

AGNIESZKA GRĄDZIELEWSKA**EDYTA PACZOS-GRZĘDA****DANIELA GRUSZECKA**

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Zastosowanie metod RAPD i ISSR do oceny podobieństwa genetycznego greckich form *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy

Application of RAPD and ISSR methods to genetic similarity estimation of Greek *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy populations

W pracy przeprowadzono ocenę podobieństwa genetycznego 9 greckich form *Dasypyrum villosum* L. (P.) Candargy pochodzących z trzech regionów Grecji (Tesalii oraz Zachodniej i Środkowej Macedonii) na podstawie polimorfizmu markerów RAPD i ISSR. Analizę podobieństwa genetycznego przeprowadzono z wykorzystaniem 18 wyselekcjonowanych starterów RAPD i 17 starterów ISSR. Ogółem otrzymano 122 fragmenty RAPD i 210 ISSR, z czego 50% było polimorficznych. Technika RAPD pozwoliła na identyfikację produktów specyficznych jedynie u pięciu z dziewięciu badanych form, podczas gdy przy udziale metody ISSR otrzymano takie fragmenty dla siedmiu populacji, najwięcej dla W6 7264. Dla obu zastosowanych w badaniach metod obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC), którego wartość zawierała się w przedziale 0,13–0,68 dla RAPD i 0,15–0,52 dla ISSR, średnio odpowiednio 0,32 i 0,33. Na podstawie polimorfizmu markerów RAPD i ISSR oraz obu technik łącznie obliczono wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a, pomiędzy parami badanych populacji. Średnie podobieństwo badanych obiektów wyniosło odpowiednio 0,854, 0,871 i 0,864. Najbardziej odmienną od pozostałych była forma W6 7264. W oparciu o matryce podobieństw Dice'a skonstruowano dendrogramy obrazujące stosunki pokrewieństwa pomiędzy badanymi populacjami.

Słowa kluczowe: *Dasypyrum*, ISSR, markery molekularne, podobieństwo genetyczne, RAPD

Estimation of genetic similarity between nine Greek *Dasypyrum villosum* L. (P.) Candargy populations native to three Greece regions (Thesally, West and Central Macedonia) was performed basing on polymorphism of RAPD and ISSR markers. Eighteen RAPD and seventeen ISSR selected primers were used in the genetic similarity analyses. In total, 122 RAPD and 210 ISSR products were obtained, out of which 50% were polymorphic. The RAPD method identified specific products only in five from nine populations studied, while ISSR in seven, most for W6 7264. Polymorphic information content (PIC) values calculated for the both methods, ranged from 0.13–0.68 for RAPD and 0.15–0.52 for ISSR. Mean values of PIC for RAPD and ISSR were 0.32 and 0.33, respectively. Based on the polymorphism of RAPD and ISSR markers and both methods combined, genetic similarities using Dice algorithm were estimated between pairs of populations analyzed. Mean genetic similarities were 0.854,

0.871 and 0.864, respectively. Most different from the others was W6 7264. Based on Dice matrix similarities, dendrograms showing relatedness between the analyzed populations were constructed.

Key words: *Dasypyrum*, ISSR, genetic similarity, molecular markers, RAPD

WSTĘP

Pogłębiający się spadek zmienności genetycznej wśród odmian uprawnych skłania hodowców do poszerzania puli genowej zbóż poprzez krzyżowania oddalone z dzikimi gatunkami traw, które charakteryzuje bogactwo genów odporności oraz ogromna zmienność.

Gatunkiem o bardzo dużym poziomie polimorfizmu, wykorzystywanym w hodowli pszenicy, jest *Dasypyrum villosum* L. (P.) Candargy (Zhong i Qualset, 1995; Caceres i in., 1998; Yildirim i in., 2000; De Pace i in., 2001). Uzyskanie mieszańców *Dasypyrum villosum* z różnymi gatunkami di-, tetra- i heksaploidalnymi *Triticum*, a następnie linii addycyjnych, substytucyjnych i translokacyjnych, pozwoliło na transfer genów z *D. villosum* do pszenicy (De Pace i in., 2001; Chen i in., 2002; Grądzielewska, 2006). Otrzymano linie i odmiany pszenicy odporne na mączniaka prawdziwego, rdzę żółtą, wirus wrzecionowatej smugowatości zbóż (WSSMV), a także formy o większej zawartości białka zapasowego w ziarniakach i większym potencjale plonowania (De Pace i in., 2001; Zhang i in., 2005; Zhu i in., 2007).

