

KATARZYNA PANKIEWICZ

TADEUSZ ADAMSKI

ZYGMUNT KACZMAREK

MARIA SURMA

MICHAŁ RĘBARZ

Institut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Molekularne i fenotypowe różnicowanie odmian i linii podwojonych haploidów pszenicy (*Triticum aestivum* L.)

Molecular and phenotypic differentiation of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties and their doubled haploid lines

Celem badań było stwierdzenie, czy odmiany pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) uprawiane w Polsce, są homogenne pod względem genetycznym. Badanie jednorodności odmian prowadzono poprzez porównanie linii podwojonych haploidów z odmianami wyjściowymi pod względem fenotypowym i molekularnym. Analizowano 7 odmian pszenicy ozimej (Batis, Changer, Elena, Kobra, Kornett, Kris i Mikon) oraz uzyskane z nich linie podwojonych haploidów (DH). Polimorfizm DNA u badanych form określono metodą RAPD-PCR dla 20 10-nukleotydowych starterów. Uzyskano 145 produktów amplifikacji, z których 107 było polimorficznych. Ponadto dokonano porównania linii DH z odmianami wyjściowymi pod względem wybranych cech morfologicznych. Żadna z badanych odmian nie była homogenna, przy czym najbardziej zróżnicowanymi odmianami zarówno pod względem genetycznym, jak i fenotypowym okazały się Kobra, Elena.

Słowa kluczowe: fenotyp, podobieństwo genetyczne, pszenica, RAPD

The aim of this study was to examine homogeneity of several wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Poland. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) polymorphism was studied in seven wheat cultivars: Batis, Changer, Elena, Kobra, Kornett, Kris and Mikon, and doubled haploid (DH) lines derived from them. Twenty decamer primers were used. Totally, 145 amplification products were observed 107 ones were polymorphic. Genetic similarity between each variety and its DH lines was estimated. Besides, the phenotypic differences between DHs and their initial varieties were examined in respect of yield-related traits. The results indicated that none of the studied varieties was homogenous. The most differentiated varieties appeared to be Kobra and Elena.

Key words: genetic similarity, Mahalanobis distance, phenotype, RAPD, wheat varieties

WSTĘP

Odmiany roślin uprawnych są sprawdzane i rejestrowane przez Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). Decyzje o wpisaniu odmiany do rejestru odmian Ośrodek podejmuje na podstawie badań OWT (odrębności, wyrównania, trwałości). Dla roślin samopylnych granice tolerancji dla wyrównania odmian są mniej rygorystyczne, niż dla odmian rozmnażanych wegetatywnie. W ocenie wyrównania pszenicy dopuszcza się istnienie mieszczącej się w pewnych granicach niejednorodności, zwłaszcza w przypadku cech uwarunkowanych wieloma genami, do których należy większość cech agronomicznych, między innymi masa tysiąca ziaren, plon, wysokość roślin, wielkość kłosa. Tym samym zakłada się możliwość istnienia zróżnicowania genetycznego roślin w obrębie badanej odmiany.

Celem badań było stwierdzenie, czy odmiany pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) uprawiane w Polsce, są homogenne pod względem genetycznym i fenotypowym. Informacje te mogą być pomocne w doborze form rodzicielskich przeznaczonych zarówno do badań naukowych, jak i prac hodowlanych. Przyjęto założenie, że w przypadku odmian jednorodnych wyprowadzone z nich linie podwojonych haploidów (DH) nie powinny się istotnie różnić od form wyjściowych zarówno pod względem wybranych cech fenotypowych, jak i na poziomie DNA. Linie DH jako formy całkowicie homozygotyczne stanowią dobry materiał do badań genetycznych, w szczególności do analizy cech ilościowych, z uwagi na możliwość powtarzania obserwacji dla poszczególnych genotypów, a tym samym zwiększenia precyzji eksperymentu. Linie DH pszenicy otrzymuje się między innymi poprzez krzyżowanie z kukurydzą. Metoda ta została opisana roku 1986 przez Laurie i Bennet. Obecnie jest ona z powodzeniem stosowana w produkcji podwojonych haploidów pszenicy na skalę komercyjną. Badania dotyczące zróżnicowania genetycznego odmian prowadzono z wykorzystaniem metody opartej na polimorfizmie losowo amplifikowanych fragmentów DNA (RAPD). Metoda ta została opracowana przez Williamsa i wsp. w 1990 roku. Znalazła szerokie zastosowanie, między innymi w badaniach ewolucyjnych, w identyfikacji odmian, przy badaniu sprzężeń markerów z cechami użytkowymi oraz do oceny podobieństwa genetycznego (Devos i Gale, 1992; Joshi i Nguyen, 1993; Kato i in., 2000; Kuczyńska i in., 2003; Chen, 2004).

