

STEFAN STOJAŁOWSKIKatedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Polimorfizm markerów STS i SSR w obrębie linii wsobnych żyta*

Polymorphism of STS and SSR markers in rye inbred lines

Dwadzieścia pięć markerów STS oraz dwanaście markerów mikrosatelitarnych (SSR) zostało wykorzystanych do oceny genetycznego zróżnicowania w obrębie 15 linii wsobnych żyta. Polimorficzne fragmenty DNA zidentyfikowano w obrębie dwudziestu loci STS i jedenastu SSR. Oba systemy markerowe okazały się być skuteczne przy rozróżnianiu badanych genotypów żyta, ale markery SSR okazały się bardziej polimorficzne i w związku z tym wydają się być efektywniejsze w identyfikowaniu poszczególnych linii. Poziom genetycznego zróżnicowania oceniony na podstawie wszystkich użytych w pracy markerów mieścił się w granicach od 0,10 do 0,58. Dendrogram skonstruowany w oparciu o wykryty polimorfizm markerów STS i SSR był zasadniczo zgodny z danymi o pochodzeniu badanych linii.

Słowa kluczowe: markery molekularne, SSR, STS, żyto

Twenty five STS and twelve microsatellite (SSR) markers were used for the evaluation of genetic diversity among 15 inbred lines of rye. Polymorphic DNA fragments were identified in twenty STS and eleven SSR loci. Although both marker systems were able to discriminate the analyzed rye genotypes, SSRs proved to be more polymorphic which makes them more prospective for taxonomic purposes. Genetic diversity among inbred lines, assessed on the basis of all markers used in the study, ranged from 0.10 to 0.58. Dendrogram based on STS and SSR polymorphisms was generally consistent with the pedigree data.

Key words: molecular markers, rye, SSR, STS

WSTĘP

Żyto uprawne (*Secale cereale* L.) należy do najważniejszych gatunków uprawnych w Polsce, ale w skali światowej jego znaczenie gospodarcze jest raczej znikome. Stąd też systematyczny postęp badań z zakresu genetyki molekularnej, jaki obserwujemy u wielu innych gatunków uprawnych, w mniejszym zakresie dotyczy analiz genomu żyta. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym badania genetyczne żyta jest obcopylność tego gatunku. Pomimo tego ilość dostępnych danych o specyficznych sekwencjach genomu

* Praca dofinansowana przez AR w Szczecinie w ramach badań własnych BW//03/06

żytniego systematycznie wzrasta umożliwiając coraz szersze wykorzystanie osiągnięć genetyki molekularnej w praktycznej hodowli.

Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach genetycznych i pracach hodowlanych nad żytem (i wieloma innymi roślinami uprawnymi), zmierza w dwóch podstawowych kierunkach. Pierwszy ma na celu opracowanie technik pozwalających na identyfikowanie w ramach pojedynczej analizy wielu polimorficznych, ale często nieokreślonych pod względem lokalizacji, regionów genomu żytniego. Techniki pozwalające na tego rodzaju analizy to przede wszystkim RAPD (Williams i in., 1990), ISSR (Zietkiewicz i in., 1994), AFLP (Vos i in., 1995) czy też opracowana w ostatnich latach technologia DArT — Diversity Arrays Technology (Jaccoud i in., 2001). U żyta techniki te wykorzystywane są głównie do określania poziomu zróżnicowania genetycznego pomiędzy genotypami (Bednarek i in., 1999; Myśków i in., 2001; Stojalowski i in., 2004) oraz do poszukiwania markerów sprzężonych z ważnymi gospodarczo cechami (Börner i in., 1998; Masojć i in., 1999; Miftahudin i in., 2002).