Przenoszenie genów z gatunków dzikich do uprawnych drogą krzyżowania oddalonego nie zawsze kończy się sukcesem z powodu istnienia barier krzyżowalności, które nie dopuszczają do powstania mieszańców lub powodują ich sterylność. Prawdopodobieństwo otrzymania płodnych mieszańców maleje wprost proporcjonalnie do wielkości dystansu genetycznego między krzyżowanymi gatunkami. Ocena zróżnicowania genetycznego umożliwia zatem odpowiedni dobór komponentów do krzyżowań, a tym samym zwiększa prawdopodobieństwo sukcesu hodowlanego. Podobieństwo genetyczne można oceniać za pomocą różnych systemów markerowych (markery morfologiczne, białka, izoenzymy) czy na podstawie informacji o pochodzeniu, jednak najbardziej informatywne i wiarygodne są markery molekularne (Bednarek i Chwedorzewska, 2001; Sztuba-Solińska, 2005).

Celem pracy była ocena podobieństwa genetycznego greckich form *Dasypyrum villosum* L. (P.) Candargy na podstawie polimorfizmu markerów RAPD i ISSR oraz identyfikacja markerów specyficznych dla poszczególnych populacji.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 9 greckich form *Dasypyrum villosum* L. (P.) Candargy (tab. 1), które otrzymano z United States Department of Agriculture, Western Regional Plant Introduction Station, Washington University, USA. Populacje te zostały skolekcjonowane w banku genów w roku 1984.

Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z metodą Milligana (1992) z 25 roślin każdej z form, w dwóch niezależnych powtórzeniach.

Tabela 1

Charakterystyka i miejsce skolekjonowania badanych populacji *D. villosum*
Characteristics and collecting site of *D. villosum* populations studied

Oznaczenie formy w banku genów Accession identifier in genbank	Region Grecji Greece region	Departament Department	Wysokość występowania [m n.p.m.] Elevation [m]
PI 598391	Tesalia Thesally	Trikala	230
PI 598392		Trikala	360
W6 7264		Larissa	90
PI 598393	Zachodnia Macedonia	Grevena	560
PI 598394	West Macedonia	Grevena	770
PI 598397		Kozani	740
PI 598399	Środkowa Macedonia Central Macedonia	Imathia	470
PI 598401		*	150
W6 7280		Kilkis	230

* Brak danych, Data lacking

Amplifikację wykonano według metody Williamsa i wsp. (1990) (RAPD) i Ziętkiewicz i wsp. (1994) (ISSR) w obecności odpowiednio 18 i 17 starterów (tab. 2), z jednoczesną kontrolą negatywną. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% (RAPD) i 2,5% (ISSR) żelu agarozowym zawierającym 0,01% EtBr, w buforze TBE przez 2,5 h przy napięciu 120V.

Tabela 2

Sekwencje starterów wykorzystanych w pracy
Sequences of primers used in the study

Starter RAPD Primer RAPD	Sekwencja (5' – 3') Sequence (5' – 3')	Starter ISSR Primer ISSR	Sekwencja (5' – 3') Sequence (5' – 3')
A-18	AGG TGA CCG T	Sr-01	(AG) ₈ G
A-20	GTT GCG ATC C	Sr-06	(GT) ₈ C
D-10	GGT CTA CAC C	Sr-11	(AC) ₈ G
D-16	AGG GCG TAA G	Sr-16	(GA) ₈ C
F-05	CCG AAT TCC C	Sr-17	(GA) ₈ YC
G-04	GGA GTA CTG G	Sr-22	(CA) ₈ G
G-10	CCG ATA TCC C	Sr-23	(CA) ₈ GC
J-10	AAG CCC GAG G	Sr-27	(TC) ₈ G
J-13	CAA CAC TAC C	Sr-28	(TG) ₈ G
J-19	GGA CAC CAC T	Sr-31	(AG) ₈ YC
T-01	CGC AGT ACT C	Sr-32	(AG) ₈ YT
T-02B	CTA CAC AGG C	Sr-33	(AG) ₈ T
T-03	GTC CTT AGC G	Sr-36	(AC) ₈ CG
U-18	GGG CCG TTT A	Sr-37	(AC) ₈ C
U-225	CGA CTC ACA G	Sr-38	(CT) ₈ G
U-295	CGC GTT CCT G	Sr-39	(GA) ₈ GG
U-534	CAC CCC CTG C	Sr-40	(AC) ₈ T
U-535	CCA CCA ACA G		