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 7 odmian pszenicy ozimej: Batis, Changer, Elena, Kobra, Kornett, Kris i Mikon. Z każdej odmiany wyprowadzono 10 linii podwojonych haploidów metodą krzyżowania pszenicy z kukurydzą (Wędzony, 2003). Zarówno odmiany wyjściowe pszenicy, jak i linie DH badano na polu doświadczalnym w Cerekwicy stosując standardowe warunki uprawy i nawożenia. Nasiona wysiewano na poletkach o powierzchni 2 m² w rozstawie 10 × 3 cm (około 330 nasion na m²), w układzie bloków losowanych kompletnych w trzech powtórzeniach. Na podstawie 50 losowo wybranych roślin z każdego poletka określano: długość kłosa, liczbę i masę ziarna z kłosa, masę tysiąca ziaren, wysokość roślin oraz plon z poletka. Ocena zróżnicowania linii DH

pochozących z tej samej odmiany pod względem analizowanych cech struktury plonu przeprowadzono stosując wielowymiarowe metody statystyczne (Morrison, 1976). Podstawą tych metod jest ogólny model obserwacji wielocechowych i oparta na nim wielozmienna analiza wariancji MANOVA (Caliński i Kaczmarek, 1973). Jako miarę wielowymiarowego podobieństwa badanych linii DH przyjęto odległości Mahalanobisa.

Analizę polimorfizmu DNA odmian i linii DH przeprowadzono z użyciem markerów RAPD na ośmiu losowo wybranych roślinach. DNA izolowano z 15-dniowych siewek metodą krążkową (Thompson i Henry, 1995) z modyfikacjami. Z każdej rośliny wycinano pięć krążków liściowych o powierzchni 2 mm², a następnie umieszczano w buforze TPS na 15 minut w temperaturze 95°C. Reakcje RAPD-PCR przeprowadzono przy użyciu dziesięcionukleotydowych starterów według następującego schematu: 93°C przez 30 s, 40 cykli: 93°C — 60 s, 36°C — 60 s i 72°C — 90 s, a następnie 90 s w 72°C. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5 mg/L przy napięciu 110 V przez 100 minut. Obecność produktu amplifikacji oznaczono symbolem 1, a jego brak symbolem 0. Wyniki analizowane były przy użyciu programu UVIMAP w funkcji Nei i Li (1979).

WYNIKI I DYSKUSJA

Badanie zróżnicowania fenotypowego wewnątrz odmian prowadzono poprzez porównanie linii DH z odmianą wyjściową. W tabeli 1 zamieszczono średnie wartości cech struktury plonu dla badanych odmian oraz zakres wartości tych cech u wyprowadzonych z każdej odmiany linii DH. Spośród analizowanych cech największe zróżnicowanie stwierdzono w odniesieniu do wysokości roślin oraz masy 1000 ziaren. Porównanie linii DH z odmianą wyjściową pod względem wszystkich cech łącznie (odległości Mahalanobisa), zakres i wartości statystyki F dla różnic między odmianą wyjściową a liniami DH, jak również procent linii DH istotnie różniący się od odmiany wyjściowej przedstawiono w tabeli 2. Jak można zauważyć, istotne różnice między liniami DH a formą wyjściową wystąpiły w przypadku odmian Elena, Kobra Kornett i Kris. Wartości odległości Mahalanobisa oraz statystyki F dla porównań linii DH z ich odmianami wyjściowymi wskazują, że najbardziej zróżnicowane były odmiany Kobra i Elena. W przypadku odmian Changer, Batis i Mikon nie stwierdzono żadnej linii istotnie różniącej się od formy wyjściowej. Wskazuje to, że odmiany te są wyrównane pod względem fenotypowym.

Zróżnicowanie genetyczne badano techniką RAPD. Przy użyciu 20 starterów, wyselekcjonowanych na podstawie wcześniejszych badań (Rębarz i in., 2003) uzyskano 145 produktów amplifikacji, z których 107 (73,8%) było polimorficznych. Średnia liczba produktów amplifikacji uzyskanych przy użyciu jednego startera wynosiła 7,2, a średnia liczba polimorficznych produktów amplifikacji generowanych przez jeden starter — 5,3. Obserwowany stosunkowo wysoki stopień polimorfizmu był wynikiem kierunkowego doboru starterów. Podobną metodykę przyjął Marić i wsp. (2004), co pozwoliło autorom uzyskać 93,2% polimorficznych produktów amplifikacji.

