

OCENA PODOBIENSTWA GENETYCZNEGO MIESZAŃCÓW PSZENŻYTA
Z *AEGILOPS JUVENALIS* (THELL.) EIG

Agnieszka Grądzielewska, Daniela Gruszecka, Justyna Leśniowska-Nowak

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: agnieszka.gradzielewska@up.lublin.pl

Streszczenie. Celem pracy była ocena podobieństwa genetycznego mieszańców pszenżyta z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig z wykorzystaniem metody RAPD oraz identyfikacja u pszenżyta DNA dzikiego gatunku. Badania prowadzono z udziałem 16 starterów RAPD. Łącznie uzyskano 141 fragmentów DNA, z czego poszczególne startery powielały od 5 (U572) do 14 (A16) odcinków. Średnio na starter przypadało 2,9 polimorficznych produktów – od 1 (dla F09 i W2) do 6 (dla U225). Trzy startery (A16, G2, G10) powielały łącznie 4 produkty potwierdzające obecność materiału genetycznego *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig u poszczególnych form mieszańcowych. Określono podobieństwo genetyczne pomiędzy badanymi obiektami. Stwierdzono, że największe średnie podobieństwo genetyczne w stosunku do pozostałych genotypów (0,846) wykazywał ród o kombinacji *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]. Średnie podobieństwo genetyczne wszystkich badanych form wynosiło 0,791. Na podstawie matrycy indeksów podobieństwa genetycznego wykonano analizę skupień metodą UPGMA.

Słowa kluczowe: *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig, podobieństwo genetyczne, pszenżyto, RAPD

WSTĘP

Pszenżyto jest zbożem, które przez wiele lat uważane było za jedno z najodporniejszych na choroby. W miarę zwiększania się jego areалу uprawy zaobserwowano wzrost porażania przez różne patogeny pszenicy jak i żyta, choć w dalszym ciągu jest ono mniejsze niż u form rodzicielskich (Pokacka 1988, 1991, Zamorski i Schollenberger 1995, Góral 2006). Pszenżyto jest porażane przez takie choroby jak: rdza żółta (*Puccinia striiformis*), rdza brunatna (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), rynchosporioza wywoływana m. in. przez *Rhynchosporium secalis*

(Zamorski i Schollenberger 1995), fuzarioza kłosów (*Fusarium culmorum*) (Góral 2006), septorioza (*Stagonospora nodorum*), czy sporysz (Pokacka 1991).

Wzrastająca podatność pszenżyta na choroby nie jest jedynym problemem hodowców tego zboża. Dużym wyzwaniem jest również poprawa odporności *Triticosecale* na porastanie ziarna. Pszenżyto wykazuje znaczną skłonność do porastania, większą nawet niż gatunki rodzicielskie (Gruszecka 2005).

Odporność zbóż, w tym również pszenżyta, na stresy biotyczne i abiotyczne można poprawiać poprzez wprowadzenie genów odporności z form dzikich, opierając się na krzyżowaniu oddalonym pomiędzy gatunkami w obrębie jednego lub różnych rodzajów. Celem jest uzyskanie nowych genotypów o większym znaczeniu praktycznym od form wyjściowych (Makarska i Gruszecka 2000).

Dziki gatunki z plemienia *Triticeae* – kozińce (*Aegilops* sp.) są dla zbóż źródłem odporności na wiele chorób powodowanych przez grzyby patogenne oraz czynniki abiotyczne. Heksaploidalny gatunek *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig jest źródłem genów odporności na rdzę brunatną, czy wysokie stężenie toksycznych jonów glinu (Stefanowska i in. 1995). Mieszańcowe rody pszenżyta (Boros i in. 2005), jak również pszenicy (Stefanowska i in. 1995) z *Aegilops juvenalis* 6x (Thell.) Eig charakteryzują się ponadto wyższym poziomem białka w ziarnie w porównaniu z rodzicielskimi formami uprawnymi pszenżyta i pszenicy. Kozińiec ten ma również korzystny wpływ na skład chemiczny ziarna pszenżyta (Makarska i Gruszecka 2000).