Wyniki otrzymane metodami RAPD i ISSR pozwoliły na obliczenie dla każdej z nich współczynników informacji o polimorfizmie — PIC (polymorphism information content) zgodnie z założeniami Nei (1973). W oparciu o uzyskane polimorfizmy markerów RAPD, ISSR oraz obu technik łącznie, obliczono podobieństwa genetyczne (SI – similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych form przy użyciu formuły Dice'a (Nei i Li, 1979),

a następnie wykonano analizę skupień metodą UPGMA i skonstruowano dendrogramy. Obliczono współczynniki korelacji między otrzymanymi macierzami SI. Obliczenia wykonano w programie NTSYS-pc 2.10q (Rohlf, 2001). Masę prążków określano przez porównanie z markerem wielkości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa), stosując program Dnafrag 3.03.

WYNIKI

W efekcie przeprowadzonych analiz otrzymano ogółem 122 fragmenty RAPD i 210 fragmentów ISSR, z których w obu przypadkach, połowę stanowiły produkty polimorficzne (tab. 3). Poszczególne startery powielały od 3 do 10 (RAPD) i od 6 do 19 (ISSR) fragmentów DNA, z których odpowiednio od 1 do 9 i od 2 do 11 stanowiły produkty polimorficzne. Średnio pojedynczy starter RAPD generował 3,4 fragmentów Polimorficznych, a starter ISSR — 6,2. Dla obu zastosowanych w badaniach metod obliczono współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC), którego wartość zawierała się w przedziale 0,13–0,68 dla RAPD i 0,15–0,52 dla ISSR. Średnia wartość PIC w obu przypadkach była niemal identyczna — 0,32 i 0,33. Dla wszystkich badanych populacji uzyskano fragmenty specyficzne — 5 RAPD i 14 ISSR (tab. 4). Metoda RAPD ujawniła łącznie 87 profili prążkowych, a ISSR 118. Obie grupy starterów (RAPD oraz ISSR) generowały od 2 do 9 profili, przy czym w metodzie RAPD otrzymano ich średnio 4,8 na starter, a w metodzie ISSR — 6,9. Rozróżnienie wszystkich badanych form było możliwe po przeprowadzeniu reakcji z jednym ze starterów: T03, Sr-22, Sr-28 lub Sr-36.

Tabela 3

Ocena polimorfizmu identyfikowanego przy udziale starterów RAPD i ISSR Estimation of polymorphism identified with the RAPD and ISSR primers

Wszystkie fragmenty Total fragments	RAPD	ISSR
Całkowita liczba produktów — Total number of fragments	122	210
Liczba produktów/starter — Number of fragments per primer	3–10	6–19
Średnia liczba produktów/starter — Mean number of fragments per primer	6,8	12,3
Zakres wielkości generowanych fragmentów [pz] — Size range of amplified fragments [bp]	370–2560	270–2520
Fragmenty polimorficzne Polymorphic fragments		
Całkowita liczba produktów polimorficznych — Total number of polymorphic fragments	61	105
Liczba produktów polimorficznych/starter — Number of polymorphic fragments per primer	1–9	2–11
Średnia liczba produktów polimorficznych/starter — Mean number of polymorphic fragments per primer	3,4	6,2
Udział produktów polimorficznych [%] — Contribution of polymorphic fragments [%]	50	50
Zakres wielkości fragmentów polimorficznych [pz] — Size range of polymorphic fragments [bp]	385–2560	300–2540
Fragmenty specyficzne Specific fragments		
Liczba produktów specyficznych — Number of specific fragments	5	14
Profile Profiles		
Liczba profili — Number of profiles	87	118
Liczba profili/starter — Number of profiles per primer	2–9	3–9
Średnia liczba profili/starter — Mean number of profiles per primer	4,8	6,9

