

KRZYSZTOF KOWALCZYK**SYLWIA OKOŃ**Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Analiza zmienności allelicznej w *locus* *Xgwm261* w odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006

Allelic variation at the *Xgwm261* locus in wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) registered in Poland in 1978–2006

Celem pracy była analiza zmienności allelicznej w *locus* *Xgwm 261* w 45 odmianach pszenicy zwyczajnej zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006. Wyizolowany DNA poddano amplifikacji z parą specyficznych starterów Wms261. Produkty rozdzielano na żelu poliakrylamidowym. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano dużą zmienność alleliczną w *locus* *Xgwm261* w badanych odmianach. Najczęściej obserwowano fragment DNA o wielkości 174pz. Zaobserwowano również fragmenty o wielkości 165 i 198 pz. Fragment o wielkości 192 pz sprzężony z genem *Rht8* stwierdzono w 7 badanych odmianach pszenicy zwyczajnej: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada i Saga.

Słowa kluczowe: pszenica zwyczajna, SSR, zmienność alleliczna, gen karłowatości *Rht8*

The aim of this study was an analysis of allelic variation in *Xgwm 261* locus, in 45 wheat cultivars registered in Poland in the years 1978–2006. After isolation, DNA was amplified with two WMS261 primers. DNA fragments were separated on polyacrylamide gel. The analysis showed a high allelic variation in *Xgwm 261* locus in these cultivars. A 174 bp DNA fragment was observed most frequently 165bp and 198bp DNA fragments were also observed. A 192 bp fragment linked with *Rht8* dwarfing gene was observed in seven cultivars: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada and Saga.

Key words: common wheat, SSR, allelic variation, *Rht8* dwarfing gene

WSTĘP

Jednym z głównych czynników ograniczających plonowanie pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest wyleganie, dlatego w hodowli poświęca się dużo uwagi na wyselekcjonowanie form krótkostomych, a jednocześnie o wysokim potencjale plonowania. Jednym ze sposobów uzyskania roślin odpornych na wyleganie jest wprowadzanie

genów karłowatości (Gale i Youssefian, 1985; Worland i in., 1990; Kowalczyk, 1997). W celu skrócenia źdźbła w pszenicy zwyczajnej najczęściej wykorzystuje się trzy geny karłowatości: *Rht-B1b*, *Rht-D1b* i *Rht8*. Geny *Rht-B1b*, *Rht-D1b* pochodzą od odmiany Norin 10. Geny te wpływają na zwiększenie plonu roślin przy jednoczesnym skróceniu źdźbła o około 20% (Gale i Youssefian, 1985; Worland, 1987; Börner i in., 1993; Kowalczyk i in., 1997). Są one niewrażliwe na egzogeny kwas giberelinowy, dzięki czemu genotypy zawierające te geny są łatwe do zidentyfikowania (Gale i Gregory, 1977; Gale i Youssefian, 1985). Gen *Rht8* pochodzi od japońskiej odmiany Akakomugi i zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 2D (Korzun i in., 1998). Powoduje on skrócenie źdźbła o około 10% (Jost i Jost, 1989; Worland i in., 1990). Gen ten jest wrażliwy na egzogeny kwas giberelinowy i nie można go zidentyfikować za pomocą GA₃.

Korzun i in. (1998) zidentyfikowali mikrosatelitarny marker WMS261 co-segregujący z genem *Rht8*. Autorzy wykazali obecność fragmentu DNA o wielkości 192 pz w liniach zawierających gen *Rht8*. Ponadto autorzy stwierdzili w *locus Xgwm261* produkty o wielkości 174 pz, których obecność nie była powiązana z redukcją wysokości roślin oraz produkty o wielkości 165 pz, których obecność skorelowana była ze wzrostem wysokości o 3–4 cm. Dalsze badania zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* wykonane w różnych ośrodkach na świecie wykazały obecność szeregu polimorficznych produktów o zróżnicowanej wielkości, (Worland i in., 2001; Ahmad i Sorrells, 2002; Schmidt i in., 2004; Liu i in., 2005).

