

ZASTOSOWANIE METODY PstI-AFLP DO OCENY MIESZAŃCÓW *Aegilops* × *Triticum*

Mirosław Tyrka, Grażyna Stefanowska

Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza w Lublinie

Wstęp

Gatunki *Aegilops* stanowią źródło wartościowych cech dla pszenicy zwyczajnej dlatego są przedmiotem zainteresowania genetyków i hodowców. Spektakularnymi przykładami transferu genów z *A. ventricosa* TAUSCH. są linia VPM1 [MAIA 1967] z genami *Yr17*, *Lr37* i *Sr38* [BARIANA, MCINTOSH 1994] przenosząca ponadto odporność na fاملiwość podstawy źdźbła oraz linia H-93-70 z innym genem warunkującym odporność na tę chorobę (*Pch-1*) [DOUSSINAULT i in. 1983]. Linie te wykorzystano jako źródło odporności w odmianach pszenicy 'Roazon', 'Cappelle-Desprez' oraz 'Rendezvous'. Gatunki *Aegilops* mogą być również dawcami genów warunkujących wysoką zawartość białka [COX i in. 1995], tolerancję na zakwaszenie gleby [STEFANOWSKA, MASŁOWSKI 1994], tolerancję na suszę, mróz [SUTKA 1994], oraz wczesne dojrzewanie i plonowanie [KNOTT 1987].

Mieszzańce pszenicy z gatunkami z rodzaju *Aegilops* sp. były charakteryzowane fenotypowo [DOSBA, CAUDERON 1972], pod względem białek zapasowych [DOSBA, AUTRAN 1983] oraz przy zastosowaniu markerów biochemicznych [DOSBA i in. 1983; MENA i in. 1989] i molekularnych RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) [MENA i in. 1993]. Istnieje wiele typów markerów DNA bazujących na reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction) wykorzystywanych u pszenicy [GUPTA i in. 1999] stanowiących narzędzie umożliwiające ocenę zmienności między- i wewnątrzgatunkowej.

Celem przeprowadzonych badań było potwierdzenie mieszańcowego charakteru rodów uzyskanych w następstwie krzyżowań pszenic twardej i zwyczajnej z gatunkami *Aegilops ventricosa* TAUSCH. i *A. juvenalis* THELL. EIG. selekcjonowanych pod względem cech plonotwórczych. Przeprowadzone analizy pozwoliły również na ocenę wydajności zastosowanej metody do potwierdzania mieszańcości.

Materiał i metody

Materiał badawczy obejmował 25 obiektów: 8 rodów mieszańcowych z *A. ventricosa*, 9 rodów uzyskanych w wyniku krzyżowania z *A. juvenalis* oraz 8 form rodzicielskich (tab. 1). W analizowanych materiałach hodowlanych znajdujących się na końcowym etapie selekcji wyparto niekorzystne cechy wprowadzane przez *Aegilops* [STEFANOWSKA 1995]. Wykorzystany materiał jest zróżnicowany pod względem cech plonotwórczych [TYRKA, STEFANOWSKA 2001].

Tabela 1; Table 1

Rody pszenicy oraz formy rodzicielskie wykorzystane w badaniach
Strains of wheat and parental forms used in study

Odmiana/ród; Cultivar/strain	Pochodzenie; Progeny
<i>T. aestivum</i> L. VGL	F ₉ * <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/Lanca
<i>T. aestivum</i> L. VGLL	F ₈ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/2* <i>Lanca</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPP	F ₈ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/2* <i>Panda</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPPP	F ₇ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/3* <i>Panda</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPB	F ₈ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/ <i>Panda</i> /3/ <i>Begra</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPPB	F ₇ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/ <i>Panda</i> /3/ <i>Begra</i> /4/ <i>Panda</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPA	F ₈ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/ <i>Panda</i> /3/ <i>Arda</i>
<i>T. aestivum</i> L. VGPAA	F ₇ <i>A. ventricosa</i> /Grandur/2/ <i>Panda</i> /3/2* <i>Arda</i>
<i>T. aestivum</i> L. JCP	F ₈ <i>A. juvenalis</i> /CZR1406/2/ <i>Panda</i>
<i>T. aestivum</i> L. JPCP	F ₇ <i>A. juvenalis</i> /CZR1406/2/ <i>Panda</i> /3/CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. JCCP	F ₆ <i>A. juvenalis</i> /2*CZR1406/3/ <i>Panda</i> /3/CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. JCCPC	F ₇ <i>A. juvenalis</i> /2*CZR1406/3/ <i>Panda</i> /4/CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. JCB	F ₈ <i>A. juvenalis</i> /CZR1406/2/ <i>Begra</i>
<i>T. aestivum</i> L. JCBB	F ₇ <i>A. juvenalis</i> /CZR1406/2/2* <i>Begra</i>
<i>T. aestivum</i> L. JCBC	F ₇ <i>A. juvenalis</i> /CZR1406/2/ <i>Begra</i> /3/CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. JCCB	F ₉ <i>A. juvenalis</i> /2*CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. JCCC	F ₇ <i>A. juvenalis</i> /3*CZR1406
<i>T. aestivum</i> L. 'Lanca'	Nadzieja/Pluto
<i>T. aestivum</i> L. 'Panda'	Dana/Flevina
<i>T. aestivum</i> L. 'Begra'	Grana/Bezostaja
<i>T. aestivum</i> L. 'Arda'	CJ 12633/Capelle-Desprez/2/C474/73
<i>T. aestivum</i> L. CZR 1406	Lanca/ <i>S. cereale</i> L506/2/Lanca
<i>A. juvenalis</i> THELL. EIG.	
<i>A. ventricosa</i> TAUSCH.	
<i>T. durum</i> DESF. 'Grandur'	Adur/mutacja Capelli