Tabela 4

Produkty specyficzne dla poszczególnych populacji *Dasypyrum villosum*
The specific fragments for the *Dasypyrum villosum* populations studied

Forma Form	Fragment Fragment
PI 598391	U-18 ¹⁵¹⁸
PI 598392	Sr-11 ²²²¹ , Sr-32 ¹⁵⁴⁷
W6 7264	Sr-11 ¹⁹¹⁴ , Sr-16 ^{1145, 1045} , Sr-27 ⁸⁴⁰ , Sr-31 ¹⁴⁴⁴
PI 598393	Sr-38 ⁵⁷⁶
PI 598394	T-03 ⁸¹³ , Sr-38 ¹⁰³¹
PI 598397	J-13 ¹⁰⁰⁰
PI 598399	A-18 ¹⁶⁶⁴ , Sr-33 ¹¹⁵⁴ , Sr-40 ⁵²⁷
PI 598401	U-225 ⁴²³ , Sr-40 ⁷⁵⁴
W6 7280	Sr-06 ¹²⁷⁰ , Sr-37 ¹⁰⁷³

Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a uzyskane w oparciu o polimorfizm markerów RAPD wynosiły 0,803–0,911, z udziałem metody ISSR — 0,816–0,932, a otrzymane dzięki połączeniu obu technik zawierały się w przedziale 0,811–0,920 (tab. 5).

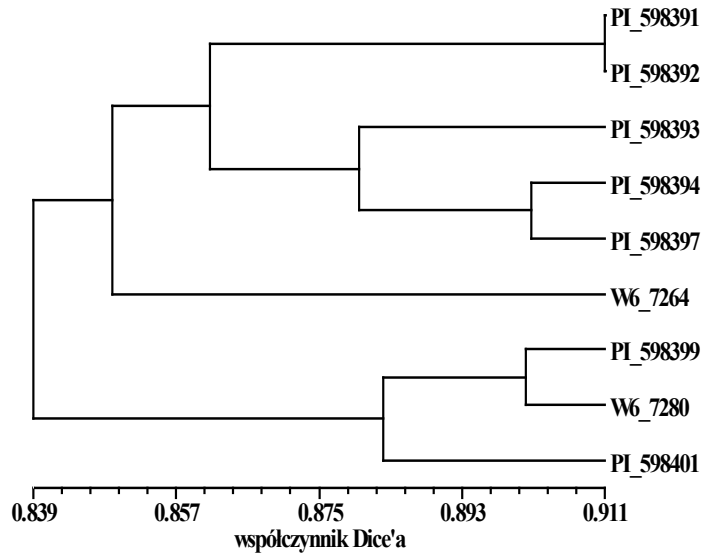
Tabela 5

Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a uzyskane w oparciu o polimorfizm markerów RAPD i ISSR
Dice genetic similarity values based on the RAPD and ISSR markers polymorphism

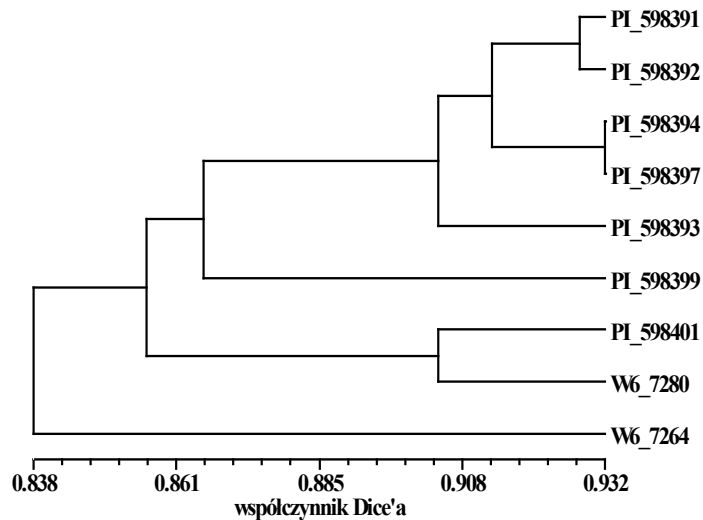
	Zakres wartości współczynników podobieństwa Range of genetic similarity coefficients values	Średnia wartość współczynników podobieństwa Mean values of genetic similarity coefficients
RAPD	0,803–0,911	0,854
ISSR	0,816–0,932	0,871
RAPD+ISSR	0,811–0,920	0,864

