

## Ocena zróżnicowania genetycznego materiałów kolekcyjnych pszenżyta ozimego stabilnych pod względem cech plonotwórczych

Aneta Kramek, Sylwia Okoń

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin – Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, Polska

**Abstrakt.** Celem pracy była ocena zróżnicowania genetycznego materiałów kolekcyjnych pszenżyta ozimego za pomocą markerów RAPD. Do badań wybrano 24 genotypy (rody hodowlane i odmiany) pochodzące z różnych rejonów świata, u których na podstawie wieloletnich badań i analiz statystycznych stwierdzono stabilność cech plonotwórczych.

Spośród wstępnie przeanalizowanych 50 starterów RAPD do oceny polimorfizmu wybrano 9. Startery te amplifikowały łącznie 81 fragmentów DNA, z czego 56 (69,13%) stanowiły fragmenty polimorficzne. Średnia wartość indeksów podobieństwa genetycznego badanych genotypów wynosiła 0,81 i wahała się od 0,76 (pomiędzy odmianą Pinokio i pozostałymi obiektami) do 0,91 (pomiędzy rodem LAD 671 i mieszańcem Alzo × LAD 122/90). Odmiana Pinokio charakteryzowała się największym dystansem genetycznym do wszystkich badanych genotypów, zaś rody hodowlane: LAD 671, DED 1556/90 i mieszańiec Alzo × LAD 122/90 oraz odmiana Bolero wykazały się największym podobieństwem w porównaniu do pozostałych genotypów.

Otrzymane wyniki wskazują, że mimo zróżnicowanego pochodzenia geograficznego stabilne pod względem cech plonotwórczych materiały kolekcyjne pszenżyta ozimego charakteryzują się niewielkim zróżnicowaniem genetycznym.

**słowa kluczowe:** markery RAPD, pszenżyto ozime, zróżnicowanie genetyczne

### WSTĘP

We współczesnej hodowli roślin, w tym pszenżyta, duże znaczenie odgrywają genotypy stabilne o szerokim zakresie możliwości adaptacyjnych dotyczących cech plonotwórczych oraz jakości plonu (Kociuba, 2003). Jednak wielu autorów (González i in., 2002; Stojałowski, Góral, 2002; Tams i in., 2002, 2004, 2005; Tyrka, Kociuba, 2002;

Góral i in., 2005; Kramek, 2008) informuje, że materiały hodowlane pszenżyta charakteryzują się dużym podobieństwem genetycznym, co nie jest korzystne z punktu widzenia praktycznej hodowli nowych odmian. Ważne jest, aby materiał hodowlany był zróżnicowany genetycznie i jednocześnie stabilny pod względem cech plonotwórczych, przez co będzie stanowił wartościowe źródło zmienności w pracach hodowlanych.

System markerów RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), oparty na łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem starterów o długości 10 nukleotydów, umożliwia diagnozowanie tożsamości genetycznej przy użyciu niewielkich ilości materiału roślinnego. Za wykorzystaniem tej techniki na szeroką skalę przemawiają stosunkowo niski koszt oraz prosta procedura analiz. Jednak nie wszystkie amplifikowane fragmenty są stabilne i powtarzalne, co wskazuje na konieczność wstępnej selekcji starterów generujących prądkie markerowe (Williams i in., 1990; Masojć, 2000; Milczarski i in., 2001; Stojałowski, Góral, 2002; Twardowska i in., 2002; Atak i in., 2005).

Celem pracy była ocena zróżnicowania genetycznego pochodzących z różnych regionów geograficznych świata i stabilnych pod względem cech plonotwórczych genotypów pszenżyta ozimego. Informacje na temat podobieństwa genetycznego tych materiałów mogą być ważną wskazówką przy wyborze materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian.

### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał badawczy stanowiły 24 genotypy pszenżyta ozimego (rody hodowlane i odmiany), u których na podstawie wieloletnich badań własnych i przeprowadzonych analiz statystycznych stwierdzono stabilność cech plonotwórczych (tab. 1).

DNA badanych genotypów wyizolowano zgodnie z metodą CTAB z koleptyli 5-dniowych siewek w dwóch powtórzeniach dla każdego genotypu i doprowadzono do

Autor do kontaktu:

Aneta Kramek

e-mail: aneta.kramek@up.lublin.pl

tel. 081 445 69-42

Praca wpłynęła do redakcji 25 czerwca 2013 r.

