłem genów efektywnie przywracających męską płodność u roślin z cytoplazmą Pampa (Geiger i Miedaner, 1996) została udostępniona do badań przez prof. H.H. Geigera z Uniwersytetu Hohenheim (Stuttgart, Niemcy). Składające się z 33 osobników pokolenie mieszańca F_1 rozszczebiało się na rośliny męskopłodne i męskosterylne. Nasiona populacji F_2 uzyskano z 16 losowo wybranych, zaizolowanych przed kwitnieniem kłosów zebranych z płodnych roślin F_1 .

Badana populacja F_2 licząca 276 osobników została wysiana punktowo w rozstawie 20×20cm na terenie Hali Wegetacyjnej Akademii Rolniczej w Szczecinie w sezonie 2005/06. Z młodych roślin pobrane zostały próbki liści do izolacji DNA. Przed kwitnieniem na trzy kłosa każdej spośród 251 dobrze rozwiniętych roślin zostały założone izolatory z tofianu. W czasie żniw zbierano tylko zaizolowane kłosa, a osadzanie ziaren pod izolatorami było w doświadczeniu traktowane jako wskaźnik płodności roślin. Drugą

metodą oceny płodności były kilkukrotne obserwacje wzrokowe kwitnienia każdego z pojedynczych wykonanych przy zastosowaniu 9-stopniowej skali bonitacyjnej Geigera i Morgensterna (1975). Przed zbiorem dokonano pomiarów wysokości roślin, a po zbiorach oceniono długość kłosów, liczbę kłosków w kłosie i liczbę ziaren w kłosie. Osadzanie ziaren określano jako procentowy stosunek liczby zawiązanych ziarniaków do liczby kwiatków w kłosie. Rośliny nie zawiązujące w ogóle ziaren w izolowanych kłosach klasyfikowano jako męskosterylne, te które osadzały ziarno na poziomie do 50% określano jako częściowo płodne. Przy co najmniej 50% osadzeniu ziarna, rośliny zaliczano do kategorii męskopłodnych.

Ziarna uzyskane z częściowo i w pełni płodnych roślin pokolenia F_2 wysiano na jednorzędowych poletkach w sezonie 2007/08, a płodność każdego liczącego minimum 15 roślin potomstwa F_3 oceniano wzrokowo w czasie kwitnienia i zaliczano do dwóch kategorii: męskopłodnych (gdy wszystkie oceniane rośliny wykazywały przynajmniej częściowe objawy płodności) oraz segregujących (gdy w pokoleniu F_3 obok roślin w pełni lub częściowo płodnych pojawiały się również rośliny męskosterylne).

Ekstrakcję DNA z roślin badanej populacji wykonano przy zastosowaniu jedno-etapowej metody wg Thomson i Henry'ego (1995). Warunki analiz PCR-SCAR zostały opisane w pracy Stojalowskiego i wsp. (2005), a jedyna modyfikacja dotyczyła składu mieszaniny reakcyjnej i wynikała z uproszczonej metody izolacji DNA: zastosowano zredukowaną do poziomu 2–4 ng ilość DNA i zmniejszoną 5-krotnie ilość buforu PCR. Przetestowano czternaście markerów SCAR zmapowanych na długim ramieniu chromosomu 4R (Stracke i in., 2003; Stojalowski, 2007), spośród których tylko cztery wykrywały polimorfizm między formami rodzicielskimi i segregowały w pokoleniu F_2 badanej populacji. Dwa spośród nich: SCP16M58 i SCY09d znane były jako markery sprzężone z genami kontrolującymi płodność w CMS-Pampa (Stracke i in., 2003), dwa pozostałe (SCSz334L700 i SCSz1139L856) zostały opracowane w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie (Stojalowski, Milczarski, dane niepublikowane) i nie były dotąd używane do badań nad żytem z tym typem cytoplazmy sterylizującej.

Dla danych z oceny fenotypowej roślin F_2 wyliczono średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe oraz współczynniki korelacji pomiędzy badanymi cechami. Zgodność obserwowanych segregacji płodności/sterylności roślin oraz obecności/braku prążków markerowych z zakładanymi modelami dziedziczenia sprawdzano testem χ^2 . Mapę sprzężeń markerów molekularnych utworzono w programie JoinMap 3,0 (Van Ooijen i Voorrips, 2001) przy $LOD = 4,0$. Identyfikację *loci* kontrolujących oceniane cechy fenotypowe (QTL-e) przeprowadzono za pomocą programu MapQTL v.5,0 (Van Ooijen, 2004). Wartość krytyczną dla krzywej LOD przy mapowaniu interwałowym (interval mapping) dla każdej z cech określono przy pomocy testu permutacji przy 1000 permutacjach. Dodatkowo przy mapowaniu QTL-i zastosowano nieparametryczny test rangowy Kruskala-Wallisa pozwalający na określenie związku między markerem molekularnym i *locus* kontrolującym daną cechę ilościową.

WYNIKI

W obrębie badanej populacji F₂ obserwowano pełen zakres zmienności pod względem fenotypowych objawów męskiej płodności/sterylności. Liczebność roślin zaliczonych wzrokowo do kategorii męskosterylnych (oceny od 1 do 3 w skali Geigera i Morgensterna) i w pełni męskopłodnych (od 7 do 9 w skali) były bardzo zbliżone (tab. 1).

Tabela 1

Wyniki oceny męskiej płodności/sterylności u pojedynczych roślin pokolenia F₂ oraz potomstw pokolenia F₃ mieszańca 541P × IRAN IX 269-4
Results of male fertility/sterility assessment among individuals of the F₂ population and F₃ progenies of the cross 541P × IRAN IX 269-4

Metoda oceny Assessment method	Pokolenie Generation	Fenotypy ¹⁾ Phenotypes						Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Zgodność z dwugenowym modelem dziedziczenia ²⁾ Conformity with the two-gene inheritance model ²⁾	
		MS		CP		MP				Chi ²	P
Wzrokowa Visual	F ₂	98		53		100		5,14	2,70	2,26	0,20–0,10
	F ₃	segr. —	MP —	segr. 30	MP 3	segr. 79	MP 17			2,52	0,20–0,10
Osadzanie ziaren Seed set	F ₂	90		96		65		26,1	28,2	6,35	0,025–0,01

¹⁾ MS — męskosterylny, male sterile; CP — częściowo płodny; partially fertile; MP — męsko płodny; male fertile;

segr. — rozszczepiające się; segregating

²⁾ Objasnienia w tekście. Details in the text

Roślin ocenionych jako częściowo płodne było prawie o połowę mniej. Bimodalny rozkład cechy z maksymalnymi liczebnościami roślin reprezentujących skrajne kategorie fenotypowe wskazuje na oligogeniczny charakter dziedziczenia męskiej sterylności w badanej populacji. Przy próbie sformułowania hipotezy genetycznej tłumaczącej dziedziczną kontrolę płodności roślin w badanej populacji wyróżniano dwie główne klasy fenotypowe, zaliczając do form męskopłodnych rośliny w pełni męskopłodne i częściowo płodne. Obserwowane stosunki rozszczepień zarówno w pokoleniu F₂, jak i w F₃ wskazują, że przywracanie płodności pręcikowia determinowane było przez geny z co najmniej dwóch niezależnych *loci*. Zadowalającą zgodność obserwowanych stosunków rozszczepień z teoretycznie oczekiwanymi uzyskano przyjmując hipotezę, że badana cecha kontrolowana jest przez dwie pary niezależnych, dominujących, komplementarnie współdziałających genów, a rośliny męskopłodne posiadają przynajmniej po jednym dominującym allelu w obu postulowanych *loci*. Przy takich założeniach rozszczepienie na formy męskopłodne i męskosterylne w pokoleniu F₂ powinno być zgodne ze stosunkiem 9:7, a rozszczepienie na potomstwa męskopłodne i segregujące w pokoleniu F₃ (otrzymanym wyłącznie z męskopłodnych pojedynków F₂) zgodne z proporcją 1:8. Dane z wzrokowej oceny pylenia roślin z obu pokoleń badanego mieszańca wykazują zgodność z tymi założeniami (tab. 1). Rozszczepienia pod względem płodności uzyskane przy ocenie osadzania ziaren pod izolatorami różnią się nieco od rezultatów oceny wzrokowej i wykazują statystycznie istotne odchylenia od oczekiwań dla hipotezy o dwugenowej kontroli przywracania płodności (tab. 1). Z drugiej strony korelacja pomiędzy obiema

metodami oceny jest bardzo wysoka (tab. 3), a zakwalifikowanie roślin zawiązujących śladowe ilości ziaren (poniżej 1%) do kategorii roślin męskosterylnych zamiast męskopłodnych powoduje, że obserwowane odchylenia od oczekiwanego stosunku rozszczepień 9:7 przestają być statystycznie istotne (szczegółowe dane nie zostały ukazane w pracy).

Szeroki zakres zmienności zaobserwowano w obrębie cech morfologicznych ocenianych w pokoleniu F_2 mieszańca między linią 541P, a rośliną z populacji IRAN IX (tab. 2). Uzyskane rozkłady wykazywały zasadniczo zgodność z rozkładem normalnym wskazując na poligeniczny charakter dziedziczenia tych cech. Najsilniej skorelowanymi ze sobą cechami, poza płodnością ocenianą wzrokowo i osadzaniem ziarna, była długość kłosa i liczba kłosków w kłosie (tab. 3). Obie cechy morfologiczne kłosa były nieco słabiej, ale wciąż istotnie, skorelowane z wysokością roślin. Nie stwierdzono natomiast znaczących zależności między cechami morfologicznymi, a płodnością roślin.

Tabela 2

Cechy morfologiczne oceniane w populacji F_2 mieszańca 541P × IRAN IX 269-4
Morphological characters evaluated among F_2 population of the cross 541P × IRAN IX 269-4

Cecha Trait	Zakres zmienności Variation range		Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation
	min.	max.		
Liczba kłosków w kłosie Spikelets number per ear	20,0	49,0	33,82	5,39
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	4,7	15,6	10,14	1,82
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	97,0	198,0	143,3	18,81

Tabela 3

Współczynniki korelacji pomiędzy cechami badanymi w populacji F_2 mieszańca 541P × IRAN IX 269-4
Correlation coefficients between characters evaluated among F_2 population of the cross 541P × IRAN IX 269-4

Cecha Trait	Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	Osadzanie ziaren Seed set	Wysokość roślin Plant height	Długość kłosa Ear length
Liczba kłosków w kłosie Spikelets number per ear	0,15	0,13	0,50	0,73
Długość kłosa Ear length	0,04	0,01	0,52	
Wysokość roślin Plant height	0,38	0,37		
Osadzanie ziaren Seed set	0,85			

Wszystkie cztery segregujące w badanej populacji F_2 markery SCAR wykazywały dominujący charakter dziedziczenia, ale rozszczepienia tylko jednego spośród nich były zgodne z oczekiwaną proporcją 3:1 (tab. 4). Marker ten oznaczony jako SCP16M58 był produktem amplifikacji fragmentu DNA wprowadzonego do mieszańca przez genotyp

rośliny ojcowskiej. Pozostałe trzy markery będące produktami charakterystycznymi dla genotypu linii matecznej 541P segregowały w badanej populacji w proporcjach niezgodnych z oczekiwanymi dla cech dziedziczonych monogenicznie.

Tabela 4

**Segregacje markerów SCAR oraz ich lokalizacja na mapie sprzężeń populacji F₂ mieszańca
541P × IRAN IX 269-4
Segregation data of SCAR markers and their localization on the linkage map of the F₂ population
541P × IRAN IX 269-4**

Marker Marker	Pochodzenie produktu amplifikacji Origin of amplified products	Stosunek rozszerzenia Segregation ratio	χ^2 (oczekiwane rozszerzenie 3:1) (3:1 expected ratio)	Prawdo- podobieństwo Probability	Pozycja na mapie sprzężeń Position on the linkage map
SCP16M58	IRAN IX 269-4	179:74	2,4	0,1–0,3	0 cM
SCSz334L700	541P	184:90	9,0	<0,01	13 cM
SCY09d	541P	187:89	7,7	<0,01	18 cM
SCSz1139L856	541P	180:95	13,4	<0,01	24 cM

Mapa sprzężeń utworzona przez cztery użyte w pracy markery SCAR posiada całkowitą długość 24 cM i stanowi fragment długiego ramienia chromosomu 4R (tab. 4). W bezpośrednim sąsiedztwie markera SCP16M58 zidentyfikowano na skonstruowanej mapie genetycznej *locus* kontrolujący przywracanie płodności u roślin badanej populacji. Niezależnie od zastosowanej metody oceniania płodności/sterylności roślin (ocena wzrokowa i osadzanie ziaren pod izolatorami) krzywa LOD otrzymana w trakcie mapowania interwałowego wyraźnie przekraczała w pobliżu SCP16M58 poziom statystycznej istotności (tab. 5).

Tabela 5

**Wyniki mapowania *loci* kontrolujących badane cechy fenotypowe
Interval mapping of analyzed phenotypic traits**

Cecha Trait	Poziom istotności ¹⁾ Significance threshold ¹⁾	LOD _{max}	VE ²⁾ (%)	Pozycja na mapie sprzężeń ³⁾ Position on the linkage map ³⁾
Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	3,7	30,88	83,6	2 cM
Osadzanie ziaren Seed set	6,5	10,10	20,4	0 cM
Liczba kłosków w kłosie Spikelets number per ear	2,9	0,26	0,6	24cM
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	2,5	0,71	2,8	24 cM
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	3,3	2,55	6,4	0 cM

¹⁾ Poziom istotności dla krzywej LOD określony na podstawie testu permutacji; Significance threshold of LOD value determined by permutation test

²⁾ Wariancja tłumaczona efektem QTL; Variance explained by the QTL

³⁾ Pozycja, w której krzywa LOD osiąga wartość maksymalną (LOD_{max}); Position for the maximum level of the LOD curve (LOD_{max})

Stosunkowo wysoką wartość parametru LOD zaobserwowano w tym samym regionie chromosomu 4RL przy analizowaniu danych dla wysokości roślin, ale poziom

statystycznej istotności wyznaczony na podstawie testu permutacji nie został tu przekroczony. W objętym mapowaniem interwałowym obszarze genomu żyta nie stwierdzono obecności genów kontrolujących pozostałe dwie badane w doświadczeniu cechy morfologiczne (tab. 5). Wyniki testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa zasadniczo potwierdzają rezultaty uzyskane w trakcie mapowania interwałowego. Marker SCP16M58 wykazuje najsilniejszy związek z płodnością/sterylnością i spośród użytych w pracy markerów wydaje się być najbardziej przydatny do ewentualnych prac selekcyjnych. Pozostałe trzy markery są słabiej związane z cechą, ale nadal jest to związek statystycznie istotny, niezależnie od zastosowanej metody oceny płodności roślin (tab. 6).

Tabela 6

Ocena sprzężeń markerów molekularnych z *loci* badanych cech ilościowych przy zastosowaniu nieparametrycznego testu rangowego Kruskala-Wallisa
Assessment of linkage between the molecular markers and the analyzed quantitative trait *loci* using the nonparametric rank sum test of Kruskal-Wallis

Cecha Trait	Marker ¹⁾ Marker ¹⁾											
	SCP16M58			SCSz334L700			SCY09d			SCSz1139L856		
	M (-)	F (+)	P	M (+)	F (-)	P	M (+)	F (-)	P	M (+)	F (-)	P
Ocena wzrokowa płodności Visual scoring of fertility	3,03	5,99	0,0001	4,96	5,63	0,05	4,95	5,65	0,05	4,91	5,67	0,05
Osadzanie ziaren (%) Seed set (%)	8,12	33,73	0,0001	24,32	31,56	0,05	24,27	31,26	0,05	23,66	32,01	0,05
Liczba kłosków w kłosie Spikelets number per ear	33,78	33,75	ns ²⁾	34,00	33,35	ns ²⁾	33,92	33,42	ns ²⁾	34,01	33,30	ns ²⁾
Długość kłosa (cm) Ear length (cm)	10,40	10,28	ns ²⁾	10,55	9,91	ns ²⁾	10,51	9,96	ns ²⁾	10,54	9,94	ns ²⁾
Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)	136,6	145,2	0,005	143,1	142,6	ns ²⁾	143,0	142,6	ns ²⁾	143,0	142,6	ns ²⁾

¹⁾ M — Średnia wartość cechy u osobników posiadających allel markera pochodzący od linii matecznej (541P); Value of the trait average across individuals representing allele of a given marker originating from the maternal line (541P)

F — Średnia wartość cechy u osobników posiadających allel markera pochodzący od rośliny ojcowskiej (IRAN IX 269-4); Value of the trait average across individuals representing allele of a given marker originating from the paternal plant (IRAN IX 269-4)

(+) — Prążek markerowy obecny; Marker band present

(-) — Brak prążka markerowego; Marker band absent

P — Istotność różnic (prawdopodobieństwo); Significance of differences (probability)

²⁾ ns — Różnice nieistotne statystycznie; Differences not significant

Wyniki testu Kruskala-Wallisa wskazują również na statystycznie istotne sprzężenie pomiędzy markerem SCP16M58 i *locus* warunkującym wysokość roślin. Gen zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4R pochodzący z prymitywnego żyta irańskiego zwiększał wysokość roślin badanej populacji średnio o około 9cm (tab. 6).

DYSKUSJA

Na temat dziedzicznego podłoża przywracania płodności u żyta z cytoplazmą Pampa, które ma niewątpliwie złożony charakter, formułowano hipotezy zakładające działanie dwóch (Madej, 1976), trzech (Scoles i Evans, 1979) lub nawet czterech (Ruebenbauer i in., 1984) niezależnych par genów. Rozszczepienia na formy męskosterylne i płodne

obserwowane w pokoleniach F_2 i F_3 mieszańca między linią 541P, a rośliną IRAN IX 269-4 są zasadniczo zgodne z założeniem o działaniu genów z dwóch niezależnych *loci*, ale nie można wykluczyć, że dziedziczne uwarunkowanie przywracania męskiej płodności w analizowanym materiale jest bardziej skomplikowane. Dotychczas przeprowadzone badania z wykorzystaniem map genetycznych doprowadziły do zlokalizowania genów przywracających męską płodność w systemie CMS-P na pięciu chromosomach żyta, wśród których największe znaczenie miały *loci* z chromosomów 1RS i 4RL (Geiger i Miedaner, 1996; Miedaner i in., 2000). Ta ostatnia lokalizacja znalazła potwierdzenie w rezultatach badań użytego w niniejszej pracy mieszańca, dla którego źródłem alleli płodności była ojcowska forma IRAN IX 269-4. Mapowanie interwałowe, które wykonano w celu określenia przypuszczalnej lokalizacji genu kontrolującego płodność w badanym materiale dało zgodne rezultaty zarówno przy analizie danych z oceny wzrokowej jak i osadzania ziaren pod izolatorami. Obie metody oceny dały zresztą wyniki wysoce istotnie skorelowane ze sobą, a zaobserwowane niewielkie odstępstwa pomiędzy nimi wynikały prawdopodobnie z mniejszej dokładności obserwacji wzrokowych oraz przypuszczalnej aktywności alleli samoniezgodności pochodzących z populacji IRAN IX, które mogły uniemożliwiać zawiązywanie ziaren na drodze samozapylenia u niektórych roślin wizualnie określonych jako pyłace.

Zgodnie z założeniami sformułowanymi przez Geigera (1985) nowo tworzone komponenty ojcowskie dla odmian mieszańcowych żyta powinny posiadać cytoplazmę sterylizującą. Dzięki temu już na wczesnych etapach hodowli możliwe jest wstępne określenie, jaką przyszłe linie ojcowskie posiadają zdolność do przywracania płodności. Niestety obfite pylenie homozygotycznych komponentów ojcowskich posiadających sterylizującą cytoplazmę typu Pampa nie zawsze stanowi gwarancję skutecznego przywracania płodności u otrzymywanych z ich udziałem heterozygotycznych mieszańców. Stopień przywrócenia płodności w bardzo dużej mierze zależy bowiem od alleli sterility wprowadzanych przez komponent mateczny użyty w czasie krzyżowania (Geiger i Miedaner, 1996; Kolasińska, 2001). Trudności w znalezieniu wśród europejskich materiałów hodowlanych żyta genotypów o zadowalającej efektywności w przywracaniu płodności u roślin z cytoplazmą Pampa stały się impulsem do poszukiwań tego rodzaju form w obrębie populacji egzotycznych, pochodzących z Ameryki Południowej i Bliskiego Wschodu (Geiger i Miedaner, 1996). Zidentyfikowane w tych populacjach geny przywracające płodność charakteryzują się dużą efektywnością, wyraźnie lepszą od genów pochodzących ze źródeł o europejskich rodowodach, dotychczas stosowanych w hodowli żyta. Płodność mieszańców otrzymywanych przy wykorzystaniu restorerów o egzotycznym pochodzeniu w mniejszym stopniu zależy od genotypu linii matecznej i podlega mniejszym modyfikacjom pod wpływem działania czynników środowiskowych (Geiger i Miedaner, 1996). Niestety jednak, przynajmniej w przypadku genów pochodzących z południowoamerykańskiej populacji Pico Gentario, zaobserwowano niekorzystne sprzężenie między efektywnymi genami przywracającymi płodność pyłku, a genami wpływającymi na zwiększenie wysokości roślin (Miedaner i in., 2000). Podobny związek między genami warunkującymi wydłużenie źdźbła, a *loci* kontrolującymi płodność pręcikowia wydaje się występować w obrębie badanej w niniejszej pracy

populacji IRAN IX. Bliskie sąsiedztwo genów pożądaných w hodowli oraz *loci* warunkujących cechy niekorzystne z gospodarczego punktu widzenia stanowi dodatkowy argument za poszukiwaniem markerów molekularnych pozwalających na jak najprecyzyjniejszą selekcję pożądaných rekombinantów (Hackauf i in., 2009). Z drugiej strony za korzystne zjawisko należy uznać fakt, iż w obszarze długiego ramienia chromosomu 4R, poza genami wpływającymi na krzewienie (Börner i in., 2000) i pochodzącymi z prymitywnych form żyta genami warunkującymi wysokość roślin (Miedaner i in., 2000), zasadniczo nie wykrywano dotąd innych *loci* dla ważnych gospodarczo cech (Börner i in., 2000; Milczarski i Masojć, 2003). Wydaje się jednak, że ewentualna obecność w tym obszarze genomu żyta QTL-i o istotnym znaczeniu użytkowym zależy od genotypów wybranych do krzyżowania i powinna być każdorazowo przedmiotem oceny, szczególnie przy wykorzystywaniu w hodowli materiałów słabo zaadaptowanych do warunków współczesnego rolnictwa.

WNIOSKI

1. Na długim ramieniu chromosomu 4R zmapowano pochodzący z rośliny IRAN IX 269-4 *locus* silnego genu przywracającego płodność u roślin z cytoplazmą Pampa.
2. Wykazano znaczącą efektywność markera SCP16M58 przy selekcjonowaniu genotypów męskopłodnych (czterokrotnie wyższe zawiązywanie ziaren pod izolatorami), ale marker ten wykazywał jednocześnie niekorzystne sprzężenie z *locus* zwiększającym wysokość roślin u badanego mieszańca.

LITERATURA

- Börner A., Korzun V., Voylokov A. V., Worland A. J., Weber W. E. 2000. Genetic mapping of quantitative trait *loci* in rye (*Secale cereale* L.). Euphytica 116: 203 — 209.
- Geiger H. H. 1985. Hybrid breeding in rye. Proceedings of the EUCARPIA Meeting of the Cereal Section on Rye. Svalöv, Sweden, 11–13 June 1985: 237 — 265.
- Geiger H. H. 2007. Strategies of hybrid rye breeding. Vortr. Pflanzenzüchtg. 71: 1 — 5.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1996. Genetic basis and phenotypic stability of male fertility restoration in rye. Vortr. Pflanzenzüchtg. 35: 27 — 38.
- Geiger H. H., Morgenstern K. 1975. Angewandte genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. Theor. Appl. Genet. 46: 269 — 276.
- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 10: 590 — 593.
- Hackauf B., Stojalowski S., Wortmann H., Wilde P., Fromme F. J., Menzel J., Korzun V., Wehling P. 2009. Minimierung des Mutterkornbefalls im Hybridroggen durch Ansätze der Präzisionszüchtung. Journal für Kulturpflanzen 61 (1): 15 — 20.
- Kolasińska I. 2001. Przywracanie płodności pyłku u mieszańców żyta CMS-Pampa × restorer. Biul. IHAR 218/219: 341 — 349.
- Łapiński M., Stojalowski S., 1996. The C-source of sterility-inducing cytoplasm in rye: Origin, identity and occurrence. International Symposium on Rye Breeding and Genetics, Stuttgart, Germany 27-29 June 1996. Vort. Pflanzenzüchtg 35: 51 — 60.
- Madej L. 1976. Charakterystyka genetyczna trzech źródeł męskiej jałowości żyta (*Secale cereale* L.). Plant Breed. Seed Sci. 20: 157 — 174.

- Miedaner T., C. Glass F., Dreyer P., Wilde H., Wortmann H., Geiger H. H. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1226 — 1233.
- Milczarski P., Masojć P. 2003. Interval mapping of genes controlling growth of rye plants. *Plant Breed. Seed Sci.* 48: 135 — 142.
- Ruebenbauer T., Kubara-Szpunar Ł., Pająk K. 1984. Testing of a hypothesis concerning interaction of genes with mutated cytoplasm controlling male sterility of the Pampa type in rye (*Secale cereale* L.). *Genet. Pol.* 25: 1 — 16.
- Scoles G. J., Evans L. E. 1979. The genetics of fertility restoration in cytoplasmic male sterile rye. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 417 — 422.
- Stracke S., Schilling A. G., Förster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H. H. 2003. Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1184 — 1190.
- Stojałowski S. 2007. Molecular marker linkage map for localising male-fertility restorer genes in rye with CMS-C cytoplasm. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 71: 250 — 252.
- Stojałowski S., Jaciubek M., Masojć P. 2005. Rye SCAR markers for male fertility restoration in the P cytoplasm are also applicable to marker-assisted selection in the C cytoplasm. *J. Appl. Genet.* 46 (4): 371 — 373.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394 — 400.
- Van Ooijen J. W., 2004. MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E. 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant. Res. Intern.* Wageningen, the Netherlands.

IRENA KIECANA

MAŁGORZATA CEGIELKO

ELŻBIETA MIELNICZUK

Katedra Fitopatologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Występowanie *Fusarium* spp. na życie ozimym (*Secale cereale* L.) i podatność różnych genotypów na porażenie przez *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. i *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc.

The occurrence of *Fusarium* spp. on winter rye (*Secale cereale* L.) and susceptibility of different genotypes to infection with *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. and *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc.

Badania przeprowadzono w latach 2001–2005 na 10 polach uprawnych żyta ozimego w województwie lubelskim. W każdym sezonie wegetacji po przezimowaniu oceniano udział roślin z objawami nekrozy korzeni i pochew liściowych. Odsetek takich roślin wynosił od 3,5 w 2002 do 45 w 2004 roku. Natomiast wartości wskaźników chorobowych wynosiły od 0,7 w 2002 do 22,0 w 2001 roku i różniły się istotnie. Głównym patogenem żyta okazał się *F. avenaceum* (33,5% wszystkich *Fusarium* spp.). W znacznych ilościach wyosabniano także *F. culmorum* (18,8%) oraz *F. poae* (8,7%). Badania fitotronowe dotyczące podatności siewek 10 odmian żyta na porażenie przez *F. avenaceum* nr 24 i *F. culmorum* nr 33 wykazały, że najbardziej podatne na te patogeny były odmiany Kier oraz Dańkowskie Złote, dla których wartości wskaźników chorobowych wynosiły odpowiednio 58,0 i 64,25 w przypadku infekcji podłoża przez *F. avenaceum* oraz 88,25 dla odmiany Kier i 70,5 w przypadku odmiany Dańkowskie Złote w kombinacji doświadczenia z *F. culmorum*. Najmniej podatną na porażenie siewek przez *F. avenaceum* i *F. culmorum* okazała się odmiana Gradan F1, dla której wskaźniki chorobowe wynosiły odpowiednio 25,5 i 41,25.

Słowa kluczowe: doświadczenie fitotronowe, nekroza korzeni i pochew liściowych, podatność odmian, siewki

The investigations were carried out in 2001–2005 at 10 winter rye cultivation plots in the Lublin Province. The participation of plants with root and leaf sheaths necrosis was evaluated after winter in each vegetation season. The percentage of diseased plants ranged from 3.5 in 2002, to 45.0 in 2004. Mean values of the disease index ranged from 0.7 in 2002 to 22.0 in 2001 and differed significantly. The main pathogen of rye plants turned out to be the species *F. avenaceum* (33.5% of all *Fusarium* spp.). Considerable amounts of *F. culmorum* (18.8%) and *F. poae* (8.7%) were also detected. Investigation carried out in growth chamber on susceptibility of seedlings of 10 rye cultivars to infection with strains *F. avenaceum* 24 and *F. culmorum* 33 showed that the most susceptible genotypes to both

these pathogens were cv. Kier and Dańkowskie Złote, for which values of the disease index amounted 58.0 and 64.25, respectively in the case of ground inoculation with *F. avenaceum* and 88.25 for cv. Kier and 70.5 for cv. Dańkowskie Złote in the experimental combination with *F. culmorum*. The least susceptible for seedlings infection with *F. avenaceum* and *F. culmorum* was cv. Gradan F₁, for which values of the disease index amounted 25.5 and 41.25, respectively.

Key words: growth chamber, roots and leaf sheaths necrosis, seedlings, susceptibility of cultivars

WSTĘP

Żyto (*Secale cereale* L.) jest gatunkiem o stosunkowo małych wymaganiach glebowych i wodnych, a także odznacza się małą wrażliwością na przedplon, co powoduje, że zboże to zajmuje nadal znaczny areal uprawy (Blecharczyk, Małecka, 2001).

Żyto ma stymulujący wpływ na rozwój antagonistycznych mikroorganizmów ryzo-sferowych, a szczególnie bakterii fluoryzujących *Pseudomonas* spp. oraz gramdodatnich *Arthrobacter*, a także grzybów z rodzaju *Trichoderma*, które między innymi ograniczają wzrost *Fusarium* spp. (Kurek, Jaroszuk-Ściś, 2003; Głazewska-Maniewska i in., 2004; Khan i in., 2006). Pomimo obecności w wydzielinach korzeniowych żyta kwasów hydroksamowych, decydujących o zwiększonej odporności tej rośliny na porażenie przez patogeny odglebowe, zboże to infekowane jest przez gatunki z rodzaju *Fusarium* (Bravo, Lazo, 1993; Wilkes i in., 1999; Kurowski, Majchrzak, 2000; Pałys i in., 2004). W różnych warunkach uprawy za najbardziej szkodliwe dla żyta uznaje się: *F. culmorum*, *F. avenaceum* oraz *Microdochium nivale* (Mikołajska i in., 1996; Burgiel, Klima, 1999; Chongo i in., 2001; Pałys i in., 2004).

Celem pracy było określenie udziału grzybów z rodzaju *Fusarium* w porażaniu żyta w warunkach Lubelszczyzny oraz sprawdzenie chorobotwórczości najczęściej występujących gatunków *F. avenaceum* i *F. culmorum* dla siewek wybranych odmian tego zboża w warunkach fitotronowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania zdrowotności roślin żyta ozimego w fazie krzewienia przeprowadzono w latach 2001–2005, na 10 plantacjach produkcyjnych woj. lubelskiego. Wykaz plantacji i odmian podano w tabeli nr 1. W każdym roku badań, wiosną, po ruszeniu wegetacji (I dekada kwietnia) z każdej plantacji pobierano losowo cztery próby po 50 roślin, w sumie dla jednej plantacji analizowano po 200 roślin wzrastających w różnych miejscach pola.

W laboratorium oceniano procentowy udział roślin z objawami nekrozy korzeni oraz pochw liściowych. Stopień porażenia określano wg 5° skali:

- 1° do 10% porażonej powierzchni korzeni i pochwy liściowej,
- 2° od 11% do 25% porażonej powierzchni korzeni i pochwy liściowej,
- 3° od 26% do 50% porażonej powierzchni korzeni i pochwy liściowej,
- 4° od 51% do 75% porażonej powierzchni korzeni i pochwy liściowej,
- 5° od 76% do 100% porażonej powierzchni korzeni i pochwy liściowej.

Następnie obliczano wskaźniki chorobowe wykorzystując wzór McKinneya (Łacicowa, 1969), a uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem półprzedziałów ufności T-Tukeya (Żuk, 1989).

W laboratorium przeprowadzono analizę mikologiczną chorych roślin. W każdym roku badań dla każdej plantacji żyta analizowano po 50 fragmentów przygotowanych z korzeni i 50 z pochw liściowych porażonych roślin. Do wyosabniania grzybów wykorzystano pożywkę mineralną (Łacicowa, 1970).

Badania podatności siewek 10 odmian żyta (Amilo, Dańkowskie Nowe, Dańkowskie Żłote, Gradan F₁, Kier, Motto, Nawid F₁, Skat, Walet, Warko) na porażenie przez *Fusarium avenaceum* nr 24 i *Fusarium culmorum* nr 33 przeprowadzono w fitotronie, w temperaturze 23–24°C i przy wilgotności względnej powietrza 85%. W badaniach wykorzystano te szczepy, których patogeniczność została wcześniej sprawdzona w laboratorium metodą Mishry i Behra (1976). Inokulum grzybów stanowiły 14 dniowe kultury *F. avenaceum* i *F. culmorum* wzrastające na pożywce PDA w szalkach Petriego w temperaturze 22°C.

Do doświadczenia użyto doniczek plastikowych o średnicy 10 cm napełnionych glebowym podłożem uniwersalnym z dodatkiem piasku w stosunku 2:1, o pH 6,5, uprzednio wysterylizowanym dwukrotnie w autoklawie przez dwie godziny w temperaturze 121°C, pod ciśnieniem 1,21 atm. (0,12 MPa).

Do badań podatności wybrano ziarniaki analizowanych odmian żyta, których kielki osiągnęły długość 10 mm i były normalnie wykształcone. Wyselekcjonowany materiał umieszczano na plastrach pożywki z analizowanym gatunkiem grzyba, a następnie przykryto podłożem (Mańka, 1989). Kontrolę stanowiły doniczki, w których podkiełkowane ziarniaki umieszczano na plastrach pożywki bez grzyba. Doświadczenie założono 8 lutego 2006 roku, każdą kombinację doświadczenia przeprowadzono w czterech powtórzeniach po 25 roślin w każdym. Rośliny wzrastały przez 24 dni, po czym ustalono stopień porażenia siewek wg 4° skali:

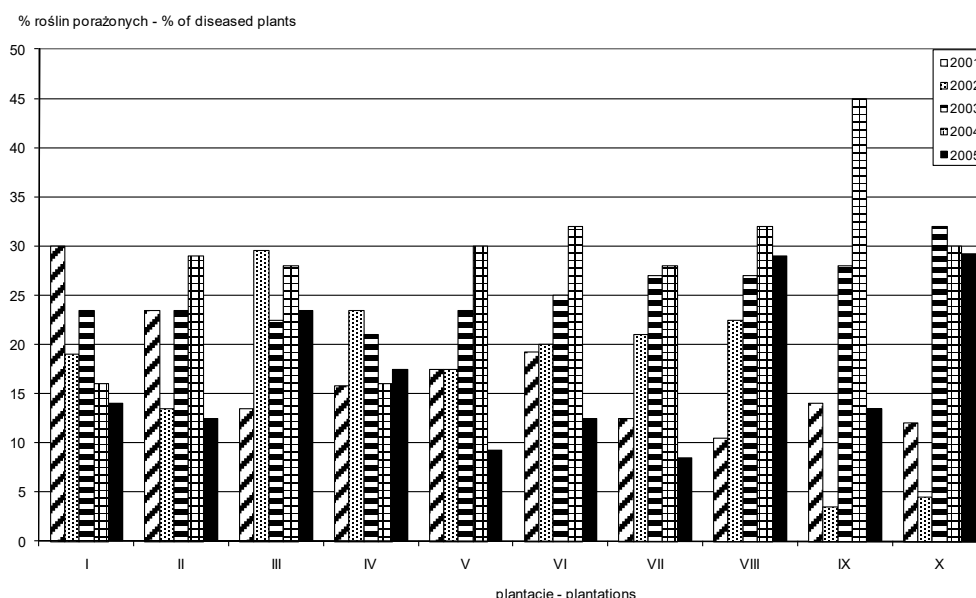
- 1° siewki z nekrozą na 1–3 korzeni,
 - 2° siewki z nekrozą u więcej niż 3 korzeni,
 - 3° siewki o całkowicie znekrotyzowanych korzeniach i z plamistością na pochwach liściowych,
 - 4° siewki całkowicie znekrotyzowane
- oraz obliczono wskaźniki chorobowe, tak jak w przypadku roślin wzrastających w warunkach polowych. Wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem półprzedziałów ufności T-Tukeya (Żuk, 1989).

Po dziesięć siewek z objawami chorobowymi, z każdej kombinacji doświadczenia fitotronowego przeznaczono do analizy mikologicznej. Analizowano po 50 fragmentów z korzeni i pochw liściowych chorych siewek każdej odmiany.

Do oznaczania grzybów wyizolowanych z porażonych roślin wzrastających zarówno w warunkach polowych, jak i doświadczenia fitotronowego wykorzystano opracowania Domscha i Gamsa (1970), Bootha (1971), Ellisa (1971), Skirgiełło i wsp. (1979), Ramirez (1982), Nelsona i wsp. (1983) oraz Burgessa i wsp. (1988).

WYNIKI

Obserwacje wiosenne ujawniły występowanie roślin żyta z nekrozą korzeni i pochew liściowych w każdym sezonie wegetacji. Odsetek takich roślin wahał się od 3,5 w 2002 do 45 w 2004 roku (rys. 1). Natomiast wartości wskaźników chorobowych wynosiły od 0,7 w 2002 do 22,0 w 2001 r. i różniły się istotnie (tab. 1).



Rys. 1. Występowanie roślin z objawami nekrozy korzeni i pochew liściowych na plantacjach żyta uprawianego w woj. lubelskim w latach 2001–2005

Fig. 1. The occurrence of plants with root and leaf sheaths necrosis on plantations of rye cultivated in the Lublin region in the years 2001–2005

W wyniku analizy mikologicznej roślin wykazujących objawy chorobowe w ciągu wszystkich lat badań uzyskano łącznie 2455 izolatów grzybów. W każdym sezonie wegetacji, zarówno z korzeni, jak i z pochew liściowych uzyskiwano kolonie *Fusarium* spp. Izolaty tych grzybów w latach 2001–2005 stanowiły odpowiednio: 27,2% (123 izolaty); 31,0% (126 izolatów); 16,6% (88 izolatów); 35,7% (151 izolatów) i 35,2% (183 izolaty) ogółu wyosobnień (tab. 2). Łącznie po 5 latach badań izolaty grzybów z rodzaju *Fusarium* stanowiły 27,4% wszystkich uzyskanych kolonii grzybów (tab. 2). Skład gatunkowy *Fusarium* spp. różnił się w analizowanych sezonach wegetacji, przy czym w latach 2003 i 2004 gatunkiem dominującym okazał się *F. avenaceum*, którego izolaty stanowiły odpowiednio 79,5% (70 izolatów) oraz 42,5% (64 izolaty) wszystkich *Fusarium* spp. Natomiast w 2001 roku w największych ilościach uzyskiwano *F. oxysporum* 68,3% (84 izolaty) wszystkich izolatów *Fusarium* spp., w 2002 roku dominował gatunek *F. culmorum*, którego kolonie stanowiły 34,9% (44 izolaty) ogółu *Fusarium* spp., zaś w 2005

roku *F. equiseti* 34% (63 izolaty) wszystkich *Fusarium* spp. (tab. 2). Ponadto w latach 2001, 2002 i 2005 z chorych roślin wyosabniano gatunek *F. sporotrichioides*, izolaty tego grzyba stanowiły odpowiednio 5,6% (7 izolatów), 11,9% (15 izolatów) i 1,6% (3 izolaty) (tab. 2). Natomiast w latach 2001 i 2004 wyizolowywano także *F. crookwellense* odpowiednio 0,8% (1 izolat) i 7,3% (11 izolatów) (tab. 2). Biorąc pod uwagę ogólną liczbę izolatów grzybów z rodzaju *Fusarium* uzyskanych z chorych roślin żyta w ciągu 5 lat badań, gatunkiem dominującym był *F. avenaceum*, którego izolaty stanowiły 33,5% (225 izolatów) wszystkich *Fusarium* spp. W znacznych ilościach wyosabniano także *F. culmorum* 18,8% (126 izolatów) ogółu *Fusarium* spp. oraz *F. poae* 8,7% (55 izolatów) (tab. 2).

Tabela 1

Wartości wskaźników chorobowych dla roślin żyta uprawianego w woj. lubelskim, w latach 2001-2005
Values of the disease index for rye plants cultivated in Lublin Province in the years 2001-2005

Numer plantacji Number of plantation	Lata badań Years of studies				
	2001	2002	2003	2004	2005
I Dańkowskie Złote	22,00e	8,50c	4,95a	3,80a	8,50cd
II Dańkowskie Złote	15,70d	4,20b	5,50ab	8,20b	6,80abc
III Dańkowskie Złote	7,34ab	14,70d	5,25ab	8,20b	15,73e
IV Dańkowskie Złote	13,00cd	8,90c	5,75ab	4,60a	10,50d
V Dańkowskie Złote	11,20bc	0,70a	5,75ab	9,80b	5,47ab
VI Dańkowskie Złote	12,70c	1,00a	9,00d	8,20b	6,70abc
VII Dańkowskie Złote	7,00ab	8,80c	6,50bc	8,20b	4,78a
VIII Dańkowskie Złote	4,80a	8,00c	7,75c	10,00b	19,25f
IX Esprit	8,80b	8,60c	8,25cd	13,15c	7,10bc
X Esprit	6,90ab	6,30bc	10,00d	10,00b	20,72f
Średnia Mean	10,94	6,97	6,87	8,45	10,55

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy ($P \leq 0,05$)

Mean values followed by the same letter do not differ significantly at ($P \leq 0,05$)

Analizowane plantacje były zlokalizowane w: I, II, III – Wólka Zabłocka; IV, V — Brzostówka; VI, VII, VIII – Kol. Wola Sernicka; IX – Głębokie, X – Krasne

Analyzed plantations were localized in: I, II, III – Wólka Zabłocka; IV, V — Brzostówka; VI, VII, VIII – Kol. Wola Sernicka; IX – Głębokie, X — Krasne

Badania fitotronowe wykazały, że zarówno w kombinacji doświadczenia z zakażaniem podłoża przez *F. avenaceum*, jak i przez *F. culmorum* występowały siewki żyta z objawami nekrozy korzeni i pochw liściowych. W obydwu kombinacjach doświadczenia notowano także rośliny całkowicie znekrotyzowane, a w niektórych przypadkach kielki zamierały jeszcze przed wydostaniem się nad powierzchnię podłoża.

Siewki kontrolne żyta posiadały zwykle 3 liście bez objawów chorobowych, a także zdrowy system korzeniowy. Jednak w niektórych powtórzeniach kombinacji kontrolnej analizowanych genotypów notowano siewki z niewielkimi nekrotycznymi plamami na pochwach liściowych. Wartości indeksów porażenia dla siewek kontrolnych wynosiły od 2,75 (Dańkowskie Złote) do 30,00 (Dańkowskie Nowe; tab. 3). Sztuczne zakażanie podłoża przez *F. avenaceum* wpłynęło istotnie na zdrowotność siewek żyta w porównaniu do kontroli, w przypadku wszystkich analizowanych odmian, na co wskazują wyniki

analizy statystycznej wskaźników chorobowych. Istotną różnicę w wielkości wskaźników chorobowych zanotowano także pomiędzy badanymi genotypami żyta (tab. 3).

Tabela 2

Grzyby wyosobnione z siewek żyta w latach 2001–2005
Fungi isolated from rye seedlings in the years 2001–2005

Gatunek grzyba Fungi species	Liczba izolatów w poszczególnych latach badań Number of isolates in each year of studies															Ogólna liczba izolatów Total number of isolates
	2001			2002			2003			2004			2005			
	k	pl	k+pl	k	pl	k+pl	k	pl	k+pl	k	pl	k+pl	k	pl	k+pl	
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem.	—	—	—	9	1	10	—	—	—	1	3	4	—	1	1	15
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	3	14	17	5	25	30	42	28	70	18	46	64	22	22	44	225
<i>Fusarium crookwellense</i> Burgess, Nelson, Toussoun	—	1	1	—	—	—	—	—	—	8	3	11	—	—	—	12
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	7	5	12	18	26	44	—	—	—	12	35	47	6	17	23	126
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7	—	7	32	31	63	70
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	2	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	65	19	84	15	3	18	14	4	18	12	8	20	16	—	16	156
<i>Fusarium poae</i> (Peck.) Wollenw.	—	—	—	13	6	19	—	—	—	—	2	2	12	22	34	55
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	3	4	7	15	—	15	—	—	—	—	—	—	1	2	3	25
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	—	1	1	1	4	5	—	9	9	14	8	22	—	—	—	37
Inne kolonie Other colonies	182	269	451	122	143	265	140	294	434	90	156	246	141	195	336	1732
Razem Total	262	313	575	198	208	406	196	335	531	162	261	423	230	290	520	2455

k — Korzenie, Roots

pl — Pochwy liściowe, Leaf sheaths

Na podstawie opracowania statystycznego do najmniej podatnych na infekcję siewek przez *F. avenaceum* zaliczono odmiany: Gradan F₁ i Walet, dla których wartości wskaźników chorobowych wynosiły odpowiednio 25,50 i 27,50. Największą podatność na zakażenie przez tego patogena zanotowano w przypadku odmian: Kier oraz Dańkowskie Złote, w przypadku których wskaźniki chorobowe wynosiły 58,00 oraz 64,25 (tab. 3). W kombinacji doświadczenia z zakażaniem ziarna przez *F. culmorum* zanotowano również istotną różnicę w porażaniu siewek w porównaniu z kontrolą u wszystkich badanych odmian żyta (tab. 3). Analiza statystyczna wskaźników chorobowych wykazała, że do najbardziej podatnych odmian żyta na porażenie siewek przez *F. culmorum* w warunkach kontrolowanej temperatury i wilgotności należą: odmiana Kier, dla której wskaźnik chorobowy wynosił 88,25 oraz odmiana Dańkowskie Złote, dla której wskaźnik

chorobowy wynosił 70,5. Najmniej podatnymi okazały się odmiany: Gradan F₁, Nawid F₁, Skat, Warko i Motto, dla których wskaźniki chorobowe wynosiły odpowiednio: 41,25, 42,00, 44,00, 44,25, 46,50 (tab. 3).

Tabela 3

Średnie wskaźniki chorobowe dla siewek odmian żyta uzyskanych w warunkach fitotronowych ze sztucznym zakażeniem podłoża przez *F. avenaceum* i *F. culmorum*
Mean values of the disease index for seedlings of rye cultivars obtained in growth chamber conditions with artificial infection of ground with *F. avenaceum* and *F. culmorum*

Odmiany Cultivars	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	Kontrola Control
Amilo	41,5cd*	58,25b*	15,00
Dańkowskie Nowe	45,25de*	56,00b*	30,00
Dańkowskie Złote	64,25g*	70,50c*	2,75
Gradan F1	25,50a*	41,25a*	12,00
Kier	58,00f*	88,25d*	23,25
Motto	38,25bc*	46,50a*	6,70
Nawid F1	49,50e*	42,00a*	6,50
Skat	50,00e*	44,00a*	5,00
Walet	27,50a*	55,00b*	9,20
Warko	34,25b*	44,25a*	8,00

* Średnie różnią się istotnie w porównaniu do kontroli, przy $P \leq 0,05$; Mean values differ significantly compared to the control at $P \leq 0,05$

Średnie wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$; Mean values in columns followed by the same letter do not differ significantly at $P \leq 0,05$

Analiza mikologiczna porażonych siewek żyta upoważniła do uznania badanych szczepów *F. avenaceum* i *F. culmorum* za przyczynę uszkodzeń (tab. 4).

Tabela 4

Grzyby wyisobnione z siewek żyta wyrosłych w doświadczeniu fitotronowym ze sztucznym zakażeniem podłoża przez *F. avenaceum* i *F. culmorum* oraz w kombinacji kontrolnej
Fungi isolated from rye seedlings grown in the growth chamber experiment with artificial infection of ground with *F. avenaceum* and *F. culmorum* and in the control

Gatunek grzyba Fungi species	Kombinacje doświadczenia Combinations of the experiment			Ogólna liczba izolatów Total number of isolates
	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	kontrola control	
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	17	8	11	36
<i>Aureobasidium pullulans</i> de (Bary) Arnaud	1	2	7	10
<i>Epicoccum nigrum</i> Link ex Link	13	—	—	13
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	252	—	3	255
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G.Sm.) Sacc.	—	271	6	277
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	3	—	—	3
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling) Samson, Stolk et al.	2	1	5	8
Formy niezarodnikujące Non-sporulating forms	3	2	1	6
Razem Total	291	284	33	608

DYSKUSJA

Przeprowadzone obserwacje polowe w rejonie Lubelszczyzny ujawniły występowanie roślin żyta z objawami nekrozy korzeni oraz pochw liściowych w większym procencie, aniżeli w przypadku żyta uprawianego w rejonie północno-wschodniej Polski (Mikołajska i in., 1996).

Przyczyną uszkodzenia roślin żyta po przezimowaniu okazał się gatunek *F. avenaceum*. Szkodliwość tego grzyba dla siewek żyta potwierdziły badania fitotronowe. *Fusarium avenaceum* wyróżniał się znaczną chorobotwórczością dla siewek innych gatunków zbóż w badaniach Mańki (1989) oraz Łacicowej i Kiecany (1987). Gatunek ten ma znaczny udział w powodowaniu chorób podsuszkowych różnych zbóż, w tym żyta uprawianego na Lubelszczyźnie oraz w rejonie północno-wschodniej Polski (Łacicowa i in., 1985; Mikołajska i in., 1996; Kiecana, Mielniczuk, 2001; Kiecana i in., 2003; Pałys i in., 2004; Majchrzak i in., 2008).

Przeprowadzone badania polowe oraz fitotronowe, a także wcześniejsze informacje z literatury wskazują, na znaczny udział *F. culmorum* w uszkodzaniu roślin żyta (Mikołajska i in., 1996; Pałys i in., 2004). Szkodliwość tego grzyba dla zbóż jest większa w podwyższonej temperaturze (Łacicowa, Pięta, 1998; Kiecana i in., 2003). W badaniach szklarniowych Strausbaugh i wsp. (2004) *F. culmorum* okazał się najbardziej patogeniczny dla siewek jęczmienia i pszenicy w porównaniu z *F. equiseti*, *F. reticulatum* i *F. acuminatum*. Ponadto uszkodliwość *F. culmorum* i *F. avenaceum* w stosunku do zbóż ma ścisły związek z wytwarzaniem przez te gatunki mikotoksyn, a szczególnie deoksyniwalenolu i jego pochodnych, w przypadku pierwszego patogena i moniliforminy w przypadku *F. avenaceum*. Wyżej wymienione toksyny mogą hamować wzrost młodych roślin oraz powodować szereg zmian w procesach metabolizmu komórki, między innymi zaburzenia w podziałach komórkowych oraz w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych (Wojciechowski i in., 1995; Packa, 1997; Dahleen, McCormick, 2001; Šrobárová, Pavlova, 2001).

Do gatunków często izolowanych z porażonych korzeni i pochw liściowych żyta należał *F. equiseti*. Grzyb ten w badaniach Majchrzak i wsp. (2008) okazał się głównym sprawcą porażenia korzeni pszenicy oraz miał znaczny udział w uszkodzaniu podstawy źdźbła tej rośliny uprawianej w warunkach północno-wschodnich rejonów Polski.

Przedstawione wyniki wskazują na udział w porażaniu żyta także gatunku *F. poae*. O uszkodliwości tego grzyba w stosunku do siewek zbóż donoszą Łacicowa (1963), Kiecana, Kocyłak (1999) oraz Fernandez i Chen (2005).

W warunkach Lubelszczyzny z porażonych roślin żyta izolowano także gatunki *F. crookwellense* i *F. sporotrichioides*. *Fusarium crookwellense* jest znanym patogenem zbóż (Rossi i in., 1995; Kiecana, Mielniczuk, 2001; Kiecana i in., 2003; Strausbaugh i in., 2004, 2005; Mielniczuk, 2008).

Natomiast, *Fusarium sporotrichioides* jest słabym patogenem zbóż, często rozwijającym się na resztkach pozbiorowych (Marasas, wg Mills, 1989; Kiecana, Kocyłak, 1999).

Gatunkiem izolowanym w każdym roku badań okazał się *F. oxysporum*, który nie jest uznawany za patogena roślin zbożowych (Truszkowska i in., 1983).

Do określania podatności genotypów roślin na patogeny stosuje się różne metody, a ich wybór zależy od ilości testowanego materiału roślinnego i warunków w jakich badania są przeprowadzane (Łacicowa i in., 1979; Łacicowa, Pięta, 1998; Kiecana, Kocylak, 1999; Mielniczuk, 2008).

W badaniach szkodliwości *F. avenaceum* i *F. culmorum* dla siewek żyta w warunkach doświadczenia fitotronowego zastosowano inokulum 14-dniowych kultur testowych analizowanych szczepów *F. avenaceum* nr 24 i *F. culmorum* nr 33, wyrosłych na podłożu glukozowo-ziemniaczanym wzorując się na badaniach Mańki (1989). Wybór inokulum w postaci kultury grzyba wyrosłej na pożywce PDA, oparto na wynikach Takegami i Sasaij (1970, wg Mańki, 1989). Jest to łatwy sposób uzyskiwania dużych ilości materiału infekcyjnego. W badanych warunkach metoda ta okazała się skuteczna ponieważ zarówno w kombinacji doświadczenia z *F. avenaceum*, jak i z *F. culmorum* występowały siewki z objawami zgorzeli przed i powstającej u badanych odmian żyta.

Uzyskane wyniki w doświadczeniu fitotronowym potwierdziły dużą szkodliwość *F. avenaceum* i *F. culmorum* dla siewek żyta, którą można zmniejszyć wprowadzając do uprawy odmiany mniej podatne. Taką właściwością wyróżniała się odmiana Gradan F₁. Natomiast duża szkodliwość tych patogenów dla odmiany Kier sugeruje unikanie jej uprawy w warunkach Lubelszczyzny.

W badaniach laboratoryjnych zaprawianie ziarna jęczmienia i pszenicy chitozanem oraz materiałem mikrobiologicznym szczepów *Pseudomonas fluorescens* MKB 100 i *Pseudomonas* sp. MKB 158 i 249 ograniczało zgorzel siewek tych zbóż powodowaną przez *F. culmorum* (Khan i in., 2006).

WNIOSKI

1. Gatunek *F. avenaceum* stanowi zagrożenie dla żyta uprawianego w woj. lubelskim.
2. Ze względu na dużą szkodliwość *F. avenaceum* należy uwzględnić tego patogena w hodowli nowych odmian żyta
3. Odmiana Gradan F₁ wydaje się najbardziej przydatna do uprawy w warunkach zagrożenia przez *Fusarium* spp.

LITERATURA

- Blecharczyk A., Małecka I. 2001. Wpływ nawożenia na plonowanie żyta ozimego uprawianego w zmianowaniu i monokulturze w doświadczeniu wieloletnim od 1957 roku. Pam. Puł. 128: 13 — 23.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey England.
- Bravo H. R., Lazo W. 1993. Antimicrobial activity of cereal hydroxamic acid and related compounds. Phytochemistry 33: 569 — 571.
- Burgess L. W., Lindell C. M., Summerell B. A. 1988. Laboratory manual for *Fusarium* research. The University of Sydney.
- Burgiel Z. J., Klima K. 1999. Skuteczność nowych zapraw nasiennych w ochronie żyta przed pleśnią śniegową. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin 39, 2: 828 — 830.

- Chongo G., Gossen B. D., Kutcher H. R., Gilbert J., Turkington T. K., Fernandez M. R., McLaren D. 2001. Reaction of seedling roots of 14 crop species to *Fusarium graminearum* from wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 132 — 137.
- Dahleen L. S., McCormik S. P. 2001. Trichothecene toxin effects on barley callus and seedling growth. *Cer. Res. Comm.* 29, 1–2: 115 — 120.
- Domsch K. H., Gams W. 1970. *Pilze aus Agrarböden*. Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Ellis M. B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Fernandez M. R., Chen Y. 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* 89, 2: 164 — 169.
- Głazewska-Maniewska R., Maciejewska A., Melech A. 2004. Występowanie bakterii glebowych z rodzaju *Arthrobacter* spp. w uprawie żyta ozimego oraz ich enzymatyczne i antagonistyczne właściwości. *Acta Sci. Pol., Agricultura* 3, 1: 129 — 137.
- Khan M. R., Fischer S., Egan D., Doohan F. M. 2006. Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology* 96, 4: 386 — 394.
- Kiecana I., Kocyłak E. 1999. Pathogenicity of *Fusarium* spp. on oats seedlings (*Avena sativa* L.). *Plant Breeding and Seed Science* 43, 1: 91 — 99.
- Kiecana I., Mielniczuk E. 2001. Występowanie *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. oraz *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun na rodach hodowlanych owsa (*Avena sativa* L.). *Acta Agrobotanica* 64, 1: 83 — 93.
- Kiecana I., Mielniczuk E., Cegiełko M., Pszczółkowski P. 2003. Badania nad chorobami podsuszkowymi owsa (*Avena sativa* L.) z uwzględnieniem temperatury i opadów. *Acta Agrobotanica* 56, 1–2: 95 — 107.
- Kurek E., Jaroszuk-Ścisł J. 2003. Rye (*Secale cereale* L.) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control* 26, 1: 48 — 56.
- Kurowski T. P., Majchrzak B. 2000. Patogeniczność i szkodliwość wybranych gatunków z rodzaju *Fusarium* dla żyta, pszenicy i owsa. *Rocz. AR Poznań CCXXI, Ogrodn.* 30: 61 — 68.
- Łacicowa B. 1963. Badania nad morfologią i biologią *Fusarium poae* (Peck) Wr oraz patogeniczności tego gatunku względem siewek pszenicy. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. C Biol.*, XVIII, 17: 419 — 439.
- Łacicowa B. 1969. Metoda laboratoryjna szybkiej oceny odporności jęczmienia na *Helminthosporium sativum* P. K. et B. *Biul. IHAR* 3–4: 61 — 62.
- Łacicowa B. 1970. Badania szczepów *Helminthosporium sorokinianum* (= *H. sativum*) oraz odporność odmian jęczmienia jarego na ten czynnik chorobotwórczy. *Acta Mycologica* 6: 187 — 248.
- Łacicowa B., Kiecana I. 1987. Występowanie *Fusarium culmorum* (W.G.Smith) Sacc. i *Fusarium avenaceum* (Fries.) Sacc. na pszenicy oraz podatność rodów hodowlanych na porażenie. *Rocz. Nauk Roln., Ser. E*, 17, 1: 161 — 177.
- Łacicowa B., Pięta D. 1998. Wpływ temperatury i opadów na udział grzybów w powodowaniu chorób podsuszkowych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agrobotanica* 51, (1–2): 51 — 61.
- Łacicowa B., Sułek D., Wagner A. 1979. Badania podatności odmian pszenicy ozimej na porażenie przez *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. *Rocz. Nauk Roln., Ser. E*, 1: 93 — 113.
- Łacicowa B., Wagner A., Kiecana I. 1985. Fuzariozy pszenicy uprawianej na Lubelszczyźnie. *Rocz. Nauk Roln., Ser. E*, 15, 1–2: 67 — 86.
- Majchrzak B., Kurowski T. P., Okorski A. 2008. Fungi isolated from the roots and stem bases of spring wheat grown after different cruciferous plants as forecrops. *Pol. J. Natur. Sc.*, 23, 2: 299 — 309.
- Mańka M. 1989. Patogeniczność wybranych gatunków z rodzaju *Fusarium* dla siewek zbóż. *Rocz. AR Poznań, Rozpr. Nauk.* 201: 1 — 64.
- Mielniczuk E. 2008. Pathogenicity of *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson and Toussoun to 12 genotypes of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Breeding and Seed Science* 57: 3 — 12.
- Mikołajska J., Majchrzak B., Pszczółkowski P. 1996. Z badań nad fuzariozami zbóż na Pojezierzu Mazurskim. *Materiały z Sympozjum „Nowe kierunki w fitopatologii” Kraków 11–13 września 1996*: 299 — 302.
- Mills J. T. 1989. Ecology of mycotoxygenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J. Food Protection*, 52, 10: 737 — 742.

- Mishra C. B. P., Behr L. 1976. Der Einfluss von *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. und *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., *Griphosphaeria nivalis* Müller et Arx auf die Keimung des Weizen. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 12, 6: 373 — 377.
- Nelson P. E. Toussoun T. A., Marasas W. P. O. 1983. *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park and London.
- Packa D. 1997. Cytogenetic effects of *Fusarium* mycotoxins on root tip cells of rye (*Secale cereale* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and field bean (*Vicia faba* L. var. *minor*). J. Appl. Genet. 38, 3: 259 — 272.
- Pałys E., Kiecana I., Kraska P., Mielniczuk E., Cegiełko M. 2004. Wpływ systemów uprawy roli oraz poziomów nawożenia i ochrony żyta ozimego na porażenie podstawy źdźbła przez grzyby chorobotwórcze. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin 44, 2: 1001 — 1003.
- Ramirez C. 1982. Manual and atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- Rossi V., Crevi C., Chiusa G., Languaso L. 1995. Fungi associated with food rots on winter wheat in Northwest Italy. J. Phytopath., 143: 115 — 119.
- Skirgiełło A., Zadura M., Ławrynowicz M. 1979. Grzyby (*Mycota*) Tom X. Glonowce (*Phycomycetes*) Pleśniakowe (*Mucorales*) Kłębiankowe (*Endogonales*). Warszawa-Kraków.
- Šrobárová A., Pavlová A. 2001. Toxicity of secondary metabolites of the fungus *F. culmorum* in relation to resistance of winter wheat cultivars. Cereal Res. Comm. 29, 1–2: 101 — 108.
- Strausbaugh C. A., Bradley C. A., Koehn A. C., Forster R. L. 2004. Survey of root of wheat and barley in southeastern Idaho. Can. J. Plant Pathol. 26: 167 — 176.
- Strausbaugh C. A., Overturf K., Koehn A. C. 2005. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. Can. J. Plant Pathol. 27: 430 — 438.
- Truszkowska W., Chmurzyńska I., Czyrek A., Dorenda M., Dworzak B., Kutrzeba M. 1983. Zagadnienia zgorzeli podstawy źdźbła (*Avena sativa* L.). Roczn. Nauk Roln., Ser. E, 13, 1–2: 73 — 83).
- Wilkes M. A., Marshall D. R., Copeland L. 1999. Hydroxamic acids in cereal roots inhibit the growth of take-all. Soil Biol. Biochem. 31: 1831 — 1836.
- Wojciechowski S., Chełkowski J., Kostecki M. 1995. Influence of deoxynivalenol on electrolyte leakage in cereal seedling leaves. Acta Physiol. Plantarum 17, 4: 357 — 360.
- Żuk B. 1989. Biometria stosowana. PWN, Warszawa.

HALINA GÓRAL ¹
MIROSLAW S. POJMAJ ²
RENATA POJMAJ ²
MONIKA BURCZY ¹

¹ Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

² DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

Otrzymywanie nasion mieszańcowych pszenżyta ozimego w siewie pasowym linii cms i restorera oraz w mieszaninach tych form

Production of hybrid seeds of winter tritcale from cms and restoring lines in strip and bulk sowing

Zbadano pylenie formy ojcowskiej oraz osadzenie i plon nasion mieszańcowych w siewie pasowym linii męskosterylnej i restorera oraz w trzech mieszaninach tych form z dodatkiem do nasion linii 5%, 10% i 20% nasion restorera. Stwierdzono większą ilość pyłku i większe osadzenie nasion mieszańcowych w siewie pasowym. Plon nasion mieszańcowych w przeliczeniu na jednostkę powierzchni był większy przy udziale 10% i 20% restorera w mieszaninie w porównaniu do plonu w siewie pasowym i w mieszaninie z udziałem 5% restorera. Mieszańce otrzymane w mieszaninach i w siewie pasowym nie różniły się istotnie plonem ziarna. Otrzymane wyniki wskazują na możliwość produkcji nasion mieszańcowych pszenżyta w siewie mieszanym linii męskosterylnej i restorera zamiast w kosztownym siewie pasowym. Zalecaną proporcją mieszaniny może być 90% nasion linii cms i 10% nasion restorera.

Słowa kluczowe: pszenżyto, nasiona mieszańcowe, siew pasowy, mieszaniny

Pollen shedding of male patent, seed set on cms line and hybrid seed yield were studied in strip sowing of cms and restoring lines (1 : 1) and in bulk sowing with 5, 10 and 20 percent proportion of the males. A larger amount of shed pollen and a larger hybrid seed set was found in strip design. The hybrid seed yield per unit area was larger in bulk sowing with 10 and 20 percent of males compared to the yield in strip sowing and bulk sowing with 5 percent of males. The yield of hybrids did not differ significantly. The results indicate that hybrid seed of tritcale may be obtained in mixtures of cms and restoring lines instead of costly strip sowing. A mixture of 90% of cms line seeds with 10% of pollinator may be recommended.

Key words: tritcale, hybrid seed, strip sowing, bulk sowing

WSTĘP

Hodowla odmian mieszańcowych wymaga zidentyfikowania form matecznych i ojcowskich wykazujących dobrą ogólną i swoistą wartość kombinacyjną oraz dających efekt heterozji u mieszańców F_1 . Formy ojcowskie muszą charakteryzować się dobrym pyleniem i powinny kwitnąć w podobnym czasie jak linie mateczne, aby zapewnić dostateczne osadzenie nasion mieszańcowych i tym samym ekonomiczną opłacalność ich produkcji. W hodowli odmian heterozyjnych pszenżyta do produkcji nasion mieszańcowych poleca się i wykorzystuje cytoplazmatyczno-genową męską sterylność opartą o cytoplazmę *T. timopheevi* (Nalepa, 1990, 2003; Góral, 2002, 2004; Ammar i in., 2006). Dotychczasowe badania wskazują, że polskie odmiany pszenżyta wytwarzają i uwalniają dostateczną ilość pyłku w czasie kwitnienia i mogą być dobrymi zapylaczami linii męskosterylnych. Osadzenie i plon nasion mieszańcowych w siewie pasowym linii cms i restorera zależą od zgodności terminów kwitnienia i genotypu rodziców, ich proporcji w siewie pasowym i szerokości pasów (Góral 2002, 2004). Otrzymywanie nasion mieszańcowych w siewie pasowym jest kosztowne, ponieważ zbiera się je tylko z części pola. Produkcja takich nasion w mieszaninie linii męskosterylnych i przywracających płodność mogłaby być bardziej ekonomiczna, jeżeli nie wpłynęłoby to na wielkość efektu heterozji i wyrównanie odmiany mieszańcowej. W dostępnej obecnie literaturze jest brak danych na temat możliwości otrzymywania nasion mieszańcowych pszenżyta w mieszaninie linia cms — restorer i wysokości plonu w ten sposób otrzymanych mieszańców.

