

EDYTA PACZOS-GRZĘDA

Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, Lublin

Badania cytogenetyczne i molekularne mieszańców międzygatunkowych heksaploidalnego owsa *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. oraz form wyjściowych

Cytogenetic and molecular analyses of interspecific hybrids of the hexaploid oat *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. and initial forms

W celu potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia badanych kombinacji *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. wykorzystano metodę RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Zidentyfikowano fragmenty DNA nieobecne u odmian matecznych, ale amplifikowane zarówno u formy ojcowskiej, jak i mieszańca. Mieszańce i formy rodzicielskie poddano analizie cytologicznej, w której uwzględniono konfiguracje chromosomów w metafazie I, częstotliwość chromosomów opóźnionych i mostów chromatydowych w anafazie I, frekwencję mikrojąder w tetradach oraz żywotność i wymiary ziaren pyłku. W metafazie I u żadnej z analizowanych form nie obserwowano uniwalentów i multiwalentów. Biwalenty miały najczęściej kształt pierścieni, rzadziej prętów. W anafazie I występowały chromosomy opóźnione i mosty chromatydowe, a ich frekwencja była wyższa u mieszańców niż u form rodzicielskich. Badane formy charakteryzowały się wysokim udziałem tetrad bez mikrojąder. U wszystkich mieszańców, z wyjątkiem Dragon × *A. sterilis*, na jedną tetradę przypadało średnio więcej mikrojąder niż u form wyjściowych. Stwierdzono, że pomimo różnic pod względem frekwencji chromosomów opóźnionych i mostów chromatydowych w anafazie I oraz mikrojąder w tetradach, wszystkie analizowane formy tworzyły pyłek o bardzo wysokim udziale ziaren żywotnych.

Słowa kluczowe: *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., mejoza, mieszańce międzygatunkowe, RAPD

The RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) method was used to confirm the hybrid character of *Avena sativa* L. × *Avena sterilis* L. crosses. DNA fragments amplified in the hybrids and paternal forms, but not observed in cultivars, were identified. Configurations of chromosomes at metaphase I, frequency of lagging chromosomes and chromatid bridges at anaphase I, occurrence of micronuclei at tetrads, viability and size of pollen grains in the hybrids and parental forms were analyzed. Univalents and multivalents were not observed at metaphase I PMC. Bivalents were generally of ring shape and occasionally of rod. The hybrids, as compared with parental forms, were characterized by the higher frequencies of lagging chromosomes and chromatid bridges. Tetrads without micronuclei predominated in all the analyzed forms. Interspecific crosses, except Dragon × *A. sterilis*, had a greater number of micronuclei per tetrad than initial forms. Despite the differences in the occurrence of lagging chromosomes, chromatid bridges and tetrads with micronuclei, the pollen viability in the examined material was very high.

Key words: *Avena sativa* L., *Avena sterilis* L., interspecific hybrids, meiosis, RAPD

WSTĘP

Rodzaj *Avena* obejmuje trzy grupy kariologiczne o 14, 28 i 42 chromosomach (Rajhathy i Thomas, 1974). Analizowane w pracy gatunki *Avena sativa* L. i *Avena sterilis* L. są heksaploidami ($2n = 6x = 42$). Na podstawie strukturalnego podobieństwa chromosomów oraz koniugacji chromosomów w mieszańcach skład genomowy wszystkich heksaploidów został opisany przez Rajhathy i Morisona (1959) jako AACCCD. Badania z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* przeprowadzone przez Linaresa i wsp. (1998) również wykazały obecność trzech zestawów chromosomów i potwierdziły, że gatunki o 42 chromosomach są alloheksaploidami. Jednakże wyniki genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) uzyskane przez Chena i Armstronga (1994) oraz Leggetta i Markhanda (1995) wskazały na istnienie dużego podobieństwa na poziomie DNA pomiędzy chromosomami genomów A i D heksaploidów. Autorzy zaproponowali oznaczenie składu genomowego tej grupy kariologicznej jako AAA'A'CC, co wskazywałoby na to, że gatunki te są zmodyfikowanymi autoalloheksaploidami.

Z uwagi na obecność bardzo silnego mechanizmu kontroli biwalentnej koniugacji heksaploidy z rodzaju *Avena* cytologicznie zachowują się jak diploidy tworząc w mejozie 21 biwalentów. Azel (1974) oraz Ansari i Thomas (1983) sugerują, że chromosomy heksaploidalnego owsa, podobnie jak u pszenicy, można przyporządkować do 7 grup homeologicznych. Przynależność chromosomów do poszczególnych grup nie została dotychczas ostatecznie określona (Kianian i in., 1997).

Do analizy genomu gatunków z rodzaju *Avena* wielokrotnie wykorzystano metodę RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Stosując tę technikę zidentyfikowano markery sprzężone z loci odporności na rdzę koronową i żdźbłową (Penner i in., 1993 a, b), niewrażliwości na długość dnia (Wight i in., 1994), warunkującymi długi czas spoczynku ziarniaków (Fennimore i in., 1999). Metodę RAPD wykorzystano również do oceny polimorfizmu międzyodmianowego owsa (Zhu i in., 1999), pokrewieństwa pomiędzy gatunkami o różnym poziomie ploidalności w obrębie rodzaju *Avena* (Loscutov i Perchuk, 2000), a także do potwierdzenia mieszańcowego charakteru kombinacji *A. sterilis* × *A. fatua* (Cavan i in., 1998).