Drugi nurt prac nad markerami molekularnymi zmierza do opracowania markerów specyficznych, o znanej lokalizacji chromosomowej, takich jak markery SSR (mikrosatelity) i STS (sequence target site) / SCAR (sequence characterised amplified region). Tego rodzaju markery od kilku lat opracowywane są również dla żyta (Hackauf i Wehling, 2002; Gonzalez i in., 2002; Stracke i in., 2003). Pod pewnymi względami są one nieco mniej przydatne do określania globalnego zróżnicowania genetycznego pomiędzy różnymi obiektami, gdyż przeważnie w ramach jednej analizy pozwalają na określenie polimorfizmu w pojedynczym locus. Tym samym całościowa analiza staje się bardziej prac- i kosztochłonna. Z drugiej jednak strony stosunkowo wysoki polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych oraz ich rozproszenie po całym genomie sprawia, że analizy z wykorzystaniem markerów SSR dawały dobre efekty przy próbach oceny zróżnicowania genetycznego między liniami wsobnymi żyta (Bolibok i in., 2005). Polimorficzne markery SSR lub STS, po wykazaniu ich związku z ważnymi gospodarczo genami mogą również stać się bardzo wartościowym narzędziem w ramach prac selekcyjnych i tym samym przyczyniać się do przyspieszenia postępu w hodowli nowych odmian. Markery SSR są pod tym względem szczególnie cenione, głównie z uwagi na kodominujący charakter dziedziczenia. Przeważnie wymagają one jednak wykonania rozdziału elektroforetycznego w poliakrylamidzie. Dużo łatwiejsze i tańsze jest wykonywanie analiz techniką charakterystyczną dla markerów STS/SCAR (rozdział elektroforetyczny w agarozie). Tego typu markery uważane są jednak za znacznie mniej polimorficzne od mikrosatelitów, co z oczywistych względów ogranicza możliwości wykorzystania ich w praktyce.

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu polimorfizmu dostępnych markerów STS w porównaniu z markerami mikrosatelitarnymi oraz określenie przydatności obu tych technik markerowych do oceny zróżnicowania genetycznego pomiędzy liniami wsobnymi żyta ozimego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowił zestaw piętnastu linii wsobnych żyta o zróżnicowanym pochodzeniu (tab. 1). DNA do badań izolowano przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) z liści pobieranych w fazie krzewienia roślin. Uzyskane preparaty DNA rozcieńczano do finalnej koncentracji 15 ng/μl i w tej postaci wykorzystywano do reakcji PCR.

Tabela 1

Pochodzenie badanych linii wsobnych żyta
Origin of analyzed inbred lines of rye

Linia wsobna Inbred line	Populacja wyjściowa Source population	Hodowla Breeder	S ¹⁾
541-6	KaH9 × [(MS69-8-1 × Smolickie)F ₂ MS × KaH]F ₁ MP	AR Szczecin	22
Ot1-3	Otello	AR Szczecin	20
544-7	(<i>S.kuprijanovii</i> × Smolickie)BC ₅ × [(MS69-8-1 × Smolickie)F ₂ MS × KaH]F ₁ MP	AR Szczecin	20
Ot0-20	Otello	AR Szczecin	21
S120	LG3 × Szk10	DANKO	12
S76	LG3 × Amilo	DANKO	10
711/81k	[(544 × K221)F ₁ × 541]F ₁ × 541	AR Szczecin	18
DS-2	<i>S.dighoricum</i> × Smolickie	AR Szczecin	22
RXL10	Zeelandzkie	AR Szczecin	21
L1	Petkuser Normal	Univ. Hohenheim	24
153/79	541-6 × 544-7	AR Szczecin	15
620/75-1-5	Dańkowskie Złote	AR Szczecin	18
S436N	MatS × Dominator	DANKO	6
2020LM-3	nieznana	IHAR	7
51527LM	nieznana	IHAR	7

¹⁾ Pokolenie chowu wsobnego; Generations of inbreeding

Analizy STS (sequence target site)/SCAR (sequence characterised amplified region)

Reakcje PCR prowadzono z wykorzystaniem 25 par starterów (tab. 2) opisanych w pracach Gonzalez i wsp. (2002), Mago i wsp. (2002, 2005) oraz Stracke i wsp. (2003), zaprojektowanych w oparciu o dane z bazy NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html, sekwencje: AF305943, AY587500, AY587501, AY587508, AY587510, AY587511, AY615365, AY954973, DQ234070, DQ234071, DQ295068) lub na podstawie niepublikowanych rezultatów badań własnych (SCSz732L530, startery: ACGCCCAGCCCATGAGATGA/ACGCCCAGCCGTCACAGCAA; SCSz980L650B, startery: ACGATCGCTCCGATAAATAG/ACGATCGCTCATAGAATCCA).

Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Mieszanina reakcyjna, o objętości 20 μl, zawierała 15 ng DNA, 7 pmol każdego startera, 0,9U Taq polimerazy (MBI Fermentas), 2mM MgCl₂, 70 μM dNTP, bufor PCR z dodatkiem siarczanu amonowego (75mM Tris-HCl, pH8.8, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20). Zastosowano następujący profil termiczny reakcji PCR: wstępną denaturację przez 3 min w 94°; 10 cykli: 92°przez 30 s., 65°C (-1°C/cykl) przez

90 s., 72°C przez 60 s.; 25 cykli: 92°C przez 30 s., 55°C przez 60 s., 72°C przez 60 s.; końcowa elongacja w 72°C przez 5 min. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelach agarozowych w buforze TBE (90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA). Żele z produktami amplifikacji uwidocznionymi przy użyciu bromku etydyny dokumentowano w aparacie Fluor S Multi Imager firmy BioRad.

Analizy SSR (simple sequence repeat)

Analizy markerów SSR prowadzono z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora kapilarowego CEQ 8000, firmy Beckmann-Coulter. Zmodyfikowano w tym celu metodykę opisaną w pracy Khlestkiny i wsp. (2004). Sekwencja jednego ze starterów SSR (*forward primer*) w każdej parze została wydłużona od strony 5' o 17-nukleotydową sekwencję identyczną ze starterem M13. Mieszanina reakcyjna o ogólnej objętości 10µl zawierała 0,5 pmol wydłużonego startera SSR-forward, 2,5 pmol startera SSR-reverse (o normalnej długości), 1,5 pmol startera M13 wyznakowanego barwnikiem fluorescencyjnym, 0,5U polimerazy typu hot-start (VivaTaq polimeraza DNA firmy Novazym), bufor reakcyjny (70 mM Tris-HCl, pH8.3, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂), 140 µM każdego dNTP i 15ng DNA. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf) według następującego profilu temperaturowego: wstępna denaturacja w 95°C przez 15 min.; 5 cykli: 94°C przez 30 s., 60°C (-1°C/cykl) przez 60 s., 72°C przez 60 s.; kolejne 5 cykli: 94°C przez 30 s., 68°C (-1°C/cykl) przez 60 s., 72°C przez 60 s.; następnych 28 cykli: 94°C przez 30 s., 48°C przez 45 s., 72°C przez 60 s.; końcowa elongacja w 72°C przez 10 min. Uzyskane produkty amplifikacji mieszano z zawierającym formamid roztworem Sample Loading Solution (Beckman-Coulter) i rozdzielano w obecności wzorca masowego CEQ DNA Standard 400. Do analizy fragmentów wykorzystywano standardowe oprogramowanie aparatu CEQ 8000. Wielkości uzyskanych produktów amplifikacji podane w niniejszej pracy zostały pomniejszone w porównaniu z danymi uzyskanymi z analizy fragmentów o 17 nukleotydów stanowiących wydłużoną część startera SSR-forward. W pracy użyto 12 markerów SSR pochodzących z BAZ Database of *Secale cereale* Microsatellites (SCM) udostępnionej przez Institut für Landwirtschaftliche Kulturen, Gross Lüsewitz, Niemcy (www.bafz.de), których lokalizacja chromosomowa została podana przez Hackaufa i Wehlinga (2003).

Analiza danych

Dla każdego z markerów użytych w niniejszej pracy obliczono według podanego poniżej wzoru, wartość współczynnika PIC (polymorphic information content) informującego o przydatności danego markera do rozróżniania badanych genotypów (Powell i in. 1996).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

gdzie p_i oznacza częstotliwość występowania i -tego allele.

Dla analizowanych linii wsobnych żyta obliczono również współczynniki różnicowania genetycznego przy zastosowaniu równania Neia (Nei i Li, 1979) oraz wykreślono metodą UPGMA dendrogram ilustrujący zaobserwowane relacje. Konstrukcję

dendrogramu wykonano przy użyciu programu NTSYS-pc v.2.20j (Applied Biostatistics Inc.).