Celem pracy było zbadanie osadzenia i plonu nasion mieszańcowych pszenżyta ozimego otrzymanych w siewie pasowym matecznej linii męskosterylnej i form ojcowskich przywracających płodność oraz w różnych proporcjach siewu form rodzicielskich w mieszaninie, a także ocena plonu otrzymanych mieszańców.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w latach 2005–2007 w Stacji Doświadczalnej w Prusach należącej do Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz w DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. Materiał do badań stanowiły: męskosterylna linia cms Purdy 5/3 wyhodowana w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa UR w Krakowie oraz ród LAD 965/98 i odmiana Pronto, wyhodowane w DANKO i charakteryzujące się zbliżonym terminem kwitnienia do linii matecznej oraz dobrym pyleniem i restoracją. W dwóch kolejnych latach założono doświadczenia z linią cms Purdy 5/3 oraz rodem LAD 965/98 (2005) i odmianą Pronto (2006) stosując wysiew mieszanin linia — restorer w 3 proporcjach (95%, 90% i 80% linii cms i odpowiednio 5%, 10% i 20% formy ojcowskiej), na poletkach o powierzchni 6 m². W 2006 roku linię męskosterylną wysiano dodatkowo w siewie pasowym w proporcji 1 : 1, stosując szerokość pasa matecznej linii cms i formy ojcowskiej, wynoszącą 1 m i odstęp między nimi 0,6 m. Poletka izolowano parawanem z agrowłókniny o wysokości 2,5 m. W czasie kwitnienia, codziennie w godzinach 8–11 w środku poletek mieszanin oraz na poletku linii matecznej w siewie pasowym wykładano na wysokości kłosów pułapki

pyłkowe, tj. szkiełka podstawowe pokryte wazeliną, w 2–3 powtórzeniach. Ziarna pyłku liczono pod mikroskopem projekcyjnym w 30 losowo wybranych polach widzenia, tj. na powierzchni 13,6 mm² i przedstawiono jako sumę ziaren pyłku z okresu kwitnienia. Osadzenie ziaren w kłosach linii męskosterylnej liczono w 40 kwiatach, na próbie 5 kłosów losowo oznaczonych w czasie kwitnienia i pobranych z 3 miejsc poletka każdej proporcji mieszanin oraz z linii cms w siewie pasowym. Po zbiorze policzono wszystkie kłosa i oceniono plon nasion mieszańcowych z 1 m². Plon ziarna mieszańców badano w latach 2006 i 2007 w doświadczeniach ścisłych, założonych w Laskach i w Choryni, w dwóch powtórzeniach, na poletkach 5 m². Do obiektów badanych w 2006 roku dołączono mieszańca otrzymanego w siewie pasowym w odrębnym doświadczeniu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Sposób produkcji nasion mieszańcowych pszenżyta w mieszaninie linia-restorer mógłby być zdecydowanie bardziej ekonomiczny niż produkcja w siewie pasowym, ponieważ plon zbiera się z całej powierzchni pola, a nie tylko z linii matecznej. W mieszaninie otrzymuje się nasiona handlowe mieszańców trójkomponentowych żyta (Geiger i in., 1995), a wyniki Jakubca i Wróbel (1981) zachęcały także do otrzymywania nasion mieszańców pojedynczych pszenicy w mieszaninie linia cms — restorer. Autorzy informują o 70–80% osadzeniu nasion mieszańcowych pszenicy, zarówno przy siewie pasowym linia cms — zapylacz w proporcji 1:1, jak i w mieszaninach z udziałem 15% i 30% nasion formy ojcowskiej.

W niniejszych badaniach stwierdzono, że w mieszaninie linii cms i rodu LAD 965/98 osadzenie ziaren w kłosach linii cms Purdy 5/3 i plon nasion mieszańcowych zależały wprost proporcjonalnie od udziału formy ojcowskiej w mieszaninie (tab. 1).

Tabela 1

Liczba ziaren pyłku na pułapkę, osadzenie ziaren i plon nasion mieszańcowych w mieszaninach linii cms Purdy 5/3 i rodu LAD 965/98, Prusy, 2005
Number of pollen grains per pollen trap, seed setting and hybrid grain yield in mixtures of cms Purdy 5/3 and LAD 965/98, Prusy, 2005

Udział formy ojcowskiej (%) Proportion of male parent (%)	Liczba ziaren pyłku na pułapkę Number of pollen grains per trap	Osadzenie ziaren (%) Seed setting (%)	Plon (kg/m ²) Yield (kg/m ²)
5	16,5	15,3	0,37
10	15,5	25,0	0,61
20	30,0	42,8	0,84
NRI — LSD _(0.05)	NI	9,8	—

NI — Różnice nieistotne, Not significant

Dwudziestoprocentowy udział formy ojcowskiej w mieszaninie był najkorzystniejszy. W podobnym doświadczeniu z odmianą Pronto, przeprowadzonym w następnym roku, nie obserwowano jednak takiej zależności (tab. 2). Ponadto największą ilość pyłku i najlepsze osadzenie ziaren w kłosach roślin męskosterylnych stwierdzono przy zastosowanym w tym doświadczeniu siewie pasowym. Plon nasion mieszańcowych uzyskany z linii męskosterylnej w siewie pasowym był większy od plonu otrzymanego we wszystkich

proporcjach mieszanin i wynosił 0,5 kg/m², ale po uwzględnieniu powierzchni zajmowanej przez odmianę Pronto i odstępu między poletkami linii matecznej i formy ojcowskiej wynosił tylko 0,19 kg/m². Był więc równy plonowi nasion z mieszaniny z udziałem 5% formy ojcowskiej i znacznie mniejszy od plonu z mieszanin z udziałem 10 i 20% odmiany Pronto.

Tabela 2

Liczba ziaren pyłku na pułapkę, osadzenie ziaren i plon nasion mieszańcowych w siewie pasowym i w mieszaninach linii cms Purdy i odmiany Pronto, Prusy, 2006
Number of pollen grains per pollen trap, seed setting and hybrid grain yield in strip sowing and in mixtures of cms Purdy 5/3 and cv. Pronto, Prusy, 2006

Udział formy ojcowskiej Proportion of male parent	Liczba ziaren pyłku na pułapkę Number of pollen grains per trap	Osadzenie ziaren (%) Seed setting (%)	Plon (kg/m ²) Yield (kg/m ²)
Siew pasowy — Strip sowing	99,0	64,4	0,19
Mieszanina — Mixture — 5%	35,3	28,5	0,19
Mieszanina — Mixture — 10%	33,0	37,5	0,35
Mieszanina — Mixture — 20%	30,3	32,4	0,37
NRI — LSD _(0,05)	25,2	13,9	—

Mieszańce linii cms Purdy × LAD 965/98 wytworzone w siewie pasowym i w mieszaninach z różnym udziałem linii matecznej różniły się istotnie plonem tylko w Choryni (tab. 3).

Tabela 3

Plon ziarna mieszańców (dt/ha) otrzymanych w siewie pasowym i w mieszaninach linii cms Purdy 5/3 irodu LAD 965/98, 2006
Yield of hybrids (dt/ha) obtained in strip sowing and in mixtures of cms Purdy 5/3 line and LAD 965/98, 2006

Udział formy ojcowskiej Proportion of male parent	Laski	Choryń	Średnia Average
Siew pasowy — Strip sowing	88,7	57,8	73,2
Mieszanina — Mixture — 5%	79,7	49,7	64,7
Mieszanina — Mixture — 10%	85,4	63,8	74,6
Mieszanina — Mixture — 20%	82,2	61,3	71,3
NRI — LSD _(0,05)	12,7	8,8	10,7
Średnia wzorców — Mean of checks ¹	96,5	68,5	82,6

¹ Moderato, Woltario, Sorento i Grenado

Plon ziarna mieszańców otrzymanych w mieszaninie z udziałem 10% i 20% rodu ojcowskiego był istotnie większy niż w mieszaninie z 5% udziałem formy ojcowskiej i podobny do plonu mieszańca otrzymanego w siewie pasowym. Mieszańce linii cms Purdy 5/3 i odmiany Pronto otrzymane w siewie pasowym i w mieszaninach nie różniły się istotnie plonem ziarna (tab. 4). W obu doświadczeniach plon ziarna mieszańców otrzymanych w mieszaninie z 10% udziałem formy ojcowskiej był zbliżony do plonu mieszańców otrzymanych w siewie pasowym i większy, choć nieistotnie, niż plon mieszańców wytworzonych z 5% i 20% udziałem zapylacza. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań Wosia i wsp. (2007), którzy wykazali brak istotnych różnic w plonowaniu mieszańców otrzymanych w siewie pasowym i w mieszaninach z 5% i 10%

udziałem restorera. Wskazują na możliwość towarowej produkcji nasion mieszańcowych pszenżyta w siewie mieszanym linii męskosterylnej i restorera zamiast w kosztownym siewie pasowym. Zalecaną proporcją mieszaniny może być 90% nasion linii cms i 10% nasion restorera. Większy udział nasion linii w mieszaninie może wpłynąć na zmniejszenie plonu ziarna u mieszańców.

Tabela 4

Plon ziarna mieszańców (dt/ha) otrzymanych w siewie pasowym i w mieszaninach męskosterylnej linii cms Purdy 5/3 i odmiany Pronto, 2007
Yield of hybrid (dt/ha) obtained in strip sowing and in mixtures of cms Purdy 5/3 line and cv. Pronto, 2007

Udział formy ojcowskiej Proportion of male parent	Laski	Choryń	Średnia Average
Siew pasowy — Strip sowing	83,1	82,6	82,8
Mieszanina — Mixture — 5%	78,6	77,8	78,2
Mieszanina — Mixture — 10%	81,2	86,8	84,0
Mieszanina — Mixture — 20%	74,1	77,5	75,8
NRI — LSD _(0.05)	8,5	12,7	6,9
Średnia wzorców — Mean of checks ¹	87,1	82,1	84,6

¹ Moderato, Woltario

WNIOSKI

1. Nie wykazano wyraźnego związku między osadzeniem ziaren w kłosach męskosterylnej linii matecznej i plonem nasion mieszańcowych a udziałem formy ojcowskiej w mieszaninie. Proporcjonalna zależność wystąpiła tylko w jednym z doświadczeń.
2. Osadzenie ziaren w siewie pasowym było większe niż w mieszaninach.
3. Plon nasion mieszańcowych w przeliczeniu na jednostkę powierzchni był większy przy udziale 10% i 20% restorera w mieszaninie w porównaniu do plonu w siewie pasowym i w mieszaninie z udziałem 5% restorera.
4. Mieszańce otrzymane w mieszaninach i w siewie pasowym nie różniły się istotnie plonem ziarna.

LITERATURA

- Ammar K., Crossa J., Pfeiffer W. H. 2006. Developing a hybrid seed production system and evaluation of heterosis levels in hybrids from CIMMYT's spring triticale germplasm. Abstracts of 6th Int. Triticale Symp. Stellenbosch, South Africa, 3–7 September 2006: 27 — 28.
- Geiger H. H., Yuan Y., Miedaner T., Wilde P. 1995. Environmental sensitivity of cytoplasmic gene male sterility (CMS) in *Secale cereale* L. In: Genetic mechanisms for hybrid breeding. Ed. U. Kück, G. Wricke. Adv. Plant Breed. 18: 7 — 17.
- Góral H. 2002. Production of triticale (*X Triticosecale* Wittm.) hybrid seeds using the sterilizing cytoplasm of *Triticum timopheevi*. Cereal Res. Com. 30: 31 — 38.
- Góral H. 2004. Wpływ odległości źródła pyłku na efektywność zapylania linii męskosterylnych pszenżyta ozimego. Biul. IHAR 231: 157 — 164.
- Jakubiec J., Wróbel A. 1981. Stan i perspektywy heterozyjnej hodowli pszenicy. Biul. IHAR 144: 101 — 107.
- Nalepa S. 1990. Hybrid triticale: present and future. Proc. of the Second Intern. Triticale Symp. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, 1–5 October 1990, CIMMYT, Mexico: 402 — 407.

- Nalepa S. 2003. Perspektywy hodowli pszenżyta w Resource Seeds Inc. w USA. Biul. IHAR 230: 143 — 146.
- Woś H., Woś J., Waga J., Budzianowski G. 2007. Hodowla mieszańcowa pszenżyta ozimego. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli roślin uprawnych”, Zakopane, 29.01 — 02.02.2007, streszczenia — suplement, 1.

BOGUSŁAWA JAŚKIEWICZ

Zakład Uprawy Roślin Zbożowych

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Wpływ gęstości siewu i sposobu nawożenia azotem na plonowanie i cechy morfologiczne pszenżyta ozimego odmiany Woltario

The influence of sowing density and nitrogen application method on yielding and morphological characters of winter triticale cv. Woltario

Badania polowe przeprowadzono w latach 2000–2003 w SD IUNG-PIB w Grabowie. Celem badań było określenie wpływu zróżnicowanej gęstości siewu i sposobu nawożenia azotem na liczbę pędów i liści roślin pszenżyta ozimego odmiany Woltario. Doświadczenie zlokalizowane było na glebie kompleksu pszennego dobrego. Zastosowano gęstości siewu 100, 200, 300, 400 ziaren/m² i 3 sposoby nawożenia azotem (dawki 120 kg N/ha). Optymalną liczbę pędów (4,4 szt.) i liści zielonych (12 szt.) z rośliny stwierdzono w fazie dojrzałości młecznej przy gęstości siewu 200 ziaren na m², ponieważ w takich warunkach uzyskano najwyższy plon ziarna pszenżyta odmiany Woltario. Zależności regresyjne między plonem ziarna a liczbą pędów i liści wskazują, że poprzez badane czynniki możemy kształtować plon ziarna z jednostki powierzchni.

Słowa kluczowe: gęstość siewu, liczba liści, liczba pędów, sposób nawożenia azotem

Field experiments with triticale cv. Woltario were conducted in the years 2000–2003 at the Experiment Station Grabów belonging to the Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute. The aim of this research was to define influence of the nitrogen application method and sowing density on changes in the number of shoots and green leaves per plant of winter triticale cv. Woltario. Plots were located on a good wheat soil. Sowing densities: 100, 200, 300, 400 grain/ m² and 3 nitrogen application methods (dose 120 kg N/ha) were applied. Optimal shoot number (4.4) and green leaves number (12) per plant at milky stage were stated under sowing density 200 grain per 1 m². Under such conditions the highest grain yield of the triticale Woltario variety was harvested. Regression relations between grain yield as well as shoots and leaves number per plant show that we can form grain yield basing on the studied factors.

Key words: nitrogen application method, number of leaves, number of shoots, sowing density

WSTĘP

Azot aplikowany na rośliny zbożowe w okresie wegetacji wpływa na kształtowanie się ich cech plonotwórczych. Zastosowany w okresie krzewienia decyduje o obsadzie kłosów, wnoszony na początku strzelania w źdźbło o liczbie ziaren w kłosie i wykształceniu ziarna,

a stosowany w fazie kłoszenia głównie o zawartości białka w ziarnie. Istotne znaczenie dla efektywności nawożenia azotem ma między innymi zdolność odmiany do produktywnego wykorzystania azotu. Krzewienie roślin zależy w dużym stopniu od obsady roślin na jednostce powierzchni, a także od właściwości odmianowych. Głównym organem asymilującym roślin pszenżyta są liście. Ich liczba i powierzchnia oraz czas trwania aktywności asymilacyjnej w dużej mierze decydują o wielkości plonu biologicznego (Byszewski, 1977; Nalborczyk i in., 1995). Szybkość wyrastania kolejnych liści z merystemu wierzchołkowego, ich kształt i rozmiar oraz zamieranie są wprawdzie uwarunkowane genetycznie, jednak w dużym stopniu zależą także od warunków środowiska i agrotechniki (Byszewski, 1977; Grabiński, 1994; Jaśkiewicz, 1995; Nalborczyk i in., 1995). Według Franka i Bauera (1995) liczba wytworzonych liści na źdźbło w mniejszym stopniu zależą od zmienności środowiska, a głównie zmodyfikowane są genetycznie. Pewne różnice między odmianami w tempie rozwoju liści stwierdził Cutforth i wsp. (1992). Według Byszewskiego (1995) kształtowanie się liczby pędów na roślinie i liczby liści zdolnych do asymilacji ma bowiem związek z końcowym plonem ziarna.

Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu zróżnicowanej gęstości siewu i sposób nawożenia azotem na liczbę pędów i liści asymilujących na roślinie w poszczególnych fazach rozwojowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w latach 2000–2003 w SD IUNG-PIB Grabów (51°25' N; 21°58' E) na glebie pseudobielicowej wytworzonej z piasku gliniastego lekkiego na glebie lekkiej. Gleba charakteryzowała się lekko kwaśnym odczynem, wysoką zawartością fosforu i potasu oraz niską zawartością magnezu we wszystkich latach badań.

Czynnikami doświadczenia były cztery gęstości siewu: 100, 200, 300, 400 nasion/m² (czynnik I) oraz 3 sposoby stosowania podzielonej dawki N (dawka ogólna 120 kg N/ha) (czynnik II) w fazach rozwojowych (tab. 1).

Tabela 1

Sposoby stosowania podzielonej dawki azotu w fazach rozwojowych
Nitrogen application methods in growth stages

Sposoby stosowania podzielonej dawki azotu Nitrogen application method	Fazy rozwojowe — Growth stages				
	ruszenie wegetacji beginning of vegetation	koniec krzewienia end of tillering (29*)	początek strzelania w źdźbło beginning of shooting (30*)	pełnia strzelania w źdźbło full shooting (32*)	kłoszenie heading (51*)
I	60	—	60	—	—
II	40	—	60	—	20
III	20	40	—	60	—

* — skala Zadoksa i wsp. (1974); Acc.to Zadoks et al. (1974)

Doświadczenie przeprowadzono metodą pasów prostopadłych (split-blok) w 4 powtórzeniach na glebie kompleksu pszennego dobrego. Powierzchnia poletka do siewu wynosiła 36 m² natomiast do zbioru 28,3 m². Nawozy fosforowo-potasowe zastosowano w ilości

53 kg/ha P_2O_5 , 80 kg/ha K_2O , 7,0 kg/ha MgO, natomiast w ostatnim roku badań wysiano 72 kg/ha P_2O_5 w formie superfosfatu i 100 kg/ha K_2O w formie soli potasowej. Nawożenie azotem zastosowano w formie saletry amonowej (34% N). We wszystkich latach badań nie wystąpiło wyleganie roślin. Kompleksowa ochrona doświadczeń była prowadzona według zaleceń IOR.

Rośliny pobierano na każdym poletku z powierzchni 0,5 m² w fazie krzewienia (29*) strzelania w źdźbło (32*), kłoszenia (51*) i dojrzałości mleczej (71* skala wg Zadoksa). Określono liczbę roślin z badanej powierzchni oraz policzono pędy, które miały więcej niż dwa liście i wszystkie w pełni wykształcone liście asymilujące na pojedynczej roślinie. Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Wartości półprzedziałów ufności wyliczono stosując test Tukeya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Określono zależność regresyjną między plonem ziarna a liczbą roślin z m² oraz liczbą pędów i liści asymilujących na roślinie. W wyznaczonym zadaniu badawczym kierunek zmian badanych cech w okresie wegetacji był podobny, dlatego podano uśrednione wyniki z trzech lat badań.

Charakterystykę warunków pogodowych przedstawiono w innym opracowaniu autorki (2008).

WYNIKI I DYSKUSJA

Nie stwierdzono współdziałania między gęstością siewu a sposobem nawożenia azotem w liczbie roślin z m² oraz pędów i liści z rośliny, dlatego podano tylko efekty główne.

Wypadanie roślin występowało w całym okresie wegetacji i zależało od gęstości siewu (tab. 2). W fazie krzewienia wiosennego stwierdzono o 3%–5% mniejszą obsadę roślin w stosunku do liczby roślin wieszłych, natomiast w fazie dojrzałości mleczej wypadło 6%–8% roślin. Liczba roślin malała w kolejnych fazach rozwoju, co wskazuje na to, że proces samoregulacji w łanie dokonuje się w całym okresie wegetacji. Podobne spostrzeżenia poczynili Jaśkiewicz (1995) i Grabiński (1994).

W fazie dojrzałości mleczej przy gęstości 300 i 400 szt. na m² wypadło po 8% roślin na każdej gęstości siewu w stosunku do wysianych. Stwierdzono, że im większa była liczba roślin po wschodach, tym więcej roślin obumierało w poszczególnych fazach wzrostu, a nasilenie wypadania roślin wystąpiło w okresie zimowania i w fazie krzewienia. Zwiększanie obsady roślin po wschodach, pomimo, że wpływa na ograniczenie przeżywalności w okresie wegetacji, jest podstawowym elementem zapewnienia odpowiednio wysokiej liczby roślin i kłosów w okresie zbioru. W fazie krzewienia liczba roślin na obiektach z różnymi sposobami stosowania azotu była podobna. Przy drugim i trzecim sposobie stosowania azotu stwierdzono podobną liczbę roślin w fazach strzelanie w źdźbło, kłoszenie i dojrzałość mleczna. Natomiast istotnie niższa obsada roślin w tych fazach była przy pierwszym sposobie nawożenia (60 kg N/ha w fazie ruszenie wegetacji +60 kg N/ha w fazie strzelanie w źdźbło). W fazie krzewienia przy drugim sposobie nawożenia wypadło — 3% roślin, przy trzecim — 4%, a przy pierwszym — 6%. Natomiast w fazie dojrzałości mleczej najwięcej roślin wypadło przy pierwszym sposobie stosowania azotu 10%, przy drugim 6%, a trzecim 8% roślin.

Tabela 2

Liczba roślin na 1 m² pszenżyta ozimego odmiany Woltario w poszczególnych fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu i sposobu stosowania azotu
Plants number per m² of winter triticale cv. Woltario in various growth stages depending on density of sowing and nitrogen application method

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Sowing density (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages			
	krzewienie tillering	strzelanie w źdźbło shooting	kłoszenie heading	dojrzałość mleczna milk maturity
100	95	94	93	93
200	194	191	188	187
300	286	281	278	276
400	380	375	366	368
NIR _{0,05} — LSD	12,8	5,2	12,1	4,7
Sposób stosowania azotu*				
Nitrogen application method*				
I	234	231	224	224
II	242	240	237	236
III	240	236	232	230
NIR _{0,05} — LSD	r.n	4,1	10,2	5,1

*Objaśnienia tab. 1 — Explanation Table 1

Stwierdzono dodatnią zależność korelacyjną między plonem ziarna pszenżyta a liczbą roślin w całym okresie wegetacyjnym na badanych obiektach z różną gęstością siewu. Wyższą siłę związku między plonem ziarna a liczbą roślin wykazano w początkowych fazach rozwojowych i przy rzadkich siewach (tab. 3).

Tabela 3

Zależność regresyjna między plonowaniem pszenżyta ozimego (t/ha) a liczbą roślin w fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu
Regression dependence between winter triticale yielding (t/ha) and plants number in growth stages depending on density of sowing

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Density of sowing (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages			
	krzewienie — tillering		strzelanie w źdźbło — shooting	
	równanie regresji* regression equation	R ²	równanie regresji* regression equation	R ²
100	y = -7,855+0,1398x	0,56	y = -6,843+0,1311x	0,53
200	y = 0,709+0,0305x	0,49	y = 0,603+0,0252x	0,45
300	y = 3,884+0,0112x	0,44	y = 5,716+0,0039x	0,42
100	y = -5,875+0,1221x	0,50	y = -3,354+0,0951x	0,47
200	y = 3,311+0,0172x	0,44	y = 4,809+0,0094x	0,40
300	y = 5,617+0,0042x	0,35	y = 6,6524+0,0006x	0,31

**Wartości istotne przy $\alpha = 0,01$; Statistically significant coefficient

* Wartości istotne przy $\alpha = 0,05$ Statistically significant coefficient

Liczba pędów pszenżyta odmiany Woltario w poszczególnych fazach była uzależniona głównie od gęstości siewu, a więc ściśle związana z liczbą roślin na jednostce powierzchni (tab. 4). W każdej fazie rozwojowej w warunkach wzrastającej gęstości siewu stwierdzono mniejsze krzewienie roślin. Średnio dla wszystkich gęstości siewu w fazie dojrzałości pełnej było 15% mniej pędów z rośliny niż w fazie krzewienia. Małe zagęszczenie roślin

(100 i 200 ziaren na m²) wpłynęło na lepsze krzewienie się roślin, natomiast większe (300 ziaren/m²) i duże (400 ziaren/m²) spowodowały istotne zmniejszenie liczby pędów z rośliny we wszystkich fazach rozwojowych. W fazie strzelania w źdźbło w warunkach gęstych siewów zastosowanych w badaniach (300, 400 szt./m²) wypadło 12%, w fazie kłoszenia 29%, a dojrzałości mleczej 34% pędów z rośliny w porównaniu do liczby pędów z rośliny w fazie krzewienia.

Tabela 4

Liczba pędów z m² pszenżyta ozimego odmiany Woltario w fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu i sposobu stosowania azotu
Number of shoots per m² of the winter triticale cv. Woltario in the growth stages depending on density of sowing and nitrogen application method

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Sowing density (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages			
	krzewienie tillering	strzelanie w źdźbło shooting	kłoszenie heading	dojrzałość mlecza milk maturity
100	4,9	5,6	5,5	4,2
200	4,2	4,8	4,6	4,4
300	3,7	3,9	3,2	2,9
400	3,5	3,4	2,7	2,6
NIR _{0,05} — LSD	0,37	0,54	0,88	0,61
Sposób stosowania azotu*				
Nitrogen application method*				
I	4,2	4,5	4,1	3,7
II	4,0	4,4	3,9	3,5
III	3,8	4,3	3,9	3,4
NIR _{0,05} — LSD	r.n	r.n	r.n	r.n

*Objaśnienia: tab.1 – Explanation: Table 1

W innym eksperymencie Jaśkiewicz (1995) stwierdziła, iż zwiększenie zagęszczenia roślin u długosłomych odmian pszenżyta ozimego na jednostce powierzchni wpłynęło niekorzystnie na liczbę pędów z rośliny tych odmian, podobnie jak w analizowanych badaniach z odmianą krótkosłomą Woltario.

Zastosowane dawki i sposoby nawożenia azotem nie różnicowały istotnie liczby pędów z rośliny w badanych fazach rozwojowych (tab. 4). Niemniej bardziej rozkrzewione rośliny pochodziły z obiektów nawożonych dawką 60 kg N/ha w fazie ruszenia wegetacji (pierwszy sposób nawożenia azotem). Rozbicki (1997) uważa, że większe zagęszczenie pędów na m² wystąpiło w warunkach nawożenia większą dawką azotu w okresie wiosennego ruszenia wegetacji.

W badaniach z odmianą Woltario, najwięcej pędów z rośliny stwierdzono w fazie strzelania w źdźbło — 4,4 szt. (tab. 5). Najmniej rozkrzewione rośliny wystąpiły w fazie dojrzałości mleczej i kłoszenia (tab. 5). Natomiast najbardziej rozkrzewione rośliny były w fazie krzewienia. Liczba pędów z rośliny charakteryzowała się największą zmiennością (32,7%) w fazie kłoszenia. W pozostałych fazach rozwojowych współczynnik zmienności był podobny i mieścił się w granicach 22,3%–26,8%.

Tabela 5

Charakterystyka statystyczna liczby pędów i liści z rośliny pszenżyta ozimego odmiany Woltario w fazach rozwojowych

Statistics of shoots and leaf number per plant of winter triticale cv. Woltario in the growth stages

Cechy Traits	Zakres zmienności Range of variability		Średnia Mean	Odchylenie standardowe Standard deviation	Współczynnik zmienności(%) Correlation coefficient
	min	max			
Liczba pędów z rośliny — Shoots number per plant					
Krzewienie — Tillering	2,7	8,4	4,1	1,03	25,1
Strzelanie w źdźbło — Shooting	2,8	6,4	4,4	0,98	22,3
Kłoszenie — Heading	2,1	6,8	4,0	1,31	32,7
Dojrzałość mleczna — Milk maturity	2,0	5,4	3,5	0,94	26,8
Liczba liści z rośliny — Leaves number per plant					
Krzewienie — Tillering	9	30	15,4	4,07	26,4
Strzelanie w źdźbło — Shooting	13	35	22,5	5,97	26,5
Kłoszenie — Heading	9	37	19,7	7,77	39,4
Dojrzałość mleczna — Milk maturity	5	18	9,6	3,01	31,3

Z równań regresji liniowej wynika, że plon ziarna pszenżyta odmiany Woltario zależał w znacznej mierze od liczby pędów z rośliny, świadczą o tym wysokie wartości współczynników determinacji (tab. 6).

Tabela 6

Zależność regresyjna między plonowaniem (y) pszenżyta ozimego (t/ha) a liczbą pędów z rośliny w fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu

Regression dependence between winter triticale yielding (t/ha) and number of shoots per plant in growth stages depending on density of sowing

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Sowing density (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages					
	strzelanie w źdźbło shooting		kłoszenie heading		dojrzałość mleczna milk maturity	
	równanie regresji regression equation	R ²	równanie regresji regression equation	R ²	równanie regresji regression equation	R ²
100	y= 2,629+0,512x	0,42*	y= 2,880+0,4696x	0,51**	y= 3,204+0,543	0,51*
200	y= 5,094+0,331x	0,56**	y= 4,413+ 0,4689x	0,61**	y= 4,263+0,522x	0,72**
300	y= 5,533+0,325x	0,57**	y= 6,435+0,1151x	0,53**	y= 6,245+0,190x	0,52**

* Wartości istotne przy $\alpha = 0,05$; Statistically significant coefficient

** Wartości istotne przy $\alpha = 0,01$; Statistically significant coefficient

Przy gęstości siewu 300 ziaren/m² plon ziarna pszenżyta ozimego w największym stopniu (57%) zależał od liczby pędów z rośliny określonej w fazie strzelania w źdźbło. Przy tej samej gęstości siewu w następnych fazach rozwojowych (kłoszenie, dojrzałość mleczna) ta zależność się zmniejszała.

Z kolei w warunkach rzadszych siewów (100 i 200 ziaren/m²) siła związku wielkości plonu ziarna z liczbą pędów z rośliny wynosiła 0,51 wartości współczynnika determinacji w dojrzałości mlecznej dla wysiewu 100 ziaren/m² i 0,72 dla 200 ziaren/m².

Badane w doświadczeniu gęstości siewu wpłynęły istotnie na liczbę liści zielonych na roślinie (tab. 7). Rośliny pochodzące z małego zagęszczenia miały więcej liści, niż z większej obsady roślin (300, 400szt na m²). W fazie dojrzałości mlecznej liczba liści

zielonych przy gęstościach siewu 100 i 200 ziaren/m² oraz przy gęstości siewu 300 i 400 szt. na m² była podobna. W fazie krzewienia, na obiektach o gęstości siewu 200, 300, 400 szt./m² stwierdzono mniej odpowiednio o 11, 26, 37 %, w strzelania w źdźbło 14, 31, 45% oraz w fazie kłoszenia 30%, 47% i 57% liści zielonych w stosunku do liści zielonych z rośliny z najmniejszej gęstości siewu (100 szt./m²).

Tabela 7

Liczba liści z rośliny pszenżyta ozimego odmiany Woltario w fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu i sposobu stosowania azotu
Number of green leaves per plant of winter triticale cv. Woltario in the growth stages depending on density of sowing and nitrogen application method

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Sowing density (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages			
	krzewienie tillering	strzelanie w źdźbło shooting	kłoszenie heading	dojrzałość mleczna milk maturity
100	19	29	30	12
200	17	25	21	12
300	14	20	16	7
400	12	16	13	7
NIR _{0,05} — LSD	2,7	3,4	1,5	1,9
Sposób stosowania azotu*				
Nitrogen application method*				
I	15	22	19	10
II	15	23	20	9
III	16	22	20	10
NIR _{0,05} — LSD	r.n	r.n	r.n	r.n

* Objasnienia tab.1 — Explanation: Table 1

W fazie dojrzałości mlecznej z gęstości 300 i 400 szt./m² było o 42% mniej liści zielonych na roślinie niż w warunkach siewów rzadkich. W innych badaniach z długosłomym pszenżytem ozimym (Jaśkiewicz 1995) wynika, że zwiększanie osady roślin obniża liczbę liści zielonych z rośliny, co znajduje potwierdzenie w badanej krótkosłomej odmianie Woltario.

Grabiński (1994) potwierdza dodatni wpływ nawożenia azotem (dawki N) na liczbę wytworzonych liści pszenżyta ozimego na roślinach. Rozbicki (1997) stwierdza, że średnia liczba liści na pędzie rośliny wzrasta pod wpływem stosowania większej dawki azotu w okresie wiosennego ruszenia wegetacji.

Sposób nawożenia azotem pszenżyta ozimego odmiany Woltario w doświadczeniu polowym nie wpływał na liczbę liści asymilujących z rośliny (tab. 7). Zmieniała się ona jedynie wraz z upływem wegetacji. W fazie kłoszenia liczba liści zielonych zmalała o 12% w porównaniu do wcześniejszej fazy, natomiast w fazie dojrzałości mlecznej pozostało zaledwie po kilka liści asymilujących na roślinie, co stanowiło 49% liści zielonych z rośliny w fazie kłoszenia.

Największą zmienność w liczbie liści z rośliny stwierdzono w fazie kłoszenia, wówczas współczynnik zmienności wyniósł 39,4% (tab. 5). Zakres zmienności w okresie wegetacyjnym wahał się w zależności od fazy rozwojowej od 5 liści w fazie dojrzałości mlecznej do 37 liści w fazie kłoszenia.

Najwyższy plon ziarna pszenżyto odmiany Woltario wydało z obiektu o gęstości siewu 200 ziaren /m² i nawożeniu azotem 120 kg na ha zastosowanego w dwu dawkach (faza ruszenia wegetacji i faza strzelania w źdźbło; Jaśkiewicz, 2009).

Przedstawiono liniową zależność regresyjną w fazach rozwojowych między plonem ziarna a liczbą liści zielonych z rośliny (tab. 8).

Tabela 8

Zależność regresyjna między plonowaniem (y) pszenżyta ozimego (t/ha) a liczbą liści zielonych z rośliny (x) w fazach rozwojowych w zależności od gęstości siewu
Regression dependence between winter triticale yielding (t/ha) and number of green leaves per plant of winter triticale cv. Woltario in the growth stages depending on density of sowing

Gęstość siewu (ziaren/m ²) Sowing density (grain per m ²)	Faza rozwojowa Growth stages			
	strzelanie w źdźbło shooting		kłoszenie heading	
	równanie regresji regression equation	R ²	równanie regresji regression equation	R ²
100	y= 2,421+0,107x	0,39**	y= 3,190+0,077x	0,31**
200	y= 5,062+0,059x	0,57**	y= 5,597+0,046x	0,32**
300	y= 6,114+0,034x	0,65**	y= 6,493+0,019x	0,44**

** Wartości istotne przy $\alpha=0,01$ — Statistically significant coefficient

Liczba liści asymilujących na roślinie najsilniej decydowała o wielkości plonu ziarna przy określaniu jej w fazie strzelania w źdźbło. W następnej fazie wzrostu — kłoszenie — zaobserwowano zmniejszenie zależności plonu ziarna od liczby liści zielonych na roślinie. Wraz ze wzrostem zagęszczenia roślin na jednostce powierzchni liczba liści zielonych w coraz mniejszym stopniu wpływała na przyrost plonu ziarna.

WNIOSKI

1. Liczba pędów i liści z rośliny zależała od gęstości siewu, a więc obsady roślin na jednostce powierzchni, natomiast sposoby nawożenia azotem nie różnicowały tych cech.
2. Najwyższą liczbę pędów i liści z rośliny stwierdzono w warunkach rzadkich siewów (100 ziaren na m²). Mała obsada roślin na jednostce powierzchni i mniejsza produktywność pędów pochodzących z większego rozkrzewienia tych roślin zdecydowała o tym, że w rezultacie nie uzyskano wysokiego plonu ziarna.
3. Optymalną liczbę pędów (4,4 szt.) i liści zielonych (12 szt.) z rośliny stwierdzono w fazie dojrzałości mleczej przy gęstości siewu 200 ziaren na m², ponieważ w takich warunkach uzyskano najwyższy plon ziarna pszenżyta odmiany Woltario.
4. Zależności regresyjne między plonem ziarna a liczbą pędów i liści wskazują, że poprzez badane czynniki możemy kształtować plon ziarna z jednostki powierzchni. Stwarza to duże możliwości kształtowania badanych cech poprzez stosowanie czynników agrotechnicznych.

LITERATURA

- Byszewski W. 1977. Biologiczne podstawy produktywności roślin. PWN, Warszawa.
- Cutforth H., W., Jame Y., W., Jefferson P. G. 1992. Effect of temperature, vernalization and water stress on phyllochron and final main-stem leaf number of HY320 and Neepawa spring wheat's. *Canadian Journal of Plant Science* 72: 1141 — 1151.
- Frank A. B., Bauer A. 1995. Phyllochron differences in wheat, barley, and forage grasses. *Crop Science* 35: 19 — 23.
- Grabiński J. 1994. Wzrost, rozwój i plonowanie pszenżyta ozimego w zależności od głębokości i gęstości siewu oraz nawożenia azotowego. *Zesz. Nauk. AR Szczecin* nr 162 (58):49 — 54.
- Jaśkiewicz B. 1995. Wzrost, rozwój oraz plonowanie pszenżyta ozimego w zależności od terminu siewu i obsady roślin. *Puławy. Seria R* (328).
- Jaśkiewicz B. 2009. Plonowanie pszenżyta odmiany Woltario w zależności od gęstości siewu i sposobu nawożenia azotem. *Acta Agrophysica*. 13 (3), w druku.
- Jaśkiewicz B. 2008. Wpływ intensywności nawożenia i gęstości siewu na plonowanie pszenżyta ozimego odmiany Woltario. *Acta Scient. Polon.* 7 (2): 41 — 50.
- Nalborczyk E., Łoboda T., Pietkiewicz S. 1995. Photosynthetic indices of the canopy and grain yield. *Fragm. Agronomica* 2 (46): 98 — 99.
- Rozbicki J. 1997. Agrotechniczne uwarunkowania wzrostu, rozwoju i plonowania pszenżyta ozimego. Fundacja, Rozwój SGGW, Warszawa.

MICHAŁ NOWAKInstytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Identyfikacja genów *Vrn* w odmianach jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) zarejestrowanych w Polsce

Identification of the *Vrn* genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars from the Polish register

Długość okresu wernalizacji jęczmienia zwyczajnego warunkowana jest przez 3 loci: *VRN-H1*, *VRN-H2* oraz *VRN-H3*. Dominujące allele *Vrn-H1* i *Vrn-H3* są charakterystyczne dla odmian jarych. W odmianach ozimych występuje dominujący allele *Vrn-H2* oraz recesywne allele *vrn-H1* i *vrn-H3*. W pracy zidentyfikowano za pomocą markerów STS-PCR geny *Vrn-H1* oraz *Vrn-H2* w 41 jarych oraz 11 ozimych odmianach jęczmienia zwyczajnego zarejestrowanych w Polsce. Do identyfikacji genu *Vrn-H1* zastosowano parę starterów: HvBM5A-intron1-F3 i Intr1/H/R3, natomiast dla genu *Vrn-H2*: VRN-Ha-F i VRN-Ha-R. Obecność recesywnego allele *vrn-H1* stwierdzono we wszystkich badanych odmianach ozimych, a jego brak — we wszystkich analizowanych odmianach jarych jęczmienia. Obecność dominującego allele *Vrn-H2* stwierdzono we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych oraz w 10 odmianach jarych: Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos oraz Scarlett. W jarych odmianach Scarlett i Stratus obserwowano ponadto produkty amplifikacji, których obecność wynikać może z występowania nowej formy allelicznej genu *Vrn-H2* lub rearanżacji w genomach tych odmian.

Słowa kluczowe: geny *Vrn*, jęczmień zwyczajny, STS-PCR, wernalizacja

Length of the barley vernalization period is determined by 3 loci: *VRN-H1*, *VRN-H2* and *VRN-H3*. The dominant *Vrn-H1* and *Vrn-H3* alleles are characteristic for spring growth habit. In winter cultivars the dominant *Vrn-H2* and recessive *vrn-H1* and *vrn-H3* alleles are present. In this paper the *Vrn-H1* and *Vrn-H2* genes were identified by means of STS-PCR markers in 41 spring and 11 winter barley cultivars from the Polish register. The primer pair: HvBM5A-intron1-F3 and Intr1/H/R3 was used for identification of the *Vrn-H1* gene, and the pair: VRN-Ha-F and VRN-Ha-R for the *Vrn-H2* gene. The recessive *vrn-H1* allele was observed in all examined winter barley cultivars and in none of examined spring cultivars. The presence of dominant *Vrn-H2* allele was stated in all examined winter cultivars and in 10 spring cultivars: Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos and Scarlett. In the spring cultivars Scarlett and Stratus non-specific amplification products were observed. Their presence could be attributed to occurrence of new allelic forms of the *Vrn-H2* gene or from a rearrangement in genomes of these cultivars.

Key words: barley, STS-PCR, vernalization, *Vrn* genes

WSTĘP

Działanie niskiej temperatury na określonych etapach rozwoju roślin zbożowych jest niezbędne, aby doszło do ich kwitnienia i zawiązania ziarniaków. Zjawisko wernalizacji polega na nabywaniu lub przyspieszaniu zdolności roślin do kwitnienia poprzez traktowanie ich chłodem (Chouard, 1960). Proces wernalizacji zachodzi gdy temperatura powietrza wynosi od 0°C do 10°C i trwa przez kilka tygodni (Flood i Halloran, 1984). Badania fizjologiczne polegające na traktowaniu poszczególnych części roślin chłodem wykazały, że ośrodek odpowiadający za wernalizację znajduje się w szczytowym fragmencie pędu (Amasino, 2004).

Długość okresu wernalizacji w jęczmieniu zwyczajnym determinowana jest przez trzy loci. Locus *VRN-H1* znajduje się na chromosomie 5H, *VRN-H2* na chromosomie 4H (Yasuda i in., 1993), a *VRN-H3* na chromosomie 7H (Yan i in., 2006). Von Zitzewitz i wsp. (2005) dokonali dokładnej identyfikacji i charakterystyki locus *VRN-H1*. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzili oni, że kluczową rolę w tym locus odgrywa gen *HvBM5A*. Delecja w obrębie pierwszego intronu tego genu jest podstawowym czynnikiem determinującym jary charakter wzrostu rośliny (von Zitzewitz i in., 2005; Fu i in., 2005). Podobne badania przeprowadzone zostały również dla locus *VRN-H2*. W ich wyniku zidentyfikowano rodzinę genów *ZCCT-H* kodujących czynnik transkrypcyjny, zbudowany z białka zawierającego palec cynkowy i domenę CCT (Dubcovsky i in., 2005). W jęczmieniu rodzina ta zawiera trzy geny, które obecne są w genotypach ozimych, natomiast w genotypach jarych ulegają delecji (Dubcovsky i in., 2005; von Zitzewitz i in., 2005). W przypadku locus *VRN-H3*, o dominującym lub recesywnym jego charakterze decyduje mutacja w obrębie pierwszego intronu genu *HvFT* (Yan i in., 2006). Podstawowym systemem regulującym długość okresu wernalizacji u jęczmienia jest dwugenowy epistatyczny model *Vrn-H2/Vrn-H1*, gdzie produkt ekspresji genów *Vrn-H2* jest represorem dla *Vrn-H1* (Karsai i in., 2005; Kóti i in., 2006; Cockram i in., 2007; Szűcs i in., 2007). Ponadto wykazano, że działanie genów *Vrn-H1* i *Vrn-H2* regulowane jest przez intensywność światła oraz temperaturę (Karsai, 2008; Karsai i in., 2008).

W przypadku jęczmienia zwyczajnego genotyp w loci *VRN-H1* i *VRN-H2* jest silnie związany z tolerancją na działanie niskiej temperatury oraz wrażliwością na fotoperiod (von Zitzewitz i in., 2005). Z tego względu celem pracy było określenie za pomocą metody STS-PCR genotypów *Vrn* w odmianach jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) zrejonizowanych w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były zrejonizowane w Polsce odmiany jęczmienia zwyczajnego ozime: Bartosz, Bażant, Bombay, Bursztyn, Corbie, Gil, Gregor, Horus, Lomerit, Sigra, Tiffany i jare: Annabell, Antek, Atol, Barke, Basza, Binal, Blask, Boss, Brenda, Bryl, Edgar, Frontier, Granal, Hanka, Jersey, Johan, Lailla, Lot, Madonna, Mauritia, Nadek, Nagrad, Nagradowicki, Orthega, Philadelphia, Poldek, Prosa, Rabel, Rasbet, Rastik, Rataj, Refren, Rodion, Rodos, Ryton, Scarlett, Sebastian, Start, Stratus, Tolar, Widawa.

Całkowity DNA wyizolowano z pięciodniowych siewek badanych odmian metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Identyfikację genów *Vrn* w jęczmieniu zwyczajnym wykonano metodą STS-PCR. Do analizy *locus VRN-H1* zastosowano metodę opartą o analizę rearanżacji w obrębie sekwencji intronowej (Cockram i in., 2007). Do reakcji PCR włączono parę starterów: HvBM5A-intron1-F3 (5'-TTTGTCGGAACCTACAACCTTCA-3') i Intr1/H/R3 (5'-AAAGCTCCTGCCAACTACGA-3'), pozwalające na identyfikację recesywnego allelu *vrn-H1*. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja — 94°C przez 5 minut, 38 cykli: denaturacja — 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów — 60°C przez 30 sekund, elongacja — 72°C przez 1,5 minuty oraz po zakończeniu wszystkich cykli, końcowa elongacja — 72°C przez 10 minut.

Zmienność alleliczną w *locus VRN-H2* analizowano stosując markery STS-PCR opracowane przez Dubcovsky i in. (2005). Zastosowano tutaj parę starterów:

— VRN-Ha-F (5'-GCCTCTTCTTCTTCCTCGAC-3'),

— VRN-Ha-R (5'-ACTGGTACTCGTGCACTGGG-3'),

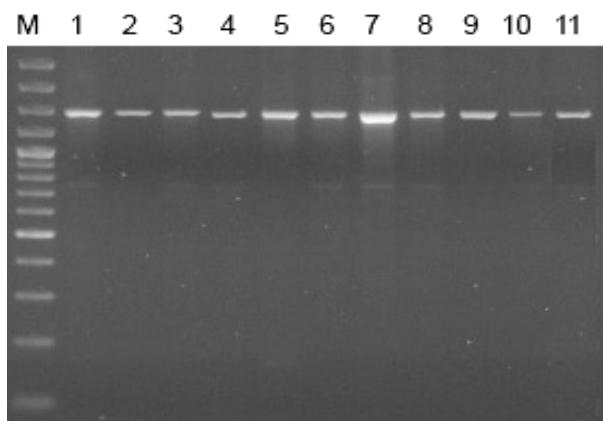
które amplifikują fragment DNA o długości 208 bp w odmianach zawierających dominujący allel *Vrn-H2*. Zastosowany został następujący profil termiczny reakcji: wstępna denaturacja — 94°C przez 5 minut, 38 cykli: denaturacja — 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów — 55°C przez 30 sekund, elongacja — 72°C przez 30 sekund oraz po zakończeniu wszystkich cykli, końcowa elongacja — 72°C przez 7 minut. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze TProfessional Basic (Biometra).

Produkty PCR rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym. Zastosowano marker długości GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze 1× TBE przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Produkty rozdzielone na żelu agarozowym wizualizowano w świetle UV i dokumentowano przy użyciu zestawu PolyDoc (Vilber Lourmat).

WYNIKI I DYSKUSJA

Po rozdzieleniu na żelu agarozowym produktów PCR uzyskanych z wykorzystaniem pary starterów HvBM5A-intron1-F3 oraz Intr1/H/R3, stwierdzono obecność prążka o wielkości 1500 bp we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych jęczmienia zwyczajnego. Fragmentu DNA o tej wielkości nie obserwowano natomiast w żadnej z 41 analizowanych odmian jarych (rys. 1, tab. 1). Uzyskane wyniki wskazują na obecność recesywnego allelu *vrn-H1* we wszystkich badanych odmianach ozimych oraz brak tego allelu we wszystkich analizowanych odmianach jarych jęczmienia (rys. 1).

Wykorzystanie do PCR pary starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R umożliwia identyfikację dominującego allelu *Vrn-H2* jęczmienia zwyczajnego. Po rozdzieleniu produktów amplifikacji na żelu agarozowym, fragment DNA o wielkości 208 bp występował we wszystkich 11 badanych odmianach ozimych oraz w 10 spośród 41 odmian jarych (Boss, Bryl, Edgar, Prosa, Rabel, Rastik, Rataj, Refren, Rodos, Scarlett).



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Bartosz, 2 — Bażant, 3 — Bombay, 4 — Bursztyn, 5 — Corbie, 6 — Gil, 7 — Gregor, 8 — Horus, 9 — Lomerit, 10 — Sigra, 11 — Tiffany

Rys. 1. Obraz elektroforetyczny otrzymany dla ozimych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdziłu produktów reakcji PCR, do której włączono startery HvBM5A-intron1-F3 oraz Intr1/H/R3

Fig. 1. Electrophoretic image of amplified products obtained for winter barley cultivars in PCR reaction with the HvBM5A-intron1-F₃ and Intr1/H/R3 primers

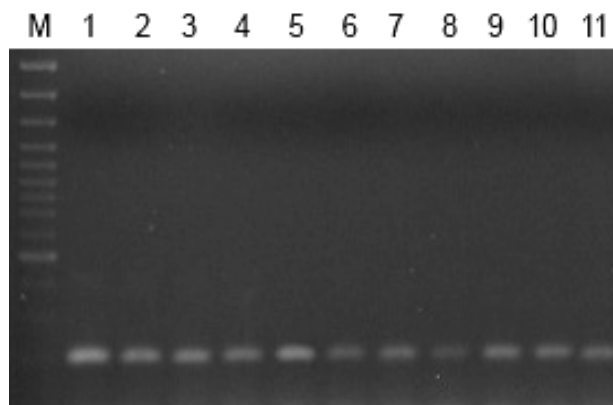
Tabela 1

Genotypy *Vrn* analizowanych odmian jęczmienia zwyczajnego
***Vrn* genotypes of analysed barley cultivars**

L.p. No.	Odmiana Cultivar	<i>Locus VRN — VRN locus</i>		L.p. No.	Odmiana Cultivar	<i>Locus VRN — VRN locus</i>	
		<i>VRN-H1</i>	<i>VRN-H2</i>			<i>VRN-H1</i>	<i>VRN-H2</i>
1	Annabell	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	27	Lot	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
2	Antek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	28	Madonna	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
3	Atol	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	29	Mauritia	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
4	Barke	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	30	Nadek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
5	Bartosz	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	31	Nagrad	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
6	Basza	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	32	Nagradowicki	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
7	Bażant	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	33	Orthega	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
8	Binal	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	34	Philadelphia	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
9	Blask	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	35	Poldek	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
10	Bombay	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	36	Prosa	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
11	Boss	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	37	Rabel	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
12	Brenda	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	38	Rasbet	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
13	Bryl	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	39	Rastik	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
14	Bursztyn	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	40	Rataj	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
15	Corbie	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	41	Refren	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
16	Edgar	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	42	Rodion	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
17	Frontier	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	43	Rodos	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
18	Gil	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	44	Ryton	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
19	Granal	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	45	Scarlett	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i> *
20	Gregor	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	46	Sebastian	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
21	Hanka	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	47	Sigra	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
22	Horus	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	48	Start	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
23	Jersey	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	49	Stratus	<i>Vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i> *
24	Johan	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	50	Tiffany	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>
25	Lailla	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>	51	Tolar	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>
26	Lomerit	<i>vrn-H1</i>	<i>Vrn-H2</i>	52	Widawa	<i>Vrn-H1</i>	<i>vrn-H2</i>

*Obecność niespecyficznego produktu reakcji PCR; Presence of non-specific PCR product

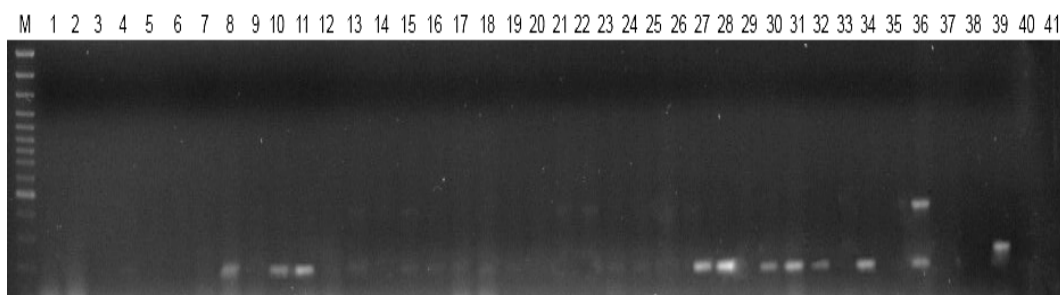
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono występowanie w tych odmianach dominującego allelu *Vrn-H2*. Pozostałe badane odmiany, w których nie stwierdzono amplifikacji w wyniku reakcji PCR, charakteryzowały się obecnością recesywnego allelu *vrn-H2* (rys. 2 i 3, tab. 1).



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Bartosz, 2 — Bażant, 3 — Bombay, 4 — Bursztyn, 5 — Corbie, 6 — Gil, 7 — Gregor, 8 — Horus, 9 — Lomerit, 10 — Sigra, 11 — Tiffany

Rys. 2. Obraz elektroforetyczny otrzymany dla ozimych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdziału produktów reakcji PCR, do której włączono startery VRN-Ha-F i VRN-Ha-R

Fig. 2. Electrophoretic image of amplified products obtained for winter barley cultivars in PCR reaction with the VRN-Ha-F and VRN-Ha-R primers



M — GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 1 — Annabell, 2 — Antek, 3 — Atol, 4 — Barke, 5 — Basza, 6 — Binal, 7 — Blask, 8 — Boss, 9 — Brenda, 10 — Bryl, 11 — Edgar, 12 — Frontier, 13 — Granal, 14 — Hanka, 15 — Jersey, 16 — Johan, 17 — Lailla, 18 — Lot, 19 — Madonna, 20 — Mauritia, 21 — Nadek, 22 — Nagrad, 23 — Nagradowicki, 24 — Orthega, 25 — Philadelphia, 26 — Poldek, 27 — Prosa, 28 — Rabel, 29 — Rasbet, 30 — Rastik, 31 — Rataj, 32 — Refren, 33 — Rodion, 34 — Rodos, 35 — Rytton, 36 — Scarlett, 37 — Sebastian, 38 — Start, 39 — Stratus, 40 — Tolar, 41 — Widawa

Rys. 3 Obraz elektroforetyczny otrzymany dla jarych odmian jęczmienia zwyczajnego w wyniku rozdziału na 1,5% żelu agarozowym produktów reakcji PCR, do której włączono startery VRN-Ha-F i VRN-Ha-R

Fig. 3. Electrophoretic image of amplified products obtained for spring barley cultivars in PCR reaction with the VRN-Ha-F and VRN-Ha-R primers

W przypadku odmiany Scarlett po rozdzieleniu produktów reakcji PCR, do której włączono parę starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R, na żelu agarozowym stwierdzono występowanie drugiego, niespecyficznego produktu o wielkości około 450 bp. Obecność tego fragmentu wynikać może z występowania nowej formy allelicznej badanego genu lub rearanżacji w genomie tej odmiany. W odmianie Stratus po reakcji z tą samą parą starterów nastąpiła amplifikacja pojedynczego fragmentu DNA o wielkości około 250 bp, który świadczyć może o modyfikacji w obrębie amplifikowanego fragmentu DNA lub występowaniu niezidentyfikowanej formy allelicznej w *locus VRN-H2* (rys. 3).

W dostępnej literaturze niewiele jest prac dotyczących analizy *loci* genów wernalizacji w roślinach jęczmienia. Cockram i wsp. (2007) analizowali 429 jarych, ozimych i przewódkowych odmian jęczmienia zwyczajnego. Spośród badanych odmian 417 miało genotyp *Vrn-H1* zgodny z wymaganą długością okresu wernalizacji. Spośród pozostałych 12 odmian, w 7 przypadkach zweryfikowano na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych i analizy czasu kwitnienia podawane wcześniej wymagania dotyczące procesu wernalizacji. Cztery odmiany jęczmienia: Almunia, Athene, Birgit oraz Express, zawierały allele charakterystyczne dla form jarych, podczas gdy analizy fenotypowe potwierdziły, że są to formy ozime. Rozbieżność ta wynikała przypuszczalnie z obecności nowego, niezidentyfikowanego allelu genu *Vrn-H1*. Cytowani autorzy stwierdzili także, że odmiana Xenia zawierająca allele charakterystyczne dla form ozimych, nie wymagała okresu działania niskiej temperatury do przejścia z fazy wegetatywnej w generatywną. Jej kwitnienie było jednak znacznie opóźnione w porównaniu z badanymi odmianami jarymi. Wyniki uzyskane w badaniach własnych wykazały, że badane odmiany ozime jęczmienia zwyczajnego posiadały recesywny allel *vrn-H1*, który nie występował w żadnej z badanych odmian jarych.

Dubcovsky i wsp. (2005) analizowali *locus VRN-H2* w 23 ozimych i 61 jarych odmianach jęczmienia zwyczajnego. Autorzy na podstawie badań wykazali obecność dominującego allelu *Vrn-H2* we wszystkich analizowanych odmianach ozimych oraz zidentyfikowali recesywny allel *vrn-H2* we wszystkich 61 odmianach jarych. W badaniach własnych wykazano, że wszystkie analizowane ozime odmiany jęczmienia posiadały dominujący allel *Vrn-H2*, jednakże występował on również w 10 spośród 41 badanych odmian jarych jęczmienia zrejonizowanych w Polsce.

WNIOSKI

1. W 11 badanych odmianach ozimych jęczmienia zwyczajnego zidentyfikowano obecność recesywnego allelu *vrn-H1*. Allel ten nie występował w żadnej z 41 badanych odmianach jarych. Dominujące allele *Vrn-H2* zidentyfikowano w 11 ozimych oraz w 10 jarych badanych odmianach jęczmienia zwyczajnego, a recesywne *vrn-H2* w 31 odmianach jarych.
2. Potwierdzono, że decydujący wpływ na determinację jarego charakteru rozwoju jęczmienia zwyczajnego ma obecność dominującego allelu *Vrn-H1*.

3. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie niespecyficznych produktów PCR w jarych odmianach jęczmienia Scarlett i Stratus po zastosowaniu pary starterów VRN-Ha-F i VRN-Ha-R.

LITERATURA

- Amasino R. 2004. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell* 16: 2553 — 2559.
- Chouard P. 1960. Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11: 191 — 238.
- Cockram J., Chiapparino E., Taylor S. A., Stamati K., Donini P., Laurie D. A. OSullivan D. M. 2007. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotype. *Theor. Appl. Genet.* 115: 993 — 1001.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11 — 15.
- Dubcovsky J., Chen Ch., Yan L. 2005. Molecular characterization of the allelic variation at the *VRN-H2* vernalization locus in barley. *Mol. Breed.* 15: 395 — 407.
- Flood R. G., Halloran G. M. 1984. The nature and duration of gene action for vernalization response in wheat. *Ann. Bot.* 53: 363 — 368.
- Fu D., Szűcs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., von Zitzewitz J., Hayes P. M., Dubcovsky J. 2005. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Gen. Genomics* 273: 54 — 65.
- Karsai I., Szűcs P., Mészáros K., Filichkina T., Hayes P. M., Skinner J. S., Láng L., Bedő Z. 2005. The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative × winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1458 — 1466.
- Karsai I. 2008. Effect of low light intensity on the *VRN-H1* and *VRN-H2* vernalization response loci in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agronomica Hungarica* 56(1): 1 — 10.
- Karsai I., Szűcs P., Kőszegi B., Hayes P. M., Casas A., Bedő Z., Veisz O. 2008. Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *J. Exp. Bot.* 59 (10): 2707 — 2715.
- Kóti K., Karsai I., Szűcs P., Horváth Cs., Mészáros K., Kiss G. B., Bedő Z., Hayes P. M. 2006. Validation of the two — gene epistatic model for vernalization response in a winter × spring barley cross. *Euphytica* 152: 17 — 24.
- Szűcs P., Skinner J. S., Karsai I., Cuesta-Marcos A., Haggard K. G., Corey A. E., Chen T. H. H., Hayes P. M. 2007. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol. Genet. Genomics* 277:249 — 261.
- von Zitzewitz J., Szűcs P., Dubcovsky J., Yan L., Francia E., Pecchioni N., Casas A., Chen T. H. H., Hayes P. M., Skinner J. S. 2005. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. *Plant Mol. Biol.* 59: 449 — 467.
- Yan L., Fu D., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Yasuda S., Dubcovsky J. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (51): 19581 — 19586.
- Yasuda S., Hayashi J., Moriya I. 1993. Genetic constitution for spring growth habit and some other characters in barley cultivars in the Mediterranean coastal region. *Euphytica* 70: 77 — 83.

BARBARA WIEWIÓRA

Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Podatność jęczmienia jarego na porażenie przez *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. sprawcę plamistości liści

Susceptibility of spring barley to infection of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. the causal agent of spot blotch

Badania dotyczyły podatności jęczmienia jarego w różnych fazach rozwojowych na plamistość liści powodowaną przez *Bipolaris sorokiniana*. Obejmowały ocenę wschodów polowych po inokulacji ziarna, określenie wpływu fazy rozwojowej, w której ma miejsce infekcja na wystąpienie plamistości liści w doświadczeniu polowym oraz wpływu porażenia roślin przez *B. sorokiniana* na plon i zdrowotność materiału nasiennego. Ponadto przeprowadzono laboratoryjną ocenę odporności wybranych odmian na plamistość liści. Wykonane analizy wykazały, że inokulacja ziarniaków grzybem *B. sorokiniana* spowodowała obniżenie wschodów polowych u wszystkich badanych odmian. Największe nasilenie plamistości liści w porównaniu do poletek kontrolnych obserwowano na roślinach inokulowanych w czasie kłoszenia i kwitnienia. Ponadto stwierdzono, że plon ziarna, a zwłaszcza jego porażenie przez *B. sorokiniana* zależały od fazy rozwojowej jęczmienia, w której nastąpiła infekcja. Spośród badanych odmian najbardziej odporne na plamistość liści w warunkach laboratoryjnych były odmiany Lailla i Prosa, a najbardziej podatne okazały się odmiany Rastik i Widawa.

Słowa kluczowe: *Bipolaris sorokiniana*, faza rozwojowa, infekcja, jęczmień jary, plamistość liści, podatność

The research concerned susceptibility of spring barley to infection of *Bipolaris sorokiniana* in relationship to plant development stage. The aim of this study was the estimation of emergence after seed inoculation and influence of plant development stage on occurrence of leaf spot in a field experiment. The effects of plant infections by *B. sorokiniana* on seed yield and seed health were also investigated. According to our results, the emergence of all examined cultivars decreased after seed inoculation of fungal solution of *B. sorokiniana*. The highest incidence of infection, in comparison to the control, was observed on plants inoculated at heading and flowering. It was also found that seed yield and seed infection by *B. sorokiniana* is strongly influenced by plant development stage, in which infection occurs. The most resistant cultivars, in the laboratory conditions, were Lailla and Prosa while the most susceptible were Rastik and Widawa.

Key words: *Bipolaris sorokiniana*, growth stage, infection, leaf spot, seed health, spring barley, susceptibility

WSTĘP

Grzyb *Bipolaris sorokiniana* jest znanym patogenem jęczmienia i sprawcą powszechnie występujących chorób podsuszkowych, plamistości liści oraz czernienia kłosów. Patogen ten występuje powszechnie w uprawach nie tylko jęczmienia, ale również pszenicy i wielu gatunków traw na całym świecie (Kiesling, 1985). Jęczmień jest podatny na infekcję w każdej fazie wzrostu. Spadek plonu może dochodzić nawet do ponad 30% i jest następstwem porażenia korzeni, dolnych międzywęźli, liści, kłosów, a w nich ziarna (Eng-Chong-Pua i in., 1985; Grey i Mathre, 1984). Objawy plamistości liści najliczniej pojawiają się w regionach, w których podczas sezonu wegetacyjnego utrzymuje się wysoka wilgotność i temperatura pomiędzy 22° i 30°C (Fletcher i Steffenson, 1994; Ghazvini i Tekauz, 2007).

Źródłem infekcji może być zarówno materiał siewny, jak i gleba. W przypadku porażonego ziarna infekcja następuje za pośrednictwem grzybni zlokalizowanej między plewkami, a okrywą owocowo-nasienną oraz przez konidia zanieczyszczające powierzchnię ziarniaków (Kumar i in., 2001). Częstotliwość zakażenia ziarna przez *B. sorokiniana* zależy od ilości materiału infekcyjnego znajdującego się w otoczeniu roślin podczas kwitnienia i formowania ziarna. Najczęściej są to konidia przenoszone przez prądy powietrza z porażonych liści. Duża wilgotność sprzyja porażeniu aparatu asymilacyjnego liści, zarodnikowaniu i zakażeniu ziarna w kłosach (Couture i Sutton, 1978). Z porażonego ziarna wyrastają chore siewki, a na pochwach i blaszkach liściowych grzyb tworzy konidia powodujące wtórne infekcje.

Patogen przeżywa jako grzybnia w zainfekowanych nasionach lub jako saprotrof na obumarłych tkankach roślinnych (Barba i in., 2002). W ziarniakach grzybnia może zachować żywotność do czterech lat (Christensen, 1963). Oprócz tego *B. sorokiniana* jest fakultatywnym pasożytem, który może żyć saprotroficznie w glebie. Przeżywa w postaci grubościennych przetrwalników, które są głównym czynnikiem sprawczym zgnilizny korzeni (Clark i Wallen, 1969). Grzyb ten charakteryzuje się zdolnością wytwarzania toksyny zwanej helminthosporalem oraz wydzielania poligalaktouranazy, celulazy i pektynoesterazy (Nakijima i in., 1998). Kachlicki (1995) donosi, że najczęściej występującą i aktywną fitotoksyną tego gatunku jest prehelminthosporol, który odgrywa ważną rolę w patogenie wpływając na osłabienie lub nawet zabicie komórek rośliny (Lilijeroth i in., 1993).

Szkodliwość *B. sorokiniana* zależy nie tylko od warunków pogody, ale przede wszystkim od podatności odmian (Grey i Mathre, 1984; Łacicowa i Pięta, 1991). Równie ważnym zagadnieniem jest patogeniczna specjalizacja tego gatunku, którą po raz pierwszy opisał Christensen (1922). Powszechnie wiadomo, że populacje tego patogena charakteryzują się dużą zmiennością wirulencji. Valjavec-Gratian i Steffenson (1997) w swojej pracy oznaczyli trzy patotypy dla tego gatunku. Podobne wyniki uzyskali Arabi i Jawhar (2004) opisując obecność w Syrii trzech grup wirulencji wśród 11 izolatów badanych przy użyciu 10 różnych genotypów jęczmienia. W Australii zaś Meldrum i wsp. (2004) zidentyfikowali sześć patotypów wśród badanych 34 izolatów. Występowanie i szkodliwość *B. sorokiniana* dla upraw jęczmienia jarego zależy od bardzo wielu

czynników zwłaszcza od rejonu upraw, warunków pogodowych, podatności odmian, jak również patotypów patogena występujących na tym rejonie oraz ich wirulencji.

Celem badań było określenie wschodów polowych po inokulacji ziarna oraz wpływu fazy rozwojowej, w której ma miejsce infekcja grzybem *B. sorokiniana* na wystąpienie plamistości liści w doświadczeniu polowym oraz na plon ziarna i jego porażenie przez tego patogena. Ponadto przeprowadzono ocenę odporności wybranych odmian na plamistość liści powodowaną przez *B. sorokiniana* w warunkach laboratoryjnych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły ziarniaki 12 odmian jęczmienia jarego otrzymane od hodowców (Antek, Barke, Bryl, Hanka, Johan, Justina, Lailla, Prosa, Rastik, Refren, Rytan i Widawa), które posłużyły do założenia doświadczenia polowego prowadzonego w latach 2006–2008 na polu doświadczalnym w Radzikowie. Inokulację ziarna oraz roślin w fazie krzewienia, strzelania w źdźbło, kłoszenia i kwitnienia wykonano używając inokulatu (zawiesina zarodników konidialnych grzyba *B. sorokiniana*) o stężeniu $2,5 \times 10^5$ zarodników w 1 ml roztworu. Kontrolę stanowiły rośliny nieinokulowane.

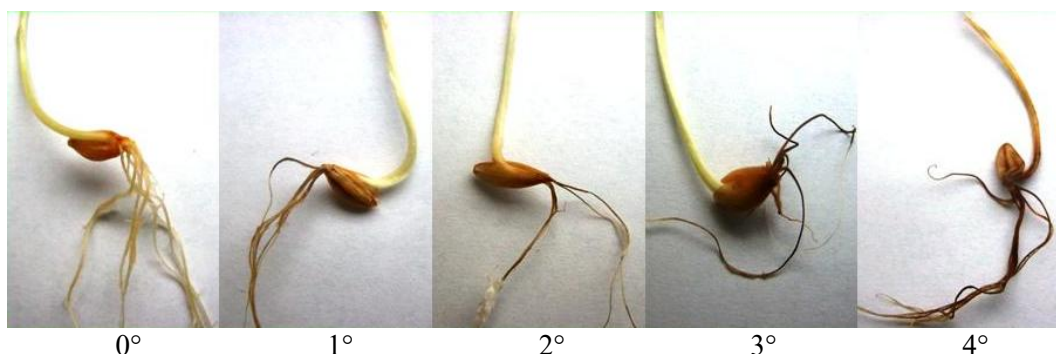
Inokulat przygotowywano w oparciu o jednoczarodnikową kulturę grzyba *B. sorokiniana*, który wcześniej wyizolowano z ziarna i inkubowano przez 14 dni w temperaturze 24°C i przemiennym oświetleniu NUV 360 nm i ciemności (12h/12h). Wcześniej oznaczono patogeniczność kilku izolatów, którą określono na próbie 100 ziarniaków jęczmienia odmiany Scarlett inokulowanych zawiesiną zarodników konidialnych o stężeniu $2,5 \times 10^5$ w 1 ml roztworu. Po dziewięciu dniach oznaczono liczbę ziarniaków nieskiełkowanych oraz skiełkowanych, ale porażonych — zbrunatniałe korzenie i część nadziemna. Wybrano izolat najsilniej patogeniczny w stosunku do odmiany Scarlett (52% ziarniaków nieskiełkowanych i 34% porażonych), który użyto do dalszych badań.