Celem pracy były analizy molekularne i cytogenetyczne mieszańców międzygatunkowych F₂ *A. sativa* × *A. sterilis* oraz form rodzicielskich. Metodę RAPD wykorzystano do potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia uzyskanych kombinacji *A. sativa* × *A. sterilis* oraz określono jej przydatność do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych owsa. W analizie cytogenetycznej uwzględniono konfiguracje chromosomów w metafazie I, częstotliwość chromosomów opóźnionych i mostów w anafazie I, frekwencję mikrojąder w tetradach oraz żywotność i wymiary ziaren pyłku.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem pracy były uzyskane w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Lublinie mieszańce międzygatunkowe F₂ heksaploidalnego owsa:

- *Avena sativa* L. odm. Borys $\times$ *Avena sterilis* L.,
- *Avena sativa* L. odm. Dragon $\times$ *Avena sterilis* L.,
- *Avena sativa* L. odm. Farys $\times$ *Avena sterilis* L.,
- *Avena sativa* L. odm. Góral $\times$ *Avena sterilis* L.,
- *Avena sativa* L. odm. Komes $\times$ *Avena sterilis* L. oraz formy rodzicielskie.

Wstępnym etapem analiz molekularnych była ekstrakcja DNA przeprowadzona metodą Milligana (1992) w dwóch powtórzeniach dla każdego genotypu z pięciu koleotypy kilkunastu siewek. Stężenie wyizolowanego DNA określano spektrofotometrycznie stosując GeneQuandt (Pharmacia). Amplifikację markerów RAPD przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Williamsa i wsp. (1990). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 $\times$ bufor do PCR (Fermentas, Litwa), 100 μ M każdego dNTP, 300–450 nM startera, 2,5mM MgCl₂, 40 ng genomowego DNA, 0,4–0,43 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcje amplifikacji wykonywano dla dwóch prób DNA z każdego genotypu, jednocześnie prowadząc reakcję kontrolną bez matrycy DNA. Mieszaninę reagentów pokrywano kroplą oleju mineralnego (Sigma). Reakcję prowadzono na termocyklerze Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 2 min. w 95°C, 45 cykli: 94°C — 45 s, 37°C — 45 s, 72°C — 45 s, z końcową inkubacją 10 min. w 72°C. Uzyskane produkty rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE przez 2 h przy napięciu 100V. Rozdzielone fragmenty DNA stawały się widoczne po podświetleniu żelu na transiluminatorze UV. W celu dokumentacji wyników uzyskany obraz fotografowano na filmach Polaroid. Masę prążków określano porównując je z markerem wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa) wykorzystując program Dnafrag wersja 3.03.

Materiał do analizy mejozy pobierano przed kłoszeniem z pięciu roślin każdej z badanych form, zaś do badań żywotności i wymiarów ziaren pyłku w fazie kwitnienia. Młode wiechy i pylniki utrwalano bezpośrednio po pobraniu w roztworze Carnoya, a po upływie 24 h przenoszono do 70–75% alkoholu etylowego i przechowywano w temp. +4°C. Wykonywano preparaty rozmazowe w 2% roztworze acetokarminu. W ponad 100 KMP każdej z analizowanych form określano liczbę biwalentów w postaci pierścieni i prętów w metafazie I. W anafazie I obserwowano częstotliwość chromosomów opóźnionych i mostów chromatydowych w około 100 komórkach każdej formy. Analizując co najmniej 2500 tetrad określano frekwencję mikrojąder u wszystkich form mieszańcowych i rodzicielskich. W dojrzałych pylnikach każdej formy analizowano po 3000 ziaren pyłku. Na podstawie wypełnienia ziaren cytoplazmą klasyfikowano je do trzech grup. Do pierwszej z nich zaliczono pyłek całkowicie wypełniony (75–100%), do drugiej pyłek częściowo wypełniony (75–25%), a do trzeciej pusty, w którym cytoplazma stanowiła mniej niż 25% objętości ziarna. Pyłek całkowicie wypełniony cytoplazmą traktowano jako żywotny. U wszystkich analizowanych form określano długość i szerokość 50 ziaren pyłku. Pomiarów wykonano pod mikroskopem przy powiększeniu 8 $\times$ 40 posługując się okulariem z podziałką i mikrometrem przedmiotowym. Analizy cytologiczne przeprowadzano pod mikroskopem świetlnym Zeiss. Fotografie obiektów cytologicznych zamieszczone

w pracy wykonano przy pomocy mikroskopu Jenawal GF-PA i przystawki do mikrofotografii mf-AKS Automatic MOT-2.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program opracowany przez Ośrodek Informatyki Akademii Rolniczej w Lublinie. Zastosowano test F-Snedecora. W celu stwierdzenia istotności różnic pomiędzy obiektami wykorzystano wielokrotne przedziały ufności Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

