

OCENA ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO POLSKICH ODMIAN OWSA (*AVENA SATIVA* L.)

Maria Chrzęstek, Edyta Paczos-Grzęda, Katarzyna Kruk

Institut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: edyta.paczos@ar.lublin.pl

Streszczenie. Wykonano ocenę zróżnicowania genetycznego 13 polskich odmian owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w oparciu o analizy cytologiczne i molekularne oraz pomiary ważniejszych cech plonotwórczych. Nie stwierdzono istotnych różnic pod względem żywotności pyłku, która wahała się od 99,3% u odmiany Komes do 96,4% u German. Odmiany różniły się natomiast istotnie pod względem średnich wymiarów ziaren pyłku. U odmiany German miały one kształt eliptyczny podczas gdy u odmian Góral i Komes były zbliżone do okrągłego. Stwierdzono istotne różnice pomiędzy odmianami pod względem niektórych cech ilościowych. Odmiany różniły się wysokością roślin, wielkością i kształtem wiechy oraz średnią płodnością kłoska i masą tysiąca ziaren. Na podstawie markerów ^{PstI}AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) określono podobieństwo genetyczne odmian, które było znacznie wyższe od obliczonego na podstawie rodowodów. Uzyskane wyniki wskazują, że badane odmiany pomimo zmienności wielu cech są do siebie genetycznie bardzo podobne.

Słowa kluczowe: *Avena sativa* L., ^{PstI}AFLP, rodowody, żywotność pyłku, cechy ilościowe

WSTĘP

Owies zwyczajny (*A. sativa* L.) jest klasycznym przykładem gatunku uprawnego o bardzo wąskiej puli genów. Założeniem wielu prac badawczych i programów hodowlanych jest poszerzenie jego zmienności genetycznej poprzez wprowadzenie pożądanych genów z pokrewnych gatunków dzikich [4]. Kluczem do uzyskania wartościowych mieszańców jest odpowiedni dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowania. Przyjmuje się, że im większy jest dystans genetyczny pomiędzy krzyżowanymi komponentami tym większe jest prawdopodobieństwo uzyskania wartościowych mieszańców. W ocenie genotypów należy uwzględnić nie tylko cechy morfologiczne roślin, ale również stabilność cytogenetyczną i zróżnicowanie molekularne analizowanych form.

Celem pracy była ocena zróżnicowania genetycznego niektórych polskich odmian owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) przeznaczonych na formy maceczne w krzyżowaniach międzygatunkowych.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem pracy było 13 polskich odmian owsa *Avena sativa* L.: Boryna, Borys, Dragon, Dukat, Farys, German, Góral, Karol, Komes, Kwant, Santor, Sławko, Skrzat. Wszystkie odmiany wysiano punktowo w rozstawie 10 x 20 cm w Gospodarstwie Doświadczalnym Akademii Rolniczej w Czesławicach k/ Nałęczowa. Doświadczenie założono metodą bloków losowanych w trzech powtórzeniach.

W fazie kwitnienia z 5 roślin każdej odmiany utrwalano w roztworze Carnoy'a dojrzałe pylniki do badania żywotności i wymiarów ziaren pyłku. Wykonywano preparaty rozmazowe w kropli 2% acetokarminu. Analizy preparatów dokonywano pod mikroskopem świetlnym przy powiększeniu 16x20. Z każdej odmiany analizowano około 3000 ziaren pyłku. Żywotność pyłku określano na podstawie stopnia wypełnienia ziaren cytoplazmą. Ziarna pyłku, w których cytoplazma stanowiła od 75 do 100% objętości, traktowano jako pyłek żywotny. Dla każdej odmiany określono średnią długość i szerokość ziarn pyłku. Pomiary wykonywano pod mikroskopem przy powiększeniu 10 x 40 za pomocą okularu z podziałką i mikrometru przedmiotowego.