Współczynnik korelacji matryc SI był równy 0,6 i statystycznie istotny. Średnie podobieństwo wszystkich badanych form oszacowane metodą RAPD wyniosło 0,854, metodą ISSR — 0,871, a łącznie — 0,864. Najmniejsze podobieństwo do pozostałych, wykazała forma W6 7264 (0,836 — RAPD, 0,838 — ISSR, 0,837 — RAPD+ISSR). Formami najbardziej podobnymi do pozostałych były PI 598394 (RAPD, ISSR, RAPD+ISSR) oraz PI 598391 i PI 598397 (ISSR). Najbardziej podobne do siebie były z kolei PI 598391 i PI 598392 (RAPD — 0,910 i RAPD+ISSR — 0,920), oraz PI 598394 i PI 598397 (ISSR — 0,932). Za najbardziej odmienne można uznać populacje PI 598399 i W6 7264 (0,804 — RAPD, 0,816 — ISSR, 0,811 — analiza łączna).

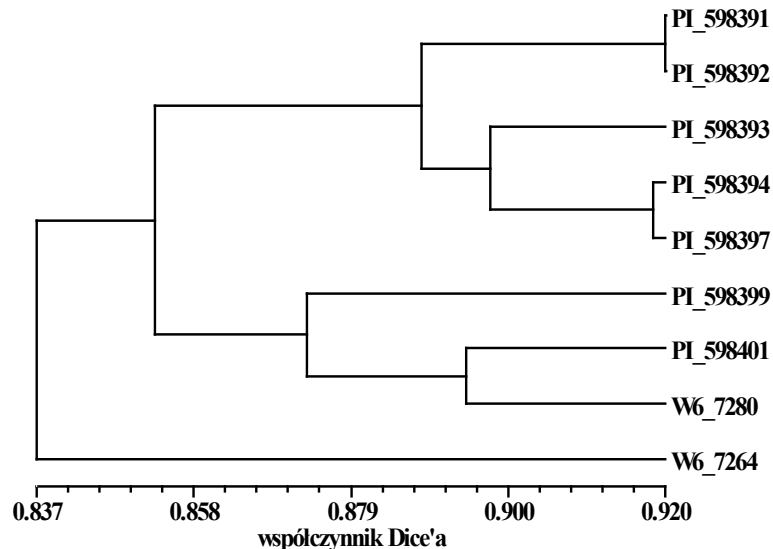
Niezależnie od zastosowanej metody (RAPD, ISSR, RAPD+ISSR) dendrogramy, skonstruowane w oparciu o matryce podobieństw metodą UPGMA obrazują 2 główne grupy skupień (rys. 1, 2, 3). Pierwsza z nich obejmuje dwie podgrupy, skupiające formy pochodzące z Tesalii i Zachodniej Macedonii. Druga grupa skupia populacje ze Środkowej Macedonii.



Rys. 1. Dendrogram pokrewieństwa populacji *D. villosum* uzyskany metodą UPGMA na podstawie polimorfizmu markerów RAPD
Fig. 1. UPGMA dendrogram illustrating genetic similarity between the *D. villosum* populations built on the basis of RAPD markers polymorphism



Rys. 2. Dendrogram pokrewieństwa populacji *D. villosum* uzyskany metodą UPGMA na podstawie polimorfizmu markerów ISSR
Fig. 2. UPGMA dendrogram illustrating genetic similarity between the *D. villosum* populations built on the basis of ISSR markers polymorphism



Rys. 3. Dendrogram pokrewieństwa populacji *D. villosum* uzyskany metodą UPGMA na podstawie polimorfizmu markerów RAPD i ISSR
 Fig. 3. UPGMA dendrogram illustrating genetic similarity between the *D. villosum* populations built on the basis of RAPD and ISSR markers polymorphism

