

SYLWIA OKOŃ¹
EDYTA PACZOS-GRZEŃDA¹
PIOTR KRASKA²
EWA KWIECIŃSKA-POPPE²
EDWARD PAŁYS²

¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

² Katedra Ekologii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Analiza podobieństwa genetycznego odmian orkiszu (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) za pomocą markerów RAPD

Assessment of genetic similarity of spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) cultivars based on RAPD markers

W pracy przedstawiono analizę podobieństwa genetycznego 8 odmian pszenicy orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) za pomocą markerów RAPD. Dla 17 wyselekcjonowanych starterów uzyskano 175 produktów, z których 80 było polimorficznych, zaś 7 specyficznych dla pojedynczych obiektów. Średnie podobieństwo genetyczne określone pomiędzy parami wszystkich badanych form wyniosło 0,868. Na podstawie maczyc indeksów podobieństwa genetycznego wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że analizowane odmiany orkiszu charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym.

Słowa kluczowe: podobieństwo genetyczne, RAPD, *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.

The paper contains an analysis of genetic similarity of 8 *Triticum aestivum* ssp. *spelta* cultivars done using RAPD markers. Seventeen selected primers produced 175 fragments, out of which 80 were polymorphic and 7 were genotype-specific. RAPD-based genetic similarity was estimated to be between 0.851 and 0.913. The mean genetic similarity was calculated at 0.868. Genetic similarity matrix was applied for cluster analysis through UPGMA method. The data obtained indicate that the analyzed spelt cultivars are characterized by high similarity.

Key words: genetic similarity, RAPD, *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.

WSTĘP

Triticum aestivum ssp. *spelta* L. jest podgatunkiem pszenicy zwyczajnej, należy do grupy pszenic heksaploidalnych ($2n = 42$) oplewionych o łamliwej osadce kłosowej. Orkisz jest gatunkiem odpornym na choroby i inne niekorzystne czynniki siedliska. Ziarno orkiszu w porównaniu z pszenicą ozimą zawiera na ogół więcej białka, jest bogate w cynk, miedź

i selen (Baumagärtel-Blaschke, 1991). W składzie kwasów tłuszczowych przeważa kwas linolowy. Ponadto zawiera witaminy z grupy A, E i D (Grela i in., 1993).

W ostatnich latach markery molekularne znalazły szerokie zastosowanie w hodowli roślin. Są one wykorzystywane w ocenie podobieństwa genetycznego, ale także w selekcji i identyfikacji pożądanych form, ocenie czystości materiału siewnego oraz w potwierdzeniu skuteczności krzyżowań (Sztuba-Solińska, 2005; Virk i in., 1995). Podobieństwo genetyczne oceniane jest przede wszystkim na podstawie markerów molekularnych, które umożliwiają szybką identyfikację polimorfizmu DNA (Achleitner i in., 2008; Cheng i Huang, 2009; Ikegami, 2009). Jedną z metod bardzo często wykorzystywaną do analiz genomów roślin jest RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams i in., 1990). Technika ta jest prostą i efektywną metodą, pozwalającą na szybkie oszacowanie podobieństwa genetycznego wielu gatunków roślin (Marillia i Scoles, 1996; Drossou i in., 2004; Kochieva i in., 2004; Vinod i in., 2007).

Celem prezentowanej pracy była analiza podobieństwa genetycznego 8 odmian orkiszu (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) w oparciu o markery RAPD.