W fazie pełnej dojrzałości poddano ocenie laboratoryjnej 30 pojedynków z każdej odmiany. Analizowano następujące cechy: wysokość roślin (cm), długość wiechy głównej (cm), liczba kłosek i ziarniaków w wieszce głównej, masa ziarniaków z wiechy (g), płodność kłoska (liczba ziarniaków przypadająca na jeden kłosek w wieszce głównej), masa tysiąca ziarniaków (g). Wyniki oszacowano statystycznie przy pomocy programu opracowanego przez Ośrodek Informatyki Akademii Rolniczej w Lublinie. Zastosowano test F-Snedecora, a w celu stwierdzenia istotności różnic pomiędzy obiektami wykorzystano przedziały ufności Tukey'a.

Do charakterystyki odmian wykorzystano również metodę analizy polimorfizmu DNA – ^{PstI}AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). DNA izolowano z koleoptyli kilkudniowych siewek metodą Milligana [7]. Analizę ^{PstI}AFLP wykonano zgodnie z metodyką Tyrki i in. [12]. Do analiz wykorzystano 10 starterów specyficznych: Pst1-Pst10. Na podstawie markerów ^{PstI}AFLP, zgodnie z formułą Dice [9], określono podobieństwo genetyczne SI (*similarity index*) pomiędzy parami wszystkich badanych odmian. Uzyskane wyniki porównano z podobieństwem określonym w oparciu o rodowody 10 spośród 13 badanych odmian. Rodowody odmian posłużyły do obliczenia współczynników rodzicielstwa – COP (*coefficient of parentage*) metodą Murphy i in. [8]. Na podstawie matrycy SI oraz COP skonstruowano dwa dendrogramy wykorzystując metodę UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) stosując program NTSYS-pc 2.10q [11].

WYNIKI BADAŃ

Określenie żywotności i wielkości ziaren pyłku pozwala wnioskować o płodności roślin, a także dostarcza informacji na temat przyczyn powstawania i funkcjonowania niezredukowanych gamet męskich występujących u niektórych gatunków owsa [3]. Zjawisko to ma duży wpływ na efektywność krzyżowania.

Analizowane odmiany owsa nie różniły się istotnie pod względem żywotności pyłku. Najwięcej pyłku wypełnionego całkowicie cytoplazmą zanotowano w odmianie Komes (99,26%) a najmniej w odmianie German (96,35%) (tab. 1).

Tabela 1. Analiza żywotności i wymiarów ziarn pyłku wybranych odmian owsa (*Avena sativa* L.)
Table 1. Analysis of viability and size of pollen grains in some oat (*Avena sativa* L.) varieties

Odmiana Variety	% pyłku całkowicie wypeł- nionego cy- toplazmą % of pollen grains fully filled with cytoplasm	% pyłku częściowo wypełnionego cytoplazmą % of pollen grains partly filled with cytoplasm	% pyłku pustego % of pollen grains not filled with cytoplasm	Średnia długość ziarn pyłku Mean length of pollen grains (um)	Średnia szerokość ziarn pyłku Mean width of pollen grains (um)
Boryna	98,54	0,53	0,93	44,03	36,76
Borys	98,82	0,28	0,90	42,95	37,15
Dragon	98,58	0,64	0,78	43,21	38,86
Dukat	96,96	0,78	2,26	41,16	36,10
Farys	98,54	0,48	0,98	42,65	37,69
German	96,35	2,50	1,15	44,90	36,01
Góral	99,15	0,26	0,59	43,25	39,50
Karol	98,32	0,16	1,52	42,60	36,35
Komes	99,26	0,16	0,58	42,45	38,70
Kwant	97,44	1,38	1,18	43,72	36,22
Santor	98,89	0,03	1,08	43,78	39,88
Sławko	98,79	0,42	0,79	41,83	34,87
Skrzat	97,69	0,91	1,40	47,26	39,83
Średnia Mean	98,26	0,64	1,10	43,37	37,58
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	2,97	1,70	–	2,70	2,96

Stwierdzono natomiast istotne różnice dotyczące wymiarów ziaren pyłku. Najdłuższe ziarna pyłku wytwarzała odmiana Skrzat (47,26 μm) a najkrótsze odmiana Dukat (41,16 μm). Szerokość ziaren pyłku wahała się od 34,87 μm (Sławko) do 39,88 μm (Santor). Najbardziej eliptyczny kształt ziaren pyłku obserwowano w odmianie German a najbardziej okrągły w odmianach Góral i Komes.