W hodowli pszenicy zwyczajnej coraz częściej wykorzystuje się markery DNA do selekcji roślin. Identyfikacja genu *Rht8* za pomocą markerów mikrosatelitarnych może w znacznym stopniu ułatwić hodowcom wybór pożądaných form wyjściowych do krzyżowań.

Celem pracy była analiza zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* w odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 45 odmian pszenicy zwyczajnej, w których do tej pory nie określono zmienności allelicznej w *locus Xgwm 261* (tab. 1). DNA badanych odmian wyizolowano z liści dziesięciodniowych siewek metodą CTAB (Doyle i Doyle, 1987). Stężenie wyizolowanego DNA określono za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym przez porównanie z molekularnym wzorcem masy MassRuler™ DNA (Fermentas, Litwa). Następnie próbki rozcieńczono do stężenia DNA 20 ng/μl.

Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T1 Biometra w 20μl mieszaniny o następującym składzie: 1 × PCR bufor (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20); 1,5 mM MgCl₂; 200 μM każdego dNTP; 250 nM każdego startera, 60 ng genomowego DNA, 1U *Taq* Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano startery SSR (*Simple Sequence Repeat*) WMS 261 5'-CTCCCTGTACGCCTAAGGC-3' i 5'-CTCGCGCTACTAGCCATTG-3' (Korzun i in., 1998). Amplifikacja DNA przebiegała

według następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja 1 min w 90°C, 45 cykli: 1 min -90°C, 1 min -55°C, 2 min -72°C z końcową inkubacją przez 10 min w 72°C.

Rozdział produktów prowadzono na denaturującym 6% żelu poliakrylamidowym w buforze TBE. Próbkę denaturowano w 95°C, a następnie rozdzielano przez 1–2 godziny przy 50 W. Zastosowano marker wielkości GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fermentas).

Przed barwieniem żele utrwalano w 10% kwasie octowym, płukano w wodzie destylowanej, wysycano roztworem azotanu srebra z formaldehydem, wywoływano w roztworze węglańku sodu z formaldehydem i tiosiarczanem sodu oraz ponownie utrwalano w 10% kwasie octowym (Chalhoub i in., 1997). Po wysuszeniu otrzymane wzory prążkowe analizowano na podświetlaczu i fotografowano aparatem cyfrowym w systemie PoyDoc.

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 45 analizowanych odmian pszenicy zwyczajnej najczęściej obserwowano produkt o wielkości 174 pz. Produkt ten stwierdzono w 27 badanych odmianach. Ponadto zaobserwowano obecność fragmentów DNA o wielkości 165 pz w 6 odmianach, a o wielkości 198 pz w 5 analizowanych odmianach. Produkt wielkości 192pz wskazujący na obecność genu karłowatości *Rht8* zaobserwowano w 7 zrejoniowanych w Polsce odmianach pszenicy zwyczajnej (tab. 1). Analizy pochodzenia tych odmian wykazały obecność francuskiej odmiany Etoile de Chiosy w rodowodach odmian Almari, Begra, Gama, Rada i Saga. Jednakże jako bezpośredni rodzic odmiana ta występuje jedynie w rodowodzie odmiany Saga. Rodowody odmian Griwa i Monsun są nieznane (tab. 2). Jednym z komponentów rodzicielskich Etoile de Chiosy była odmiana Ardito, która zawiera gen *Rht8* wprowadzony od Akakomugi. Na podstawie analizy rodowodów stwierdzono, że gen *Rht8* zawarty w odmianach Almari, Begra, Gama, Rada i Saga pochodzi od japońskiej odmiany Akakomugi.