Na dendrogramie otrzymanym na podstawie metody ISSR jedna z form pochodząca ze Środkowej Macedonii (PI 598399) nie tworzy skupienia z populacjami pochodzącymi z tego regionu, ale luźno łączy się z formami z Tesalii i Zachodniej Macedonii. Forma W6 7264 pochodząca z Tesalii na wszystkich dendrogramach jest widoczna jako wyraźnie odmienna od pozostałych. Na dendrogramie otrzymanym w oparciu o metodę RAPD łączy się ona luźno z formami z Tesalii i Zachodniej Macedonii, a w przypadku dendrogramów uzyskanych techniką ISSR oraz ISSR i RAPD łącznie, nie klasteryzuje się z innymi populacjami z regionu jej pochodzenia, a w odniesieniu do pozostałych form zajmuje odległe miejsce.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy ocenę podobieństwa genetycznego 9 populacji *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy przeprowadzono za pomocą metod RAPD oraz ISSR. Techniki te były wielokrotnie stosowane w podobnych analizach u wielu gatunków roślin, także dzikich (Fahima i in., 1999; Qian i in., 2001; Tanyolac, 2003). Jak dotąd do oceny podobieństwa genetycznego w obrębie *Dasypyrum villosum* nie użyto żadnej z metod wykorzystujących markery molekularne DNA.

Metodę RAPD zastosowano kilkakrotnie w badaniach nad gatunkami *Dasypyrum* i mieszańcami *D. villosum* z pszenicą (Qi i in., 1996; Xia i in., 1998) i żytem (Gruszecka i

Miąc, 2002). Yang i wsp. (2006) za pomocą RAPD ocenili pokrewieństwo *Dasyphyrum breviaristatum* z 9 gatunkami z płemienia *Triticeae*, w tym z *D. villosum* i wykazali znaczny dystans genetyczny pomiędzy dwoma gatunkami *Dasyphyrum*. Metoda ISSR, jakkolwiek nie stosowana dotąd w badaniach nad *Dasyphyrum*, była wielokrotnie wykorzystywana do oceny gatunków z płemienia *Triticeae*, takich jak np. żyto (Bolibok i in., 2005) czy pszenica (Nagaoka i Ogihara, 1997).

Wydajność metod RAPD i ISSR w detekcji polimorfizmu była wielokrotnie testowana u wielu gatunków roślin. Qian i wsp. (2001), wykorzystując te dwa systemy markerowe w badaniach polimorfizmu dzikiego ryżu *Oryza granulata*, otrzymali 30,7% polimorficznych produktów RAPD i 46% ISSR, co wskazywało na znaczną przewagę systemu ISSR. Podobne wyniki otrzymali u pszenicy Nagaoka i Ogihara (1997) (20% RAPD; 40% ISSR), u żyta Matos i wsp. (2001) (36% RAPD; 82% ISSR), a także Fernández i wsp. (2002) u jęczmienia (63% RAPD i 83% — ISSR). W badaniach własnych obie metody identyfikowały polimorfizm u *D. villosum* z podobną wydajnością. W obu przypadkach otrzymano 50% produktów polimorficznych, jednak metoda ISSR okazała się bardziej efektywna — ta sama ilość starterów generowała prawie dwukrotnie więcej polimorficznych fragmentów ISSR w porównaniu z RAPD. Podobne wyniki uzyskali Fernández i wsp. (2002). Qian i wsp. (2001) oraz Tanyolac (2003) podkreślają, że mimo zastosowania większej liczby starterów RAPD, metoda ta pozwoliła na uzyskanie znacznie mniejszej ilości produktów polimorficznych niż ISSR.

Przydatność startera do ujawniania polimorfizmu i rozróżniania badanych form ocenia się m.in. za pomocą współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC). Sarla i wsp. (2005) uzyskali wartości współczynnika PIC dla 86 ocenianych z udziałem 14 starterów ISSR form ryżu, mieszczące się w zakresie od 0,63 do 0,92, średnio — 0,82. Autorzy oceniali jednak wysoce zróżnicowaną grupę, w skład której wchodziły zarówno odmiany uprawne, jak i populacje miejscowe oraz formy dzikie. Dla poszczególnych grup wartości PIC były niższe i wynosiły odpowiednio 0,3–0,78 dla odmian, 0,41–0,89 dla populacji miejscowych i 0,09–0,68 dla form dzikich. Oszacowana w niniejszej pracy wartość PIC dla grupy greckich populacji *D. villosum*, o dużym podobieństwie genetycznym, zawierała się w przedziale 0,13–0,68 dla RAPD i 0,15–0,52 dla ISSR, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez Sarla i wsp. (2005) dla form dzikich.