Tabela 1. Wykaz badanych genotypów pszenżyta ozimego  
Table 1. The list of researched genotypes of winter triticale.

Lp. No.	Nazwa genotypu Genotype name	Pochodzenie <sup>#</sup> Origin
1	LT 1334/76	POL
2	6TA-204 AA 3M	ZAF
3	6A-582	CAN
4	/VIR 49913/	UKR
5	6373 M 111 M	ZAF
6	CWT 1977/290	GBR
7	<b>Bolero</b>	POL
8	<b>PABLO</b>	POL
9	GT-AD-1/90	BGR
10	TSW.2.804-86	DDR
11	6TB-792	MEX
12	DED 1556/90	POL
13	DED 248/90	POL
14	LT-2/95	POL
15	LAD 898/93	POL
16	<b>Olympus</b>	FRA
17	<b>BELITSA</b>	BGR
18	MT-3 PRADO	POL
19	<b>PINOKIO</b>	POL
20	<b>DECOR</b>	RUM
21	DI 96-5	FRA
22	LAD 671	POL
23	Alzo × LAD 122/90	POL
24	IGS 5101 × LAD 122/90	POL

# POL – Polska, Poland; ZAF – Republika Południowej Afryki, Republic of South Africa; CAN – Kanada, Canada; UKR – Ukraina, Ukraine; GBR – Wielka Brytania, Great Britain; BGR – Bułgaria, Bulgaria; DDR – Niemiecka Republika Demokratyczna, East Germany; MEX – Meksyk, Mexico; FRA – Francja, France; RUM – Rumunia, Romania

stężenia 20 ng·μl<sup>-1</sup>. Amplifikację DNA przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Williamsa i in. (1990). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 ml wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40), 160 mM każdego dNTP, 5,3 pM startera, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 ng genomowego DNA, 0,4 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas). Reakcje przeprowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 3 minuty w temperaturze 94°C, 44 cykle: 94°C – 45 s, 37°C – 45 s, 72°C – 45 s, z końcową inkubacją 7 min w temperaturze 72°C.

Z wstępnie przeanalizowanych 50 starterów RAPD do analizy polimorfizmu wybrano 9 generujących stabilne i polimorficzne wzory prążków (tab. 2). Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-borate, 2,5 mM EDTA) przez 1,5 godziny przy napięciu 120 V. Żele po podświetleniu lampą UV sfotografowano wykorzystując system dokumentacji żeli PolyDoc. Masę prążków określono porównując je z markerem wielkości GeneRulerTM

100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa) wykorzystując program 'dnafrag' wersja 3.03.

Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano mu odpowiednio wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI – similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów szacowano zgodnie z formułą Dice'a, za Nei i Li (1979):

$$SI = 2N_{xy} / (N_x + N_y),$$

gdzie  $N_{xy}$  oznacza liczbę prążków wspólnych dla genotypów X i Y, a  $N_x$  i  $N_y$  oznaczają odpowiednio liczbę prążków obecnych w genotypie X i w genotypie Y.

Matrycę SI (tab. 3) uzyskaną na podstawie analizy polimorfizmu zidentyfikowanego metodą RAPD wykorzystano do konstrukcji dendrogramu metodą UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) (rys. 1) przy zastosowaniu programu NTSYS-pc (Rohlf, 2001).

## WYNIKI I DYSKUSJA

Przydatność markerów RAPD do identyfikacji genotypów zależy przede wszystkim od wybranego startera, który będzie generował stabilne polimorficzne produkty amplifikacji (Twardowska i in., 2002). Atak i in. (2005) przebadali za pomocą markerów RAPD 25 genotypów pszenżyta pochodzących z tureckich ośrodków hodowlanych i stwierdzili ich duże zróżnicowanie genetyczne oraz przydatność zastosowanej metody. Dane z literatury wskazują, że liczba starterów wykorzystywanych do oceny polimorfizmu pszenżyta waha się od kilku do kilkunastu. Terzi (1998) za pomocą 7 starterów RAPD dokonał analizy zróżnicowania genetycznego 12 odmian pszenżyta. Masojć (2000) do odróżnienia odmian żyta, pszenicy i pszenżyta użył 8 starterów, a Kramek (2008) ocenę polimorfizmu 22 polskich odmian pszenżyta ozimego przeprowadził w oparciu o 15 starterów RAPD.