Przy doborze komponentów do krzyżowania istotnym kryterium jest wartość ważniejszych cech plonotwórczych. Jedną z nich jest wysokość roślin. Średnia wysokość roślin badanych odmian zawierała się w przedziale 90-111,1 cm (tab. 2).

Tabela 2. Analiza wartości średnich cech ilościowych wybranych odmian owsa (*Avena sativa* L.)
Table 2. Analysis of mean values of quantitative traits of selected oat (*Avena sativa* L.) varieties

Odmiana Variety	Wysokość roślin Plant height (cm)	Długość wiechy Panicle length (cm)	Liczba kłosek z wiechy Number of spikelets per panicle	Liczba ziarniaków z wiechy Number of kernels per panicle	Masa ziarniaków z wiechy Weight of kernels per panicle (g)	Płodność kłoska Spikelet fertility	Masa tysiąca ziarniaków 1000 ker- nels weight (g)
Boryna	102,90	20,00	55,90	103,20	3,37	1,85	32,76
Borys	109,00	19,40	61,60	111,50	3,45	1,82	31,18
Dragon	108,10	20,30	57,40	110,80	3,77	1,93	34,53
Dukat	106,60	21,50	63,70	120,70	3,85	1,90	31,91
Farys	96,00	17,80	48,60	91,70	2,85	1,86	31,11
German	99,60	21,40	53,10	98,50	3,38	1,83	34,38
Góral	93,10	18,50	65,40	98,10	3,03	1,82	30,90
Karol	99,40	18,70	65,40	110,30	3,55	1,69	32,27
Komes	94,40	19,80	44,20	90,70	2,77	2,05	30,65
Kwant	111,10	21,00	62,50	118,40	4,27	1,90	39,10
Santor	96,00	18,00	50,90	103,90	3,20	2,05	31,00
Sławko	104,90	21,50	45,40	90,20	3,60	1,98	39,91
Skrzat	90,00	18,90	45,40	88,10	2,71	1,95	30,86
Średnia Mean	100,90	19,70	55,30	102,70	3,37	1,89	33,12
NIR _{0,05} LSD _{0,05}	4,90	1,50	20,70	21,60	0,75	0,20	11,49

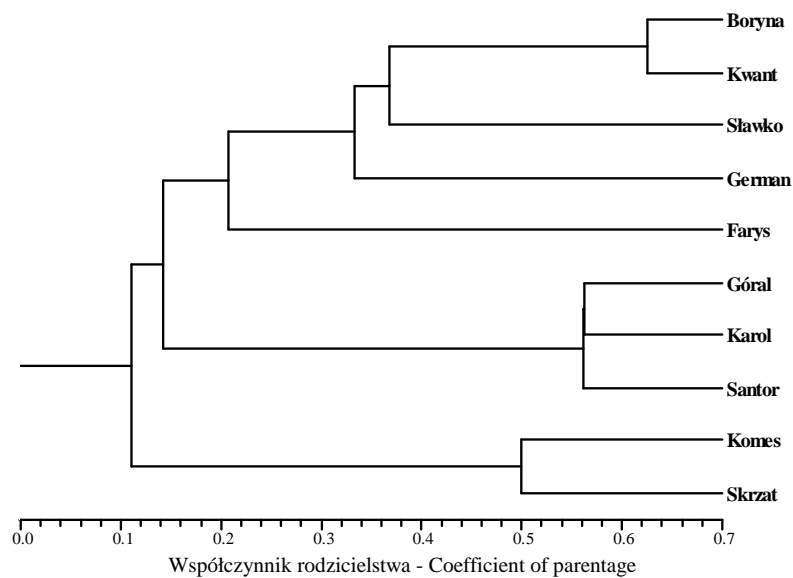
Istotne różnice pomiędzy odmianami stwarzają możliwość selekcji korzystnych genotypów przydatnych w hodowli odmian odpornych na wyleganie. Jednym z kierunków nowoczesnej hodowli owsa jest skrócenie źdźbła poprzez wprowadzenie do odmiany uprawnej genów karłowatości [6]. Z wysokością roślin skorelowana jest długość wiechy [5]. Spośród testowanych odmian najdłuższą wiechą charakteryzowała się odmiana Sławko (21,5 cm) a najkrótszą odmiana Farys (17,8 cm). Średnia liczba kłosek w wieszce głównej badanych odmian wahała się od 44,2 do 65,4.