W praktycznej hodowli roślin duże znaczenie odgrywa szybka ocena materiałów hodowlanych, pozwalająca na ich identyfikację i określenie podobieństwa bądź zróżnicowania genetycznego, co w konsekwencji pozwala na wybór do hodowli materiałów najbardziej zróżnicowanych genetycznie oraz wykluczenie z kolekcji powtarzających się form. Ze względu na bardzo dużą ilość linii hodowlanych i odmian zebranych w bankach genów, które w wielu przypadkach wykazują duże podobieństwo genetyczne, ocena ich zróżnicowania genetycznego w oparciu o markery morfologiczne stała się niewystarczająca. Dlatego też obecnie na szeroką skalę wykorzystuje się do tego celu markery molekularne.

W badaniach mieszańców międzyrodzajowych wielokrotnie wykorzystywano metodę RAPD. Xia i in. (1998) badali tą metodą mieszańce *T. aestivum* z *D. villosum*, z kolei Gruszecka i Miąc (2002) stwierdziły obecność fragmentów DNA charakterystycznych dla formy ojcowskiej u mieszańców *Secale cereale* × *Dasyphyrum villosum*. Markery RAPD okazały się przydatne do oceny pokrewieństwa genetycznego pomiędzy *Aegilops* i *Triticum*, a także do identyfikacji chromatyny *Ae. juvenalis* i *Ae. ventricosa* u mieszańców z *T. aestivum* (Tyrka 1999, Tyrka i in. 2001). Metodę tę zastosowano także w badaniach genów pochodzących z *Aegilops kotschyi*, a przywracających płodność formom *Triticum aestivum* z cytoplazmatyczną męską sterylnością (Liu i in. 2002).

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiło 7 rodów mieszańcowych pszenżyta z kociońcem – *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig należących do dwóch kombinacji krzyżówkowych oraz komponenty rodzicielskie (tab. 1).

Kociońca – *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig otrzymano z kolekcji Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research w Gatersleben (Niemcy).

Tabela 1. Materiał roślinny

Table 1. Plant material

Kombinacja/Forma rodzicielska Combination/Parental form	Nr rodu Strain No.	Pochodzenie Pedigree	Pokolenie Generation	Formuła krzyżowania Crossbreeding formula
Kombinacja I Combination 1	1.	CZR350/9	B ₄ /F ₇	
	2.	CZR350/833/3/95 (forma wysoka) (high form)	B ₂ /F ₉	<i>Aegilops juvenalis</i> 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]
	3.	CZR350/833/3/95 (forma niska) (short form)	B ₂ /F ₉	
	4.	CZR350/833/3/95	B ₂ /F ₉	
Kombinacja II Combination 2	5.	CZR700/9	B ₂ /F ₈	
	6.	CZR700/VI/4/1/01	B ₂ /F ₄	
	7.	CZR700/VIII/1/3/01	B ₄ /F ₂	
Formy rodzicielskie Parental forms	komb. I comb. 1	Aj ♀ <i>Aegilops juvenalis</i> (Thell.) Eig		
		A ♂ (Lanca × L506/79) × CZR142/79		
	komb. II comb. 2	B ♀ (Jana × Tempo) × Jana		
		Aj ♂ <i>Aegilops juvenalis</i> (Thell.) Eig		