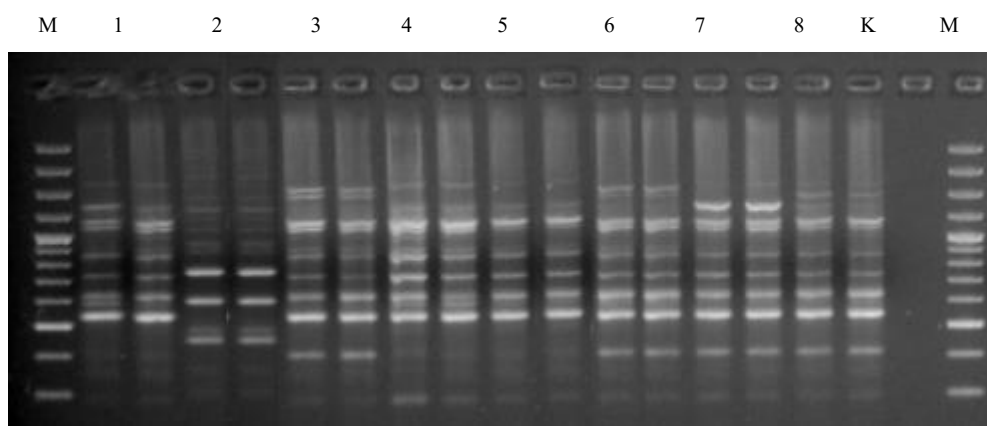
MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 8 odmian pszenicy orkisz (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*): Frankenckorn, Badengold, Schwanenspelz, Oberkulmer, Ostro, Ceralio, Schwaberncorn Dinkel, Spelt I.N.Z. Odmiany te różnią się między sobą morfologicznie i zostały wybrane do analiz molekularnych na podstawie wstępnych obserwacji prowadzonych w Katedrze Ekologii Rolniczej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. DNA z badanych odmian wyizolowano z kilkudniowych siewek zgodnie z metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Reakcję PCR prowadzono zmodyfikowaną metodą Williamsa i wsp. (1990). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 15 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8,8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (Fermentas, Litwa), 160 µM każdego dNTP, 5,3 pM startera, 1mM MgCl₂, 60 ng genomowego DNA, 0,4 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Reakcje amplifikacji przeprowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra dla dwóch prób DNA z każdej odmiany, jednocześnie prowadząc reakcję kontrolną bez matrycy DNA. Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 3 min. w 94°C, 44 cykle: 94°C — 45 s, 37°C — 45 s, 72°C — 45 s, z końcową inkubacją 7 min. w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny. Żele podświetlano na transiluminatorze i fotografowano wykorzystując systemem dokumentacji żeli Poly Doc.

W analizie polimorfizmu obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednio wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI — similarity index) pomiędzy parami wszystkich badanych form oszacowano zgodnie z formułą Dice'a (Nei i Li, 1979). W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) stosując program NTSYS-pc 2.10q (Rohlf, 2001).

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród przeanalizowanych 40 starterów RAPD do analiz wybrano 17 generujących stabilne i polimorficzne wzory prążków (rys. 1). Przeprowadzono reakcje z tymi starterami dla badanych odmian orkisz. Całkowita liczba uzyskanych fragmentów wynosiła 175. Liczba fragmentów generowanych przy użyciu jednego startera wahała się od 7 dla starterów A16, G10, i J05 do 16 dla startera F14. Średnio na jeden starter przypadało 10,3 amplifikowanych odcinków DNA, zaś na jedną odmianę 21,9 amplikonów. Liczba prążków polimorficznych uzyskanych w wyniku reakcji PCR wyniosła 80. Sun i wsp. (1998) za pomocą markerów RAPD analizowali 46 genotypów pszenicy, wśród których założyły się zarówno odmiany pszenicy zwyczajnej, jak i genotypy pszenicy orkisz. Autorzy wykorzystali 26 starterów, które inicjowały amplifikację 279 prążków, z których 182 było polimorficznych. Na pojedynczy starter przypadało od 2 do 20 takich produktów. Średnio na starter autorzy uzyskali 7 polimorficznych produktów. W badaniach własnych pojedynczy starter inicjował amplifikację od 2 (A16 i W02) do 12 (F14) produktów polimorficznych. Średnio na pojedynczy starter przypadało 4,7 polimorficznych fragmentów, zaś na pojedynczy genotyp 10. Frekwencja prążków polimorficznych wahała się od 22,2% dla startera W02 do 73,3% dla startera F14. Rozmiary prążków polimorficznych wahały się od 190 do 2000 par zasad. Du i wsp. (2002) do analizy zmienności genetycznej orkisz wykorzystali markery ISSR. Autorzy analizowali 47 genotypów pszenicy, w tym 10 form orkisz. Wyselekcjonowali oni 33 startery ISSR, które generowały 238 prążków, wśród których 207 było polimorficznych.