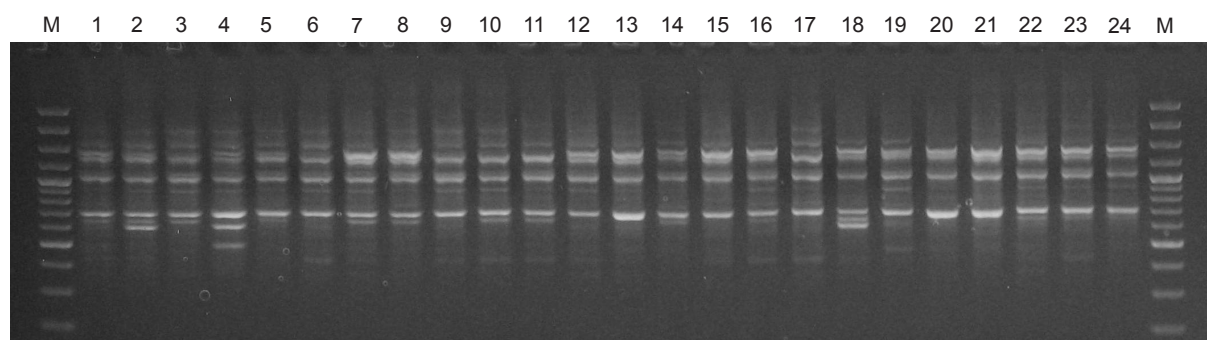
W niniejszej pracy ocena polimorfizmu 24 genotypów pszenżyta ozimego została przeprowadzona za pomocą systemu markerów RAPD. Całkowita liczba produktów amplifikacji uzyskanych w obecności 9 wyselekcjonowanych starterów wynosiła 81, z czego 56 (69,13%) były to produkty polimorficzne. Średnio na jeden starter przypadało 9 amplifikowanych odcinków DNA, zaś na jeden genotyp 3,37 amplikonu. Liczba fragmentów generowanych przy użyciu jednego startera wahała się od 6 dla startera U600 do 11 dla starterów A16 i G01. Rozmiary uzyskanych prążków wynosiły od 470 do 2700 par zasad. Średnio na starter przypadało 6,22 fragmentu polimorficznego, zaś na pojedynczy genotyp – 2,33. Pojedynczy starter inicjował amplifikację od 3 (U600) do 10 (A16) takich produktów. Frekwencja prążków polimorficznych wahała się od 40,0% dla startera J-10 do 90,9% dla startera A16 (tab. 2, fot. 1).

Wyniki wielu badań wskazują, że liczba polimorficznych produktów, które powstają w obecności różnych starterów, jest zróżnicowana i zależy nie tylko od zastoso-

Tabela 2. Charakterystyka starterów RAPD użytych do oceny zróżnicowania genetycznego materiałów kolekcyjnych pszenżyta ozimego

Table 2. The characteristic of RAPD primers used to assess the genetic diversity of winter triticale collection materials.

Starter Primer	Sekwencja (5'-3') Sequence 5'-3'	Liczba prążków Number of bands		Procent prążków polimorficznych The percentage of polymorphic bands	Zakres wielkości prążków (pz) Range of bands size (bp)
		całkowita total	polimorficznych polymorphic		
A16	AGCCAGCGAA	11	10	90,9	500–1500
F13	GGCTGCAGAA	9	6	66,7	600–1600
G01	CTACGGAGGA	11	6	54,5	470–2700
J-10	AAGCCCGAGG	10	4	40,0	510–2600
M-07	CCGTGACTCA	9	8	88,9	550–2000
T02	GGAGAGACTC	7	5	71,4	490–1600
U534	CACCCCTGC	10	8	80,0	740–2500
U535	CCACCAACAG	8	6	75,0	720–2450
U600	GAAGAACCGC	6	3	50,0	900–2400
Suma; Sum		<b>81</b>	<b>56</b>		
Średnio na starter Mean per primer		<b>9</b>	<b>6,22</b>	<b>69,13</b>	
Średnio na genotyp Mean per genotype		<b>3,37</b>	<b>2,33</b>		