Tabela 1

Zmienność alleliczna w locus *Xgwm 261* odmian pszenicy zwyczajnej
Allelic variation in *Xgwm 261* locus in common wheat cultivars

Odmiana Cultivar	Długość fragmentu DNA (pary zasad) DNA fragment size (base pairs)				Charakter rozwoju Growth habit	Rok rejestracji Registration year
	165	174	192	198		
Saga			X		O	1978
Gama			X		O	1979
Kamila		X			O	1979
Modra		X			O	1979
Zeta		X			O	1979
Asta				X	O	1982
Begra			X		O	1982
Beta		X			O	1982
Emika		X			O	1982
Liwilla	X				O	1982
Panda				X	O	1982

c.d. Tabela 1

Odmiana Cultivar	Długość fragmentu DNA (pary zasad) DNA fragment size (base pairs)				Charakter rozwoju Growth habit	Rok rejestracji Registration year
	165	174	192	198		
Rota		X			O	1982
Salwa		X			O	1982
Polanka		X			O	1984
Weneda		X			O	1984
Lanca		X			O	1985
Alba				X	O	1986
Niwa		X			O	1987
Parada		X			O	1987
Oda		X			O	1988
Rada			X		O	1988
Almari			X		O	1989
Nika		X			O	1989
Arda		X			O	1990
Lama		X			O	1990
Rosa		X			O	1990
Kaja		X			O	1997
Wanda		X			O	1997
Mobela	X				O	1998
Rysa		X			O	1998
Griwa			X		J	2001
Zebra	X				J	2001
Flair		X			O	2002
Triso				X	J	2002
Bryza				X	J	2003
Rapsodia	X				O	2003
Rubens		X			O	2003
Slade	X				O	2003
Trend	X				O	2003
Dorota		X			O	2004
Monzun			X		J	2004
Alcazar		X			O	2006
Anthus		X			O	2006
Boomer		X			O	2006
Ludwig		X			O	2006

X — Oznacza obecność fragmentu DNA

X — DNA fragment is present

Tabela 2

Rodowody odmian pszenicy zwyczajnej zawierających gen karłowatości *Rht8*
Pedigree of common wheat cultivars with *Rht8* dwarfing gene

Odmiana Cultivar	Rodowody Pedigree
Almari	Maris Huntsman × Alcedo
Begra	Grana × Bezostaya-1
Gama	Mironovskaya-808 × Luna
Griwa	Rodowód nieznan / Pedigree unknown
Monzun	Rodowód nieznan / Pedigree unknown
Rada	Kranich × C 568/70) × (Luna × Mironowskaja 808)] × Maris Huntsman
Saga	Etoile de Choisy × Mironowskaja 808) × Perdix

Ahmad i Sorrells (2002) wykorzystali startery WMS 261 do analizy zmienności allelicznej 71 odmian pszenicy pochodzących z 13 krajów. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy wykazali, że wśród badanych odmian najczęściej występowały fragmenty wielkości 165 i 174 pz. Częstość występowania produktu 192 pz sprzężonego z genem *Rht8* wynosiła 6%. Ponadto autorzy stwierdzili cztery nowe allele w *locus Xgwm261* obecne w odmianach pochodzących ze Stanów Zjednoczonych i Nowej Zelandii. Worland i wsp. (2001) analizowali za pomocą metody SSR zmienność alleliczną w *locus Xgwm261* w 800 odmianach pszenicy zwyczajnej pochodzących z 20 krajów. Autorzy stwierdzili, że wśród badanych odmian najczęściej występowały allele o wielkości 165 pz i 174 pz. Fragment DNA o wielkości 192 pz sprzężony z genem karłowatości *Rht8* występował w odmianach pochodzących z Europy południowej. Chebotar i wsp. (2001) analizowali zmienność alleliczną w *locus Xgwm261* w 23 ukraińskich odmianach pszenicy zwyczajnej. Uzyskane wyniki wykazały, że w większości badanych odmian obecny był allel o wielkości 192pz. Autorzy obserwowali również fragmenty wielkości 174, 165, i 206 pz. Liu i wsp. (2005) badali 408 chińskich odmian pszenicy zwyczajnej. Zidentyfikowali oni 13 różnych alleli występujących w *locus Xgwm261*. Allel o wielkości 192pz skorelowany z genem karłowatości *Rht8* występował w wielu chińskich odmianach. Marker WMS261 został również wykorzystany do analizy zmienności allelicznej polskich odmian pszenicy zwyczajnej. Kowalczyk (2006) analizował odmiany pszenicy zarejestrowane w Polsce do roku 1975. Autor stwierdził dużą zmienność alleliczną w *locus Xgwm 261* i zidentyfikował szereg polimorficznych produktów. Fragment o wielkości 192pz sprzężony z genem karłowatości *Rht8* zidentyfikował tylko w trzech badanych odmianach pszenicy: Aria, Grana i Luna.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych analiz SSR wykazano dużą zmienność alleliczną w *locus Xgwm261* w 45 odmianach pszenicy zwyczajnej zarejestrowanych w Polsce w latach 1978–2006.
2. W analizowanych odmianach w *locus Xgwm261* stwierdzono obecność produktów PCR wielkości 165, 174, 192 i 198pz.
3. Produkty PCR wielkości 192pz sprzężone z genem karłowatości *Rht8* stwierdzono w odmianach: Almari, Begra, Gama, Griwa, Monsun, Rada, Saga.