W przedstawionej pracy analizowano mieszańce uzyskane w wyniku krzyżowania 5 polskich odmian *Avena sativa* z jednym genotypem dzikiego gatunku *Avena sterilis*. W celu potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia badanych kombinacji *A. sativa* × *A. sterilis* zastosowano metodę RAPD. Poszukiwano starterów generujących takie fragmenty DNA, które nie były obecne u odmian matecznych, ale ulegały amplifikacji zarówno u formy ojcowskiej, jak i mieszańca. Spośród 84 analizowanych starterów wyselekcjonowano dwa spełniające powyższe kryterium: G-10 i T-04. U mieszańców i formy ojcowskiej zidentyfikowano 4 prążki niewystępujące u odmian oraz 1 prążek, który w kombinacjach mieszańcowych, podobnie jak u *A. sterilis*, charakteryzował się silniejszą amplifikacją aniżeli u odmian. Analiza polimorfizmu RAPD potwierdziła mieszańcowe pochodzenie badanych form. Najwięcej, bo aż 3 prążki charakterystyczne dla gatunku ojcowskiego, a nieobecne w odmianie matecznej stwierdzono w kombinacji Komes × *A. sterilis*, dwa u Borys × *A. sterilis* i 'Farys × *A. sterilis*, zaś po jednym u Dragon × *A. sterilis* i Góral × *A. sterilis* (tab. 1).

Tabela 1

Identyfikacja fragmentów DNA potwierdzających mieszańcowe pochodzenie badanych form Identification of DNA fragments confirming the hybrid origin of the analyzed forms

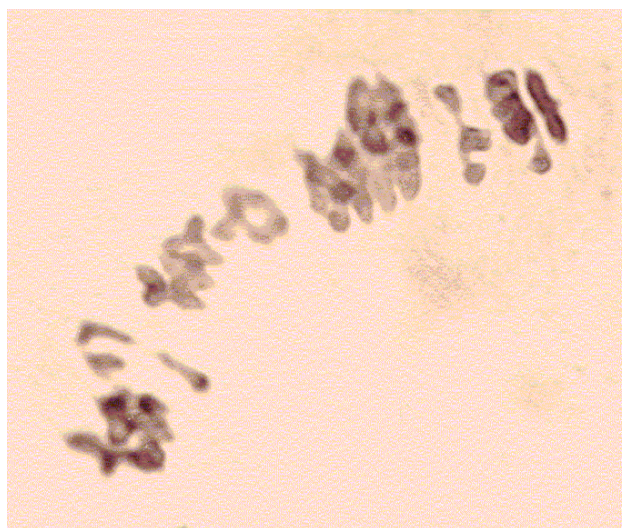
Starter Primer	Wielkość fragmentu Size of fragment (bp)	Borys × <i>A. sterilis</i>	Dragon × <i>A. sterilis</i>	Farys × <i>A. sterilis</i>	Góral × <i>A. sterilis</i>	Komes × <i>A. sterilis</i>
G-10	1067		+	+	+	+
	921					+
	742			+		+
T-04	1685	+	+	+	+	+
	761	+				

* — Wzrost intensywności prążka/ * — Band intensity increase

Liczne badania dowodzą, że metoda RAPD może służyć jako źródło markerów specyficznych chromosomowo, genomowo lub gatunkowo (Wang i in., 1995; Wei i in., 1995). Kresovich i wsp. (1992) stwierdzili, że markery molekularne są niezastąpionym narzędziem w identyfikacji genotypów. Zastosowanie metody RAPD do ustalania mieszańcowego pochodzenia badanych materiałów częściowo ogranicza zjawisko współzawodnictwa startera o matrycę. Halldén i wsp. (1996) odnotowali spadek liczby wykrywanych prążków potwierdzających mieszańcowy charakter analizowanych form. Autorzy obserwowali również powstawanie dodatkowych niespecyficznych fragmentów DNA. Występowanie prążków niespecyficznych wyjaśniano obecnością mutacji, bądź rekombinacji.

binacji w obrębie miejsca przyłączania startera lub powielanego regionu oraz tworzeniem heterodupleksów pomiędzy fragmentami o innej ruchliwości na żelu niż homodupleksy. Stammers i wsp. (1995) zwrócili ponadto uwagę na zjawisko konwergencji lub homoplazji polegające na tym, że prążki o podobnej ruchliwości w żelu mogą pochodzić z niehomologicznych sekwencji DNA. Ponieważ pojawiały się również zastrzeżenia do powtarzalności metody RAPD m.in. Skroch i Nienhuis (1995) przeprowadzili eksperyment, w którym stwierdzili, że warunkiem uzyskania powtarzalnych wyników jest ścisła kontrola warunków reakcji, reagentów, a także selekcja starterów generujących stabilne wzory prążków. Uwzględniając powyższe zastrzeżenia, w badaniach własnych, do potwierdzenia mieszańcowego charakteru kombinacji *A. sativa* × *A. sterilis*, spośród testowanych starterów wybrano tylko dwa, które generowały stabilne fragmenty DNA charakterystyczne jednocześnie dla formy ojcowskiej, jak i określonych kombinacji mieszańcowych.

