

ZMIENNOŚĆ ALLELICZNA W LOCUS XGWM 261 W POLSKICH
ODMIANACH PSZENICY ZWYCZAJNEJ
ZAREJESTROWANYCH DO 1975 ROKU

Krzysztof Kowalczyk

Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: krzysztof.kowalczyk@ar.lublin.pl

Streszczenie. W pracy za pomocą markerów mikrosatelitowych, analizowano zmienność alleliczną w locus Xgwm 261 w 30 polskich odmianach pszenicy zwyczajnej zarejestrowanych do 1975 roku. Wyizolowane DNA poddano amplifikacji z parą starterów WMS 261. Produkty reakcji PCR rozdzielono na żelu poliakryloamidowym. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że badane odmiany pszenicy zwyczajnej wykazują dużą zmienność alleliczną w locus Xgwm 261. Najczęściej obserwowano fragmenty DNA o wielkości 197 pz, 165 pz i 174 pz. Fragmenty o wielkości 192 pz sprzężone z genem *Rht8* stwierdzono w trzech odmianach: Aria, Grana i Luna.

Słowa kluczowe: pszenica zwyczajna, geny karłowatości *Rht8*, markery molekularne, mikrosatelity

WSTĘP

Jednym z ważnych czynników ograniczających plonowanie pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest wyleganie, dlatego w hodowli zwraca się szczególną uwagę na selekcję form krótko- i sziwnosłomych o wysokim potencjale plonowania. Najskuteczniejszym sposobem wyhodowania odmian odpornych na wyleganie jest wprowadzenie genów karłowatości [6,10,11,26].

W programach hodowlanych pszenicy zwyczajnej na świecie najszerzej wykorzystywane są geny *Rht-B1b* i *Rht-D1b* pochodzące od 'Norin 10' oraz *Rht8* pochodzący od 'Akakomugi' [6,10,25,26]. Gen karłowatości *Rht-B1b* jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 4B, a *Rht-D1b* na krótkim ramieniu chromosomu 4D [2,6]. Geny te powodują redukcję wysokości roślin o około 20% i zwiększenie plonów, głównie poprzez wzrost płodności kłoska [2,6,11,13]. Są one niewrażliwe na egzogeny kwas giberelinowy, co umożliwia identyfikację geno-

typów zawierających te geny [5,6,23]. Gen *Rht8* jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 2D [8, 24]. Redukuje długość źdźbła o ok. 10% i jest szeroko rozpowszechniony wśród pszenic jugosłowiańskich [7,26]. Gen *Rht8* jest wrażliwy na egzogenny kwas giberelinowy i dlatego niemożliwa jest jego identyfikacja za pomocą GA_3 .

Geny *Rht8* można zidentyfikować za pomocą markerów mikrosatelitowych [8]. Mikrosatelity lub proste sekwencje powtórzone (SSRs) stanowią ważne źródło genetycznych markerów dla wielu eukariotycznych genomów [9,17,21,22]. Analiza mikrosatelitów bazuje na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), jest łatwa do wykonania i często wykorzystywana w badaniach molekularnych pszenicy [4,15,16,18,19].

Korzun i in. [8] za pomocą markerów mikrosatelitowych zidentyfikowali geny *Rht8* w odmianach i liniach pszenicy zwyczajnej, i zmapowali go na krótkim ramieniu chromosomu 2D w odległości 0,6 cM od locus Xgwm261. Autorzy opracowali startery WMS261, które po włączeniu do reakcji PCR generowały polimorficzne produkty o wielkości 165 pz, 174 pz i 192 pz. Obecność fragmentów o wielkości 192 pz była powiązana z redukcją wysokości roślin o ok. 7-8 cm. Obecność prążka o wielkości 174 pz nie była powiązana z redukcją wysokości roślin, zaś obecność allelu który w reakcji PCR dawał produkt o wielkości 165 pz była skorelowana ze wzrostem wysokości o ok. 3-4 cm. Worland i in. [27], Ahmad, Sorrells [1], Schmidt i in. [20] oraz Liu i in. [12] podają, że w locus Xgwm 261 występuje szereg prążków o jeszcze innych wielkościach.

Celem pracy było określenie za pomocą markerów mikrosatelitowych, zmienności allelicznej w locus Xgwm 261, w wybranych polskich odmianach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) zarejestrowanych przed rokiem 1975, zgromadzonych w banku genów. Odmiany te mogą być wykorzystywane jako materiał wyjściowy w hodowli pszenicy, dlatego ważna jest ich dokładna charakterystyka, która umożliwiłaby hodowcom, dobór odpowiednich komponentów do krzyżowania.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było 30 odmian pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) otrzymanych z Centrum Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie (tab. 1).