WYNIKI

Większość z użytych markerów STS pozwalała na amplifikację pojedynczych, specyficznych fragmentów DNA, a ewentualny polimorfizm w obrębie tych markerów wynikał z obecności alleli „null”, czyli braku amplifikacji danego fragmentu STS u niektórych genotypów. Spośród dwudziestu pięciu par starterów STS użytych do analiz średnio co piąty nie ujawniał polimorfizmu w obrębie testowanych genotypów żyta (tab. 2). Wśród pozostałych markerów dwa: IB267 z chromosomu 1R i OPO10_896 o nieznannej lokalizacji generowały produkty amplifikacji tylko u pojedynczych linii wsobnych. Tym samym ich zdolność do rozróżniania genotypów żyta mierzona wartością współczynnika PIC była bardzo niska. Najlepszą zdolnością do identyfikowania różnic pomiędzy genotypami charakteryzowała się grupa czterech markerów: iag95, OPQ4_578, P6M12P i SCSz980L650B, które charakteryzowały się obecnością trzech lub nawet czterech (iag95) alleli — poza allelami „null” generowały u poszczególnych linii wsobnych produkty amplifikacji o różnych wielkościach. Wśród markerów, u których stwierdzono obecność tylko dwóch alleli największe możliwe do uzyskania wartości współczynnika PIC odnotowano dla OPB19_968, OPO7_666 i SCP14M55. Średnia liczba alleli identyfikowanych przy użyciu pojedynczej pary starterów wyniosła 2,00, a przeciętna wartość współczynnika PIC dla wszystkich analizowanych markerów STS - 0,334.

Różne allele markerów mikrosatelitarnych ujawniane były w formie produktów amplifikacji o różnej wielkości. Nie obserwowano tu alleli „null”, dzięki czemu markery SSR wykazują kodominujący charakter dziedziczenia. Właściwość ta, bardzo ceniona w analizach z wykorzystaniem markerów molekularnych, pozwoliła na wykrycie resztkowej heterozygotyczności u dwóch spośród badanych linii wsobnych. Linie S436N i 51527LM, należące do stosunkowo mało zaawansowanych w chowie wsobnym materiałów (tab. 1), charakteryzowały się obecnością dwóch produktów amplifikacji w locus SCM31 z chromosomu 2R (tab. 3). Wśród dwunastu markerów SSR tylko jeden nie dał polimorficznych produktów amplifikacji. Pozostałe markery charakteryzowały się w większości obecnością 2–3 form allelicznych. Jedynie marker SCM126 generował u badanych linii wsobnych aż pięć allelicznych produktów amplifikacji. Zdolność do rozróżniania genotypów mierzona wartością współczynnika PIC była w przypadku markerów mikrosatelitarnych nieco wyższa niż w przypadku produktów STS. Średnia liczba alleli przypadająca na jeden locus mikrosatelitarny to 2,5, a przeciętna wartość PIC — 0,445.

Współczynniki odległości genetycznej między poszczególnymi liniami wsobnymi mieściły się w dość szerokim zakresie od 0,10 do 0,58. Zgodnie z oczekiwaniami najmniejsze zróżnicowanie pomiędzy genotypami obserwowano między liniami spokrewnionymi ze sobą: 541-6, 544-7, 711/81k i 153/79 (tab. 4).

c.d. Tabela 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
PKABA1 ^{N)}	2R	1050	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,32
SCIM819_1434 ^{N)}	7R	1434	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0,44
SCM812_1138 ^{N)}	7R	1138	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0,32
SCP12M56 ^{S)}	4R	300	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0,48
SCP14M55 ^{S)}	4R	230	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0,50
SCP15M55 ^{S)}	4R	260	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0,39
SCP16M58 ^{S)}	4R	180	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,39
SCP44M51 ^{S)}	4R	220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,00
SCSz732L530 ^{W)}	1R	530	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0,39
SCSz980L650B ^{W)}	6R	380	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50
		650	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
SCY09d ^{S)}	4R	470	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0,39

G) Sekwencje starterów wg Gonzalez i in. (2002); Primer sequences according to Gonzales et al. (2002)