Inokulację w warunkach polowych wykonywano w godzinach wieczornych, gdy temperatura powietrza spadała poniżej 20°C. Przez 3–4 dni po inokulacji rośliny spryskiwano wodą, w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności dla skiełkowania zarodników patogena. Do oceny porażenia przez choroby zastosowano 9 stopniową skalę zalecaną przez COBORU, gdzie 9° to brak objawów, a 1° to 50% powierzchni liści z objawami chorobowymi (Kaczyński i in., 1998). Po zbiorach oznaczono plon z poletka o powierzchni 1 m² i oceniono zasiedlenie ziarna zebranego w doświadczeniu polowym przez gatunek *B. sorokiniana*.

Analizę fitopatologiczną wykonano na 200 ziarniakach, które wykładano na płytki Petriego z pożywką PDA. Inkubacja przebiegała w termostacie o stałej temperaturze 20°C i przemiennym oświetleniu NUV 360 nm 12h/12h ciemności. Po 15–20 dniach od przeszczepienia kultur na płytki plastikowe z podłożem agarowo-ziemniaczanym i inkubacji w podanych wyżej warunkach, stymulujących zarodnikowanie określono na nasionach liczbę kolonii gatunku *Bipolaris sorokiniana*.

Metoda laboratoryjna określenia podatności odmian na *B. sorokiniana* polegała na ocenie porażenia 7-dniowych siewek według skali 5-stopniowej (rys. 1) i wyliczeniu wskaźnika chorobowego według wzoru (Łacicowa, 1969):

$$\text{Wskaźnik chorobowy} = \frac{\text{suma iloczynów liczbowych wskaźników skali i liczby siewek odpowiadającej danemu wskaźnikowi}}{\text{ogólna liczba badanych siewek} \times \text{najwyższy wskaźnik cyfrowy skali}} \times 100$$

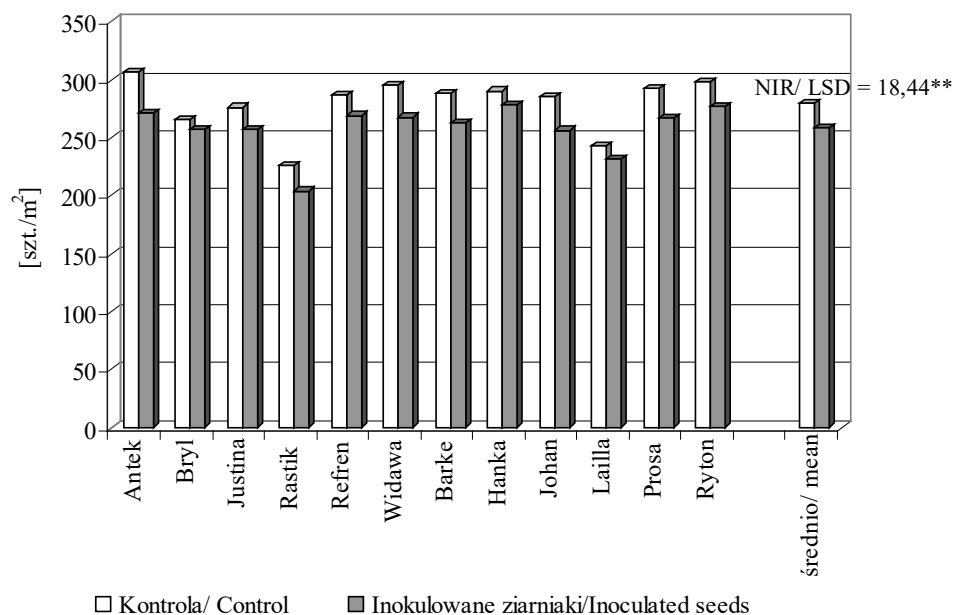


Rys. 1. Skala porażenia siewek
Fig. 1. Rating scale for assessing of seedling infection

Analizy statystyczne przeprowadzono w Systemie SAS® w wersji 1.9 (SAS Institute Inc., 2004 a, 2004 b).

WYNIKI

Wschody polowe były oceniane na poletkach kontrolnych oraz na poletkach, gdzie wysiewano materiał siewny inokulowany zawiesiną zarodników *B. sorokiniana* przez trzy kolejne lata: 2006, 2007 i 2008. Wartości tego parametru istotnie różniły się pomiędzy kontrolą i inokulowanym ziarnem i kształtowały się średnio na poziomie 279,6 roślin/m² na poletkach kontrolnych i 258,3 roślin/m² na poletkach, gdzie wysiewano inokulowane ziarniaki. Spośród badanych odmian najlepsze wschody na kontroli obserwowano dla odmian Antek i Ryton (odpowiednio 306,7 i 298,2 roślin/m²), a naj słabsze dla odmiany Rastik — 225,9 roślin/m². Na poletkach, gdzie wysiewano ziarniaki inokulowane również najlepiej wschodziło ziarno odmiany Ryton (średnio 276,7 roślin/m²) oraz Hanka (średnio 278,8 roślin/m²), zaś naj słabiej odmiany Rastik — 204,2 roślin/m² (rys. 2). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że inokulacja ziarniaków spowodowała obniżenie wschodów polowych u wszystkich badanych odmian. Stwierdzono, że wschody roślin na poletkach, gdzie wysiewano inokulowane ziarno, były niższe średnio o 21,3 szt./m² (zakres od 8,4 dla odmiany Bryl do 35,1 szt./m² dla odmiany Antek).



* Istotne dla $\alpha = 0,05$; ** Istotne dla $\alpha = 0,01$

* Significant for $\alpha = 0.05$; ** Significant for $\alpha = 0.01$

Rys. 2. Wschody polowe na poletkach kontrolnych i obsianych ziarnem inokulowanym
Fig. 2. Field emergence on control plots and plots where inoculated sowing material was used

Plamistość liści powodowana przez *B. sorokiniana* była oceniana również przez trzy sezony wegetacyjne w latach 2006, 2007 i 2008. Objawy tej choroby przy naturalnej infekcji w niewielkim nasileniu wystąpiły zarówno w roku 2006 jak i 2008. Także wysiew inokulowanego materiału siewnego oraz przeprowadzenie inokulacji w różnych fazach rozwojowych roślin nie spowodowało spodziewanych efektów w postaci znacznego uszkodzenia blaszki liściowej. Przyczyną słabego rozwoju choroby były niesprzyjające warunki pogodowe w czasie inokulacji i po jej wykonaniu zarówno w roku 2006 jak i 2008. W obu tych latach prowadzenia doświadczenia, w czasie wegetacji jęczmienia średnia dobową temperatura powietrza i suma opadów od kwietnia do czerwca (okres przeprowadzania inokulacji) była podobna (od 9,2°C do 18,3°C w 2006 i od 9,4°C do 19,0°C w 2008). Różnice dotyczyły tylko temperatury w lipcu (23,4°C w 2006 i 19,5°C w 2008) oraz sum opadów w lipcu (4,6 mm w 2006 i 62,5 mm w 2008) i sierpniu (189,8 mm w 2006 i 51,4 mm w 2008). Najkorzystniejsze warunki dla rozwoju choroby wystąpiły w 2007 roku, kiedy to obok sprzyjającej rozwojowi choroby średniej temperatury powietrza w czerwcu (19,1°C), wystąpiły obfitsze opady (72,2 mm) w porównaniu do tego okresu w roku 2006 i 2008 (tab. 1). We wszystkich latach prowadzenia oceny, największe nasilenie plamistości liści w porównaniu do poletek kontrolnych obserwowano na roślinach inokulowanych w czasie kłoszenia i kwitnienia: średni stopień porażenia odpowiednio 7,60 i 7,62. Na poletkach kontrolnych z naturalną infekcją praktycznie nie obserwowano

objawów choroby (średni stopień porażenia od 8,4 dla odmiany Hanka do 9,0 dla odmiany Rastik). Analizy statystyczne wykazały istotne różnice w występowaniu objawów chorobowych na poletkach kontrolnych i poletkach, gdzie została przeprowadzona inokulacja ziarna i roślin (tab. 2). Można zatem stwierdzić, że na porażenie roślin przez tego patogena mają wpływ nie tylko warunki pogodowe w czasie wegetacji, ale również faza rozwojowa, w której zachodzi proces infekcji.

Tabela 1

Średnia temperatura i suma opadów w czasie wegetacji jęczmienia jarego w latach 2006–2008 na tle danych z wielolecia
Mean temperature and sums of precipitation during vegetation of spring barley in the years 2006–2008 in comparison to long-term averages

Miesiące Months	Średnia dobową temperaturę [°C] Mean daily temperatures [°C]				Suma opadów [mm] Precipitation sums [mm]			
	2006	2007	2008	wielolecie long-term 1976–2008	2006	2007	2008	wielolecie long-term 1976–2008
Kwiecień — April	9,2	9,7	9,4	8,5	38,8	20,0	30,2	30,8
Maj — May	14,3	15,7	14,0	14,5	52,0	63,2	56,6	46,1
Czerwiec — June	18,3	19,1	19,0	17,3	29,0	72,2	15,0	58,0
Lipiec — July	23,4	19,1	19,5	19,0	4,6	94,8	62,5	72,5
Sierpień — August	18,1	19,3	18,8	18,4	189,8	58,2	51,4	55,7
Średnia temperatura i suma opadów Mean temperature and sums of precipitation	16,7	16,6	16,1	15,5	314,2	308,4	215,7	263,1

Tabela 2

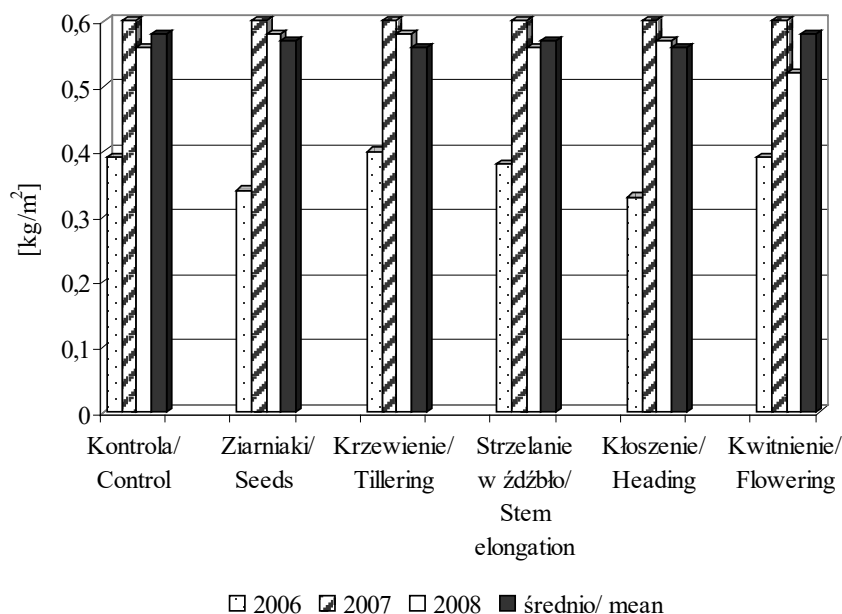
Wpływ inokulacji ziarna i roślin *B. sorokiniana* na występowanie plamistości liści na roślinach w doświadczeniu polowym
Influence of seed and plant inoculation by *B. sorokiniana* on leaf spot occurrence in field experiment

Odmiana Cultivar	Kontrola Control	Inokulacja — Inoculation					NIR LSD
		ziarniaki seed	krzewienie tillering	strzelanie w źdźbło stem elongation	kłoszenie heading	kwitnienie flowering	
Antek	8,76	8,27	8,10	8,17	7,77	7,67	NS
Bryl	8,93	8,33	7,60	8,33	7,83	7,73	NS
Justina	8,83	8,50	7,43	8,07	8,00	7,53	NS
Rastik	9,00	8,33	8,40	8,17	7,33	7,67	NS
Refren	8,76	8,07	7,53	8,27	7,00	7,43	NS
Widawa	8,60	8,27	7,93	8,00	7,50	7,67	NS
Barke	8,76	8,53	8,00	8,17	7,70	7,70	NS
Hanka	8,40	8,50	7,93	7,83	7,83	7,53	NS
Johan	8,50	8,33	8,00	7,90	7,33	7,43	NS
Lailla	8,43	8,33	8,10	7,93	7,00	7,93	NS
Prosa	8,67	7,83	7,90	8,43	7,93	7,67	NS
Ryton	8,83	8,50	8,27	8,50	8,00	7,67	NS
Średnio Mean	8,70	8,32	7,93	8,15	7,60	7,62	0,504**

* Istotne dla $\alpha = 0,05$; ** Istotne dla $\alpha = 0,01$

* Significant for $\alpha = 0.05$; ** Significant for $\alpha = 0.01$

Oszacowano również średni plon ziarna z poletka dla każdej z badanych odmian i stwierdzono, że przeprowadzenie inokulacji ziarna i roślin nie wpłynęło istotnie na wielkość plonu, a jedynie na jego porażenie przez *B. sorokiniana*. Wartości uzyskanego plonu jęczmienia wahały się średnio od 0,56 kg/poletko dla roślin inokulowanych w czasie krzewienia i kłoszenia do 0,58 kg/poletko dla kontroli oraz dla roślin inokulowanych w czasie kwitnienia (rys. 3). Obserwowano jednak zróżnicowanie plonowania w zależności od roku zbioru i stwierdzono, że wszystkie badane odmiany uzyskały najlepszy plon w roku 2007, zaś najgorsze plonowanie obserwowano w roku 2006.



NIR dla kombinacji = 0,086; LSD for combinations = 0.086

NIR dla lat = 0,026**; LSD for years = 0.026**

* Istotne dla $\alpha = 0,05$; ** Istotne dla $\alpha = 0,01$

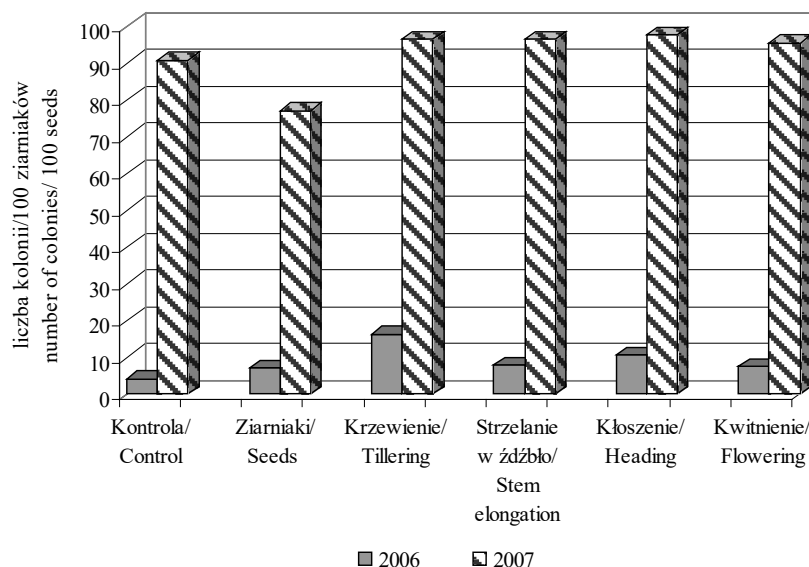
* Significant for $\alpha = 0,05$; ** Significant for $\alpha = 0,01$

Rys. 3. Plon z poletka badanych odmian jęczmienia jarego po inokulacji materiału siewnego i roślin
Fig. 3. Yield of spring barley cultivars after inoculation of sowing material and plants

W 2006 roku obserwowano zróżnicowanie plonowania pomiędzy badanymi kombinacjami, które wahało się średnio od 0,33 kg zebranych z poletek, na których inokulację przeprowadzono w czasie kłoszenia do 0,40 kg/poletko dla kombinacji z inokulacją w czasie krzewienia. Stwierdzono, że wysiew inokulowanych ziarniaków oraz infekcja roślin w czasie kłoszenia wpłynęła na niewielkie obniżenie plonowania odpowiednio o średnio 0,05 kg/poletko i 0,06 kg/poletko. Inokulacja roślin wykonana w pozostałych, badanych fazach rozwojowych nie spowodowała zmian w plonowaniu jęczmienia. Niewielkie różnice w plonowaniu obserwowano w 2007 roku, które wahały się pomiędzy badanymi kombinacjami: od 0,71 kg/poletko dla roślin inokulowanych w czasie krzewienia do 0,82

kg/poletko dla kombinacji z inokulacją roślin w czasie kwitnienia. Największy spadek plonu w porównaniu do kontroli obserwowano na poletkach, gdzie rośliny inokulowano w czasie krzewienia — średnio o 0,07 kg. Ponadto stwierdzono, że rok ten charakteryzował się najlepszymi warunkami pogodowymi dla rozwoju jęczmienia, gdyż uzyskany plon ze wszystkich badanych kombinacji był wyższy niż w latach 2006 i 2008. W 2008 roku plon z poletka w zależności od kombinacji wahał się 0,52 kg dla inokulacji w czasie kwitnienia do 0,58 kg dla kombinacji z inokulowanymi ziarniakami i roślinami w czasie krzewienia (rys. 3). Różnice w plonowaniu pomiędzy badanymi kombinacjami były niewielkie i wynosiły średnio od 0 do 0,04 kg. W trakcie trzech lat badań obserwowane różnice plonowania pomiędzy badanymi kombinacjami okazały się jednak nieistotne statystycznie. Istotne różnice obserwowano jedynie pomiędzy latami zbioru, gdzie najlepszy okazał się rok 2007, a najgorszy 2006.

Inokulacja grzybem *B. sorokiniana* w różnych fazach rozwoju jęczmienia istotnie wpłynęła na zdrowotność ziarna, a zwłaszcza na porażenie przez *B. sorokiniana*. Analiza zdrowotności ziarniaków zebranych w 2006 roku wykazała, że najsilniej porażone przez tego patogena były ziarniaki zebrane z roślin inokulowanych w fazie krzewienia (średnio 16,4 kolonii/100 ziaren) (rys. 4).



NIR dla kombinacji = 13,89**, LSD for combinations = 13.89**

NIR dla lat = 1,49** ; LSD for years = 1.49**

* Istotne dla $\alpha = 0,05$; ** Istotne dla $\alpha = 0,01$

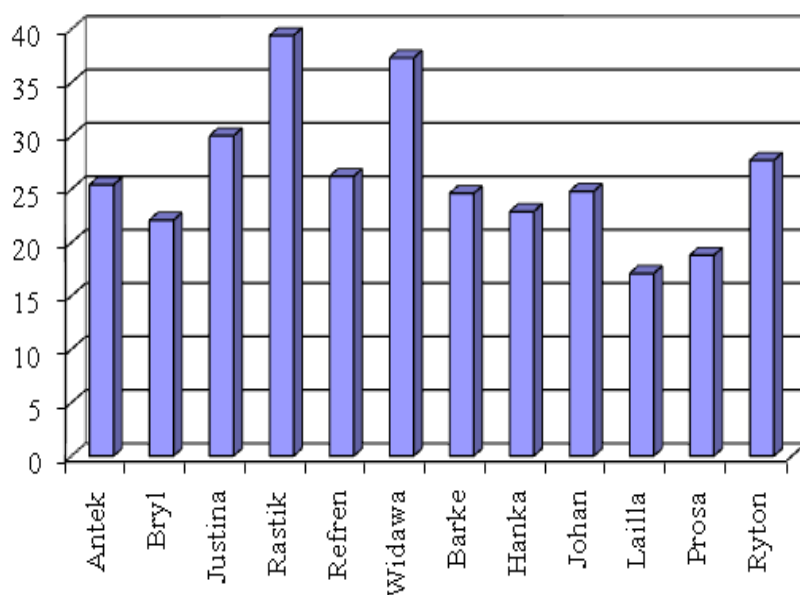
* Significant for $\alpha = 0.05$; ** Significant for $\alpha = 0.01$

Rys. 4. Wpływ inokulacji ziarna i roślin na porażenie przez *B. sorokiniana* materiału siewnego zebranego w doświadczeniu polowym

Fig. 4. Influence of sowing material and plant inoculation by *B. sorokiniana* on infection by this pathogen of seeds harvested in field experiments

Przeprowadzona w tym samym czasie analiza ziarniaków z roślin kontrolnych wykazała porażenie na poziomie 4,2 kolonii/100 ziaren. Spośród badanych odmian *B. sorokiniana* najczęściej izolowano z ziarniaków odmiany Antek i Bryl, zwłaszcza zebranych z roślin inokulowanych w czasie krzewienia i strzelania w źdźbło. Oceniając zdrowotność ziarna zebranego w doświadczeniu polowym w 2007 roku stwierdzono, że wszystkie badane próby ziarniaków były w bardzo dużym stopniu zasiedlone przez *B. sorokiniana*. Najsilniej zasiedlone były ziarniaki zebrane z roślin inokulowanych w fazie kłoszenia (średnio 97,6 kolonii/100 ziaren). Najmniej licznie, chociaż także w znacznej ilości gatunek ten wystąpił na inokulowanym ziarnie – średnio 77,1 kolonii/100 ziaren (rys. 4). W zależności od fazy, w której przeprowadzono inokulację, patogen ten stanowił od 51,6 do 82,0% wszystkich zidentyfikowanych grzybów. Najczęściej był on izolowany z ziarna odmiany Prosa i Hanka, zebranego z roślin inokulowanych w czasie strzelania w źdźbło, kłoszenia oraz kwitnienia.

Przeprowadzone badania laboratoryjne na siewkach i wyliczony wskaźnik chorobowy dla poszczególnych odmian, pozwolił na uszeregowanie badanych odmian pod względem ich odporności na plamistość liści. Najniższy wskaźnik chorobowy uzyskano dla odmiany Lailla (17,1) i Prosa (po 18,8), a co za tym idzie odmiany te w warunkach laboratoryjnych okazały się najbardziej odporne na plamistość liści powodowaną przez *B. sorokiniana*. Najbardziej podatne na tę chorobę okazały się odmiany Rastik (wskaźnik chorobowy 39,4) i Widawa (wskaźnik chorobowy 37,3) (rys. 5).



Rys. 5. Wskaźnik chorobowy podatności badanych odmian jęczmienia jarego na *B. sorokiniana*
 Fig. 5. Disease index of spring barley cultivars susceptibility to *B. sorokiniana*

DYSKUSJA

Grzyb *B. sorokiniana* atakuje rośliny w każdej fazie wzrostu, a spadek plonu może wahać się od 20% do 80% (Duveiller i Gilchrist, 1994), ale może również dojść do 100% strat w czasie dogodnych warunków środowiska dla rozwoju infekcji (Srivastava i in., 1971). Jęczmień jest podatny na infekcję w każdej fazie wzrostu, jednak nie znaleziono żadnych informacji mówiących o tym, w którym momencie rozwoju roślina jest najbardziej wrażliwa na atak patogena i kiedy odpowiada na ten atak największym spadkiem plonu i jego zdrowotności. Duveiller i wsp. (1998) stwierdzili jednak, że istnieje zależność pomiędzy występowaniem choroby, wysokością roślin i ich wczesnością. Również Joshi i wsp. (2002) badając pszenicę obserwowali, że później dojrzewające genotypy wydają się być odporne, bo unikają infekcji, ponieważ cykl rozwojowy rośliny nie jest zsynchronizowany z cyklem rozwojowym patogena.

Przeprowadzone badania własne wykazały, że porażenie ziarna przez gatunek *Bipolaris sorokiniana* ma istotny wpływ na obniżenie wschodów polowych. W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono, że wschody polowe były niższe od kontroli od 3,2 do 11,4% (średnio 7,6%) w zależności od odmiany. Potwierdzają to badania Łacicowej (1990) oraz Szyrmera i wsp. (1984) nad zdrowotnością nasion jęczmienia jarego oraz wpływem mikroorganizmów zasiedlających ziarno na zdolność kiełkowania i wschody polowe. Autorzy ci stwierdzili, że wraz z obniżeniem zdrowotności materiału siewnego następował spadek wartości obu tych parametrów. Wschody polowe uległy obniżeniu o ponad 30%, a uwzględniając wypadanie siewek na skutek infekcji, obsada roślin na plantacji zmniejszyła się znacznie poniżej optimum przewidzianego dla gatunku. Powszechnie wiadomo, że infekcja siewek następuje za pośrednictwem grzybni zlokalizowanej między plewkami, a okrywą owocowo-nasienną oraz przez konidia zanieczyszczające powierzchnię ziarniaków (Kumar i in., 2001), czyli przyczyną słabszych wschodów polowych jest głównie zasiedlony materiał siewny.

Podczas obserwacji polowych stwierdzono, że plamistość liści przy naturalnej infekcji wystąpiła w niewielkim nasileniu zarówno w roku 2006 jak i 2008. Także wysiew inokulowanego materiału siewnego oraz przeprowadzenie inokulacji w różnych fazach rozwojowych roślin nie spowodowało większego uszkodzenia roślin. Przyczyną słabego rozwoju choroby były niesprzyjające warunki pogodowe w czasie inokulacji i po jej wykonaniu. Mimo, że patogen rozwija się w szerokim zakresie temperatury od 4°C do 36°C (optimum 24–28°C) (Surin i in., 2001), to znaczącą rolę w rozwoju choroby odgrywają opady i chociaż przez kilka dni po inokulacji rośliny spryskiwano wodą, w celu zapewnienia odpowiedniej wilgotności dla rozwoju choroby, to nie przyniosło to pożądanego efektu. Najkorzystniejsze warunki dla rozwoju choroby były w 2007 roku, kiedy to obok sprzyjającej rozwojowi choroby średniej temperatury powietrza w czerwcu (19,1°C), wystąpiły obfite opady (72,2 mm). Agarwal i Sinclair (1997) zwrócili uwagę, że opady i wysoka temperatura w czerwcu, w czasie kłoszenia, mają znaczący wpływ na rozwój mikroflory, zwłaszcza grzyba *B. sorokiniana*. Autorzy ci podkreślili, że wysoka temperatura na początku maja i wilgotne oraz chłodniejsze warunki pod koniec maja i na początku czerwca sprzyjają wysokiemu porażeniu ziarniaków. Z porażonego ziarna

wyrastają chore siewki, a na pochwach i blaszkach liściowych grzyb tworzy konidia powodujące wtórne infekcje, które mają miejsce w momencie obfitego powstawania zarodników konidialnych na nekrotycznych plamach, do czego niezbędna jest odpowiednio wysoka wilgotność (Scott, 1995).

Badania plonowania jęczmienia wykazały, że przeprowadzenie inokulacji ziarna i roślin nie wpłynęło istotnie na wielkość plonu, a jedynie na jego zasiedlenie przez *B. sorokiniana*. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez Bailey i wsp. (1997), którzy obserwowali, że wysiew ziarna porażonego przez *B. sorokiniana* spowodował redukcję wschodów, ale plon z poletka nie zwiększył się istotnie w stosunku do plonu uzyskanego z poletek, gdzie wysiewano zdrowe ziarno. W prezentowanych badaniach własnych stwierdzono jedynie różnice w porażeniu ziarna w zależności od fazy rozwojowej roślin, w której nastąpiła infekcja. Najsilniej porażone były ziarniaki zebrane z roślin inokulowanych w fazie kłoszenia, zaś najmniej licznie, chociaż także w znacznej frekwencji gatunek ten wystąpił na inokulowanym ziarnie. Stwierdzono również, że ziarniaki ze zbioru 2007 były dużo częściej zasiedlone w porównaniu do zebranych w 2006 roku. Zróżnicowane wyniki dotyczące liczby uzyskiwanych izolatów tego grzyba z ziarna w różnych latach zbioru i różnych okręgach rolniczych uzyskała również Łacicowa (1990), co tłumaczyła warunkami pogodowymi i glebowymi oraz niejednakową ilością materiału infekcyjnego znajdującego się w otoczeniu podczas kwitnienia zbóż.

Jednak szkodliwość *B. sorokiniana* zależy nie tylko od warunków pogody, ale przede wszystkim od podatności odmian, na co zwracają uwagę Grey i Mathre (1984) oraz Łacicowa i Pięta (1991). Przeprowadzone laboratoryjne badania nad podatnością siewek na *B. sorokiniana* wykazały wyraźne zróżnicowanie w obrębie badanych odmian. Najbardziej odporne okazały się odmiany Lailla i Prosa, zaś podatne były odmiany Rastik i Widawa. Kumar i wsp. (2001) w pracy dotyczącej oddziaływaniu genu odporności na mączniaka prawdziwego *Mlo* w stosunku do nekrotroficznego gatunku *B. sorokiniana* stwierdzili, że odporne na mączniaka genotypy z mutacją w *Mlo locus* wykazują większą wrażliwość na porażenie przez tego patogena w porównaniu do dzikich form jęczmienia. Z danych literaturowych wiadomo, że infekcja jęczmienia przez ten gatunek grzyba jest związana z penetracją ścian komórkowych i akumulacją nadtlenu wodoru, co w końcowym efekcie przyczynia się do śmierci komórkowej (Kumar i in., 2002). W pracy prowadzono badania nad 12 odmianami jęczmienia jarego, z czego 6 posiadało gen odporności na mączniaka *Mlo*. Uzyskane wyniki nie pozwalają jednak na stwierdzenie, że obecność tego genu wpływa w zdecydowany sposób na podatność lub odporność w warunkach laboratoryjnych tych odmian w stosunku do *B. sorokiniana*. Spośród badanych odmian posiadających gen odporności na mączniaka *Mlo* jedna okazała się odporna na *B. sorokiniana*, zaś pozostałe charakteryzowały się średnimi wartościami wskaźnika chorobowego.

WNIOSKI

1. Inokulacja ziarniaków grzybem *Bipolaris sorokiniana* spowodowała obniżenie wschodów polowych u wszystkich badanych odmian.

2. Największe nasilenie plamistości liści w porównaniu do polettek kontrolnych obserwowano na roślinach inokulowanych w czasie kłoszenia i kwitnienia. Stwierdzono, że na nasilenie występowania choroby duży wpływ miały warunki pogodowe panujące w czasie i po przeprowadzeniu inokulacji.
3. Nie obserwowano istotnego wpływu fazy rozwojowej jęczmienia, w której przeprowadzono inokulację na plon ziarna, a jedynie na jego porażenie przez *B. sorokiniana*.
4. Spośród badanych odmian najbardziej podatne na plamistość liści w warunkach laboratoryjnych okazały się odmiany Rastik i Widawa, zaś najbardziej odporne były Lailla i Prosa.

LITERATURA

- Agarwal V. K., Sinclair J. B. 1997. Principles of seed pathology. Second edition, CRC Press Inc., Lewis.
- Arabi M. I. E., Jawhar M. 2004. Identification of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) isolates expressing differential virulence on barley genotypes in Syria. J. Phytopathol. 152: 461 — 464.
- Barba J. T., Reis E. M., Forcelini C. A. 2002. Comparison of methods for the detection of *Bipolaris sorokiniana* in barley seeds. Fitopatologia Brasileira Vol. 27, No. 4: 389 — 394.
- Bailey K.L., Duczek L.J., Potts D.A. 1997. Inoculation of seeds with *Bipolaris sorokiniana* and soil fumigation methods to determine wheat and barley tolerance and yield losses caused by common root rot. Canadian Journal of Plant Science Vol. 77, No. 4: 691 — 698.
- Christensen J. J. 1922. Studies on the parasitism of *Helminthosporium sativum*. Univ. Minn. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 11: 1 — 42.
- Christensen J. J. 1963. Longevity of fungi in barley kernels. Pl. Dis. Reprt. 47: 639 — 642.
- Clark R. V., Wallen V. R. 1969. Seed infection of barley by *Cochliobolus sativus* and its influence on yield. Can. Plant Dis. Surv. 49: 60 — 64.
- Couture L., Sutton J. C. 1978. Relation of weather variables and host factors to incidence of airborne spores of *Bipolaris sorokiniana*. Can. J. Bot. 56: 2162 — 2170.
- Duveiller E., Gilchrist L. 1994. Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: Current situation and future prospects. In: Saunders D.A., Hettel G.P. (Eds.), Wheat in Heat-Stressed Environments: Irrigated, Dry Areas and Rice-Wheat Farming Systems, CIMMYT, Mexico, D.F. pp.343 — 352.
- Duveiller E., Garcia I., Franco J., Toledo J., Crossa J., Lopez F. 1998. Evaluating spot blotch resistance of wheat: Improving disease assessment under controlled conditions and in the field. In: Duveiller E., Dubin H.J., Reeves J., McNab A. (Eds.), Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, CIMMYT, Mexico, D.F. pp. 171 — 181.
- Eng-Chong-Pua R. R., Pelletier H. R., Klinck H. R. 1985. Seedling blight, spot blotch and common root rot in Quebec and their effect on grain yield in barley. Can. J. Pl. Path. 7: 395 — 401.
- Fletcher T. G. Jr., Steffenson B. J. 1994. Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. Can. J. Plant Pathol. 16: 202 — 206.
- Grey W.E., Mathre D.E. 1984. Reaction of spring barleys to common root rot and its effect on yield components. Can. J. Pl. Sci. 64: 245 — 253.
- Ghazvini H., Tekauz A. 2007. Virulence Diversity in the Population of *Bipolaris sorokiniana*. Plant Dis. 91: 814 — 821.
- Joshi A.K., Chand R., Arun B. 2002. Relationship of plant height and days to maturity with resistance to spot blotch in wheat. Euphytica 123: 221 — 228.
- Kachlicki P. 1995. Metabolitem of *Helminthosporia*. In: Chełkowski J. (ed.). *Helminthosporia* Metabolites, Biology, Plant Diseases. *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum*. Poznań, Poland: 1 — 26.
- Kaczyński L., Zych J., Behnke M., Lewandowska B., Szymczyk R. 1998. Metodyka badania wartości gospodarczej odmian (WGO) roślin uprawnych. Rośliny rolnicze. Zbożowe. Jęczmień, owies, pszenica zwyczajna, pszenżyto, żyto. COBORU. Wydanie 1, Słupia Wielka.

- Kiesling R.L. 1985. The diseases of barley in D.C. Rasmussen, ed., Barley Agron. Monogr. 16. ASA and SSSA, Madison, WI.: 269 — 308.
- Kumar J., Hükelhoven R., Beckhove U., Nagarajan S., Kogel K. H. 2001. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. The American Phytopathological Society Vol. 91, No. 2: 127 — 133.
- Kumar J., Schafer P., Hükelhoven, Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S., Kogel K. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Molecular Plant Pathology 3 (4): 185 — 195.
- Lilijeroth E., Franzon-Almgren I., Gunnarsson T. 1993. Effect of pre-helminthosporol, a phytotoxin produced by *Bipolaris sorokiniana* on barley roots. Can. J. Bot. 72: 558 — 563.
- Łacicowa B. 1969. Metoda laboratoryjna szybkiej oceny odporności jęczmienia na *Helminthosporium sativum* P. K. et B. Biul. IHAR 3-4: 61 — 62.
- Łacicowa B. 1990. Mikoflora ziarna jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) wzrastającego w warunkach zagrożenia chorobowego przez *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. et Jain. (= *Helminthosporium sativum* P.K. et B.). Rocz. Nauk Rol. s. E, T. 20, Z. 1/2: 17 — 23.
- Łacicowa B., Pięta D. 1991. Podatność różnych odmian jęczmienia jarego na porażenie przez *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. et Jain. Hod. Rośl. Aklim. T. 35, Z. 5/6: 53 — 59.
- Meldrum S. I., Ogle H. J., Platz G. J. 2004. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia. Aust. Plant Pathol. 33: 109 — 114.
- Nakijima H., Toratsu Y., Fujii Y., Ichinoe M., Hamasaki T. 1998. Biosynthesis of Sorokinianin a Phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*. Evidence of Mixed Origin from the Sesquiterpene TCA Pathways. Pergamon, Tetrahedron Letters 39: 1013 — 1016.
- SAS Institute Inc. 2004 a. SAS 9.1 Companion for Windows. Cary, NC, USA: SAS Publishing, SAS Institute Inc.
- SAS Institute Inc. 2004 b. SAS/STAT 9.1 user's guide. Cary, NC, USA: SAS Publishing, SAS Institute Inc.
- Scott D. B. 1995. *Helminthosporia* that cause leaf spots on small-grain cereals in South Africa. Chelkowski J. (ed.). *Helminthosporia* Metabolites, Biology, Plant Diseases. *Bipolaris*, *Drechslera*, *Exserohilum*. Poznań, Poland: 107 — 137.
- Srivastava O. P., Luthra J. K., Narula P. N. 1971. Inheritance of seedling resistance to leaf blight of wheat. Indian J. Genet. & Plant Breed. 45: 941 — 943.
- Surin N. A., Sorokataya E. I., Gromovykh T. I., Zobova N. V. 2001. The necessity of increasing the resistance of spring barley varieties to root rots in the Krasnoyarsk Territory. Russian Agricultural Sciences No. 6: 14 — 17.
- Szyrmer J., Rytko G., Grzelak K., Tulo M. 1984. Znaczenie wartości siewnej ziarna w produkcji zbóż. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. Z. 305: 371 — 375.
- Valjavec-Gratian M., Steffenson B. J. 1997. Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley. Phytopathology 87: 1140 — 1143.

ALICJA PECIO¹ANDRZEJ BICHONSKI²¹ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach² Małopolska Hodowla Roślin — HBP sp. z o.o. Kraków

Nawożenie azotem i chemiczna ochrona roślin przed chorobami jako czynniki plonowania jęczmienia jarego

Nitrogen fertilization and fungicide application as the elements of spring barley production

Celem pracy była ocena wpływu interakcji nawożenia azotem i ochrony roślin na wielkość plonu ziarna i białka jęczmienia jarego. Badania prowadzono w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym IUNG-PIB Grabów w latach 2005–2007. Jęczmień jary uprawiano w stanowisku po pszenicy ozimej na 5 poziomach nawożenia azotem: 0, 30, 60, 90 i 120 kg N·ha⁻¹. Jako czynnik chemicznej ochrony roślin przed chorobami grzybowymi zastosowano środki chemiczne zgodnie z programami trzech firm: Syngenta, DuPont i BASF. Po zbiorach określano plon ziarna i elementy struktury oraz zawartość i plon białka. Stwierdzono, że warunkiem uzyskania wysokich plonów ziarna i białka jęczmienia paszowego były sprzyjające warunki pogody, charakteryzujące się ciepłą i wilgotną pogodą w fazach krzewienia i wypełniania ziarna oraz intensywne nawożenie azotem. O wysokim plonie ziarna w takich warunkach decydowała liczba ziaren w kłosie i masa tysiąca ziaren. Jednoczesny wpływ nawożenia azotem i chemicznej ochrony roślin przed chorobami na plon ziarna i białka jęczmienia jarego miał charakter addytywny.

Słowa kluczowe: jęczmień jary, nawożenie azotem, program ochrony roślin

The purpose of the study was the estimation of interaction between N fertilization and plant protection in spring barley production. The studies were conducted in Grabow Experimental Station of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in 2005–2007. Spring barley was cultivated after winter wheat on 5 levels of nitrogen fertilizers 0, 30, 60, 90 and 120 kg N·ha⁻¹ and under 3 plant protection programs: Syngenta, DuPont and BASF. Grain yield, its components, protein content and yield were examined. Warm and moist weather conditions during tillering and grain filling and intensive nitrogen fertilization were the requirements for high grain and protein yield. In such conditions number of grains per spike and weight of 1000 grains were the parameters decisive upon grain yield. Simultaneous effects of N fertilization and plant protection on grain and protein yields were of the additive type.

Key words: nitrogen fertilization, plant protection program, spring barley

WSTĘP

Warunkiem uzyskania dużego plonu jęczmienia jest właściwy dobór czynników wpływających z jednej strony na formowanie składowych plonu ziarna, a z drugiej strony na ich ochronę. Azot jest jednym z najważniejszych czynników kontrolujących wzrost i rozwój, a zatem i końcowy plon ziarna jęczmienia (Noworolnik, 2003). Roślina ta jest jednak atakowana przez wiele patogenów powodujących choroby grzybowe (Fiedorow i in., 2008), powinna być zatem skutecznie chroniona przed stratami potencjalnego plonu (Kaniuczak, 2001). Środki ochrony roślin działają najczęściej zapobiegawczo i proponowane są przez producentów w formie tzw. programów (Dąbrowski, 2001). Zgodnie z panującą powszechnie opinią nawożenie azotem zwiększa podatność roślin na choroby grzybowe (Noworolnik, 2003). Można się zatem spodziewać interakcji pomiędzy dawką nawożenia azotem i sposobem chemicznej ochrony roślin. Plon ziarna jęczmienia powinien także spełniać wymagania jakościowe, aby zapewnić wysoki plon białka. Jakość ziarna, co prawda uwarunkowana genetycznie (Przulj i Momcilovic, 2001 b), nawet w większym stopniu niż wielkość plonu ziarna zależy od wielu czynników zewnętrznych, szczególnie od przebiegu warunków pogody (Bertholdsson, 1998, 1999) i nawożenia azotem (Pettersen i Eckersten, 2007). Celem badań była ocena wpływu interakcji nawożenia azotem i ochrony przed chorobami grzybowymi na wielkość plonu ziarna i białka jęczmienia jarego.

MATERIAŁ I METODY

W opracowaniu przedstawiono wyniki badań prowadzonych w latach 2005–2007 w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym IUNG-PIB Grabów. Przedmiotem badań był jęczmień jary odm. Antek (2005 i 2006) oraz Justina (2007) uprawiany w stanowisku po pszenicy ozimej. Pierwszy czynnik doświadczalny stanowiła dawka nawożenia azotem: 0, 30, 60, 90 i 120 kg N·ha⁻¹ (tab. 1).

Tabela 1

Dawki i terminy nawożenia azotem
Nitrogen fertilization doses and times

Całkowita dawka azotu Total N dose (kg N·ha ⁻¹)	Rok i liczba dni po siewie Year and days after sowing					
	2005	2006	2007	2005	2006	2007
	35	10	25	50	38	51
0		0			0	
30		30			0	
60		30			30	
90		60			30	
120		60			60	

Nawożenie w dawkach 30 i 60 kg N·ha⁻¹ stosowano w fazie krzewienia, a w dawkach większych: 60 kg N·ha⁻¹ w fazie krzewienia i 30 lub 60 kg N·ha⁻¹ w fazie strzelania w źdźbło. Jako czynnik chemicznej ochrony roślin przed chorobami zastosowano środki chemiczne zgodnie z programami trzech firm: Syngenta, DuPont i BASF (tab. 2). Na obiekcie kontrolnym nie stosowano środków chemicznej ochrony roślin przed chorobami.

Doświadczenie założono w układzie split-plot w czterech powtórzeniach. Zlokalizowano je na glebie kompleksu żytanego b. dobrego o odczynie $\text{pH}_{\text{KCl}} = 5,7$. Powierzchnia poletek do zbioru wynosiła $28,8 \text{ m}^2$. Zbiór wykonano w fazie dojrzałości pełnej ziarna. Oznaczono plon ziarna i liczbę kłosów na powierzchni 1 m^2 oraz masę 1000 ziaren i liczbę ziaren w kłosie. Po zbiorze określono procentową zawartość białka ogółem w pełnym ziarnie metodą NIR w aparacie Inframatic 9100 firmy Perten oraz plon białka z jednostki powierzchni.

Tabela 2

Badane programy fungicydowej ochrony jęczmienia jarego
The programs of fungicide protection of spring barley

Program ochrony	Stosowane fungicydy	Substancja biol. czynna	Grupa aktywna	Dawka	Faza rozwojowa	Dni po
ochrony	Fungicide	Biologically active	Active agent	Dose	Development	siewie
Program		substance g l^{-1}	group	l ha^{-1}	phase DC	Days after sowing
Rok 2005						
Syngenta	Acanto 250 SC	pikoksystrobina 250	strobiluriny	0,6	49	67
	Tilt Plus 400 EC	propikonazol 125 fenpropidyna 275	triazole morfoliny	0,6	49	67
DuPont	Cerelux Plus 535 EC	fluzilasol 160 fenpropimorf 375	triazole morfoliny	0,4	49	67
	Charisma 207 EC	fluzilasol 160,7 famokstae 100	triazole oksazolidyny	1	49	67
BASF	Rex 500 SC	karbendazym 250	benzimidazole	0,6	32	56
	Juvel TT 483 SE	epoksyzazol 83 krezoksym metylowy 83 fenpropimorf 317	triazole strobiluriny morfoliny	1,2	49	67
Rok 2006						
Syngenta	Tilt Plus 400 EC	propikonazol 125 fenpropidyna 275	triazole morfoliny	1,0	49	55
DuPont	Cerelux Plus 535 EC	fluzilasol 160 fenpropimorf 375	triazole morfoliny	0,3	49	55
	Talius 200 EC	proquinazid - 200	quinozoliny	0,15	49	55
	Charisma 207 EC	fluzilasol 160,7 famokstae 100	triazole oksazolidyny	0,8	49	55
BASF	Juvel TT 483 SE	epoksyzazol 83 krezoksym metylowy 83 fenpropimorf 317	triazole strobiluriny morfoliny	0,8	49	55
	Duett Ultra 497 SC	tiofanat metylowy 310 epoksykonazol 187	benzimidazole triazole	0,4	49	55
Rok 2007						
Syngenta	Tilt Plus 400 EC	propikonazol 125 fenpropidyna 275	triazole morfoliny	1,0	52-53	64
DuPont	Talius 200 EC	proquinazid 200	quinozoliny	0,15	52-53	64
	Alert 375 SC	karbendazym 250 flusilazol 125	benzimidazole triazole	1,0	52-53	64
BASF	Duett Ultra 497 SC	tiofanat metylowy 310 epoksykonazol 187	benzimidazole triazole	0,6	52-53	64

Różnice pomiędzy średnimi oceniano za pomocą testu Tukeya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Warunki pogodowe w latach badań były niejednakowe (tab. 3). Najbardziej korzystny dla plonowania jęczmienia był rok 2005. Charakteryzował się na ogół ciepłą pogodą z temperaturami lekko powyżej średniej wieloletniej i umiarkowaną ilością opadów. Większe opady deszczu i ochłodzenie wystąpiły w I i II dekadzie maja, a w lipcu przeciągające się obfite opady deszczu wystąpiły w warunkach wysokiej temperatury powietrza. Przebieg warunków pogody w roku 2006 był niesprzyjający dla jęczmienia jarego. Małą ilość opadów i wysokie temperatury notowano w okresie od kwietnia do lipca. W roku 2007 warunki pogody były na ogół sprzyjające dla zbóż jarych, aczkolwiek susza w okresie wypełniania ziarna spowodowała słabsze plonowanie jęczmienia.

Tabela 3

Rozkład warunków pogody w latach 2005–2007
Weather conditions in the years 2005–2007

Miesiąc Month	Średnia temperatura dobową (°C) Mean daily temperature				Suma opadu (mm) Precipitation sum			
	2005	2006	2007	średnia wieloletnia multi-year mean	2005	2006	2007	średnia wieloletnia multi-year mean
Kwiecień April	8,6	9,0	8,7	7,5	10,2	30,1	13,3	42
Maj May	13,5	13,6	15,2	12,4	84,0	53,4	74,6	53
Czerwiec June	16,1	17,4	18,7	16,7	46,3	38,3	99,9	110
Lipiec July	20,0	22,4	19,2	17,8	132,8	10,0	75,5	105
Sierpień August	17,5	17,9	19,1	17,1	36,8	219,5	151,7	72

WYNIKI

Wszystkie badane czynniki wpływały na istotne zwiększenie plonu ziarna i składowych plonu jęczmienia (tab. 4). Największy plon ziarna uzyskano w roku 2005, a duży plon uzyskano również w roku 2007, podczas gdy rok 2006 był najmniej sprzyjający produkcji ziarna. Średnio z lat plon ziarna zwiększał się wraz ze wzrostem dawki nawożenia azotem do 90 kg N·ha⁻¹, a badane programy ochrony roślin nie różnicowały plonu ziarna, zwiększając go jednak istotnie w stosunku do obiektu kontrolnego.

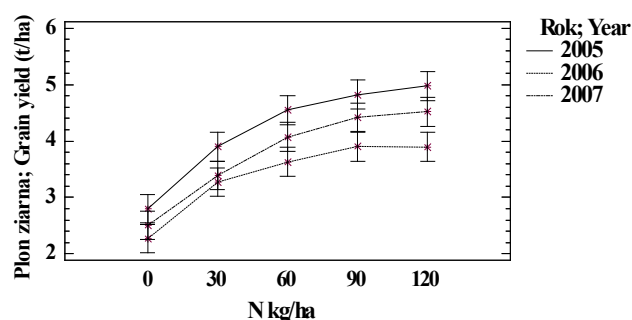
Najbardziej interesujące są jednak istotne interakcje: rok × nawożenie azotem (rys. 1), rok × program ochrony roślin (rys. 2) oraz nawożenie azotem × program ochrony roślin (rys. 3).

Tabela 4

Plon ziarna i jego składowe oraz zawartość białka w ziarnie jęczmienia jarego
Grain yield, yield components and grain protein content of spring barley

Rok Year			Dawka nawożenia azotem (kg ha ⁻¹) Nitrogen dose (kg ha ⁻¹)					Program ochrony roślin Plant protection program			
2005	2006	2007	0	30	60	90	120	kontrola control	Syngenta	DuPont	BASF
Plon ziarna — Grain yield (kg ha ⁻¹)											
4208	3393	3780	2527	3519	4080	4379	4464	3495	3828	3898	3954
NIR — LSD: 157			228	190							
Liczba kłosów na 1 m ² — Number of spikes per 1 m ²											
560	581	871	516	637	696	727	777	656	681	662	684
NIR — LSD: 20,8			31,3	26,3							
Liczba ziaren w kłosie — Number of grains per 1 spike											
15,2	14,4	10,1	10,9	12,6	13,9	14,5	14,3	13,1	13,2	13,4	13,3
NIR — LSD: 0,73			1,10	r.n.*							
Masa 1000 ziaren — Weight of 1000 grains											
49,5	40,9	43,0	46,3	45,8	44,2	43,4	42,8	42,8	44,5	45,2	45,5
NIR — LSD: 1,11			1,67	1,40							
Zawartość białka w ziarnie — Grain protein content											
12,4	12,1	12,2	10,4	10,9	12,1	13,2	14,4	12,3	12,2	122	12,2
NIR — LSD: r.n.			0,46	r.n.							
Plon białka — Protein yield (kg ha ⁻¹)											
529	419	470	264	386	494	577	642	437	477	487	490
NIR — LSD: 20,3			19,7	17,6							

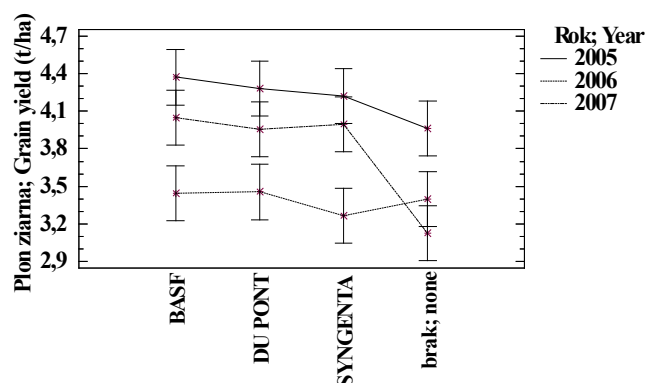
*r.n. Różnica nieistotna; Not significant difference



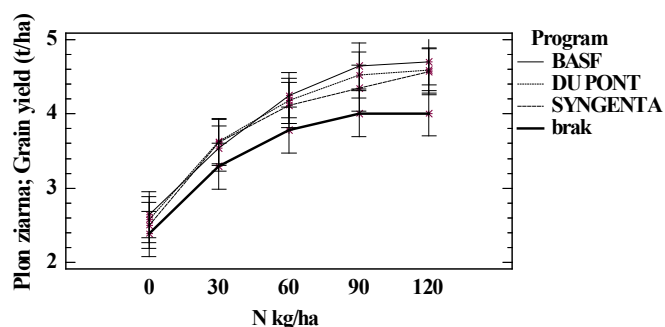
Rys. 1. Współdziałanie lat badań z dawką nawożenia azotem
Fig. 1. Interaction between years and nitrogen rates

Największą efektywność nawożenia (w stosunku do obiektu kontrolnego) stwierdzono w latach 2005 i 2007, a najmniejszą w roku 2006 (rys. 1). W latach 2005 i 2007 plon ziarna zwiększał się istotnie przy nawożeniu w dawkach do 90 kg N·ha⁻¹, a w roku 2006 tylko do 60 kg N·ha⁻¹. Regularna aplikacja fungicydów zabezpieczyła średni wzrost plonu ziarna jęczmienia o ok. 400 kg ziarna·ha⁻¹ w ciągu trzech lat badań (tab. 3). Stosunkowo największą efektywność ochrony roślin (w stosunku do obiektu kontrolnego) stwierdzono

w roku 2007 (rys. 2). Istotna interakcja nawożenia azotem i ochrony roślin wyrażała się większą efektywnością badanych programów ochrony roślin w obiektach z wyższymi dawkami azotu (rys. 3). W roku 2007, charakteryzującym się dużą aktywnością patogenów chorób grzybowych, średnie przyrosty plonu ziarna na skutek stosowania fungicydów wynosiły ok. 660 kg ziarna·ha⁻¹ przy niższych dawkach nawożenia azotem (do 60 kg N·ha⁻¹) i około 1200 kg ziarna·ha⁻¹ przy dawkach 90 i 120 kg N·ha⁻¹. We wszystkich latach badane programy ochrony roślin zapewniały podobną ochronę roślin przed chorobami.



Rys. 2. Współdziałanie lat badań z programami ochrony roślin
Fig. 2. Interaction between years and plant protection programs



Rys. 3. Współdziałanie nawożenia azotem z programami ochrony roślin
Fig. 3. Interaction between nitrogen rates and plant protection programs

Największą liczbę kłosów na jednostce powierzchni stwierdzono w roku 2007, a najmniejszą w roku 2005. Zwiększała się ona wraz ze wzrostem dawki nawożenia azotem do 120 kg N·ha⁻¹ i była praktycznie niezależna od programu ochrony roślin przed

chorobami (tab. 3). Jedynie program firmy BASF średnio z trzech lata badań istotnie zwiększał liczbę kłosów w stosunku do kontroli.

Największą liczbę ziaren w kłosie stwierdzono w roku 2005, a najmniejszą w roku 2007. Zwiększała się wraz ze wzrostem dawki nawożenia azotem do $60 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ i była niezależna od sposobu ochrony roślin przed chorobami.

Masa 1000 ziaren była największa w roku 2005, a najmniejsza w roku 2006. Istotnie zmniejszała się przy wzroście dawki nawożenia azotem do $60 \text{ N} \cdot \text{ha}^{-1}$ i nie różniła się przy różnych programach ochrony roślin, aczkolwiek stosowanie fungicydów wpływało na istotne zwiększenie MTZ w stosunku do kontroli.

A zatem wysoki plon ziarna jęczmienia w latach 2005 i 2007 uwarunkowany był różnymi składowymi plonu. W roku 2007 o wysokim plonie ziarna zdecydowała duża liczba kłosów na jednostce powierzchni, a w roku 2005 — duża liczba ziaren w kłosie i masa 1000 ziaren. Obydwie te składowe łącznie zatem decydowały o największej produktywności pojedynczego kłosa w roku 2005. W przypadku programu firmy BASF plon ziarna z pojedynczego kłosa w tym roku był niemal dwukrotnie większy niż w roku 2007.

Dla liczby kłosów na jednostce powierzchni stwierdzono istotne interakcje pomiędzy rokiem badań a dawką nawożenia azotem i programem ochrony roślin oraz pomiędzy dawką nawożenia azotem i programem ochrony roślin.

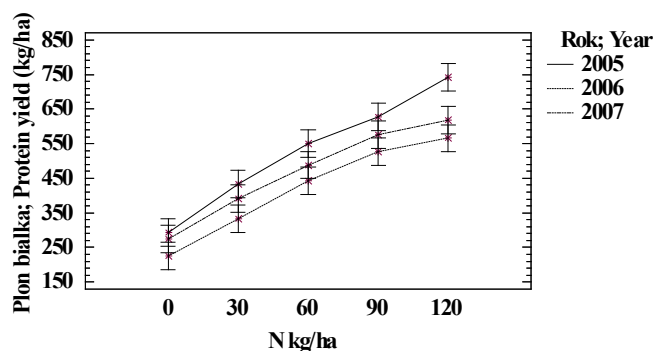
W roku 2005 każda dawka azotu istotnie zwiększała liczbę kłosów w stosunku do kontroli, przy czym różnice pod wpływem kolejnych dawek nie były istotne, w roku 2006 liczba kłosów zwiększała się istotnie wraz ze wzrostem nawożenia azotem do dawki $60 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, a w roku 2007 aż do dawki $120 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. W latach 2005 i 2006 badane programy ochrony roślin nie różnicowały liczby kłosów. Jedynie w roku 2007 zwiększały liczbę kłosów w następującej kolejności: DuPont, kontrola, Syngenta, BASF. Na obiekcie kontrolnym i obiekcie z programem ochrony firmy BASF liczba kłosów zwiększała się wraz ze wzrostem dawki nawożenia azotem do $120 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, a na obiektach firm Syngenta i Du Pont — do $90 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. Na wszystkich obiektach nawożenia azotem liczba kłosów nie była zróżnicowana pomiędzy obiektami ochrony roślin.

W przypadku liczby ziaren w kłosie, masy 1000 ziaren i plonu ziarna z pojedynczego kłosa stwierdzono istotne interakcje badanych czynników doświadczalnych z latami badań. Liczba ziaren w kłosie w latach 2005 i 2007 zwiększała się istotnie przy zwiększaniu dawki nawożenia do $60 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$, a w roku 2006 tylko do $30 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$. Dalsze zwiększanie dawki N nie powodowało wzrostu liczby ziaren w kłosie. Masa 1000 ziaren w roku 2005 nie była istotnie zależna od poziomu nawożenia N, w latach 2006 i 2007 największa była na obiekcie nie nawożonym i nawożonym najmniejszą dawką azotu ($30 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$).

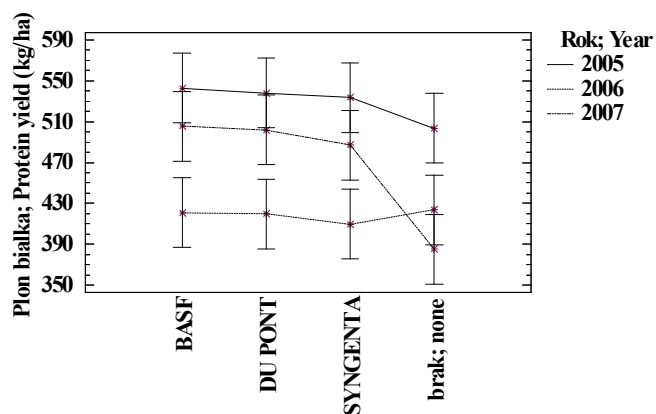
Zawartość białka w ziarnie jęczmienia była podobna w latach badań i zwiększała się istotnie wraz ze wzrostem dawki N do $120 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (tab. 4). Nie zależała od sposobu ochrony roślin.

Plon białka z jednostki powierzchni był zróżnicowany w latach badań i zmieniał się zależnie od dawki nawożenia azotem oraz programu ochrony roślin (tab. 4). Istotnie największy plon białka stwierdzono w roku 2005, tj. roku największego plonowania i największej reakcji jęczmienia na nawożenie azotem. Średnio z lat badań zwiększające się

nawożenie azotem do dawki 120 kg N·ha⁻¹ powodowało istotny wzrost plonu białka. Wszystkie badane programy ochrony roślin wpływały na zwiększenie plonu białka w stosunku do obiektu kontrolnego, aczkolwiek sposób ochrony nie różnicował plonu białka. Stwierdzono istotne interakcje pomiędzy rokiem uprawy a dawką nawożenia N (rys. 4) i programem ochrony roślin (rys. 5). W latach 2005 i 2007 plon białka zwiększał się istotnie do dawki 120 kg N·ha⁻¹, a w roku 2006 tylko do dawki 90 kg N·ha⁻¹. Badane programy ochrony roślin wpływały na zwiększenie plonu białka w stosunku do kontroli tylko w roku 2007, a w pozostałych latach ochrona roślin nie powodowała zwiększenia plonu białka.



Rys. 4. Współdziałanie lat badań z dawką nawożenia azotem w kształtowaniu plonu białka
Fig. 4. Interaction between years and nitrogen rates for protein yield



Rys. 5. Współdziałanie lat badań z programami ochrony roślin w kształtowaniu plonu białka
Fig. 5. Interaction between years and plant protection programs for protein yield

Tabela 5

Udział i wkład składowych plonu w różnicę pomiędzy plonem ziarna jęczmienia jarego w latach 2006 i 2005
Contribution and share of yield components in the difference between spring barley grain yields in 2006 and 2005

Składowe plonu Yield components	Rok Year		Efekty składowych plonu Effects of yield components		
	2006	2005	wkład — contribution		udział (%) share (%)
			t·ha ⁻¹	%	
Plon — Yield (t·ha ⁻¹)	3,39	4,21	—	—	—
Obsada kłosów na 1m ² Spikes per m ²	581	560	-0,10	-3,03	-12,52
Liczba ziaren w kłosie Grains per spike	14,4	15,2	0,17	5,10	21,07
MTZ	40,9	49,5	0,75	22,12	91,45
Suma — Total			0,82	24,19	100,00
Błąd oceny — Estimation error			14,43		

Tabela 6

Udział i wkład składowych plonu w różnicę pomiędzy plonem ziarna jęczmienia jarego w latach 2007 i 2005
Contribution and share of yield components in the difference between spring barley grain yields in 2007 and 2005

Składowe plonu Yield components	Rok Year		Efekty składowych plonu Effects of yield components		
	2007	2005	wkład — contribution		udział (%) share (%)
			t·ha ⁻¹	%	
Plon — Yield (t·ha ⁻¹)	3,78	4,21	—	—	—
Obsada kłosów na 1m ² Spikes per m ²	871	560	-0,14	-3,71	-32,59
Liczba ziaren w kłosie Grains per spike	10,1	15,2	0,46	12,27	107,89
MTZ	43	49,5	0,11	2,81	24,70
Suma — Total			0,43	11,37	100,00
Błąd oceny — Estimation error			8,95		

Tabela 7

Maksymalny wpływ nawożenia azotem i ochrony roślin (program BASF)
Maximal effect of nitrogen fertilization and plant protection (BASF program)

Rok Year	Zwyżka plonu ziarna (t·ha ⁻¹) i białka w (kg·ha ⁻¹) pod wpływem Grain (t·ha ⁻¹) and protein (kg·ha ⁻¹) yield increase as a result of							
	nawożenia azotem nitrogen fertilization		ochrony roślin plant protection (program BASF)		addytywny additive		interakcyjny combined	
	ziarno grain	białko protein	ziarno grain	białko protein	ziarno grain	białko protein	ziarno grain	białko protein
2005	2,18	488	0,41	39	2,59	527	2,49	489
2006	1,63	286	0,05	-3	1,68	283	1,71	319
2007	2,01	392	0,92	121	2,93	513	2,73	417
Średnio Mean	1,94	389	0,46	52	2,40	441	2,31	408

DYSKUSJA

Plon ziarna i białka jęczmienia były silnie związane z warunkami pogody w latach badań. Wielkość plonu ziarna oraz jego zmienność w poszczególnych latach jest wypadkową wzajemnych relacji wielu czynników, które współdziałają ze sobą w ciągu całego okresu wegetacji roślin (Jaczeńska-Kalicka, 2008). Przebieg pogody w czasie wegetacji ma jednak decydujący wpływ na plonowanie i porażenie przez patogeny. Mazurek (1999) wyjaśnił, że zróżnicowane w latach warunki pogody wpływają na rozwój roślin, zdolność pobierania składników pokarmowych i efektywność fotosyntezy. Powodują one zmiany powierzchni asymilacyjnej roślin i tempa fotosyntezy, która decyduje o ilości materiałów zapasowych w ziarnie, tj. o ich masie i w rezultacie o wielkości plonu z jednostki powierzchni. W korzystnych warunkach wilgotnościowych przed kwitnieniem rośliny gromadzą dużą ilość materiałów zapasowych, które mogą być wykorzystane do zasilania ziarna. Po kwitnieniu rośliny dłużej utrzymują zielone liście, co przedłuża okres gromadzenia suchej masy w czasie wypełniania ziarna i wpływa na zwiększenie plonu ziarna i białka z jednostki powierzchni (Pecio i Bichoński, 2004).

Najniższy plon ziarna jęczmienia jarego stwierdzono w roku 2006, charakteryzującym się niekorzystnym rozkładem warunków pogody, w tym głównie małą ilością opadów i wysoką temperaturą w okresie wegetacji. Niski poziom plonowania jęczmienia w latach o zbyt małych opadach i wyższej temperaturze powietrza stwierdził również Michalski i in. (2006). Jaczeńska-Kalicka (2008) oraz Korbas (2008) wyjaśniają, że każda roślina uprawna daje najwyższe plony w optymalnych warunkach klimatycznych i wszelkie anomalie pogodowe mogą znacząco wpływać na wielkość plonu. Czynniki pogodowe mogą zaznaczyć się wyraźnie wpływając bezpośrednio na ograniczenie plonu (np. susza) lub stymulując rozwój patogenów wpływających destrukcyjnie na plon. W wyniku braku opadów rośliny słabiej rozwijają się, zmienia się architektura łanu i mikroklimat.

Chociaż warunki pogody w latach 2005 i 2007 nie różniły się znacząco i choć częściowo wyjaśniają różnice w plonie ziarna, to należy zwrócić uwagę, że w latach 2005 i 2006 uprawiano odmianę Antek, a w roku 2007 odmianę Justina. W badaniach Noworolnika (2003) odmiana Justina wyróżniała się spośród badanych odmian najwyższym plonem ziarna. Charakteryzowała się istotnie wyższą od pozostałych odmian masą ziarna z kłosa, dzięki dużej liczbie ziaren z kłosa i ich większej dorodności (MTZ).

Najwyższy plon ziarna uzyskany w roku 2005 wynikał również z dużej liczby ziaren w kłosie i wysokiej masy 1000 ziaren, podczas gdy liczba kłosów na jednostce powierzchni była w tym roku najmniejsza. Potwierdza to dane z literatury, że wysoki plon ziarna jęczmienia jarego, można osiągnąć przy umiarkowanej liczbie kłosów (Gozdowski i in., 2007; Listowski, 1979). Badania (Mazurek, 1999) wykazały, że na plon ziarna składają trzy jego składowe: liczba kłosów na jednostce powierzchni, liczba ziaren w kłosie i masa 1000 ziaren, które są ujemnie skorelowane. Uzasadnia to skomplikowane zależności pomiędzy roślinami w łanie i pomiędzy organami roślinnymi. Liczba kłosów jest modyfikowana głównie przez zabiegi agrotechniczne, takie jak nawożenie azotem, termin i ilość wysiewu, a liczba ziaren w kłosie i masa 1000 ziaren są uwarunkowane genetycznie i przez czynniki środowiskowe. Liczba ziaren w kłosie jest związana z długością kłosa,

czyli liczbą wykształconych zdolnych do zapłodnienia kwiatków. Organy generatywne kłosa, tj. kłoski i kwiatki rozwijają się we wczesnych stadiach rozwojowych, tzn. w okresie krzewienia. Niewystarczająca ilość składników pokarmowych w tym czasie lub słaba efektywność fotosyntezy może zmniejszyć liczbę płodnych kwiatków, w rezultacie liczbę ziaren w kłosie (Ferrante i in., 2007). Masa ziarna jest związana z aktywnością i długością procesu asymilacji (Bertholdsson, 1999; Przulj i Momcilovic, 2001 a).