Ekstrakcję DNA przeprowadzono zgodnie z metodą Milligana (1992). Amplifikację przy udziale starterów RAPD została wykonana zgodnie z Williams i in. (1990). W mieszaninie reakcyjnej o całkowitej objętości 15 µl znajdowały się od-

powiednio: 1x bufor do PCR (10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 1,2 mM MgCl₂, 160 μM każdego dNTP, 0,53 μM startera, 40 ng genomowego DNA, 0,5U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcje przeprowadzono na termocyklerze Thermocycler T1 Biometra stosując profil termiczny: wstępna denaturacja przez 2 min. w temp. 95°C, następnie 45 cykli wg profilu: 94°C – 45 s, 37°C – 45 s, 72°C – 45 s oraz końcowa inkubacja w 72°C przez 10 min. Reakcje RAPD przeprowadzono z zastosowaniem 16 spośród 24 testowanych starterów RAPD (tab. 2) w dwóch powtórzeniach dla każdego genotypu, jednocześnie prowadząc próbę bez matrycy DNA jako reakcję kontrolną.

Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym zawierającym 0,01% bromku etydyny, w buforze 1× TBE (89 mM Tris-borate, 2,5 mM EDTA). Rozdział prowadzono przez 1,5 h stosując napięcie 120V. Rozdzielone w żelu fragmenty DNA podświetlano transiluminatorem UV i fotografowano. Masę prążków określano poprzez porównanie ich z markerem wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa), przy pomocy programu Dnafrag 3.03.

Tabela 2. Sekwencje wybranych starterów RAPD

Table 2. Sequence of chosen RAPD primers

Starter Primer	Sekwencja 5'-3' 5'-3' sequence	Starter Primer	Sekwencja 5'-3' 5'-3' sequence	Starter Primer	Sekwencja 5'-3' 5'-3' sequence
A-11	CAA TCG CCG T	T-02B	CTA CAC AGG C	U-532	TTG AGA CAG G
A-16	AGC CAG CGA A	T-04	GTC CTC AAC G	U-535	CCA CCA ACA G
F-05	CCG AAT TCC C	V-15	CAG TGC CGG T	U-572	TTC GAC CAT C
G-02	TGC TGC AGG T	U-225	CGA CTC ACA G	U-600	GAA GAA CCG C
G-10	CCG ATA TCC C	U-250	CGA CAG TCC C	W-02	ACC CCG CCA A
T-02	GTC CTA CTC G				

Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę, którą zapisywano odpowiednio jako wartość 1 lub 0. Otrzymaną w ten sposób matrycę zero-jedynkową zastosowano do obliczenia współczynników podobieństwa genetycznego pomiędzy parami wszystkich badanych genotypów przy użyciu formuły Dice'a (Nei i Li 1979): $SI = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$ gdzie, N_{XY} oznacza liczbę prążków obecnych w obu porównywanych genotypach X i Y, N_X oznacza liczbę fragmentów obecnych w genotypie X, N_Y oznacza liczbę prążków obecnych w genotypie Y. Obliczenia wykonano z zastosowaniem programu NTSYS-pc 2.10q.

Matryca indeksów podobieństwa (SI) posłużyła do konstrukcji dendrogramu przy zastosowaniu metody średnich połączeń UPGMA (*unweighted*

pair group method with arithmetic average) za pomocą programu NTSYS-pc 2.10q (Rohlf 2001).

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie – PIC (*polymorphism information content*) zgodnie z założeniami Nei (1973): $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ gdzie P_{ij} – częstość i-tego allelu ujawnionego przez j-ty marker. Wartości PIC przyjmują zakres od 0 (allel monomorficzny) do 1 (allel silnie dyskryminujący).

WYNIKI BADAŃ

Wybrane do analiz startery RAPD powieliły łącznie 141 fragmentów DNA. Poszczególne oligonukleotydy amplifikowały od 5 (U572) do 14 (A16) odcinków DNA, średnio 8,8 na starter (tab. 3). Wielkość zidentyfikowanych fragmentów mieściła się w granicach 245-2395 pz (par zasad). Otrzymano 47 (33,3%) produktów polimorficznych o wielkości 294-1869 pz. Poszczególne startery generowały od 1 (F05, W2) do 6 (U225) polimorficznych fragmentów, średnio 2,9 na starter. Wartość współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) dla poszczególnych starterów RAPD wynosiła od 0,36 do 0,69. Średnia wartość tego indeksu dla metody RAPD wyniosła 0,53.