M) Sekwencje starterów wg Mago i in. (2002, 2005); Primer sequences according to Mago et al. (2002, 2005)

N) Sekwencje starterów zaprojektowane w oparciu o dane z bazy NCBI; Primer sequences from NCBI database

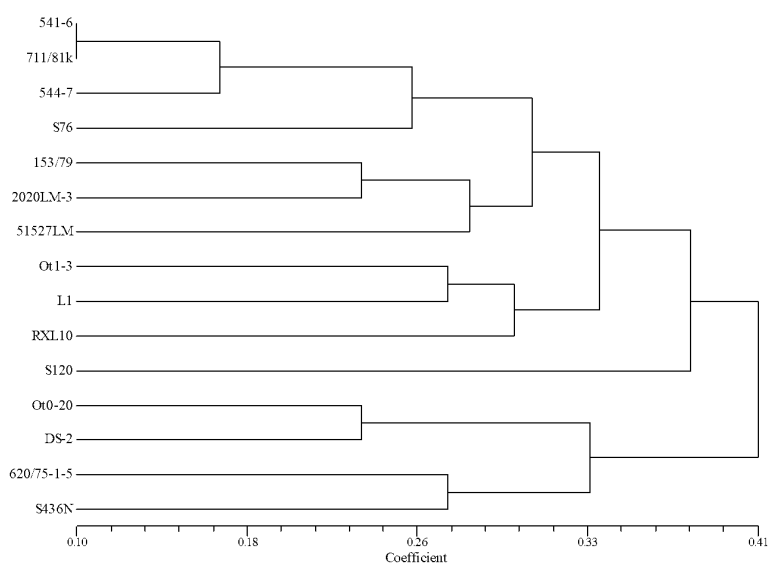
^{W)} Sekwencje starterów zaprojektowane na podstawie własnych (niepublikowanych) badań nad żytem; Primer sequences developed on the basis of unpublished studies on rye

^{S)} Sekwencje starterów wg Stracke i in. (2003); Primer sequences according to Stracke et al. (2003)

Tabela 4

Macierz odległości genetycznych między liniami wsobnymi żyta otrzymana przy wykorzystaniu polimorfizmu markerów SCAR i SSR
Matrix of genetic distances among inbred lines of rye based on polymorphisms of SCAR and SSR markers

Ot1-3	0,47														
544-7	0,13	0,43													
Ot0-20	0,55	0,35	0,55												
S120	0,33	0,50	0,37	0,45											
S76	0,23	0,33	0,23	0,55	0,33										
711/81k	0,10	0,47	0,20	0,58	0,40	0,30									
DS-2	0,45	0,42	0,42	0,23	0,45	0,45	0,48								
RXL10	0,30	0,33	0,30	0,55	0,40	0,37	0,33	0,42							
L1	0,27	0,27	0,23	0,38	0,33	0,27	0,37	0,42	0,27						
153/79	0,28	0,38	0,18	0,47	0,38	0,32	0,38	0,40	0,35	0,25					
620/75-1-5	0,38	0,42	0,42	0,37	0,35	0,32	0,45	0,40	0,42	0,38	0,43				
S436N	0,38	0,35	0,35	0,30	0,42	0,28	0,35	0,27	0,42	0,38	0,33	0,27			
2020LM-3	0,35	0,28	0,25	0,37	0,42	0,32	0,35	0,37	0,35	0,32	0,23	0,40	0,23		
51527LM	0,32	0,35	0,25	0,47	0,35	0,32	0,38	0,47	0,35	0,35	0,23	0,30	0,33	0,33	
Linie wsobne żyta Inbred lines of rye	541-6	Ot1-3	544-7	Ot0-20	S120	S76	711/81k	DS-2	RXL10	L1	153/79	620/75-1-5	S436N	2020LM-3	



Rys. 1. Dendrogram UPGMA, przedstawiający relacje odległości genetycznej między liniami wsobnymi żyta, wyznaczone przy użyciu markerów STS i SSR

Fig. 1. UPGMA dendrogram showing genetic distances among inbred lines of rye, determined by STS and SSR markers