DNA badanych odmian pszenicy izolowano z liści dziesięciodniowych siewek zgodnie z metodą Milligan'a [14]. DNA strącano 1 cz. (400 μ l) izopropanolu z dodatkiem octanu sodu. Uzyskany DNA dwukrotnie przemyto etanolem 75%. Po osuszeniu, osad rozcieńczano w 50 μ l TE. Stężenie DNA określono za pomocą elektroforezy na 1,5% żelu agarozowym przez porównanie z molekularnym wzorcem masy (DNA faga λ strawionym endonukleazą *Hind*III, Fermentas, Litwa). Następnie próbki doprowadzono do jednakowego stężenia DNA 50 ng· μ l⁻¹.

Tabela 1. Zmienność alleliczna w locus Xgwm 261 polskich odmian pszenicy zwyczajnej
Table 1. Allelic variation in Xgwm 261 locus in Polish common wheat cultivars

Odmiana – Cultivar	Długość fragmentów DNA (pary zasad) DNA fragments size (base pairs)				
	192	174	165	197	203
Antonińska Wczesna			+		
Aria	+				
Balta		+			
Biała Kaszubska				+	
Biały Krzyż				+	
Bogatka					+
Bożena		+			
Choryńska			+		
Dana		+			
Dańkowska Graniatka			+		
Grana	+				
Halina					+
Jana		+			
Jasnocha Włoszanowska					+
Komorowska		+			
Konstancja Granum				+	
Konstancja Wierzbieńska				+	
Leszczyńska Wczesna		+			
Litwinka				+	
Luna	+				
Malwa			+		
Niewylegająca				+	
Olza		+			
Płocka					+
Puławska Wczesna					+
Sobieszyńska 44			+		
Stieglera 22			+		
Strzelecka			+		
Wysokolitewska Ołtarzewska				+	
Wysokoliewska Sztynwosłoma				+	

+ oznacza obecność fragmentu DNA – means the presence of a DNA fragment.

Reakcje PCR przeprowadzano na termocyklerze Perkin Elmer, w 20 μ l mieszaniny o następującym składzie: 1 x PCR bufor (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20); 1,5 mM MgCl_2 ; 200 μ M każdego dNTP; 250 nM każdego startera. Zastosowano parę starterów WMS 261 5'-CTCCCTGTACGCCTAAGGC-3' i 5'-CTCGCGCTACTAGCCATTG-3'. Amplifikacja DNA przebiegała w cyklach: wstępna denaturacja 1' w 94°C, 45 cykli: 1'- 94°C, 1'- 55°C, 2'- 72°C z końcową inkubacją 10' w 72°C.

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

Przed barwieniem żele utrwalano w 10% kwasie octowym, płukano w wodzie destylowanej, wysycano w roztworze azotanu srebra z formaldehydem i wywołymano w roztworze węglańu sodu z formaldehydem i tiosiarczanem sodu oraz ponownie utrwalano w 10% kwasie octowym [3]. Po wysuszeniu otrzymane wzory rozdziałów analizowano na podświetlaczu i fotografowano aparatem cyfrowym w systemie BDA Digital (Biometra).

WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród analizowanych 30 polskich odmian pszenicy zwyczajnej produkty PCR o wielkości 192 par zasad (pz) świadczące o obecności genu *Rht8* stwierdzono w 3 odmianach: Aria, Grana i Luna. Fragmenty DNA o wielkości 174 pz stwierdzono w odmianach: Balta, Bożena, Dana, Jana, Komorowska, Leszczyńska Wczesna i Olza, zaś o długości 165 pz w odmianach: Antonińska Wczesna, Choryńska, Dańkowska Graniatka, Malwa, Sobieszyńska 44, Stieglera 22 i Strzelecka. Za pomocą przeprowadzonych analiz SSRs nie stwierdzono markerowych fragmentów DNA locus *Xgwm 261* w odmianach: Biała Kaszubska, Biały Krzyż, Bogatka, Halina, Jasnocha Włoszanowska, Konstancja Granum, Konstancja Wierzbieńska, Litwinka, Niewylegająca, Płocka, Puławska Wczesna, Wysokolitewska Ołtarzewska i Wysokolitewka Sztynnosłoma. W rodowodach odmian: Aria, Grana i Luna występuje francuska odmiana Etoile de Choisy (tab. 2). Jednym z komponentów rodzicielskich Etoile de Choisy była odmiana Arditto. 'Arditto' wyhodowana w Rieti przez Nazereno Strampellego zawiera gen *Rht8* wprowadzony od 'Akakomugi' [6]. Na podstawie analizy rodowodów wynika, że dawcą genów *Rht8* dla odmian Aria, Grana i Luna była Etoile de Choisy.