Zidentyfikowano 4 produkty potwierdzające obecność materiału genetycznego *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig u poszczególnych form mieszańcowych, z wyjątkiem rodu numer 5 (tab. 4). Przeprowadzenie reakcji z dwoma starterami (A16 i G2) pozwoliło otrzymać fragmenty DNA pochodzące od dzikiego gatunku dla 6 z 7 badanych rodów. U poszczególnych rodów obecność materiału genetycznego *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig potwierdzało od 1 do 3 fragmentów (tab. 4).

Otrzymane metodą RAPD wyniki badań podobieństwa genetycznego stanowiły podstawę do skonstruowania matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (SI) (tab. 5). Wśród 7 badanych form mieszańcowych najbardziej podobne genetycznie (0,969) były rody 2 i 3 z kombinacji *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79], najmniejsze zaś podobieństwo (0,851) stwierdzono pomiędzy rodem nr 3 kombinacji *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] a rodem nr 7 kombinacji [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x. Wśród wszystkich badanych genotypów najmniejsze jednak podobieństwo genetyczne (0,364) stwierdzono między *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig i rodem nr 5 kombinacji [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x (tab. 5).

Dziki gatunek rodzicielski charakteryzował się najmniejszym podobieństwem genetycznym w stosunku do wszystkich badanych form pszenżyta, wynoszącym 0,364-0,405, średnio 0,392. Największe zaś średnie podobieństwo genetyczne w stosunku do pozostałych genotypów (0,846) wykazywał ród nr 4 kombinacji Ae-

gilops juvenalis 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]. Średnie podobieństwo genetyczne wszystkich badanych form wynosiło 0,791 (tab. 5).

Tabela 3. Charakterystyka polimorfizmu markerów RAPD

Table 3. Characteristics of the RAPD markers polymorphism

Starter Primer	Liczba fragmentów Number of fragments			Zakres wielkości fragmentów (pz) Fragment size range (bp)		PIC	
	Całkowita Total	Polimorficznych Polymorphic	Poch. z <i>Aegilops juvenalis</i> From <i>Aegilops juvenalis</i>	Specyficznych dla <i>Aegilops juvenalis</i> Specific for <i>Aegilops juvenalis</i>	Wszystkich Total		Polimorficznych Polymorphic
A11	7	2	0	1	468-1023	673-711	0,36
A16	14	4	1	3	407-1856	499-1856	0,41
F05	7	1	0	2	675-1869	1869	0,42
G2	8	4	2	1	523-1291	792-1291	0,54
G10	10	2	1	2	340-1907	461-599	0,37
T2	9	3	0	3	315-2012	537-1274	0,63
T2B	10	3	0	3	245-1022	444-836	0,56
T4	6	2	0	2	571-1307	571-725	0,55
U225	11	6	0	3	371-1203	496-776	0,68
U250	12	2	0	4	349-1003	349-1003	0,49
U532	7	2	0	2	294-1685	294-1144	0,59
U535	6	5	0	0	636-1416	636-1416	0,69
U572	5	2	0	1	715-1764	715-1054	0,62
U600	12	3	0	4	332-1157	421-1157	0,57
V15	10	5	0	1	540-2395	594-1162	0,5
W2	7	1	0	2	325-1175	515	0,48
Suma / zakres wielkości Sum/size range	141	47	4	34	245-2395	294-1869	
Średnio na starter Mean per primer	8,8	2,9	0,25	2,1			0,53

Tabela 4. Markery RAPD identyfikujące chromatynę *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig u mieszańców pszenżyta**Table 4.** RAPD markers identifying *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig chromatin in *Triticale* hybrids.