M – marker wielkości, size marker; 1 – LT 1334/76; 2 – 6TA-204 AA 3M; 3 – 6A-582; 4 – VIR 49913; 5 – 6373 M 111 M; 6 – CWT 1977/290; 7 – Bolero; 8 – Pablo; 9 – GT-AD-1/90; 10 – TSW.2.804-86; 11 – 6TB-792; 12 – DED 1556/90; 13 – DED 248/90; 14 – LT-2/95; 15 – LAD 898/93; 16 – Olympus; 17 – Belitsa; 18 – MT-3 Prado; 19 – Pinokio; 20 – Décor; 21 – DI 96-5; 22 – LAD 671; 23 – Alzo × LAD 122/90; 24 – IGS 5101 × LAD 122/90

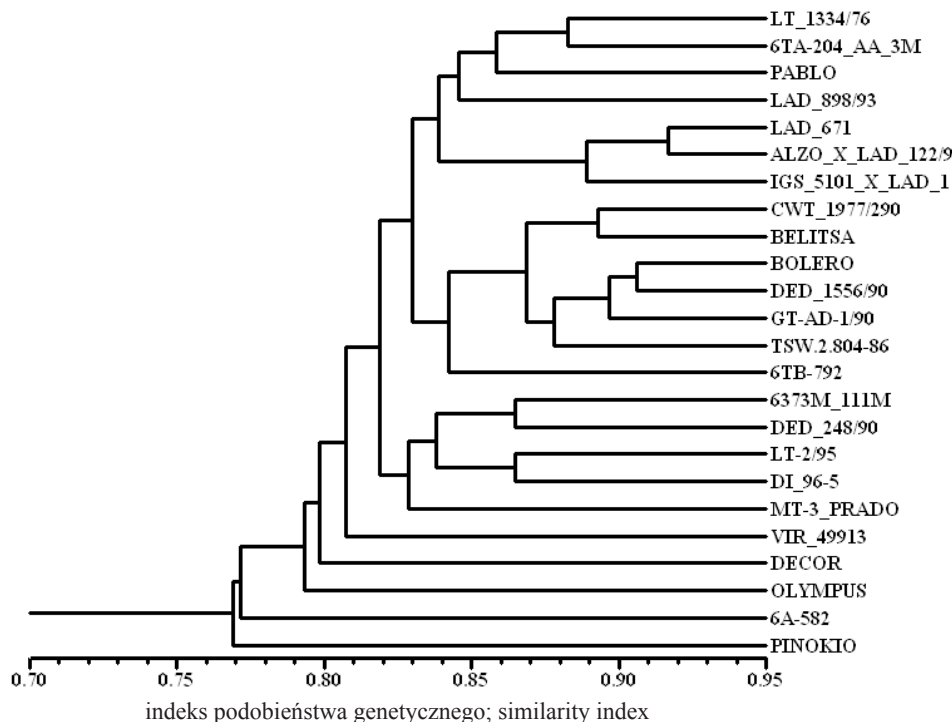
Fot. 1. Obraz amplifikacji uzyskany w obecności startera U 534

Fot. 1. The amplification pattern of U 534 primer.

wanego systemu markerów molekularnych, ale również od gatunku rośliny. González i in. (2002) stosując różne systemy markerowe, m.in.: RAPD, RAMP, SSR i AFLP, otrzymali 5016 produktów amplifikacji, z których tylko 500 (10,0%) było fragmentami polimorficznymi. Stojałowski i Góral (2002) analizując różnicowanie linii cms pszenżyta ozimego z cytoplazmą *Triticum timopheevi* stwierdzili, że w obecności starterów RAPD powstawało od 1 do 6 stabilnych produktów amplifikacji, z których tylko 12,2%

było produktami polimorficznymi, natomiast startery ISSR inicjowały syntezę od 4 do 12 powtarzalnych odcinków DNA, z których również niewielki odsetek (18,1%) stanowiły produkty polimorficzne umożliwiające identyfikację genotypów. Większą liczbę produktów polimorficznych uzyskały Kramek (2008) oraz Kramek i Paczos-Grzęda (2010) badając zróżnicowanie genetyczne polskich odmian pszenżyta ozimego. W obecności starterów RAPD powstało 87 (64,44%) takich produktów (Kramek, 2008),