Worland i in. [27] za pomocą markerów mikrosatelitowych opracowanych przez Korzuna i in. [8], analizowali 800 odmian pszenicy zwyczajnej pochodzących z 20 krajów. Autorzy wykazali, że 90% odmian generowało prążki w reakcji PCR o wielkości 165 pz, 174 pz lub 192 pz. Marker o wielkości 192 pz sprzężony

z genem *Rht8* najczęściej występował w odmianach pochodzących z południowej Europy. Allel o wielkości 165 pz występował w większości odmian wyhodowanych w CIMMYT w Meksyku. Ahmad i Sorrells [1] analizowali zmienność alleliczną w locus Xgwm 261 w 71 odmianach pszenicy zwyczajnej pochodzących z 13 krajów. Autorzy wykazali, że 19 odmian generowało fragmenty o wielkości 165 pz, zaś w 37 odmianach stwierdzili obecność fragmentów o wielkości 174 pz. Tylko cztery odmiany: Pioneer Var 2510 (USA), Chinese Spring i Bai Huo (Chiny) oraz Kanto (Japonia) generowały wyraźne fragmenty o wielkości 192 pz sprzężone z genem *Rht8*. U dwóch odmian amerykańskich Arapahoe i Ernie stwierdzili fragmenty DNA o różnej wielkości. U tych dwóch odmian występowały również fragmenty o wielkości 192 pz, ale były najmniej intensywne. Liu i in. [12] badali 408 chińskich odmian pszenicy zwyczajnej. Po włączeniu do reakcji PCR starterów WMS 261 zidentyfikowali 13 różnych fragmentów DNA w locus Xgwm 261. Allele o wielkości 192 pz sprzężone z genem *Rht8* występowały w wielu chińskich odmianach.

Tabela 2. Rodowody polskich odmian pszenicy zwyczajnej zawierających geny karłowatości *Rht8*
Table 2. Genealogies of Polish common wheat cultivars with *Rht8* dwarfing genes

Odmiana – Cultivar	Rodowody – Pedigree
Aria	Etoile de Choisy/Wysokolitewska Szywnosłoma// Dańkowska Biała
Grana	Etoile de Choisy/Wysokolitewska Szywnosłoma// Dańkowska Biała
Luna	Etoile de Choisy/Wysokolitewska Szywnosłoma

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych analiz SSRs wykazano, że polskie odmiany pszenicy zwyczajnej zarejestrowane przed rokiem 1975 wykazują dużą zmienność alleliczną w locus Xgwm 261.

2. W analizowanych odmianach w locus Xgwm 261 stwierdzono obecność fragmentów DNA o wielkości 165 pz, 174 pz, 192 pz, 197 pz i 203 pz.

3. Fragmenty o wielkości 192 pz sprzężone z genem *Rht8* stwierdzono w trzech odmianach: Aria, Grana i Luna.

PIŚMIENNICTWO

1. **Ahmad M., Sorrells M.E.:** Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing gene in wheat. *Euphytica*, 123, 235-240, 2002.
2. **Börner A., Worland A. J., Plaschke J., Schumann E., Law C. N.:** 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, 1993.