U mieszańców pokolenia F₂ i form wyjściowych przeprowadzono obserwacje zachowania się chromosomów w mejozie. Analizowano m.in. konfiguracje chromosomów w metafazie I. Rajhathy i Thomas (1974) oraz Singh i Kolb (1991) wskazują na trudności w analizowaniu tego stadium u owsa ze względu na zbyt ściśle ułożenie chromosomów w płytce metafazowej i problemy w uzyskaniu komórek z dobrymi rozkładami chromosomów. W badanym w niniejszej pracy materiale obserwowano na tyle wyraźne płytki metafazowe, że możliwe było określenie kształtu biwaleatów (rys. 1).



Rys. 1. Mieszaniec Kome × *A. sterilis*. Metafaza I, 18 biwaleatów w kształcie pierścieni i 3 pręty
Fig. 1. Komes × *A. sterilis* hybrid. Metaphase I, 18 ring bivalents and 3 rods

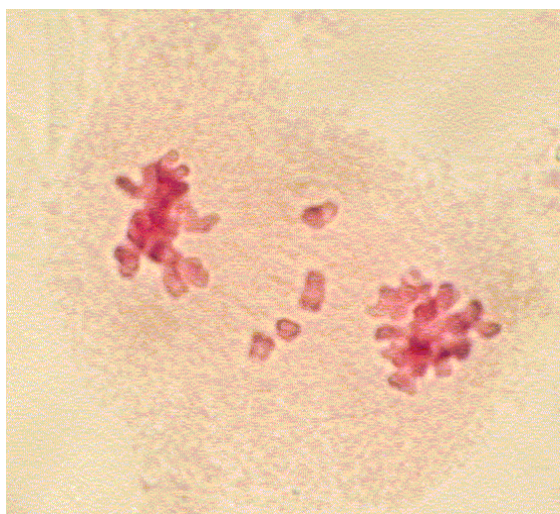
U wszystkich analizowanych form biwaleaty występowały najczęściej w postaci pierścieni, rzadziej prętów. U form matecznych średnio na jedną komórkę przypadało 19,74

biwalentów w postaci pierścieni i 1,26 prętów. U *A. sterilis* stwierdzono 19,56 biwalentów pierścieniowych i 1,44 prętów. W komórkach mieszańców obserwowano średnio 19,20 pierścieni oraz 1,80 biwalentów w kształcie pręta. W porównaniu z odmianami matecznymi u wszystkich mieszańców obserwowano mniej biwalentów w postaci pierścieni i więcej prętów, a różnica ta była istotna w przypadku kombinacji Góral $\times$ *A. sterilis* (tab. 2). U żadnej z analizowanych form nie obserwowano uniwalentów i multiwalentów. McMullen i wsp. (1982) analizując przebieg mikrosporogenezy u mieszańców międzygatunkowych F_1 *A. sativa* $\times$ *A. sterilis* nie określali kształtu biwalentów w metafazie I. Autorzy obserwowali uniwalenty i multiwalenty. Częstotliwość uniwalentów u mieszańców wzrastała w metafazie I w porównaniu do diakinezy, co według autorów wskazuje na desynapsis, czyli przedwczesne zanikanie chiazm. Według Rajhathy i Thomasa (1974) u owsa, analogicznie do pszenicy, występowanie multiwalentów wskazuje na supresję genu (-ów) odpowiedzialnych za kontrolę koniugacji homologów lub obecność wzajemnych translokacji. McMullen i wsp. (1982) stwierdzili również, że frekwencja uniwalentów i multiwalentów w mieszańcach międzygatunkowych zależała od genotypu *A. sterilis* wykorzystanego do krzyżowania z odmianami *A. sativa*. Autorzy zasugerowali, że niemal wyłącznie biwalentna koniugacja w niektórych kombinacjach mieszańcowych wskazuje na wysoką homologię poszczególnych genotypów *A. sterilis* z odmianami *A. sativa*. Na podstawie regularności mejozy mieszańców F_1 *A. sativa* $\times$ *A. sterilis* również Sereno-Tavares i wsp. (1992) stwierdzili wysoką homologię pomiędzy badanymi genotypami, a w konsekwencji dużą łatwość introgresji cech z *A. sterilis* do *A. sativa*. McMullen i wsp. (1982) podkreślają znaczenie doboru do krzyżowań genotypów o regularnej mejozie, co ułatwia transfer genów u mieszańców międzygatunkowych.