Tabela 1
Średnie wartości badanych cech u odmian pszenicy oraz zakresy wartości cech u wyprowadzonych linii DH*
Mean values of the studied traits for wheat varieties and ranges of means for DH lines derived from the varieties*

Odmiana Variety	Długość kłosa Spike length (cm)	Liczba ziaren z kłosa Grain number per spike	Masa ziarna z kłosa Grain weight per spike (g)	Masa tysiąca ziaren 1000-grain weight (g)	Wysokość roślin Plant height (cm)	Plon ziarna z poletka Grain yield per plot (kg)
Batis	9,5	52,2	2,6	52,1	104,3	2,9
DH	9,4-10,4	50,1-56,3	2,6-3,0	52,1-55,5	99,7-105,7	2,9-3,0
Changer	7,8	54,6	2,5	45,2	70,0	2,6
DH	7,4-8,1	46,7-61,0	2,1-2,7	43,1-46,7	67,3-78,0	2,7-3,1
Elena	9,9	58,6	2,8	50,7	96,7	2,7
DH	8,2-11,0	54,4-64,1	2,5-3,2	45,7-50,7	82,0-94,7	2,3-3,0
Kobra	9,1	66,7	3,7	55,8	85,7	2,5
DH	8,0-9,1	44,1-66,7	2,3-3,7	48,2-60,0	78,0-107,0	2,3-2,8
Kornett	7,7	56,4	2,5	44,9	81,0	2,9
DH	7,3-8,1	52,3-59,9	2,4-2,6	43,3-48,5	77,3-85,3	2,5-3,1
Kris	7,8	48,7	2,2	50,5	77,7	2,8
DH	7,5-8,5	48,4-59,8	2,4-3,0	48,5-51,7	76,7-81,7	2,6-3,0
Mikon	9,6	46,7	2,3	51,1	100,0	2,5
DH	9,1-9,9	42,3-49,1	2,3-2,6	48,5-54,0	92,0-97,7	2,4-2,7

*Analizowano po 10 liniach DH wyprowadzonych z każdej odmiany

*10 DH lines derived from each variety were analyzed

Tabela 2
Współczynniki podobieństwa fenotypowego i genetycznego linii DH wyprowadzonych z odmian pszenicy