Starter Primer	Wielkość prążka (pz) Band size (bp)	Mieszańce – Hybrids						
		1	2	3	4	5	6	7
A16	563	+	+		+			
G2	876				+		+	+
	792		+	+	+			
G10	599						+	

Tabela 5. Matryca indeksów podobieństwa Dice'a (SI) otrzymana na podstawie polimorfizmu markerów RAPD**Table 5.** Dice coefficient similarity matrix (SI) based on the RAPD markers polymorphism

Forma Form	Aj	A	1	2	3	4	B	5	6	Średnie podobieństwo Mean similarity
Aj										0,392
A	0,405									0,826
1	0,398	0,913								0,828
2	0,398	0,878	0,877							0,845
3	0,374	0,878	0,888	0,969						0,835
4	0,393	0,869	0,889	0,948	0,938					0,846
B	0,402	0,890	0,856	0,886	0,865	0,866				0,821
5	0,364	0,874	0,906	0,871	0,871	0,904	0,860			0,835
6	0,400	0,863	0,862	0,903	0,882	0,915	0,872	0,933		0,843
7	0,395	0,865	0,863	0,872	0,851	0,895	0,895	0,934	0,956	0,836

Aj – *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig,

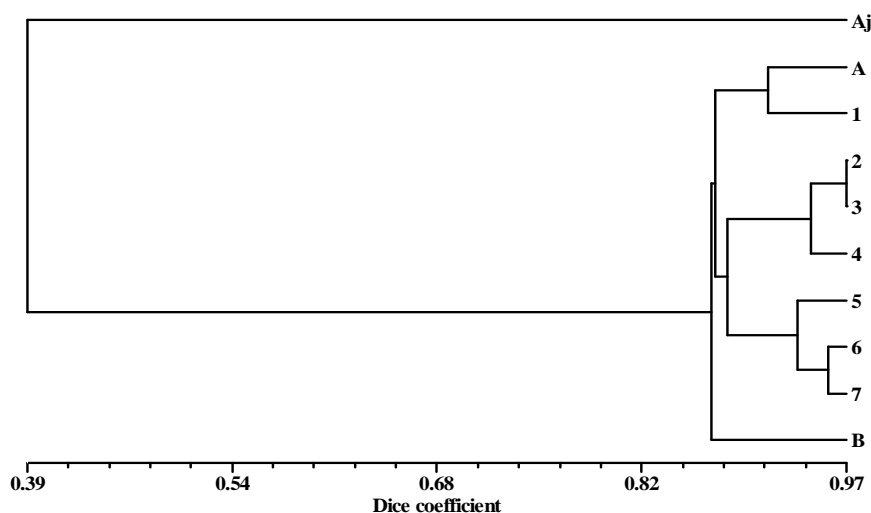
A – forma ojcowska/paternal form – (Lanca × L506/79) × CZR142/79,

B – forma mateczna/maternal form – (Jana × Tempo) × Jana,

1-7 – badane rody mieszańcowe/hybrid strains investigated.

Na podstawie matrycy podobieństw SI przeprowadzono analizę skupień UPGMA i skonstruowano dendrogram (rys. 1). Wyróżniono 3 grupy skupień. Rody należące do dwóch badanych kombinacji: *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] oraz [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x,

tworzyły odrębne grupy skupień. Jedynie ród nr 1 kombinacji krzyżówkowej *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] nie tworzył skupienia z formami należącymi do tej samej kombinacji ani z rodami kombinacji [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x, natomiast tworzył je ze swoją formą ojcowską – (Lanca × L506/79) × CZR142/79. Forma mateczna kombinacji [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x – (Jana × Tempo) × Jana, nie tworzyła skupienia z żadną z grup. Na obrzeżach dendrogramu plasował się dziki gatunek rodzicielski – *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig o najmniejszym podobieństwie genetycznym w stosunku do badanych rodów pszenżyta (rys. 1).