Wartości indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a uzyskane w oparciu o polimorfizm obu typów markerów były podobne i jedynie nieznacznie wyższe dla metody ISSR, a współczynnik korelacji matryc był statystycznie istotny co wskazuje, że obie metody w podobny sposób odzwierciedlają podobieństwo wewnątrzgatunkowe *D. villosum*. Również Nagaoka i Ogihara (1997) oraz Castagana i wsp. (1997) wykazali, że podobieństwo genetyczne u pszenicy określone za pomocą różnych technik: RAPD, ISSR czy RFLP, przyjmowało bardzo zbliżone wartości. Patzak (2001) wykazał zbieżność wyników otrzymanych metodami RAPD, STS, ISSR i AFLP w ocenie zróżnicowania genetycznego chmielu, przy czym najbardziej zgodne były wyniki otrzymane na podstawie polimorfizmu markerów ISSR i RAPD. Z kolei Bolibok i wsp. (2005) dowiedli braku zgodności metod ISSR, SSR oraz SAMPL w ocenie podobieństwa genetycznego żyta i zasugerowali konieczność jednoczesnego stosowania różnych systemów markerowych w

badaniu zmienności genetycznej, w celu analizy wszystkich możliwych źródeł polimorfizmu.

Podobieństwo genetyczne pomiędzy populacjami *D. villosum* ocenianymi w niniejszej pracy było bardzo wysokie — 0,803–0,932. Wielu autorów podaje, że zróżnicowanie genetyczne *D. villosum* jest znacznie większe w obrębie populacji niż pomiędzy populacjami (Zhong i Qualset, 1993; Zhong i Qualset, 1995; Caceres i in., 1998), a populacje rozmieszczone geograficznie bliżej siebie wykazują większe podobieństwo genetyczne niż populacje odległe (Zhong i Qualset, 1995).

Topologia dendrogramów otrzymanych na podstawie wyników badań własnych była bardzo zbliżona. Na każdym z nich uformowały się 2 główne grupy skupień, w obrębie których badane formy klasteryzowały się zgodnie z pochodzeniem geograficznym. W jednej grupie wspólny klaster tworzyły formy z Tesalii i Zachodniej Macedonii, w drugiej skupiły się formy ze Środkowej Macedonii. Podobnie (zgodnie z rozmieszczeniem geograficznym) grupowały się populacje dzikiego jęczmienia w badaniach Tanyolac'a (2003) przeprowadzonych metodami RAPD i ISSR. Niewielkie różnice w topologii dendrogramów otrzymanych w badaniach własnych na podstawie analiz RAPD i ISSR dotyczyły jedynie dwóch form: W6 7264 z Tesalii i PI 598399 ze Środkowej Macedonii. Fernández i wsp. (2002) tłumaczą różnice w topologii dendrogramów RAPD i ISSR odmienną liczbą analizowanych produktów PCR.

WNIOSKI

1. Analiza polimorfizmu międzypopulacyjnego w obrębie *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy przeprowadzona metodami RAPD i ISSR, wykazała niewielkie zróżnicowanie genetyczne ocenianych populacji.
2. Dendrogramy sporządzone na podstawie polimorfizmu markerów RAPD i ISSR grupowały badane formy zgodnie z pochodzeniem geograficznym.
3. Zgodność wyników otrzymanych przy pomocy obu zastosowanych metod wskazuje, że każda z nich może być stosowana w ocenie podobieństwa genetycznego *Dasypyrum villosum*, jednak bardziej efektywna jest metoda ISSR.