Oznaczenia: M — marker wielkości, K — kontrola negatywna, 1 — Frankenckorn, 2 — Badengold, 3 — Schwanenspelz, 4 — Oberkulmer, 5 — Ostro, 6 — Ceralio, 7 — Schwaberncorn Dinkel, 8 — Spelt I.N.Z., każdy genotyp w dwóch powtórzeniach. 207 było polimorficznych

Rys. 1. Rozdział produktów RAPD ze starterem A05

Descriptions: M— size marker, K — negative control, 1 — Frankenckorn, 2 — Badengold, 3 — Schwanenspelz, 4 — Oberkulmer, 5 — Ostro, 6 — Ceralio, 7 — Schwaberncorn Dinkel, 8 — Spelt I.N.Z., each genotype in two replications

Fig. 1. Resolution of RAPD products obtained with A05 primers

Liczba wszystkich profili prążków, czyli liczba różnych kombinacji fragmentów DNA uzyskanych dla poszczególnych odmian przy udziale badanych starterów wyniosła 93. Startery generowały od 3 do 7 profili, średnio 5,5 na starter i 11,6 na genotyp. Żaden z analizowanych starterów nie generował profili specyficznych dla wszystkich badanych odmian (tab. 1).

Tabela 1

Charakterystyka starterów RAPD
Characteristics of RAPD primers

Starter Primer	Sekwencja startera Primer sequence	Liczba prążków Number of bands		Frekwencja prążków polimorficznych Polymorphic bands frequency (%)	Liczba profili prążków Number of band profiles	Zakres wielkości prążków (pz) Range of band size (bp)
		całkowita total	polimorficznych polymorphic			
A05	AGGGGTCTTG	8	5	62,5	7	580-1600
A07	GAAAAGGGTG	12	5	41,6	7	500-1300
A08	GTGACGTAGG	10	4	40	6	250-1600
A12	TCGGCGATAG	9	3	33,3	5	530-1800
A16	AGCCAGCGAA	7	2	28,6	3	320-1200
A17	GACCGCTTGT	10	4	40	6	600-1900
A19	CAAACGTCGG	10	5	50	7	190-1100
F14	TGCTGCAGGT	16	12	73,3	7	250-1900
G4	GGAGTACTGG	13	9	69,2	7	300-2000
G10	CCGATATCCC	7	4	57,1	5	600-1800
H20	GGGAGACATC	12	4	33,3	5	200-1600
J05	CTCCATGGGG	7	4	57,1	3	850-1700
J10	AAGCCCGAGG	14	5	35,7	7	290-1600
T2B	CTACACAGGC	9	3	33,3	5	200-2000
U250	CGACAGTCCC	10	3	30	3	380-1500
U295	CGCGTCCTG	12	6	50	7	300-1500
W2	ACCCCGCAA	9	2	22,2	3	400-1300
Suma Sum		175	80	45,7	93	
Średnio / starter Mean / primer		10,29	4,70		5,47	
Średnio/genotyp Mean / genotype		21,87	10		11,62	

Tabela 2

Produkty specyficzne dla poszczególnych odmian
Genotype - specific RAPD products

Odmiana Cultivar	Produkty specyficzne Specific products
Frankenckorn	A16(4), U295(4), G4(8), G4(13)
Schwanenspelz	A08(8), F14(5),
Schwaberncorn Dinkel	G4(12)

Spośród 8 analizowanych w prezentowanej pracy odmian orkiszu trzy odmiany mogą być zidentyfikowane przez obecność unikalnych markerów RAPD. Łącznie uzyskano 7 specyficznych produktów generowanych przez 5 starterów RAPD. Liczba specyficznych

produktów wahała się od 1 do 3 dla pojedynczego startera. Średnio na starter przypadają 0,4 produktów specyficznych, zaś na genotyp 0,9. Odmiana Frankenkorn może być zidentyfikowana przez obecność 4 specyficznych markerów RAPD. Odmianę Schwanenspelz można zidentyfikować za pomocą dwóch specyficznych markerów, odmianę Schwaberncorn Dinkel za pomocą jednego takiego produktu (tab. 2).