Aj – *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig,

A – forma ojcowska/paternal form – (Lanca × L506/79) × CZR142/79,

B – forma mateczna/maternal form – (Jana × Tempo) × Jana,

1-7 – badane rody mieszańcowe/hybrid strains investigated.

Rys. 1. Dendrogram UPGMA mieszańców pszenżyta z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig otrzymany z zastosowaniem metody UPGMA w oparciu o markery RAPD

Fig. 1. UPGMA dendrogram of *Triticale* hybrids based on the RAPD markers

DYSKUSJA

Technika RAPD ze względu na łatwość i szybkość a zarazem prostotę metodyki, była wielokrotnie wykorzystywana do oceny polimorfizmu u różnych gatunków roślin, również u pszenżyta.

Masojć (2000) przy zastosowaniu 8 starterów RAPD otrzymał 15 polimorficznych produktów, co pozwoliło zidentyfikować wszystkie z 6 badanych od-

mian pszenżyta i ocenić ich podobieństwo genetyczne. Oszacowany poziom polimorfizmu markerów RAPD u odmian pszenżyta był znacznie większy niż w przypadku ocenianych jednocześnie odmian żyta i pszenicy. Twardowska i in. (2002) przy pomocy 10 polimorficznych fragmentów RAPD otrzymanych z użyciem 7 starterów, zidentyfikowali 16 krajowych odmian pszenżyta ozimego. Podobną identyfikację wraz z oceną podobieństwa genetycznego tych samych 16 odmian pszenżyta przeprowadzili Milczarski i in. (2001) wykorzystując 17 starterów, które pozwoliły na wyróżnienie 30 polimorficznych fragmentów RAPD.

Markery RAPD stosowano również do oceny polimorfizmu gatunków z rodzaju *Aegilops*. Goryunova i in. (2004) w badaniach nad 95 formami należącymi do 14 gatunków z rodzaju *Aegilops*, uzyskali aż 796 produktów RAPD powielanych jedynie przez 11 starterów, z czego większość (99%) było polimorficznych. Autorzy określili pokrewieństwo między badanymi gatunkami kozińców.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach zidentyfikowano 47 (33,3%) produktów polimorficznych powielonych z zastosowaniem 16 starterów RAPD, co pozwoliło na określenie podobieństwa genetycznego między badanymi rodami. Uzyskany poziom polimorfizmu (średnio 2,9 fragmentów polimorficznych/starter) był podobny jak w badaniach Matos i in. (2001) u odmian żyta (36% produktów polimorficznych). Nieco niższy poziom polimorfizmu u pszenżyta otrzymali Masojć (2000) oraz Milczarski i in. (2001), którzy średnio uzyskali odpowiednio 1,9 oraz 1,8 takich produktów powielanych przez jeden starter – w badaniach własnych uzyskano od 1 do 6 polimorficznych produktów, podczas gdy Masojć (2000) oraz Milczarski i in. (2001), otrzymali ich od 1 do 4. Mniej takich fragmentów uzyskali Twardowska i in. (2002) oraz Stojalowski i Góral (2002), odpowiednio od 1 do 3 i od 1 do 2. Dla badanych linii i odmian pszenżyta Stojalowski i Góral (2002) stwierdzili dość niski polimorfizm na poziomie 12,2% wskazujący na ich niewielkie zróżnicowanie genetyczne.

Markery RAPD i ISSR stosowano wielokrotnie do identyfikacji u mieszańców chromatyny dzikich gatunków. Tyrka i in. (2001) stwierdzili, że z 8 prążków RAPD specyficznie powielanych w *Ae. ventricosa* 2 produkty były obecne również w mieszańcach z *T. aestivum*, potwierdzając tym samym transfer genów z kozińca do pszenicy. Gruszecka i Miąc (2002) uzyskały aż 21 fragmentów obecnych u formy ojcowskiej *Dasypyrum villosum* i dla mieszańcowych rodów żyta, wskazujących na transfer materiału genetycznego formy dzikiej do tego zboża. W badaniach własnych spośród 38 produktów charakterystycznych dla dzikiego gatunku *Ae. juvenalis*, 4 były obecne również u mieszańców, natomiast nieobecne u formy rodzicielskiej pszenżyta, potwierdzając obecność DNA formy dzikiej dla 6 z 7 badanych rodów.