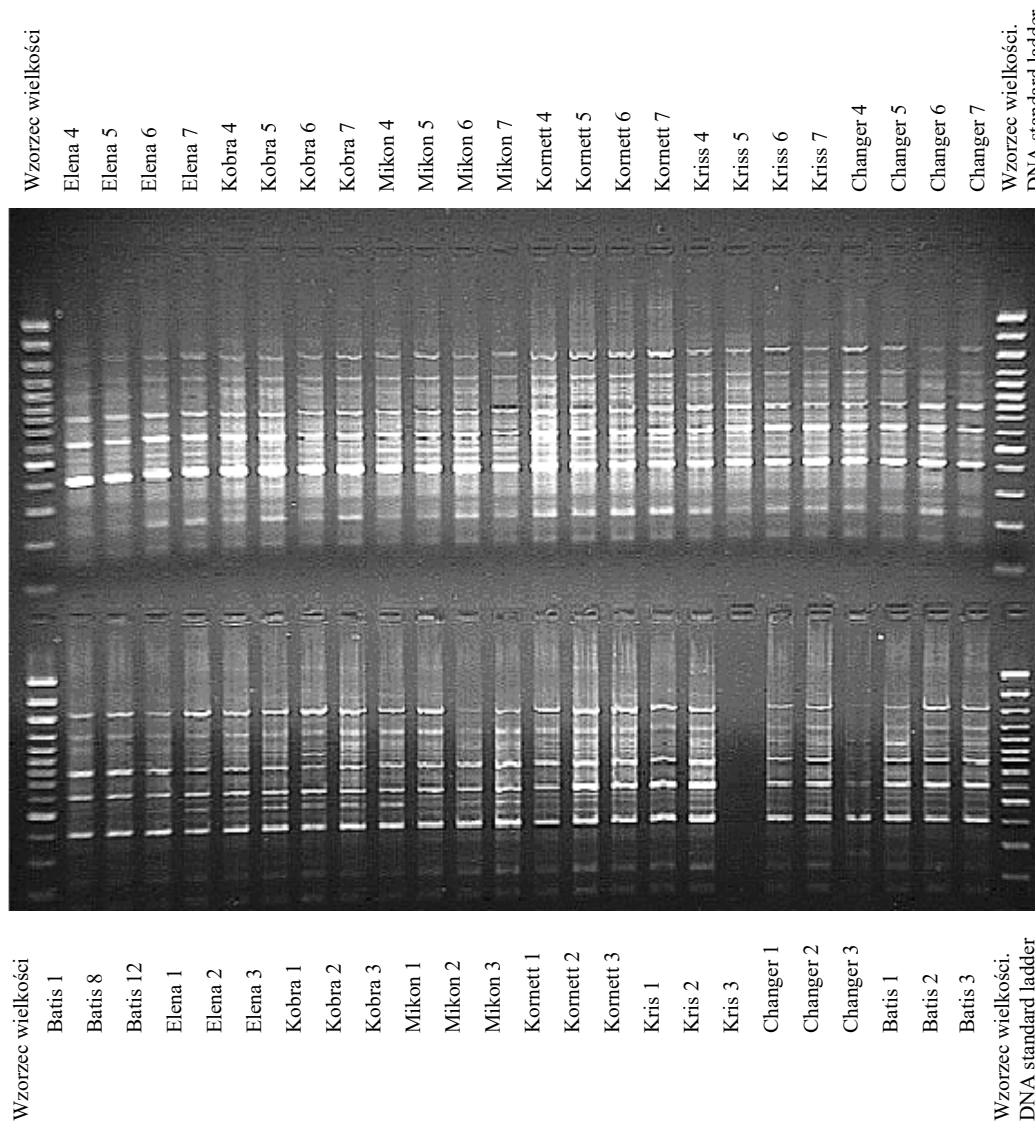
Phenotypic and genetic similarity coefficients of DH lines derived from wheat varieties

Odmiana Variety	Zakres odległości Mahalanobisa między odmianą wyjściową a liniami DH Range of Mahalanobis distance between varieties and DH lines	Zakres wartości statystyki F dla różnic między liniami DH a formą wyjściową Range of F value for differences between varieties and DH lines	Wartość krytyczna statystyki $F_{0,05}$ dla różnic między liniami DH a formą wyjściową Critical $F_{0,05}$ value for differences between varieties and DH lines	% linii DH istotnie różniących się od odmiany wyjściowej % DH lines significantly different from cultivar	Zakres współczynników podobieństwa genetycznego między odmianą wyjściową a liniami DH Range of genetic similarity coefficients between varieties and DH lines
Batis	1,92-4,31	0,21-1,86	4,95	0	0,76-0,91
Changer	0,72-4,02	0,43-1,55	2,79	0	0,80-0,91
Elena	1,77-12,96	0,05-19,34	3,37	43	0,76-0,91
Kobra	4,82-13,00	0,11-18,55	4,95	60	0,77-0,90
Kornett	0,96-4,54	2,64-4,88	2,79	70	0,79-0,92
Kris	1,28-4,58	2,36-4,88	2,79	80	0,81-0,95
Mikon	1,03-5,62	0,42-1,81	3,37	0	0,78-0,92

Na rysunku 1 pokazano przykładowy obraz rozdziału zamplifikowanych fragmentów DNA dla startera 5'-GGTGATCAGG-3'.

Zakres współczynników podobieństwa genetycznego badanych form zamieszczono w tabeli 2. Można zauważyć, że badane rodziny linii DH pochodzące z różnych odmian

odznaczały się podobnym polimorfizmem DNA. Różnice w zakresie wartości współczynników podobieństwa genetycznego między liniami o tym samym pochodzeniu wynosiły od 0,11 do 0,15. Współczynniki podobieństwa genetycznego między liniami tej samej odmiany najmniej zróżnicowane były w przypadku odm. Changer (0,80–0,91), największe natomiast u odmian Batis i Elena (0,76–0,91).