3. **Chalhoub B. A., Thibault S., Laucou V., Rameau C., Höfte H., Cousin R.:** Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Bio-techniques*, 22, 216-220, 1997.
4. **Ellis M.H., Rebetzke G.J., Azaña F., Richards R.A., Spielmayr W.:** Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 111, 423-430, 2005.
5. **Gale M. D., Gregory R. S.:** A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica*, 26, 733-738, 1977.
6. **Gale M. D., Youssefian S.:** Dwarfing genes in wheat. In: *Progress in Plant Breeding. I'* Ed. G. E. Russell, Butterworths, London, 1-35, 1985.
7. **Jost M., Jost M.:** Pedigrees of 142 Yugoslav winter wheat cultivars released from 1967 till 1986. *Podravka*, (7) 1, 19-27, 1989.
8. **Korzun V., Röder M., Ganal M. W., Worland A. J., Law C. N.:** 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, 1998.
9. **Korzun V., Röder M., Worland A. J., Börner A.:** Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breed.*, 116, 227-232, 1997.
10. **Kowalczyk K.:** Historia i wykorzystanie w hodowli pszenicy genów karłowatości pochodzących od Norin 10. *Post. Nauk Rol.*, 1/97, 63-71, 1997.
11. **Kowalczyk K., Worland A. J., Miazga D.:** Pleiotropic effects of *Rht1*, *Rht2*, and *Rht3* genes in wheat isogenic lines Maris Huntsman and Maris Widgeon. *J. Genet. & Breed.*, 51, 129-135, 1997.
12. **Liu Y., Liu D., Zhang H., Wang J., Sun J., Guo X.:** Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the XGWM261 locus in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 145, 103-122, 2005.
13. **Miazga D., Worland A. J., Kowalczyk K.:** Pleiotropic effects of dwarfing (*Rht*) genes in near-isogenic lines of common wheat cv. Bezostaya in a Central European environment. *Acta Agron. Hun.*, 45(4), 419-426, 1997.
14. **Milligan, B.G.:** Plant DNA isolation. In: *Molecular analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK. 59-88, 1992.
15. **Peng J. H., Fahima T., Röder M. S., Li Y. C., Dahan A., Grama A., Ronin Y. I., Korol A. B., Nevo E.:** Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1B. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 862-872, 1999.
16. **Pestsova E., Ganal M. W., Röder M. S.:** Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 43, 689-697, 2000.
17. **Pestsova E., Röder M.:** Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 84-91, 2002.
18. **Plaschke J., Ganal M. W., Röder M. S.:** Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1001-1007, 1995.
19. **Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W.:** A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023, 1998.
20. **Schmidt A.L., Gale K.R., Ellis M.H., Giffard P.M.:** Sequence variation at a microsatellite locus (XGWM261) in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties. *Euphytica* 135, 239-246, 2004.
21. **Varshney R. K., Prasad M., Roy J. K., Kumar N., Harjit-Singh, Dhaliwal H. S., Balyan H. S., Gupta P. K.:** Identification of eight chromosomes and a microsatellite marker on 1AS associated with QTL for grain weight in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1290-1294, 2000.

22. **Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D.:** Survey of plant short tandem DANN repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 1-6, 1994.
23. **Worland A. J.:** Co-operative studies on the genetics of height in European wheat varieties. *EWAC Newsletter, Hungary*, 69-82, 1987.
24. **Worland A. J., Law C. N.:** Genetic Analysis of Chromosome 2D of Wheat. I. The Location of Genes Affecting Height, Day-Length Insensitivity, Hybrid Dwarfism and Yellow-Rust Resistance. *Z. Pflanzzüchtg.*, 96, 331-345, 1986.
25. **Worland A. J., Law C. N., Petrović S.:** Pleiotropic effect of the chromosome 2D genes *Ppd1*, *Rht8* and *Yr16*. *Procc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Cambridge, 669-674, 1988.
26. **Worland A. J., Law C. N., Petrović S.:** Height reducing genes and their importance to Yugoslavian winter wheat varieties. *Zbornik*, 38, 245-257, 1990.
27. **Worland A.J., Sayers E.J., Korzun V.:** Allelic variation at the dwarfing gene *Rht8* locus and its significance in international breeding programmes. *Euphytica*, 119, 155-159, 2001.

ALLELIC VARIATION IN XGWM 261 LOCUS IN POLISH COMMON WHEAT CULTIVARS REGISTERED TILL THE YEAR 1975

Krzysztof Kowalczyk

Institute of Genetics and Plant Breeding, Agricultural University
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: krzysztof.kowalczyk@ar.lublin.pl

Abstract. Allelic variation in Xgwm 261 locus was studied in 30 Polish old cultivars, using SSRs methods. DNA was amplified after extraction with two WMS 261 primers. DNA fragments from PCR were separated on polyacrylamide gel. Investigated common wheat cultivars showed allelic variation in Xgwm 261 locus on the basis of microsatellite analysis. The highest alleles frequency was observed for a 197 bp fragment and for 165 bp and 174 bp fragments. The 192 bp fragment size linked with *Rht8* dwarfing gene was observed in three cultivars: Aria, Grana and Luna

Key words: common wheat, *Rht8* dwarfing gene, molecular markers, microsatellites