Przydatność startera do ujawniania polimorfizmu i rozróżniania genotypów ocenia się m.in. za pomocą współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC). Otrzymana

w badaniach własnych średnia wartość współczynnika informacji o polimorfizmie dla metody RAPD wyniosła 0,53 (od 0,36 do 0,69). Podobne średnie wartości PIC otrzymali z udziałem markerów SSR dla pszenżyta Tams i in. (2004) (0,54) oraz dlażyta Shang i in. (2006) (0,60). Landjeva i in. (2006) analizując polimorfizm markerów SSR u odmian pszenicy ozimej *Triticum aestivum* uzyskali wartości współczynnika PIC mieszczące się w szerokim zakresie od 0,10 do 0,81.

Na dendrogramie otrzymanym w badaniach własnych badane rody uległy kalsteryzacji zgodnie z ich pochodzeniem – formy należące do dwóch badanych kombinacji: *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79] oraz [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* 6x, tworzyły odrębne grupy skupień. W badaniach Tanyolac'a (2003) na dendrogramie uzyskanym w oparciu o wyniki RAPD i ISSR populacje dzikiego jęczmienia grupowały się zgodnie z rozmieszczeniem geograficznym.

WNIOSKI

1. Uzyskane z zastosowaniem metody RAPD wyniki potwierdzają pokrewieństwo badanych form. Rody należące do dwóch kombinacji krzyżówkowych tworzyły na dendrogramie odrębne grupy skupień.

2. Potwierdzono przydatność markerów RAPD do identyfikacji obecności obcego materiału genetycznego w DNA rodów mieszańcowych *Triticosecale*. Dla 6 badanych rodów stwierdzono obecność fragmentów pochodzących z *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig

3. Zidentyfikowano fragmenty RAPD specyficzne dla poszczególnych rodów, pszenżytnich form rodzicielskich i *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig.

PIŚMIENNICTWO

- Boros D., Ploch M., Gruszecka D., 2005. Charakterystyka jakościowa mieszańców pszenżyta z kozięcami i pszenperzem. Biul. IHAR, 235, 203-208.
- Goryunova S.V., Kochieva E.Z., Chikida N.N., Pukhalskyi V.A., 2004. Phylogenetic relationships and intraspecific variation of D-Genome *Aegilops* L. as revealed by RAPD Analysis. Russ. J. Genet., 40(5), 515-523.
- Góral T., 2006. Ocena odporności rodów pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego na fuzariozę kłosów powodowaną przez *Fusarium culmorum* oraz odporności pszenżyta ozimego na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) w 2005 roku. Komunikat, Biul. IHAR, 242, 79-88.
- Gruszecka D., 2005. Genetyka pszenżyta. Zarys genetyki zbóż, T.2; Pszenżyto, kukurydza, owies, A. G. Górny (red.), wyd. IGR PAN, Poznań, 5-121.
- Gruszecka D., Miąc A., 2002. Wykorzystanie metody RAPD w określaniu mieszańcowego charakteru rodów *Secale cereale* L. × *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 488, 161-168.