W mieszańcach i formach wyjściowych studiowano anafazę I mejozy. We wszystkich kombinacjach mieszańcowych chromosomy opóźnione obserwowano częściej niż u obu form rodzicielskich (rys. 2). Jedynie u mieszańców Góral $\times$ *A. sterilis* i Komes $\times$ *A. sterilis* różnica ta była statystycznie istotna w odniesieniu do form matecznych (tab. 2). U wszystkich analizowanych form obserwowano nieliczne mosty chromatydowe. U odmian występowało mniej tego typu aberracji chromosomowych niż u *A. sterilis*. Średnia liczba mostów w komórkach mieszańców wahała się od 0,132 u Dragon $\times$ *A. sterilis* do 0,182 u Komes $\times$ *A. sterilis*. U mieszańców mosty chromatydowe występowały częściej niż u obu form rodzicielskich, ale stwierdzone różnice nie były istotne (tab. 2). Studiując anafazę I mejozy u mieszańców *A. sativa* $\times$ *A. sterilis* McMullen i wsp. (1982) zaobserwowali, że częstotliwość chromosomów opóźnionych i mostów w poszczególnych kombinacjach była zróżnicowana i zależała od genotypu *A. sterilis* wykorzystanego do krzyżowań. W badaniach własnych największą częstotliwość chromosomów opóźnionych i mostów obserwowano u mieszańców Komes $\times$ *A. sterilis* i Góral $\times$ *A. sterilis*. W wyżej wymienionych kombinacjach stwierdzono jednocześnie najmniejszą liczbę biwalentów w postaci pierścieni (tab. 2).

Metafaza I i anafaza I w KMP oraz częstotliwość mikrojąder w tetradach mieszańców *A. sativa* × *A. sterilis* i form wyjściowych
Metaphase I, anaphase I and the frequency of micronuclei in tetrads of interspecific hybrids *A. sativa* × *A. sterilis* and initial forms

Formy wyjściowe Mieszańce Initial forms Hybrids	Biwalenty Bivalents				Średnia liczba chromosomów opóźnionych Mean number of lagging chromosomes	Średnia liczba mostów chromatydowych Mean number of chromatid bridges	% tetrad % of tetrads					Średnia liczba mikrojąder w tetradzie Mean number of micronuclei per tetrad
	pierścienie rings		pręty rods				bez mikro- jąder without micro- nuclei	z 1 mikro- jądrem with 1 micro- nucleus	z 2 mikro- jądrami with 2 micro- nuclei	z 3 mikro- jądrami with 3 micro- nuclei	z większą liczbą mikrojąder with higher number of micronuclei	
	liczba number	%	liczba number	%								
formy mateczne maternal forms												
Borys	19,60	93,34	1,40	6,66	0,104	0,056	97,93	1,64	0,31	0,08	0,04	0,03
Dragon	19,99	95,21	1,01	4,79	0,112	0,058	97,54	2,24	0,22	0,00	0,00	0,03
Farys	19,78	94,17	1,22	5,83	0,050	0,070	97,67	1,58	0,33	0,33	0,10	0,04
Góral	19,99	95,19	1,01	4,81	0,046	0,064	98,34	1,29	0,24	0,04	0,08	0,03
Komes	9,34	92,08	1,66	7,92	0,164	0,094	95,56	2,62	0,80	0,36	0,66	0,08
Średnia Mean	19,74	94,00	1,26	6,00	0,095	0,068	97,41	1,87	0,38	0,16	0,18	0,04
forma ojcowska paternal form												
<i>A. sterilis</i>	19,56	93,14	1,44	6,86	0,254	0,106	96,59	1,97	0,94	0,43	0,08	0,06
mieszańce hybrids												
Borys × <i>A. sterilis</i>	19,52	92,96	1,48	7,04	0,282	0,154	98,46	1,30	0,19	0,05	0,00	0,02
Dragon × <i>A. sterilis</i>	19,64	93,54	1,36	6,46	0,266	0,132	94,31	2,33	1,41	0,84	1,11	0,12
Farys × <i>A. sterilis</i>	19,08	90,88	1,92	9,12	0,350	0,134	92,72	4,12	1,58	0,44	0,52	0,12
Góral × <i>A. sterilis</i>	18,72	89,14	2,28	10,86	0,490	0,176	92,91	3,27	1,58	1,24	1,00	0,14
Komes × <i>A. sterilis</i>	19,04	90,66	1,96	9,34	0,538	0,182	84,79	5,48	4,55	2,04	3,14	0,38
Średnia Mean	19,20	91,44	1,80	8,56	0,385	0,156	92,64	3,30	1,86	0,92	1,15	0,16
NIR (p = 0,05) LSD (p = 0,05)	1,19	5,67	1,19	5,67	0,323	—	4,63	3,24	1,94	0,97	1,81	0,12



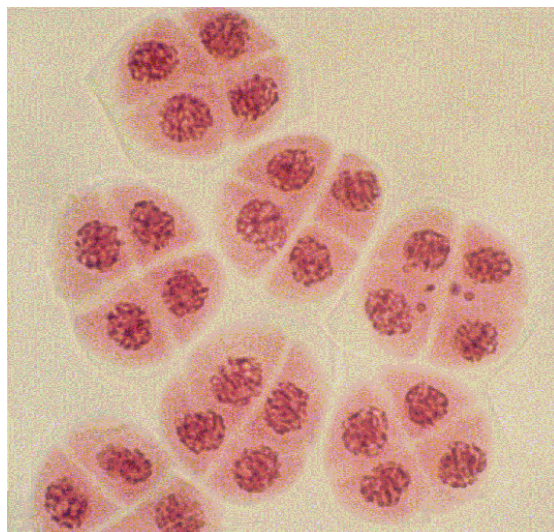
Rys. 2. Mieszaniec Komes $\times$ *A. sterilis*. Anafaza I, widoczne chromosomy opóźnione
Fig. 2. Komes $\times$ *A. sterilis* hybrid. Anaphase I with lagging chromosomes