Udział składowych plonu w zróżnicowaniu jego wielkości zależy od dwóch poziomów danego czynnika najlepiej jest ocenić za pomocą metody Rudnickiego (2000). Jak wynika z danych w tabelach 5 i 6 różnica w plonie ziarna pomiędzy rokiem 2005 a 2006 uwarunkowana była głównie masą 1000 ziaren, a różnica pomiędzy latami 2005 i 2007 wynikała z liczby ziaren w kłosie.

Nawożenie azotem jest kolejnym ważnym czynnikiem decydującym o wielkości plonu ziarna i jego składowych. Wpływa ono istotnie na zwiększenie liczby ziaren w kłosie i liczby kłosów, a przez to i plonu z jednostki powierzchni. Zależności te są dobrze znane z literatury (Fotyma i Kęsik, 1993; Gozdowski i in., 2007; Noworolnik, 2003; Wyszyński, 2007). We wczesnych stadiach rozwojowych azot stymuluje krzewienie roślin i decyduje o liczbie kłosków w kłosie, w fazie strzelania w źdźbło azot chroni przed nadmierną redukcją pędów i kłosków oraz umożliwia uzyskanie dużej liczby ziaren w kłosie. W okresie pomiędzy rozwojem liścia flagowego i początkiem kwitnienia azot stymuluje efektywność organów asymilacyjnych i tworzenie masy ziarna.

Największą efektywność azotu stwierdzono w latach 2005 i 2007, a najmniejszą w roku 2006, kiedy to stwierdzono również najmniejszy plon ziarna. Optymalne dawki azotu, tzn. zapewniające 95% maksymalnego plonu ziarna wynosiły w kolejnych latach odpowiednio 109 kg N·ha⁻¹, 99 kg N·ha⁻¹ i 116 kg N·ha⁻¹. Efektywność strukturalna azotu obliczona dla 1 kg N·ha⁻¹ wynosiła 1,39 kłosa na 1 m² i 0,04 ziarna w kłosie w roku 2005, 1,53 kłosa i 0,06 ziarna w kłosie w roku 2006 oraz 3,61 kłosów i 0,02 ziarna w kłosie w roku 2007. Ochrona roślin była bardzo efektywna w roku 2007 i praktycznie nieefektywna w suchym roku 2006. Chociaż stwierdzono dodatnią interakcję pomiędzy nawożeniem azotem i ochroną roślin to wpływ obydwu czynników na plon ziarna jęczmienia był praktycznie addytywny (tab. 7).

Jest to zgodne z literaturą (Bertholdsson, 1999; Przulj i Momcilovic, 2001 a), z której wynika, że nawożenie azotem w okresie przed kwitnieniem jęczmienia determinuje wytworzenie większej powierzchni zielonej, która później bierze udział w fotosyntezie w czasie wypełniania ziarna. Stosowanie chemicznej ochrony roślin wpływa tylko na przedłużenie czasu jej trwania (Ruiter i Brooking, 1996) i raczej stabilizuje niż tworzy plon ziarna (Prószyński, 2002).

Zawartość i plon białka w ziarnie są modyfikowane w dużym stopniu przez warunki środowiska i zabiegi agrotechniczne. Bertholdsson (1998) wykazał, że zmienność zawartości białka w ziarnie jęczmienia jest determinowana w niemal 90% przez rok uprawy, zaopatrzenie w azot i warunki wilgotnościowe gleby, a tylko w 7% przez genotyp rośliny. Pozostała zmienność wynika z interakcji tych czynników. W badaniach własnych zarówno zawartość białka, jak i plon białka były związane z warunkami pogody w latach badań. Tendencję do większej zawartości białka w ziarnie i istotnie największy plon białka

stwierdzono w roku największego plonowania jęczmienia, w którym w okresie nalewania ziarna wysokie opady występowały w połączeniu z wysoką temperaturą (średnia dzienna temperatura lipca wynosiła 20°C). Petterson i Eckersten (2007) podali, że wysokie temperatury na ogół skracają czas trwania wypełniania ziarna i przyspieszają jego tempo. Te dwa procesy są przeciwstawne w sensie ilości asymilatów gromadzonych w ziarnie i dlatego pożądana jest temperatura optymalna. Ponieważ gromadzenie azotu w ziarnie nie jest tak wrażliwe na wysokie temperatury jak gromadzenie węgla, wysokie temperatury w czasie wypełniania ziarna powodują wzrost zawartości białka w ziarnie. Plon białka z jednostki powierzchni jest wypadkową plonu ziarna i zawartości białka.

Podobnie jak w badaniach innych autorów (Noworolnik, 2003), nawożenie azotem istotnie zwiększało zawartość i plon białka w ziarnie jęczmienia. Zgodnie z równaniem regresji liniowej zwiększenie dawki o 1 kg N·ha⁻¹ powodowało wzrost zawartości białka w ziarnie o 0,038% i plonu białka o 3,15 kg·ha⁻¹. Petterson i Eckersten (2007) również wykazali liniową zależność pomiędzy zawartością białka i dawką N, a wzrost zawartości białka w ziarnie jęczmienia wynosił 0,028%.

Plon białka z hektara zwiększał się na skutek stosowania chemicznej ochrony roślin przed chorobami grzybowymi. Badane programy nie różnicowały istotnie plonu białka, aczkolwiek program firmy BASF był nieco bardziej efektywny. Podobnie jak w przypadku plonu ziarna pomimo dodatniej interakcji ochrony i nawożenia N (rys. 4), efekt oddziaływania obu czynników na plon białka miał charakter addytywny (tab. 7).

WNIOSKI

1. Plon ziarna i białka jęczmienia paszowego są skorelowane dodatnio. Uzyskanie dużych plonów jest możliwe w sprzyjających warunkach pogody, charakteryzujących się ciepłą i wilgotną pogodą w fazach krzewienia i wypełniania ziarna oraz intensywnego nawożenia azotem.
2. O wysokim plonie ziarna decyduje duża liczba ziaren w kłosie i masa tysiąca ziaren. Uzyskanie takiego plonu jest możliwe przy średniej obsadzie kłosów na jednostce powierzchni (ok. 560 kłosów na 1 m²).
3. Nawożenie azotem oraz chemiczna ochrona roślin mają addytywny wpływ na plon ziarna i białka jęczmienia.

LITERATURA

- Bertholdsson N.O. 1998. Selection methods for malting barley consistently low in protein concentration. *Eur. J. Agron.* 9: 213 — 222.
- Bertholdsson N. O. 1999. Characterization of malting barley cultivars with more or less stable protein content under varying environmental conditions. *Eur. J. Agron.* 10: 1 — 8.
- Dąbrowski Z. T. 2001. Wskaźniki i kryteria oceny programów integrowanej ochrony roślin. *Prog. Plant. Protect./Post. Ochr. Rośl.*, 41 (1) :77 — 87.
- Ferrante A., Savin A., Slafer G. A. 2008. Wheat and barley floret development in response to nitrogen and water availability. *Ital. J. Agron./ Riv. Agron.* 3 suppl.: 205 — 206.
- Fiedorow Z., Gołębiak B., Weber Z. 2008. Choroby roślin rolniczych. AR Poznań: 200 ss.

- Fotyma E., Pietrasz-Kęsik G. 1993. Struktura plonu zbóż jarych zależnie od nawożenia azotem. *Fragm. Agron.* 4: 103 — 104.
- Gozdowski D., Wyszynski Z., Kalinowska-Zdun M. 2007. Plon i składowe plonu jęczmienia jarego oplewionego i nagoziarnistego. *Fragm. Agron.* 2: 110 — 118.
- Jaczewska-Kalicka A. 2008. Wpływ zmian klimatycznych na plonowanie i ochronę zbóż w Polsce. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 48 (2): 415 — 425.
- Kaniuczak Z. 2001. Efektywność chemicznego zwalczania chorób grzybowych i szkodników w uprawie jęczmienia jarego. *Prog. Plant. Protect./Post. Ochr. Rośl.* 41 (2): 707 — 710.
- Korbas M. 2008. Sprawcy chorób a zmiany klimatyczne. *Progress In Plant Protection/Postępy w Ochronie Rośl.* 48 (3): 771 — 776.
- Listowski A. 1979. Agrofizjologiczne podstawy produktywności roślin. PWN.
- Mazurek J. 1999. Biologiczne podstawy plonowania roślin zbożowych. *Pam. Puł.* 114: 261 — 273.
- Michalski T., Idziak R., Horoszkiewicz-Janka J. 2006. Plonowanie jęczmienia jarego w zależności od warunków wilgotnościowych i temperatury w okresie wegetacji. *Rocz. AR w Poznaniu, CCCLXXX*: 243 — 249.
- Noworolnik K. 2003. Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na plonowanie jęczmienia jarego w różnych warunkach siedliska. *Pam. Puł. Monografie i Rozprawy Naukowe* nr 8.
- Pecio A., Bichoński A. 2004. Możliwości kształtowania cech jakościowych jęczmienia słodowego poprzez zabiegi agrotechniczne. VIII Konf. Nauk. IUNG: „Jakość towarowych surowców roślinnych wyzwaniem dla nauki i praktyki rolniczej. Puławy 31.05–1.06.2004: 93 — 100.
- Pettersen C. G., Eckersten H. 2007. Prediction of grain protein in spring malting barley grown in Northern Europe. *Eur. J. Agron.* 27: 205 — 214.
- Pruszyński, S. 2002. Produkcyjne i ekologiczne uwarunkowania ochrony roślin przed chorobami i szkodnikami. *Pam. Puł.* 130: 607 — 618.
- Przulj N., Momcilovic V. 2001 a. Genetic variation for dry matter and nitrogen accumulation and translocation in two-row spring barley. I. Dry matter translocation. *Eur. J. Agron.* 15: 241 — 254.
- Przulj N., Momcilovic V. 2001 b. Genetic variation for dry matter and nitrogen accumulation and translocation in two-row spring barley. II. Nitrogen translocation. *Eur. J. Agron.* 15: 255 — 265.
- Rudnicki F. 2000. Wyznaczanie wpływu poszczególnych elementów plonowania na różnice plonów między obiektami doświadczalnymi. *Fragm. Agron.* 3: 53 — 65.
- Ruiter J.M., Brooking I.R., 1996. Effect of sowing date and nitrogen on dry matter and nitrogen partitioning in malting barley. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 24 (1): 65 — 76.
- Wyszynski Z., Gozdowski D., Pietkiewicz S., Łoboda T. 2007. Plon ziarna jęczmienia jarego i jego składowe w zależności od rodzaju i dawki nawozów azotowych. *Fragm. Agron.* 2: 418 — 426.

EDYTA PACZOS-GRZĘDA
MARIA CHRZĄSTEK
SYLWIA OKOŃ
AGNIESZKA GRĄDZIELEWSKA
DANUTA MIAZGA

Instytut Genetyki i Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Zastosowanie markerów ISSR do analizy wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego *Avena sterilis* L.

Application of ISSR markers in analysis of intraspecific similarity of *Avena sterilis* L.

W Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie prowadzony jest program obejmujący krzyżowanie owsa zwyczajnego z dzikimi gatunkami z rodzaju *Avena* L. W krzyżowaniach jako formy mateczne wykorzystywane są polskie i amerykańskie odmiany owsa oraz linie hodowlane. Komponentami ojcowskimi są dzikie gatunki heksaploidalne: *A. sterilis* L. i *A. fatua* L. oraz tetraploidalne: *A. murphyi* Ladiz. i *A. maroccana* Gdgr. W celu określenia poziomu zróżnicowania genetycznego form *A. sterilis* wykorzystywanych do krzyżowań przeprowadzono analizę polimorfizmu markerów ISSR. Metoda ISSR jest wysoce efektywna, identyfikuje wysoki polimorfizm i może być z powodzeniem stosowana do oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie *Avena sterilis* L. Podobieństwo genetyczne analizowanych genotypów określone na podstawie polimorfizmu markerów ISSR wahało się od 0,512 pomiędzy AVE 2532 i AVE 2116 do 0,878 pomiędzy CN 26025 i AVE 531, a średnio wynosiło 0,715. Takie wartości współczynników podobieństwa genetycznego świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *A. sterilis* przeznaczonych do krzyżowań.

Słowa kluczowe: *Avena sterilis* L., ISSR, podobieństwo genetyczne

The Institute of Genetics, Breeding and Plant Biotechnology of University of Life Sciences in Lublin conducted a program of *Avena sativa* L. cultivars crossing with wild species of the genus *Avena* L. Polish and American cultivars and breeding lines were the maternal forms for crossing. The paternal components were wild hexaploid species: *A. sterilis* L., *A. fatua* L. and tetraploids: *A. murphyi* Ladiz., *A. maroccana* Gdgr. Analysis of ISSR markers polymorphism was conducted in order to determine genetic diversity of the *A. sterilis* genotypes used in crossing. The ISSR method is much effective in identification of DNA polymorphism and can be employed with success to evaluate the *A. sterilis* L. genetic diversity. Genetic similarity of the analyzed genotypes, determined based on the ISSR markers polymorphism, ranged from 0.512 (AVE 2532 vs. AVE 2116) to 0.878 (CN 26025 vs. AVE 531), on the average — 0.715. Such values of genetic similarity indices testify to high diversity of the *A. sterilis* genotypes designated for crossing.

Key words: *Avena sterilis* L., genetic similarity, ISSR

WSTĘP

W Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie od kilku lat prowadzony jest program obejmujący krzyżowanie owsa zwyczajnego z dzikimi gatunkami z rodzaju *Avena* L. (Chrzastek i in., 2006). W krzyżowaniach jako formy mateczne wykorzystywane są polskie i amerykańskie odmiany owsa oraz linie hodowlane pochodzące z HR Strzelce oraz Danko w Choryni. Komponentami ojcowskimi są dzikie gatunki heksaploidalne: *A. sterilis* L. i *A. fatua* L. oraz tetraploidalne: *A. murphyi* Ladiz. i *A. maroccana* Gdgr.

Dzikie gatunki owsa charakteryzuje nie tylko bogactwo genów odporności, ale i ogromna zmienność cech morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych i rolniczych. Z uwagi na duże podobieństwo genetyczne do *A. sativa*, gatunek *A. sterilis* uważany jest za przodka form uprawnych (Zhou i in., 1999) oraz jedno z najłatwiej dostępnych źródeł zmienności (Frey, 1986; Chrzastek i in., 2004). Jednocześnie *A. sterilis* stanowi dużą rezerwę różnorodności genetycznej dla owsa zwyczajnego, dlatego wykorzystywany jest w programach hodowlanych jako źródło genów warunkujących odporność na mączniaka (Frey, 1986), rdzę koronową i żdźbłową (Martens i in., 1980), nicienie (Rivoal i Cook, 1993) czy herbicydy (Somody i in., 1984). *A. sterilis* może być również dawcą genów warunkujących wysoką zawartość białka (Takeda i Frey, 1977) i tłuszczu (Thro i Frey, 1985) w ziarnie, a także odpowiedzialnych za wysoki potencjał plonowania (Takeda i Frey, 1977).

Genotypy *Avena sterilis* pochodzące ze światowych kolekcji były zaledwie kilkakrotnie obiektem analiz molekularnych. Goffreda i wsp. (1992) oceniali polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych w 173 próbach *A. sterilis* pochodzących z 9 krajów Afryki i południowo-wschodniej Azji. Phillips i wsp. (1993) określili podobieństwo genetyczne 1005 genotypów *A. sterilis* z kolekcji US NSGC (United States National Small Grain Collection) na podstawie zróżnicowania izoenzymów dla 23 systemów enzymatycznych. Heun i wsp. (1994) za pomocą markerów RAPD i izoenzymów analizowali zróżnicowanie 24 form *A. sterilis* pochodzących z kolekcji US NSGC. Zohu i wsp. (1999) wykorzystując metodę RAPD ocenili podobieństwo genotypów *A. sterilis* o zróżnicowanym pochodzeniu oraz udział *A. sterilis* w ewolucji gatunków uprawnych. Fu i wsp. (2007) podjęli próbę oceny zróżnicowania genetycznego 369 form *A. sterilis* z kolekcji PGRC (Plant Gene Resources of Canada) pochodzących z 26 krajów za pomocą systemu SSR.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) jest metodą opartą na PCR, a amplifikacji podlegają fragmenty DNA pomiędzy powtórzeniami mikrosatelitarnymi położonymi w odległości nie większej niż ok. 2000bp (Ziętkiewicz i in., 1994). Metoda ta, z uwagi na wysokie temperatury przyłączania starterów, jest wysoce powtarzalna. Ponadto markery ISSR, podobnie jak sekwencje mikrosatelitarne, z którymi sąsiadują są równomiernie rozłożone w genomie (Predeep-Reddy i in., 2002). Metodę ISSR wykorzystano kilkakrotnie do analizy gatunków z rodzaju *Avena*. De Souza i wsp. (2005) użyli tej metody do oszacowania zróżnicowania genetycznego mutantów *A. sativa* oraz identyfikacji

regionów genomu związanych z wrażliwością bądź tolerancją na kwasy organiczne będące produktami rozkładu materii organicznej. Tanhuanpaa i wsp. (2006) wykorzystali tę metodę w celu identyfikacji markera dla genu karłowatości Dw6. Paczos-Grzęda i wsp. (2006) przeprowadzili analizę polimorfizmu markerów ISSR u 12 mieszańców F_1 10 różnych kombinacji *A. sativa* $\times$ *A. maroccana* oraz 2 kombinacji *A. sativa* $\times$ *A. murphyi* i potwierdzili mieszańcowy charakter badanych form. Natomiast Paczos-Grzęda (2007) oceniła podobieństwo genetyczne wybranych polskich odmian *A. sativa*. ISSR była również jedną z metod wykorzystanych do konstrukcji mapy sprzężeń heksaploidalnego owsa na bazie podwojonych haploidów (Tanhuanpaa i in., 2008).

W celu określenia poziomu zróżnicowania genetycznego form *A. sterilis* wykorzystywanych do krzyżowań mających na celu poszerzenie zmienności uprawnych form owsa przeprowadzono analizę polimorfizmu markerów ISSR 27 wybranych genotypów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 27 genotypów *A. sterilis* (tab. 1) pochodzących z różnych rejonów świata, a sprowadzonych z czterech banków genów: National Small Grain Collection, Aberdeen w USA, Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon w Kanadzie, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben w Niemczech, Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Izolację DNA przeprowadzono metodą Milligana (1992). DNA każdego genotypu izolowano w dwóch powtórzeniach. Jedno powtórzenie stanowiły fragmenty koleoptyle 15–20 siewek. Reakcje amplifikacji przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Ziętkiewicz i wsp. (1994). W metodzie ISSR w skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 μ L wchodziły: 1 $\times$ bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20) (Fermentas, Litwa); 160 μ M każdego dNTP; 5,3 pM startera; 1,3 mM MgCl_2 ; 0,4 mM spermidyny, 80 ng genomowego DNA; 0,5 U Taq DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 7 min. w 95°C, 38 cykli: denaturacja 95°C — 30 s, przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C — 45 s, trzy kolejne cykle 53°C — 45 s i 32 cykle 52°C — 45 s, wydłużanie starterów 72°C — 2 min., z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 2,5 % żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano wykorzystując system dokumentacji żeli PolyDoc.

Na podstawie polimorfizmu markerów ISSR określono podobieństwo genetyczne SI (similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano mu odpowiednio wartość 1 lub 0. W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) stosując program NTSYS-pc 2.10q. (Rohlf, 2001). W celu dokonania oceny wartości zastosowanego systemu markerowego obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie PIC (polymorphism information content) zgodnie z założeniami Powell i wsp. (1996). Określono również indeks efektywności metody (AEI — Assay Efficiency

Index) (Pejic i in., 1998) $AEI = BP/T$, gdzie BP jest całkowitą liczbą uzyskanych polimorficznych fragmentów, zaś T liczbą zastosowanych starterów.

Tabela 1

**Pochodzenie badanych genotypów *Avena sterilis* L.
Origin of the analysed *Avena sterilis* L. genotypes**

Oznaczenie genotype Genotype description	Bank genów Genebank	Pochodzenie Origin	Rok wprowadzenia do kolekcji Year of introduction into collection
51565	IHAR	—	—
AVE 1373	IPK	Włochy	—
AVE 1561	IPK	Cypr	1977
AVE 1935	IPK	Ukraina	—
AVE 2068	IPK	Włochy	1981
AVE 2116	IPK	Liban	1981
AVE 2122	IPK	—	1981
AVE 2532	IPK	Tadżykistan	1983
AVE 2562	IPK	Wielka Brytania	—
AVE 283	IPK	Grecja	1942
AVE 531	IPK	Włochy	1950
AVE 941	IPK	Izrael	—
Clav 8295	NSGC	—	1966
CN 20304	PGRC	—	1990
CN 20321	PGRC	Syria	1990
CN 20322	PGRC	—	1990
CN 20328	PGRC	—	1990
CN 24397	PGRC	Gruzja	1990
CN 25677	PGRC	—	1990
CN 25717	PGRC	Portugalia	1990
CN 26025	PGRC	—	1990
PI 287211	NSGC	—	1963
PI 378811	NSGC	—	1973
PI 378859	NSGC	Izrael	1973
PI 379677	NSGC	—	1973
PI 380064	NSGC	—	1973
PI 380125	NSGC	—	1973

NSGC — National Small Grain Collection, Aberdeen, USA

PGRC — Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon, Kanada

IPK — Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Niemcy

IHAR — Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), IHAR w Radzikowie

WYNIKI I DYSKUSJA

W reakcjach przeprowadzonych dla 27 genotypów *A. sterilis* z 10 wyselekcjonowanymi starterami ISSR uzyskano łącznie 148 fragmentów DNA, z których 105 było polimorficznych. Wielkość amplikonów wahała się od 180 do 1800 pz, zaś produkty polimorficzne miały długość od 260 do 1780 pz. Pojedynczy starter inicjował amplifikację od 11 dla SR-27 do 19 produktów dla SR-11, średnio na starter przypadało 14,8 amplifikowanych fragmentów (tab. 2). Liczba prążków polimorficznych wynosiła od 7 dla SR-27 do 15 dla SR-1 i SR-11. Średnio każdy starter uczestniczył w amplifikacji 10,5 polimorficznych odcinków DNA, stąd indeks efektywności metody AEI przyjął właśnie

taką wartość. Heun i wsp. (1994) stosując 21 starterów RAPD dla 24 genotypów *A. sterilis* uzyskali 177 fragmentów, spośród których 115 było polimorficznych. Wartość AEI była niższa, aniżeli uzyskana w badaniach własnych i wyniosła 5,5. Zhou i wsp. (1999) uzyskali 248 polimorficznych prążków przy zastosowaniu 35 starterów RAPD dla 96 genotypów *A. sterilis*, a indeks AEI osiągnął wartość 7,0. Wydajność metody RFLP w badaniach Goffreda i wsp. (1992) była jeszcze niższa, a indeks AEI przyjął wartość 5,0. Fu i wsp. (2007) wykorzystali do analiz 26 par starterów SSR identyfikujących 125 alleli, a indeks efektywności metody wyniósł zaledwie 4,8. Można więc stwierdzić, że najbardziej efektywną metodą do analizy zróżnicowania genetycznego *A. sterilis* jest zastosowana w niniejszej pracy ISSR.

Tabela 2

Charakterystyka polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR
Characteristic of the polymorphism identified by the ISSR methods

Starter Primer	Liczba produktów Products number			PIC	Liczba profili Number of profiles	
	całkowita total	polimorficznych polymorphic	specyficznych specific		całkowita total	specyficznych specific
SR 1	17	15	0	0,52	21	16
SR 6	14	9	4	0,98	9	5
SR 11	19	15	2	0,67	22	18
SR 14	16	11	1	0,76	19	14
SR 16	14	10	1	0,75	15	9
SR 17	16	10	3	0,75	16	9
SR 22	13	8	1	0,67	17	16
SR 23	13	9	2	0,83	17	13
SR 27	11	7	0	0,82	17	10
SR 28	15	11	1	0,67	21	16
Suma Total	148	105	15	—	174	126
Średnio/starter Average per primer	14,8	10,5	1,5	0,74	17,4	12,6

Wartość PIC dla poszczególnych starterów ISSR wahała się od 0,52 do 0,99, zaś średnio wyniosła 0,74 (tab. 2). Powell i wsp. (1996) porównując wydajność kilku systemów markerowych u soi (AFLP, RAPD, RFLP oraz SSR) stwierdzili, podobnie jak wielu innych autorów, że współczynnik PIC przyjął najwyższą wartość dla metody SSR (0,60). SSR jest więc postrzegana jako metoda najbardziej efektywna w identyfikacji polimorfizmu. Li i wsp. (2000) stosując zaprojektowane dla owsa startery SSR dla 12 gatunków z rodzaju *Avena* uzyskali średnią wartość PIC 0,57 (0,28–0,79), zaś dla 20 odmian *Avena sativa* 0,51 (0,10–0,85). Analizując startery SSR zaprojektowane dla jęczmienia ci sami autorzy dla gatunków z rodzaju *Avena* oszacowali wartość PIC na 0,55 (0,31–0,77), zaś dla odmian na 0,38 (0,15–0,51). Równie wysoką, jak w badaniach własnych, wartość współczynnika PIC uzyskali Spada i wsp. (2004) u ryżu. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że metoda ISSR jest konkurencyjna w stosunku do SSR.

Osiem wykorzystanych w badaniach starterów inicjowało syntezę 15 produktów specyficznych wyłącznie dla pojedynczych genotypów. Obecność 3 produktów specyficznych stwierdzono u genotypu CN 24397 (GRU), zaś po 2 takie produkty były

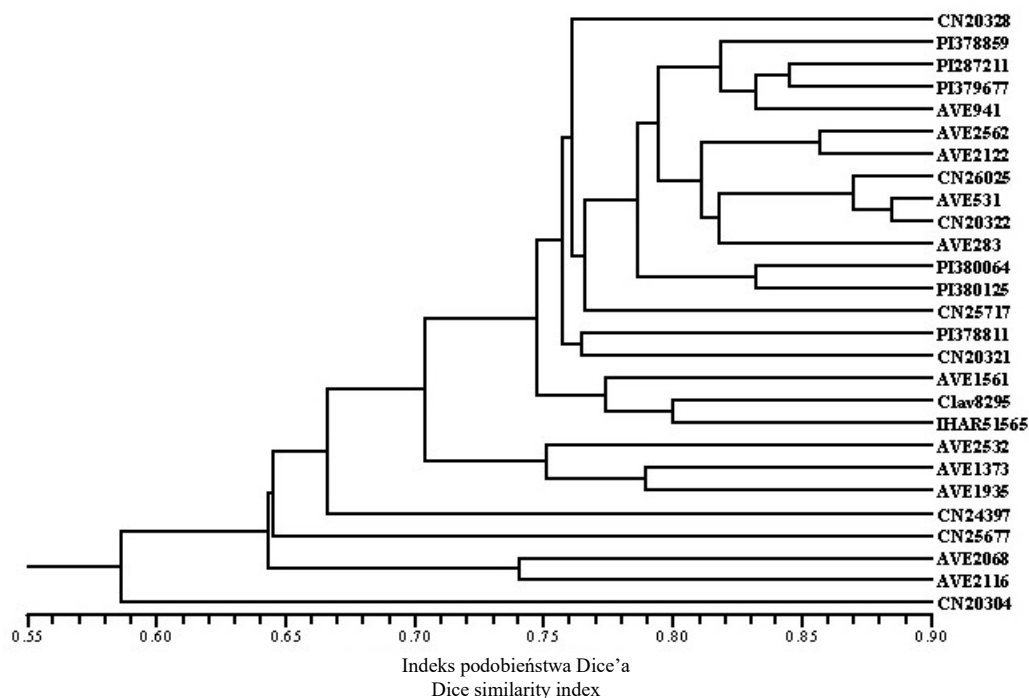
amplifikowane u PI 378811 (ISR), AVE 1561 (CYP) oraz CN 20304 (SYR). Wymienione genotypy posiadają więc unikalne sekwencje DNA nieobecne u pozostałych form. Wskazuje to na ich odmienność od reszty badanych genotypów.

Graham i wsp. (1996) wyniki oceny genetycznego pokrewieństwa 8 odmian truskawki uzyskane za pomocą metody RAPD przedstawili w postaci matrycy prążków. Matryca ta została utworzona z profili fragmentów DNA amplifikowanych w obecności poszczególnych starterów dla każdego z genotypów. Profile zebrane razem stworzyły swoisty fingerprint każdej z badanych odmian i umożliwiły właściwą i wiarygodną identyfikację. W niniejszej pracy polimorfizm markerów ISSR badanych genotypów *A. sterilis* również zapisano w postaci profili, a następnie złożono w matrycę prążków. Pojedynczy starter inicjował amplifikację produktów, które tworzyły od 9 (SR-6) do 22 (SR-11) odmiennych profili, w tym od 5 do 18 specyficznych wyłącznie dla jednego genotypu (tab. 2). Zidentyfikowano w sumie 174 profile, z których 126 było specyficznych. Średnio na każdy genotyp przypadało 4,7 profili specyficznych. Najwięcej, bo aż 9 profili specyficznych stwierdzono dla CN 25677 (PRT) oraz CN 20304 (SYR). Siedem takich profili pojawiło się u CN 24397 (GRU) oraz AVE 1561 (CYP). Genotypy te można więc uznać za najbardziej odmienne od pozostałych. Najmniej profili specyficznych, jedynie po 2, stwierdzono u genotypów: PI 378811 (ISR), AVE 531 (ITA) oraz Clav 8295 (ISR). Na tej podstawie można wnioskować, że wymienione genotypy są bardzo podobne do reszty analizowanych form.

Heun i wsp. (1994) stwierdzili, że odróżnienie wszystkich badanych form *A. sterilis* było możliwe na podstawie specyficznych profili markerów RAPD otrzymanych dla 21 starterów oraz izoenzymów uzyskanych dla 29 systemów enzymatycznych. W prezentowanych badaniach analiza profili wykazała, że pojedynczy starter ISSR nie umożliwia identyfikacji wszystkich badanych genotypów. Jednakże zastosowanie tylko jednej z 18 (na 45 możliwych) kombinacji par starterów pozwala na identyfikację każdego z badanych genotypów.

Na podstawie polimorfizmu markerów ISSR określono podobieństwo genetyczne (SI) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów zgodnie z formułą Dice'a. Podobieństwo genetyczne analizowanych genotypów wahało się od 0,512 pomiędzy AVE 2532 i AVE 2116 do 0,878 pomiędzy CN 26025 i AVE 531, a średnio wynosiło 0,715. Przyjmuje się, że im mniejsze podobieństwo genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi, tym większe możliwości uzyskania mieszańców o bardziej korzystnych właściwościach (Cox i Murphy, 1990). Wartości współczynników podobieństwa genetycznego świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *A. sterilis* przeznaczonych do krzyżowań i pozwalają przypuszczać, że prowadzone krzyżowania znacznie poszerzą pulę genetyczną wykorzystywaną w hodowli nowych odmian owsa zwyczajnego.

W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA. Na dendrogramie (rys. 1.) wyodrębniono jedną główną grupę skupień obejmującą 12 obiektów oraz 4 mniejsze. Grupa główna obejmuje 3 podgrupy, z których dwie skupiają wyłącznie genotypy z Izraela, charakteryzujące się najmniejszym zróżnicowaniem genetycznym. Kilka genotypów nie tworzy skupienia z żadną z wymienionych grup.



Rys. 1. Dendrogram genotypów *A. sterilis* L. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery ISSR
 Fig. 1. UPGMA dendrogram of the *A. sterilis* L. genotypes based on the ISSR markers

Na obrzeżach dendrogramu znajduje się genotyp CN 20303 pochodzący z Syrii, sprowadzony z banku genów w Saskatoon. Charakteryzuje się on najmniejszym spośród badanych form podobieństwem genetycznym do wszystkich pozostałych genotypów. Fu i wsp. (2007) zaobserwowali, że największym zróżnicowaniem genetycznym charakteryzowały się genotypy skolekcjonowane w Grecji, Liberii i Włoszech, podczas gdy formy z Egiptu, Gruzji, Etiopii, Gibraltaru i Kenii były najbardziej odmienne od form pochodzących z innych krajów. Autorzy nie zaobserwowali wspólnej klasteryzacji obiektów pochodzących z tych samych rejonów geograficznych. Goffreda i wsp. (1992) wykazali, że genotypy *A. sterilis* pochodzące z regionu Iran-Irak odbiegają od pozostałych form i charakteryzują się stosunkowo dużym zróżnicowaniem. Autorzy stwierdzili również, że genotypy z innych krajów, między innymi z Syrii i Izraela, grupowały się razem i cechowało je największe wzajemne podobieństwo. W badaniach własnych także zaobserwowano, że genotypy z Izraela charakteryzują się wysokim podobieństwem genetycznym.

WNIOSKI

1. Wartości współczynników podobieństwa genetycznego określone na podstawie polimorfizmu markerów ISSR, świadczą o dużym zróżnicowaniu genotypów *Avena sterilis* L. przeznaczonych do krzyżowań. Na podstawie uzyskanych wyników za

- genotypy najbardziej odmienne od pozostałych można uznać: CN 25677 (PRT), CN 20304 (SYR) i CN 24397 (GRU).
2. Metoda ISSR jest wysoce efektywna, identyfikuje wysoki polimorfizm i może być z powodzeniem stosowana do oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie *Avena sterilis* L.

LITERATURA

- Chrzastek M., Paczos-Grzęda E., Kowalczyk K., Miazga D., Kruk K. 2006. Mieszanie międzygatunkowe owsa. W: Mieszanie oddalone roślin uprawnych. Sodkiewicz W., Sodkiewicz T., Surma M. (red.). IGR PAN Poznań: 49 — 62.
- Chrzastek M., Paczos-Grzęda E., Miazga D. 2004. Charakterystyka cytologiczna i molekularna niektórych gatunków z rodzaju *Avena* W: Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Red. P. Krajewski, Z. Zwierzykowski, P. Kachlicki. IGR PAN Poznań: 67 — 74.
- Cox T. S., Murphy J. P. 1990. The effect of parental divergence on F₂ heterosis in winter wheat crosses. *Theor. Appl. Genet.* 79: 241 — 250.
- De Souza V. Q., Pereira A. Da S., Kopp M. M., Coimbra J. L. M., De Carvalho F. I. F., Da Luz V. K., De Oliveira A. C. 2005. Genetic dissimilarity in oat (*Avena sativa* L.) tolerant and sensitive mutants to organic acids. *Bragantia* 64: 569 — 575.
- Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding. In: Proc. of the 2nd Int. Oat Conf. 1985. Lawes D. A., Thomas H. (red.). Aberystwyth, UK: 9 — 15.
- Fu Y.-B., Chong J., Fetch T., Wang M.-L. 2007. Microsatellite variation in *Avena sterilis* oat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1029 — 1038.
- Goffreda J. C., Barnquist W. B., Beer S. C., Tanksley S. D., Sorrels M. E. 1992. Application of molecular markers to assess genetic relationships among accessions of wild oat, *Avena sterilis*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 146 — 151.
- Graham J., McNicol R. J., McNicol J. W. 1996. A comparison of methods for estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 402 — 406.
- Heun M., Murphy J. P., Phillips T. D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* 87: 689 — 696.
- Li C. D., Rosnagel B. G., Scoles G. J. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869 — 876.
- Martens J. W., McKenzie R. I. H., Harder D. E. 1980. Resistance to *Puccinia graminis avenae* and *P. coronata avenae* in the wild and cultivated *Avena* populations of Iran, Iraq, and Turkey. *Can. J. Genet. Cytol.* 22: 641 — 649.
- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK: 59 — 88.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269 — 5273.
- Paczos-Grzęda E., Chrzastek M., Miazga D., Wacko S. 2006. Analiza molekularna mieszańców *Avena sativa* L. × *A. maroccana* Gdgr oraz *A. sativa* L. × *A. murphyi* Ladiz. W: Mieszanie oddalone roślin uprawnych. Sodkiewicz W., Sodkiewicz T., Surma M. (red.), IGR PAN Poznań: 135 — 141.
- Paczos-Grzęda E. 2007. Wykorzystanie metod ISSR i RAPD oraz analizy rodowodów do oceny podobieństwa międzyodmianowego *Avena sativa* L. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 517: 547 — 558.
- Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplik V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 248 — 255.
- Phillips T. D., Murphy J. P., Goodman M. M. 1993. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. *Theor. Appl. Genet.* 86 (1): 54 — 64.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225 — 238.

- Predeep-Reddy M., Salara N., Siddiq E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9 — 17.
- Rivoal R., Cook R. 1993. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. In: K. Evans and J. M. Webster (ed.). CAB International, Wallingford, UK: 259 — 303.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Somody C. N., Nalewaja J. D., Miller S. D. 1984. Wild oat (*Avena fatua*) and *Avena sterilis* morphological characteristic and response to herbicides. *Weed. Sci.* 32: 353 — 359.
- Spada A., Mantegazza R., Biloni M., Caporali E., Sala F. 2004. Italian rice varieties: historical data, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationships. *Plant Breeding* 123: 105 — 111.
- Takeda, K., Frey, K. J. 1977. Growth rate inheritance and association with other traits in backcross populations of *Avena sterilis* × *A.sativa*. *Euphytica* 26: 309 — 317.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Laurila J., Schulman A. H., Manninen O., Kiviharju E. 2006. Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa* L.). *Genome* 49: 282 — 287.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Schulman A. H., Kiviharju E. 2008. The first doubled haploid linkage map for cultivated oat. *Genome* 51 (8): 560 — 569.
- Thro A. M., Frey K. J. 1985. Inheritance of groat — oil content and high-oil selection in oats (*Avena sativa* L.). *Euphytica* 34: 251 — 263.
- Zhou X., Jellen E.N., Murphy J.P. 1999. Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. *Crop Sci.* 39: 1208 — 1214.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 — 183.

EDYTA PACZOS-GRZĘDAInstytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Zastosowanie metod RAPD i SSR do oceny podobieństwa genetycznego tetraploidalnych gatunków z rodzaju *Avena* L.

Application of the RAPD and SSR methods to genetic similarity assessment of tetraploid species of the *Avena* L. genus

W pracy analizowano podobieństwo genetyczne i pokrewieństwo tetraploidalnych gatunków z rodzaju *Avena* L.: *A. maroccana*, *A. murphyi* i *A. macrostachya* do gatunków heksaploidalnych *A. sativa* i *A. sterilis* w oparciu o polimorfizm markerów RAPD oraz SSR. Piętnaście starterów RAPD inicjowało syntezę 129 polimorficznych fragmentów DNA, zaś 13 par starterów SSR uczestniczyło w amplifikacji 141 tego typu produktów. Wartości współczynnika informacji o polimorfizmie wahały się od 0,58 do 0,80 dla RAPD i od 0,71 do 0,92 dla SSR. Średnia wartość PIC dla metody RAPD wyniosła 0,67, zaś dla SSR — 0,82. Indeksy podobieństwa genetycznego Dice'a zostały wykorzystane w analizie skupień przeprowadzonej metodą UPGMA. Tetraploidy o składzie genomowym AACC uległy wspólnej klasteryzacji z heksaploidami AACCDD. Jednocześnie tetraploidy AACC: *A. maroccana* i *A. murphyi* utworzyły oddzielne subklastry. Analizowane genotypy autotetraploidalnego gatunku *A. macrostachya* (CCCC) uformowały najbardziej odseparowaną grupę skupień, co wskazuje na ich największą odmienną genetyczną. Topologia obu skonstruowanych dendrogramów była identyczna i zgodna z przyjętą systematyką rodzaju *Avena* L.

Słowa kluczowe: *Avena* L., podobieństwo genetyczne, RAPD, SSR

Tetraploids of the genus *Avena* L.: *A. maroccana*, *A. murphyi* and *A. macrostachya* were evaluated for genetic similarity and relatedness with the hexaploid species *A. sativa* and *A. sterilis* based on RAPD and SSR polymorphism. Fifteen RAPD primers produced 129 polymorphic DNA fragments and 13 SSR primer pairs amplified 141 products of such type. Polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.58 to 0.80 for RAPD and from 0.71 to 0.92 for SSR. Mean values of PIC for RAPD was 0.67 and for SSR — 0.82. Dice genetic similarity indices were used for cluster analysis with the UPGMA method. The AACC genome tetraploids clustered together with the AACCDD genome hexaploids. Simultaneously, AACC tetraploids: *A. maroccana* and *A. murphyi* were found to form two separate subclusters. The analyzed genotypes of the CCCC autotetraploid *A. macrostachya* formed an outer branch, indicating a major genomic divergence. Topology of both constructed dendrograms was the same and consistent with the *Avena* L. genus systematics.

Key words: *Avena* L., genetic similarity, RAPD, SSR

WSTĘP

Rodzaj *Avena* L. należy do plemienia *Aveneae* Dumort., rodziny *Poaceae* Barnh. (Frey i Rutkowski, 2002). Obejmuje gatunki diploidalne, tetraploidalne i heksaploidalne, o podstawowej liczbie chromosomów równej 7 (Rajhathy i Thomas, 1974). Gatunki tetraploidalne w obrębie rodzaju *Avena* przyporządkowano do czterech sekcji: *Ethiopica*, *Pachycarpa*, *Avenotrichon* oraz *Tenuicarpa* (Zeller, 1998). Do sekcji *Ethiopica* należą gatunki o składzie genomowym AABB: *A. abyssinica* Hochst i *A. vaviloviana* (Malz.) Mordv. Tetraploidy, których skład genomowy opisano jako AACC: *A. maroccana* Gdgr, *A. murphyi* Ladiz. (dawniej *A. magna* Murphy et Terrell) i *A. insularis* Ladiz. tworzą sekcję *Pachycarpa*. Sekcja *Tenuicarpa* obejmuje dwa gatunki AABB: *A. agadiriana* Baum et Fedak oraz *A. barbata* Pott ex Link. Autotetraploid *A. macrostachya* Bal. ex Coss. et Dur., o składzie genomowym CCCC, jest jedynym gatunkiem w sekcji *Avenotrichon* (Zeller, 1998).

Dziki gatunki z rodzaju *Avena* stanowią dużą pulę różnorodności genetycznej dla owsa zwyczajnego, która może być wykorzystana w programach hodowlanych jako źródło pożądanych genów (Loscuto, 2008). Zmienność tych gatunków nie zawsze w równym stopniu jest dostępna dla hodowców, a możliwości jej wykorzystania zależą od nasilenia barier genetycznych. Przekazywanie genów z tetraploidów o składzie genomowym AACC do heksaploidalnych form uprawnych, w przeciwieństwie do ich przenoszenia z gatunków AABB, jest tylko częściowo ograniczone (Leggett, 1996). W związku z tym gatunki AACC mogą zostać wykorzystane w programach hodowlanych. Pentaploidalne mieszańce F₁ otrzymuje się stosunkowo łatwo, lecz są one samosterylne. Poprzez krzyżowania wsteczne można przywrócić im płodność.

Celem pracy było: 1) przeprowadzenie analizy porównawczej tetraploidalnych gatunków z rodzaju *Avena* za pomocą dwóch systemów oceny podobieństwa genetycznego RAPD i SSR, a także 2) określenie podobieństwa trzech gatunków tetraploidalnych: *A. murphyi* Ladiz., *A. maroccana* Gdgr. i *A. macrostachya* Bal. ex Coss. et Dur. do dwóch gatunków heksaploidalnych: *A. sativa* L. i *A. sterilis* L.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 11 form reprezentujących trzy gatunki tetraploidalne: *Avena maroccana* Gdgr. (AVE 2785, AVE 2796, AVE 2847), *A. murphyi* Ladiz. (AVE 2811, AVE 2846, CN 21989) i *A. macrostachya* Bal. ex Coss. et Dur. (IHAR-B₆, IHAR-B₇, IHAR-B_{zw}) oraz dwa gatunki heksaploidalne: *A. sativa* L. (cv. Borowiak) i *A. sterilis* L. (PI 380125). Materiały zostały sprowadzone z banków genów: National Small Grain Collection, Aberdeen w USA, Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon w Kanadzie, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben w Niemczech oraz Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), IHAR w Radzikowie.

Genomowe DNA wyizolowano metodą Milligana (1992) z koleoptyli kilkudniowych siewek w dwóch powtórzeniach dla każdej formy. Amplifikację produktów RAPD

przeprowadzono metodą Williamsa i wsp. (1990), zaś SSR — metodą Ziętkiewicz i wsp. (1994). Rozdziały elektorforetyczne fragmentów RAPD prowadzono w 2% żelu agarozowym z 0,01% EtBr. Produkty amplifikacji uzyskane metodą SSR rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym, a następnie barwiono metodą srebrową. Rozdziały analizowano określając obecność lub brak prążków.

Na podstawie zidentyfikowanego polimorfizmu dla obu metod obliczono współczynniki informacji o polimorfizmie — PIC (polymorphism information content) zgodnie z założeniami Nei (1973). Indeks efektywności metody (AEI — Assay Efficiency Index) oszacowano metodą Pejic’a i wsp. (1998). Podobieństwo genetyczne (SI similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów określono zgodnie z formułą Dice’a (Nei i Li, 1979). Matryce SI uzyskane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami RAPD i SSR posłużyły do konstrukcji dendrogramów metodą UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) przy zastosowaniu programu NTSYS-pc 2.10q (Rohlf, 2001). Obliczono również wartość współczynnika korelacji pomiędzy matrycami SI.

WYNIKI

Do oceny podobieństwa genetycznego 11 form należących do trzech tetra- i dwóch heksaploidalnych gatunków z rodzaju *Avena* L. zastosowano dwa systemy markerowe — RAPD oraz SSR. Obie zastosowane techniki umożliwiły detekcję wysokiego poziomu polimorfizmu (tab. 1). Udział produktów polimorficznych w metodzie RAPD wyniósł 78,7%, zaś w SSR — 83,4%. Efektywność metody wyrażona współczynnikiem AEI, czyli średnią liczbą polimorficznych produktów amplifikowanych przez jeden starter była wyższa w przypadku metody SSR (10,8), aniżeli RAPD (8,6). Wartość współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) określona dla metody RAPD wahała się od 0,58 do 0,80, zaś dla SSR od 0,71 do 0,92. Średnia wartość PIC dla metody SSR była wyższa (0,82), aniżeli dla RAPD (0,67).

Osiem wykorzystanych w badaniach starterów RAPD inicjowało syntezę 9 produktów specyficznych wyłącznie dla pojedynczych genotypów (tab. 1). Z kolei 18 takich fragmentów DNA było amplifikowanych przy udziale 9 par starterów SSR. Obecność 6 specyficznych produktów SSR stwierdzono u *A. sterilis* PI 380125, 5 u *A. sativa* cv. Borowiak, zaś po dwa u *A. maroccana* AVE 2785 oraz AVE 2874. Cztery specyficzne odcinki RAPD uległy amplifikacji u *A. maroccana* 2785, zaś 2 u *A. sterilis* PI 380125. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano fragment RAPD (G-01¹⁵²⁰) charakterystyczny dla obu badanych tetraploidów o genomach AACC (*A. maroccana* i *A. murphyi*), a także stwierdzono obecność odcinków specyficznych zarówno dla badanych tetraploidów AACC, jak i heksaploidów, które nie były amplifikowane u *A. macrostachya*. Fragmenty A-16²⁰⁵⁰ oraz W-02⁴⁰⁰ uległy amplifikacji u wszystkich analizowanych form *A. macrostachya*. Nie stwierdzono obecności produktów SSR charakterystycznych dla poszczególnych grup genotypów.

Tabela 1

Charakterystyka polimorfizmu identyfikowanego metodami RAPD i SSR
Characteristics of polymorphism identified by the RAPD and SSR methods

Starter RAPD RAPD primer	Liczba produktów Products number			PIC	Para starterów SSR SSR primer pairs	Liczba produktów Products number			PIC
	całkowita total	polimorficz- nych polymorphic	specyficz- nych specific			całkowita total	polimor- ficznych polymorphic	specyficz- nych specific	
A-10	13	8	0	0,62					
A-16	9	8	0	0,62	GDM-33	6	3	0	0,71
D-11	13	9	0	0,64	GDM-93	11	8	2	0,88
G-01	10	8	2	0,65	HVM-40	17	13	2	0,92
G-02	14	12	1	0,80	WMC-27	14	8	3	0,82
M-02	7	5	1	0,74	WMS-129	19	17	4	0,88
M-07	6	5	0	0,69	WMS-191	11	10	1	0,82
P-06	9	6	0	0,68	WMS-234	11	11	0	0,77
T-02	13	10	0	0,69	WMS-512	10	10	2	0,84
T-02B	9	6	1	0,77	WMS-515	17	16	1	0,76
U-295	14	12	0	0,64	WMS-550	9	9	0	0,84
U-534	11	10	1	0,58	WMS-595	9	7	1	0,88
U-535	12	11	1	0,61	WMS-614	16	13	2	0,80
U-600	11	9	1	0,66	WMS-666	18	16	0	0,77
W-02	12	10	1	0,63					
Suma Total	163	129	9	—	Suma Total	168	141	18	—
Średnio na starter Average per primer	10,87	8,6	0,6	0,67	Średnio na starter Average per primer	12,9	10,8	1,4	0,82

Wartości indeksów podobieństwa uzyskane w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą SSR były bardzo zróżnicowane (0,13–0,98), co wynikało głównie z dużej odmienności genotypów reprezentujących gatunek *A. macrostachya* od pozostałych form (tab. 2). Silna separacja tych tetraploidów była widoczna również przy wykorzystaniu metody RAPD. Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a uzyskane w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą RAPD zawierały się jednak w zdecydowanie węższym przedziale (0,60–0,92). Średnie podobieństwo obiektów oszacowane na podstawie wyników uzyskanych tą metodą wyniosło 0,71. Średnia wartość podobieństwa obliczona na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą SSR była znacznie niższa (0,50) i wskazywała na większą różnorodność analizowanego materiału.

Tabela 2

Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a oszacowane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami RAPD i SSR
Values of Dice genetic similarity indices estimated based on polymorphism identified by the RAPD and SSR methods

Metoda Method	Średnia wartość indeksów podobieństwa Mean values of genetic similarity indices	Zakres wartości indeksów podobieństwa genetycznego Range of genetic similarity indices values
RAPD	0,71	0,60–0,92
SSR	0,50	0,13–0,98

W oparciu o polimorfizm identyfikowany obydwoma metodami określono również średnie podobieństwo wewnątrzgatunkowe analizowanych obiektów (tab. 3). Niezależnie od zastosowanej metody najmniejszym zróżnicowaniem charakteryzowały się formy reprezentujące gatunek *A. murphyi*, zaś największym — *A. maroccana*.

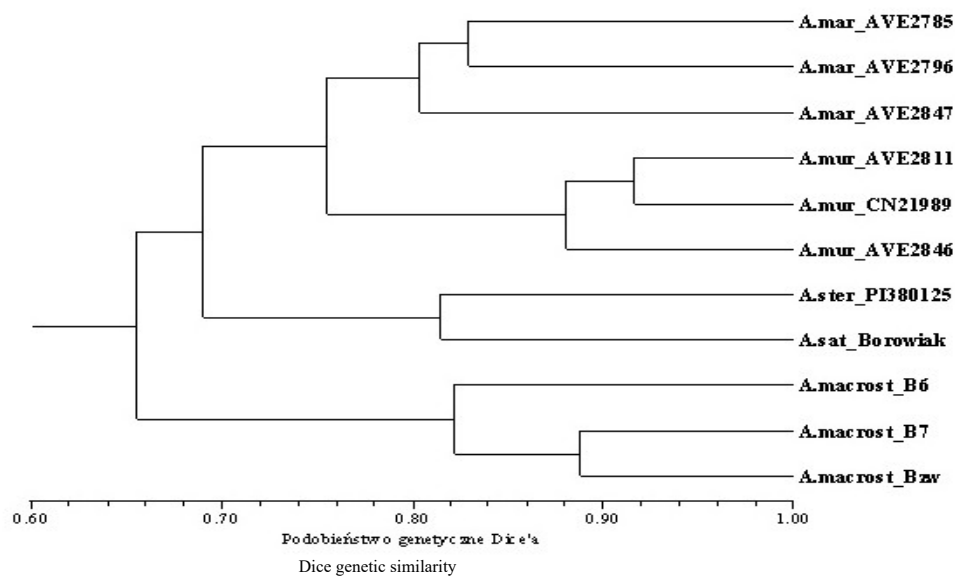
Tabela 3

Średnie wartości wewnątrzgatunkowego i międzygatunkowego podobieństwa genetycznego oszacowane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami RAPD i SSR
Mean values of intraspecific and interspecific genetic similarity estimated based on polymorphism identified by the RAPD and SSR methods

Gatunek Species	<i>A. maroccana</i>	<i>A. murphyi</i>	<i>A. macrostachya</i>	<i>A. sativa</i>	<i>A. sterilis</i>
<i>A. maroccana</i>	0,81 ^{RAPD} 0,90 ^{SSR}				
<i>A. murphyi</i>	0,76 ^{RAPD} 0,74 ^{SSR}	0,89 ^{RAPD} 0,98 ^{SSR}			
<i>A. macrostachya</i>	0,65 ^{RAPD} 0,14 ^{SSR}	0,65 ^{RAPD} 0,16 ^{SSR}	0,84 ^{RAPD} 0,92 ^{SSR}		
<i>A. sativa</i>	0,71 ^{RAPD} 0,63 ^{SSR}	0,66 ^{RAPD} 0,71 ^{SSR}	0,67 ^{RAPD} 0,14 ^{SSR}	nb	
<i>A. sterilis</i>	0,70 ^{RAPD} 0,65 ^{SSR}	0,69 ^{RAPD} 0,69 ^{SSR}	0,65 ^{RAPD} 0,13 ^{SSR}	0,81 ^{RAPD} 0,84 ^{SSR}	nb

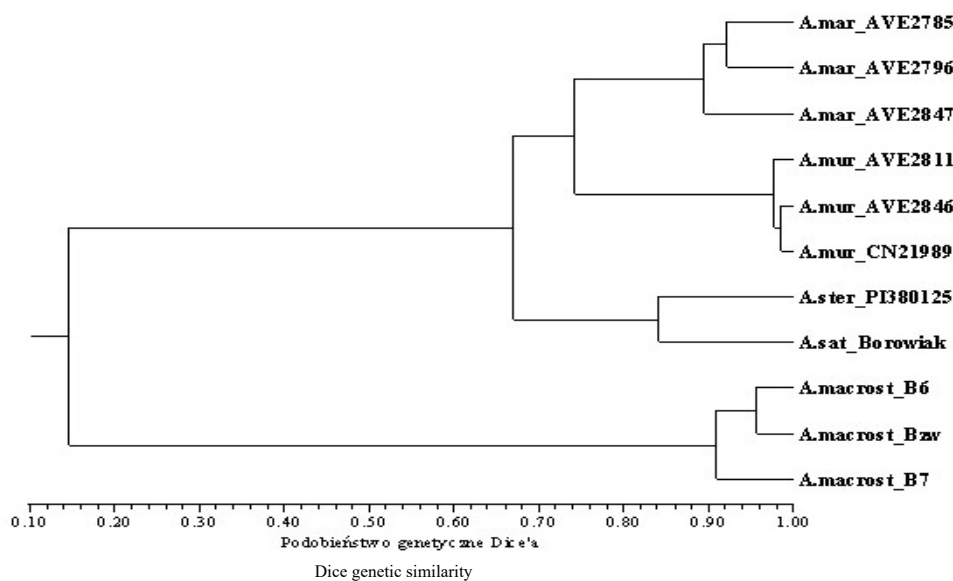
Najwyższe wartości indeksów podobieństwa międzygatunkowego odnotowano pomiędzy heksaploidami *A. sativa* i *A. sterilis* — 0,81 w metodzie RAPD oraz 0,84 w metodzie SSR (tab. 3). Na podstawie wyników uzyskanych metodą RAPD można stwierdzić, że oba heksaploidy charakteryzują się większym podobieństwem genetycznym do *A. maroccana*, aniżeli do *A. murphyi*. Jednakże wyniki analizy sekwencji mikrosatelitarnych wskazują przeciwnie — na większe podobieństwo heksaploidów do *A. murphyi*. Niezależnie od zastosowanej metody oceny polimorfizmu, podobieństwo tetraploidów AACC względem siebie było wyższe, aniżeli względem heksaploidów. Jednakże analizy prowadzone metodą SSR wskazywały na większy dystans pomiędzy tymi gatunkami, aniżeli RAPD. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu obu metod wykazały dużą odrębność genotypów *A. macrostachya* od pozostałych gatunków. Podobieństwo między *A. macrostachya* a tetraploidami i heksaploidami zawierało się w przedziałach 0,65–0,67 (RAPD) oraz 0,13–0,16 (SSR).

Stwierdzono wysoką, istotną statystycznie korelację pomiędzy macierzami indeksów podobieństwa genetycznego uzyskanymi w oparciu o polimorfizm identyfikowany za pomocą obu systemów markerowych (0,81). Znalazło to swoje odzwierciedlenie w niemal identycznej topologii dendrogramów (rys. 1 i 2). Na obu dendrogramach formy przynależące do poszczególnych gatunków utworzyły oddzielne subklastry. Wspólnej klasteryzacji uległy tetraploidy AACC, czyli *A. maroccana* i *A. murphyi*. Osobną grupę skupień utworzyły heksaploidy, ale usytuowały się one blisko tetraploidów AACC.



Rys. 1. Dendrogram skonstruowany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą RAPD

Fig. 1. UPGMA dendrogram constructed based on polymorphism identified with the RAPD method



Rys. 2. Dendrogram skonstruowany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą SSR

Fig. 2. UPGMA dendrogram constructed based on polymorphism identified with the SSR method

Formy *A. macrostachya* na obu dendrogramach utworzyły klaster najbardziej odległy od pozostałych genotypów, co odzwierciedla ich niewielkie podobieństwo genetyczne do pozostałych analizowanych gatunków. Topologia uzyskanych dendrogramów jest zgodna z ogólnie przyjętą systematyką gatunków z rodzaju *Avena*.

DYSKUSJA

Większość gatunków w obrębie rodzaju *Avena* L. to formy dzikie, wśród uprawnych największe znaczenie ekonomiczne mają: owies zwyczajny (*Avena sativa* L.), owies czerwony (*Avena byzantina* C. Koch), w mniejszym stopniu owies szorstki (*Avena strigosa* Schreb.). Owies zwyczajny jest klasycznym przykładem gatunku uprawnego o bardzo wąskiej puli genów. Poszerzenie zmienności genetycznej odmian może być uzyskane poprzez wprowadzenie pożądaných genów z pokrewnych, dzikich gatunków (Frey, 1986). Dostępność tej zmienności zależy od stopnia nasilenia barier genetycznych.

Poznanie genetycznego pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi gatunkami na różnych poziomach ploidalności jest podstawowym warunkiem efektywnego dobierania komponentów rodzicielskich do krzyżowań w celu uzyskania płodnych i stabilnych cytologicznie mieszańców międzygatunkowych, które charakteryzowałyby się pożądanymi cechami i mogły stanowić materiał wyjściowy do uzyskania nowych odmian (Stalker, 1980; Frey, 1986). Im większy jest dystans genetyczny pomiędzy krzyżowanymi gatunkami, tym większe trudności w otrzymaniu płodnego mieszańcowego potomstwa (Thomas, 1992). Podobieństwo genetyczne pomiędzy gatunkami lub w ich obrębie może być szacowane przy wykorzystaniu systemów markerów molekularnych identyfikujących polimorfizm DNA (Sztuba-Solińska, 2005).

Do oceny filogenetycznego pokrewieństwa pomiędzy gatunkami o różnym stopniu ploidalności w obrębie rodzaju *Avena* Nocelli i wsp. (1999) oraz Loskutow i Perchuk (2000) wykorzystali metodę RAPD, zaś Li i wsp. (2000) użyli markerów mikrosatelitarnych — SSR (Li i in., 2000). Podobną analizę dla 18 gatunków przeprowadzili Drossou i wsp. (2004) metodami RAPD i AFLP, zaś Fu i wsp. (2008) za pomocą metody AFLP ocenili relacje pokrewieństwa 25 gatunków z rodzaju *Avena*. Benchacho i wsp. (2002) wykorzystując metodę RAPD oraz izoenzymy analizowali zróżnicowanie 12 ekotypów *A. murphyi*. W badaniach własnych ocenę podobieństwa genetycznego wybranych genotypów reprezentujących 3 gatunki tetraploidalne i 2 heksaploidalne przeprowadzono z zastosowaniem dwóch systemów markerowych: RAPD oraz SSR.

Metodę RAPD wielokrotnie wykorzystano do analizy molekularnej gatunków z rodzaju *Avena* (Penner i in., 1993; Ronald i in., 1996; Fennimore i in., 1999; Chrzastek i in., 2004). Z kolei, zarówno opracowywanie, jak i wykorzystanie markerów SSR u owsa postępuje znacznie wolniej, aniżeli u innych gatunków rolniczych (Li i in., 2000; Holland i in., 2001). Jako pierwsi sekwencje starterów SSR dla owsa opracowali Li i wsp. (2000). Autorzy otrzymali 44 pary starterów, z których 26 (62%) identyfikowało polimorfizm międzygatunkowy, zaś 16 (36%) międzyodmianowy. Pal i wsp. (2002) opracowali kolejne 44 pary starterów mikrosatelitarnych, z których 18 (41%) identyfikowało polimorfizm międzygatunkowy, zaś 6 (14%) polimorfizm międzyodmianowy. Z uwagi na możliwość

wykorzystania do analiz starterów SSR, zaprojektowanych dla spokrewnionych rodzajów (Li i in., 2000), w badaniach własnych zastosowano 13 par starterów SSR opracowanych dla jęczmienia i pszenicy.

Efektywność metody wyrażona współczynnikiem AEI, czyli średnią liczbą polimorficznych produktów amplifikowanych przez jeden starter była wyższa w przypadku metody SSR (10,8) niż RAPD (8,6). Również średnia wartość PIC dla metody SSR była wyższa (0,82), aniżeli dla RAPD (0,67). Wskazuje to, że SSR jest bardziej efektywna w analizie podobieństwa wewnątrz- i międzygatunkowego, aniżeli metoda RAPD i jest zgodne z wynikami innych autorów (Powell i in., 1996; Pejic i in., 1998).

Polimorfizm uzyskany za pomocą technik RAPD oraz SSR posłużył do utworzenia matryc indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a. Wartość współczynnika korelacji pomiędzy matrycami była wysoka (0,81) i statystycznie istotna. W oparciu o matryce SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA. Na obu dendrogramach można wyodrębnić trzy grupy skupień obejmujące odpowiednio: tetraploidy o genomach AACC, heksaploidy oraz genotypy *A. macrostachya*. Topologia uzyskanych dendrogramów jest zgodna z ogólnie przyjętą systematyką gatunków z rodzaju *Avena* zaproponowaną m.in. przez Zellera (1998). Odrębność gatunku *A. macrostachya* obserwowana niezależnie od zastosowanej metody oceny polimorfizmu, potwierdza obecność wielu różnic między przedstawicielami tego gatunku a pozostałymi gatunkami z rodzaju *Avena* L.

W oparciu o wyniki analiz cytologicznych mieszańców międzygatunkowych *A. sativa* z *A. maroccana*, *A. murphyi* i *A. insularis* Ladizinsky (1999) uważa, że tetraploidy z tej grupy brały udział w ewolucji heksaploidów. Przeprowadzone przez Jellena i wsp. (1993) różnicowe barwienie chromosomów wykazało, że tetraploidy o składzie genomowym AACC brały udział w formowaniu heksaploidów, zaś *A. sterilis* jest przodkiem pozostałych heksaploidów. Wyniki uzyskane w badaniach własnych potwierdziły wysokie podobieństwo genetyczne tetraploidów *A. maroccana* i *A. murphyi* do heksaploidów, nie pozwoliły jednak na jednoznaczne stwierdzenie, który z tetraploidalnych gatunków o genomach AACC jest bliższy heksaploidom. Otrzymane wyniki nie wykazały większego podobieństwa któregośkolwiek z tetraploidów do *A. sativa* bądź *A. sterilis*. Nie stwierdzono również większego podobieństwa któregośkolwiek z analizowanych gatunków do *A. macrostachya*, a tym samym nie wytypowano najlepszego partnera do krzyżowań.

WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki wskazują na duże podobieństwo genetyczne heksaploidów AACDD do tetraploidów AACC. Zróżnicowane wartości indeksów podobieństwa genetycznego oszacowane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami RAPD i SSR nie pozwalają jednak na jednoznaczne stwierdzenie, który z tetraploidalnych gatunków o genomach AACC jest bliższy heksaploidom.
2. Niezależnie od zastosowanej metody oceny polimorfizmu DNA najmniejsze podobieństwo do wszystkich pozostałych form wykazały genotypy *A. macrostachya*.
3. Metody RAPD oraz SSR umożliwiły identyfikację wysokiego poziomu polimorfizmu, a wysoka korelacja między matrycami indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a

wskazuje, iż mogą być one stosowane niezależnie w analizie podobieństwa genetycznego w obrębie rodzaju *Avena*. Ze względu na większą efektywność metodą z wyboru powinna być SSR.

LITERATURA

- Benchacho M., Guma R., Perez de la Vega M., Garcia P. 2002. The genetic structure of tetraploid *Avena*: a comparison of isozyme and RAPD markers. *Cellular & Molecular Biology Letters*. Vol. 7: 465 — 469.
- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Miazga D. 2004. Charakterystyka cytologiczna i molekularna niektórych gatunków z rodzaju *Avena* L. Rozprawy i monografie. „Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych”. Poznań: 67 — 74.
- Drossou A., Katsioti A., Leggett J. M., Lukas M., Tsakas S. 2004. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 48 — 54.
- Fennimore S. A., Nyquist W. E., Shaner G. E., Doerge R. W., Foley M. E. 1999. A genetic model and molecular markers for wild oat (*Avena fatua* L.) seed dormancy. *Theor. Appl. Genet.* 99: 711 — 718.
- Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding. In: Lawes D. A., Thomas H. (ed.). *Proc. of the 2nd Int. Oat Conf.* 1985, Aberystwyth, UK: 9 — 15.
- Frey L., Rutkowski L. 2002. Wykaz gatunków (suplement 3). W: L. Frey (red.), *Polska księga traw*. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Kraków: 87 — 95.
- Fu Y. B., Williams D. J. 2008. AFLP variation in 25 *Avena* species. *Theor. Appl. Genet.* 117: 333 — 342.
- Holland J. B., Helland S. J., Sharopova N., Rhyne D. C. 2001. Polymorphism of PCR — based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome* 44: 1065 — 1076.
- Jellen E. N., Phillips R. L. 1993. C-banded cariotypes and polymorphisms in hexaploid oat accessions (*Avena* ssp.) using Wright’s stain. *Genome* 36: 1129 — 1137.
- Ladizinsky G. 1999. Cytogenetic relationships between *A. insularis* (2n=28) and both *A. strigosa* (2n=14) and *A. murphyi* (2n=28). *Genet. Res. and Crop Evol.* 46: 501 — 504.
- Leggett J. M. 1996. Using and conserving *Avena* genetic resources. *Proc. of 5th International Oat Conference*: 128 — 132.
- Li C. D., Rossmagel B. G., Scoles G. J. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1259 — 1268.
- Loscutov I. G. 2008. On evolutionary pathways of *Avena* species. *Genet Res. Crop Evol.* 55: 211 — 220.
- Loskutov I. G., Perchuk I. N. 2000. Evaluation of interspecific diversity in *Avena* genus by RAPD analysis. *Oat Newslett* 46.
- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: *Molecular analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK: 59 — 88.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 3321 — 3323.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Nocelli E., Giovannini T., Bioni M., Alicchio R. 1999. RFLP- and RAPD-based genetic relationships of seven diploid species of *Avena* with the A genome. *Genome* 42: 950 — 959.
- Pal N., Sandhu J. S., Dormier L. L., Kolb F. L. 2002. Development and characterization of microsatellite and RFLP — derived PCR markers in oat. *Crop Sci.* 42: 912 — 918.
- Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplik V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 248 — 255.
- Penner G. A., Chong J., Levesque-Lemay M., Molnar S. J., Fedak G. 1993. Identification of RADP marker linked to the oat stem rust gene Pg3. *Theor. Appl. Genet.* 85: 702 — 705.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225 — 238.