LITERATURA

- Ahmad M., Sorrells M. E. 2002. Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing gene in wheat. *Euphytica* 123: 235 — 240.
- Börner A., Worland A. J., Plaschke J., Schumann E., Law C. N. 1993. Pleiotropic effects of genes for reduced height (*Rht*) and day-length insensitivity (*Ppd*) on yield and its components for wheat grown in middle Europe. *Plant Breed.* 111: 204 — 216.
- Chalhoub B. A., Thibault S., Laucou V., Rameau C., Höfte H., Cousin R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques* 22: 216 — 220.
- Chebotar S. V., Korzun V. N., Sivolap Y. M. 2001. Allele distribution at *locus* WMS261 marking the dwarfing gene *Rht8* in common wheat cultivars of southern Ukraine. *Rus. J. Genet.* 37: 894 — 989.

- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Gale M. D., Gregory R. S. 1977. A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica* 26: 733 — 738.
- Gale M. D., Youssefian S. 1985. Dwarfing genes in wheat. In: *Progress in Plant Breeding*, I' Ed. G. E. Russell, Butterworths, London 1 — 35.
- Jost M., Jost M. 1989. Pedigrees of 142 Yugoslav winter wheat cultivars released from 1967 till 1986. *Podravka* (7) 1: 19 — 27.
- Korzun V., Röder M., Ganal M. W., Worland A. J., Law C. N. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 1104 — 1109.
- Kowalczyk K. 1997. Historia i wykorzystanie w hodowli pszenicy genów karłowatości pochodzących od Norin 10. *Post. Nauk Rol.* 1/97: 63 — 71.
- Kowalczyk K. 2006. Zmienność alleliczna w *locus Xgwm 261* w polskich odmianach pszenicy zwyczajnej zrejoniowanych do 1975 roku. *Acta Agrophisica* 8 (2):415 — 421.
- Kowalczyk K., Worland A. J., Miazga D. 1997. Pleiotropic effects of *Rht1*, *Rht2*, and *Rht3* genes in wheat isogenic lines Maris Huntsman and Maris Widgeon. *J. Genet. & Breed.* 51: 129 — 135.
- Liu Y., Liu D., Zhang H., Wang J., Sun J., Guo X. 2005. Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the XGWM261 *locus* in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 145: 103 — 122.
- Schmidt A.L., Gale K.R., Ellis M.H., Giffard P.M. 2004. Sequence variation at a microsatellite locus (XGWM261) in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Euphytica* 135:239 — 246.
- Worland A. J. 1987. Co-operative studies on the genetics of height in European wheat varieties. *EWAC Newsletter*, Hungary 69 — 82.
- Worland A. J., Law C. N., Petrović S. 1990. Height reducing genes and their importance to Yugoslavian winter wheat varieties. *Zbornik* 38: 245 — 257.
- Worland A.J., Sayers E.J., Korzun V. 2001. Allelic variation at the dwarfing gene *Rht8* locus and its significance in international breeding programmes. *Euphytica* 119: 155 — 159.