Odmiany różniły się pod względem plonu ziarniaków z wiechy głównej. W wielu przypadkach były to różnice istotne statystycznie. Największą liczbę i masę ziarniaków zanotowano dla odmian Dukat i Kwant (tab. 2). Średnia plodność kłosa dla wszystkich analizowanych odmian wynosiła 1,89. Pomiedzy wieloma odmianami wystąpiły istotne różnice. Najbardziej różniły się od siebie odmiany Karol (1,69) i Santor (2,05) (tab. 2).

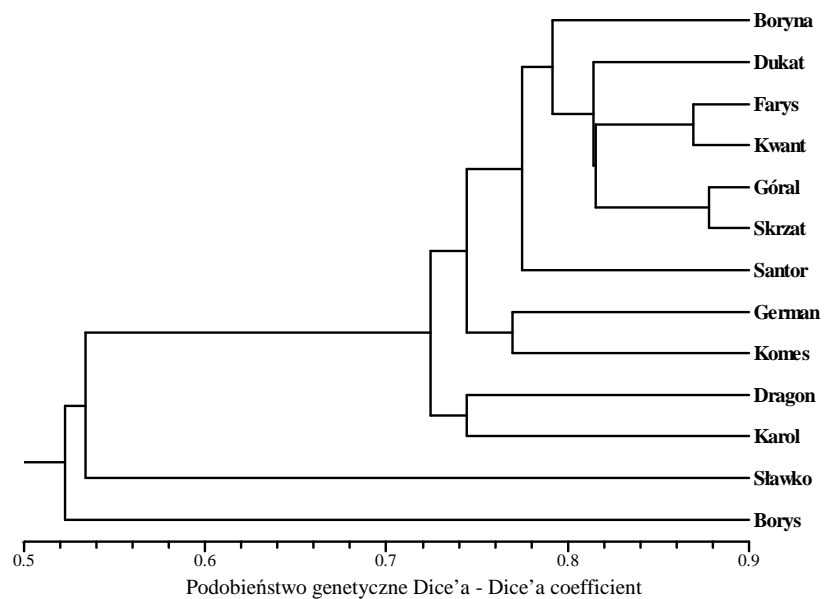
Stwierdzono istotne różnice pomiędzy badanymi odmianami pod względem masy tysiąca ziarniaków (tab. 2). Najwyższą MTZ zanotowano dla odmiany Sławko (39,91 g), a najniższą dla Komes (30,65 g).

Określenie polimorfizmu DNA pozwala bezpośrednio wnioskować o zróżnicowaniu materiału genetycznego analizowanych form.

Wyniki analizy polimorfizmu DNA – ^{Pst}I AFLP wskazują na stosunkowo duże podobieństwo genetyczne badanych odmian. Spośród 10 testowanych specyficznych starterów 9 amplifikowało produkty polimorficzne. W sumie uzyskano 50 polimorficznych fragmentów DNA, od 2 do 11 na starter (średnio 5,6). Podobieństwo genetyczne określone na podstawie markerów molekularnych wyniosło średnio 0,692 i wahało się od 0,381 pomiędzy odmianami Komes i Borys do 0,869 pomiędzy cv. Kwant i cv. Farys. Wartość podobieństwa obliczonego na podstawie rodowodów była znacznie niższa i wynosiła średnio 0,097, najwyższą wartość przyjmując dla odmian Kwant i Boryna (0,625). Współczynnik korelacji pomiędzy matrycami podobieństwa miał wartość 0,186 i był statystycznie nieistotny. Dendrogramy uzyskane w oparciu o rodowody (rys. 1) oraz markery ^{Pst}I AFLP (rys. 2) w dużym stopniu różniły się topologicznie. Wielu autorów uważa, że markery molekularne, za pomocą których oceniana jest zmienność genetyczna na poziomie DNA, lepiej odzwierciedlają rzeczywiste zróżnicowanie obiektów aniżeli dane rodowodowe [2,10]. Almanza-Pinzón i in. [1] stwierdzili, że współczynniki rodzicielstwa, szacowane w oparciu o informacje o pochodzeniu, mogą również właściwie określać podobieństwo genetyczne, ale dane te muszą być rozbudowane i kompletne.