- Rajhathy T., Thomas H. 1974. Cytogenetics of oats (*Avena* L.). Misc. Publ. Genet. Soc., Ottawa, ON.
- Rohlf F. J. 2001. NTSYS — pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N. Y.
- Ronald P. S., Penner G. A., Brown P. D. 1996. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling hull content in oat (*Avena sativa* L.). Proc. Of V Int. Oat. Conf. 93: 292 — 294.
- Stalker H. T. 1980. Utilization of wild species for crop improvement. Advances in Agronomy No. 33: 111 — 147.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54 (2–3): 227 — 239.
- Thomas H. 1992. Cytogenetics of *Avena*. In: Oat science and technology. Ed.: H. G. Marshall, J. Sorrells. American Society of Agronomy. Agronomy Monograph No. 33, Madison, Wis., USA: 473 — 507.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primes are useful as genetic markers. Nucl. Acid. Res. 18: 6531 — 6535.
- Zeller F. J. 1998. Nutzung des genetischen Potentials der *Avena* - Wildarten zur Verbesserung des Saathafers (*Avena sativa* L.). Journal of Applied Botany 72: 180 — 185.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176 — 183.

EDYTA PACZOS-GRZĘDA**KATARZYNA KRUK****SYLWIA OKOŃ**Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego *Avena fatua* L. w oparciu o polimorfizm DNA

Assessment of *Avena fatua* L. intraspecific genetic similarity based on DNA polymorphism

W pracy analizowano poziom polimorfizmu DNA oraz podobieństwo genetyczne polskich i zagranicznych ekotypów *Avena fatua* L. za pomocą metod ISSR i REMAP. Dziewiętnaście starterów ISSR oraz 20 par starterów REMAP zostało wykorzystanych do uzyskania profili DNA, a amplifikacji uległo odpowiednio 238 i 468 fragmentów. Wartość współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) określona dla metody ISSR wahała się od 0,52 do 0,81, zaś dla REMAP od 0,46 do 0,99. Średnia wartość PIC dla obu metod była taka sama i wyniosła 0,65. Podobieństwo genetyczne szacowano wykorzystując algorytm Dice'a, a klasteryzację przeprowadzono metodą UPGMA, niezależnie dla obu technik. Korelacja między matrycami indeksów podobieństwa była relatywnie wysoka i wyniosła 0,69. Pomimo dużego podobieństwa w topologii, na dendrogramach uzyskanych w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodami ISSR oraz REMAP obserwowano również pewne różnice. Klasteryzacja nie wykazała zgodności z pochodzeniem geograficznym obiektów. Formy skolekcjonowane w Polsce charakteryzowały się nieznacznie mniejszym zróżnicowaniem, aniżeli formy pochodzące z pozostałych krajów. Wyniki badań wykazały wysokie wewnątrzgatunkowe podobieństwo *Avena fatua*.

Słowa kluczowe: *Avena fatua* L., ISSR, podobieństwo genetyczne, REMAP

The level of DNA polymorphism and genetic similarity of Polish and foreign *Avena fatua* L. ecotypes were studied using the ISSR and REMAP approaches. Nineteen ISSR primers and 20 REMAP primer pairs combinations used for DNA profiling, amplified 238 and 468 fragments, respectively. Polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.52 to 0.81 for ISSR and from 0.46 to 0.99 for REMAP. Mean values of PIC for ISSR and REMAP were the same — 0.65. Genetic similarities were estimated using Dice algorithm and cluster analyses were performed using UPGMA method, independently for the two molecular marker techniques. Data obtained with both techniques were relatively high correlated ($r = 0.69$). Despite of high similarity of dendrograms obtained with ISSR and REMAP methods, some clustering differences were observed. Clustering did not display agreement with geographic region or country of origin. Polish ecotypes showed less diversity than forms originating from the other countries. The results of this study have provided evidence of high intra-species genetic similarity of *Avena fatua*.

Key words: *Avena fatua* L., genetic similarity, ISSR, REMAP

WSTĘP

Owies głuchy (*Avena fatua* L.) pochodzi z Azji, jednak bliższe określenie rejonu jego różnicowania nie jest możliwe (Nalewaja, 1977; Kieć, 2000). Gatunek ten jest charakterystyczny dla strefy klimatu umiarkowanego, ale pojawia się także w warunkach klimatu suchego i półsuchego (Sharma i Van den Born, 1978; Morikawa, 1989). Należy do najgroźniejszych chwastów, szczególnie zbóż jarych (Sharma i Van den Born, 1978; Li i in., 2007). Obserwuje się stałe rozprzestrzenianie tego gatunku na świecie, co wskazuje na jego duży potencjał adaptacyjny (Mengistu i in., 2005).

W Polsce *Avena fatua* pojawia się w uprawach na terenie całego kraju, stale rozszerzając zasięg swego występowania (Skrzyczyńska, 1998; Kieć, 2000). Na produkcję swej suchej masy zużywa około 50% więcej wody, niż choćby pszenica jara. Powoduje to znaczącą obniżkę plonów zbóż, którym towarzyszy w uprawie (Sharma i Van Den Born, 1978; Skrzyczyńska, 1998).

Avena fatua odznacza się dużą zmiennością cech morfologicznych (Darmency i Aujas, 1992). Falkowski i wsp. (1982) wyróżniają 4 jego odmiany botaniczne: var. *fatua*, var. *glabrata* Peterm., var. *intermedia* (Lestib.) Lej. Et Cort. i var. *pilosissima* S. F. Gray. Z kolei Kieć (2000), opierając się na zmienności cech morfologicznych i biochemicznych, proponuje wyodrębnienie dwóch podgatunków: subsp. *fatua* i subsp. *brevipilosa*, a w obrębie każdego z nich pięciu odmian botanicznych.

A. fatua postrzegany jako bardzo agresywny i trudny do zwalczenia chwast, z hodowlanego punktu widzenia stanowi potencjalny rezerwuuar zmienności genetycznej, bardzo pożądanej w hodowli owsa zwyczajnego. Wśród ekotypów *A. fatua* zidentyfikowano geny decydujące o wczesności dojrzewania, odporności na suszę (Rines i in., 1980), szybkim wzroście wegetatywnym (Welch i Leggett, 1997), dorodności ziarniaków, wysokiej zawartości białka i tłuszczu w ziarnie (Frey, 1975), odporności na rdzę koronową i żółtą (Frey, 1986), tolerancji na wirus żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV) (Comeau, 1984), warunkujących karłowatość (Milach i in., 1998; Morikawa i in., 2007), odporność na herbicydy (Cavan i in., 1998) czy długi okres spoczynku ziarniaków (Fennimore i in., 1999). *A. fatua* dotychczas wykorzystywany był w programach hodowlanych w niewielkim zakresie. Jednym z nielicznych przykładów wprowadzenia materiału genetycznego tego dzikiego gatunku do form uprawnych jest przystosowanie do uprawy na obszarach suchych i wyjątkowa wczesność amerykańskich odmian Sierra, Rapida i Montezuma oraz odporność na rdzę koronową cv. Sierra (McMullen i Patterson, 1992).

Zróżnicowanie morfologiczne, bogactwo wartościowych genów i niespotykana zdolność adaptacyjna *A. fatua* pozwalają przypuszczać, że pula genetyczna tego gatunku jest bogata i heterogeniczna. Analizy molekularne, które przeprowadzono dotychczas dla form amerykańskich, chińskich i pakistańskich nie potwierdziły jednak tej hipotezy (Mengistu i in., 2005; Li i in., 2007; Mirza i in., 2007).

Celem pracy było dokonanie:

- oceny genetycznego podobieństwa wewnątrzgatunkowego *Avena fatua* L. w oparciu o polimorfizm DNA identyfikowany metodami ISSR i REMAP,
- analizy porównawczej ekotypów pochodzących z Polski z formami skolekcjonowanymi w różnych rejonach świata (Japonii, Albanii, Etiopii, Grecji, Libii, Rosji i Rumunii).

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 12 ekotypów *Avena fatua* L. (tab. 1) sprowadzonych z banków genów: Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben w Niemczech, Research Institute of Crop Production (RICP), Gene Bank, Praga — Ruzyně w Republice Czeskiej, N. I. Vavilov All- Russian Scientific Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg w Rosji oraz Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Tabela 1

Charakterystyka badanych ekotypów *Avena fatua* L.
Characteristics of the analyzed *Avena fatua* L. ecotypes

Oznaczenie ekotypu Ecotype description	Bank genów Genebank	Kraj pochodzenia Country of origin
AVE 270	IPK	Albania
AVE 438	IPK	Grecja — Greece
AVE 1322	IPK	Etiopia — Ethiopia
AVE 2407	IPK	Libia — Libya
AVE 2804	IPK	Rumunia — Romania
PI 51631	IHAR	Polska — Poland
PI 51633	IHAR	Polska
PI 52190	IHAR	Polska
PI 51601	IHAR	Polska
PI 51635	IHAR	Polska
03C0701476	RICP	Rosja — Russia
1963 VIR	VIR	Japonia — Japan

IPK — Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany

IHAR — Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, IHAR w Radzikowie

RICP — Research Institute of Crop Production, Gene Bank, Ruzyně, Czech Republic

VIR — N. I. Vavilov All- Russian Scientific Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russian

DNA wyizolowano metodą Milligana (1992) z fragmentów 15–20 koleoptyli kilkunastu siewek w dwóch niezależnych powtórzeniach dla każdej formy. Reakcje ISSR przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Ziętkiewicz i wsp. (1994), zaś REMAP zmodyfikowaną metodą Kalendara i wsp. (1999) dla każdej formy w dwóch powtórzeniach z jednoczesną kontrolą negatywną. W metodzie ISSR w skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 µL wchodziły: 1 × bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20) (Fermentas, Litwa); 160 µM każdego dNTP; 5,3 pM startera; 1,3 mM MgCl₂, 0,4 mM spermidyny, 80 ng genomowego DNA; 0,5 U polimerazy DNA *Taq* (Fermentas, Litwa). Stosowano następujący profil termiczny: 95°C 2'30"; 6 × (94°C 45", 58°C< -0.5°C/cykl> 45", 72°C 45"); 32 × (94°C 45", 55°C 45", 72°C 45"); 72°C 10'. W metodzie REMAP mieszanina reakcyjna o objętości 15 µl składała się z: 1 × bufor do PCR

(10 mM Tris pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 200 μ M każdego dNTP, 3 pM startera Foreward i Reverse, 2,2 mM MgCl₂, 0,4 mM spermidyny, 60 ng genomowego DNA, 1U polimerazy DNA *Taq* (Fermentas, Litwa). Profil termiczny reakcji amplifikacji był następujący: 95°C 4'; 38 × (94°C 45'', 55°C 45'', 72°C 45''); 72°C 10'. Elektroforetyczny rozdział produktów PCR prowadzono w 2,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE przez 2,5 h przy napięciu 120 V. Zdjęcia rozdziałów analizowano określając obecność lub brak prążków.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie — PIC (polymorphism information content) zgodnie z założeniami Nei (1973). Podobieństwo genetyczne (SI — similarity index) szacowano pomiędzy parami wszystkich badanych obiektów zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). Matryce SI uzyskane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami ISSR oraz REMAP posłużyły do konstrukcji dendrogramów metodą UPGMA przy zastosowaniu programu NTSYS-pc (Rohlf, 2001). Obliczono współczynnik korelacji pomiędzy matrycami indeksów podobieństwa.

WYNIKI

Reakcje amplifikacji DNA przeprowadzono z 19 starterami ISSR oraz 20 parami starterów REMAP. Całkowita liczba uzyskanych produktów ISSR wyniosła 238, z których 106 (44,5%) było polimorficznych (tab. 2).

Tabela 2

Porównanie polimorfizmu identyfikowanego metodami ISSR i REMAP
Comparison of polymorphism identified by the ISSR and REMAP methods

Porównywany parametr Comparative parameter	ISSR	REMAP
Liczba użytych starterów — Number of primers used	19	20
Całkowita liczba produktów — Total number of products	238	468
Liczba produktów polimorficznych — Number of polymorphic products	106	208
Udział produktów polimorficznych — Contribution of polymorphic products (%)	44,5	44,4
Średnia liczba produktów / starter — Mean number of products per primer	12,5	23,4
Średnia liczba produktów polimorficznych / starter — Mean number of polymorphic products per primer	5,6	10,4
Liczba produktów specyficznych — Number of specific products	13	18
Średnia wartość PIC — Mean PIC value	0,65	0,65
Całkowita liczba profili — Total number of profiles	131	200
Średnia liczba profili / starter — Mean number of profiles per primer	6,9	10,0

Amplifikacji metodą REMAP uległo 468 fragmentów, w tym 208 (44,4%) polimorficznych. Średnio każdy starter ISSR uczestniczył w syntezie 5,6 polimorficznych fragmentów DNA, a para starterów REMAP inicjowała amplifikację 10,4 takich odcinków. Wartość współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) określona dla metody ISSR wahała się od 0,52 do 0,81, zaś dla REMAP od 0,46 do 0,99. Średnia wartość PIC dla obu metod była taka sama i wyniosła 0,65. Zidentyfikowano 10 specyficznych produktów ISSR oraz 20 REMAP. Większość z nich była charakterystyczna dla ekotypu AVE 270.

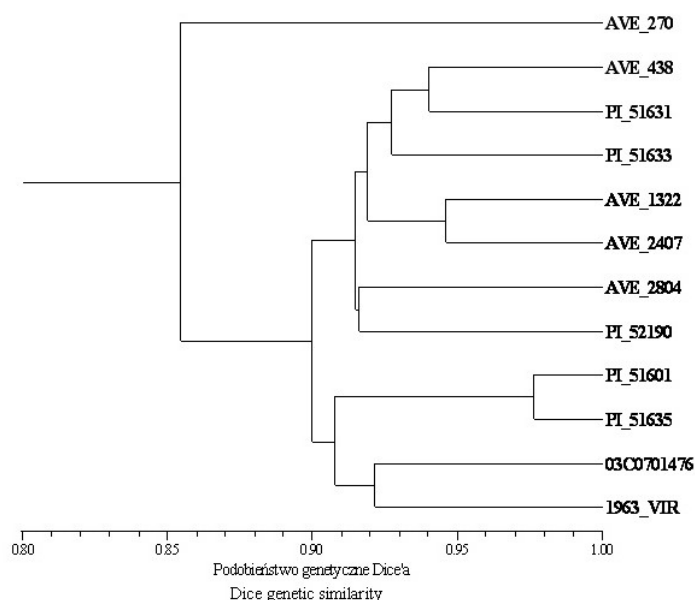
Liczba wszystkich profili prążków, czyli liczba kombinacji fragmentów DNA uzyskiwanych dla poszczególnych obiektów przy udziale starterów ISSR wyniosła 131, zaś REMAP — 200. Uzyskane profile umożliwiły identyfikację wszystkich badanych form.

Wyniki badań polimorfizmu metodami ISSR i REMAP stanowiły podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a. Wartości indeksów uzyskane dla obu metod były bardzo zbliżone (tab. 3).

Tabela 3

Średnie wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a oszacowane na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodami ISSR i REMAP
Mean values of Dice genetic similarity indices estimated based on polymorphism identified by the ISSR and REMAP methods

Metoda Method	Średnia wartość indeksów podobieństwa Dice'a Mean values of Dice genetic similarity indices			Zakres wartości indeksów podobieństwa genetycznego Range of genetic similarity indices values
	Polska — Poland	świat — world	razem — total	
ISSR	0,91	0,89	0,90	0,84–0,98
REMAP	0,91	0,89	0,90	0,85–0,96

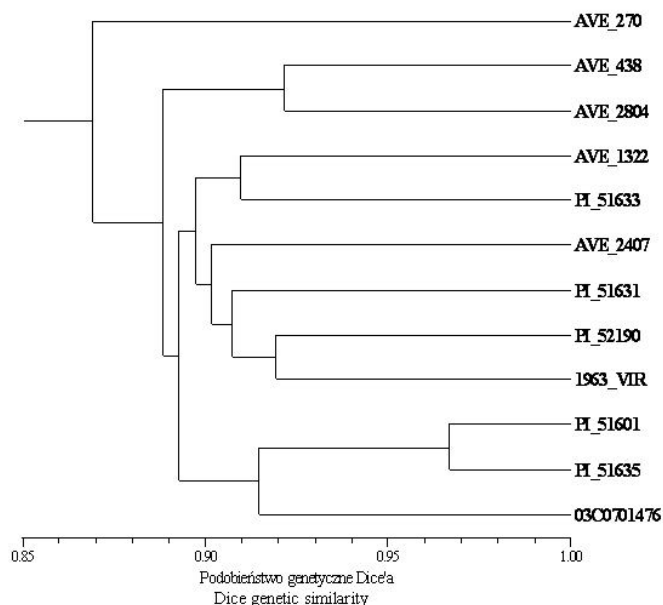


Rys. 1. Dendrogram analizowanych ekotypów *A. fatua* L. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą ISSR

Fig. 1. UPGMA dendrogram of the analysed *A. fatua* L. ecotypes based on polymorphism identified by the ISSR method

Wartości indeksów określone na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą REMAP zawierały się w przedziale 0,85–0,96, zaś metodą ISSR 0,84–0,98, średnio 0,90

niezależnie dla każdej z metod. Współczynnik korelacji maczyr indeksów podobieństwa był statystycznie istotny i wyniósł 0,69. Wysokie podobieństwo genetyczne analizowanych form *A. fatua* wskazuje na ich małą różnorodność. Podobieństwo genetyczne obiektów skolekcjonowanych w Polsce było nieznacznie większe, aniżeli form pochodzących z innych rejonów świata. Niezależnie od zastosowanej metody oceny polimorfizmu DNA topologia uzyskanych dendrogramów była podobna (rys. 1 i 2).



Rys. 2. Dendrogram analizowanych ekotypów *A. fatua* L. uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą REMAP

Fig. 2. UPGMA dendrogram of the analysed *A. fatua* L. ecotypes based on polymorphism identified by the REMAP method

Najmniejszym podobieństwem do wszystkich badanych form charakteryzował się AVE 270 pochodzący z Albanii. Usytuował się on na obrzeżach obu dendrogramów. Pozostałe obiekty uformowały dwa klastry. W obrębie pierwszego z nich znalazły się formy: PI 51601, PI 51635 oraz 03C0701476. W tej grupie skupień na dendrogramie skonstruowanym na podstawie polimorfizmu markerów ISSR znalazł się również 1963 VIR. Pozostałe ekotypy utworzyły na obu dendrogramach odrębny klaster, jednakże zaobserwowano dość duże różnice w obrębie subklastrów.

DYSKUSJA

Avena fatua L. jest jednym z siedmiu heksaploidalnych gatunków w obrębie rodzaju *Avena* L. (Zeller, 1998), a jego skład genomowy, podobnie jak u pozostałych heksaploidów opisano jako AACDD (Rajtahy i Thomas, 1974). Spadek zróżnicowania genetycznego

odmian *A. sativa* skłania do poszukiwania zmienności w gatunkach pokrewnych. Najprostszym i budzącym najmniej kontrowersji sposobem poszerzenia zmienności odmian jest wprowadzenie pożądaných genów z gatunków dzikich poprzez krzyżowanie. W obrębie rodzaju *Avena* nie stwierdzono występowania barier krzyżowalności na heksaploidalnym poziomie ploidalności (Leggett, 1992). Uzyskiwane mieszańce są płodne i stabilne cytogenetycznie, a więc możliwy jest transfer genów z gatunków dzikich do form uprawnych (Leggett, 1992; Chrzastek i in., 2003).

A. fatua był zaledwie kilkakrotnie obiektem analiz molekularnych. Cavan i wsp. (1998) wykorzystując metodę RAPD stwierdzili możliwość spontanicznego powstawania mieszańców międzygatunkowych *A. sterilis* × *A. fatua* i wyjaśnili zjawisko rozprzestrzeniania się odporności na herbicydy. Fennimore i wsp. (1999) zidentyfikowali markery RAPD sprzężone z genami warunkującymi długi okres spoczynku ziarniaków u *A. fatua*. Chrzastek i wsp. (2003) stosując tę samą metodę potwierdzili mieszańcowy charakter kombinacji *A. sativa* × *A. fatua*.

Analiza polimorfizmu DNA pozwala na bezpośrednie oszacowanie zróżnicowania genetycznego (Sztuba-Solińska, 2005). Ocenę zmienności genetycznej w obrębie *A. fatua* przeprowadzili Mengistu i wsp. (2005) wykorzystując polimorfizm identyfikowany metodami RAPD i ISSR, zaś Li i wsp. (2007) — metodą SSR. Mengistu i wsp. (2005) analizowali 36 amerykańskich populacji *A. fatua*, skolekcjonowanych w Północnej Dakocie, odpornych i wrażliwych na herbicydy. Średni dystans genetyczny pomiędzy badanymi przez autorów formami wyniósł zaledwie 0,08. Populacje tego gatunku pochodzące z USA oraz sześciu prowincji Chin oceniali Li i wsp. (2007). Uzyskane przez autorów wyniki również wykazały duże podobieństwo badanych form — indeksy podobieństwa przyjmowały wartości od 0,87 do 0,99. W niniejszej pracy w celu określenia zróżnicowania genetycznego *A. fatua* zastosowano metody ISSR i REMAP. Wartości indeksów podobieństwa genetycznego, obliczone niezależnie, na podstawie polimorfizmu identyfikowanego za pomocą obu technik, były zbliżone do uzyskanych w badaniach Mengitsa i wsp. (2005) oraz Li i wsp. (2007). Zarówno wyniki badań własnych, jak i cytowanych wyżej autorów wykazały niewielkie zróżnicowanie genetyczne *A. fatua* na poziomie DNA, co wskazuje na małą różnorodność tego gatunku. Jednocześnie wysokie wewnątrzgatunkowe podobieństwo genetyczne nie odzwierciedla dużych zdolności adaptacyjnych owsa głuchego.

Wartość współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) dla poszczególnych starterów ISSR wynosiła od 0,21 do 0,81, zaś dla par starterów REMAP wahała się od 0,47 do 0,99. Średnia wartość tego indeksu obliczona niezależnie dla każdej z metod była identyczna i wyniosła 0,65. Li i wsp. (2000) stosując zaprojektowane dla owsa startery SSR dla 12 gatunków z rodzaju *Avena* uzyskali średnią wartość PIC 0,57 (0,28–0,79), zaś dla 20 odmian *Avena sativa* 0,51 (0,10–0,85). Metoda analizy polimorfizmu długości sekwencji mikrosatelitarnych (SSR) jest postrzegana jako najbardziej efektywna w detekcji polimorfizmu (Powell i in., 1996). Wyniki uzyskane w badaniach własnych wskazują, że metody ISSR i REMAP identyfikują podobny poziom polimorfizmu, porównywalny z uzyskiwanym w metodzie SSR, jednakże z uwagi na większą wydajność, metodą z wyboru do analizy podobieństwa genetycznego w obrębie *A. fatua* powinna być REMAP.

Na podstawie polimorfizmu DNA identyfikowanego metodami ISSR i REMAP przeprowadzono analizę skupień metodą UPGMA. Skonstruowane dendrogramy różniły się od siebie w niewielkim stopniu. Nie stwierdzono jednakże wspólnej klasteryzacji form pochodzących z podobnych rejonów świata, bądź skolekcjonowanych w jednym banku genów. Mengistu i wsp. (2005) badając zróżnicowanie form owsa głuchego odpornych i wrażliwych na herbicydy wyodrębnili na dendrogramie 10 grup, przy czym 27 z 36 obiektów formowało cztery grupy główne. W trzech klastrach skupiły się formy charakteryzujące się podobnym pochodzeniem i identyczną odpornością na herbicydy. Li i wsp. (2007) analizując podobieństwo genetyczne 7 populacji owsa głuchego pochodzących z Chin i ze Stanów Zjednoczonych, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych w niniejszej pracy, obserwowali na dendrogramie formowanie skupień odpowiadających pochodzeniu badanych form. Autorzy stwierdzili jednak, że obiekty pochodzące z obszarów Chin położonych bliżej siebie wcale nie ulegały silniejszej klasteryzacji, aniżeli formy pochodzące z odległych rejonów kraju.

WNIOSKI

1. Analiza polimorfizmu DNA z zastosowaniem metod ISSR i REMAP wykazała wysokie podobieństwo genetyczne analizowanych form *Avena fatua* L. Formy skolekcjonowane w Polsce charakteryzowały się mniejszym zróżnicowaniem genetycznym, aniżeli pochodzące z innych rejonów świata.
2. Efektywność metody REMAP w detekcji polimorfizmu była niemal dwukrotnie wyższa aniżeli metody ISSR, w związku z tym byłaby ona metodą polecaną do dalszych badań zróżnicowania tego gatunku.

LITERATURA

- Cavan G., Biss P., Moss S. R. 1998. Herbicide resistance and gene flow in wild oats (*Avena fatua* and *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana*). Ann. Appl. Biol. 133: 207 — 217.
- Chrzastek M., Paczos-Grzęda E. 2003. Analiza molekularna i cytologiczna oraz ocena niektórych cech ilościowych mieszańców międzygatunkowych *Avena sativa* L. × *A. fatua* L. Biul. IHAR 230: 387 — 397.
- Comeau A. 1984. Barley yellow dwarf virus resistance in the genus *Avena*. Euphytica 33: 49 — 55.
- Darmency H., Aujas C. 1992. Genetic diversity for competitive and reproductive ability in wild oats (*Avena fatua*). Weed Science 40: 215 — 219.
- Falkowski M., Filipek J., Filipek M., Grzyb S., Kozłowski S., Kukułka I., Rudnicka-Sterna W., Rutkowska B., Suliniowski S. 1982. Trawy polskie. Falkowski M (red.). Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa: 131 — 134.
- Fennimore S. A., Nyquist W. E., Shaner G. E., Doerge R. W., Foley M. E. 1999. A genetic model and molecular markers for wild oat (*Avena fatua* L.) seed dormancy. Theor. Appl. Genet. 99: 711 — 718.
- Frey K. J. 1975. Heritability of groat-protein percentage of hexaploid oats. Crop Sci. 15: 227 — 228.
- Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding. Proc. of II. Int. Oat Conf. Aberystwyth. Dordrecht: 7 — 15.
- Kalendar R., Grob T., Souniemi A., Schulman A. H. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposons based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet. 98: 740 — 711.
- Kieć J. 2000. Zróżnicowanie morfologiczne, ekologiczne i enzymatyczne gatunku *Avena fatua* L. występującego na polach Polski południowo-wschodniej. Rozprawa habilitacyjna. Zesz. Nauk. AR. im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

- Leggett J. M. 1992. Oat science and technology. Agronomy monograph no. 33. American Society of Agron. Crop Sci. Soc. of Amer.: 29 — 52.
- Li C. D., Rossmagel B. G., Scoles G. J. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. Theor. Appl. Genet. 101: 1259 — 1268.
- Li R., Wang S., Duan L., Li Z., Christoffers M. J., Mengistu L. W. 2007. Genetic diversity of wild oat (*Avena fatua*) populations from China and the United States. Weed Sci. 55: 95 — 101.
- McMullen M. S., Patterson F. L. 1992. Oat cultivar development in the USA and Canada. In oat science and technology. Edited by H.G. Marshall and Sorrells. American Society of Agronomy. Agronomy Monograph No. 33, Madison, Wis., USA, 573 — 612.
- Mengistu L. W., Messersmith C. G., Christoffers M. J. 2005. Genetic diversity of herbicide - resistant and susceptible *Avena fatua* populations in North Dakota and Minnesota. Weed Res. 45: 413 — 423.
- Milach S. C. K., Rines H. W., Philips R. L., Stuthman D. D., Morikawa T. 1998. Inheritance of a new dwarfing gene in oat. Crop Sci. 38: 356 — 360.
- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK, 59 — 88.
- Mirza B., Mohammad S., Ahmad M., Fu Y. B. 2007. Genetic diversity in Pakistani populations of *Avena fatua* revealed by seed storage protein polymorphism. Comm. Biomet. and Crop Sci. 2: 41 — 48.
- Morikawa T. 1989. Genetic analysis on dwarfness of wild oats, *Avena fatua*. Jap. J. Genet. 64: 363 — 371.
- Morikawa T., Sumiya M., Kuriyama S. 2007. Transfer of new dwarfing genes from the weed species *Avena fatua* into cultivated oat *A. byzantina*. Plant Breed. 126: 30 — 35.
- Nalewaja J. D. 1977. Wild oats: global gloom. Proc. West. Soc. of Weed Science. Vol. 30: 21 — 32.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321 — 3323.
- Nei M., Li H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76: 5269 — 5273.
- Powell W., Machray G., Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science. 1: 215 — 222.
- Rajhathy T., Thomas H. 1974. Cytogenetics of oats (*Avena* L.). Misc. Publ. Genet. Soc., No. 2. Ottawa, Ontario, Kanada: 5 — 90.
- Rines H. W., Stuthman D. D., Briggie L. W., Youngs V. L., Jedlinski H., Smith D. H., Webster J. A., Rothman P. R. 1980. Collection and evaluation of *Avena fatua* for use in oat improvement. Crop Sci. 20: 63 — 68.
- Rohlf F. J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sharma M. D., Van Den Born W. H. 1978. The biology of Canadian weeds. *Avena fatua* L. Can. J. Plant Sci. 58: 141 — 157.
- Skrzyczyńska J., Pawlonka Z. 1998. Ekspansja owsa głuchego. Now. Rol. 5 (6): 13 — 14.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54: 227 — 239.
- Welch R. W., Leggett J. M. 1997. Nitrogen content, oil content and oil composition of oat cultivars (*Avena sativa*) and wild *Avena* species in relation to nitrogen fertility, yield and partitioning of assimilates. J. Cereal Sci. 26: 105 — 120.
- Zeller F. J. 1998. Nutzung des genetischen Potenzials der *Avena* — Wildarten zur Verbesserung des Saathafters (*Avena sativa* L.). J. Appl. Genet. 72: 180 — 185.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176 — 183.

MARIA CHRZĄSTEK¹

KATARZYNA KRUK

SYLWIA OKOŃ

EMILIA WOJTOWICZ

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin

¹ Katedra Biologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin

Wpływ formy ojcowskiej na żywotność pyłku i niektóre cechy plonotwórcze mieszańców międzygatunkowych *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L.

Effect of male genotype on pollen viability and some yield related traits of interspecific hybrids *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L.

Obiektem badań były mieszańce F₂ owsa zwyczajnego *Avena sativa* L. odm. Borowiak z 6 genotypami dzikiego heksaploidalnego gatunku *Avena sterilis* L. oraz formy rodzicielskie. Określono wpływ genotypu formy ojcowskiej na żywotność pyłku i wybrane cechy plonotwórcze mieszańców. Żywotność pyłku u analizowanych mieszańców wahała się od 91,35% do 99,10% i u większości z nich była niższa w porównaniu z odmianą mateczną. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy mieszańcami i komponentami rodzicielskimi pod względem wymiarów ziaren pyłku. Badane kombinacje mieszańcowe były zróżnicowane pod względem większości cech plonotwórczych. U trzech z nich stwierdzono istotnie krótszą wiechę główną a u wszystkich mniejszą liczbę kłosków niż u odmiany Borowiak. Mieszańce różniły się istotnie pod względem liczby i masy ziarniaków z wiechy. Plon ziarniaków z wiechy i masa tysiąca ziarniaków u wszystkich form mieszańcowych były niższe w porównaniu z mateczną odmianą a średnia płodność kłoska wahała się od 1,68 do 3,12. U wszystkich mieszańców stwierdzono istotnie więcej białka w ziarniakach niż w odmianie matecznej. Zróżnicowanie wśród badanych kombinacji mieszańcowych świadczy o wpływie genotypów ojcowskich *A. sterilis* na analizowane cechy.

Słowa kluczowe: *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., cechy plonotwórcze, mieszańce międzygatunkowe, żywotność pyłku

The hybrids F₂ of the *Avena sativa* L. cv. Borowiak with six genotypes of wild hexaploid species *Avena sterilis* L. and the parental forms were subject of the research. The influence of male genotype on pollen viability and some yield components was estimated. Pollen viability of the analyzed hybrids ranged from 91.35% to 99.10% and for most of them was lower in comparison to the maternal variety. No differences were noted between hybrids and parental components with regard to pollen size. The analyzed hybrids were much differentiated regarding majority of quantitative traits. Three of them formed significantly shorter panicle and all had lower number of spikelets per panicle than the cv.

Borowiak. The significant differences among hybrids were stated regarding number and weight of kernels per main panicle. Yield and weight of 1000 kernels of all hybrids were lower than those of maternal Borowiak variety. Mean spikelet fertility of hybrids ranged from 1.68 to 3.12. Total protein content in hybrid kernels was significantly higher in comparison to the maternal form. Variability among the tested hybrids testify to the influence of male genotypes of *A. sterilis* on the estimated traits.

Key words: *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., yield components, interspecific hybrids, pollen viability

WSTĘP

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) jest gatunkiem heksaploidalnym o składzie genomowym AACCCDD charakteryzującym się bardzo wąską pulą genową. Prace genetyczno-hodowlane mają na celu poszerzenie zmienności genetycznej form uprawnych owsa poprzez transfer pożądaných genów z pokrewnych gatunków dzikich z rodzaju *Avena*. Współczesna hodowla twórcza jest wspomagana przez szereg metod biotechnologicznych, ale wciąż często stosowaną i efektywną metodą przenoszenia korzystnych genów są krzyżowania międzygatunkowe i międzyrodzajowe. Obca zmienność nie zawsze jest dostępna dla hodowców ze względu na silne bariery genetyczne oddzielające formy dzikie od uprawnych (Stalker, 1980; Frey, 1986; Leggett, 1996). Trudności w krzyżowaniu odległych gatunków wynikają głównie z różnego poziomu ploidalności oraz braku homologii gnomów. Z danych literaturowych wynika, że spośród dzikich form heksaploidalnych do krzyżowań międzygatunkowych najczęściej jest wykorzystywany *Avena sterilis* L. (Rajhathy i Thomas, 1974; Loskutov, 2001). Ze względu na jego skład genomowy (AACCCDD), przełamanie barier izolacyjnych podczas krzyżowań nie następuje większych problemów. W obrębie tego gatunku występuje bogactwo form zróżnicowanych pod względem morfologicznym, odporności na choroby, szkodniki i abiotyczne stresy środowiskowe oraz składu chemicznego ziarniaków (Goldman, 1990; Loskutov, 2001). Paczos i in., 2007 badając 14 ekotypów *Avena sterilis* L. przy pomocy markerów RAPD, określiły zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe. Średnie podobieństwo genetyczne badanych form wynosiło 0,614 i wahało się od 0,441 do 0,775. Efektywność krzyżowań międzygatunkowych zależy od wielu czynników, między innymi od trafnego doboru komponentów rodzicielskich. Wszechstronna ocena uzyskanych mieszańców pozwala wyselekcjonować najbardziej przydatne dla hodowli genotypy. Mieszańce oddalone charakteryzują się często obniżoną płodnością roślin powodowaną głównie niską żywotnością pyłku, co może ograniczać ich wykorzystanie w hodowli (Chen i in., 1977). Analiza żywotności i wielkości ziaren pyłku pozwala wnioskować nie tylko o płodności roślin ale także o przyczynach powstawania i funkcjonowania niezredukowanych gamet męskich obserwowanych u niektórych gatunków owsa (Joshi i Howard, 1995; Katsiotis i Forsberg, 1995).

Celem pracy było określenie wpływu genotypu formy ojcowskiej na żywotność pyłku i wybrane cechy plonotwórcze mieszańców międzygatunkowych F₂ *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem pracy były mieszańce F₂ owsa zwyczajnego *A. sativa* L. cv. Borowiak z 6 genotypami dzikiego heksaploidalnego gatunku *Avena sterilis* L. oraz komponenty rodzicielskie. Wszystkie mieszańce uzyskano w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie według podanego niżej schematu:

- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp AVE 941,
- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp AVE 2068,
- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp AVE2532,
- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp CN25748,
- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp PI 287211,
- ♀ — *Avena sativa* cv. Borowiak × ♂ — *Avena sterilis* genotyp PI 380125.

Dzikie formy *Avena sterilis* L. pochodziły z banków genów w Gatersleben (Niemcy), Saskatoon (Kanada) i Beltsville (USA).

Materiały mieszańcowe oraz ziarniaki form rodzicielskich były wysiane punktowo w 2007 roku na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Czesławicach koło Nałęczowa. W fazie pełnego kwitnienia z 5 losowo wybranych roślin każdej formy pobrano pylniki do analizy żywotności i wymiarów pyłku. Analizy cytologiczne wykonywano w preparatach rozmazowych barwionych 2% roztworem acetokarminu. W każdym genotypie testowano około 4000 ziaren pyłku a miarą ich żywotności był stopień wypełnienia cytoplazmą. Jako żywotny traktowano pyłek w którym cytoplazma stanowiła ponad 75% objętości ziarna. Wielkość pyłku określono na podstawie pomiarów długości i szerokości 100 ziaren z każdego genotypu.

W fazie dojrzałości pełnej wybrano losowo po 30 wiech głównych z każdej kombinacji mieszańcowej i form rodzicielskich do laboratoryjnego przerobu. Analizowano długość wiechy i liczbę kłosek, liczbę i masę ziarniaków, płodność kłosa, masę tysiąca ziarniaków. Procentową zawartość białka ogółem w ziarniakach pozbawionych plewki oznaczono metodą Kjeldahla stosując przelicznik 5,7. Do analizy statystycznej wyników wykorzystano test F-Snedecora, a istotność różnic pomiędzy obiektami stwierdzono przy pomocy przedziałów ufności Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analizowane w pracy mieszańce międzygatunkowe *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. były mało zróżnicowane pod względem średniej żywotności pyłku (tab. 1). Wyróżniała się jedynie kombinacja Borowiak × CN 25748, w której żywotność pyłku wynosiła 91,33% i była istotnie niższa w porównaniu z komponentami rodzicielskimi, a także pozostałymi formami mieszańcowymi. W obrębie tej kombinacji obserwowano największe różnice pomiędzy poszczególnymi roślinami, współczynnik zmienności dla analizowanej cechy wynosił 27,93% (tab. 4). Pozostałe mieszańce wytwarzały od 98,04% (Borowiak × AVE 941) do 99,49% (Borowiak × PI 380125) pyłku całkowicie wypełnionego cytoplazmą. Najmniejsze zróżnicowanie międzyosobnicze obserwowano w kombinacji (Borowiak ×

AVE 941), dla której współczynnik zmienności był równy 16,33%. Trzy spośród badanych populacji mieszańcowych wytwarzały nieznacznie więcej żywotnego pyłku niż odpowiednie komponenty rodzicielskie. Średnia żywotność pyłku odmiany Borowiak wynosiła 98,31% natomiast u *A. sterilis* wahała się od 96,82% w genotypie AVE 2532 do 99,00% w AVE 941. Wysoki poziom żywotności pyłku w analizowanych populacjach mieszańcowych nie ogranicza wykorzystania tych materiałów w hodowli owsa. Równie wysoką żywotność pyłku stwierdziła Paczos-Grzęda (2003) u mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowania pięciu odmian owsa zwyczajnego z jednym genotypem *A. sterilis*. Mieszańce *A. sativa* × *A. sterilis* analizowane przez McMullen i wsp. (1982) charakteryzowały się niższą żywotnością pyłku, nie przekraczającą 90%.

Tabela 1

Żywotność i wymiary pyłku mieszańców międzygatunkowych F₂ *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *A. sterilis* L. i form rodzicielskich

Viability and size of pollen grains in the F₂ hybrids *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena. sterilis* L. and the parental forms

Mieszańce Formy rodzicielskie Hybrids Parental forms	Liczba analizo- wanych ziaren pyłku Number of analyzed pollen grains	Pyłek żywotny Viable pollen grains	Pyłek nieżywotny Unviable pollen grains			Wymiary ziaren pyłku Size of pollen grains	
		ziarna całkowicie wypełnione cytoplazmą grains fully filled up with cytoplasm (%)	ziarna częściowo wypełnione cytoplazmą grains partly filled up with cytoplasm (%)	ziarna puste grains empty (%)	razem total (%)	średnia długość mean length (μm)	średnia szerokość mean width (μm)
Avena sativa L. cv. Borowiak × Avena sterilis L.							
cv. Borowiak × AVE 941	4708	98,04	1,65	0,31	1,96	51,16	43,43
cv. Borowiak × AVE 2068	5669	99,10	0,77	0,13	0,90	55,69	48,18
cv. Borowiak × AVE2532	5445	98,18	1,41	0,41	1,82	52,59	45,03
cv. Borowiak × CN 25748	4703	91,35	2,51	6,14	8,65	51,50	46,03
cv. Borowiak × PI 287211	4494	99,03	0,64	0,33	0,97	57,06	50,03
cv. Borowiak × PI 380125	3934	99,49	0,43	0,08	0,51	55,15	48,06
Avena sterilis L.							
AVE 941	4127	99,00	0,76	0,24	1,00	55,94	49,77
AVE 2068	3387	98,21	1,23	0,56	1,79	52,02	45,84
AVE2532	3561	96,82	1,91	1,27	3,18	56,41	51,28
CN 25748	3447	97,99	1,28	0,73	2,01	53,37	48,52
PI 287211	3187	98,36	1,02	0,62	1,64	53,21	45,36
PI 380125	3721	98,09	0,55	1,36	1,91	56,22	48,75
Avena sativa L.							
cv. Borowiak	4016	98,31	0,58	1,11	1,69	53,41	45,20
NIR _{0,05}		1,52	0,92	0,91	—		5,20
LSD _{0,05}							

Pyłek nieżywotny stanowiący u badanych mieszańców średnio 2,47% był prawie w równym stopniu reprezentowany przez ziarna puste i częściowo wypełnione cytoplazmą. Wyróżniał się jedynie mieszaniec Borowiak $\times$ CN 25748, u którego stwierdzono 6,14% ziaren pustych i 2,15% częściowo wypełnionych cytoplazmą. Wśród genotypów ojcowskich obserwowano większy udział ziaren częściowo wypełnionych natomiast w odmianie matecznej było więcej ziaren pustych (tab. 1).

Z badań wielu autorów wynika, że gatunki i odmiany owsa różnią się pod względem wielkości i kształtu ziaren pyłku, a cechy te są skorelowane z poziomem ploidalności. Gatunki heksaploidalne wytwarzają większy pyłek niż tetraploidalne i diploidalne (Gornall, 1977; Chrzastek i in., 2004). Ziarna pyłku owsa mają częściej kształt eliptyczny niż okrągły (Katsiotis i Forsberg, 1995; Chrzastek i in., 2006). Analizowane w pracy mieszańce nie różniły się istotnie ani między sobą ani od form rodzicielskich pod względem średnich wymiarów ziaren pyłku. Największe ziarna pyłku o średnich wymiarach $57,06 \times 50,03 \mu\text{m}$ wytwarzał mieszaniec Borowiak $\times$ PI 287211 (tab. 1).

Tabela 2

Wartości średnie wybranych cech plonotwórczych wiechy głównej mieszańców międzygatunkowych F_2 *Avena sativa* L. cv. Borowiak $\times$ *Avena sterilis* L. i formy matecznej
Mean values of some yield related traits of main panicle in the interspecific hybrids F_2 *Avena sativa* L. cv. Borowiak $\times$ *Avena sterilis* L. and the maternal form

Mieszańce/ Forma mateczna Hybrids/ Maternal form	Długość wiechy Panicle length (cm)	Liczba kłosek Numer of spikelets per panicle	Liczba ziarniaków z wiechy Numer of kernels per panicle	Masa ziarniaków z wiechy Weight of kernels per panicle (g)	Płodność kłoska Fertility of spikelet	Masa 1000 ziarniaków 1000 kernels weight (g)
<i>Avena sativa</i> L. cv. Borowiak $\times$ <i>Avena sterilis</i> L.						
cv. Borowiak $\times$ AVE 941	17,08	17,59	34,32	1,02	1,97	28,97
cv. Borowiak $\times$ AVE 2068	21,59	36,93	64,67	1,76	1,75	27,21
cv. Borowiak $\times$ AVE2532	15,72	20,23	34,50	0,90	1,68	26,07
cv. Borowiak $\times$ CN 25748	20,03	24,13	56,23	1,39	2,52	26,10
cv. Borowiak $\times$ PI 287211	17,13	12,64	31,71	0,95	2,52	30,00
cv. Borowiak $\times$ PI 380125	19,07	16,40	50,77	1,51	3,12	29,48
<i>Avena sativa</i> L.						
cv. Borowiak	21,12	60,37	121,43	4,38	2,01	36,16
NIR _{0,05}	2,57	8,71	19,27	0,56	0,36	4,32
LSD _{0,05}						

Podczas selekcji pożądanych genotypów z populacji mieszańcowych owsa uwzględnia się szereg cech plonotwórczych determinujących wartość użytkową badanych form. Należą do nich między innymi cechy morfologiczne wiechy. Według Nity (1999) nowoczesna odmiana owsa powinna charakteryzować się stosunkowo krótkim pędem, a równocześnie długą wiechą z dużą liczbą kłosek. Badania Kolba i Marshalla (1984) wskazują na istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy tymi cechami oraz sprzężenia determinujących je genów. Z badań Milacha i wsp. (2002) wynika, że długość wiechy jest uwarunkowana w dużym stopniu przez geny karłowatości *Dw6*, *Dw7* i *Dw8*. U badanych w pracy mieszańców *Avena sativa* L. $\times$ *Avena sterilis* L. długość wiechy głównej wahała

się od 15,72 cm (Borowiak × AVE 2532) do 21,59 cm (Borowiak × AVE 2068). Największą zmienność międzyosobniczą obserwowano w kombinacji Borowiak × AVE 941 natomiast najbardziej wyrównane pod względem analizowanej cechy były rośliny mieszańcowe uzyskane z krzyżowania Borowiak × PI 287211 (tab. 4). Wszystkie formy mieszańcowe z wyjątkiem kombinacji Borowiak × AVE 2068 charakteryzowały się krótszą wiechą niż odmiana mateczna (tab. 2). Istotne różnice pod względem tej cechy dotyczyły mieszańców odmiany Borowiak z genotypami AVE 941, AVE 2532 i PI 287211. Według Petr i Frey (1966) z długością wiechy skorelowana jest liczba kłosek. Podobną zależność obserwowano w analizowanych w pracy mieszańcach odmiany Borowiak z sześcioma genotypami *Avena sterilis* L. Liczba kłosek w wieszce głównej mieszańców wahała się od 12,64 do 36,93, natomiast u odmiany Borowiak wynosiła średnio 60,37. W obrębie analizowanych kombinacji mieszańcowych obserwowano duże różnice pomiędzy poszczególnymi roślinami. Współczynnik zmienności dla tej cechy wahał się od 29,83% (Borowiak × PI 287211) do 56,19% (Borowiak × AVE 941) (tab. 4).

Tabela 3

Zawartość białka ogółem w ziarniakach pozbawionych plewki u mieszańców *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L. i form rodzicielskich
Total protein content in kernels without glumelle in the *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. hybrids and the parental forms

L.p. No.	Mieszańce/ Formy rodzicielskie Hybrids/ Parental forms	Zawartość białka ogółem w ziarniakach Total protein content in kernels (%)
<i>Avena sativa</i> L. × <i>Avena sterilis</i> L.		
1.	cv. Borowiak × AVE 941	19,73
2.	cv. Borowiak × AVE 2068	18,36
3.	cv. Borowiak × AVE2532	19,06
4.	cv. Borowiak × CN 25748	20,43
5.	cv. Borowiak × PI 287211	20,02
6.	cv. Borowiak × PI 380125	21,07
<i>Avena sativa</i> L.		
1.	cv. Borowiak	15,30
<i>Avena sterilis</i> L.		
1.	AVE 941	20,73
2.	AVE 2068	20,63
3.	AVE2532	25,01
4.	CN 25748	24,15
5.	PI 287211	27,50
6.	PI 380125	24,34
NIR _{0,05}		1,36
LSD _{0,05}		

Plenność rośliny zbożowej zależy głównie od liczby i masy ziarniaków z kłosa bądź wiechy. Odziedziczalność tych cech oszacowana przez Samsona (1971) na podstawie analizy trzech pokoleń mieszańców międzyodmianowych owsa wahała się od 0,48 do 0,65 dla liczby ziarniaków i od 0,55 do 0,72 dla masy ziarniaków. Analizowane w pracy populacje mieszańcowe *A. sativa* × *A. sterilis* były mało zróżnicowane pod względem średniej liczby ziarniaków w wieszce głównej, przy czym wszystkie zawiązywały ich istotnie mniej niż odmiana mateczna (121,43). Obserwowano natomiast duże zróżnico-

wanie pod względem tej cechy w obrębie poszczególnych kombinacji mieszańcowych, współczynnik zmienności zawierał się w przedziale od 30,31 do 53,07%. Średnia masa ziarniaków z wiechy głównej badanych form mieszańcowych była istotnie niższa w porównaniu z odmianą Borowiak (4,38 g). Stwierdzono również istotne różnice pod względem analizowanej cechy pomiędzy badanymi kombinacjami mieszańcowymi. Pozytywnie wyróżniał się mieszaniec Borowiak × AVE 2068, u którego średnia masa ziarniaków z wiechy wynosiła 1,76 g. Istotnie niższą wartością tej cechy charakteryzowały się kombinacje Borowiak × AVE 2532 (0,90 g), Borowiak × PI 287211 (0,95 g) i Borowiak × AVE 941 (91,02 g). W populacjach mieszańcowych Borowiak × AVE 2532 i Borowiak × AVE 941 obserwowano duże zróżnicowanie międzyosobnicze zarówno pod względem liczby jak i masy ziarniaków z wiechy. Współczynniki zmienności dla tych cech przekraczały 50% (tab. 4).

Tabela 4

Współczynniki zmienności dla żywotności pyłku i niektórych cech plonotwórczych mieszańców międzygatunkowych F₂ *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L.
Coefficients of variability for pollen viability and some yield related traits in the interspecific hybrids F₂ *Avena sativa* L. cv. Borowiak × *Avena sterilis* L.

Mieszańce Hybrids	Współczynnik zmienności Coefficients of variability (%)					
	żywotność pyłku pollen viability (%)	liczba kłosek number of spikelets per panicle	liczba ziarniaków z wiechy number of kernels per panicle	masa ziarniaków z wiechy weight of kernels per panicle (g)	plodność kłoska fertility of spikelet	masa 1000 ziarniaków 1000 kernels weight (g)
cv. Borowiak × AVE 941	16,33	56,19	51,78	55,15	32,35	20,14
cv. Borowiak × AVE 2068	18,01	40,78	47,46	52,84	24,71	25,77
cv. Borowiak × AVE 2532	19,52	41,44	53,07	58,89	29,76	23,44
cv. Borowiak × CN 25748	27,93	42,76	45,21	34,26	19,39	27,73
cv. Borowiak × PI 287211	22,45	29,83	30,31	30,53	14,29	12,23
cv. Borowiak × PI 380125	20,11	36,25	48,98	49,24	10,90	12,54

Plodność kłoska u analizowanych form mieszańcowych wahała się od 1,68 u mieszańca Borowiak × AVE 2532 do 3,12 w kombinacji Borowiak × PI 380125. Trzy mieszańce przewyższały istotnie formę mateczną, u której na kłosek przypadało średnio 2,01 ziarniaków. Największe różnice pomiędzy poszczególnymi roślinami pod względem analizowanej cechy stwierdzono w obrębie populacji mieszańcowej Borowiak × AVE 941, dla której współczynnik zmienności wynosił 32,35%. Najbardziej jednolita pod względem tej cechy była kombinacja Borowiak × PI 380125. Mniej zróżnicowaną plodność kłoska zawierającą się w przedziale od 1,80 do 2,07 obserwowała Paczos-Grzęda (2003) u mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowania pięciu odmian owsa zwyczajnego z

jednym genotypem *A. sterilis*. Według Gąsiorowskiego i Cierniewskiej (1995) optymalna liczba ziarniaków w kłosku nie powinna przekraczać dwóch. Ziarniaki zawiązywane w kwiatach dwurzędowych i trzeciorzędowych najczęściej są gorzej wykształcone i odznaczają się większą zawartością plewki (Palagyi, 1983).

Badane w pracy mieszańce nie różniły się istotnie pod względem masy tysiąca ziarniaków. Wartość tej cechy wahała się od 26,07 do 30,00 g i dla wszystkich kombinacji była istotnie niższa w porównaniu z odmianą Borowiak (36,16). Najmniej od odmiany różniła się kombinacja Borowiak × PI 287211, a największą różnicę zanotowano dla mieszańca Borowiak × AVE 2532. Mniejsze różnice pomiędzy mieszańcami *A. sativa* × *A. sterilis* i formami matecznymi obserwowała Paczos-Grzęda (2003). Współczynniki zmienności dla analizowanych w pracy populacji mieszańcowych zawierały się w przedziale od 12,23% (Borowiak × PI 287211) do 27,73% (Borowiak × CN 25748).

Procentowa zawartość białka w ziarniakach odmian uprawnych owsa waha się od 12% do 15%, natomiast u gatunków dzikich często przekracza 20%. U mieszańców międzygatunkowych cecha ta najczęściej przyjmuje wartości pośrednie i jest stosunkowo nisko odziedziczalna (Frey, 1975). Spośród dzikich gatunków heksaploidalnych najwięcej białka zawierają ziarniaki *Avena sterilis* L. i *Avena fatua* L. (Elliot i in., 1985; Loskutov, 2000). U analizowanych w pracy genotypów *Avena sterilis* L. wartość tej cechy wahała się od 20,63% do 27,50%, natomiast u mieszańców zawierała się w granicach 18,36%–21,07% (tab. 3). Wszystkie analizowane w pracy mieszańce charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością białka w ziarniakach niż odmiana Borowiak (15,30%). Najbardziej od formy matecznej różnił się mieszaniec Borowiak × PI 380125.

WNIOSKI

1. Wykorzystane do krzyżowań genotypy *Avena sterilis* L. poza CN 25748 nie wpływały istotnie na żywotność i wymiary ziaren pyłku u testowanych mieszańców międzygatunkowych. Średnia żywotność pyłku analizowanych mieszańców była wysoka, zatem cecha ta nie ogranicza ich wykorzystania w hodowli.
2. Mieszańce różniły się istotnie od siebie pod względem średnich wartości wszystkich analizowanych cech plonotwórczych z wyjątkiem masy tysiąca ziarniaków. W obrębie poszczególnych kombinacji stwierdzono duże zróżnicowanie międzyosobnicze pod względem liczby kłosków, oraz liczby i masy ziarniaków w wieszce głównej.
3. Wszystkie genotypy *Avena sterilis* L. i kombinacje mieszańcowe przewyższały istotnie odmianę Borowiak pod względem zawartości białka ogółem w ziarniakach pozbawionych plewki. Największa różnica wynosiła 5,77% i dotyczyła mieszańca Borowiak × PI 380125.
4. Spośród badanych form mieszańcowych pod względem większości analizowanych cech pozytywnie wyróżniały się kombinacje Borowiak × AVE 2068, Borowiak × CN 25748 i Borowiak × PI 380125.

LITERATURA

- Chen C., Qualset C. O., Stanford R. H. 1977. Meiotic studies of secondary 42-chromosome triticales. Bot. Bull. Acad. Sinica 18 (2): 89 — 99.
- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Miazga D. 2004. Charakterystyka cytologiczna molekularna niektórych gatunków z rodzaju *Avena*. Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych. Red. Krajewski P., Zwierzykowski Z., Kachlicki P. IGR, PAN, Poznań: 67 — 74.
- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Kruk K. 2006. Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian owsa (*Avena sativa* L.). Acta Agrophysica 8: 319 — 326.
- Elliot A. L., Thro A. M., Frey K. J. 1985. Inheritance of groat-oil content and several other traits in inter- and intra-specific oat mating. Iowa State J. Research, 60: 13 — 24.
- Frey K. J. 1975. Heritability of groat protein percentage of hexaploid oats. Crop Sci. 15: 277 — 279.
- Frey K. J. 1986. Genetic resources and their use in oat breeding. Proc. of the 2nd Int. Oat Conf. 1985, Aberystwyth, U.K.: 9 — 15.
- Gąsiorowski H., Cierniewska A. 1995. Morfologia i anatomia. Owies — chemia i technologia. PWRiL, Poznań: 36 — 46.
- Goodman M. 1990. Genetic and germplasm stocks worth conserving, The Journal of Heredity, 81 (1): 11 — 16.
- Gornall R. J. 1977. Notes on the size and exine ornamentation of *Avena* pollen grains. Can. J. Bot. 55: 2622 — 2629.
- Joshi A. B., Howard H. W. 1995. Meiotic irregularities in hexaploid oats. J. Agric. Sci. 45: 380 — 387.
- Katsiotis A., Forsberg R. A. 1995. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. Euphytica 83: 103 — 108.
- Kolb F. L., Marshall H. G. 1984. Peduncle elongation in dwarf and normal height oats. Crop Sci. 24: 699 — 703.
- Leggett J. M. 1996. Using and conserving *Avena* genetic resources. Proc. of 5th Int. Oat Conf., Canada: 128 — 132.
- Loskutov I. G. 2000. Some quality groat characters in oat wild species. Proc. 6th Int. Oat Confer., Lincoln Univ., N. Z.: 248 — 253.
- McMullen M. S., Phillips R. L., Stuthman D. D. 1982. Meiotic irregularities in *Avena sativa* L. × *A. sterilis* L. hybrids and breeding implications. Crop Sci. 22: 890 — 897.
- Milach S. C. K., Rines H. W., Phillips R. L. 2002. Plant height components and gibberellic acid response of oat dwarf lines. Crop Sci. 42: 1147 — 1154.
- Nita Z. T. 1999. Stan aktualny i nowe kierunki hodowli owsa w Polsce. Żywność. Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności:6 (supl.1):186 — 192.
- Paczos-Grzęda E. 2003. Charakterystyka niektórych cech ilościowych mieszańców międzygatunkowych heksaploidalnego owsa *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. oraz form wyjściowych. Biul. IHAR 229: 33 — 41.
- Paczos-Grzęda E., Chrząstek M., Wacko S., Miazga D. 2007. Ocena podobieństwa genetycznego wybranych form *Avena sterilis* L. pochodzących z Izraela, Syrii i Libanu. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. Z. 517: 559 — 567.
- Petr F. C., Frey K. J. 1966. Genotypic correlations, dominance and heritability of quantitative characters in oats. Crop Sci. 6: 259 — 262.
- Palagyi A. 1983. Tertiary seed proportions in the grain yield of several oat varieties. Cereal Res. Comm. 11: 269 — 274.
- Sampson D. R. 1971. Additive and nonadditive genetic variances and genotypic correlations for yield and other traits in oats. Can. J. Genet. Cytol. 13: 864 — 872.
- Stalker H.T. 1980. Utilization of wild species for crop improvement. Advances in Agronomy 33: 111 — 147.

ANNA SKRZYPIK
ROMAN PRAŻAK
MARIA CHRZĄSTEK

Katedra Biologii Roślin, Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena tolerancyjności na glin siewek mieszańców BC₁ (*Avena sativa* L. × *Avena fatua* L.) × *Avena sativa* L.

Evaluation of seedling tolerance to aluminum in BC₁ hybrids of (*Avena sativa* L. × *Avena fatua* L.) × *Avena sativa* L.

W rodzaju *Avena* L. występuje duże zróżnicowanie międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe pod względem tolerancyjności na toksyczne stężenia jonów glinu. Celem pracy była ocena tolerancyjności na glin 8 rodów mieszańcowych BC₁ (*Avena sativa* L. × *Avena fatua* L.) × *Avena sativa* L. oraz ich komponentów rodzicielskich. Nasiona badanych form kielkowano na bibule filtracyjnej w szalkach Petriego uzupełnionych roztworem wodnym glinu w stężeniach: 0 (kontrola) i 40 mg dm⁻³, w środowisku zakwaszonym (pH 4,2). Badano wpływ jonów glinu na kiełkowanie nasion oraz na maksymalną długość systemu korzeniowego, liczbę korzeni i maksymalną długość liści 10-dniowych siewek. Na podstawie pomiarów długości systemu korzeniowego wyznaczono indeks tolerancji glinu (I_T) według zmodyfikowanego testu Wilkinsa. Z przeprowadzonych badań wynika, że glin silnie ograniczał wzrost korzeni siewek, przyczyniając się do zwiększenia ich liczby oraz nieco słabiej wpływał na wzrost liści. Nie odnotowano istotnego wpływu badanego stężenia glinu na energię i zdolność kiełkowania nasion. Najwyższą tolerancyjnością na toksyczne stężenie jonów glinu wykazał się jeden z genotypów rodzicielskich owsa głuchego *A. fatua* L. nr 73 oraz odmiany owsa siewnego *A. sativa* L. — Kasztan, Kwant, Karol i Farys. Mieszańce charakteryzowały się pośrednim poziomem tolerancyjności. Wśród nich najwyższą tolerancyjnością wyróżnił się mieszaniec Farys × *A. fatua* L. nr 73 × Farys. Najmniej tolerancyjne na glin okazały się genotypy owsa głuchego *A. fatua* L. nr 75, 77, 83 i 84.

Słowa kluczowe: *Avena sativa* L., *Avena fatua* L., rody mieszańcowe, toksyczność glinu, tolerancyjność siewek

Within the genus *Avena* L., a high interspecies and intraspecies variation exists in tolerance of toxic concentrations of aluminum ions. The purpose of the work was evaluation of seedling tolerance to aluminum in eight of (*Avena sativa* L. × *Avena fatua* L.) × *Avena sativa* L. BC₁ hybrid strains. The samples of seeds were germinated on filter paper in Petri dishes moistened with water solution containing Al ions (as AlCl₃×6H₂O) in the concentrations: 0 (control) and 40 mg dm⁻³, in acid environment, pH 4.2. The influence of aluminum on the seed germination and on the maximal length of roots, number of roots and the maximal length of leaves of 10-day seedlings were examined. Index

of tolerance was calculated by means of modified Wilkins test. Aluminum strongly limited growth of seedling roots, caused increase of their number and less influenced growth of the seedlings' leaves. Aluminum ions did not influence seed germination. One of the parental genotypes of *A. fatua* L. nr 73 and the *A. sativa* L. cultivars — Kasztan, Kwant, Karol and Farys showed the highest tolerance. The hybrid strains showed intermediate tolerance level. Among them, the (Farys $\times$ *A. fatua* L. nr 73) $\times$ Farys hybrid showed the highest aluminum tolerance. The least tolerance to aluminum ions was recorded for the *A. fatua* genotypes denoted with the numbers 75, 77, 83 and 84.

Key words: *Avena sativa* L., *Avena fatua* L., hybrid strains, aluminum toxicity, seedlings tolerance

WSTĘP

Rodzaj *Avena* L. obejmuje zarówno gatunki uprawne, jak i dziko rosnące w środowisku naturalnym. Wśród gatunków uprawnych największe znaczenie ma owies zwyczajny (*Avena sativa* L.). Według GUS powierzchnia uprawy owsa w Polsce, w siewie czystym wynosiła w roku 2008 około 550 tys. ha. W rolnictwie polskim owies dostarcza cennego ziarna paszowego, posiada wysoką wartość odżywczą jako pokarm dla ludzi oraz jest cenną rośliną w płodozmianie, szczególnie w warunkach dużego udziału zbóż w strukturze zasiewów (dobrze znosi uprawę po zbożach, a sam jest dość dobrym przedplonem dla innych zbóż). Jest rośliną o stosunkowo niewielkich wymaganiach glebowych i cieplnych. Z uwagi na to, że uprawa owsa na żyznych glebach kompleksów pszennych i pszenno-żytnich jest mało uzasadniona, owies uprawiany jest głównie na słabszych glebach kompleksów żytnich oraz na glebach kompleksu zbożowo-pastewnego. W celu utrzymania wysokiego plonowania owsa na glebach gorszych niezbędna wydaje się wiedza na temat tolerancyjności odmian owsa na kwaśny odczyn środowiska glebowego. Skutki zakwaszenia gleby dotyczą w pierwszej kolejności wzrostu koncentracji jonów Al^{3+} , H^+ , Mn^{2+} , a następnie zmian kierunku procesów i reakcji chemicznych zachodzących w glebie. Na glebach kwaśnych zawierających toksyczne stężenia jonów glinu obserwuje się u roślin niedobór takich pierwiastków jak P, Ca, Mg, K i Mo (Liu i Luan, 2001). Z różnych badań wynika, że rośliny dobrze rozwijają się nawet przy pH ok. 4, jeżeli w roztworze glebowym nie występują jony Al^{3+} , a różna wrażliwość roślin na pH wynika m.in. z różnej ich wrażliwości na toksyczne stężenia jonów glinu (Gorlach i Mazur, 2002). Według Gorlacha i Curyło (1990), ze szkodliwym działaniem jonów H^+ należy się liczyć dopiero przy $pH < 3,0$. Niekorzystny wpływ glinu na rośliny uzewnętrznia się przede wszystkim zmianą wielkości i morfologii systemu korzeniowego (Kinraide, 1991). Rośliny wykształciły różne mechanizmy tolerancyjności na toksyczne stężenia jonów glinu. Ogólnie, mechanizmy te można podzielić na apoplastyczne i symplastyczne. Mechanizmy apoplastyczne są oparte na wydzielaniu kwasów organicznych przez wierzchołki korzeni. Kwasy organiczne tworzą trwałe kompleksy z jonami glinu Al^{3+} . Mechanizmy symplastyczne pozwalają na akumulację i detoksykację glinu wewnątrz komórek (Taylor, 1991). Jednak glin indukuje odkładanie się kalozy w plazmodesmach, ograniczając transport substancji między komórkami w symplaście (Sivaguru i in., 2000). U owsa, żyta i tolerancyjnego na glin pszenżyta apoplastyczny mechanizm tolerancyjności na toksyczne jony glinu oparty jest głównie na wydzielaniu kwasów jabłkowego i cytrynowego. Tolerancyjne na glin odmiany pszenicy zwiększają wydzielanie kwasu jabłkowego (Ma i in., 2001). Wśród zbóż

najbardziej tolerancyjne na glin są żyto, następnie owies, pszenżyto, najmniej pszenica i jęczmień (Nava i in., 2006). Z badań przeprowadzonych w Brazylii wynika, że tolerancyjność na glin u owsa *Avena sativa* L. jest kontrolowana przez jeden lub dwa geny dominujące (Oliveira, 2002). Gatunek ten charakteryzuje się bardzo wąską pulą genową. Potencjalnym źródłem obcej zmienności dla owsa zwyczajnego są gatunki dzikie, m.in. *Avena fatua* L. Dzikie gatunki oraz ich mieszańce F_1 i dalsze pokolenia uzyskane drogą krzyżowań wstecznych stanowią cenny materiał wyjściowy dla hodowli owsa (Chrzastek i in., 2007).

Celem badań była ocena tolerancyjności na glin mieszańców międzygatunkowych wytworzonych w wyniku krzyżowania odmian *Avena sativa* L. z *Avena fatua* L.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono w latach 2008–2009 w Katedrze Biologii Roślin, Wydziału Nauk Rolniczych w Zamościu Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Przedmiotem badań było 8 rodów mieszańcowych BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. Analizie poddano również wszystkie komponenty rodzicielskie biorące udział w powstaniu mieszańców, tj. genotypy owsa głuchego *Avena fatua* L.: nr 73 (AVE 270 GAT), nr 75 (AVE 1322 GAT), nr 76 (AVE 2407 GAT), nr 77 (AVE 2804 GAT), nr 84 (52188 IHAR), nr 83 (51635 IHAR) oraz odmiany owsa siewnego (zwyczajnego) *Avena sativa* L.: Deresz, Farys, German, Hetman, Karol, Kasztan, Kwant (tab. 1). Ziarniaki form rodzicielskich owsa pochodziły z Instytutu Genetyki i Hodowli Roślin w Gatersleben w Niemczech oraz Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie. Mieszańce BC_1 uzyskano z Instytutu Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Nasiona badanych form kielkowano na bibule Whatmana nr 10, w szalkach Petriego (10 nasion na szalkę) uzupełnionych roztworem wodnym glinu (w formie $AlCl_3 \times 6H_2O$) w koncentracjach: 0 (kontrola) i $40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Prażak, 2001). Odczyn roztworów ustalono na poziomie pH 4,2. Od momentu wysiewu do 10 dniowej siewki, kultury prowadzono w termostacie, w temperaturze 25°C . W każdej kombinacji wykonano po trzy powtórzenia. Po 5 i 10 dniach zbadano wpływ glinu na energię i zdolność kiełkowania nasion. Po 10 dniach wykonano pomiary maksymalnej długości systemu korzeniowego i liści siewek oraz oznaczono liczbę korzeni. Na podstawie pomiarów długości systemu korzeniowego wyznaczono indeks tolerancji glinu (I_T) według zmodyfikowanego testu Wilkina (1978):

$$I_T = \frac{\text{średnia długość korzeni roślin traktowanych Al}}{\text{średnia długość korzeni roślin kontrolnych}} \times 100\%$$

Wyniki opracowano statystycznie i przedstawiono w tabeli 1 i na rysunku 1. Kolejność analizowanych form w tabeli i na rysunku jest taka sama. Istotność różnic oceniono za pomocą testu Tukeya przy $p = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach nie odnotowano istotnego wpływu jonów glinu na energię i zdolność kiełkowania nasion owsa. W środowisku zakwaszonym obecność glinu silnie ogranicza rozwój systemu korzeniowego (Foy i in., 1978). Niekorzystny wpływ glinu na system korzeniowy roślin pszenicy, żyta i pszenżyta potwierdziły badania Anioła (1985). W badaniach własnych glin silnie ograniczał wzrost korzeni siewek i nieco słabiej liści (tab. 1, rys. 1). Spośród analizowanych form najwyższą wartością indeksu tolerancji na glin charakteryzował się dziki gatunek *Avena fatua* L. oznaczony numerem 73 ($I_T = 46,6\%$) (tab. 1). W przypadku pozostałych genotypów owsa głuchego *Avena fatua* L. odnotowano niskie wartości indeksu tolerancji na glin ($I_T = 3,4\text{--}14,0\%$).