Wszystkie badane formy charakteryzowały się wysoką frekwencją tetrad nie zawierających mikrojąder (rys. 3). U analizowanych odmian średnia liczba tetrad bez mikrojąder wynosiła 97,41%. U gatunku ojcowskiego tetrady nie zawierające mikrojąder stanowiły 96,59%. Ilość tetrad bez zaburzeń u mieszańców wynosiła średnio 92,64%, była najniższa u Komes $\times$ *A. sterilis* (84,79%), a najwyższa u Borys $\times$ *A. sterilis* (98,46%). We wszystkich kombinacjach mieszańcowych, z wyjątkiem Borys $\times$ *A. sterilis*, frekwencja tetrad nie zawierających mikrojąder była niższa od obu form rodzicielskich. W porównaniu z odmianami wyjściowymi istotnie mniej tetrad bez mikrojąder stwierdzono w kombinacjach Farys $\times$ *A. sterilis*, Góral $\times$ *A. sterilis* i Komes $\times$ *A. sterilis*. Mieszańce Komes $\times$ *A. sterilis* charakteryzowały się również istotnie niższą liczbą tetrad bez mikrojąder aniżeli forma ojcowska (tab. 2).

U analizowanych odmian tetrady z jednym mikrojądrem stanowiły średnio 1,87%, zaś u *A. sterilis* 1,97%. Wszystkie mieszańce, z wyjątkiem kombinacji Borys $\times$ *A. sterilis* wytwarzały więcej tego typu tetrad niż formy rodzicielskie. Średnio udział tetrad z jednym mikrojądrem wynosił u mieszańców 3,3%. Najwyższą częstotliwość takich tetrad obserwowano w kombinacji Komes $\times$ *A. sterilis*. Tetrad z jednym mikrojądrem było w tej kombinacji istotnie więcej niż u gatunku ojcowskiego. W analizowanym materiale frekwencja tetrad z 2, 3 lub większą liczbą mikrojąder była niewielka, ale u wszystkich mieszańców, z wyjątkiem kombinacji Borys $\times$ *A. sterilis*, wzrosła w porównaniu z formami rodzicielskimi (tab. 2).

U form matecznych średnio na jedną tetradę przypadało 0,04 mikrojądra, u *A. sterilis* 0,06, zaś u mieszańców 0,16. W porównaniu do form wyjściowych we wszystkich kombinacjach, z wyjątkiem Borys $\times$ *A. sterilis*, stwierdzono większą średnią liczbę mikrojąder przypadających na jedną tetradę. Różnica ta była istotna jedynie u mieszańców

Komes $\times$ *A. sterilis* (tab. 2). W badaniach McMullena i wsp. (1982) u analizowanych odmian i linii *A. sativa* oraz genotypów *A. sterilis* średnio na tetradę przypadało 0,02 mikrojądra, zaś u mieszańców aż 1,17. W badaniach własnych najwięcej mikrojąder w tetradach (średnio 0,38 / tetradę) obserwowano w kombinacji Komes $\times$ *A. sterilis*. U mieszańców tej kombinacji występowało również najwięcej chromosomów opóźnionych i mostów chromatydowych (tab. 2). McMullen i wsp. (1982) uważają, że łatwa do przeprowadzenia ocena częstotliwości występowania mikrojąder w tetradach może być użytecznym miernikiem zaburzeń w mejozie u heksaploidalnego owsa.



Rys. 3. Mieszaniec Dragon $\times$ *A. sterilis*. Widoczne mikrojądra w tetradach
Fig. 3. Dragon $\times$ *A. sterilis* hybrid. Tetrads with micronuclei

W badaniach własnych zaobserwowano, że pomimo różnic pod względem frekwencji chromosomów opóźnionych, mostów chromatydowych w anafazie I oraz mikrojąder w tetradach wszystkie analizowane formy tworzyły pyłek o bardzo wysokim udziale ziaren żywotnych. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w żywotności pyłku zarówno pomiędzy odmianami, gatunkiem *A. sterilis*, jak i mieszańcami pokolenia F₂. Procentowy udział pyłku nieżywotnego, obejmującego pyłek częściowo wypełniony cytoplazmą i pusty, był w badanych obiektach bardzo niski, a różnice pomiędzy formami okazały się nieistotne (tab. 3). Chen i wsp. (1977) wykazali zależność pomiędzy ilością żywotnego pyłku, a zakłóceniami w podziałach mejotycznych. Według Autorów konsekwencją zaburzeń w mejozie jest powstawanie gamet o obniżonej żywotności, co ujemnie wpływa na płodność roślin. Rogalska (1976) analizując mieszańce oktoploidalnego pszenżyta z heksaploidalną pszenicą stwierdziła, że żywotność pyłku była skorelowana z regularnością mejozy. Z kolei Chrzastek (1995) badając linie addycyjne *T. aestivum* cv. Grana — *S. cereale* cv. Dańkowskie Złote wykazała, że linia 7R pomimo regularnego przebiegu mejozy tworzyła bardzo mało żywotnego pyłku.