- Landjeva S., Korzun V., Ganeva G., 2006. Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925-2003 using microsatellites. *Genetic Res. and Crop Evol.*, 53, 1605-1614.
- Liu B.S., Sun X.Q., Sun L.Z., Gao Q.R., Xie C.J., Dou B.D., Ni Z.F., Wei Y.L., Zhang Y.C., 2002. RAPD and ISSR markers of fertility restoring gene for *Aegilops kotschy* cytoplasmic male sterility in wheat. *Acta Bot. Sin.*, 44(4), 446-450.
- Makarska E., Gruszecka D., 2000. Wpływ pszenżytnich form rodzicielskich na zawartość mineralnych składników pokarmowych w mieszańcowych ziarniakach \times *Triticosecale* Wittmack z *Aegilops* sp. *Biul. Magnezol.*, 5(3), 171-176.
- Masojć P., 2000. Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 206(82), 179-184.
- Matos M., Pinto-Carnide O., Benito C., 2001. Phylogenetic relationship among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas*, 134, 229-236.
- Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P., 2001. Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. *Biul. IHAR*, 218/219, 261-267.
- Milligan B.G., 1992. Plant DNA isolation. 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.
- Pokacka Z., 1988. Odporność pszenżyta na mączniaka prawdziwego i rdze w świetle literatury. *Hod. Roślin i Nas.*, *Biul. Branż.*, 6, 13-15.
- Pokacka Z., 1991. Choroby liści pszenżyta. *Ochr. Rośl.*, 5-6, 11-13.
- Rohlf. F.J., 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 5.1. Exeter, Setauket, N.Y.
- Shang H.Y., Wei Y.M., Wang X.R., Zheng Y.L., 2006. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the rye genus *Secale* L. (rye) based on *Secale cereale* microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29(4), 685-691.
- 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.
- Stojałowski S., Góral H., 2002. Wykorzystanie markerów RAPD i ISSR do rozróżniania linii cms pszenżyta ozimego z cytoplazmą *T. timopheevi*. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura*, 228(91), 161-166.
- Tams S.H., Bauer E., Oettler G., Melchinger A.E., 2004. Genetic diversity in European winter triticales determined with SSR markers and coancestry coefficient. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1385-1391.
- Tanyolac B., 2003. Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 611-614.
- 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., 1999. Studia nad mieszańcami *Aegilops* spp i *Triticum* spp. Praca doktorska wykonana w Instytucie Genetyki i Hodowli Roślin AR w Lublinie.
- Tyrka M., Stefanowska G., Brzeziński W., 2001. Transfer genów z *Aegilops ventricosa* do *Triticum aestivum*. *Biotechnologia*, 2(53), 57-62.

- 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.
- Xia G., Li Z., Wang S., Xiang F., Liu J., Chen P., Liu D., 1998. Asymmetric somatic hybridization between haploid common wheat and UV-irradiated *Haynaldia villosa*. *Plant Sci.*, 137, 217-223.
- Zamorski C., Schollenberger M., 1995. Występowanie chorób pszenżyta w Polsce. *Biul. IHAR*, 195/196, 197-208.

RAPD METHOD IN EXAMINATIONS OF HYBRIDS OF TRITICALE AND *AEGILOPS JUVENALIS* (THELL.) EIG

Agnieszka Grądzielewska, Daniela Gruszecka, Justyna Leśniowska-Nowak

Institute of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: agnieszka.gradzielewska@up.lublin.pl

Abstract: The aim of the study was estimation of genetic similarity in triticale hybrids using the RAPD method and identification of the wild species DNA in the triticale background. PCR was performed using 16 RAPD primers. A total number of 141 bands was obtained. Examined primers amplified between 5 (U572) and 14 (A16) DNA fragments. The average number of polymorphic product was 2.9 per primer – from 1 (for F05 and W2) to 6 (for U225). Three primers amplified 4 products identifying *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig chromatin in triticale background. The genetic similarity between the strains was estimated. The largest mean genetic similarity (0.846) to all examined genotypes was shown by *Aegilops juvenalis* 6x × [(Lanca × L506/79) × CZR142/79]. Mean similarity of all analysed forms was calculated at 0.791. On the basis of genetic similarity index matrix examined forms were divided into clusters by means of UPGMA method.

Keywords: *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig, genetic similarity, triticale, RAPD markers