Tabela 1

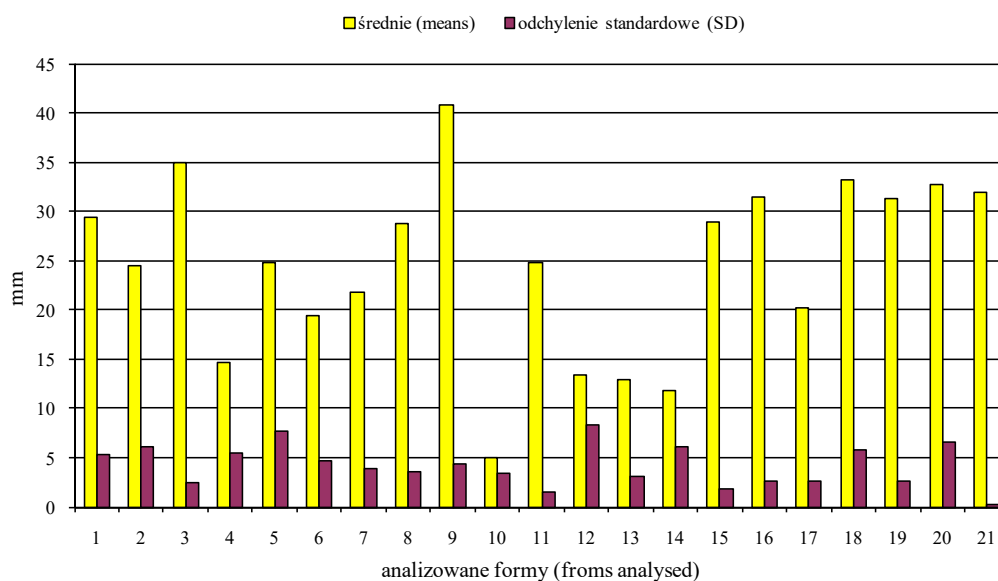
Wpływ glinu na siewki mieszańców BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. oraz ich komponentów rodzicielskich w środowisku zakwaszonym (pH 4,2)
Influence of aluminum on seedlings of BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. hybrids and their parental components in acid environment (pH 4.2)

Analizowane formy Forms analyzed	Długość korzeni (mm) Length of roots (mm)		Długość liści (mm) Length of leaves (mm)		Indeks tolerancji (%) Tolerance index (%)	
	Al (mg dm ⁻³)		Al (mg dm ⁻³)		Al (mg dm ⁻³)	
	0	40	0	40	0	40
1. (Deresz $\times$ <i>A. fatua</i> nr 83) $\times$ Deresz	131,5	29,4*	89,6	61,2*	100,0	22,4
2. (Deresz $\times$ <i>A. fatua</i> nr 84) $\times$ Deresz	109,9	24,4*	76,4	63,6	100,0	26,7
3. (Farys $\times$ <i>A. fatua</i> nr 73) $\times$ Farys	125,5	34,9*	94,0	76,5*	100,0	27,8
4. (German $\times$ <i>A. fatua</i> nr 77) $\times$ German	92,4	14,7*	78,3	67,9	100,0	16,7
5. (Hetman $\times$ <i>A. fatua</i> nr 73) $\times$ Hetman	138,8	24,7*	97,2	91,0	100,0	18,2
6. (Karol $\times$ <i>A. fatua</i> nr 76) $\times$ Karol	131,2	19,4*	87,4	53,8*	100,0	14,9
7. (Kasztan $\times$ <i>A. fatua</i> nr 75) $\times$ Kasztan	143,0	21,7*	90,8	64,4*	100,0	15,2
8. (Kwant $\times$ <i>A. fatua</i> nr 75) $\times$ Kwant	122,3	28,7*	96,4	67,6*	100,0	22,7
9. <i>A. fatua</i> nr 73	87,9	40,8*	73,8	74,4	100,0	46,6
10. <i>A. fatua</i> nr 75	134,0	4,9*	91,4	40,8*	100,0	3,4
11. <i>A. fatua</i> nr 76	112,6	24,7*	95,7	79,8	100,0	25,1
12. <i>A. fatua</i> nr 77	95,7	13,4*	88,1	60,9*	100,0	14,0
13. <i>A. fatua</i> nr 83	120,8	12,9*	105,0	67,5*	100,0	11,7
14. <i>A. fatua</i> nr 84	98,4	11,8*	99,1	64,6*	100,0	11,9
15. Deresz	144,7	28,9*	85,8	69,2*	100,0	20,5
16. Farys	114,2	31,4*	86,5	80,7	100,0	27,5
17. German	122,4	20,2*	92,6	76,4*	100,0	17,6
18. Hetman	156,5	33,2*	102,7	82,2*	100,0	21,4
19. Karol	117,3	33,2*	80,7	66,5	100,0	28,0
20. Kasztan	91,6	32,8*	78,3	81,5	100,0	36,3
21. Kwant	105,5	32,0*	85,4	75,3	100,0	30,8

* Wynik istotnie różny od kontroli (0 mg·dm⁻³ Al)

* Result significantly different in relation to the control (0 mg·dm⁻³ Al)

Rody mieszańcowe BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. charakteryzowały się średnim poziomem tolerancyjności. Wśród nich najwyższą tolerancyjnością wyróżnił się ród Farys $\times$ *A. fatua* L. nr 73 $\times$ Farys ($I_T = 27,8\%$), natomiast najniższą odznaczał się mieszaniec Karol $\times$ *A. fatua* L. nr 76 $\times$ Karol ($I_T = 14,99\%$) (tab. 1). Rody mieszańcowe pszenicy z dzikimi gatunkami *Aegilops* L., badanymi przez Prażaka (2001), również charakteryzowały się średnią tolerancyjnością na glin.



Rys. 1. Wpływ jonów glinu w stężeniu 40 mg dm^{-3} na długość korzeni siewek mieszańców BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. (nr 1-8) oraz ich komponentów rodzicielskich *Avena fatua* L. (nr 9-14) i *Avena sativa* L. (nr 15-21). Przedstawiono wartości średnie i odchylenia standardowe międzygrupowe z 3 powtórzeń

Fig. 1. Influence of aluminum ions in concentration 40 mg dm^{-3} on seedling root length of (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. BC_1 hybrids (no. 1-8) and their parental components *Avena fatua* L. (no. 9-14) and *Avena sativa* L. (no. 15-21). Means and SD of 3 replications are shown

Spośród odmian *Avena sativa* L. najbardziej tolerancyjnymi na glin okazały się Kasztan, Kwant, Karol i Farys ($I_T = 27,5\text{--}36,3\%$). W przypadku pozostałych odmian owsa siewnego (*Avena sativa* L.) wartość indeksu tolerancji wahała się od 21,4% do 17,64% (tab. 1). Wyniki te świadczą o zróżnicowaniu cechy tolerancyjności na glin wśród odmian owsa, o czym informował Bilski (1985). Według Nava i wsp. (2006) różne genotypy owsa *Avena sativa* L. charakteryzują się dużą zmiennością jeżeli chodzi o tolerancyjność na glin. Genotypy $Al_a Al_a$ cechuje tolerancja na glin, natomiast genotypy $al_a al_a$ wykazują się wrażliwością na ten metal. Oliveira i wsp. (2005) oceniając wpływ glinu na odrost korzeni siewek owsa *Avena sativa* L. zidentyfikowali dwa geny tolerancyjności na glin — Al_1 i Al_2 i jeden wrażliwości — al .

Z badań Bilskiego (1985) prowadzonych na owsie i pszenicy wynika, że najwyraźniejsze symptomy toksyczności glinu występują na glebach o pH poniżej 4,5. W przedziale pH 3,8–4,0, przy wzroście zawartości glinu w pożywce z 12 ppm do 16 ppm, autor odnotował największą obniżkę masy korzeni u wszystkich badanych odmian owsa i pszenicy. Przy dalszym obniżaniu pH roztworu szkodliwy wpływ glinu na organizmy roślinne może ulec zmniejszeniu przy jednoczesnym ujawnieniu się oddziaływania jonów wodoru (Kaczor, 1998). Toksyczność glinu u roślin przejawia się głównie zahamowaniem

wzrostu systemu korzeniowego. Korzenie reagują wcześniej na glin ruchomy niż części nadziemne. Na skutek zahamowania ich wzrostu elongacyjnego są one skrócone, zgrubiałe i skręcone. Cały system korzeniowy rośliny staje się słaby i kruchy (Kaczor, 1998). Najwyraźniej symptomy toksycznego wpływu jonów glinu na system korzeniowy uzewnętrzniały się na formach najmniej tolerancyjnych, tj. na genotypach owsa głuchego (*Avena fatua* L.) oznaczonych numerami 77, 84, 83, 75. U genotypów wrażliwych na glin często następowało również zwiększenie liczby korzeni przybyszowych.

Fizjologiczno-biochemiczne przyczyny ujemnego wpływu nadmiernego stężenia glinu na wzrost systemu korzeniowego nie są jednak dokładnie poznane. Mercik i Sas (1998) podają, że pierwotnym miejscem oddziaływania glinu na rośliny jest czapeczka korzeniowa, gdzie wiąże się on z DNA, hamując w ten sposób podziały komórkowe. Ograniczenie wzrostu korzeni jest uważane za podstawową przyczynę ograniczania plonu na glebach kwaśnych (Mercik i Sas, 1998). Efekt toksyczności glinu na częściach nadziemnych roślin jest niespecyficzny i trudny do zidentyfikowania (Wiewióra, 1999). Jony tego metalu są transportowane przez system korzeniowy tylko w niewielkich ilościach. Z tego powodu objawy toksycznego działania glinu są trudne do zauważenia na częściach nadziemnych roślin (Kaczor, 1998).

W badaniach własnych odnotowano mniejsze zahamowanie wzrostu liści siewek na pożywce z glinem, niż to miało miejsce w przypadku korzeni (tab. 1).

Uszkodzenia części nadziemnych roślin mają najczęściej charakter wtórny i wynikają z niedoboru pierwiastków, których pobieranie jest ograniczone w obecności glinu (głównie P, Mg i Ca). Potwierdzają to badania prowadzone przez Filipka i Badorę (1993) na podstawie których ustalono, że choroba fizjologiczna żyta na glebach silnie zakwaszonych uzewnętrzniała się objawami braku magnezu, fosforu i potasu. Jak podają autorzy badań objawy niedoboru Mg i P na roślinach oraz nadmiaru Mn należy ściśle wiązać z silnym zakwaszeniem gleb i wysoką koncentracją glinu ruchomego. Przytoczone dane sugerują, że objawy toksycznego działania glinu na części nadziemne roślin nie są jednoznaczne i specyficzne. Należy jednak wyraźnie podkreślić, że wartości graniczne powyżej których glin bezpośrednio lub pośrednio oddziałuje na rośliny są bardzo płynne (Kaczor, 1998).

Uzyskane wyniki potwierdzają duże zróżnicowanie międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe w rodzaju *Avena* L. pod względem tolerancyjności na toksyczne stężenia jonów glinu.

WNIOSKI

1. W środowisku zakwaszonym (pH 4,2) badane genotypy owsa charakteryzowały się zróżnicowaną reakcją na wysokie stężenie jonów glinu ($40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wśród form uprawnych, dzikich i ich mieszańców występowały genotypy o wysokiej, średniej i niskiej tolerancyjności na toksyczne stężenie jonów glinu.
2. Rody mieszańcowe BC_1 (*Avena sativa* L. $\times$ *Avena fatua* L.) $\times$ *Avena sativa* L. cechowała najczęściej średnia tolerancyjność na glin.

3. Jako źródło tolerancyjności na glin dla odmian uprawnych owsa można wykorzystać jeden z badanych genotypów owsa głuchego (*A. fatua* L. nr 73), który charakteryzował się najwyższą wartością indeksu tolerancji.

LITERATURA

- Anioł A. 1985. Podstawy hodowli roślin odpornych na toksyczne działanie jonów glinu. Biul. IHAR 156: 185 — 194.
- Bilski J. 1985. Metody szybkiej oceny odporności odmian pszenicy i owsa na obniżone pH. Biul. IHAR 156: 13 — 20.
- Chrzastek M., Paczos-Grzęda E., Kruk K. 2007. Efektywność krzyżowań wstecznych mieszańców międzygatunkowych owsa. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 517: 819 — 826.
- Filipek T., Badora A. 1993. Reakcja zbóż na silne zakwaszenie gleb. Roczn. Gleboznawcze XLIV: 47 — 54.
- Foy C. D., Chaney R. L., White M. C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 511 — 566.
- Gorlach E., Curyło T. 1990. Wpływ odczynu gleby na pobieranie potasu. Roczn. Gleboznawcze 41: 117 — 131.
- Gorlach E., Mazur T. 2002. Chemia Rolna. PWN, Warszawa.
- Kaczor A. 1998. Odżywianie się roślin w warunkach gleb silnie zakwaszonych. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 456: 55 — 62.
- Kinraide L. V. 1991. Identify of the rhizotoxic aluminum species. Plant Soil 134: 167 — 178.
- Liu K., Luan S. 2001. Internal aluminum block of plant inward K⁺ channels. Plant Cell 13: 1453 — 1465.
- Ma J. F., Ryan P. R., Delhaize E. 2001. Aluminum tolerance in plants and the complex role of organic acids. Trends in Plant Sci. 6(6): 273 — 278.
- Mercik S., Sas L. 1998. Ujemny wpływ nadmiernego zakwaszenia gleby na rośliny. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 456: 29 — 39.
- Nava I. C., Delatorre C. A., Duarte I. T. de Lima, Teixeira P. M., Federizzi L. C. 2006. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). Euphytica 148/3: 353 — 358.
- Oliveira P. H., de Federizzi L., C., Milach S. C. K., Gotuzzo C., Sawasato J. T. 2005. Inheritance in oat (*Avena sativa* L.) tolerance to soil aluminum toxicity. Crop Breed. and Appl. Biotechnology 5(3): 302 — 309.
- Pražák R. 2001. Ocena tolerancyjności siewek mieszańców *Aegilops ventricosa* Tausch. i *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. z *Triticum durum* Desf. i *Triticum aestivum* L. na toksyczne stężenie jonów glinu. Biul. IHAR 218/219: 161 — 167.
- Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluska F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D., Matsumoto H. 2000. Aluminum-induced 1-3-B-D-Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. Plant Physiol. 2: 991 — 1006.
- Taylor G. J. 1991. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminum resistance. Plant Soil 171: 89 — 103.
- Wiewióra M. 1990. Tolerancyjność polskich odmian i rodów pszenicy jarej na toksyczne działanie glinu. Biul. IHAR 212: 59 — 64.
- Wilkins D. A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. New Phytol. 80: 623 — 633.

ANNA LINKIEWICZ¹MAGDALENA ŻURAWSKA-ZAJFERT¹ZBIGNIEW TADEUSZ DĄBROWSKI²SŁAWOMIR SOWA¹¹ Laboratorium Kontroli GMO, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie² Katedra Entomologii Stosowanej, Wydział Ogrodniczy Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

Ekspresja białka Cry1Ab w odmianach kukurydzy typu MON810 w Polsce — wpływ na organizmy niedocelowe: mszycę zbożową (*Sitobion avenae* F.) i mszycę czeremchowo-zbożową (*Rhopalosiphum padi* L.)*

Cry1Ab expression in MON810 maize varieties in Poland — impact on non-target organisms the grain aphid (*Sitobion avenae* F.) and the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.)

Kukurydza (*Zea mays* L.) MON810 Bt z białkiem Cry1Ab stanowi najbardziej efektywną ochronę przeciwko omacnicy prosowiance (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). Jest ona uprawiana w Polsce od 2007 roku. Odmiany typu MON810 produkują 92 kDa N-terminalny fragment białka Cry1Ab z *Bacillus thuringiensis* (Bt) ssp. *kurstaki* szczep HD1, warunkujący odporność na owady z rzędu Motyle. Jednym z istotnych parametrów określających potencjał do rozwoju odporności populacji szkodników kukurydzy oraz wpływu upraw GM na owady niedocelowe jest poziom ekspresji białka w częściach roślin z którymi wchodzi w kontakt. W odmianach typu MON810 ekspresja białka Cry1Ab powinna mieć charakter konstytutywny ze względu na obecność promotora CaMV35S. Dane wskazują jednak, że zawartość białka w organach roślinnych jest różna. Ilościowy test immunoabsorpcji enzymatycznej (ELISA) został użyty do oznaczenia poziomu białka Cry1Ab w odmianach DKC60-16Bt i DKC3421YG uprawianych w warunkach zamkniętego użycia i w polu. Przedmiotem pracy było określenie poziomu białka Cry1Ab w dwu odmianach kukurydzy z cechą MON810 w Polsce i przeanalizowanie jego akumulacji w wybranych organizmach niedocelowych.

Słowa kluczowe: ekspresja Cry1Ab, MON810, mszyce, ocena ryzyka, organizmy niedocelowe

The transgenic MON810 maize (*Zea mays* L.), expressing Cry1Ab protein and known to have the most effective protection against European corn borer, has been cultivated in Poland since 2007. MON810 cultivars express 92 kDa N-terminal fragment of Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*

*Praca została wykonana przy udziale środków z grantu MNiSW Nr. 1511/P01/2006/31

(Bt) ssp. *kurstaki* strain HD1, assuring protection against *Lepidoptera* insects. Possible unintended effects of the widespread planting of Bt crops (insect resistance, impact on non-target organisms) are related to the expression level of Bt protein. Non-target herbivores and beneficial insects may be affected by direct feeding on the transgenic crop or by interactions in tri-trophic systems. In MON810 plants the Bt protein expression should have constitutive character due to the presence of 35S promoter. However, considerable variations in the expression level of Cry1Ab protein have been reported. A quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to quantify the levels of Cry1Ab protein in DKC60-16Bt and DKC3421YG cultivars grown under greenhouse and field conditions. The tissue-specific expression and cultivation-dependent abundance of Cry1Ab protein were determined. The accumulation of Bt protein in selected non-target organisms is discussed.

Key words: aphids, Cry1Ab expression, MON810, non-target species, risk assessment

WSTĘP

Wraz ze zwiększającym się arealem roślin wykazujących w tkankach ekspresję białka Bt o działaniu insektycydu (grupa białek Cry), coraz częściej dyskutowany jest ich wpływ na ekosystemy, a szczególnie organizmy niedocelowe, które nie są obiektem zwalczania. (Dutton, 2004). Powierzchnia upraw kukurydzy w Polsce zmienia się rokrocznie i wynosiła w 2008 roku około 730000 ha przy czym około 3000 przeznaczonych było na kukurydzę z cechą MON810 (dane wg Polskiego Związku Producentów Kukurydzy). Równocześnie gwałtownie rosną straty powodowane przez szkodniki, w tym omacnicę prosowiankę, która uszkadza nawet do 40% roślin kukurydzy na polach Polski południowej (Lisowicz, 2003). Ze względu na coraz większy problem, jakim staje się żerowanie omacnicy na plantacjach kukurydzy w Polsce, jak też na fakt rozprzestrzeniania się w Polsce innego poważnego szkodnika kukurydzy — zachodniej stonki kukurydzianej (*Diabrotica virgifera* Le Conte) (Lipa, 2004) możemy spodziewać się zwiększonego zainteresowania wprowadzeniem cechy Bt do linii dobrze plonujących w warunkach naszego klimatu. Do tej pory ponad 55 odmian kukurydzy linii z cechą MON810 zostało wpisanych do Wspólnego Katalogu Odmian Gatunków Roślin Rolniczych i może być uprawiane na terenie Unii Europejskiej. Rysuje się coraz większa potrzeba stworzenia narzędzi umożliwiających właściwą ocenę ryzyka środowiskowego oraz metodyki, która pozwoli na właściwy monitoring środowiska przyrodniczego w Polsce (case specific monitoring) z uwzględnieniem zależności troficznych występujących w naszych ekosystemach. Jednocześnie prowadzone są prace nad ujednoliceniem metodyki badań nad niezamierzonym wpływem genetycznie zmodyfikowanych roślin z genem *cry1Ab* na agrocenozy. Wykorzystanie organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) w polskim rolnictwie, w szczególności roślin jest przedmiotem wielu dyskusji co powoduje, że zastosowanie na szeroką skalę GMO w Polsce w bliskiej przyszłości może być utrudnione.

W roku 1996 w USA zarejestrowano pierwsze odmiany zawierające modyfikacje MON810. Od tego czasu kukurydza MON810 uprawiana jest na całym świecie w tym w Unii Europejskiej, gdzie pierwsza rejestracja w celu uwolnienia do środowiska miała miejsce w 1998 roku. Uprawy kukurydzy MON810 na szeroką skalę wywołują pytania odnośnie możliwości pojawienia się odporności w populacjach szkodników (Alstad

i Andow, 1995; Gould, 1998). Również możliwy wpływ kukurydzy MON810 na organizmy niedocelowe takie jak pasożytniki, drapieżcy czy wpływ na ekosystemy glebowe stanowi temat wielu prowadzonych na świecie programów badawczych (Hellmich i in., 2001; Dutton i in., 2003; Romeis i in., 2004; Romeis i in., 2008; Sanvido i in., 2006).

Jednym z istotnych parametrów wymaganych do oceny możliwości rozwoju odporności w populacji owadów docelowych, takich jak omacnica prosowianka, jak też ewentualnego wpływu upraw kukurydzy MON810 na inne ogniwa łańcuchów troficznych związanych z tymi uprawami, jest poziom białka Cry1Ab w organach roślin uprawnych. W odmianach typu MON810 ekspresja białka Cry1Ab powinna mieć charakter konstytutywny, ze względu na obecność genu *cry1Ab* pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora CaMV35S (Maessen, 1997), z enhancerem (E35S). Niewiele jest danych literaturowych mówiących o poziomach ekspresji Cry1Ab w kukurydzy MON810 w zależności od stadium rozwojowego rośliny, tkanki lub organu, warunków uprawy czy warunków klimatycznych (Clark i in., 2005; Nguyen i Jehle, 2008). Zebrane do tej pory dane wskazują, że zawartość białka Cry1Ab w organach kukurydzy może się istotnie różnić między doświadczeniami (laboratoryjnymi i polowymi), zależeć od wieku rośliny i etapu rozwoju rośliny, a aktywność względem owadów docelowych zależeć może od czynników środowiska jak warunki klimatyczne, glebowe (struktura gleby i jej pH), poziomu nawożenia, itp. (Fearing i in., 1997; Bruns i Abel, 2007; Hilbeck i Schmidt, 2006). Jednocześnie dane literaturowe wskazują na preferencyjną lokalizację białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 w komórkach mezofilowych (Dutton, 2004 b). Celem pracy było określenie tkankowo-specyficznego poziomu ekspresji białka Cry1Ab w dwu odmianach genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy z cechą MON810 w warunkach uprawy w Polsce, oraz przedstawienie tych danych w kontekście dotychczasowych informacji na temat ekspresji Cry1Ab w kukurydzy. Równocześnie praca miała na celu określenie ekspozycji na białko z kukurydzy MON810 wybranych organizmów niedocelowych znajdujących się na drugim poziomie łańcucha troficznego.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

Materiał w doświadczeniu stanowiły transgeniczne odmiany kukurydzy DKC60 -16Bt i DKC3421YG pochodzące z linii MON810 firmy Monsanto, z ekspresją białka Cry1Ab o toksycznym działaniu w stosunku do owadów z rzędu motyle (*Lepidoptera*). Kontrolą były izogeniczne, nietransgeniczne linie wyjściowe dla tych odmian DKC60-15 i DKC3420. Rośliny uprawiane były w donicach w szklarni (szklarnie Wydziału Ogrodniczego SGGW, fitotrony IHAR Radzików) lub na polu, w latach 2007 i 2008, zgodnie ze standardowymi warunkami dla kukurydzy. Do oznaczeń białka w materiale roślinnym użyto fragmentów roślin pochodzących z czterech stadiów rozwojowych kukurydzy — stadium 3 liści, stadium 6 liści, stadium kwitnienia, stadium dojrzałej kolby oraz nasion. Do oznaczeń wykorzystano tkanki liści, łodygi, korzeni, kwiatostanów męskich i żeńskich, kolby, pyłku, nasiona oraz całe rośliny w fazie kwitnienia. Do celów prezentowanej pracy dane pochodzące z jednego typu tkanki np. liście, korzenie zostały potraktowane łącznie. Próbk

po zbiorze były oczyszczane z ziemi, krojone a następnie liofilizowane i przetrzymywane do czasu oznaczenia w -20°C. Korzenie przed zamrożeniem były dodatkowo płukane pod bieżącą wodą, a następnie suszone na bibule.

Materiał zwierzęcy

- Owady niedocelowe w doświadczeniach stanowiły:
- mszyca zbożowa (*Sitobion avenae* F.),
- mszyca czeremchowo-zbożowa (*Rhopalosiphum padi* L.).

Kontrolą były owady tego samego gatunku hodowane na izogenicznych odmianach nietransgenicznej kukurydzy. Owady były zebrane z ich naturalnych stanowisk i namnożone w izolatorach w Katedrze Entomologii Stosowanej SGGW lub dostarczone przez firmę Koppert. Po minimum 7 dniach żerowania na kukurydzy owady były zebrane przy użyciu pędzelka do 2,0 ml probówek wirówkowych, zliofilizowane i zamrożone w -20°C do czasu oznaczenia białka.

Oznaczenie Cry1Ab metodą ELISA

Tkanka roślinna była rozcierana na proszek w moździerz, następnie 40 mg tkanki było zawieszane w 1 ml buforu ekstrakcyjnego EB (PBS/0,55% Tween 20) i inkubowane przez 1 h w temperaturze pokojowej. W przypadku tkanek owadzych nie zawsze możliwe było uzyskanie takiej masy próby, dlatego waga każdej próbki była odnotowywana i wykorzystana przy kalkulacji ilości białka. Po inkubacji roztwór był wirowany przez 2 minuty w celu uzyskania względnie klarownego supernatantu. Zawartość białka Cry1Ab oznaczano przy użyciu immunodetekcji testem ELISA QualiPlate Kit (Envirologix, Portland, USA), według załączonego protokołu, z modyfikacją do oznaczenia ilościowego. Próbkę stosowaną do pomiaru była rozcieńczana w buforze ekstrakcyjnym od 10 do 2000 razy w zależności od tkanki. Każdorazowo konieczne było wykonanie próbnych rozcieńczeń tkanki, tak by wartości odczytu mieściły się w obrębie krzywej standardowej. Ekstrakty pochodzące z nietransgenicznych odmian izogenicznych były używane jako kontrole. Jako standardy ilości białka wykorzystano 0,25 ppb, 0,4 ppb, 1 ppb, 4 ppb i 10 ppb białka Cry1Ab z Fitzgerald Industries USA. Dodatkowo stosowano kontrolę pozytywną z zestawu ELISA QualiPlate Kit oraz próbę ślepą, którą stanowił czysty bufor ekstrakcyjny. Absorbancję przy długości fali 450 nm mierzono na spektrofotometrycznej FLUOstar Optima (BMG Labtech) w teście płytkowym. Dane zostały przeanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech). Wyniki są prezentowane jako ilość Cry1Ab wyrażona w mikrogramach Cry1Ab w przeliczeniu na gram suchej masy tkanki [ppm]. Limit detekcji zastosowanej metody (LOD) ELISA określono wykorzystując standardy Cry1Ab i wynosił on 0,20 ppb białka.

Oznaczenie białka ogólnego metodą Bradford

Analizowane tkanki sprawdzano jednocześnie pod kątem ogólnej zawartości białka. W tym celu tkanka w ilości 20 mg była homogenizowana w buforze 1x PBS (0,2M bufor fosforanowy, 1,5M NaCl, pH 7,4). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do supernatantu był dodawany odczynnik Roti®-Quant (Roth, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Jako standard zastosowano rozcieńczenia albuminy bydlęcej (BSA, Fermentas) w stężeniu od 20 µg/ml do 100 µg/ml. Białko ogólne oznaczano metodą Bradford na spektrofotometrycznej FLUOstar Optima przy długości fali

595 nm. Dane zostały zanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech).

Analizy statystyczne

Każda próba w analizie Cry1Ab czy białka ogólnego oznaczana była w dwu powtórzeniach dla każdego rozcieńczenia. Dane zostały wstępnie przeanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech), gdzie wynik był obliczany na podstawie krzywej standardowej. W przypadku oznaczeń białka Cry1Ab wpływ warunków uprawy czy rodzaju odmiany był analizowany osobno dla każdego typu tkanki. Analizy statystyczne przeprowadzono w układzie split-plot przy użyciu programu SAS wersja 8.2. stosując trójkierunkową analizę wariancji. Średnie różnice pomiędzy badanymi czynnikami określono na podstawie testu Tukey-Kramera.

Porównanie par odmian (transgeniczna-izogeniczna) w celu stwierdzenia różnic w ilości białka ogółem między odmianami lub owadami żerującymi na tych odmianach przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta porównania średnich dla populacji o równych wariancjach lub, zależnie od potrzeby, z modyfikacją Satterthwaite'a dla populacji o istotnie różnych wariancjach. Wariancje porównywano testem F.

WYNIKI

Przeprowadzono 214 analiz próbek zawierających tkanki roślinne z odmian genetycznie zmodyfikowanych i 80 prób z odmian kontrolnych pod kątem zawartości białka Cry1Ab. Dodatkowo przeprowadzono oznaczenie Cry1Ab dla 18 prób zawierających mszyce żerujące na odmianach transgenicznych i 18 prób z mszyc odżywiających się na kukurydzy nietransgenicznej, odmianach izogenicznych. Ponieważ celem pracy było przedstawienie szerokiego spektrum akumulacji białka Cry1Ab, prezentowane są wyłącznie uśrednione dane z poszczególnych doświadczeń. Wyniki z kontrolnych, nietransgenicznych odmian izogenicznych służyły jako sprawdzenie poprawności analizy. Zawartość Cry1Ab w izogenicznych kontrolach kształtowały się na poziomie wartości dla próby ślepej, z wyjątkiem roślin, które na podstawie tego oznaczenia zostały określone jako zamieszany materiał i usunięte z dalszych doświadczeń.

Określenie poziomu ekspozycji wybranych gatunków organizmów niedocelowych na działanie toksyny Cry1Ab poprzez ocenę ekspresji białka Bt (Cry1Ab) w transgenicznej kukurydzy MON810

Zawartość białka Bt w kukurydzy odmiany DKC3421YG i DKC6016Bt z podziałem na analizowane tkanki, typy uprawy i lata doświadczeń została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1

Średnie zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy
Mean content of Cry1Ab protein in maize plant

Zawartość białka Cry1Ab (µg/g s.m.) w tkankach roślinnych Content of Cry1Ab protein in plant tissues (µg/g d.m.)							
tkanka tissue	rok year	warunki conditions	odmiana cultivar	liczba obserwacji number of observations	średnia mean	współczynniki wariancji CV	odchylenie standardowe standard deviation
Całe rośliny Entire plants	8	pole field	DKC3421YG	2	270,34	35,07	94,80
				3	361,35	85,52	309,04
			DKC6016Bt	2*	539,75*	1,38*	7,42*
Korzeń Root	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	6	26,08	78,28	20,41
			DKC6016BT	6	1,28	83,65	1,07
	8	pole field	DKC3421YG	2	62,75	5,07	3,18
			DKC6016BT	4	22,57	153,16	34,57
Kwiat męski Male flower	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	2	3,19	21,21	0,98
			DKC6016BT	2	32,65	33,14	10,82
	8	pole field	DKC3421YG	3	35,76	25,46	9,71
			DKC6016BT	3	35,76	25,46	9,71
Liście Leaves	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	10	11,99	61,27	7,35
			DKC3421YG	7	348,95	46,99	163,98
	8	pole field	DKC6016BT	5	220,50	63,01	138,94
			DKC6016BT	6	94,86	21,48	20,37
Młoda kolba Young ear Okrywa kolby Husk	8	pole field	DKC3421YG	2	128,13	10,35	13,26
			DKC3421YG	3	26,81	3,21	0,86
	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	3	0,18	51,23	0,09
			DKC3421YG	5	0,43	34,75	0,15
Pyłek Pollen	8	pole field	DKC6016BT	3	0,34 0,51*	152,31	0,53
			DKC6016BT	2*		120,76*	0,62*
	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	3	0,18	51,23	0,09
			DKC6016BT	3	0,18	51,23	0,09
Młode ziarniaki Young grains	8	pole	DKC3421YG	3	110,67	22,88	25,32
Nasiona Seeds	7	pole	DKC6016Bt	9	14,70	102,04	15,00
	8	field	DKC3421YG	8	20,99	89,15	10,81
Łodyga Stem	7	szklarnia greenhouse	DKC6016Bt	3	2,19	31,59	0,69
			DKC6016Bt	5	3,23	25,89	1,77
	8	pole	DKC3421YG	10	6,35	14,58	10,87

Czcionką pogrubioną zaznaczono współczynniki zmienności świadczące o bardzo dużej zmienności obserwacji.

Z gwiazdką (*) podano dane bez obserwacji skrajnie odstających

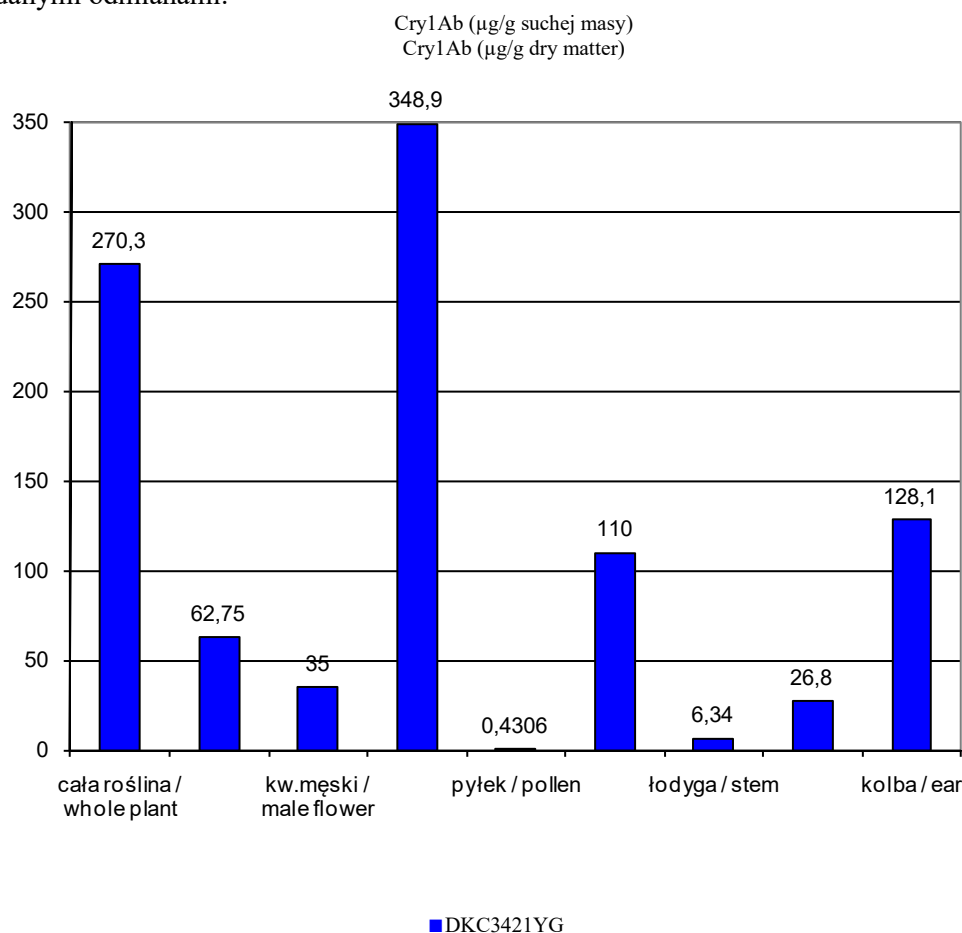
Coefficients of variation indicating the high level of variability among the observations are distinguished by bold characters. An asterisk(*) indicates the data without extreme observations

Porównanie zawartości białka Cry1Ab w odmianach DKC60-16Bt i DKC3421YG

Porównania poziomu białka Cry1Ab pomiędzy odmianami przeprowadzono na podstawie wyników pomiaru w liściach, korzeniach, pyłku oraz całych roślinach w fazie

kwitnienia. Test metodą analizy wariancji (ANOVA) nie wykazał statystycznie istotnych różnic w ekspresji białka Cry1Ab pomiędzy badanymi odmianami, zarówno w warunkach pola jak w warunkach szklarniowych. Obserwowano dużą zmienność w ilości białka Cry1Ab pomiędzy badanymi próbkami.

Analiza zawartości białka ogólnego nie wykazała statystycznie istotnych różnic między badanymi odmianami.



Rys. 1. Średnia zawartość białka Cry1Ab w µg/g suchej masy tkanki w odmianie DKC3421YG w warunkach polowych

Fig. 1. Mean content of Cry1Ab protein in dry matter of plant tissue in the cultivar DKC3421YG under field conditions

Porównanie poziomu Cry1Ab pomiędzy testowanymi rodzajami organów roślinnych

Porównano poziom ekspresji Cry1Ab w tkankach roślinnych. Wykazano istotne statystycznie różnice w poziomie akumulacji białka Cry1Ab ($P = 0,01$) w odniesieniu do testowanych organów, co graficznie przedstawione jest na przykładzie odmiany

DKC3421YG (rys. 1). Najwyższa akumulacja białka dla odmiany DKC3421YG w warunkach polowych miała miejsce w liściach ($348,9 \pm 163,9 \mu\text{g/g s.m.}$), w młodej kolbie ($128,1 \pm 13,2 \mu\text{g/g s.m.}$), młodych ziarniakach ($110 \pm 25,3 \mu\text{g/g s.m.}$) i korzeniu ($62,75 \pm 3,18 \mu\text{g/g s.m.}$). Niższe zawartości Cry1Ab obserwowane były w kwiecie męskim ($35,0 \pm 3,18 \mu\text{g/g s.m.}$), okrywie kolby oraz pręcikowiu ($26,8 \pm 0,86 \mu\text{g/g s.m.}$), łodydze ($6,34 \pm 10,9 \mu\text{g/g s.m.}$), a najmniejsza była w pyłku ($0,43 \pm 0,15 \mu\text{g/g s.m.}$). Podobne zależności obserwowano w odmianie DKC6016Bt. Analiza zawartości białka ogólnego nie wykazała statystycznie istotnych różnic między analogicznymi organami w transgenicznym i izogenicznym odmianach konwencjonalnych.

Porównanie poziomu Cry1Ab w roślinach w zależności od warunków uprawy

Przeprowadzono porównanie ilości Cry1Ab w całych roślinach dla badanych odmian uprawianych w warunkach kontrolowanych (szklarnia i fitotron) oraz w warunkach polowych. Wykazano istotne statystycznie różnice w ilości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 pomiędzy dwoma typami upraw ($P = 0,01$). Dla odmiany DKC6016Bt średnie ilości Cry1Ab potraktowane sumarycznie dla wszystkich badanych tkanek z uprawy polowej były 4,3 razy wyższe niż te obserwowane w szklarni/fitotronie. Wyniki analizy wariancji w połączeniu z wynikiem porównań wielokrotnych Tukeya przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Średnia zawartość białka Cry1Ab w roślinach kukurydzy odmiany DKC6016Bt rosnących w polu i w szklarni

Mean content of Cry1Ab protein in the maize cultivar DKC6016Bt grown under field and greenhouse conditions

Grupowanie Tukey Tukey grouping	Średnia — Mean Cry1Ab [ppm]	Liczba obserwacji Number of observations	Uprawa Conditions
A	87,58	30	pole — field
B	20,48	32	szklarnia — greenhouse

Wykonano wg procedury porównań wielokrotnych Tukeya, $\text{NIR}_{0,05} = 23,978$

Comparison done according to Tukey's multiple comparisons test, $\text{LSD}_{0,05} = 23.978$

Ocena poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na toksyczne działanie białka Cry1Ab poprzez określenie akumulacji tego białka w ich diecie, czyli w organizmach stanowiących pośrednie ogniwo łańcucha pokarmowego (2 gatunki mszyc)

Oznaczenie białka Cry1Ab w mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.) wykonane zostało wyłącznie z doświadczeń w fitotronach. Mszyca ta nie została odnotowana na polach w prowadzonych doświadczeniach, tak w 2007 jak i w 2008 roku. Kilukrotnie próby przeniesienia dorosłych, uzyskanych komercyjnie osobników mszycy na kukurydzę uprawianą w warunkach polowych nie spowodowały założenia kolonii i mszyca ta opuszczała roślinę bądź osobniki ginęły (w przypadku zastosowania siatki ochronnej na liściu). Analiza białka Cry1Ab z owadów utrzymywanych na kukurydzy w warunkach fitotyonu wykazała w tkankach mszycy zbożowej śladowe ilości Cry1Ab — $15,60 \text{ ng/g}$ suchej masy dla DKC6016BT i $7,74 \text{ ng/g}$ suchej masy dla DKC3421YG w warunkach

kontrolowanych. Brak było istotnych statystycznie różnic w ogólnej ilości białka w mszycy na odmianach transgenicznej i konwencjonalnej.

Oznaczenie białka Cry1Ab w mszycy czerwemchowo-zbożowej (*Rhopalosiphum padi* L.) wykonano, zarówno z doświadczeń prowadzonych w szklarni, jak i z kolonii mszyc pojawiających się na polu. Zawartość białka Cry1Ab w tkankach mszycy czerwemchowo-zbożowej zebranej z kukurydzy rosnącej w szklarni była bliska limitu detekcji metody 0,2 ppb Cry1Ab. Dla *R. padi* zebranej z DKC6016Bt rosnącej w polu wyniosła 56,88 ng Cry1Ab/g suchej masy, a dla DKC3421YG 6,25 ng Cry1Ab/g suchej masy.

Poziom białka ogólnego w mszycach żerujących na odmianach Bt i konwencjonalnych nie różnił się istotnie.

DYSKUSJA

Białko Cry1Ab

Toksyna Cry1Ab jest białkiem o działaniu insektycydu produkowanym przez bakterię glebową *Bacillus thuringiensis* (Höfte i Whiteley, 1989; Schnepf i in., 1998). Skrócona forma genu kodującego białko Cry1Ab została wprowadzona metodą transgenezy do roślin kukurydzy w celu otrzymania odmian odpornych na owady z rzędu motyle. Odmiany linii MON810 w ciągu ostatnich 13 lat zostały skomercjalizowane i są uprawiane z podstawowym przeznaczeniem na paszę i produkcję skrobi w wielu krajach, także w Unii Europejskiej.

Określenie poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na działanie toksyny Cry1Ab poprzez ocenę ekspresji białka Bt (Cry1Ab) w transgenicznej kukurydzy MON810

Ocena wpływu odmiany GMO na środowisko powinna uwzględnić dane obejmujące zestawienie poziomu ekspresji produktu transgeny w różnych częściach i tkankach roślinnych. Do oceny wpływu roślin GM na gatunki niedocelowe stawonogów bezpośrednio żerujące na kukurydzy MON810 (rolnice, bielinki *Pieris* spp.) musi być określona ekspozycja danego organizmu na insektycyd zawarty w roślinie. Poziom ekspozycji jest zależny od zwyczajów żywieniowych (feeding behaviour) badanego organizmu oraz poziomu ekspresji białka w poszczególnych częściach rośliny.

Poziom ekspresji białka w roślinie

Podstawową drogą ekspozycji na białko Bt jest bezpośrednia konsumpcja części transgenicznej rośliny. Wartości poziomu ekspresji białka Cry1Ab podawane w literaturze różnią się. Dane na stronach US Environmental Protection Agency (EPA) mówią o średniej wartości 10,34 µg/g Cry1Ab w świeżej masie liści, 0,19–0,32 µg/g w nasionach, 0,05 µg/g w pyłku i 4,65 µg/g w przeliczeniu na całą roślinę. Niewiele jest badań dotyczących zmian w ekspresji białka podczas sezonu wegetacyjnego, w różnych warunkach uprawy i klimatu, na skutek stresu, czy w odniesieniu do danej tkanki roślinnej (Clark i in., 2005). W badaniach Dutton (2004) stwierdzono istotne różnice w ekspresji Cry1Ab roślin w młodym i dojrzałym stadium wzrostu. Młodsze rośliny zawierały dwukrotnie więcej Cry1Ab w tkankach (58 µg/g suchej masy). Ta prawidłowość była tłumaczona niższą ogólną

zawartością białek w roślinach starszych. Wykazano też różnice w ilości białka w pomiędzy trzema typami upraw — polową ($58 \pm 2,8 \mu\text{g/g}$ suchej masy), otwartą szklarnią ($26 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$ suchej masy) i zamkniętą szklarnią ($47 \pm 1,8 \mu\text{g/g}$ suchej masy). Wskazuje się na wpływ na akumulację białka Bt takich czynników jak poziom nawożenia azotowego (Coviella i in., 2000; Bruns i Abel, 2007), jakość gleby (Griffiths i in., 2006), użycie pestycydów oraz stadium rozwojowe rośliny (Griffiths i in., 2006; Nguyen i Jehle, 2007). Znane jest również zjawisko hamowania ekspresji transgeny na skutek wysokiej temperatury (Neumann i in., 1997), choć takie doświadczenia nie są znane w odniesieniu do cechy Bt (Dutton, 2004a). Poziom białka Cry1Ab był również sprawdzany przez organizacje ekologiczne takie jak Greenpeace, gdzie określono dla liści kukurydzy MON810 wartości Cry1Ab od $5,21 \mu\text{g/g}$ do $15,06 \mu\text{g/g}$ świeżej masy (Lorch i Then, 2007). Większość dostępnych danych dotyczy pomiarów Cry w przeliczeniu na świeżą masę tkanki. Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ warunków uprawy na poziom ekspresji białka Bt. Podobnie jak w pracy Dutton (2004 a) wyższe ilości białka w poszczególnych typach tkanek były znajdowane w roślinach z upraw polowych. Jednak fakt tak znaczącego spadku ilości Cry1Ab w kukurydzy uprawianej w warunkach szklarni może być po części tłumaczony niebalansowanym nawożeniem oraz silnym porażeniem roślin przez przędziorki. Bruns i Abel (2007) obserwowali podwyższenie syntezy Cry1Ab w wyniku zwiększenia nawożenia azotowego.

Najsilniejszą ekspresję białka Cry1Ab stwierdzono w liściach MON810 badanych odmian. Pozostaje to w zgodzie z danymi literaturowymi, chociaż wartości obserwowane w liściach z roślin w polu przewyższają od 3,8x do 6,0x wartości dotychczas odnotowywane dla pomiarów wykonanych dla suchej masy tkanki. Kolejną znaczną akumulację białka Bt stwierdzono w kolbach i młodych ziarniakach. W tych organach również ma miejsce żerowanie szkodników jak omacnica, dlatego istotne jest zapewnienie odpowiedniego poziomu ochrony. Niższa ekspresja Cry1Ab była odnotowana w korzeniu i w łodydze, co pokrywa się z doniesieniami Nguyen i Jehle (2007).

W pracy potwierdzono bardzo niski poziom białka Cry1Ab w pyłku kukurydzy MON810. Wydaje się, że niska ekspresja Cry1Ab w pyłku w porównaniu do liści (średnio 295 razy niższej w warunkach szklarni i 739 razy niższej w warunkach polowych) oznacza, że potencjalny wpływ na organizmy niedocelowe, których jedynym pokarmem z kukurydzy jest pyłek, jest nieistotny.

Obserwowane wyniki wskazują na fluktuacje w zawartości białka Cry1Ab pomiędzy badanymi próbkami w ramach analizowanych części roślin (rys.1). Niektóre dane literaturowe mówią o znacznych różnicach pomiędzy próbkami pochodzącymi z kolejnych roślin w tym samym stadium rozwojowym (Nguyen i Jehle, 2007), czy roślin z cechą MON rosnących w łanie. Wysoki współczynnik wariancji charakteryzujący zgromadzone w tej pracy dane potwierdza tę prawidłowość.

Ocena poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na toksyczne działanie białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 poprzez określenie poziomu tego białka w ich diecie.

czyli w organizmach stanowiących pośrednie ogniwo łańcucha pokarmowego (2 gatunki mszyc)

Wybrane do analiz gatunki owadów stanowią pośrednie ogniwo w łańcuchu pokarmowym pomiędzy rośliną a niedocelowymi gatunkami drapieżnymi (biedronką *Adalia bipunctata* i złotookiem *Chrysoperla carnea*). W doświadczeniach był określony poziom akumulacji białka Cry1Ab w organizmie dwu gatunków mszyc *Sitobion avenae* i *Rhopalosiphum padi* na skutek bezpośredniego żerowania na kukurydzy MON810 w warunkach fitotronu/szklarni (2 gatunki) i pola (1 gatunek). Wybrane gatunki mszyc najczęściej występują na kukurydzy w Polsce, przy czym pierwszy jest mszycą jednodomną, która zasiedla zboża zwykle w fazie kłoszenia w warunkach ciepłej i suchej pogody i nie tworzy licznych populacji. Mszyca zbożowa najczęściej przelatuje na kukurydzę w okresie dojrzałości mlecznej. Mszyca czeremchowo-zbożowa to gatunek dwudomny, migrujący z czeremchy na rośliny żywicielskie, między innymi na kukurydzę. Latem zakładają na łodygach i liściach liczne kolonie, w których okresowo powstają letnie formy uskrzydłone odbywające loty dyspersyjne w uprawach. W literaturze można spotkać informacje o preferencyjnym zasiedlaniu przez mszyce odmian kukurydzy Bt (Bt11 i MON810) (Faria i in., 2007; Pons i in., 2005), co nie jest jednoznacznie naukowo wytłumaczone.

W przeprowadzonych doświadczeniach na liniach MON810 stwierdzono śladową obecność białka Cry1Ab w mszycy zbożowej i mszycy czeremchowo-zbożowej, w ilościach poniżej 60 ppb białka, czyli około 6 tysięcy razy niższą niż w liściach kukurydzy. Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na brak pobierania, lub śladowe pobieranie przez mszyce toksycznego białka z rośliny. Wynika to ze sposobu żerowania mszyc, które pobierają sok floemowy nie zawierający białka Cry (Duton, 2004b; Raps i in., 2001). Nie ma tu miejsca akumulacja białka Cry, która mogłaby zagrażać owadom w dalszych etapach łańcucha troficznego. W równolegle przeprowadzonych w Katedrze Entomologii Stosowanej SGGW biotestach pokarmowych nie wykazano też istotnego wpływu linii MON810 na mszyce zbożowe i ich drapieżców —biedronkę *Adalia bipunctata* i złotooka *Chrysoperla carnea* (Lewandowski i Górecka, 2008).

LITERATURA

- Alstad, D. N., Andow D. A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894 — 6.
- Bruns, H. A., Abel C. A. 2007. Effects of nitrogen fertility on Bt endotoxin levels in corn. *Journal of Entomological Science*. 42 (1): 35 — 34.
- Carozzi N. B., Warren G. W., Desai N., Jayne S. M., Lotstein R., Rice D. A., Evola S., Koziel M. G. 1992. Expression of a chimeric CaMV35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 20: 539 — 548.
- Coviella C. E., Morgan D. J. W., Trumble J. T. 2000. Interactions of elevated CO₂ and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants. *Environ. Microbiol.* 29: 781 — 787.
- Dutton A., D'Alessandro M., Romeis J., Bigler F. 2004. Assessing expression of Bt-toxin (Cry1Ab) in transgenic maize under different environmental conditions. In: *GMOs in Integrated Production. Ecological*

- Impact of Genetically Modified Organisms. Editors Romeis J., Bigler F., IOBC/WPRS vol. 27 (3): 49 — 55.
- Dutton A., Obrist L. D., Alessandro M., Diener L., Romeis J., Bigler F. 2004. Tracking Bt-toxin in transgenic maize to assess the risk of non target arthropods. In: *GMOs in Integrated Production. Ecological Impact of Genetically Modified Organisms*. Editors Romeis J., Bigler F., IOBC/WPRS vol. 27 (3): 57 — 63.
- Faria C. A., Wäckers F. L., Pritchard J., Barrett D. A., Turlings, T. C. J. 2007. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteron pests. *PLoS ONE* 2: e600. doi:10.1371/journal.pone.0000600.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology* 43: 701 — 726.
- Griffiths B. S., Caul S., Thompson J., Birch A. N., Scrimgeour C., Cortet J., Foggo A., Hacket C. A., Krogh, P. H. 2006. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *J. Environ. Qual.* 35: 734 — 741.
- Hilbeck A., Schmidt J. E. U., 2006. Another view on Bt proteins — how specific are they and what else might they do? *Biopesticides International* 2: 1 — 50.
- Höfte H., Whiteley H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53 (2): 242 — 55.
- Lipa J. J. 2004. Zachodnia stonka kukurydziana (*Diabrotica virgifera* Le Conte) zagraża Polsce — konieczny monitoring i środki zapobiegawcze. *Postępy w Ochronie Roślin* 44 (1): 197 — 201.
- Lisowicz F. 2003. Narastająca szkodliwość omacnicy prosowianki (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) dla kukurydzy w południowo-wschodniej Polsce. *Prog. Pl. Protection/Post. Ochr. Roślin* 43 (1): 245 — 250.
- Maessen G. D. F. 1997. Genomic stability and stability of expression in genetically modified plants. *Acta. Bot. Neerl.* 46: 3 — 24.
- Neumann K., Droge-Laser W., Kohne S., Broer. I. 1997. Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology*, Vol. 115, 3: 939 — 947.
- Nguyen, H. T., J. A. Jehle 2007. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 820 — 87.
- Pons X., Lumbierres B., Lopez C., Albajes R. 2005. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study *Eur. J. Entomol.* 2005, 102 (1): 73 — 79.
- Raps A., Kehr J., Gugerli P., Moar W. J., Bigler F., Hilbeck A. 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae) for the presence of Cry1Ab , *Molecular Ecology* 10: 525 — 533.
- Romeis J., Bartsch D., Bigler F., Candolfi M. P., Gielkens M. M. C., Hartley S. E., Hellmich R. L., Huesing J. E., Jepson P. C., Layton R., Quemada H., Raybould A., Rose R. I., Schiemann J., Sears M. K., Shelton A. M., Sweet J., Vaituzis Z., Wolt J. D. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology* 26: 203 — 208
- Sanvido O., Stark M., Romeis J., Bigler F. 2006. Ecological impacts of genetically modified crops: experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation, *Agroscope Reckenholz Tänikon Research Station ART, Zurich, Switzerland*.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 775 — 806.
- Tiedje, J.M., Colwell R. K., Grossman Y. L., Hodson R. E., Lenski R. E., Mack R. N., Regal P. J. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298 — 315.

LESZEK DOMAŃSKI**BOGDAN FLIS****HENRYKA JAKUCZUN****EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział Młochów

Ocena postępu hodowlanego pod względem wartości przetwórczej materiałów wyjściowych ziemniaka wytworzonych w latach 1999–2007

Assessment of breeding progress in relation to the processing value of potato parental lines released in 1999–2007

W Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR), Oddział Młochów oceniono cztery grupy materiałów hodowlanych pod względem barwy chipsów, wiodącej cechy ziemniaka przeznaczonego do przetwórstwa na chipsy. Badania skupiły się na: oszacowaniu genotypowej wariancji tej cechy, identyfikacji genotypów z cechą „cold chipping” i linii rodzicielskich z pozytywnymi efektami ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA — general combining ability) dla barwy chipsów bezpośrednio po przechowaniu bulw w niskiej temperaturze (4–5°C), oszacowaniu reakcji na selekcję wyżej wspomnianej cechy w trzech rodzinach wywodzących się z krzyżówek między rodzicami o dobrej jakości chipsów. Wyniki naszych badań wskazują, że postęp hodowlany w programach ukierunkowanych na wytworzenie linii rodzicielskich / odmian z cechą „cold chipping” może być przyspieszony poprzez zastosowanie testów potomstw pod kątem barwy chipsów po przechowaniu bulw w niskich temperaturach. Zastosowanie form rodzicielskich o pozytywnych efektach GCA dla tej cechy zwiększało frekwencję osobników charakteryzujących się jasną barwą chipsów. Wysoki potencjał trzech wytworzonych form rodzicielskich do tworzenia osobników typu „cold chipping” został potwierdzony w próbnym wysiewie przez parametry: σ^2_g (wariancję genetyczną), h^2 (odziedziczalność w szerokim sensie), R (oczekiwany postęp selekcyjny).

Słowa kluczowe: cecha „cold chipping”, zdolność kombinacyjna, ziemniak, reakcja na selekcję

At the Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR), Młochów Research Center, four groups of potato breeding materials were evaluated for the chips colour, a key trait of potatoes dedicated for processing into chips. The research focused on: estimation of genotypic variation for this trait, identification of cold chipping genotypes and parental lines with positive effects of general combining ability (GCA) for chips colour after cold storage of tubers, and estimation of expected responses to selection for chip colour after cold storage (4–5°C) in three families originated from crosses between parents with good chipping quality. The results evidenced that breeding progress in programmes directed to the development of parental lines or cultivars with cold chipping ability may be accelerated by the use of progeny tests for chip colour after cold storage. The use of parental forms with positive GCA effects for this trait increased the frequency of progeny individuals characterized by light chips

colour. A high potential to improve cold chipping ability, found in three released parental lines, was proved in progeny test, by the estimates of: σ^2_g (genetic variance), h^2 (heritability in the broad sense), R (expected response to selection).

Key words: cold chipping, combining ability, potato, selection response

WSTĘP

Wytworzenie nowych odmian ziemniaka i linii rodzicielskich o niskim poziomie cukrów redukujących (CR) po przechowaniu bulw w niskich temperaturach (4–5°C) jest ważnym celem większości programów hodowlanych zarówno w Północnej Ameryce (Thill i Peloquin, 1995; Hayes i Thill, 2002; Sowokinos, 2007), jak i w Europie (Mackay i in., 1997; Putz, 1999; Domański i in., 2004 a). Tego typu odmiany pozwalają na przechowywanie bulw w niższych temperaturach, co z kolei:

- (1) redukuje straty stałych substancji poprzez transpirację i straty powodowane przez choroby przechowalnicze;
- (2) ogranicza zużycia inhibitorów kiełkowania podczas przechowywania (Sowokinos, 2007).

W 1999 roku w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR), Oddział Młochów rozpoczęto prace hodowlano-badawcze ukierunkowane na wytworzenie rodów typu „cold chipping”, łączących cechę niskiego poziomu CR po długotrwałym przechowaniu bulw w obniżonych temperaturach (4–5°C) z dobrym poziomem cech użytkowych i posiadających zdolność do produkowania chipsów o jasnej barwie. Jasny kolor produktu smażonego jest powiązany z niską zawartością CR w bulwach i jest kluczową cechą odmian ziemniaka wykorzystywanych w przemyśle przetwórczym na chipsy (Zgórska, 1979; Coffin i in., 1987; Zgórska 2006; Lisińska i in., 2009).

Celem pracy jest ukazanie postępu w selekcji form rodzicielskich ziemniaka typu „cold chipping” na podstawie prac hodowlano-badawczych przeprowadzonych w latach 1999–2007.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły cztery grupy materiałów hodowlanych, które oceniono w testach smażenia pod względem barwy chipsów.

- I grupę materiałów stanowiły 24 rody ziemniaka i 4 odmiany wzorcowe. Z każdego obiektu doświadczalnego w latach 1999–2001 pobrano 10-bulwowe próbki z dwóch powtórzeń. Test smażenia prowadzono bezpośrednio z bulw przechowywanych w temperaturze 4°C przez trzy miesiące. Chipsy produkowano laboratoryjnie, wycinając ze środkowej części każdej z 10 bulw po trzy plasterki o grubości 1,6 mm, które smażyono w frytkownicy (wyposażonej w termoregulator), w oleju roślinnym do głębokiego smażenia, w temperaturze 180°C, przez 3 minuty. Barwę chipsów oceniano wizualnie w skali 1–9 (gdzie 9 = barwa jasnożółta, a noty akceptowane ≥ 6) według kart barwnych IBVL (Wageningen). Głównym celem doświadczenia było zidentyfikowanie genotypów typu „cold chipping”.

- II grupa materiałów obejmowała 1696 klonów I-go wegetatywnego rozmnożenia, stanowiących 60 potomstw, pochodzących z pięciu typów krzyżowań. Klony te uzyskano z wysiewów nasion przeprowadzonych w latach 1999–2001. Z każdego klonu pobrano do testów smażenia próbkę dwóch bulw w dwóch powtórzeniach. Test smażenia przeprowadzono bezpośrednio z bulw przechowywanych w temperaturze 4°C przez trzy miesiące, zgodnie z metodyką przyjętą przy ocenie materiałów I grupy, wycinając z każdej próbki po 4 plastry. Analizowano wpływ typów krzyżowań rodzicielskich na frekwencję form „cold chipping” w potomstwach.
- III grupę materiałów doświadczalnych stanowiły potomstwa (siewki polowe), pochodzące z czterech zestawów krzyżowań czynnikowych (NC II), w których oceniano efekty zdolności kombinacyjnej 19 linii rodzicielskich pod względem barwy chipsów po przechowaniu bulw w 4–5°C. W zestawach testerów dopełniających linie rodzicielskie występowały odmiany o pozytywnych efektach GCA (Albatros, Karlana, Pepo, Snowden), jak i odmiany wykazujące ujemne efekty GCA (Oda, Redstar, Signal, Victoria). Każda z badanych kombinacji rodzicielskich reprezentowana była w testach smażenia przez 60 siewek × 2 bulwy × 2 plastry. Test smażenia przeprowadzano podobnie jak w poprzednich grupach materiałów doświadczalnych.
- IV grupę materiałów doświadczalnych stanowiły potomstwa trzech populacji, pochodzące z krzyżowań między formami rodzicielskimi typu „cold chipping”. Głównym celem doświadczenia było określenie, jakiego postępu selekcyjnego można oczekiwać pod względem barwy chipsów po przechowaniu bulw w 4–5°C. Populacja pierwsza składała się z (n = 58) losowo pobranych klonów, pochodzących z krzyżówki Lady Claire × M-62774. Populację drugą (n = 59) uzyskano z krzyżówki Snowden × M-62724, natomiast populację trzecią (n = 60) z krzyżówki Snowden × M-62805. W latach 2003–2004 wyżej wspomniane klony (3 krzaki / klon) zostały wysadzone w układzie bloków rozszerzonych w jednym powtórzeniu. Materiałom tym towarzyszyło 8 odmian powtórzonych trzy razy w układzie losowanych bloków. Próbkę o wielkości (8 bulw × 3 plastry) / klon oceniono zgodnie z metodyką uprzednio opisaną.

Analiza statystyczna

Statystyczna analiza I grupy materiałów doświadczalnych obejmowała: (1) analizę wariancji według dwukierunkowej klasyfikacji przeprowadzoną według modelu Scheffego-Calińskiego, (2) oszacowanie udziału każdego genotypu w interakcji genotypowo-środowiskowej za pomocą statystyki F, (3) oszacowanie efektu głównego dla porównań jakości przetwórczej ród — standard, za który przyjęto odmianę Saturna. Powyższą analizę wykonano przy użyciu programu SERGEN 3 (Caliński i in., 1998).

Wpływ typów krzyżowań rodzicielskich na frekwencję form „cold chipping” w potomstwach (materiały doświadczalne II grupy) analizowano za pomocą testu χ -kwadrat (STATGRAPHICS Plus v. 4.1).

Analizę wariancji ogólnej (GCA) i swoistej (SCA) zdolności kombinacyjnej (grupa III materiałów) przeprowadzono z wykorzystaniem programu SERGEN 3.

W analizie statystycznej materiału doświadczalnego grupy IV przyjęto losowy model efektów genotypowych i środowiskowych. Przeprowadzono łączną analizę wariancji

poprzez dwa lata dla każdej z trzech populacji. Wyniki analizy wariancji odmian wzorcowych dostarczyły oszacowań błędu eksperymentalnego do testowania istotności średnich kwadratów interakcji klony $\times$ lata. Oczekiwany postęp genetyczny (R) w następnym pokoleniu obliczano zgodnie z wzorem podanym przez Falconera (1989):

$$R = i h^2 \sqrt{\sigma_p^2},$$

gdzie:

i — współczynnik intensywności selekcji (przyjęto 10% intensywność selekcji),

h^2 — odziedziczalność w szerokim sensie,

σ_p^2 — fenotypowa wariancja.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wśród ocenianej puli tetraploidalnych rodów (I grupa materiałów) stwierdzono znaczne genetyczne zróżnicowanie (tab. 1) pod względem barwy chipsów z bulw przechowywanych w 4°C. Łączna analiza wariancji wykazała także istotność wpływu lat, a także występowanie interakcji genotypowo-środowiskowych.

Tabela 2

Średnie kwadraty i komponenty wariancyjne z łącznej analizy wariancji dla barwy chipsów z bulw przechowywanych przez trzy miesiące w 4°C
Mean squares and variance components from combined analysis of variance for chip colour after three month storage of tubers at 4°C

Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Średni kwadrat Mean square	Komponenty wariancyjne Variance components
Lata Years	2	1,06**	0,018–(1,8%)
Genotypy Genotypes	27	4,42**	0,627–(62,4%)
Genotypy $\times$ Lata Genotypes $\times$ Years	54	0,66**	0,300–(29,9%)
Błąd Error	81	0,06	0,06–(6,0%)

** Istotność na poziomie $\alpha = 0,01$

** Significant at $\alpha = 0.01$

Zastosowanie programu komputerowego SERGEN 3 do identyfikacji rodów typu „cold chipping” (to jest takich, które po przechowaniu w 4°C uzyskały w testach smażenia noty ≥ 6 i nie wykazały interakcji z latami) było owocne. Pulę genową zawartą w rodach typu „cold chipping” (tab. 2) wykorzystano do doskonalenia tej cechy w nowych populacjach hodowlanych w drodze selekcji. Dalsze badania (Domański i in., 2004 a) wykazały, że rody M-62705, M-62724, M-62774 charakteryzowały się niską akumulacją cukrów redukujących oraz istotnie obniżoną zawartością sacharozy w porównaniu do odmiany Saturna, a także wyższą zawartością skrobi, kształtniejszymi bulwami i niższym udziałem zewnętrznych i wewnętrznych wad bulw w plonie. Rody te charakteryzowały się wysoką odpornością na wirus Y ziemniaka. Formy rodzicielskie tych trzech rodów cechowały się

jasną barwą chipsów po zabiegu rekondycjonowania bulw. W przypadku rodziców rodów M-62724 i M-62774 odnotowano także pozytywne efekty GCA względem barwy chipsów.