Tabela 3

Żywotność i wymiary ziaren pyłku mieszańców *A. sativa* × *A. sterilis* oraz form wyjściowych
Viability and size of pollen grains in hybrids *A. sativa* × *A. sterilis* and initial forms

Formy wyjściowe Mieszańce Initial forms Hybrids	Pyłek żywotny Viable pollen grains		Pyłek nieżywotny Unviable pollen grains				Wymiary ziaren pyłku Size of pollen grains	
	całkowicie wypełniony cytoplazmą fully filled up with cytoplasm		częściowo wypełniony cytoplazmą partly filled up with cytoplasm		pusty not filled up with cytoplasm		średnia długość mean length (µm)	średnia szerokość mean width (µm)
	liczba number	%	liczba number	%	liczba number	%		
formy mateczne maternal forms								
Borys	2930	97,67	8	0,26	62	2,07	52,74	47,62
Dragon	2978	99,26	2	0,07	20	0,70	52,25	46,56
Farys	2942	98,07	4	0,13	54	1,80	52,90	46,18
Góral	2957	98,57	5	0,17	38	1,27	52,52	46,01
Komes	2984	99,47	4	0,13	12	0,40	50,51	45,53
Średnia Mean	2958	98,61	5	0,15	37	1,25	52,18	46,38
forma ojcowska paternal form								
<i>A. sterilis</i>	2967	98,90	4	0,13	29	0,97	53,22	47,26
mieszańce hybrids								
Borys × <i>A. sterilis</i>	2962	98,73	8	0,27	30	1,00	57,97	50,83
Dragon × <i>A. sterilis</i>	2978	99,27	12	0,40	10	0,33	56,30	49,94
Farys × <i>A. sterilis</i>	2954	98,47	19	0,63	27	0,90	50,42	45,66
Góral × <i>A. sterilis</i>	2949	98,30	20	0,67	31	1,03	52,42	47,56
Komes × <i>A. sterilis</i>	2957	98,57	19	0,63	24	0,80	51,96	47,18
Średnia Mean	2960	98,67	16	0,52	24	0,81	53,81	48,23
NIR/LSD (p = 0,05)	—	—	—	—	—	—	2,82	3,15

Gornall (1977) analizował rozmiary ziaren pyłku u 13 gatunków z rodzaju *Avena*, w tym 3 heksaploidów (*A. fatua*, *A. sativa* i *A. sterilis*). Autor określał najdłuższą przekątną ziaren pyłku. Obserwowana wielkość wynosiła średnio u *A. sativa* 47,3 μm, zaś u *A. sterilis* 44,6 μm. Katsiotis i Forsberg (1995) zauważyli, że długość i szerokość ziaren pyłku owsa są ze sobą wysoce skorelowane. Średnie wymiary ziaren u 8 odmian *A. sativa* wynosiły 47,0 × 40,1 μm. Badając wymiary pyłku diploidów, tetraploidów, heksaploidów i syntetycznych oktoploidów Autorzy stwierdzili, że w rodzaju *Avena*, podobnie jak u innych rodzajów, wielkość ziaren pyłku jest pozytywnie skorelowana z liczbą chromosomów. Autorzy nie obserwowali wyraźnego zróżnicowania w rozmiarach pomiędzy gatunkami na jednym poziomie ploidalności. Średnie wymiary pyłku badanych w pracy odmian owsa zwyczajnego były wyższe od obserwowanych przez Katsiotisa oraz Forsberga i wynosiły 52,18 × 46,38 μm, natomiast u *A. sterilis* 53,22 × 47,26 μm. Ziarna pyłku form mieszańcowych miały średnio większe wymiary niż formy rodzicielskie (53,81 × 48,23 μm). Spośród wszystkich analizowanych form największymi ziarnami pyłku charakteryzowała się kombinacja Borys × *A. sterilis* (57,97 × 50,83 μm), a najmniejszymi Farys × *A. sterilis* (50,42 μm × 45,66 μm) (tab. 3).

WNIOSKI

1. Metoda RAPD może być stosowana do potwierdzania mieszańcowego pochodzenia kombinacji *A. sativa* × *A. sterilis*.
2. U mieszańców międzygatunkowych i form wyjściowych w metafazie I nie obserwowano uniwalentów i multiwalentów. Biwalenty miały najczęściej kształt pierścieni, rzadziej prętów.
3. W anafazie I u wszystkich analizowanych form obserwowano chromosomy opóźnione i mosty chromatydowe. U mieszańców stwierdzono wyższą niż u obu form rodzicielskich frekwencję chromosomów opóźnionych i mostów.
4. Żywotność pyłku mieszańców była zbliżona do form wyjściowych, chociaż więcej zaburzeń w mejozie w postaci chromosomów opóźnionych, mostów chromatydowych i mikrojąder w tetradach obserwowano w kombinacjach mieszańcowych.