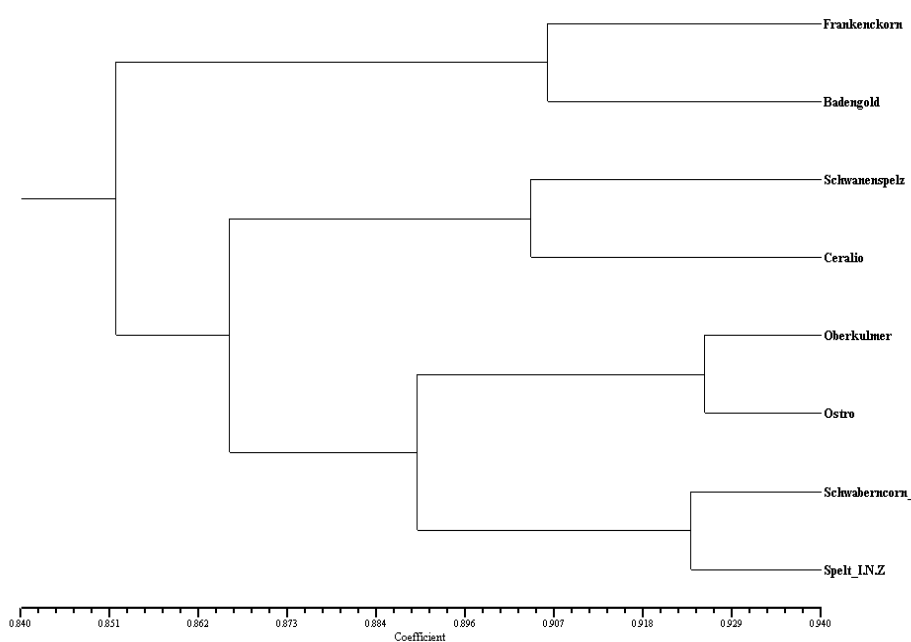
Wyniki badań polimorfizmu markerów RAPD odmian orkisz stanowią podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (tab. 3).

Tabela 3

Matryca indeksów podobieństwa odmian orkisz określonych na podstawie polimorfizmu markerów RAPD

The matrix of similarity indices for spelt cultivars determined based on RAPD markers polymorphism

Odmiana Cultivar	Franken- ckorn	Badengold	Schwa- nenspelz	Oberkulmer	Ostro	Ceralio	Schwabern- corn Dinkel	Spelt I.N.Z.
Frankenkorn								
Badengold	0,905							
Schwanenspelz	0,851	0,851						
Oberkulmer	0,851	0,851	0,866					
Ostro	0,851	0,851	0,866	0,925				
Ceralio	0,851	0,851	0,903	0,866	0,866			
Schwaberncorn Dinkel	0,851	0,851	0,866	0,889	0,889	0,866		
Spelt I.N.Z.	0,851	0,851	0,866	0,889	0,889	0,866	0,923	



Rys. 2. Dendrogram odmian orkisz uzyskany metodą UPGMA w oparciu o markery RAPD
Fig. 2. UPGMA dendrogram for spelt cultivars obtained based on RAPD markers

Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,851 do 0,913, a średnio wynosiła 0,868. Największe podobieństwo do wszystkich pozostałych odmian wykazały odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z., najmniejsze zaś odmiany Frankenckorn i Badengold. W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą UPGMA (rys. 2). Na uzyskanym dendrogramie wyróżnić można trzy grupy skupień. Pierwsza obejmuje odmiany Frankenckorn i Badengold, druga Schwanenspelz i Ceralio. W trzeciej grupie skupień wspólnej klasteryzacji uległy odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z. Odmiany znajdujące się w tej grupie skupień można podzielić na dwie podgrupy, pierwszą tworzą odmiany Oberkulmer i Ostro, drugą Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z. Sun i wsp. (1998) stwierdzili, że analizowane przez nich genotypy orkisz charakteryzowały się większym zróżnicowaniem genetycznym, aniżeli genotypy pszenicy zwyczajnej. Autorzy stwierdzili podobnie jak Du i wsp. (2002), że na uzyskanym dendrogramie badane linie orkisz tworzyły odrębną grupę skupień. Ocenę zróżnicowania genetycznego orkisz przeprowadzono również stosując markery SSR. Yang i wsp. (2005) analizowali za pomocą markerów mikrosatelitarnych genotypy pszenicy heksaploidalnej. Autorzy analizując 20 odmian *T. aestivum*, 13 form *T. spelta* i 11 genotypów *T. compactum*. wykazali, że pszenica orkisz charakteryzowała się największym spośród badanych obiektów zróżnicowaniem genetycznym.

WNIOSKI

1. Badane odmiany orkisz charakteryzowały się wysokim podobieństwem genetycznym.
2. Za pomocą wybranych starterów możliwa była identyfikacja 6 spośród 8 badanych odmian orkisz.
3. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że największe podobieństwo do wszystkich pozostałych odmian wykazały odmiany Oberkulmer, Ostro, Schwaberncorn Dinkel i Spelt I.N.Z., najmniejsze zaś odmiany Frankenckorn i Badengold.

LITERATURA

- Achleitner A., Tinker N.A., Zechner E., Buerstmayr H. 2008. Genetic diversity among oat varieties of worldwide origin and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1041 — 1053.
- Baumagärtel-Blaschke U. 1991. Dinkel für die neue deutsche Küche. *DLG — Mitteilungen*, 106, 12: 44 — 47.
- Cheng Z., Huang H. 2009. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. *Scientia Hort.* 120: 188 — 193.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11 — 15.
- Drossou A., Katsiotis A., Leggett J. M., Loukas M., Tsakas S. 2004. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 48 — 54.
- Du J. K., Yao Y. Y., Ni Z. F., Peng H. R., Sun Q. X. 2002. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compacted and progeny of recurrent selection. *Acta Genet. Sin.* 29 (5): 445 — 452.

- Grela E., Pałys E., Günther K. D. 1993. Skład chemiczny i wartość pokarmowa ziarna orkisz (*Triticum spelta*) w żywieniu świń. Mat. Sympozjum Naukowego nt.: „Produkcja zwierzęca a środowisko przyrodnicze”. Wyd. AR Lublin, 214 — 222.
- Ikegami H., Nogata H., Hirashima K., Awamura M., Nakahara T. 2009. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. Genet. Resour. Crop Evol. 56:201 — 209.
- Kochieva E. Z., Goryunova S. V., Pomortsev A. A. 2001. RAPD analysis of the genome in species of the genus *Hordeum*. Rus. J. Genet. 37 (8): 905 — 910.
- Marillia E. F., Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. Genome 39 (4): 646 — 54.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci. 76: 5269 — 5273.
- Rohlf F. J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sun Q., Ni Z., Liu Z., Gao J., Huang T. 1998. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99: 205 — 211.
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54 (2-3): 227 — 239.
- Vinod K. Y., Sandeep K., Ravindra K. P. 2007. Measurement of genetic dissimilarity in fieldpea (*Pisum sativum* L.) genotypes using RAPD markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54 (6): 1285 — 1289.
- Virk P. S., Ford-Lloyd B. V., Jackson M. T., Newbury H. J. 1995 Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity 74: 170 — 179.
- 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.
- Yang X., Liu P., Han Z., Ni Z., Sun Q. 2005. Genetic diversity revealed by genomic-SSR and EST-SSR markers among common wheat, spelt and compacted. Progr. Nat. Sci. 15 (1):24 — 33.