Tabela 2

Średnie oceny barwy chipsów dla wybranych rodów ziemniaka po trzech miesiącach przechowywania w 4°C oraz ich interakcja z latami
Average estimates of chip colour in selected clones after three month storage at 4°C and their interaction with years

Ród Clone	Średnia ocen barwy chipsów w skali 1–9 Mean chip colour estimate 1–9 scale	Statystyka F dla interakcji z latami F-statistic for interaction with years	Oszacowanie głównego efektu ród-odm. Saturna Estimates of main effect: clone-cv. Saturna	Statystyka F dla głównego efektu ród- odm. Saturna F-statistic for main effect: clone-cv. Saturna
M-62705	6,4	1,72 ns	1,05	52,92*
M-62724	6,2	0,49 ns	0,83	192,31**
M-62741	6,1	1,71 ns	0,57	15,21 ns
M-62774	6,4	1,41 ns	1,05	69,63 **
Zakresy dla pozostałych rodów — Ranges for the remaining clones				
20 rodów 20 clones	2,3 - 6,0	0,69 - 50,39	0,17 - (- 3,10)	0,06 – 126,73
Odm. — cv. Saturna	5,4	0,07 ns		
Wartości krytyczne — Critical values:				
$\alpha = 0,05$		3,11		18,51
$\alpha = 0,01$		4,88		98,50

*, ** Istotne na poziomie $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$ odpowiednio, ns — nieistotne

*, ** Significant at $\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.01$ respectively, ns — not significant

Tabela 3

Frekwencja osobników o jasnej barwie chipsów (oceny ≥ 6) z bulw przechowywanych przez trzy miesiące w 4°C, w zależności od typu kombinacji rodzicielskiej
The frequency of individuals with light coloured chips (scores ≥ 6) after three month storage of tubers at 4°C, depending on the type of parental combination

Typ kombinacji rodzicielskiej Type of parental combination	Liczba kombinacji rodzicielskich No of parental combinations	Liczba badanych osobników No of tested individuals	Potomstwo z oceną ≥ 6 Progeny with score ≥ 6	
			liczba — number	% — percentage
A × A	6	289	28	9,6
A × B	27	498	25	5,0
B × B	9	780	38	4,9
B × C	3	76	0	0,0
C × C	15	53	0	0,0
Ogółem Total	60	1696	91	5,36

χ^2 -square = 18,44 (istotne na poziomie $\alpha = 0,001$, significant at $\alpha = 0,001$)

A — Fenotyp o jasnej barwie chipsów z pozytywnymi efektami GCA dla barwy chipsów + R; Phenotype with light colour chips and positive GCA effects for chip colour + R

B — Fenotyp o jasnej barwie chipsów bez pozytywnych efektów GCA dla barwy chipsów + R; Phenotype with light colour chips without positive GCA effects for chip colour + R

C — Fenotyp o ciemnych chipsach bez pozytywnych efektów GCA dla barwy chipsów + R; Phenotype with dark colour chips without positive GCA effects for chip colour + R

R — Bulwy rekondycjonowane w 18°C przez 2 tygodnie; Tubers reconditioned for two weeks at 18°C

W II grupie materiałów analiza 1696 osobników pochodzących z 60 rodzin, uzyskanych z pięciu typów krzyżowań rodzicielskich wykazała, że frekwencja form „cold chipping” istotnie zależała od typu krzyżowania (tab. 3).

Osobniki typu „cold chipping” znajdowano w krzyżówkach między rodzicami o jasnej barwie chipsów. Ich frekwencja była wyższa w przypadku obecności pozytywnych efektów GCA u obu rodziców. Analizy potomstw z próbnych wysiewów za pomocą testu chi-kwadrat okazały się użytecznym narzędziem do eliminacji niepożądanych rodziców z dalszych programów krzyżowań i wysiewów. Wyniki analizy chi-kwadrat danych z wysiewów hodowlanych zostały także wykorzystane przy typowaniu form rodzicielskich do układów krzyżowań czynnikowych, w których oceniano zdolność kombinacyjną (Domański i in., 2004 b, 2006 a).

Analiza doświadczeń z potomstwami uzyskanymi z krzyżowań czynnikowych w III analizowanej grupie materiałów wykazała, że ogólna zdolność kombinacyjna (GCA) miała większe znaczenie w dziedziczeniu barwy chipsów, jakkolwiek efekty SCA były również istotne (tab. 4). Wyniki te są zgodne z wynikami badań innych autorów (Loiselle i in., 1990; Domański i in., 2004 b; Domański i in., 2006 a). Ogółem 9 form rodzicielskich spośród 19 testowanych (tab. 5) zostało zidentyfikowane jako formy rodzicielskie z pozytywnymi efektami GCA dla barwy chipsów z bulw po trzymiesięcznym ich przechowywaniu w 4–5°C. Najwyższy pozytywny efekt GCA (13,5**) stwierdzono w klonie diploidalnym DG.93-332.

Tabela 4

Procentowy udział komponentów wariancyjnych GCA i SCA w całkowitej zmienności genetycznej barwy chipsów z bulw przechowywanych w 4–5°C
Proportion of GCA and SCA variance components in the total genetic variance for chip colour after cold storage of tubers at 4–5°C

Komponent wariancyjny Variance component	Procent Percentage
GCA matek — GCA females	22,0
GCA ojców — GCA males	47,5
SCA	30,5

Tabela 5

Efekty ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) wybranych linii rodzicielskich względem barwy chipsów z bulw przechowywanych w 4–5°C przez trzy miesiące
Effects of general combining ability (GCA) of selected parental lines for chip colour after three month storage of tubers at 4–5°C

Barwa chipsów Chip colour	Linia rodzicielska Parental line								
	PS-1705	PS-1742	PS-1753	M-62724	M-62819	M-62826	M-55	M-64	DG93-332
Σ ocen / 30 osobników Σ scores / 30 individuals	6,7**	8,4**	3,9*	5,1*	9,6**	6,0*	9,1**	3,9*	13,5**

*, ** Istotne na poziomie $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$, odpowiednio

*, ** Significant at $\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.01$, respectively

Wysoki potencjał trzech form rodzicielskich: M-62724, M-62774 i M-62805, które uzyskały status materiałów wyjściowych, do tworzenia osobników typu „cold chipping” został potwierdzony w próbnym wysiewach (materiały doświadczalne IV grupy) przez parametry: (σ^2_g) wariancji genetycznej, (h^2) odziedziczalności w szerokim sensie i (R) oczekiwanego postępu selekcyjnego (tab. 6).

Tabela 6

Komponenty wariancyjne: genetyczny (σ^2_g), genotyp $\times$ środowisko (σ^2_{ge}), błędu (σ^2_e) oraz oszacowania odziedziczalności (h^2) i oczekiwanego reakcji na selekcję (R) względem barwy chipsów w trzech nieselekcjonowanych populacjach

Variance components: genetic (σ^2_g), genotype $\times$ environment (σ^2_{ge}), error (σ^2_e), and estimates of heritability (h^2), and expected response to selection (R) for chip colour for three unselected populations

Populacja Population	Komponenty wariancyjne Variance components			h^2	R
	σ^2_g	σ^2_{ge}	σ^2_e		
Lady Claire $\times$ M-62774	0,21**	0,14*	0,15	0,42	0,52
Snowden $\times$ M-62724	0,25**	0,07	0,15	0,53	0,64
Snowden $\times$ M-62805	0,25**	0,18*	0,15	0,43	0,58

*, ** Istotne na poziomie $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$, odpowiednio

*, ** Significant at $\alpha = 0.05$ and $\alpha = 0.01$, respectively

W okresie dziewięciu lat prac hodowlano-badawczych wytworzono i przekazano polskim hodowcom ziemniaka 17 form rodzicielskich, przydatnych dla hodowli odmian ziemniaka na cele przetwórstwa spożywczego. Wśród uzyskanych rodów, które uzyskały status materiałów wyjściowych 14 jest typu „cold chipping”. Wartościową cechą tych form rodzicielskich jest ich wyższa odporność względem wirusów Y i M ziemniaka (Domański i in., 2007).

Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że postęp hodowlany w programach ukierunkowanych na wytworzenie linii rodzicielskich / odmian typu „cold chipping” może być przyspieszony poprzez zastosowanie testów potomstwa pod kątem barwy chipsów i innych cech kształtujących jakość przetwórcza. Zastosowanie form rodzicielskich o pozytywnych efektach GCA dla tej cechy zwiększało frekwencję osobników charakteryzujących się jasną barwą chipsów po przechowaniu bulw w niskich temperaturach. Wśród zidentyfikowanych linii rodzicielskich o wysokich pozytywnych efektach GCA na uwagę zasługuje diploidalny, złożony mieszaniec międzygatunkowy DG 93-332 typu „cold chipping”. Z krzyżowań interploidalnych $4x-2x$ z udziałem tej formy rodzicielskiej wyselekcjonowano rody o dobrym poziomie cech użytkowych i zadowalającej odporności na wirusy, z istotnie wyższą częstością niż z krzyżowań $4x-4x$ (Domański i in., 2006 b).

Dotychczasowe prace w IHAR O/Młochów nad przenoszeniem cech przydatności bulw na chipsy z ziemniaka diploidalnego zaowocowały przekazaniem polskim hodowcom trzech rodów otrzymanych z krzyżowań $4x-2x$: rodu M-62724 wyselekcjonowanego z kombinacji Agria $\times$ DW 88-4556, rodu M-62833 pochodzącego z kombinacji Signal $\times$ DG 93-332 i rodu M-62879 wywodzącego się z kombinacji PS-1760 $\times$ DG 93-33. Hayes i Thill (2002) otrzymali potomstwa $4x$ z krzyżowań $4x-2x$ o jaśniejszej barwie chipsów i wyższej

odporności na zarazę ziemniaka. Wyniki cytowanej pracy, jak również wyniki otrzymane w IHAR O/Młochów wskazują, że potencjał genetyczny mieszańców międzygatunkowych ziemniaka diploidalnego może zapewnić postęp w hodowli ukierunkowanej na przetwórstwo, jednocześnie wzbogacając pulę genową o nowe allele poszukiwanych cech.

WNIOSKI

1. Stwierdzono istotne genetyczne zróżnicowanie wśród początkowej stawki rodów ziemniaka pod względem cechy „cold chipping”, stanowiącej materiał wyjściowy do dalszego doskonalenia w drodze selekcji.
2. Frekwencja osobników potomnych o jasnej barwie chipsów bezpośrednio z bulw przechowywanych w 4°C, zależała od zastosowanych typów krzyżowań. Frekwencja tego typu osobników była najwyższa w przypadku, kiedy obydwie formy rodzicielskie wykazywały pozytywne efekty GCA pod względem barwy chipsów.
3. W ocenianej puli form rodzicielskich barwa chipsów warunkowana była zarówno przez addytywne, jak i nieaddytywne formy działania genów, przy czym przeważało addytywne działanie genów.
4. Wśród 19 ocenianych linii rodzicielskich ziemniaka zidentyfikowano dziewięć o istotnie pozytywnych efektach GCA pod względem barwy chipsów. Najwyższe pozytywne efekty GCA stwierdzono w przypadku diploidalnego, złożonego mieszańca międzygatunkowego DG 93-332.
5. Wysoki potencjał trzech form rodzicielskich ziemniaka, które uzyskały status materiałów wyjściowych, do tworzenia osobników typu „cold chipping” został potwierdzony w próbnym wysiewach przez parametry: (σ^2_g) wariancji genetycznej, (h^2) odziedziczalności w szerokim sensie i (R) oczekiwanego postępu selekcyjnego.

LITERATURA

- Caliński T., Czajka A., Kaczmarek Z., Krajewski P., Siatkowski I. 1998. Podręcznik użytkownika programu SERGEN 3, Poznań: 1 — 53.
- Coffin R. H., Yada R.Y., Parkin K. L., Grodzinski B., Stanley D. W. 1987. Effect of low temperature storage on sugar concentrations and chip color of certain processing potato cultivars and selections. *J. Food Sci.* 52: 639 — 645.
- Domański L., Zimnoch-Guzowska E., Domańska M., Jakuczun H., Zgórska K., Frydecka-Mazurczyk A. 2004 a. The development of cold chipping potato parental lines for breeding cultivars suitable for processing. *Plant Breeding and Seed Science* 49: 91 — 100.
- Domański L., Zimnoch-Guzowska E., Flis B., Domańska M. 2004 b. Zdolność kombinacyjna wybranych linii rodzicielskich pod względem kilku cech kształtujących jakość surowca na przetwory ziemniaczane. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 500: 117 — 126.
- Domański L., Zimnoch-Guzowska E., Flis B. 2006 a. Zdolność kombinacyjna wybranych rodów ziemniaka pod względem ogólnego wyglądu bulw, ciemnienia enzymatycznego i barwy produktu smażonego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 511: 123 — 130.
- Domański L., Jakuczun H., Zimnoch-Guzowska E., Flis B. 2006 b. Przydatność dwóch diploidalnych form rodzicielskich ziemniaka do tworzenia tetraploidalnego potomstwa typu „cold-chipping”. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 511: 115 — 121.

- Domański L., Sztangret-Wisniewska J., Zimnoch-Guzowska E. 2007. Tetraploidalne materiały wyjściowe dla hodowli odmian ziemniaka przydatnych do przetwórstwa spożywczego. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 517: 245 — 251.
- Falconer D.S. 1989. Introduction to quantitative genetics. 3rd Ed. Longman Scientific and Technical, Harlow.
- Hayes R. J., Thill Ch. A. 2002. Co-current introgression of economically important traits in a potato-breeding program. Amer. J. of Potato Res. 79: 173 — 181.
- Lisińska G., Pęksa A., Kita A., Rytel E., Tajner-Czopek A. 2009. The quality of potato for processing and consumption. In: Yee N, Bussell W. T. (Eds) Potato IV, Food 3 (Special Issue 2): 99 — 104.
- Loiselle F., Tai G. C. C., Chrystie B. R. 1990. Genetic components of chip color evaluated after harvest, cold storage and reconditioning. Amer. Potato J. 67: 633 — 646.
- Mackay G. R., Tod D., Bradshaw J. E., Dale M. F. B. 1997. The targeted and accelerated breeding of potatoes. Scottish Crop Research Institute. Annual Report 1996/97: 40 — 45.
- Putz B. 1999. First potato varieties for the chip industry suitable to be stored at 4°C. In: Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstrations 14th Triennial Conference of the EAPR, Sorrento, Italy, May 2–7, 1999. Assessorato, Agricoltura Regione Capania: 333 — 335.
- Sowokinos J.B. 2007. The canon of potato science: 38. Carbohydrate metabolism. Potato Research 50: 3/4: 73 — 80.
- Thill C.A., Peloquin S.J. 1995. A breeding method for accelerated development of cold chipping clones in potato. Euphytica 84: 73 — 80.
- Zgórska K. 1979. Czynniki warunkujące cechy jakości ziemniaka jadalnego. Ziemniak 1979: 183 — 206.
- Zgórska K. 2006. Parametry wyznaczające przydatność odmian do konsumpcji i przetwórstwa. Wieś Jutra 2 (91): 37 — 38.

TERESA PASTUSZEWSKA**GRZEGORZ GRYŃ**

Pracownia Chorób i Szkodników Kwarantannowych Ziemniaka

Zakład Technologii Produkcji Roślin Okopowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Bydgoszczy

Woda jako potencjalne źródło rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Water as a potential source of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* dissemination

Badano czas przeżycia *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) w środowisku sterylnej wody pochodzącej z jeziora, stawu i rzeki oraz wody destylowanej jako kontroli, przechowywanych w różnych temperaturach. Wykonano izolację bakterii z zawiesin wodnych oraz test biologiczny na roślinach bakłażana (*Solanum melongena*). Wyniki badań wykazały, że Cms może przeżyć przez długi okres czasu w 4°C w środowisku sterylnej wody z jeziora, stawu i rzeki oraz wody destylowanej, zachowując zdolność do wywołania objawów chorobowych u roślin bakłażana. Podwyższenie temperatury do 21°C spowodowało zarówno spadek liczebności bakterii w zawiesinach wodnych jak i obniżenie infekcyjności w stosunku do roślin bakłażana.

Słowa kluczowe: bakłażan, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, infekcyjność, przeżywalność w wodzie

The survival period of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) in the environment of sterile water originating from a lake, pond and a river and maintained at different temperatures was assessed. Distilled water was used as a control variant. Isolation of bacteria from the suspensions and biological test with the use of eggplant (*Solanum melongena*) assay plants were done. The results of the study indicated that Cms was able to survive for a long time in the water from lake, pond or river kept at 4°C. The bacteria retained the ability to cause infection in *S. melongena*. The increase in environmental temperature up to 21°C resulted both in the decrease in Cms density in water suspensions and in the diminished infectivity to eggplant plants.

Key words: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, eggplant, infectivity, survival in water

WSTĘP

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka wywołwana przez *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kott Hoff) Davis et al. (EPPO/CABI, 1997) jest poważnym zagrożeniem dla upraw ziemniaka w państwach UE. Choroba ma status choroby

kwarantannowej, więc podlega zwalczaniu z urzędu, co regulują odpowiednie akty prawne. Wystąpienie choroby może powodować poważne straty gospodarcze, związane z obniżeniem plonu na skutek zamierania roślin i gnicia bulw oraz dyskwalifikacją plantacji i nałożeniem kwarantanny.

Za główne źródło rozprzestrzeniania patogena uważa się porażone sadzeniaki. Oprócz typowych objawów w bulwach, patogen może porażać i zasiedlać ziemniaki w formie bezobjawowej i w ten sposób przetrwać nie wykryty przez kilka rozmnożeń wegetatywnych (Boer i McNaughton, 1986; Manzer i in., 1987; Slack, 1987; Boer i in., 1992; Pastuszewska i in., 2004, Pastuszewska, 2008).

Bakteria *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* jest organizmem biotroficznym, czerpiącym pokarm z żywych komórek rośliny żywiciela, którym jest ziemniak (*Solanum tuberosum*). Patogen jest odporny na wysuszenie i z tego powodu może zachować żywotność przez dłuższy okres czasu na skażonych powierzchniach. Nelson (1980) dowiódł długotrwałą zdolność do przeżycia na maszynach, powierzchniach produkcyjnych i przechowalniczych oraz odzieży, podkreślając znaczenie takich czynników jak temperatura i wilgotność, determinujących długość przeżywania Cms. Patogen utrzymał żywotność, przez co najmniej 24 miesiące na jucie, papierze i plastiku, przechowywany w warunkach niskiej wilgotności względnej 12% i w temperaturach 5°C lub 20°C. Przy podwyższonej wilgotności względnej do 94% i w tych samych temperaturach, przeżył krócej niż 14 miesięcy. Temperatury poniżej 0°C raczej wydłużają okres przeżywania bakterii Cms (Slack, 1987). Wyniki badań prowadzonych w ostatnim czasie w Wielkiej Brytanii (Elphinstone, 2004) wskazują, że przeżywalność Cms ulega znacznemu obniżeniu na mokrych powierzchniach lub na suchych powierzchniach, ale w wilgotnych warunkach.

Zdolność do przeżywania Cms w glebie nie została jeszcze jednoznacznie określona. Bakteria może przeżyć krócej w glebie wilgotnej, a dłużej w niektórych gatunkach gleb, w warunkach małej wilgotności. Ryzyko związane z potencjalną przeżywalnością patogena w glebie jest słabo określone i zwykle uważa się je za niskie. Sądzi się, że przenoszenie choroby poprzez bakterie znajdujące się w glebie ma małe znaczenie w epidemiologii bakteriozy pierścieniowej. Jest kilka doniesień o braku możliwości przeniesienia Cms na polu, z chorych roślin na zdrowe (Dykstra, 1942; Sletten, 1985), chociaż w warunkach słabego odwodnienia może wystąpić potencjalne ryzyko porażenia roślin (Dykstra, 1941). Według Nelsona (1980; 1985) bakteria może przeżyć w suchych, zainfekowanych łodygach ziemniaka przez 26–63 miesięcy. W glebie o wilgotności odpowiadającej współczynnikowi wędnięcia i w niskiej temperaturze (0°C – 10°C) patogen utrzymał żywotność przez 278 dni, podczas gdy w tej samej glebie, ale w warunkach wodnej pojemności polowej i przy 20°C bakteria przeżyła tylko 6 dni (Nelson, 1979). W kolejnym eksperymencie bakteria zachowała żywotność w sterylnej glebie, w 3°C przez 135 dni, a znacznie krócej przeżywała w niesterylnej glebie lub w wyższych temperaturach (Dykstra, 1942). W doświadczeniach polowych nie stwierdzono porażenia roślin uprawianych w uprzednio silnie skażonej glebie, nawet, kiedy sadzeniaki przed wysadzeniem krojono (Bonde, 1942; Dykstra, 1941, 1942).

Okres przeżycia bakterii Cms w środowisku wodnym również nie jest do końca wyjaśniony. Uważa się, że ryzyko rozprzestrzeniania Cms poprzez wodę używaną do

nawadniania upraw jest niższe, niż w przypadku bakterii *Ralstonia solanacearum* (R. sol.), sprawcy choroby zwanej śluzakiem. Nie znaleziono dotychczas innych roślin bytujących w ciekach wodnych, które mogłyby być potencjalnym żywicielem dla Cms, natomiast w przypadku *Ralstonia solanacearum* taką rośliną jest psianka słodkogórz (*Solanum dulcamara*).

Celem badań było określenie czasu przeżycia *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w skontaminowanej wodzie i ustalenie ewentualnego ryzyka rozprzestrzeniania się Cms za pośrednictwem środowiska wodnego.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano polski szczep *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* BPR IOR 527, pochodzący z Banku Patogenów Roślin Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu. Prowadzono hodowlę czystych kultur szczepu, na podłożu stałym YPGA (agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy).

Jako materiał badawczy wykorzystano 4 źródła wody: z małych zbiorników stawu i jeziora, z rzeki Wisły oraz wodę destylowaną. Próby wód przefiltrowano przez sterylne membrany bakteriologiczne o średnicy porów 0,2 µm. W każdym ze źródeł wody sporządzono zawiesiny bakteryjne szczepu Cms BPR IOR 527 i umieszczono je w zamykanych, sterylnych pojemnikach bakteriologicznych w temperaturach: 4°C, 21°C, 35°C (woda z jeziora, stawu i rzeki, woda destylowana nr 1, woda destylowana nr 2), oraz 30°C (woda destylowana).

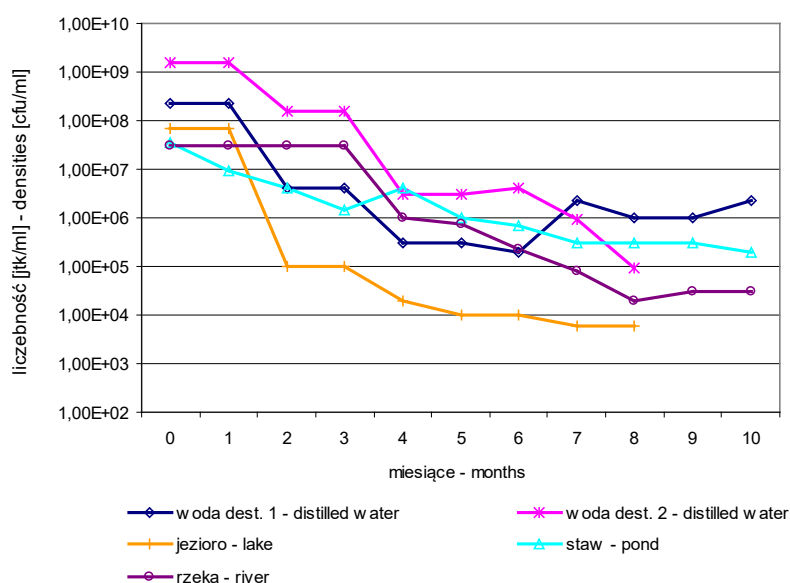
Jednocześnie, w celu określenia liczebności bakterii w momencie rozpoczęcia doświadczenia, wykonano posiew zawiesin na szalki Petriego z podłożem mikrobiologicznym YPGA. Przeprowadzano kontrole przeżycia bakterii w poszczególnych rodzajach wody i różnych warunkach temperatury, w odstępach czasowych 1 miesiąca dla 4°C (przez okres 10 miesięcy) i 21°C (przez 3 miesiące), natomiast dla 30°C w odstępach 4 dni, a dla 35°C w 6 i 8 dniu.

Wykonano izolowanie bakterii sporządzając szereg 10-krotnych rozcieńczeń zawiesiny w 0,9% NaCl i posiewając powierzchniowo na płytki Petriego z podłożem YPGA. Po upływie 3, 5, 7, 10 i 14 dni oceniono wzrost kolonii Cms.

Przeprowadzono 3 testy bakłażanowe dla oceny patogeniczności bakterii Cms, według następującej procedury. W tym celu siewki bakłażana (*Solanum melongena* L), odmiana Black Beauty, w stadium trzeciego liścia inokulowano zawiesinami badanych wód. Inokulację roślin (po 5 roślin dla każdego rodzaju wody) przeprowadzano przy pomocy igły do iniekcji 23 G (0,6 × 25) i strzykawki (2 ml), pomiędzy liścieniami i pierwszym liściem. Do eksperymentu dołączano kontrolę negatywną (sterylny bufor PB) i pozytywną (zawiesina Cms szczep BPR IOR 527). Zakażone rośliny bakłażana inkubowano w pokoju hodowlanym, w 21°C, przy 14. godz. oświetleniu przez okres 40. dni. Począwszy od 7. dnia trwania testu notowano występowanie objawów.

WYNIKI

Cms wyizolowano po 10 miesiącach utrzymywania w zawieszynie wody destylowanej nr 1 w temperaturze 4°C (rys. 1). Liczebność bakterii w badanej zawieszynie zmniejszyła się z $2,2 \times 10^8$ do $2,3 \times 10^6$ jednostek tworzących kolonie w ml (jtk/ml). Po 8 miesiącach utrzymywania Cms w wodzie destylowanej nr 2 (rys. 1) liczebność bakterii zmniejszyła się z $1,6 \times 10^9$ jtk/ml do 9×10^4 jtk/ml, natomiast w wodzie z jeziora (rys. 1) z 7×10^7 jtk/ml do 6×10^3 jtk/ml. Brak danych w kolejnych miesiącach był spowodowany kontaminacją zawiesiny niepożądanym gatunkiem bakterii, uniemożliwiającym identyfikację kolonii Cms. W pozostałych rodzajach wód (staw i rzeka) Cms nadal utrzymuje żywotność, stwierdzono jednak wyraźną redukcję liczebności kolonii bakteryjnych (rys. 1).



Rys. 1. Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawieszinach wodnych w temperaturze 4°C (log jtk/ml)

Fig. 1. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in water suspensions at 4°C (log cfu/ml)

W 21°C, do trzech miesięcy trwania testu, bakterie Cms izolowano z wszystkich zawiesin (rys. 2). Największą redukcję liczebności uzyskiwanych kolonii bakteryjnych zanotowano w wodzie z jeziora, natomiast najmniejszy spadek liczebności bakterii wykazano w środowisku wody destylowanej.

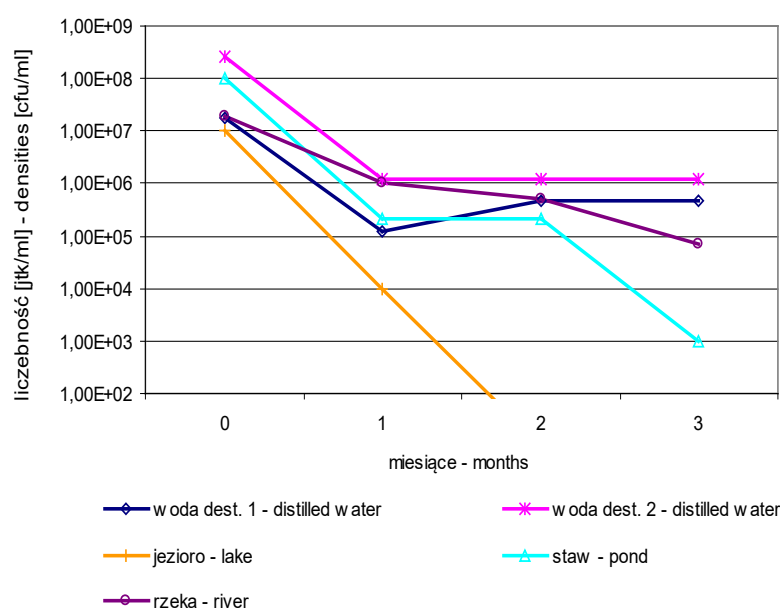
Po 30 dniach utrzymywania zawiesiny bakterii w wodzie destylowanej, w 30°C (tab. 1), bakterie nadal były żywe, chociaż zaobserwowano wyraźny spadek liczebności kolonii Cms z $4,2 \times 10^9$ jtk/ml do 1×10^3 jtk/ml. Badając w 6 i 8 dniu zawiesiny wodne z jeziora, stawu i rzeki oraz z wody destylowanej 1 i 2, utrzymywane w 35°C (tab. 2), nie odnotowano wzrostu bakterii na pożywce.

Tabela 1

Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawiesinie wody destylowanej w temperaturze 30°C (jtk/ml)

Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in distilled water suspension at 30°C (cfu/ml)

Rodzaj wody Kind of water	Koncentracja początkowa Initial concentration	4 dzień 4 th day	8 dzień 8 th Day	12 dzień 12 th day	18 dzień 18 th day	22 dzień 22 nd day	26 dzień 26 th day	30 dzień 30 th day
Woda destylowana Distilled water	$4,2 \times 10^9$	$1,03 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	6×10^4	4×10^4	3×10^3	4×10^3	1×10^3



Rys. 2. Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w zawiesinach wodnych w temperaturze 21°C (log jtk/ml)

Fig. 2. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in water suspensions at 21°C (log cfu/ml)

Przeprowadzono 3 testy infekcyjności bakterii na bakłażanie dla kombinacji przechowywanej w 4°C (po dwóch tygodniach, po 5 i 10 miesiącach) oraz jeden dla kombinacji w 21°C (po dwóch tygodniach). Bakterie Cms straciły całkowicie infekcyjność po dwóch tygodniach trwania doświadczenia, dla kombinacji przechowywanej w 21°C — w wodzie z jeziora, stawu oraz wody destylowanej; oraz po 10 miesiącach, dla kombinacji w 4°C, — w zawiesinie wody z jeziora i wody destylowanej nr 2. Bakterie Cms zachowały infekcyjność do końca doświadczenia, w kombinacji przechowywanej w 4°C, w wodzie ze stawu i rzeki oraz w wodzie destylowanej nr 1.

Tabela 2

Przeżywalność *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w różnych zawiesinach wodnych w temperaturze 35°C (jtk/ml)
Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in different distilled water suspensions at 35°C (cfu/ml)

Rodzaj wody Kind of water	Koncentracja początkowa Initial concentration	6 dzień 6 th day	8 dzień 8 th day
Woda dest. 1 — Distilled water 1	3×10 ⁷	0	0
Woda dest. 2 — Distilled water 2	2,6×10 ⁷	0	0
Jezioro — Lake	4,7×10 ⁷	0	0
Staw Pond	7×10 ⁸	0	0
Rzeka — River	2×10 ⁷	0	0

DYSKUSJA

W celu określenia ryzyka rozprzestrzeniania Cms poprzez wody powierzchniowe i ściekowe oraz porażenia roślin ziemniaka za pośrednictwem skażonej wody użytej do nawadniania, zbadano wpływ czynnika źródła wody i temperatury na długość okresu przeżywania bakterii. Przeprowadzono izolację patogena na pożywcę mikrobiologiczną i inokulację roślin bakłazaną. Ze względu na powolny wzrost Cms na sztucznym podłożu, niewspółzawodniczenie z innymi bakteriami patogenicznymi i saprofitycznym oraz brak pożywki selektywnej, w badaniach ograniczono się do wody sterylizowanej filtrowanej przez membrany bakteriologiczne.

Ryzyko przenoszenia Cms w wodzie powierzchniowej używanej do nawadniania, uważane jest za mniejsze, niż w przypadku śluzaka (*Ralstonia solanacearum*). Cms nie jest patogenem dla *Solanum dulcamara*, jednym z nielicznych wodnych gatunków europejskich, należących do *Solanaceae* (Knorr, 1948, Wolf i Beckhoven, 2004). Jak podaje Elphinstone (2004) w Anglii dowiedziono, że istnieje ryzyko zakażenia zdrowych bulw ziemniaka poprzez mycie w wodzie użytej dwie doby wcześniej do umycia bulw, porażonych przez Cms. Autor dopatruje się, że w taki sposób, w 2002 roku, w miejscu pakowania, mogło dojść do zakażenia ziemniaków towarowych, od porażonej przez Cms, partii ziemniaków, importowanych do Wielkiej Brytanii. Wolf i Beckhoven (2004) wykrywali żywe komórki Cms do 7 dnia przechowywania w niesterylnej wodzie powierzchniowej, wcześniej skażonej Cms, bez względu na źródło pochodzenia wody. Autorzy sugerują, że w tym czasie, patogen może być transportowany drogą wodną na duże odległości, szczególnie w rzekach. Zakażone wody stwarzają pewne zagrożenie dla upraw ziemniaka, jednak z drugiej strony, by to nastąpiło musiałoby istnieć stałe źródło uwalniania bakterii, bowiem w wodzie koncentracja patogena ulega zmniejszeniu.

W badaniach nie zaobserwowano wzrostu liczebności jednostek tworzących kolonie Cms (rys. 1), w żadnym ze źródeł wody użytych do przygotowania zawiesin bakteryjnych. Czyste kultury Cms wyosobniono po 10 miesiącach utrzymywania w 4°C w wodzie destylowanej, oraz w wodzie ze stawu i rzeki. Liczebność populacji Cms zmniejszyła się odpowiednio w wodzie destylowanej nr 1 z $2,2 \times 10^8$ do $2,3 \times 10^6$, w wodzie ze stawu z $3,5 \times 10^7$ do 2×10^5 , w wodzie z rzeki z 3×10^7 do 3×10^4 jtk/ml. W przypadku wody z

jeziora i wody destylowanej nr 2, Cms był izolowany do 8. miesiąca, potem nastąpiła kontaminacja wody niepożądanym gatunkiem bakterii, który uniemożliwił identyfikację kolonii Cms na pożywce.

Wolf i Beckhoven (2004) zaobserwowany brak wzrostu populacji Cms we wszystkich zastosowanych rozcieńczalnikach tłumaczyli względnie niską zdolnością patogena do przeżywania w środowisku wodnym. Niewielki wzrost liczebności, jaki wystąpił w sterylnej wodzie wodociągowej, przypisali rozdzieleniu się tworzących agregaty kolonii Cms. Autorzy uznali 35 dni za maksymalny czas przeżywania Cms w sterylnej wodzie z kranu, w 20°C. Krótszy okres uzyskali dla zawiesiny sterylnej wody MiliQ i sztucznego płynu z ksylemu.

Z wszystkich zawiesin utrzymywanych w 21°C, do 3. miesiąca trwania badań izolowano Cms (rys. 2). Największą redukcję w liczebności populacji zanotowano w wodzie z jeziora, najmniejszą w wodzie destylowanej. W 30°C bakteria przeżyła w wodzie destylowanej do 30 dni, chociaż nastąpiła znaczna redukcja koncentracji, z $4,2 \times 10^9$ do 1×10^3 jtk/ml (tab. 2).

Wykazano, że patogen utrzymywany w 4°C w sterylnych zawiesinach wodnych wody destylowanej nr 1 i 2, oraz z jeziora, rzeki i stawu zachował patogeniczność przez okres 5 miesięcy, po 10 miesiącach nie obserwowano objawów na roślinach infekowanych wodą destylowaną nr 2 oraz wodą z jeziora. Natomiast dla 21°C, po dwóch tygodniach od rozpoczęcia badań objawy choroby uwidoczniły się jedynie na roślinach bakłażana inokulowanych zawiesiną z rzeki.

WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki badań wskazują na zdolność bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* do długotrwałego przeżywania w sterylnej wodzie destylowanej, oraz pochodzącej z jeziora, stawu i rzeki, przechowywanej w temperaturze 4°C.
2. Stwierdzono istotny wpływ poziomu temperatury na utrzymywanie się przy życiu bakterii Cms, temp. 21°C wpłynęła na spadek liczebności bakterii w zawiesinach.
3. Woda o temperaturze powyżej 30°C stanowi nieogodne środowisko dla przeżycia bakterii Cms.
4. Przeprowadzone testy biologiczne na bakłażanie potwierdziły zachowanie przez Cms infekcyjności w środowisku wodnym, w temp. 4°C, po upływie, co najmniej 10 miesięcy. Uwidoczniło się to w postaci typowych objawów chorobowych na roślinach testowych, inokulowanych zawiesiną bakterii w wodzie destylowanej nr 1 oraz w wodzie ze stawu i rzeki.
5. Temperatura 21°C wpłynęła na obniżenie infekcyjności Cms w stosunku do bakłażana.

LITERATURA

- Bonde R. 1942. Ring rot in volunteer plants. Am. Potato J. 19: 131 — 133.
 Boer De S. H., McNaughton M. E. 1986. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. Am. Potato J. 63: 533 — 543.

- Boer De S. H., Vaerenbergh Van J., Stead D. E., Janse J. D., McKenzie A. R. 1992. A comparative study in five laboratories on detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato stems and tubers. *Potato Research* 35: 217 — 226.
- Dykstra T. P. 1941. Results of experiments in control of bacterial ring rot of potatoes in 1940. *Am. Potato J.* 18: 27 — 55.
- Dykstra T. P. 1942. Compilation of results in control of bacterial ring rot in 1941. *Am. Potato J.* 19: 175 — 196.
- Elphinstone J. G. 2004. Bacterial ring rot of potato — the facts (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). *British Potato Council Report*: 24 — 27.
- EPPO/CABI. 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. In: Quarantine pests for Europe. Second Edition. (Ed. By Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M.). CAB International, Wallingford, UK: 986 — 990.
- Knorr L. C. 1948. Suspect range of the potato ring rot bacterium. *Am. Potato J.* 25: 361 — 371.
- Manzer F. E., Gudmestad N. A., Nelson G. A. 1987. Factors affecting infection, disease development and symptom expression of bacterial ring rot. *Am. Potato J.* 64: 641 — 676.
- Nelson G. A. 1979. Persistence of *Corynebacterium sepedonicum* in soil and in buried potato stems. *Am. Potato J.* 56: 71 — 77.
- Nelson G. A. 1980. Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems. *Am. Potato J.* 75: 595 — 600.
- Nelson G. A. 1985. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems and on surfaces held at freezing and above freezing temperatures. *Am. Potato J.* 62: 23 — 28.
- Pastuszewska T., Junosza Kisielewska I., Grzech W., Brzozowski S. 2004. Rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka w rozmnożeniach wegetatywnych roślin. *Biul. IHAR* 233: 277 — 287.
- Pastuszewska T. 2008. Tempo rozwoju bakteriozy pierścieniowej ziemniaka z formy bezobjawowej w objawową w potomstwie bulw ziemniaka. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 531: 161 — 168.
- Slack S. A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Potato J.* 64: 665 — 669.
- Sletten A. 1985. The effect of *Corynebacterium sepedonicum* on symptoms and field of four potato cultivars. *Potato Research* 28: 27 — 33.
- Wolf Van der J. M., Beckhoven Van J. R. C. M. 2004. Factors affecting survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in water. *J. Phytopathology* 152: 161 — 168.

KRZYSZTOF KLIMONT**ZOFIA BULIŃSKA-RADOMSKA**

Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Przydatność wybranych gatunków roślin do rekultywacji glebotwórczego gruntu z wapna poflotacyjnego

Usefulness of some plants species to reclamation of soilless ground on post-flotation lime

Określono wpływ stosowania zróżnicowanych dawek azotu na wzrost i rozwój kostrzewy trzcinowej i topinamburu rosnących na podłożu wapna poflotacyjnego wzbogaconego trzema dawkami osadów ścieków komunalnych tj. 250, 500 i 750 m³·ha⁻¹ na terenach poeksploatacyjnych Kopalni Siarki „Jeziórko”. Plon zielonej masy i wysokość roślin kostrzewy trzcinowej wzrastały istotnie i proporcjonalnie do rosnących dawek nawożenia azotowego użytego na wszystkich trzech poziomach wzbogacania podłoża osadami ściekowymi w odniesieniu do wariantów kontrolnych. Stwierdzono, że obsada roślin i liczba wykształconych pędów generatywnych wytworzonych przez rośliny kostrzewy trzcinowej rosnącej na bezglebowym podłożu wzbogaconym każdym z trzech poziomów osadów ściekowych wzrastała istotnie pod wpływem średniej i najwyższej dawki azotu w odniesieniu do wariantu kontrolnego. Wysokość roślin topinamburu była zróżnicowana i zawierała się w przedziale od 100,9 do 181,0 cm., a wszystkie dawki azotu wpływały na przyrost wysokości roślin w porównaniu do wariantu kontrolnego na każdym z trzech poziomów wzbogacania podłoża osadami ściekowymi. Dawki osadów ściekowych wpływały mniej efektywnie na wartość badanych cech niż nawożenie azotowe.

Słowa kluczowe: bezglebowy grunt, kostrzewa trzcinowa, nawożenie azotowe, osady ściekowe, rekultywacja, rośliny do rekultywacji, topinambur

The effect of differentiated nitrogen doses on growth and development of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) was investigated. Plants were grown on the ground of post reclamation lime substrate enriched with various doses 250, 500 i 750 m³·ha⁻¹) of municipal sewage sludge, on post-mining terrain of „Jeziórko” Sulphur Mine. Green matter yield and height of the tall fescue's plants increased proportionally to increasing rate of nitrogen fertilization applied in all three combinations of substrate enrichment with the sewage sludge. It was stated that the plant density and number of developed generative shoots generated by reed fescue plants increased significantly under the influence of the lowest and the average nitrogen doses at each level of substance enrichment with the sewage sludge in relation to the control version. The height of Jerusalem artichoke plants was variable and ranged from 100,9 to 181,0 cm and all nitrogen doses stimulated height of plants with reference to the control plants on each three levels of ground enrichment

with savage sludge. Rates of applied savage sludge were less effective than the nitrogen fertilization as regard the values of the investigated plants traits.

Key words: Jerusalem artichoke, nitrogen, savage sludge, reclamation, soilless ground, tall fescue, revitalization plants for reclamation

WSTĘP

Grunty zdewastowane przez działalność rolniczą i przemysłową zajmują coraz większą powierzchnię w Polsce. Wymagają one koniecznie rekultywacji zarówno z gospodarczego, jak i społecznego punktu widzenia, gdyż prawidłowo przeprowadzona rekultywacja może być praktycznie jedyną możliwością odzyskania utraconych gruntów rolnych czy leśnych (Dulewski i Wtorek, 2000). Zabiegi rekultywacyjne inicjują procesy glebotwórcze w podłożu a przede wszystkim odbudowę szaty roślinnej poprzez dobór odpowiednich gatunków roślin użytkowych, oraz właściwe zabiegi uprawowe, pielęgnacyjne i nawożenie Góral (2001).

Otworowa eksploatacja siarki w kopalniach okolic Tarnobrzega zdewastowała obszary gruntów, poprzez niszczenie struktury geologicznej, deformację terenu i bardzo silne zanieczyszczenie powierzchni (Siuta, 2001). Motowicka-Terelak i Dudka (1991) donoszą, że zdecydowana większość gleb znajdujących się na terenach poeksploatacyjnych siarki Kopalni „Jeziórko” uległa zakwaszeniu, a pH spadło nawet do 4, co skutkowało zniszczeniem roślinności i życia biologicznego w glebie. Do neutralizacji odczynu kwaśnego oraz blokady skupisk siarki, zapelnienia niecek osiadania i ukształtowania rzeźby terenu wykorzystywano odpad płynny ze wzbogacania rudy siarkowej zwany wapnem poflotacyjnym), będący martwym podłożem. Przywrócenie jego użyteczności rozpoczęto od wprowadzenia do martwego podłoża osadów ścieków komunalnych, inicjując w nim aktywność biologiczną i stwarzając warunki do życia i uprawy roślin (Siuta, Jońca, 1997; Siuta, 1998; Jońca, 2000; Warzybok, 2000; Dulewski, Wtorek, 2000). Jest to najbardziej racjonalna metoda, która jednocześnie rozwiązuje problem utylizacji odpadów bytowych i przemysłowych. Prace Klimonta i Górala (2001), Klimonta i wsp. (2002) i Klimonta (2004, 2007) oraz Klimonta i Bulińskiej-Radomskiej (2008) wykazują, że topinambur bulwa i kostrzewa trzcinowa są bardzo przydatne do rekultywacji wapna poflotacyjnego wzbogaconego osadem ściekowym.

Celem prowadzonego doświadczenia było zbadanie wpływu zastosowania zróżnicowanych dawek azotu na wzrost i rozwój dwóch gatunków roślin: kostrzewy trzcinowej i topinamburu, uprawianych na podłożu wapna poflotacyjnego, które nawieziono trzema dawkami osadów ścieków komunalnych.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie prowadzono w latach 2006–2008 na terenie poeksploatacyjnym Kopalni Siarki „Jeziórko” niedaleko Tarnobrzega, pozyskiwanej metodą podziemnego wytopu. Obszary te celem likwidacji zanieczyszczenia i wyrównania zapadlisk terenu pokryto wapnem poflotacyjnym. Jest ono odpadem poflotacyjnym w procesie uzdatniania rudy siarkowej wydobywanej metodą odkrywkową w pobliskiej Kopalni Siarki „Machów”.

Przemieszczano je na pole poeksploatacyjne za pomocą hydrotransportu. Gołda (1993) określa wapno poflotacyjne jako gliny pylaste lekkie. Wiosną 1995 roku nawieziono go osadami ścieków komunalnych w dawkach: 250, 500 i 750 m³·ha⁻¹ i wymieszano z podłożem broną talerzową Jońca (2000). Na przygotowanym podłożu założono dwa niezależne doświadczenia. Na pierwszym o powierzchni 1,2 ha wysiano nasiona kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.), a na drugim o powierzchni 0,3 ha wysadzono bulwy topinamburu *Helianthus tuberosus* L.). Powierzchnia każdego z trzech wariantów nawożenia osadami ścieków w przypadku kostrzewy trzcinowej wynosiła 0,4 ha, a topinamburu 0,1 ha. Każdą z trzech powierzchni wzbogacania dawkami osadów ściekowych w przypadku obydwu gatunków podzielono na cztery równe poletka: kostrzewa po 0,1 ha i topinambur po 0,025 ha) i corocznie wnoszono na nie cztery zróżnicowane dawki azotu: 0 — wariant kontrolny, 50, 100 i 150 kg·ha⁻¹, na tle stałych dawek P₂O₅ i K₂O odpowiednio 30 i 83 kg·ha⁻¹. Na powierzchni każdego wariantu nawożenia azotem kostrzewy trzcinowej, corocznie wyznaczano 10 poletek o powierzchni 1 m².

W doświadczeniu z kostrzewą trzcinową oceniano plon zielonej masy, obsadę roślin, wysokość roślin, liczbę pędów generatywnych wykształconych i niewykształconych. Cechy te określano dwukrotnie przed pierwszym i drugim pokosem. W przypadku topinamburu, pod koniec okresu wegetacji dokonywano losowo pomiaru wysokości 10 roślin, z każdej kombinacji nawożenia azotem na tle każdego poziomu wzbogacania osadami ściekowymi. Obliczeń statystycznych dokonano metodą analizy wariancji dla dwu niezależnych doświadczeń w układzie split-plot, a porównań średnich dokonano za pomocą testu Tukeya przy NIR α = 0,05.

WYNIKI I DYSKUSJA

Warunki pogodowe w latach badań istotnie wpływały na wartość ocenianych cech zarówno kostrzewy trzcinowej jak i topinamburu (tab. 1, 2). Najkorzystniejsze warunki dla rozwoju badanych gatunków roślin wystąpiły w ciepłym i obfitym w opady 2008 roku, mniej korzystne w 2007, a najmniej sprzyjające w chłodnym i skąpym w opady 2006 roku (tab. 1, 2). Wszystkie trzy dawki nawożenia azotem wpływały istotnie na plon zielonej masy kostrzewy trzcinowej, na wszystkich trzech poziomach wzbogacania wapna poflotacyjnego osadami ścieków komunalnych (tab. 3). W przypadku poziomu 250 m³ osadów ściekowych na 1 ha wzrost plonu zielonej masy pod wpływem nawożenia trzema kolejnymi dawkami azotu wzrastał odpowiednio o: 15,1, 29,0 i 30,0% w stosunku do wariantu kontrolnego — 66,90 dt·ha⁻¹. Także na poziomie 500 m³ osadów ściekowych na 1 ha obserwowano wzrost plonu zielonki pod wpływem nawożenia trzema kolejnymi dawkami azotu o: 16,6, 32,3 i 43,6% w porównaniu do wariantu kontrolnego — 67,33 dt·ha⁻¹. Najwyższy plon zielonej masy kostrzewy zebrano z poletek założonych na podłożu wapna poflotacyjnego wzbogaconego dawką 750 m³ osadu ściekowego na 1 ha. Przyrost zielonej masy wskutek zastosowania kolejnych wzrastających dawek azotu wynosił: 14,6; 55,9 i 74,4% w porównaniu z wariantem kontrolnym — 70,53 dt·ha⁻¹.

Tabela 1

Suma opadów miesięcznych oraz średnia miesięczna temperatura powietrza w latach 2006–2008
Monthly rainfall and mean air temperature in the years 2006–2008

Miesiąc Month	Lata — Years					
	2006		2007		2008	
	suma opadów rainfall (mm)	temperatura temperature (°C)	suma opadów rainfall (mm)	temperatura temperature (°C)	suma opadów rainfall (mm)	temperatura temperature (°C)
Styczeń January	26,5	-7,8	48,0	2,7	29,4	0,4
Luty February	26,6	-3,5	22,1	-0,2	11,7	2,3
Marzec March	61,8	-0,4	26,5	6,8	45,8	3,8
Kwiecień April	44,3	9,5	19,6	9,6	59,0	9,4
Maj May	70,8	13,8	32,4	15,9	74,3	13,5
Czerwiec June	62,1	17,5	53,4	19,0	29,4	18,2
Lipiec July	15,1	22,3	103,8	19,4	99,4	18,8
Sierpień August	10,2	17,9	58,3	19,2	31,0	18,9
Wrzesień September	21,6	16,2	106,8	12,9	83,3	12,7
Październik October	19,7	10,6	31,3	8,1	36,8	9,8
Listopad November	41,3	5,3	20,6	1,0	19,2	5,0
Grudzień December	18,4	2,6	10,1	-1,3	37,1	0,9
RO	418,4	8,7	532,9	9,4	556,4	9,5

RO— Roczna suma opadów i średnia roczna temperatura powietrza; Annual of rainfall and average air temperature

Tabela 2

Wartość oznaczonych cech kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.) i topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) w zależności od roku zbioru, niezależnie od nawożenia azotem i poziomu wzbogacenia osadem ściekowym
Some traits of reed fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as affected by the year of harvest, independently on nitrogen doses and the applied sewage sludge levels

Lata Years	Kostrzewa trzcinowa (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)					Topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)
	plon yield (dt·ha ⁻¹)	liczba roślin number of plants (szt/m ²)	liczba pędów generatywnych number of shoots		wysokość roślin height of plants (cm)	wysokość roślin height of plants (cm)
			wykształconych developed	niewykształconych underdeveloped		
2006	76,58	75,1	111,8	5,2	50,2	120,8
2007	84,62	79,5	130,4	7,0	61,2	140,2
2008	97,08	85,1	132,0	7,9	77,8	173,7
NIR ($\alpha=0,05$)	5,68	4,1	5,5	0,8	2,5	4,5
LSD ($\alpha=0,05$)						

Niezależnie od poziomu nawożenia azotowego plon zielonej masy uzyskany z wariantu wzbogaconego najwyższą dawką osadu ściekowego był istotnie wyższy w odniesieniu do uzyskanych z wariantów nawiezionych dawką średnią i najniższą (tab. 3). Otrzymane wyniki korespondują z wcześniejszymi rezultatami autora Klimont (2004), Klimont, Bulińska-Radomska (2008), pokazujące pozytywną reakcję kostrzewy trzcinowej na wzrastające dawki osadów ściekowych. Góral (2001) uznał go za gatunek wyróżniający się wśród traw dużą plastycznością w stosunku do warunków środowiska.

Tabela 3

Wpływ nawożenia azotem na plon zielonej masy, obsadę, liczbę pędów generatywnych wykształconych i niewykształconych i wysokość roślin kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.) oraz wysokość roślin topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) — średnio 2006–2008)
The effect of nitrogen on the yield of green mass, plant density, number of generative shoots (developed and underdeveloped) and height of plants of Reed fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) and plant height of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) — mean 2006–2008

Dawka osadów ściekowych Dose of sewage sludge (m ³ ·ha ⁻¹)	Dawka azotu Dose of nitrogen (kg·ha ⁻¹)	Kostrzewa trzcinowa (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.)					Topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)
		cechy — traits					
		plon yield (dt·ha ⁻¹)	liczba roślin number of plants per area (szt./m ²)	liczba pędów generatywnych number of generative shoots (szt./m ²)		wysokość roślin height of plants (cm)	wysokość roślin height of plants (cm)
				wykształconych developed	niewykształconych underdeveloped		
250	0	66,90	66,9	108,2	5,7	51,5	100,9
	50	77,03	72,1	117,9	7,0	56,8	115,9
	100	86,30	76,0	125,3	7,1	60,5	129,3
	150	87,00	85,7	128,1	6,4	64,2	146,8
$\bar{x}$		79,31	75,2	119,8	6,5	58,3	123,2
500	0	67,33	68,2	111,7	6,7	54,3	123,4
	50	78,50	73,6	118,6	5,1	61,7	147,4
	100	89,07	76,3	125,0	5,8	68,5	160,3
	150	96,67	87,6	136,3	8,0	69,6	174,0
$\bar{x}$		82,89	76,4	122,9	6,4	63,5	151,3
750	0	70,53	75,3	114,6	6,4	57,9	137,0
	50	80,83	77,4	123,1	7,3	65,3	152,9
	100	109,93	98,4	139,8	7,5	71,4	170,1
	150	123,00	101,3	148,4	7,6	75,1	181,0
$\bar{x}$		96,07	88,1	131,5	7,2	67,4	160,2
NIR ($\alpha=0,05$); efekt N LSD ($\alpha=0,05$); N effect		8,55	8,4	13,1	r.n.; n.s.	4,8	24,4
NIR ($\alpha=0,05$); efekt osadu ściekowego LSD ($\alpha=0,05$); sewage sludge effect		5,73	5,8	11,2	r.n.; n.s.	3,8	22,2

r.n ; n.s. — Różnice nieistotne; No significant differences

Obsada roślin kostrzewy trzcinowej ulegała istotnemu zwiększeniu pod wpływem średniej i najwyższej a wysokość roślin pod wpływem każdej dawki nawożenia azotem na wszystkich trzech poziomach wzbogacania wapiennego gruntu osadem ściekowym w porównaniu z wariantem kontrolnym (tab. 3). Bardzo silny system korzeniowy tego

gatunku pozwala bardzo dobrze wykorzystywać składniki pokarmowe wniesione w postaci nawozów azotowych czy też osadów ściekowych (Góral, Sybilska, 2000; Góral, 2001). Liczba pędów generatywnych wykształconych, które wytworzyły rośliny kostrzewy trzcinowej zależała od ilości osadów ściekowych wnoszonych do podłoża oraz dawki azotu zastosowanej do nawożenia kostrzewy, natomiast liczba pędów generatywnych niewykształconych nie ulegała istotnym zmianom pod wpływem tych czynników (tab. 3). Niezależnie od poziomu nawożenia azotem, najwyższa dawka osadu ściekowego wniesiona do podłoża skutkowała wzrostem liczby pędów generatywnych w stosunku do najmniejszej dawki osadu, a średnie i najwyższe dawki azotu istotnie wpływały na zwiększenie wartości tej cechy na każdym z trzech poziomów wzbogacania podłoża osadami ściekowymi (tab. 3). Niezależnie od lat badań najwyższe i średnie dawki azotu na każdym z wariantów wzbogacania podłoża osadami ścieków wpływały na istotny wzrost obsady i liczby wykształconych pędów generatywnych a wszystkie poziomy nawożenia azotem na wysokość roślin kostrzewy, co istotnie wpływało na przyrost plonu zielonej masy. Osady ściekowe aplikowane w trzech zróżnicowanych dawkach do wapna poflotacyjnego oddziaływały mniej efektywnie na wartość badanych cech niż nawożenie azotowe. Należy przypuszczać, że wynika to z faktu, iż zastosowano je na kilka lat przed okresem, z którego pochodzą prezentowane wyniki i efekt ich oddziaływania staje się z roku na rok coraz mniej widoczny, pomimo że wraz z osadami wprowadzono do podłoża ogromne ilości materii organicznej i składników pokarmowych.

Aplikując dawkę $250 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ wniesiono około 25 dt azotu, 5 dt fosforu, około 3 dt wapnia i 0,75 dt magnezu oraz prawie 530 dt substancji organicznej Klimont i in., 2002). Podwójna i potrójna dawka osadu ściekowego z wielokrotniła ilość składników pokarmowych i materii organicznej wnoszonej do podłoża. Inne badania autora (Klimont i Góral, 2001; Klimont i in., 2002; Klimont, 2004, 2007; Klimont, Bulińska-Radomska, 2008) wskazują, że wapno poflotacyjne zastosowane do rekultywacji terenów poeksploatacyjnych siarki, wzbogacone osadem ściekowym wraz z porastającą roślinnością tworzy sprzyjające warunki do inicjacji procesów glebotwórczych, w wyniku których tworzy się substancja organiczna, wzrasta również zawartość przyswajalnych P, K, Mg w podłożu wraz ze wzrostem wysokości dawki osadu. Wyniki Górala (2001), Klimonta (2004) oraz Klimonta i Bulińskiej-Radomskiej (2008) wskazują, że kostrzewa trzcinowa jest gatunkiem polecanym do rekultywacji gruntów bezglebowych ze względu na duże zdolności przystosowawcze do warunków środowiska, bardzo silny system korzeniowy, małe wymagania pokarmowe i trwałość w runi, a właśnie takie trudne warunki panują na terenie poeksploatacyjnym Kopalni Siarki „Jeziorko”, szczególnie w okresie letniej suszy. Również Góral i Sybilska (2000) polecają ten gatunek jako przydatny do rekultywacji biologicznej terenów zdewastowanych.

Średnia i najwyższa dawka azotu powodowała istotny przyrost wysokości roślin topinamburu w stosunku do kontroli na wszystkich trzech poziomach wzbogacania podłoża osadami ściekowymi (tab. 3). Wysokość roślin była zróżnicowana i wahała się od 100,9 do 181,0 cm i rosła wraz ze wzrostem ilości osadu wzbogacającego podłoże i wysokością dawek azotu. Jest to zgodne z doniesieniami Górala (1996) stwierdzającymi, że topinambur wykazuje duże zapotrzebowanie na azot. Niezależnie od dawek azotu, średni i najwyższy

wariant wzbogacenia osadem ściekowym istotnie wpływał na wysokość roślin topinamburu (tab. 3). Wcześniejsze badania (Klimont, Góral 2001; Klimont i in., 2002; Klimont, Bulińska-Radomska, 2008) wskazują, że topinambur (bulwa) ze względu na zapas wody i cukrów w bulwach bardzo dobrze rośnie na podłożu wapna poflotacyjnego i pozytywnie reaguje przyrostem wysokości na wzrastające dawki osadów ściekowych.

WNIOSKI

1. Plon zielonej masy wzrastał pod wpływem rosnącej dawki nawożenia azotowego na wszystkich trzech poziomach wzbogacania wapna poflotacyjnego osadami ściekowymi w stosunku do wariantu kontrolnego.
2. Obsada roślin kostrzewy trzcinowej oraz liczba pędów generatywnych wykształconych wytworzonych przez ten gatunek ulegała istotnemu zwiększeniu pod wpływem średniej i najwyższej, a wysokość pod wpływem każdej dawki nawożenia azotem na wszystkich trzech poziomach wzbogacania wapna poflotacyjnego osadem ściekowym w stosunku do wariantu kontrolnego.
3. Wysokość roślin topinamburu była zróżnicowana i wahała się od 100,9 do 181,0 cm. Średnie i najwyższe dawki istotnie wpływały na przyrost wysokości roślin w stosunku do kontroli na wszystkich wariantach wzbogacania gruntu wapiennego osadami ściekowymi.
4. Niezależnie od poziomu nawożenia azotem wprowadzenie do podłoża najwyższej dawki osadu ściekowego istotnie wpłynęło na obsadę roślin, plon zielonej masy i liczbę pędów generatywnych wykształconych, wytworzonych przez rośliny kostrzewy trzcinowej w stosunku do najniższej dawki osadu, a w przypadku wysokości roślin kostrzewy i topinamburu taki sam efekt spowodowało wzbogacenie podłoża najwyższą i średnią dawką osadu.
5. Zróżnicowane dawki azotu okazały się bardziej efektywne niż aplikowane osady ściekowe na wartość badanych cech obydwu gatunków roślin.

LITERATURA

- Dulewski I., Wtorek L. 2000. Problemy przywracania wartości użytkowych gruntom zdewastowanym działalnością górniczą. Ochrona i rekultywacja gruntów. Inżynieria Ekologiczna 1, PTIE Baranów Sandomierski: 14 — 22.
- Gołda T. 1993. Przemiany siarki elementarnej zawartej w szlamie poflotacyjnym pod wpływem rekultywacyjnych zabiegów uprawowych. Zesz. Nauk. AGH Nr 1496, Sozologia i Socjotechnika z. 137: 67 — 75.
- Góral S. 1996. Topinambur — słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.). W: Nowe rośliny uprawne na cele spożywcze i przemysłowe jako odnawialne źródło energii. SGGW, Warszawa: 76 — 86.
- Góral S. 2001. Roślinność zielna w ochronie i rekultywacji gruntów. Inżynieria. Ekologiczna 3, PTIE, Bydgoszcz: 161 — 178.
- Góral S., Sybilska A. 2000. Przydatność polskich odmian hodowlanych (*Festuca arundinacea* Schreb.) do rekultywacji gruntów zdewastowanych. Łąkarstwo w Polsce 3, Poznań: 199 — 204.
- Jońca M. 2000. Zastosowanie osadów ściekowych w rekultywacji gruntów Kopalni Siarki „Jeziórko”. Inżynieria Ekologiczna 1, PTIE, Baranów Sandomierski: 27 — 30.

- Klimont K., Bulińska-Radowska Z. 2008. Przydatność wybranych gatunków roślin do rekultywacji podłoża wapna poflotacyjnego w różnych warunkach agrotechnicznych. *Problemy Inżynierii Rolniczej* 159): 99 — 108.
- Klimont K., Góral S. 2001. Glebotwórcze działanie traw i topinamburu na gruncie wapna poflotacyjnego. *Inżynieria Ekologiczna* 3, PTIE, Bydgoszcz: 198 — 201.
- Klimont K., Góral S., Jońca M. 2002) Rekultywacyjna efektywność osadów ściekowych na podłożu wapna poflotacyjnego. *Biul. IHAR* 223/224: 415 — 425.
- Klimont K. 2004. Przydatność wybranych gatunków roślin użytkowych do rekultywacji terenów zdewastowanych. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 497: 673 — 684.
- Klimont K. 2007. Ocena przydatności wybranych gatunków roślin użytkowych do rekultywacji terenów zdewastowanych przez przemysł i gospodarkę komunalną. *Problemy Inżynierii Rolniczej*, 2 56): 27 — 36.
- Motowicka-Terelak T., Dudka S. 1991. Degradacja chemiczna gleb zanieczyszczonych siarką i jej wpływ na rośliny pastewne. *IUNG Puławy R* 224): 95 ss.
- Siuta J. 1998. Materiały stosowane w rekultywacji gruntów w: *Rekultywacja gruntów*. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa: 169 — 180.
- Siuta J. 2001. Rekultywacja gruntów w górnictwie siarkowym. *Inżynieria Ekologiczna* 3, PTIE Bydgoszcz, 192 — 198.
- Siuta J., Jońca M. 1997) Rekultywacyjne działanie osadu ściekowego na wapnie poflotacyjnym w Kopalni Siarki „Jeziórko”. *Mat. konf. „Przyrodnicze użytkowanie osadów ściekowych” IOS, Puławy-Lublin-Jeziórko*, 26-28 V 1997: 39 — 48.
- Warzybok W. 2000) Rekultywacja terenów górniczych Kopalni Siarki „Jeziórko”. *Inżynieria Ekologiczna* 1, PTIE Baranów Sandomierz: 23 — 26.

ZBIGNIEW BRODA¹**AGNIESZKA DOBRZYCKA**^{1, *}**JAN BOCIANOWSKI**²¹ Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu² Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Podobieństwo genetyczne różnych populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.) a ich potencjał plonowania

Genetic similarity of various populations of alfalfa (*Medicago sativa* L. sl.) and their seed yield potential

Dla 16 zróżnicowanych genotypowo populacji lucerny siewnej przeprowadzono obserwacje wybranych cech składających się na plon nasion, takich jak liczba strąków w owocostanie, liczba nasion w strąku, plon nasion z owocostanu oraz płodność. Dla tych samych 16 populacji wykonano w dwóch powtórzeniach analizę podobieństwa genetycznego z wykorzystaniem markerów RAPD. Do analiz użyto DNA izolowanego dwiema metodami (pierwsza — metoda Thomsona-Henry'ego oraz druga — metoda kolumnkowa) w celu zaobserwowania różnic w wynikach obu analiz. Dendrogramy podobieństwa otrzymane w wyniku obu analiz wyraźnie się różniły. W pierwszej serii markerów RAPD na dendrogramie podobieństwa wyróżniono 4 grupy, a w drugiej 5 grup podobieństwa genetycznego. Następnie wykonano analizę wariancji w celu sprawdzenia, czy zmienność obserwowanych cech jest większa pomiędzy, czy w obrębie grup podobieństwa.

Słowa kluczowe: lucerna, plon nasion, RAPD-PCR

Several traits affecting seed yield were observed in 16 genetically differentiated populations of alfalfa. The analyzed traits included number of pods per infructescence, number of seeds per pod, seed yield per infructescence and fertility. An analysis of genetic similarity was carried out for the populations using RAPD markers, in two series. For the first series the DNA was isolated using the Thomson-Henry's method and for the other series – with the column method. The dendrograms of genetic similarity varied for both methods and included four and five groups of similarity, respectively. Variability of the observed traits was compared between and within the similarity groups using analysis of variance.

Key words: alfalfa, RAPD-PCR, seed yield

* Autor jest stypendystą w ramach działania 8.2 PO KL współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu Państwa

WSTĘP

Lucerna siewna jest rośliną, z której można otrzymać duży plon zielonej masy o bardzo wysokiej zawartości białka i dużej zawartości witamin. Brak nasion produkcji krajowej uniemożliwia szersze rozpowszechnienie upraw lucerny. Szacuje się, że zaledwie 5% zapotrzebowania na nasiona pokrywa produkcja krajowa, pozostałe 95% pochodzi z importu. Przyczyną małego zainteresowania krajowym materiałem jest złe wiązanie strąków i nasion mogące wynikać z lokalnych warunków pogodowych: stosunkowo niskiej temperatury, słabego nasłonecznienia, a także niekorzystnego rozkładu opadów w okresie kwitnienia. Słabe wiązanie strąków i nasion może być także spowodowane właściwościami danego genotypu lucerny (Julier i in., 1995). Hodowlę nasienną tego gatunku utrudnia poligeniczny charakter cech ilościowych, mających wpływ na plonowanie lucerny oraz ich silna zależność od czynników środowiskowych (Volenec i in., 2002).

W niniejszej pracy do oceny podobieństwa genetycznego badanych populacji lucerny siewnej wykorzystano markery RAPD. Celem pracy była ocena zależności pomiędzy cechami fenotypowymi a podobieństwem genetycznym badanych populacji lucerny siewnej, tzn. czy w wyróżnionych na podstawie dendrogramu grupach podobieństwa genetycznego znajdują się obiekty o podobnych wartościach danej cechy, przy równoczesnych istotnych statystycznie różnicach pomiędzy grupami. Porównanie podobieństwa obserwowanego na poziomie genotypu oraz fenotypu pozwala na ocenę modyfikującego wpływu środowiska na ekspresję informacji genetycznej zawartej w DNA rośliny.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem roślinnym było 16 populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.), pochodzących z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Obiektami badań były: 2 ekotypy (27, 212); 4 odmiany (Radius, Du Puits, Sitel, Vernal); 2 populacje syntetyczne (Syn 9-3, Syn 7-3); 2 linie wsobne S5 (B₁₀, F); 2 mieszańce pojedyncze (B₁₀×F, F×B₁₀); 3 mutanty ('lp'— długogroniasty, 'br'— wiechowaty, 'tf'— samokończący); odmiana Ulstar (długogroniasta, wyhodowana z mutantu 'lp'). Próby do badań molekularnych oraz do analizy struktury plonu nasion pobierano z roślin rosnących w ogrodzie doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Doświadczenie założone zostało w czerwcu 2005 roku, w układzie bloków losowych o wymiarach 13×3m w 3 powtórzeniach.