Rys. 1. Wyniki rozdzielu fragmentów RAPD dla badanych odmian pszenicy i ich linii DH dla startera GGTGATCAGG

Fig. 1. Results of RAPD analysis for the studied wheat cultivars with the primer GGTGATCAGG

Z definicji markerów RAPD wynika, iż obserwowana zmienność genetyczna nie musi iść w parze ze zmiennością fenotypową. Stąd też zastosowano w pracy dwa podejścia: badanie zróżnicowania na poziomie fenotypowym i genotypowym. Miarą zróżnicowania linii DH na poziomie molekularnym są obliczone współczynniki podobieństwa genetycznego. Odpowiednikiem tej oceny, przeprowadzonej na podstawie zróżnicowania fenotypowego linii DH z uwzględnieniem wszystkich cech łącznie, są odległości Mahalanobisa. Oszacowanie w pracy obu tych parametrów pozwoliło na porównanie występującej u badanych form zmienności fenotypowej i genetycznej na podstawie oszacowanego dla każdego z tych podejść jednego parametru.

Obserwowany polimorfizm genetyczny u linii DH pochodzących z jednej odmiany, jak i ich zróżnicowanie pod względem badanych cech morfologicznych może wskazywać na wieloliniowość badanych odmian. Stwierdzony w pracy brak istotnego zróżnicowania fenotypowego wewnątrz danej odmiany przy jednocześnie występującym zróżnicowaniu genetycznym (np. odm. Batis) może być wynikiem starannie przeprowadzanej selekcji hodowlanej pod względem wybranej grupy cech.

W hodowli pszenicy jakościowych szczególną uwagę zwraca się na wyrównanie odmian pod względem składu podjednostek gluteninowych. Homozygotyczność większości uprawianych na świecie odmian pod względem tej cechy sprawia, że na podstawie występowania określonych podjednostek gluteninowych w ziarnie dokonuje się identyfikacji odmian. Nie oznacza to jednak, że odmiany te są jednoliniowe. Pewność co pełnej homogenności danej odmiany można mieć tylko w przypadku, gdy została wyprowadzona z jednej linii DH lub daleko zaawansowaną techniką pojedynczego ziarna (SSD — single-seed descent).

WNIOSKI

1. Wszystkie badane odmiany pszenicy ozimej, to jest Batis, Changer, Elena, Kobra, Kornett, Kris i Mikon, są zróżnicowane pod względem genetycznym.
2. Odmianami najbardziej wyrównanymi w odniesieniu do badanych cech agronomicznych były Batis, Changer i Mikon.
3. Brak występowania zróżnicowania wewnątrz-odmianowego pod względem cech struktury plonu może być wynikiem starannie prowadzonej selekcji. Nie oznacza to, iż badana odmiana jest jednoliniowa.

LITERATURA

- Caliński T., Kaczmarek Z. 1973. Metody kompleksowej analizy doświadczenia wielocechowego. Trzecie Colloquium Metodologiczne z Agrobiometrii, PAN i PTB Warszawa 258 — 320.
- Chen X. H., Niu Y. C., Hu B. Z. 2004. Identification of RAPD markers linked to the resistance gene Yr5 against wheat stripe rust with denaturing PAGE-silver staining. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China.
- Devos K. M., Gale M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84:567 — 572.
- Joshi Ch. P., Nguyen H. T. 1993. Application of the random amplified polymorphic DNA techniques for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. *Genome* 36: 602 — 609.

- Kato K., Miura H., Sawada S. 2000. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1114 — 1121.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Masojć P., Surma M., Adamski T. 2003. Zastosowanie markerów RAPD do określania podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). *Biul. IHAR* 226/227: 81 — 85.
- Laurie D. A., Bennett M. D. 1986. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 313 — 316.
- Marić S., Bolarić S., Martinčić J., Pejić I., Kozumplik V. 2004. Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breeding* 123 (4): 366 — 369.
- Morrison D. F. 1976. *Multivariate Statistical Methods*. McGraw-Hill; New York.
- Rębarz M., Kuczyńska A., Krystkowiak K., Bocianowski J., Adamski T., Surma M. 2003. Intra- and intervarietal polymorphism in wheat detected by RAPD primers. In: *Application of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses. PAGEN Series Vol. 1*. Eds.: Zwierzykowski Z., Surma M., Kachlicki P. Institute of Plant Genetics PAN, Poznań: 143 — 149.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction end nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979 October; 76 (10): 5269–5273.
- Thomson D. Henry R. 1995 Single-Step Protocol for Preparation of plant tissue for analysis by PCR *BioTechniques* Vol. 19, No. 3: 394 — 400.
- Wędzony M. 2003. Protocol for doubled haploid production in hexaploid Triticale (*Triticosecale* Wittm.) by crossing it with maize. In: *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Eds: M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, I. Szalejko. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London: 129 — 134.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 (22): 6531 — 6535.