LITERATURA

- Ansari N., Thomas H. 1983. A study of homologous relationships in the cultivated oat *Avena sativa* ($2n = 6x = 42$). Theor. Appl. Genet. 66: 303 — 305.
- Azel A. 1974. Die Homologie der Chromosomen 2, 15 und 21 von Hafer, *Avena sativa* L. Z. Pflanzenzüchtung 71: 12 — 24.
- 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.
- Chen C., Qualset C. O., Stanford R. H. 1977. Meiotic studies of secondary 42 — chromosome Triticales. Bot. Bull. Acad. Sinica. 18. 2: 89 — 99.
- Chen Q., Armstrong K. 1994. Genomic *in situ* hybridization in *Avena sativa*. Genome 37: 607 — 612.
- Chrzastek M. 1995. Koniugacja chromosomów w metafazie I i żywotność pyłku w liniach addycyjnych *T. aestivum* L. odm. Grana — *S. cereale* L. odm. Dańkowskie Złote. Biul. IHAR 194: 21 — 27.
- 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.
- Gornall R. J. 1977. Notes on the size and exine ornamentation of *Avena* pollen grains. Can. J. Bot. 55(20): 2622 — 2629.
- Halldén C., Hansen M., Nilsson N.O., Hjerdin A., Säll T. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 1185 — 1192.
- Katsiotis A., Forsberg R. A. 1995. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. Euphytica 83: 103 — 108.
- Kianian S. F., Wu B.-Ch., Fox S. L., Rines H. W., Phillips R. L. 1997. Aneuploid marker assignment in hexaploid oat with the C genome as a reference for determining remnant homeology. Genome 40: 386 — 396.
- Kresovich S., Williams J. G. K., McFerson J. R., Routman E. J., Schaal B. A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85: 190 — 196.
- Ladizinsky G. 1970. Chromosomal rearrangements in hexaploid oats. Heredity 25: 457 — 461.
- Leggett J. M., Markhand G. S. 1995. The genomic structure of *Avena* revealed by GISH. Kew Chromosome Conf. IV: 133 — 139.
- Linares C., Ferrer E., Fominaya A. 1998. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12450 — 12455.
- Loskutov I. G., Perchuk I. N. 2000. Evaluation of interspecific diversity in *Avena* genus by RAPD analysis. Oat Newslett. 46.
- 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.

- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK: 59 — 88.
- Penner G. A., Chong J., Levesque-Lemay M., Molnar S. J., Fedak G. 1993 a. Identification of RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. Theor. Appl. Genet. 85: 702 — 705.
- Penner G. A., Chong J., Wight C. P., Molnar S. J., Fedak G. 1993 b. Identification of RAPD marker for the crown rust resistance gene *Pc68* in oats. Genome 36: 818 — 820.
- Rajhathy T., Thomas H. 1974. Cytogenetics of oats (*Avena L.*). Misc. Publ. Genet. Soc. Ottawa, ON.
- Rajhathy T., Morrison J. W. 1959. Chromosome morphology in the genus *Avena*. Canad. J. Botany, 37: 331 — 337.
- Rogalska S. 1976. Observations on the course of meiosis in the pollen cells of the F₂ hybrids obtained from a cross of octoploid wheat-rye (*Triticale*) with hexaploid wheat *T. aestivum*. Genet. Pol. 17: 517 — 522.
- Sereno-Tavares M. J., Bodanese-Zanettini M., Carvalho F., Matsumara A. 1992. Variability in *A. sativa*, *A. sterilis* and their hybrids: morphologic, cytogenetic and electrophoretic evaluations. Proc. of the 4th International Oat Conference, Adelaide, South Australia: 93 — 94.
- Singh R. J., Kolb F. L. 1991. Chromosomal interchanges in six hexaploid oat genotypes. Crop Sci. 31: 726 — 729.
- Skroch P., Nienhuis J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. Theor. Appl. Genet. 91: 1086 — 1091.
- Stammers M., Harris J., Evans G. M., Hayward M. D., Forster J. W. 1995. Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationship in the *Lolium / Festuca* complex. Heredity 74: 19 — 27.
- Wang R. R. C., Chen J., Joppa L. R. 1995. Production and identification of chromosome specific RAPD markers for Langdon durum wheat disomic substitution lines. Crop Sci. 35: 886 — 888.
- Wei J. Z., Wang R. R. C. 1995. Genome- and species-specific markers and genome relationships of diploid perennial species in *Triticeae* based on RAPD analyses. Genome 38: 1230 — 1236.
- Wight C. P., Penner G. A., O'Donoghue L. S., Burrows V. D., Molnar S. J., Fedak G. 1994. The identification of random amplified polymorphic DNA markers for daylength insensitivity in oat. Genome 37: 910 — 914.
- 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. Acids Res. 18 (22): 6531 — 6535.
- Zhou X., Jellen E. N., Murphy J. P. 1999. Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. Crop Sci. 39: 1208 — 1214.