Markery molekularne RAPD-PCR otrzymywano zgodnie z procedurą opisaną poniżej: fragmenty liści przeznaczonych do izolacji DNA pobierano z 10 losowo wybranych roślin z każdego badanego obiektu. Całkowity DNA izolowano dla każdej z roślin osobno, a następnie sporządzano próbę zbiorczą reprezentującą daną populację.

Izolację DNA przeprowadzano dwiema metodami. Pierwszą była metoda Thomsona-Henry'ego (Thomson i Henry, 1995). Fragmenty liści o powierzchni 50 mm² inkubowano w 200 µl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA.

Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut. Po inkubacji zbierano supernatant zawierający DNA.

Drugą metodą izolacji była metoda kolumnkowa z wykorzystaniem zestawu odczynników Qiagen DNeasy Plant Kit. Fragmenty liści o powierzchni 50 mm² umieszczano w probówkach z ciekłym azotem i rozcierano tkankę roślinną na proszek. Izolację DNA prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana, 1M Tris HCl, MgCl₂ (25 mM), BSA (20 mg/ml), dNTP (2 mM), starter, Taq polimeraza (5u/µl), DNA. Amplifikację przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 firmy BIOMETRA. Na przebieg reakcji PCR składało się 45 cykli; denaturacja DNA zachodziła w 94°C, przyłączanie starterów w 37°C, natomiast synteza nowych nici w 72°C. Elektroforezę produktów amplifikacji prowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Zdjęcia produktów amplifikacji wykonywane były w świetle UV. Analizę z każdym ze starterów powtarzano dwa razy, wybierając do dalszego opracowania jednie powtarzające się prążki.

Podobieństwo genetyczne (GS) badanych obiektów oszacowano stosując miarę Nei i Li (1979), wyliczając współczynniki 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. Współczynniki te posłużyły do hierarchicznego grupowania obiektów metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu.

Dla obu analiz podobieństwa (wykonanych na DNA wyizolowanych różnymi metodami) wykorzystano liczbę produktów amplifikacji wygenerowanych w reakcjach z poszczególnymi starterami. Cechy struktury plonu nasion określano w następujący sposób: dla każdego obiektu w każdym bloku pobierano losowo po 10 dojrzałych owocostanów, na podstawie których wyznaczono liczbę strąków oraz liczbę nasion. Na tej podstawie obliczano liczbę nasion w strąku. Następnie nasiona ważono w celu obliczenia masy (plonu) nasion z owocostanu. Płodność obliczano dzieląc liczbę nasion w strąku przez liczbę zalążków w zalążni i podając wynik w procentach. Obserwacje te powtarzano w 2 kolejnych latach. Dla otrzymanych wyników obliczono średnie, a następnie wykonano analizę wariancji (z grupami wyznaczonymi na podstawie dendrytów jako czynnikiem) w celu ustalenia, czy zmienność poszczególnych cech jest większa w obrębie wyróżnionych grup podobieństwa, czy też pomiędzy tymi grupami. Wszystkie obliczenia wykonano korzystając z pakietu statystycznego Genstat (Genstat 5 Committee, 1993).

WYNIKI

Spośród 35 przetestowanych starterów oligonukleotydowych wybrano 10, które dawały najwięcej produktów amplifikacji. Były to startery OPA 01 (CAGGCCCTTC), OPA 03 (AGTCAGCCAC), OPA 04 (AATCGGGCTG), OPA 07 (GAAACGGGTG), OPB 07 (GGTGACGCAG), OPC 08 (TGGACCGGTG), OPC 18 (TGAGTGGGTG), OPE 14 (TGCGGCTGAG), OPI 02 (GGAGGAGAGG), OPJ 20 (AAGCGGCCTC).

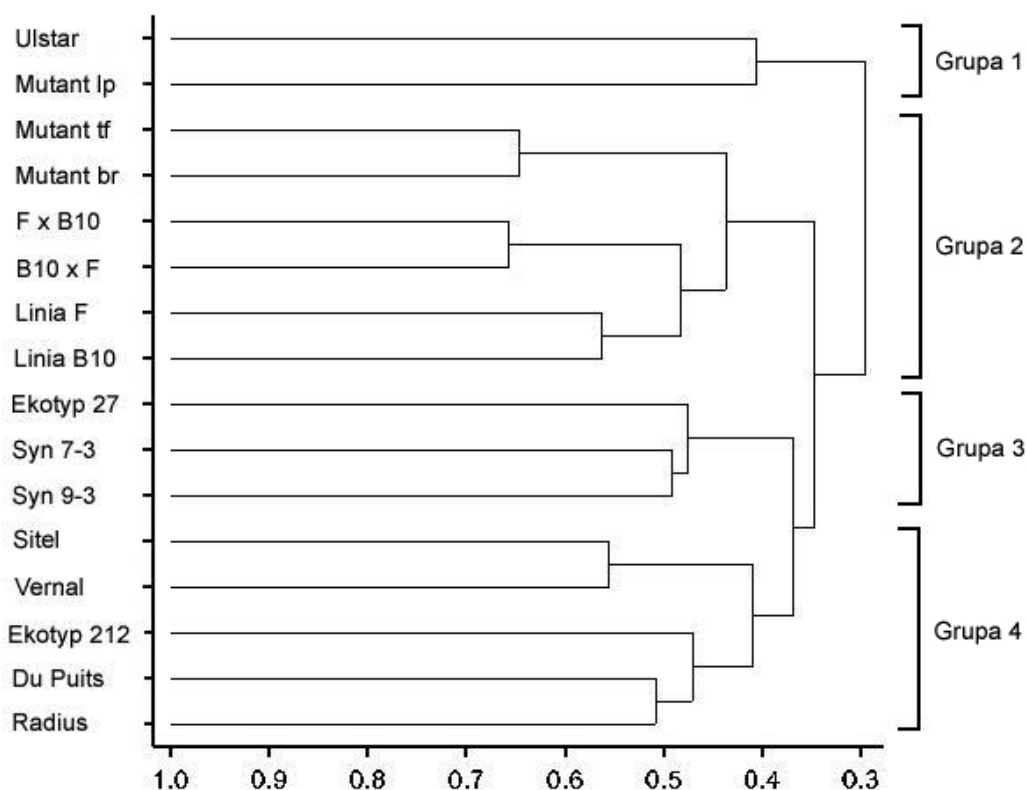
Używając dziesięciu wybranych starterów wykonano dwie serie analiz techniką RAPD, z wykorzystaniem DNA izolowanego dwiema metodami. W zależności od metody izolacji DNA użytego do reakcji PCR otrzymano różną liczbę produktów amplifikacji. Stosując DNA izolowane metodą Thomsona-Henry'ego najmniejszą liczbę produktów amplifikacji uzyskano przy zastosowaniu startera OPB 07 (średnio 3,5 w przeliczeniu na populację) (tab. 1). Największą liczbę produktów amplifikacji wygenerowano stosując starter OPA 01 (6,3 w przeliczeniu na populację). W przypadku, gdy do reakcji użyto DNA izolowanego metodą kolumnkową, liczba produktów dla jednej populacji wynosiła średnio od 6,7 przy użyciu startera OPE 14 do 10,6 w przypadku startera OPB 07. Zauważono, że przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą kolumnkową średnia liczba wygenerowanych prążków była prawie dwukrotnie wyższa niż w przypadku, gdy wykorzystano DNA izolowany metodą Thomsona-Henry'ego (tab. 1). Liczba wszystkich uzyskanych produktów polimorficznych wynosiła dla metody Thomsona-Henry'ego 178, natomiast dla metody kolumnkowej 512 (dla dziesięciu testowanych starterów).

Tabela 1

Średnia liczba produktów amplifikacji wygenerowanych dla jednej populacji przez każdy z użytych starterów

Average number of amplification products generated for every population by the used primers		
Starter primer	Metoda I Method I	Metoda II Method II
OPA 01	6,3	9,1
OPA 03	5,3	9,7
OPA 04	4,4	8,8
OPA 07	4,1	6,8
OPB 07	3,5	10,6
OPC 08	4,1	7,2
OPC 18	5,2	8,9
OPE 14	4,2	6,7
OPI 02	5,1	8,5
OPJ 20	4,0	7,7
Średnia Average	4,6	8,4

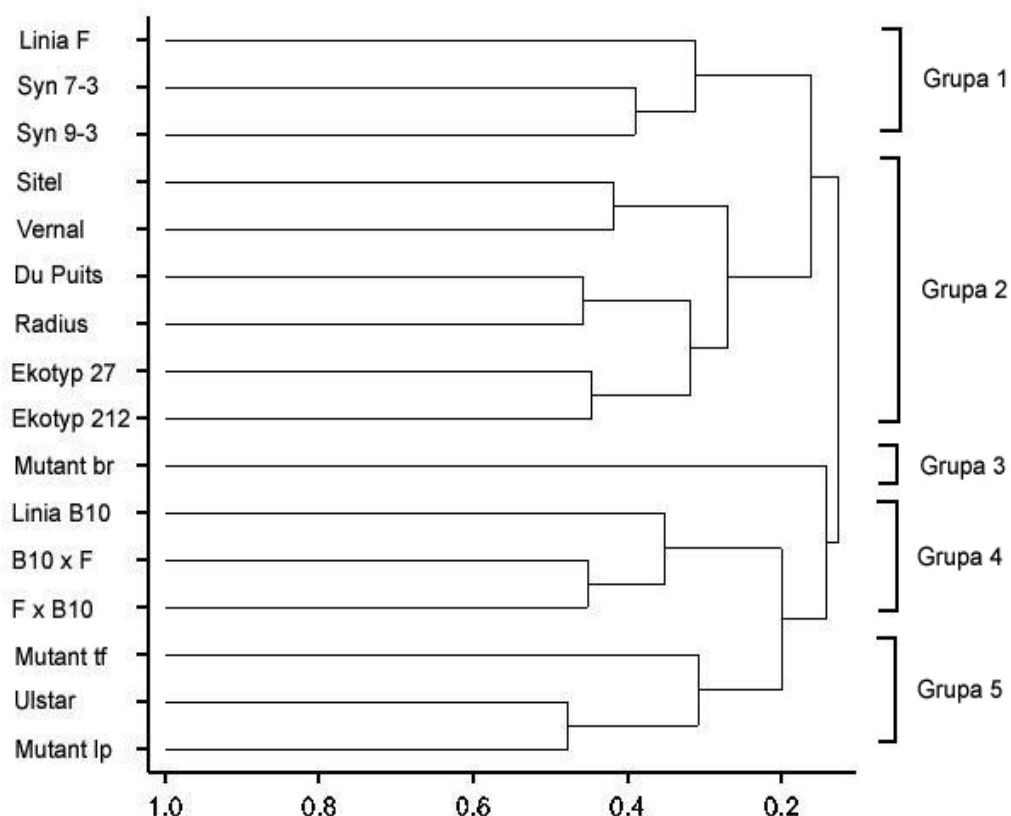
Wynik analizy podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR także różnił się w zależności od metody izolacji DNA. Przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego badane populacje utworzyły cztery grupy zróżnicowania genetycznego, wyróżnione na poziomie 0,4. Podobieństwo między tymi populacjami wahało się od 0,3 do 0,65 (rys. 1). W grupie pierwszej znalazły się odmiana Ulstar i mutant *lp*. Podobieństwo genetyczne pomiędzy tymi obiektami wynosiło 0,4. Grupę drugą utworzyły linie F oraz B₁₀, mieszańce F×B₁₀ i B₁₀×F oraz mutanty *tf* i *br*, pomiędzy którymi podobieństwo wahało się od 0,5 do 0,65. Grupę trzecią utworzyły dwie populacje syntetyczne — Syn 9-3 i Syn 7-3 oraz ekotyp 27, wykazujące podobieństwo w granicach 0,47–0,49. W grupie czwartej znalazły się odmiany Du Puits, Radius, Sitel i Vernal oraz ekotyp 212. Podobieństwo genetyczne w tej grupie wahało się od 0,41 do 0,56.



Rys. 1. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi obiektami — analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry’ego

Fig. 1. Dendrogram of genetic similarity between the examined objects — analysis made with DNA isolated by the Thomson - Henry method

W przypadku, gdy do badania podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR użyto DNA izolowanego metodą kolumnkową wynik analizy był inny niż wówczas, gdy używano DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry’ego. Obiekty na dendrogramie będącym wynikiem tej analizy utworzyły pięć grup podobieństwa genetycznego, którego wartość wahała się od 0,15 do 0,48 (rys. 2). W grupie pierwszej znalazły się populacje syntetyczne Syn 7-3 i Syn 9-3 oraz linia F; podobieństwo między nimi wahało się od 0,32 do 0,4. Grupę drugą utworzyły odmiany Du Puits, Radius, Sitel i Vernal oraz ekotypy 27 i 212, pomiędzy którymi podobieństwo wynosiło od 0,28 do 0,45. W grupie trzeciej znalazł się jedynie mutant *br*. Grupa czwarta utworzona została przez linię B₁₀ i mieszańce F×B₁₀ oraz B₁₀×F. Podobieństwo genetyczne w tej grupie wahało się od 0,35 do 0,45. W grupie piątej znalazły się mutanty *lp*, *tf*, oraz odmiana Ulstar, wykazujące podobieństwo na poziomie 0,32–0,48.



Rys. 2. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi obiektami — analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą kolumnkową

Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity between the examined objects — analysis made with DNA isolated by the column method

Wartości średnie, zakres i współczynniki zmienności oraz wartości NIR dla obserwowanych cech struktury plonu nasion zestawiono w tabeli 2. W roku 2006 największą średnią liczbę nasion w strąku osiągnęła linia F, natomiast najniższą mieszaniec pojedynczy $F \times B_{10}$. W roku 2007 najniższą liczbę nasion przypadających na strąk zanotowano u odmiany Ulstar, a najwyższą u odmian Radius i Vernal. Warto zauważyć, iż w roku 2007 średnie wartości tej cechy były niemal dla wszystkich obiektów wyższe niż w roku 2006.

Tabela 2

Zmienność czterech obserwowanych cech struktury plonu w badanych populacjach lucerny
Variability of the observed features of seed yield structure in the examined populations of alfalfa

Obiekty Objects	Liczba nasion w strąku Number of seeds per pod							
	2006				2007			
	min	średn.	max	CV	min	średn.	max	CV
Ekotyp 27	0,43	1,43	2,24	64,32	1,38	2,02	2,60	30,26
Ekotyp 212	0,74	1,41	1,96	43,85	1,62	1,87	2,01	11,61
Du Puits	1,04	1,52	2,08	34,39	1,92	2,48	3,04	22,58
Radius	0,86	1,15	1,34	22,30	1,68	2,50	3,30	32,41
Sitel	0,60	1,42	2,36	62,60	1,42	1,79	2,14	20,12
Vernal	0,92	1,41	1,92	35,48	1,14	2,50	4,12	60,28
Syn 7-3	0,38	0,69	0,86	38,79	1,14	1,76	2,44	36,86
Syn 9-3	1,42	1,96	2,70	33,69	1,50	2,37	3,26	37,08
Linia F	0,66	1,19	1,88	52,31	1,56	2,25	3,40	44,39
Linia B ₁₀	0,60	0,83	1,17	36,20	1,88	2,02	2,26	10,33
FxB ₁₀	0,50	0,55	0,60	9,10	1,66	2,41	3,34	35,36
B ₁₀ xF	1,54	1,75	1,86	10,54	1,64	2,10	2,72	26,55
Ulstar	0,96	1,43	1,74	29,01	1,04	1,53	1,80	27,89
Mutant <i>lp</i>	0,68	1,31	1,66	41,83	1,72	1,91	2,08	9,48
Mutant <i>tf</i>	0,87	0,98	1,10	11,70	1,56	1,65	1,70	4,889
Mutant <i>br</i>	0,62	1,17	1,58	42,31	1,34	1,59	2,04	24,35
NIR _{0,05}	0,869				1,13			
LSD _{0,05}								
Obiekty Objects	Liczba strąków w owocostanie Number of pods per infructescence							
	2006				2007			
	min	średn.	max	CV	min	średn.	max	CV
Ekotyp 27	9,6	12,73	14,4	21,33	9,6	10,60	11,2	8,22
Ekotyp 212	14,0	15,06	17,2	12,26	9,0	10,93	12,4	15,98
Du Puits	15,2	18,06	19,6	13,75	14,8	15,20	15,6	2,63
Radius	12,2	13,93	15,0	10,87	8,4	11,00	14,2	26,78
Sitel	15,6	16,53	18,0	7,78	12,0	13,20	14,8	10,93
Vernal	11,8	12,06	12,6	3,83	10,6	11,66	12,6	8,63
Syn 7-3	12,2	13,86	15,8	13,09	13,4	14,46	15,0	6,39
Syn 9-3	11,0	12,53	13,8	11,32	10,6	11,40	12,8	10,67
Linia F	14,2	15,40	16,8	8,52	10,6	12,73	16,0	22,56
Linia B ₁₀	13,2	15,53	18,2	16,20	11,0	12,00	12,8	7,63
FxB ₁₀	11,0	14,93	20,4	32,71	9,8	11,80	15,6	27,90
B ₁₀ xF	15,4	18,66	21,2	15,90	11,6	12,80	14,4	11,27
Ulstar	16,4	21,06	26,0	22,81	14,6	20,46	26,0	27,89
Mutant <i>lp</i>	10,2	15,86	20,2	32,34	21,8	23,73	26,2	9,47
Mutant <i>tf</i>	12,2	15,86	20,8	27,97	12,2	13,20	14,0	6,94
Mutant <i>br</i>	15,0	18,53	22,4	20,02	12,2	13,80	15,4	11,59
NIR _{0,05}	5,093				3,75			
LSD _{0,05}								

c.d. Tabela 2

Obiekty Objects	Plon nasion z owocostanu Seed yield per infructescence [mg]							
	2006				2007			
	min	średn	max	CV	min	średn	max	CV
Ekotyp 27	13,3	48,6	67,8	62,61	31,7	42,8	52,6	24,39
Ekotyp 212	37,7	50,8	63,3	26,07	38,4	49,4	58,2	20,14
Du Puits	37,3	54,3	80,6	37,85	57,4	75,3	90,3	24,13
Radius	21,6	37,1	46,8	36,96	30,3	50,2	70,4	36,86
Sitel	24,2	42,4	70,4	60,95	38,2	44,7	50,5	12,67
Vernal	23,8	36,8	52,3	39,85	28,4	58,3	10,6	64,48
Syn 7-3	9,4	28,2	53,6	78,16	31,7	51,5	80,2	49,23
Syn 9-3	38,6	49,3	60,7	28,27	33,4	55,9	70,3	37,19
Linia F	22,3	57,9	12,2	96,53	33,8	52,5	80,3	40,72
Linia B ₁₀	18,8	37,2	73,3	82,33	42,4	45,2	50,6	8,663
FxB ₁₀	8,8	18,9	35,8	75,69	35,8	59,4	101,8	55,92
B ₁₀ xF	68,4	70,5	70,4	4,97	40,6	55,7	80,4	33,33
Ulstar	40,6	71,5	110,8	45,37	32,5	65,1	91,5	44,62
Mutant <i>lp</i>	27,3	45,2	80,2	59,86	50,4	60,3	70,3	16,88
Mutant <i>tf</i>	26,5	34,5	46,5	31,11	44,2	47,4	48,1	4,784
Mutant <i>br</i>	25,1	56,6	70,6	47,81	38,1	40,4	43,8	5,33
NIR _{0,05}	0,042				0,033			
LSD _{0,05}								
Obiekty Objects	Płodność Fertility							
	2006				2007			
	min	średn	max	CV	min	średn	max	CV
Ekotyp 27	4,13	15,60	21,54	63,70	13,27	20,19	25,00	30,43
Ekotyp 212	6,92	14,39	18,32	44,99	15,14	18,75	22,62	19,98
Du Puits	9,81	13,71	19,62	37,96	18,11	23,40	28,68	22,59
Radius	7,75	12,13	17,30	39,75	15,14	22,52	29,73	32,40
Sitel	6,90	14,86	27,13	72,50	16,32	20,61	24,60	20,13
Vernal	8,44	12,78	17,61	36,03	10,46	22,93	37,8	60,28
Syn 7-3	4,18	9,45	15,16	58,24	12,53	19,41	26,81	36,85
Syn 9-3	10,53	15,55	23,68	45,65	13,16	20,82	28,60	37,08
Linia F	6,23	17,73	37,17	95,42	14,72	21,26	32,08	44,39
Linia B ₁₀	5,04	9,86	18,49	75,97	15,80	16,97	18,99	10,33
FxB ₁₀	5,00	6,00	7,40	20,82	16,60	24,13	33,40	35,36
B ₁₀ xF	14,95	18,06	21,17	17,22	15,92	20,38	26,41	26,56
Ulstar	10,00	16,67	21,88	36,43	10,83	15,97	18,75	27,90
Mutant <i>lp</i>	7,23	17,02	26,17	55,74	18,30	20,36	22,13	9,48
Mutant <i>tf</i>	8,53	10,78	14,22	28,02	15,29	16,21	16,67	4,915
Mutant <i>br</i>	6,26	13,26	17,58	46,14	13,54	16,09	20,61	24,35
NIR _{0,05}	12,72				10,89			
LSD _{0,05}								

W przypadku liczby strąków w owocostanie, ich największą średnią liczbę w roku 2006 zawiązała odmiana Ulstar (21,07 szt.), natomiast najmniejszą odmiana Vernal (12,07 szt.). W roku 2007 najwyższą liczbą strąków w owocostanie charakteryzował się mutant *lp* (23,73 szt.), a najniższą ekotyp 27 (średnio 10,6 strąka). Najwyższym średnim plonem nasion z owocostanu odznaczała się w roku 2006 odmiana Ulstar (71,5 mg), a w roku 2007 odmiana Du Puits (75,3 mg). Najmniejszą masę nasion z jednego owocostanu stwierdzono

w 2006 roku u mieszańca $F \times B_{10}$ (18,9 mg), a w roku 2007 u mutantu *br* (40,4 mg). Średnia płodność w roku 2006 wahała się od 6% u mieszańca $F \times B_{10}$ do 18% u mieszańca $B_{10} \times F$. W roku mieszańiec 2007 $F \times B_{10}$ osiągnął najwyższą płodność (24%), natomiast płodnością najniższą cechowała się odmiana Ulstar (16%).

Wyniki analizy wariancji zestawiono w tabelach 3 oraz 4. Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku uwzględniającej podział obiektów na grupy według dendrogramu otrzymanego przy wykorzystaniu metody izolacji Thomsona-Henry'ego przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku dla dendrogramu powstałego z wykorzystaniem metody Thomsona-Henry'ego
Mean squares from analysis of variance for the observed features in 2006 and 2007, for the dendrogram created with the Thomson-Henry method

Rok Year	Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Cecha Trait			
			liczba strąków w owocostanie number of pods per infructescence	liczba nasion w strąku number of seeds per pod	plon nasion z owocostanu seed yield per infructescence	płodność fertility
2006	grupy groups	3	41,79*	0,3247	37,9	26,85
	błąd residual	44	10,22	0,3163	63,4	52,19
2007	grupy groups	3	162,46***	0,385	34,3	24,4
	błąd residual	44	5,703	0,4284	34,35	36,57

* Istotne na poziomie 0,05; Significant at level 0.05

*** Istotne na poziomie 0,001; Significant at level 0.001

Tabela 4

Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku dla dendrogramu powstałego z wykorzystaniem metody kolumnkowej
Mean squares from analysis of variance for the observed features in 2006 and 2007, for the dendrogram created with the column method

Rok Year	Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Cecha Trait			
			liczba strąków w owocostanie number of pods per infructescence	liczba nasion w strąku number of seeds per pod	plon nasion z owocostanu seed yield per infructescence	płodność fertility
2006	grupy groups	4	26,39	0,1883	15,81	16,68
	błąd residual	43	10,91	0,3288	66,05	53,73
2007	grupy groups	4	84,573***	0,5782	17,1	35,32
	błąd residual	43	9,303	0,4114	35,95	35,84

*** Istotne na poziomie 0,001, Significant at level 0.001

Analizę wariancji grup wyróżnionych na podstawie dendrogramu wykreślonego na podstawie analizy RAPD z wykorzystaniem izolacji metodą kolumnkową przedstawiono w tabeli 4. W przypadku tej metody otrzymywania markerów RAPD obserwowano zależności pomiędzy podobieństwem genetycznym a cechami fenotypowymi jedynie dla liczby strąków w owocostanie w drugim roku obserwacji (2007), przy czym była to zależność istotna na poziomie 0,001. Analiza ta wykazała, że grupy wyróżnione na dendrogramie podobieństwa różniły się istotnie statystycznie jedynie w przypadku liczby strąków w owocostanie (w roku 2006 wartości tej cechy dla poszczególnych grup różniły się istotnie na poziomie 0,05, natomiast w roku 2007 na poziomie 0,001). Dla pozostałych cech grupy wyznaczone na podstawie analizy molekularnej nie miały przełożenia na podobieństwo pod względem cech fenotypowych.

DYSKUSJA

Do oceny dystansu genetycznego badanych genotypów lucerny użyto markerów RAPD. Technika ta jest wykorzystywana między innymi do: określenia pochodzenia materiałów mieszańcowych, identyfikacji gatunków oraz odmian hodowlanych (Hu i Quiros 1991; Weder Jurgen, 2002), oceny dystansu lub podobieństwa genetycznego (Marilla i Scoles, 1996; Irzykowska i Bocianowski, 2008), identyfikacji markerów sprzężonych z genami warunkującymi korzystne cechy ilościowe (Waugh i Powell, 1992) oraz jakościowe — między innymi odporności na patogeny (Schachermayr i in., 1994), badania polimorfizmu wewnątrzgatunkowego i międzygatunkowego u wielu gatunków (Brown i in. 1993). Segregacje markerów RAPD wg praw Mendla oraz ich dziedziczenie obserwowano np. u jęczmienia, lucerny oraz soi (Williams i in., 1990, Echt i in., 1992). Przy testowaniu lucerny markerami RAPD zmienność wewnątrz populacji jest zwykle bardzo wysoka. Prawdopodobnie wynika to z obcypylności tego gatunku oraz tego, iż lucerna jest w większości tetraploidalna (Crochemore i in., 1996).

Najczęściej napotykanym problemem przy posługiwaniu się techniką RAPD jest słaba powtarzalność uzyskanych wyników, wynikająca z wrażliwości tej metody na zmiany warunków amplifikacji (Słomski, 2001). Liczba, powtarzalność i intensywność produktów otrzymanych w technice RAPD są funkcją wielu parametrów: stężenia chlorku magnezu, trójfosforanów deoksynukleotydów, *Taq* polimerazy DNA, koncentracji oraz metody izolacji DNA, liczby cykli, temperatury przyłączania starterów oraz typu termocyklera (Davin-Regli i in., 1995; Meunier i Grimont, 1993; Park i Kohel, 1994; Penner i in., 1993). Dokonane obserwacje mogą potwierdzić istotny wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego metodą RAPD — liczba produktów otrzymana w wyniku analizy wykonanej z użyciem DNA izolowanego przy pomocy metody kolumnkowej była niemal dwukrotnie wyższa niż liczba produktów otrzymana w wyniku analizy wykorzystującej metodę Thomsona-Henry'ego. W przypadku metody kolumnkowej liczba uzyskanych po reakcji PCR produktów amplifikacji wynosiła średnio 8,4 produktu na ścieżkę (wartość średnia dla dziesięciu testowanych starterów). Przy wykorzystaniu metody Thomsona-Henry'ego liczba otrzymanych produktów była niewielka i wynosiła średnio 4,6 na ścieżkę (dla dziesięciu testowanych starterów).

Wartość ta była porównywalna do liczby produktów otrzymanych w analizach RAPD przez innych autorów. Yu i Pauls (1993) studiowali zależności genetyczne między odmianami lucerny na próbach zbiorczych DNA (bulked DNA) z użyciem 10 starterów, które generowały średnio po 5 produktów.

Na wykreślonych dendrogramach podobieństwa genetycznego dały się wyróżnić wyraźne grupy, skupiające populacje podobne pod względem genetycznym. Zastosowana metoda izolacji DNA miała wpływ nie tylko na liczbę otrzymanych produktów amplifikacji, ale również na końcowy wynik analizy podobieństwa genetycznego, przedstawiony na dendrogramach podobieństwa (rys. 1 i 2). W przypadku analizy z wykorzystaniem DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego obiekty na dendrogramie utworzyły 4 grupy podobieństwa genetycznego, natomiast w przypadku wykorzystania DNA izolowanego metodą kolumnkową, obiekty na dendrogramie utworzyły 5 grup. Interesujące było, czy owe grupy skupiają populacje, odznaczające się istotnie podobną wartością danej cechy, innymi słowy, czy badane populacje grupują się pod względem którejś z obserwowanych cech, przy równoczesnym istotnym zróżnicowaniu pomiędzy grupami.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że zarówno dla dendrogramu będącego wynikiem analizy wykorzystującej metodę Thomsona-Henry'ego, jak i dla tego wykorzystującego metodę kolumnkową, jedynie w przypadku jednej cechy zaobserwowano grupowanie się populacji o podobnych wartościach. Cechą tą była liczba nasion w strąku, która różnicowała wyróżnione grupy podobieństwa genetycznego na dendrogramie wykreślonym dla metody Thomsona-Henry'ego w dwóch kolejnych latach obserwacji (przy czym istotność różnic wartości tej cechy w poszczególnych grupach podobieństwa była znacznie wyższa w drugim roku obserwacji — poziom istotności 0,001). Na dendrogramie wykreślonym dla metody kolumnkowej zaobserwowano grupowanie się populacji o podobnych wartościach tej cechy jedynie w roku 2006 (poziom istotności wynosił 0,001).

Obserwacje te wskazują, że grupy podobieństwa wyróżnione za pomocą techniki RAPD nie odpowiadają grupom podobieństwa pod względem cech morfologicznych, innymi słowy — nie obejmują populacji podobnych pod względem obserwowanych cech. Tendencję grupowania się obiektów pod względem wartości cechy morfologicznej zauważono jedynie dla cechy liczby strąków w owocostanie, jednak tendencja owa nie była do końca powtarzalna w latach.

Cecha wielkości plonu nasion lucerny przez wielu autorów uważana jest za cechę niestabilną i silnie zależną od warunków środowiskowych. Delouche (1980) i Sypniewski (1986) twierdzą, że na zmniejszenie plonu nasion może mieć wpływ niedobór wody w okresie kwitnienia, wiązania i dojrzewania strąków. Również Staszewski (1975) zwraca uwagę na wpływ zbyt niskiej ilości opadów — suma opadów poniżej 220 mm w miesiącach letnich powoduje znaczny spadek plonu nasion. Obserwacje własne poczynione w niniejszej pracy (duża rozbieżność między podobieństwem fenotypowym a genotypowym) mogą potwierdzać bardzo silny, modyfikujący wpływ środowiska na ekspresję cech związanych z plonem nasion lucerny.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Reakcja PCR przeprowadzona z wykorzystaniem DNA izolowanego metodą kolumnkową dała prawie dwa razy więcej produktów amplifikacji niż w przypadku DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego.
2. Współczynniki podobieństwa wyliczone na podstawie analiz wykorzystujących dwie różne metody izolacji DNA (metodę Thomsona-Henry'ego oraz kolumnkową) grupowały badane populacje w różny sposób.
3. Wykonana analiza wariancji potwierdziła silną zależność podobieństwa genetycznego z obserwowanymi wartościami cech struktury plonu nasion jedynie dla cechy liczby strąków w owocostanie.

LITERATURA

- Brown P. T. H., Lange F. D., Kranz E., Lorz H. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 235: 157 — 165.
- Crochemore M. L., Huyghe C., Kerlan M. C., Durand F., Julier B. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie* 16: 421 — 432.
- Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R. N., Bollet C., Micco P. 1995. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* 146: 561 — 568.
- Delouche J. C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. *Hort. Sc.* 15: 775 — 780.
- Echt C. S., Erdahl L. A., McCoy T. J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84 — 87.
- Genstat 5 Committee. 1993. Genstat 5 Release 3 Reference Manual. Clarendon Press, Oxford.
- Hu J., Quiros C. F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505 — 511.
- 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. *Annales of Applied Biology* 152: 369 — 375.
- Julier B., Porcheron A., Ecalle C., Guy P. 1995. Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 15: 295 — 304.
- Marilla E. F., Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome* 39: 646 — 654.
- Meunier J. R., Grimont P. A. D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373 — 379.
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Park Y. H., Kohel R. J. 1994. Effects of concentration of $MgCl_2$ on RAPD DNA polymorphism. *Biotech.* 16: 652.
- Penner G. A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S. J., Fedak G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2: 341 — 345.
- Schachermayr G., Siedler H., Gale M. D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88: 110 — 115.
- Słomski R. (red.). 2001. Przykłady analiz DNA — praca zbiorowa: 158 — 160.
- Staszewski Z. 1975. Lucerny. PWRiL, Warszawa.
- Sypniewski J. 1986. Problemy uprawy roślin strączkowych w Polsce. *Fragm. Agron.* 1: 29 — 36.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.

- Volenec J. J., Cunningham S. M., Haagenson D. M., Berg W. K., Joern B. C., Wiersma D. W. 2002. Physiological genetics of alfalfa improvement: past failures, future prospects. *Field Crops Research* 75: 97 — 110.
- Waugh R., Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.* 10: 186 — 191.
- Weder Jurgen K.P., 2002. Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. *Lebensm.-Wiss. und Technol.* 35: 504 — 511.
- Willams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 — 6535.
- Yu K., Pauls K. P. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86: 788 — 794.

URSZULA SKOMRA

MARCIN PRZYBYŚ

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Porównanie metody polowej i laboratoryjnej oceny odporności chmielu na mączniaka prawdziwego (*Podosphaera macularis*)

A comparison of field and laboratory methods in assessment of hop resistance to powdery mildew (*Podosphaera macularis*)

Przedmiotem badań były dwa potomstwa chmielu zwyczajnego uzyskane w wyniku skrzyżowania odmiany chmielu Wye Target, będącej źródłem genu *R2* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego (*Podosphaera macularis*), z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę. Wrażliwość genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego określano przy użyciu dwóch metod: oceny występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej oraz na podstawie stopnia porażenia liści po sztucznej inokulacji na szalkach w warunkach kontrolowanych. Oba testy odporności dały zgodny wynik w 88% przypadków. Zastosowanie testu szalkowego w pierwszym etapie selekcji pozwala na zmniejszenie liczby roślin ocenianych w warunkach polowych o ponad 70%. Ocena fenotypowa odporności na mączniaka prawdziwego jest w dużym stopniu uzależniona od wpływu środowiska, co czyni ją długotrwałą, pracochłonną i nie zawsze wiarygodną. Alternatywą dla tego typu oceny może być wykorzystanie markerów molekularnych identyfikujących określone geny odporności. W ramach prowadzonych badań wykorzystano markery molekularne losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD) do identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności na mączniaka prawdziwego. Przetestowano 40 starterów, z których wytypowano 2 wykazujące asocjację z cechą odporności.

Słowa kluczowe: *Humulus lupulus*, odporność polowa, *Podosphaera macularis*, RAPD, sztuczna inokulacja

Two hop progenies from the crosses between hop cv. Wye Target, used as a source of *R2* gene determining resistance to hop powdery mildew (*Podosphaera macularis*), and two susceptible male plants were the objects of the work. The susceptibility of hop genotypes to powdery mildew was assessed using two methods: screening hop cones for disease symptoms in the field under natural infection pressure and artificial inoculation of detached hop leaves in Petri dishes, in controlled conditions. Both assessment methods gave the same results of resistance classification in 88% of individuals. The number of plants to be assessed in the field for cone infection would have been reduced by over 70% using the detached leaves inoculation in the early stage of selection. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to determine the presence of resistance gene. Until now

40 primers were tested. We report here the identification of two RAPD markers closely linked to a gene for resistance to *Podosphaera macularis*.

Key words: *Humulus lupulus*, field resistance, *Podosphaera macularis*, RAPD, artificial inoculation

WSTĘP

Mączniak prawdziwy chmielu powodowany przez grzyb *Podosphaera macularis* (Wallr.) jest jedną z najgroźniejszych chorób tej rośliny. W sprzyjających warunkach, przy niekontrolowanym rozwoju patogena, straty plonu mogą dochodzić nawet do 100% (Engelhard, 2005; Peetz, 2007). Odporność na mączniaka prawdziwego warunkują pojedyncze, dominujące geny, specyficzne w stosunku do rasy patogena (Liyanage i in., 1972). Dotychczas poznano osiem takich genów (*RB*, *R1*, *R2*, *R3*, *R4*, *R5*, *R6* i *RW*) (Seigner i in., 2001). Badania wykazały, że w różnych rejonach uprawy chmielu występują rasy *P. macularis* mające zdolność przełamывania odporności determinowanej przez wszystkie te geny w warunkach szklarniowych (Seigner i in., 2001). W warunkach polowych została przełamana odporność determinowana przez geny *R1*, *R3*, *R5*, *R6* i *RB* (Darby, 1998). Najbardziej trwała w warunkach polowych jest odporność warunkowana przez gen *R2*, którego źródłem jest angielska odmiana Wye Target. Odmiana ta jest uprawiana w Wielkiej Brytanii od 35 lat i nadal utrzymuje wysoki poziom odporności na mączniaka prawdziwego (Darby i in., 1989; Seigner i in., 2001). W Polsce odmiana Wye Target nigdy nie była uprawiana na plantacjach produkcyjnych, ale jest ona utrzymywana w kolekcji odmian chmielu w IUNG-PIB w Puławach. Badania występowania objawów mączniaka prawdziwego chmielu prowadzone w warunkach naturalnej presji infekcyjnej potwierdziły wysoki poziom odporności tej odmiany również w naszym kraju (Skomra, 2004). Obecnie odmiana Wye Target jest wykorzystywana jako źródło odporności na mączniaka prawdziwego w programie hodowlanym w IUNG-PIB.

Podstawą hodowli odpornościowej jest selekcja perspektywicznych genotypów przy dużym nasileniu czynnika chorobotwórczego. W warunkach polowych fenotypowa ekspresja odporności jest często modyfikowana przez występowanie patogena oraz warunki środowiska. Polowa ocena odporności roślin na mączniaka prawdziwego musi być więc prowadzona przynajmniej przez kilka lat, aby selekcja była skuteczna. Wprowadzenie do oceny materiałów hodowlanych chmielu metod pozwalających na określenie odporności roślin w kontrolowanych warunkach środowiska znacznie przyspiesza proces selekcji, ponadto pozwala na zmniejszenie liczby genotypów przeznaczonych do oceny w warunkach polowych, co w przypadku chmielu jest niezwykle istotne z uwagi na duże koszty utrzymania plantacji.

Celem pracy było porównanie skuteczności różnych metod oceny odporności chmielu na mączniaka prawdziwego w aspekcie ich wykorzystania w pracach hodowlanych do selekcji genotypów odpornych. Wrażliwość genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego określano przy użyciu dwóch metod: oceny występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej oraz na podstawie stopnia porażenia liści po sztucznej inokulacji na szalkach w warunkach kontrolowanych.

Dodatkowo podjęto próbę wykorzystania markerów molekularnych RAPD do identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności na mączniaka prawdziwego.

MATERIAŁ I METODY

Badania polowe

Materiał badawczy stanowiły dwa potomstwa chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) uzyskane w wyniku skrzyżowania odmiany chmielu Wye Target, będącej źródłem genu *R2* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego, z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę. Krzyżowania wykonano w 2004 r. Wiosną 2006 r. rośliny wysadzono na plantację hodowlaną, na której nie są prowadzone chemiczne zabiegi ochrony roślin. Odporność pojedynków na mączniaka prawdziwego oceniano na podstawie występowania objawów choroby na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej. Badania prowadzono w latach 2007–2008, po rozpoczęciu przez rośliny owocowania. Z każdej rośliny pobierano losowo 250 szyszek i oceniano stopień ich porażenia na podstawie wielkości powierzchni uszkodzonej przez chorobę (Skomra, 2004). Za rośliny odporne uznawano takie, których współczynnik porażenia szyszek nie przekraczał 2%.

Sztuczna inokulacja liści na szalkach

Wykonano badania odporności przy użyciu sztucznej inokulacji liści na szalkach Petriego. Z każdej rośliny zbierano młode, nie w pełni rozwinięte liście, które następnie rozkładano po dwie sztuki na szalkach wyłożonych wilgotną bibułą filtracyjną. Dla każdej rośliny przygotowano 3 szalki. Taki sam komplet szalek przygotowano dla odmian referencyjnych: Magnum — bardzo wrażliwej na mączniaka prawdziwego i Wye Target — odpornej na tę chorobę. Liście inokulowano zawiesiną zarodników konidialnych *P. macularis* w 0,005% roztworze Tween 20. Inokulum sporządzono przez zmycie zarodników konidialnych grzyba z powierzchni silnie porażonych liści odmiany Magnum. Koncentrację zarodników w zawiesinie sprawdzono przy użyciu hemacytomtru. Inokulację przeprowadzono natychmiast po sporządzeniu zawiesiny zarodników przy użyciu ręcznego opryskiwacza. Szalki umieszczono w fitotronie w temperaturze 18–21°C przy 14. godzinnym fotoperiodzie. Codziennie monitorowano stan liści na szalkach. W razie potrzeby bibułę zwilżano wodą destylowaną. Po 14 dniach od inokulacji przeprowadzono obserwacje występowania kolonii *P. macularis* pod binokulem. Przeprowadzono dwie serie inokulacji z użyciem tych samych genotypów chmielu oraz przy zachowaniu takich samych warunków inkubacji.

Technika RAPD

Materiał badawczy stanowiły: odmiana Wye Target (posiadająca gen *R2*) oraz pojedynki ocenione jako odporne oraz podatne na mączniaka prawdziwego na podstawie sztucznej inokulacji w warunkach kontrolowanych, pochodzące z potomstwa odmiany Wye Target z dwoma osobnikami męskimi charakteryzującymi się podatnością na tę chorobę.

Izolacja całkowitych kwasów nukleinowych

W celu izolacji DNA z tkanek badanych pojedynczych, 100 mg świeżej tkanki roślinnej homogenizowano w moździerz z dodatkiem 650 µl buforu o składzie: 2% CTAB, 0,1M Tris-HCL pH 8,0, 20mM EDTA, 1,4M NaCl, 0,4% β-merkaptotanol. Homogenat przenoszono do probówki 1,5ml i inkubowano w 68°C przez 90 minut. Po wystudzeniu do temperatury otoczenia dodawano 850µl mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24:1), wytrząsano, a następnie wirowano przy 14 000 obr./min. przez 10 minut w temperaturze 4°C. Uzyskaną po wirowaniu fazę wodną w ilości 400µl przenoszono do nowej probówki, dodawano 500 µl chloroformu, wytrząsano i wirowano w tych samych warunkach. Fazę wodną ponownie przenoszono do nowej probówki i ekstrahowano chloroformem. Następnie z fazy wodnej wytrącano DNA przez 12 godzin w temperaturze -20°C poprzez dodanie 0,6 objętości izopropanolu oraz 0,1 objętości 3M octanu sodu pH 7,4. Po wirowaniu z prędkością 14000 obr./min. przez 30 minut, osad przemywano dwukrotnie 80% etanolem, a następnie suszono próżniowo i zawieszano w 30 µl sterylnej wody Mili-Q. Oznaczanie ilościowe DNA prowadzono metodą spektrofotometryczną.

RAPD

Do reakcji PCR użyto następujących starterów: OPA-1, OPA-3, OPA-7, OPA-11, OPA-17, OPB-8, OPB-11, OPC-8, OPC-9, OPD-1, OPD-11, OPE-2, OPE-3, OPE-7, OPE-8, OPE-9, OPF-6, OPG-2, OPG-4, OPG-5, OPG-10, OPH-7, OPI-14, OPK-20, OPM-5, OPM-20, OPN-13, OPO-4, OPO-8, OPP-2, OPP-3, OPP-4, OPP-6, OPP-7, OPP-8, OPV-17, OPAA-11, OPAB-7, OPAB-8, OPAC-2.

Reakcję PCR prowadzono w końcowej objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Do 1 µl DNA (100 ng) uzyskanego po izolacji dodawano mastermix zawierający: 1 × bufor PCR (Fermentas), 0,5 µM startera, 500 µM mieszaniny dNTPs (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂ (Fermentas). Jako ostatnią dodawano polimerazę Taq w ilości 2,5U (Fermentas).

Amplifikacja obejmowała etapy:

- denaturacja wstępna: 95°C przez 2 minut,
- właściwa amplifikacja (42 cykle): denaturacja 95°C przez 30 sekund, annealing 35°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 30 sekund,
- końcowa elongacja: 72°C przez 5 minut.

Elektroforeza produktów amplifikacji

Produkty amplifikacji analizowano w 1,7% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Na żel nanoszono po 10µl mieszaniny po amplifikacji z dodatkiem 2 µl barwnika obciążającego 6 × Loading Dye (Fermentas). Jako marker wielkości wykorzystano marker 100bp (Fermentas). Elektroforezę prowadzono w buforze 1× TBE przy napięciu 5V/cm. Wynik elektroforezy oglądano pod UV i fotografowano.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozwój mączniaka prawdziwego chmielu jest uzależniony od warunków pogodowych, dlatego występowanie i nasilenie objawów choroby różni się w poszczególnych latach (Engelhard i in., 2001; Skomra, 2008). W warunkach naturalnych rozwój objawów choroby

oraz jej nasilenie są modyfikowane przez wiele czynników, z których najważniejsze to: obecność patogena, sprzyjające warunki atmosferyczne oraz podatność rośliny na porażenie. Dynamika poszczególnych czynników wpływających na rozwój infekcji w ciągu sezonu wegetacyjnego jest bardzo duża, toteż często nawet w przypadku roślin wrażliwych objawy choroby nie występują. W celu wyeliminowania tej sezonowej zmienności ocenę odporności poszczególnych genotypów na mączniaka prawdziwego w warunkach polowych należy prowadzić przez kilka lat. Zróżnicowanie występowania objawów mączniaka prawdziwego w warunkach polowych obserwowano również w niniejszych badaniach. Za odporne uznawano jedynie te rośliny, których współczynnik porażenia w żadnym roku badań nie przekroczył 2%, a wśród badanych szyszek nie stwierdzano silnie porażonych. Po dwuletniej obserwacji występowania objawów mączniaka prawdziwego na szyszkach w warunkach naturalnej presji infekcyjnej zidentyfikowano 12 roślin odpornych na tę chorobę (tab. 1).

Zastosowanie sztucznej inokulacji liści na szalkach Petriego, a następnie ich inkubacja w kontrolowanych, korzystnych dla rozwoju patogena warunkach temperatury i wilgotności eliminuje wpływ czynników atmosferycznych na rozwój patogena. Jest to stosunkowo prosta metoda, która może być stosowana w ciągu całego okresu wegetacyjnego. Dodatkową jej zaletą jest możliwość oceny młodych roślin, które nie weszły jeszcze w okres owocowania. Ma to szczególne znaczenie w przypadku badań nad chmielem, który zaczyna wytwarzać szyszki zazwyczaj dopiero w drugim roku wzrostu roślin w warunkach polowych, tj. po trzech latach od wykonania krzyżowania. Metoda ta przynosi bardzo dobre efekty w przypadku wielu gatunków roślin i patogenów (Olmstead i in. 2000; Browne, Cooke, 2004). Była ona również stosowana w badaniach nad mączniakiem prawdziwym chmielu (Seigner i in., 2001; Seigner i in., 2005). *P. macularis* może rozwijać się w szerokim zakresie temperatury, jednak najwięcej kolonii tworzy w temperaturze 18–21°C (Turechek i in., 2001). Takie optymalne warunki temperatury zastosowano podczas inkubacji szalek z inokulowanymi liśćmi chmielu. Do inokulacji pobierano zawsze liście najmłodsze, jeszcze nie w pełni rozwinięte, ponieważ są one najbardziej wrażliwe na porażenie (Seigner i in., 2003; Turechek i in., 2001). Pierwsze kolonie *P. macularis* obserwowano po 6 dniach od inokulacji, ale ostateczną ocenę przeprowadzono po 14 dniach. Nasilenie objawów było zróżnicowane od pojedynczych, małych kolonii widocznych tylko pod binokulem, do kilku, dobrze rozwiniętych kolonii na jednym liściu. Pojedynki, u których przynajmniej na jednym liściu stwierdzono kolonię grzyba z zarodnikami konidialnymi uznawano za wrażliwe na porażenie. Objawy mączniaka prawdziwego obserwowano na liściach 24 genotypów (tab. 1).

Oba testy odporności, tj. sztuczna inokulacja liści chmielu na szalkach oraz ocena porażenia szyszek w warunkach naturalnej presji infekcyjnej dały zgodny wynik w przypadku 30 z 34 badanych roślin. Spośród 10 genotypów uznanych za odporne na podstawie testu szalkowego, tylko jeden wykazywał objawy mączniaka prawdziwego na szyszkach w warunkach polowych. Oznacza to, że test wykorzystujący sztuczną inokulację liści chmielu na szalkach nadaje się do wstępnej weryfikacji roślin pod względem odporności na mączniaka prawdziwego. Zastosowanie tego testu w pierwszym etapie selekcji pozwala na zmniejszenie liczby roślin ocenianych w warunkach polowych. W

przypadku potomstw testowanych w niniejszych badaniach, na podstawie wyników testu szalkowego można było wyeliminować z dalszej oceny 24 wrażliwe genotypy, co stanowiło ponad 70% wszystkich badanych pojedynków.

Tabela 1

Porównanie metod fenotypowej oceny odporności genotypów chmielu na mączniaka prawdziwego oraz identyfikacji pojedynków posiadających gen odporności *R2* przy użyciu markerów RAPD
A comparison of phenotypical methods in assessment of hop genotypes for resistance to powdery mildew with identification of individuals possessing the *R2* resistance gene using RAPD markers

Genotypy chmielu Hop genotypes	Ocena polowa porażenia szyszek Screening hop cones in the field	Sztuczna inokulacja liści Artificial inoculation of detached leaves	RAPD
11/34	O	O	1
11/38	P	P	1
11/40	P	P	0
11/41	P	P	0
11/42	P	O	1
11/44	P	P	0
11/45	O	P	0
11/46	P	P	0
11/50	O	O	1
11/51	P	P	0
11/52	P	P	1
11/53	O	O	1
11/54	O	O	0
11/56	P	P	0
11/58	P	P	0
11/59	O	O	1
12/1	P	P	0
12/2	O	P	0
12/3	P	P	0
12/5	O	O	1
12/6	P	P	0
12/8	P	P	0
12/10	P	P	0
12/13	P	P	0
12/17	P	P	0
12/19	O	O	1
12/21	P	P	0
12/22	P	P	0
12/24	P	P	0
12/28	O	O	1
12/30	O	O	1
12/33	O	P	0
12/34	P	P	0
12/35	P	P	0

O — Odporny; Resistant

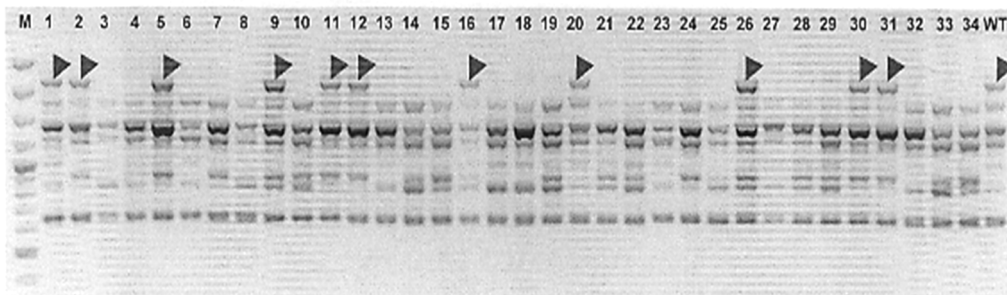
P — Podatny; Susceptible

1 — Obecność prążka; Band's presence

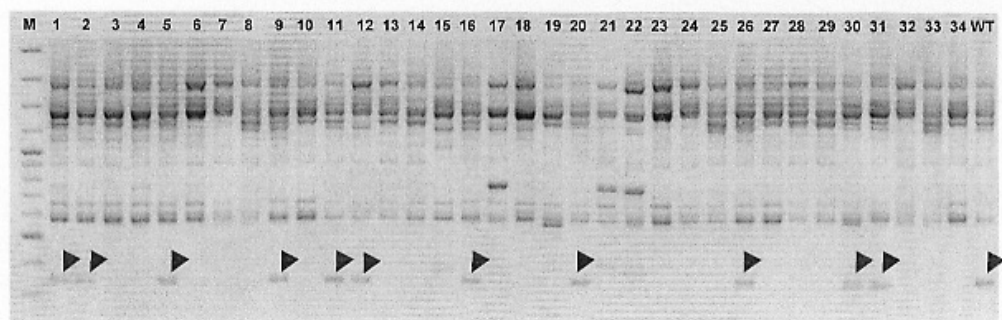
0 — Brak prążka; Band's absence

W ramach identyfikacji markerów RAPD sprzężonych z cechą odporności na mączniaka prawdziwego przebadano 40 różnych starterów RAPD reakcji PCR. Produkty amplifikacji miały wielkość od 150bp do 2500bp. Tylko 2 startery generowały fragmenty DNA wykazujące asocjację z cechą odporności. Przy użyciu startera OPC-9 uzyskiwano

różnicujący produkt o wielkości 1920bp (rys. 1), zaś w przypadku użycia OPG-10 marker o wielkości 350bp (rys. 2). W 91% były one zgodne z obserwacjami dokonanymi po sztucznej inokulacji. Odnotowano jedynie dwa przypadki (genotypy 11/38 i 11/52), kiedy liście na szalkach Petriego poddane sztucznej inokulacji uległy porażeniu przez mączniaka prawdziwego, a markery RAPD wskazywały na obecność genu odporności. Przypadki występowania specyficznych markerów odporności dla genu *R2* w roślinach chmielu podatnych na patogena miały miejsce również w badaniach nad markerami AFLP (Seefeldler i in., 2003).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów RAPD po użyciu startera OPC-9. (M -marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 1-34 – genotypy 11/34-12/35, WT – Wye Target
Fig. 1. Electrophoretic separation of RAPD products after using primer OPC-9. (M –DNA fragments size marker (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder), 1-34 – genotypes 11/34-12/35, WT – Wye Target



Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów RAPD po użyciu startera OPG-10. (M -marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, 1-34 – genotypy 11/34-12/35, WT – Wye Target
Fig. 2. Electrophoretic separation of RAPD products after using primer OPG-10. (M –DNA fragments size marker (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder), 1-34 – genotypes 11/34-12/35, WT – Wye Target

Odnotowano również sytuację, kiedy liście poddane sztucznej inokulacji nie uległy porażeniu przez patogena, podczas gdy po elektroforezie nie był widoczny prążek — wskazując iż jest to roślina podatna (genotyp 11/54). Pojedyncze przypadki niezgodności wyników uzyskanych przy użyciu markerów RAPD z obserwacjami fenologicznymi nie wykluczają użycia tych markerów do selekcji.

WNIOSKI

1. Ocena odporności genotypów chmielu na podstawie występowania objawów mączniaka prawdziwego na szyszkach jest skuteczną metodą selekcji, jednak można ją zastosować dopiero po rozpoczęciu przez rośliny owocowania, tj. po 3 latach od wykonania krzyżowania.
2. Wykorzystanie metody sztucznej inokulacji liści na szalkach pozwala na rozpoczęcie selekcji pod kątem odporności na mączniaka prawdziwego już w pierwszym roku po wykonaniu krzyżowania, jeszcze przed wysadzeniem roślin w pole, co znacznie przyspiesza proces hodowlany.
3. Zastosowanie tego testu w pierwszym etapie selekcji pozwala na znaczne zmniejszenie liczby roślin chmielu ocenianych w warunkach polowych.
4. Wstępne badania nad poszukiwaniem markerów molekularnych RAPD wykazują, że markery te mogą być wykorzystywane do wstępnej selekcji pojedynków posiadających gen R2 odporności na mączniaka prawdziwego chmielu, co eliminuje pracochłonny etap sztucznej inokulacji.

LITERATURA

- Browne R. A., Cooke B. M. 2004. Development and evaluation of an in vitro detached leaf assay for pre-screening resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 110: 91 — 102.
- Darby P. 1998. The symptoms and biology of hop powdery mildew. *Amer. Soc. Of Brew. Chemists NET*. www.scisoc.org/hpmes/darby.htm
- Darby P., Godwin J. R., Mansfield J. W. 1989. The assessment of partial resistance to powdery mildew disease in hops. *Plant Pathology* 38: 219 — 225.
- Engelhard B., Goldbrunner Ch., Seigner E. 2001. Investigations on biology of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) as a basis for specific strategies of control. *Proc. Technical Commission IHGC, Canterbury, England*: 29 — 45.
- Engelhard B. 2005. The impact of weather conditions on the behaviour of powdery mildew in infecting hop (*Humulus*). *Acta Hort.* 668: 111 — 116.
- Liyanage A. de S., Neve R. A., Royle D. J. 1972. Resistance to hop powdery mildew. *Rep. Dept. Hop Res. Wye Coll.*: 49 — 50.
- Olmstead J. W., Lang G. A., Grove G. G. 2000. A leaf disk assay for screening sweet cherry genotypes for susceptibility to powdery mildew. *Hort. Sci.* 35 (2): 274 — 277.
- Peetz A. B. 2007. Understanding sporulation and dissemination of *Podosphaera macularis*, hop powdery mildew. Thesis for degree of Master of Science. Oregon State University: 78 pp.
- Seefelder S., Seigner E. 2003. Molecular markers for powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*) resistance in hops. *Proc. of Scientific Commission IHGC, Dobrna – Žalec, Slovenia*: 8 — 11.
- Seigner E., Seefelder S., Haugg B., Hesse H., Rösch H., Felsenstein F. 2001. Investigation on the virulence spectrum of hop powdery mildew (*Sphaerotheca humuli*). *Proc. of Scientific Commission IHGC, Canterbury, Kent, England*: 33 — 37.
- Seigner E., Seefelder S., Haugg B., Engelhard B., Hasyn S., Felsenstein F. 2003. Infektionspotenzial des echten Mehltaus (*Sphaerotheca humuli*) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Hopfens (*Humulus lupulus*). *Gesunde Pflanzen*, 55. Jahrg., Heft 2: 29 — 33.
- Seigner E., Lutz A., Radic-Miehle H., Seefelder S. 2005. Breeding for powdery mildew resistance in hop (*Humulus L.*): strategies at the Hop Research Center, Huell, Germany. *Acta Hort.* 668: 19 — 29.
- Skomra U. 2004. Ocena wybranych odmian chmielu pod względem podatności na mączniaka rzekomego i prawdziwego chmielu. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 497: 581 — 589.

- Skomra U. 2008. Występowanie mączniaka prawdziwego chmielu w zależności od odmiany i warunków klimatycznych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 531: 193 — 200.
- Turechek W. W., Mahaffee W. F., Ocamb C. M. 2001. Development of management strategies for hop powdery mildew in the Pacific Northwest. Online. Plant Health Progress DOI: 10.1094/PHP-2001-0313-01-RS.

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Edward S. Gacek	Wybrane aspekty ochrony własności intelektualnej w hodowli roślin i biotechnologii Some aspects of protection of intellectual property in plant breeding and biotechnology	5
Bogusław Gołębiowski	Poglądy polskich hodowców na perspektywy rozwoju hodowli i nasiennictwa w Polsce The views of Polish breeders on perspectives for development of plant breeding and seed production in Poland	15
Elżbieta Małuszyńska Anna Szydłowska	Wstępna ocena skuteczności wybranych metod zaprawiania nasion do stosowania w rolnictwie ekologicznym. Komunikat Preliminary assessment of the effectiveness of some methods of seed treatment in organic farming. Short communication	27
Sylwia Okoń Edyta Paczos-Grzęda Piotr Kraska Ewa Kwiecińska-Poppe Edward Pałys	Analiza podobieństwa genetycznego odmian orkisz (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>spelta</i> L.) za pomocą markerów RAPD Assessment of genetic similarity of spelt (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>spelta</i> L.) cultivars based on RAPD markers	35
Roman Prażak	Zmienność i współzależność niektórych cech w mieszańcach <i>Aegilops kotschy</i> Boiss. × <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Rusalka Variability and interrelationship of some traits in <i>Aegilops kotschy</i> Boiss. × <i>Triticum aestivum</i> L. cv. Rusalka hybrids	43
Krzysztof Kowalczyk Sylwia Okoń	Analiza zmienności allelicznej w locus <i>Xgwm261</i> w odmianach pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i> L.) zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006 Allelic variation at the <i>Xgwm261</i> locus in wheat cultivars (<i>Triticum aestivum</i> L.) registered in Poland in 1978–2006	61
Jan Masłowski Zbigniew Segit	Tolerancyjność wybranych linii <i>Triticum durum</i> Desf. na toksyczne działanie jonów glinu. Komunikat The tolerance of selected <i>Triticum durum</i> Desf. lines to toxic effects of aluminum ions. Short communication	67
Tadeusz Adamski Maria Surma Aleksandra Ponitka Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina Karolina Krystkowiak Anetta Kuczyńska Hanna Pudelska Krzysztof Rubrycki Reneta Trzeciak Jolanta Woźna	Efektywność uzyskiwania haploidów pszenicy metodą kultur pylnikowych oraz krzyżowania z kukurydzą Production efficiency of wheat haploids by anther culture and wheat × maize crosses	73

Ryszard Weber Grażyna Podolska	Wpływ terminu i gęstości siewu na wielkość i strukturę plonu pszenicy ozimej The effects of sowing term and density on size and structure of yield of winter wheat	81
Marcin Studnicki Wiesław Mądry Tadeusz Śmiałowski	Wielocechowa analiza różnorodności fenotypowej w kolekcji roboczej pszenicy jarej Multivariate analysis of phenotypic diversity in Polish spring wheat collection	91
Marcin Studnicki Wiesław Mądry Tadeusz Śmiałowski	Porównanie efektywności metod statystycznych tworzenia kolekcji podstawowej na przykładzie pszenicy jarej Comparison of statistical methods to development of a core collection for a spring wheat collection	105
Anna Ćwiklińska Zbigniew Broda Jan Bocianowski	Analiza porównawcza cech dzikich gatunków rodzaju <i>Secale</i> L. w celu poszerzenia zmienności genetycznej przydatnej w hodowli Comparative analysis of the features of wild species within the genus <i>Secale</i> for widening genetic variability to be utilized in breeding	119
Monika Kociuba Stefan Stojałowski	Efektywność markerów molekularnych SCAR z chromosomu 4RL w selekcji genotypów męskopłodnych oraz ich związek z wybranymi cechami morfologicznymi żyta (<i>Secale cereale</i> L.) Efficiency of the SCAR markers from 4RL chromosome in selection of male fertile genotypes and their relation to some morphological traits in rye (<i>Secale cereale</i> L.)	139
Irena Kiecana Małgorzata Cegiełko Elżbieta Mielniczuk	Występowanie <i>Fusarium</i> spp. na życie ozimym (<i>Secale cereale</i> L.) i podatność różnych genotypów na porażenie przez <i>F. avenaceum</i> (Fr.) Sacc. i <i>F. culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc. The occurrence of <i>Fusarium</i> spp. on winter rye (<i>Secale cereale</i> L.) and susceptibility of different genotypes to infection with <i>F. avenaceum</i> (Fr.) Sacc. and <i>F. culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	151
Halina Góral Mirosław S. Pojmaj Renata Pojmaj Monika Burezy	Otrzymywanie nasion mieszańcowych pszenżyta ozimego w siewie pasowym linii cms i restorera oraz w mieszaninach tych form Production of hybrid seeds of winter triticale from cms and restoring lines in strip and bulk sowing	163
Bogusława Jaśkiewicz	Wpływ gęstości siewu i sposobu nawożenia azotem na plonowanie i cechy morfologiczne pszenżyta ozimego odmiany Woltario The influence of sowing density and nitrogen application method on yielding and morphological characters of winter triticale cv. Woltario	169
Michał Nowak	Identyfikacja genów <i>Vrn</i> w odmianach jęczmienia zwyczajnego (<i>Hordeum vulgare</i> L.) zarejestrowanych w Polsce Identification of the <i>Vrn</i> genes in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) cultivars from the Polish register	179
Barbara Wiewióra	Podatność jęczmienia jarego na porażenie przez <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem. sprawcę plamistości liści Susceptibility of spring barley to infection of <i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoem. the causal agent of spot blotch	187
Alicja Pecio Andrzej Bichoński	Nawożenie azotem i chemiczna ochrona roślin przed chorobami jako czynniki plonowania jęczmienia jarego Nitrogen fertilization and fungicide application as the elements of spring barley production	201

Edyta Paczos-Grzęda Maria Chrząstek Sylwia Okoń Agnieszka Grądzielewska Danuta Miazga	Zastosowanie markerów ISSR do analizy wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego <i>Avena sterilis</i> L. Application of ISSR markers in analysis of intraspecific similarity of <i>Avena sterilis</i> L.	215
Edyta Paczos-Grzęda	Zastosowanie metod RAPD i SSR do oceny podobieństwa genetycznego tetraploidalnych gatunków z rodzaju <i>Avena</i> L. Application of the RAPD and SSR methods to genetic similarity assessment of tetraploid species of the <i>Avena</i> L. genus	225
Edyta Paczos-Grzęda Katarzyna Kruk Sylwia Okoń	Ocena wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego <i>Avena fatua</i> L. w oparciu o polimorfizm DNA Assessment of <i>Avena fatua</i> L. intraspecific genetic similarity based on DNA polymorphism	235
Maria Chrząstek Katarzyna Kruk Sylwia Okoń Emilia Wojtowicz	Wpływ formy ojcowskiej na żywotność pyłku i niektóre cechy plonotwórcze mieszańców międzygatunkowych <i>Avena sativa</i> L. cv. Borowiak × <i>Avena sterilis</i> L. Effect of male genotype on pollen viability and some yield related traits of interspecific hybrids <i>Avena sativa</i> L. cv. Borowiak × <i>Avena sterilis</i> L.	245
Anna Skrzypik Roman Prażak Maria Chrząstek	Ocena tolerancji na glin siewek mieszańców BC ₁ (<i>Avena sativa</i> L. × <i>Avena fatua</i> L.) × <i>Avena sativa</i> L. Evaluation of seedling tolerance to aluminum in BC ₁ hybrids of (<i>Avena sativa</i> L. × <i>Avena fatua</i> L.) × <i>Avena sativa</i> L.	255
Anna Linkiewicz Magdalena Żurawska-Zajfert Zbigniew Tadeusz Dąbrowski Sławomir Sowa	Ekspresja białka Cry1Ab w odmianach kukurydzy typu MON810 w Polsce — wpływ na organizmy niedocelowe: mszycę zbożową (<i>Sitobion avenae</i> F.) i mszycę czerechowo-zbożową (<i>Rhopalosiphum padi</i> L.) Cry1Ab expression in MON810 maize varieties in Poland — impact on non-target organisms the grain aphid (<i>Sitobion avenae</i> F.) and the bird cherry-oat aphid (<i>Rhopalosiphum padi</i> L.)	263
Leszek Domański Bogdan Flis Henryka Jakuczun Ewa Zimnoch-Guzowska	Ocena postępu hodowlanego pod względem wartości przetwórczej materiałów wyjściowych ziemniaka wytworzonych w latach 1999–2007 Assessment of breeding progress in relation to the processing value of potato parental lines released in 1999–2007	275
Teresa Pastuszevska Grzegorz Gryń	Woda jako potencjalne źródło rozprzestrzeniania się bakterii <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> Water as a potential source of <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> dissemination	285
Krzysztof Klimont Zofia Bulińska-Radomska	Przydatność wybranych gatunków roślin do rekultywacji glebotwórczego gruntu z wapna po flotacyjnego Usefulness of some plants species to reclamation of soilless ground on post-flotation lime	293
Zbigniew Broda Agnieszka Dobrzycka Jan Bocianowski	Podobieństwo genetyczne różnych populacji lucerny siewnej (<i>Medicago sativa</i> L. sl.) a ich potencjał plonowania Genetic similarity of various populations of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L. sl.) and their seed yield potential	301
Urszula Skomra Marcin Przybyś	Porównanie metody polowej i laboratoryjnej oceny odporności chmielu na mączniaka prawdziwego (<i>Podosphaera macularis</i>) A comparison of field and laboratory methods in assessment of hop resistance to powdery mildew (<i>Podosphaera macularis</i>)	315