Wszystkie te cztery linie zostały wytworzone w AR Szczecin w ramach programu hodowli linii dopełniających dla cytoplazmy sterylizującej CMS-C. Wyższy poziom zróżnicowania zaobserwowano pomiędzy liniami Ot1-3 i Ot0-20, które wyprowadzono z tej samej populacji wyjściowej — odmiany Otello (tab. 1). Jednocześnie obie te linie, a w szczególności Ot0-20, bardzo znacząco różniły się od wymienionych wyżej linii dopełniających. Zależności te znalazły potwierdzenie w rozmieszczeniu poszczególnych linii w obrębie dendrogramu (rys. 1). Analiza UPGMA ujawniła obecność dwóch głównych grup skupień. Do jednej z nich zaliczone zostały cztery linie: Ot0-20, DS-2, 620/75-1-5 i S436N, z których każda w dość wyraźny sposób odróżniała się od pozostałych. W drugiej grupie skupień znalazła się reszta linii, wśród których największe podobieństwo zaobserwowano między liniami 541-6, 711/81k i 544-7. W nieco większej odległości od nich znalazła się czwarta z linii dopełniających — 153/79.

DYSKUSJA

Większość markerów STS u żyta zostało opracowanych poprzez zsekwencjonowanie produktów RAPD lub AFLP (Gonzalez i in., 2002; Mago i in., 2002, 2005; Stracke i in., 2003). Głównym celem tego rodzaju przekształceń markerów o małej specyficzności w markery STS jest przeważnie chęć wykorzystania ich dalej do prac selekcyjnych. Markery STS pozwalają bowiem przy niewielkich nakładach pracy i pieniędzy na szybkie analizowanie dużej liczby obiektów. Podstawową wadą tego typu markerów jest jednak często niezadawalający poziom polimorfizmu obserwowany w materiałach hodowlanych. Wśród przebadanych dwudziestu pięciu markerów tylko 80% wykazywało polimorfizm w badanym materiale, który charakteryzował się dość dużym zróżnicowaniem pod względem pochodzenia. Wartość wskaźnika PIC tylko dla połowy polimorficznych markerów STS przekroczyła wartość 0,40. Pod względem poziomu wykrywanego polimorfizmu wyraźnie lepsze okazały się markery SSR, których dodatkową zaletą jest kodominujący charakter dziedziczenia. Tego rodzaju dziedziczenie może co prawda być obecne również w przypadku markerów STS, ale jak tego dowodzą rezultaty Stracke i wsp. (2003) przy przekształcaniu fragmentów RAPD i AFLP w markery specyficzne kodominację obserwuje się raczej rzadko.

Stosunkowo duży polimorfizm i wysokie wartości wskaźnika PIC w obrębie większości markerów mikrosatelitarnych świadczy o ich przydatności do prac związanych z identyfikacją linii wsobnych i oceną poziomu zróżnicowania genetycznego pomiędzy nimi. Podobne obserwacje poczynili Bolibok i wsp. (2005) sugerując jednocześnie, że prawidłowa ocena dystansów genetycznych pomiędzy badanymi genotypami żyta powinna się opierać o wykorzystanie różnych systemów markerowych, gdyż każdy z nich może wykrywać polimorfizm w innych obszarach genomu. Jednocześnie dobór markerów amplifikowanych w obrębie różnych chromosomów może sprzyjać uzyskiwaniu bardziej wiarygodnych wyników (Myśków i in., 2001). Zaprezentowane wyniki oceny zróżnicowania genetycznego pomiędzy liniami wsobnymi żyta oparte są o markery amplifikowane w obszarze wszystkich siedmiu chromosomów żyta przy zastosowaniu dwóch technik markerowych. Niewątpliwie w związku z często niezadawalającym