Rys. 1. Dendrogram 13 odmian owsa uzyskany metodą UPGMA w oparciu o rodowody
Fig. 1. Dendrogram of 13 oat varieties generated by UPGMA method based on pedigree



Rys. 2. Dendrogram 13 odmian owsa uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery ^{PstI}AFLP
Fig. 2. Dendrogram of 13 oat varieties generated by UPGMA method based on ^{PstI}AFLP markers

WNIOSKI

1. Analizowane polskie odmiany owsa pomimo różnic dotyczących żywotności pyłku i niektórych cech ilościowych charakteryzują się dużym podobieństwem genetycznym.
2. Analiza rodowodów odmian wskazuje na większe zróżnicowanie genetyczne niż analiza polimorfizmu DNA.
3. W hodowli nowych odmian wskazane jest poszerzenie zmienności genetycznej poprzez wprowadzenie korzystnych genów między innymi z gatunków dzikich.

PIŚMIENNICTWO

1. **Almanza-Pinzón M.I., Khairallah M., Fox P.N., Warburton M.L.:** Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. *Euphytica*, 130, 77-86, 2003.
2. **Dweikat I., McKenzie S., Levy M., Ohm H.:** Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor Appl Genet.*, 85, 497-505, 1993.
3. **Katsiotis A., Forsberg R.A.** Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. *Euphytica*, 83, 103-108, 1995.
4. **Leggett J.M.:** Using and conserving *Avena* genetic resources. W: Proc. of. 5th Int. Oat Conf., Canada, 128-132, 1996.
5. **Marshall H.G., Murphy C.F.:** Inheritance of dwarfness in three oat crosses and relationship of height to panicle and culm length. *Crop. Sci.*, 21, 335-338, 1981.
6. **Milach S.C., Rines H.W., Phillips R.L., Stuthman D.D., Morikawa T.:** Inheritance of a new dwarfing gene in oat. *Crop Sci.*, 38, 356-360, 1997.
7. **Milligan B.G.:** Plant DNA isolation. W: Molecular analysis of Populations: A Practical Approach, pp 59-88. IRL Press, Oxford, UK, 1992.
8. **Murphy J.P., Cox T.S., Rodgers D.M.:** Cluster analysis of red winter wheat cultivars based upon coefficients of parentage. *Crop Sci.*, 26, 672-676, 1986.
9. **Nei M., Li W.H.:** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 5269-5273, 1979.
10. **O'Donoghue L.S., Souza E., Sorrells M.E., Tanksley S.D.:** Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragments length polymorphisms. *Crop Sci.*, 34, 1251-1258, 1994.
11. **Rohlf F.J.:** NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y., 2001.
12. **Tyrka, M.** A simplified AFLP method for fingerprinting of common wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *J. Appl. Genet.*, 43(2), 131-143, 2002.

GENETIC DIVERSITY OF POLISH OAT VARIETIES (*AVENA SATIVA* L.)*Maria Chrząstek, Edyta Paczos-Grzęda, Katarzyna Kruk*

Institute of Genetics and Plant Breeding, Agricultural University
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: edyta.paczos@ar.lublin.pl

Abstract. Genetic diversity of 13 polish oat varieties was evaluated using cytogenetic and molecular analysis as well as measurement of some yield traits. No significant differences were observed in regard to pollen viability which oscillated from 99.3% for cv. Komes to 96.4% for German. However, significant differences referred to pollen grain size. The German variety had elliptic grain, when pollen grains of the Góral and Komes varieties were almost round. Analysed oat varieties differed also significantly in regard to some quantitative traits. Differences affected height of plants, size and shape of panicle, mean spikelet fertility, and 1000 kernels weight. Genetic similarity of varieties was estimated on the basis of ^{PstI}AFLP markers and analysis of pedigree. The first method points to higher genetic similarity. The results give information indicating that, in spite of many differences, the tested varieties are genetically very similar.

Keywords: *Avena sativa* L., ^{PstI}AFLP, pedigree, pollen viability, quantitative traits