Rys. 1. Dendrogram 24 genotypów pszenżyta ozimego uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą RAPD

Fig. 1. The UPGMA dendrogram of 24 winter triticale genotypes based on RAPD polymorphism.

natomiast startery ISSR generowały 116 (62,03%) fragmentów polimorficznych (Kramek, Paczos-Grzęda, 2010). Podobne wyniki uzyskali Orlovskaya i in. (2012), którzy za pomocą markerów RAPD i ISSR ocenili polimorfizm 20 genotypów pszenżyta jarego. Stwierdzili, że spośród 69 fragmentów amplifikowanych w obecności starterów RAPD 62 (89,9%) były to fragmenty polimorficzne, natomiast startery ISSR generowały 86 stabilnych produktów amplifikacji, z czego 69 (80,2%) było produktami polimorficznymi. Różnice w liczbie produktów polimorficznych uzyskanych przez autorów ww. prac wynikają zapewne z tego, że do oceny zostały wykorzystane zróżnicowane zestawy starterów generujące określony poziom polimorfizmu, a ocena została przeprowadzona na zróżnicowanym materiale badawczym.

Średnia wartość indeksów podobieństwa genetycznego (SI) badanych materiałów kolekcyjnych pszenżyta ozimego była wysoka i wyniosła 0,81, przy zakresie od 0,76 (pomiędzy odmianą Pinokio a pozostałymi badanymi genotypami) do 0,91 (pomiędzy mieszańcem Alzo × LAD 122/90 a rodem hodowlanym LAD 671). Największym podobieństwem genetycznym wśród badanych obiektów charakteryzowały się rody hodowlane: LAD 671, DED 1556/90 oraz odmiana Bolero, zaś najmniejszym odmiana Pinokio (tab. 3).

Badane genotypy pszenżyta ozimego utworzyły na dendrogramie trzy grupy skupień. Pierwsza z nich obej-

muje 7 obiektów: 6 z nich pochodzi z Polski, a jeden (6TA-204 AA 3M) z Republiki Południowej Afryki. W drugiej grupie skupień znalazło się również 7 genotypów pszenżyta pochodzących z Bułgarii (Belitsa, GT-AD-1/90), Meksyku (6TB-792), Niemiec (TSW.2.804-86), Polski (Bolero, DED 1556/90) i Wielkiej Brytanii (CWT 1977/290). Trzecią grupę skupień utworzyło 5 genotypów, z czego 3 pochodzą z Polski (DED 248/90, LT-2/95, MT-3 Prado), jeden z Francji (DI 96-5) i jeden z RPA (6373 M 111 M). Pozostałe genotypy o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym (Francja, Kanada, Polska, Rumunia, Ukraina) charakteryzowały się mniejszym podobieństwem genetycznym i skupiły się na obrzeżach dendrogramu (rys. 1).

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują na małe zróżnicowanie genetyczne stabilnych pod względem cech plonotwórczych materiałów kolekcyjnych pszenżyta ozimego mimo ich zróżnicowanego pochodzenia geograficznego. O relatywnie niewielkim zróżnicowaniu materiałów hodowlanych pszenżyta informują również: González i in. (2002), Stojałowski, Góral (2002), Tams i in. (2002), Tyrka, Kociuba (2002) Kramek (2008). Na uzyskane wyniki duży wpływ mogły mieć zastosowane przez autorów startery oraz system markerowy. Precyzyjna ocena dystansu genetycznego powinna opierać się na szerokim zestawie markerów oraz na kilku systemach markerowych równocześnie (Tams i in., 2002).

## WNIOSKI

1. System markerów RAPD pozwolił na ocenę zróżnicowania genetycznego stabilnych pod względem cech plonotwórczych genotypów pszenżyta ozimego.

2. Badane genotypy, mimo zróżnicowanego pochodzenia geograficznego, charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym. Jednak, ze względu na stabilność pod względem cech plonotwórczych, mogą stanowić cenne źródło zmienności w hodowli twórczej.