poziomem polimorfizmu markerów STS, tylko niektóre z nich należałoby zalecić do prowadzenia badań nad zróżnicowaniem genetycznym materiałów hodowlanych.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oceny podobieństwa genetycznego okazały się być w znacznym stopniu zgodne z dostępnymi danymi rodowodowymi. Co prawda linie wywodzące się z tej samej populacji wyjściowej: Ot1-3 i Ot0-20 wykazywały dość wysoki poziom zróżnicowania, ale z uwagi na populacyjny charakter odmiany Otello wynik ten nie wydaje się być zaskakujący. Znajduje on zresztą potwierdzenie we wcześniejszych badaniach z zastosowaniem techniki RAPD (Myśków i in., 2001). Z uwagi na fakt, że z populacji wyjściowej o pozornie identycznym pochodzeniu możemy uzyskać materiały znacząco różniące się genetycznie, Graner i wsp. (1994) uważają, że wyniki oceny zróżnicowania genetycznego otrzymywane technikami genetyki molekularnej są często wartościowsze dla hodowli niż same dane rodowodowe. Oczywiście precyzja tego rodzaju analiz wzrasta wraz z ilością stosowanych technik markerowych (Bolibok i in., 2005) oraz liczbą badanych loci. Tym samym uzyskane w niniejszej pracy wyniki podobieństwa genetycznego bazujące na ocenie polimorfizmu w obrębie 37 loci STS i SSR niewątpliwie nie mogą być traktowane jako ostateczne.

WNIOSKI

1. Polimorfizm wykrywany przy użyciu markerów STS jest u linii wsobnych żyta znacząco mniejszy niż w przypadku zastosowania markerów mikrosatelitarnych.
2. Niektóre markery STS, u których obserwuje się obecność w jednym locus serii 3–4 alleli, charakteryzują się zdolnością do rozróżniania genotypów żyta porównywalną do markerów SSR.

LITERATURA

- Bednarek P. T., Chwedorzewska K., Króliczak J., Puchalski J., Zawada M. 1999. Wykorzystanie markerów genetycznych typu AFLP do badań zmienności genetycznej linii wsobnych żyta. Biul. IHAR 211: 219 — 227.
- Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., Hromada A., Pietrzykowaski 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.
- Börner A., Korzun V., Polley A., Malyshev S., Melz G. 1998. Genetics and molecular mapping of male fertility restoration locus (Rfg1) in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 99 — 102.
- Gonzalez C., Camacho M. V., Benito C. 2002. Chromosomal location of 46 new RAPD markers in rye (*Secale cereale* L.). Genetica 118: 205 — 211.
- Graner A., Ludwig F. W., Melchinger A. E. 1994. Relationship among European barley germplasm: II Comparison of RFLP and pedigree data. Crop Sci. 34: 1199 — 1205.
- Hackauf B., Wehling P. 2002. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. Plant Breed. 121: 11 — 25.
- Hackauf B., Wehling P. 2003. Development of microsatellite markers in rye: map construction. Plant Breed Seed Sci 48: 143 — 151.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucl. Acid. Res. 29(4), e25: 1 — 7.

- Khlestkina E. K., Than M. H. M., Pestsova E. G., Röder M. S., Malyshev S. V., Korzun V., Börner A. 2004. Mapping of 99 new microsatellite-derived loci in rye (*Secale cereale* L.) including 39 expressed sequence tags. *Theor. Appl. Genet.* 109: 725 — 732.
- Mago R., Miah H., Lawrence G. J., Wellings C. R., Spielmeyer W., Bariana H. S. 2005. High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theor Appl Genet* 112: 41 — 50.
- Mago R., Spielmeyer W., Lawrence G. J., Lagudah E. S., Ellis J. G., Pryor A. 2002. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. *Theor Appl Genet.* 104: 1317 — 1324.
- Masojć P., Łapiński M., Myśków B., Stojalowski S., Milczarski P. 1999. Poszukiwanie markerów molekularnych męskiej sterility i odporności na porostanie u żyta. *Biul. IHAR* 211: 273 — 280.
- Miftahudin, G., Scoles J., Gustafson J. P. 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 626 — 631.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szołkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42 (1): 1 — 14.
- Nei M., Lee W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5269 — 5273.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225 — 238.
- Stojalowski S., Milczarski P., Masojć P. 2004. Przydatność markerów ISSR do identyfikacji linii wsoonych oraz mapowania genomu żyta. *Biul. IHAR* 231: 237 — 246.
- Stracke S., Schilling A. G., Förster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H. H. 2003. Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1184 — 1190.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid. Res.* 23 (21): 4407 — 4414.
- 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.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) — Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176 — 183.