LITERATURA

- Bednarek P. T., Chwedorzewska K. 2001. Markery molekularne i ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia* 1 (52): 9 — 34.
- Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., Hromada A., Pietrzykowski R. 2005. Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. *Euphytica* 146: 109 — 116.
- Caceres M.E., De Pace C., Scarascia Mugnozza G.T., Kotsonis P., Ceccarelli M., Cionini P.G. 1998. Genome size variations within *Dasypyrum villosum*: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotypic characteristics and behaviour in reproduction. *Theor. Appl. Genet.* 96: 559 — 567.
- Castagana R., Gnocchi S., Perenzin M., Heun M. 1997. Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 424 — 430.
- Chen Q., Conner R. L., Li H., Laroche A., Graf R.J., Kuzyk A. D. 2002. Expression of resistance to stripe rust, powdery mildew and the wheat curl mite in *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* lines. *Can. J. Plant. Sci.* 82 (2): 451 — 456.

- De Pace C., Snidaro D., Ciaffi M., Vittori D., Ciofo A., Cenci A., Tanzarella O.A., Qualset C.O., Scarascia Mugnozza G.T. 2001. Introgression of *Dasypyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica* 117: 67 — 75.
- Fahima T., Sun G. L., Beharav A., Krugman T., Beiles A., Nevo E. 1999. RAPD polymorphism of wheat emmer populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel. *Theor. Appl. Genet* 98: 434 — 447.
- Fernández M. E., Figueiras A. M., Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104: 845 — 851.
- Grądzielewska A. 2006. The genus *Dasypyrum* — part 2. *Dasypyrum villosum* — a wild species used in wheat improvement. *Euphytica* 152: 441 — 454.
- Gruszecka D., Miąg A. 2002. Wykorzystanie metod RAPD w określaniu mieszańcowego charakteru rodów *Secale cereale* L. × *Dasypyrum villosum* (L.) P. Candargy. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 488: 161 — 168.
- Matos M., Pinto-Carnide O., Benito C. 2001. Phylogenetic relationship among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134: 229 — 236.
- Milligan B. G. 1992. Plant DNA isolation. In: *Molecular analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK, 59 — 88.
- Nagaoka T., Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597 — 602.
- 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.
- Patzak J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9 — 18.
- Qi L., Cao M., Chen P., Li W., Liu D. 1996. Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene Pm21 of wheat. *Genome* 39: 191 — 197.
- Qian W., Ge S., Hong D.Y. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 102: 440 — 449.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sarla N., Neeraja C. N., Siddiq E. A. 2005. Use of anchored (AG)_n and (GA)_n primers to assess genetic diversity of Indian landraces and varieties of rice. *Curr. Sci.* 89(8): 1371 — 1381.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54 (2–3): 227 — 239.
- 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.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K.J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6531 — 6535.
- 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.
- Yang Z. J., Liu C., Feng J., Li G. R., Zhou J.P., Deng K. J., Ren Z. L. 2006. Studies on genome relationship and species-specific PCR marker for *Dasypyrum breviaristatum* in *Triticeae*. *Hereditas* 143: 47 — 54.
- Yildirim A., Jones S. S., Murray T. D., Line R. F. 2000. Evaluation of *Dasypyrum villosum* populations for resistance to cereal eyespot and stripe rust pathogens. *Plant Diseases* 84: 40 — 44.
- Zhang Q., Li Q., Wang X., Wang H., Lang S., Wang Y., Wang S., Chen P., Liu D. 2005. Development and characterization of a *Triticum aestivum* – *Haynaldia villosa* translocation line T4VS-4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus. *Euphytica* 145: 317 — 320.
- Zhong G. Y., Qualset C. O. 1993. Allelic diversity of high-molecular-weight glutenin protein subunits in natural populations of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy. *Theor. Appl. Genet.* 86: 851 — 858.

- Zhong G. Y., Qualset C.O. 1995. Quantitative genetic diversity and conservation strategies for an allogamous annual species, *Dasyphyrum villosum*. (L.) Candargy (*Poaceae*). Theor. Appl. Genet. 91: 1064 — 1073.
- Zhu Z., Tihua F., Yuan T., Ye Ch., Zhenglong R. 2007. Identification and chromosomal locations of novel genes for resistance to powdery mildew and stripe rust in wheat line 101-3. Euphytica 156: 89 — 94.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) – anchored chain reaction amplification. Genomics 20: 176 — 183.