## LITERATURA

- Atak M., Parmaksiz I., Ozcan S., Ciftci C.Y., 2005.** Characterization of triticale genotypes by RAPD analysis. *Kor. J. Genet.*, 27(4): 375-381.
- González J.M., Jouve N., Gustafson J.P., Muñiz L.M., 2002.** A genetic map of molecular markers in  $\times$ Triticosecale Wittmack. W: Proc. of the 5th Int. Triticale Symp., IHAR Radzików, Poland, 30 June – 5 July 2002, vol. II: 85-93.
- Góral H., Tyrka M., Spiss L., 2005.** Assessing genetic variation to predict the breeding value of winter triticale cultivars and lines. *J. Appl. Genet.*, 46(2): 125-131.
- Kociuba W., 2003.** Ocena średnich i stabilności cech plonotwórczych w kolekcji genotypów pszenżyta ozimego ( $\times$ Triticosecale Wittmack). *Biul. IHAR*, 226/227/1: 167-176.
- Kramek A., 2008.** Wykorzystanie markerów RAPD do oceny zróżnicowania genotypowego polskich odmian pszenżyta ozimego. *Biul. IHAR*, 248: 43-51.
- Kramek A., Paczos-Grzęda E., 2010.** Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian pszenżyta ozimego za pomocą markerów ISSR. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 555: 249-258.
- Masojć P., 2000.** Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 206(82): 179-184.
- Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P., 2001.** Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. *Biul. IHAR*, 218/219: 261-267.
- 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.
- Orlovskaya O.A., Koren L.V., Khotyleva L.V., 2012.** Genetic polymorphism evaluation of spring triticale ( $\times$ Triticosecale Wittmack) samples with use of RAPD and ISSR markers. *Russian J. Genet.: Appl. Res.*, 2(6): 508-512
- Rohlf F.J., 2001.** NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.10q. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y., ss 171.
- Stojalowski S., Góral H., 2002.** Wykorzystanie markerów RAPD i ISSR do różnicowania linii cms pszenżyta ozimego z cytoplazmą *T. timopheevi*. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 228(91): 161-166.
- Tams S.H., Melchinger A.E., Oettler G., Bauer E., 2002.** Assessment of genetic diversity in European winter triticale us-

ing molecular markers and pedigree data. W: Proc. of the 5th Int. Triticale Symp., IHAR Radzików, Poland, 30 June – 5 July, vol. I: 95-103.

- Tams S.H., Bauer E., Oettler G., Melchinger A.E., 2004.** Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 1385-1391.
- Tams S.H., Melchinger A.E., Bauer E., 2005.** Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. *Plant Breed.*, 124: 154-160.
- Terzi V., 1998.** RAPD markers for fingerprinting barley, oat and triticale varieties. *J. Genet. Breed.*, 51(2): 115-120.
- Twardowska M., Banek-Tabor A., Masojć P., 2002.** Identyfikacja odmian pszenżyta ozimego przy użyciu techniki RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 228(91): 175-178.
- Tyrka M., Kociuba W., 2002.** Ocena zróżnicowania genetycznego odmian pszenżyta ozimego 6x za pomocą zmodyfikowanej metody AFLP. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 228(91): 185-190.
- 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: 6531-6535.

*A. Kramek, S. Okoń*

THE ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF WINTER TRITICALE COLLECTION ACCESSIONS THAT SHOW STABILITY FOR YIELD-RELATED TRAITS

Summary

The aim of this study was to assess the genetic diversity of winter triticale collection materials using RAPD markers. Twenty four genotypes (breeding lines and cultivars), derived from different regions of the world, in which the stability of yielding traits was found based on the long term studies and statistical analysis, were chosen to this study.

Among initially analyzed 50 RAPD primers, 9 were chosen to the estimation of polymorphism. Those primers generated 81 fragments of DNA, 56 of them (69.13%) were polymorphic. The mean value of similarity index of researched genotypes was 0.81 and fluctuated from 0.76 (between cv. Pinokio and the other accessions) to 0.91 between breeding line LAD 671 and the hybrid Alzo  $\times$  LAD 122/90. Cv. Pinokio showed the largest genetic distance to all examined genotypes and breeding lines: LAD 671, DED 1556/90 and GT-AD-1/90, as well cv. Bolero were characterized by the greatest similarity in comparison to the other accessions.

The results indicate that despite diverse geographical origin, winter triticale collection materials which show stability for yield-related traits are characterized by a small genetic diversity.

**key words:** genetic diversity, RAPD markers, winter triticale