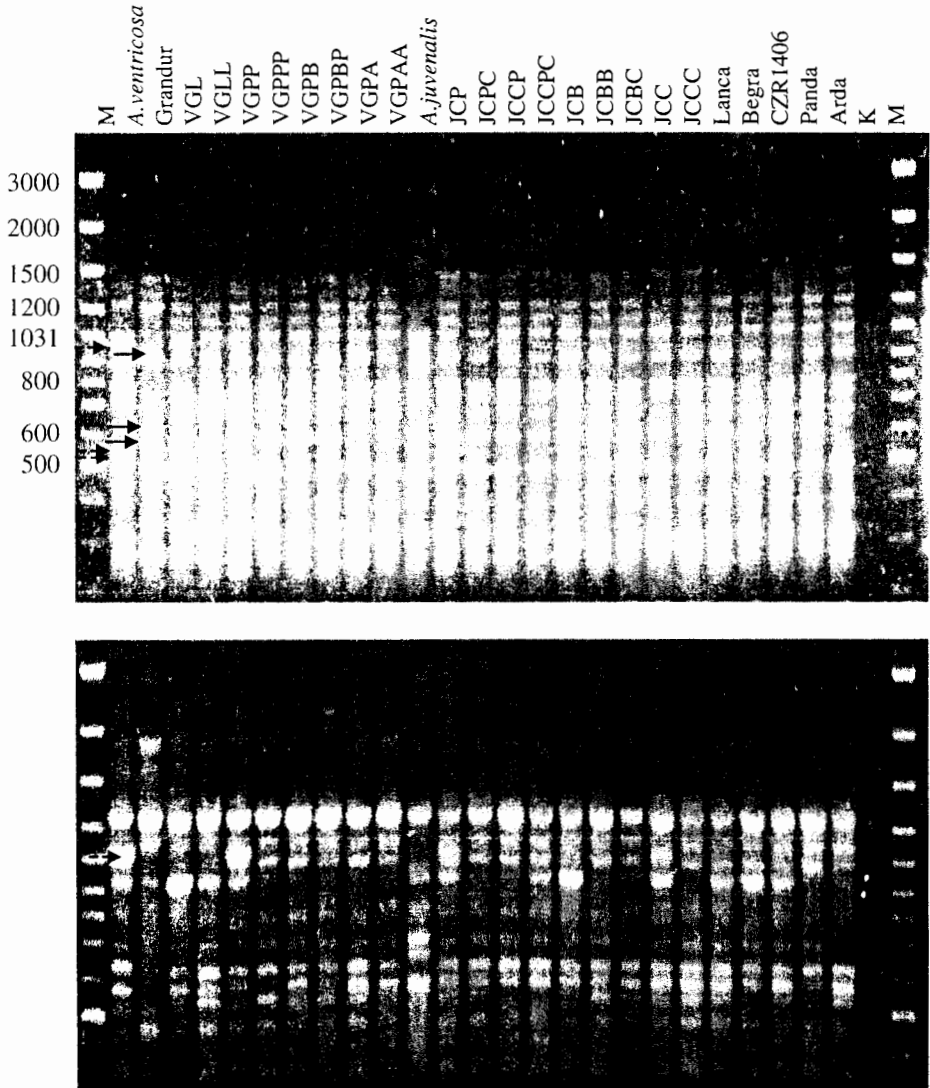
* Pokolenie od momentu ostatniego krzyżowania; Generation since last cross

Ekstrakcję DNA wykonano na próbce łączonej z 10 podkiełkowanych 2-tygodniowych siewek dla każdej formy zgodnie z MILLIGAN [1992]. Oznaczenia PstI-AFLP wykonano zgodnie z TYRKA [2002] poddając trawieniu, ligacji i doczyszczaniu preparaty DNA o stężeniu 350 ng. Analizy wykonano z dziesięcioma starterami selekcyjnymi. Zdjęcia żeli skanowano i analizowano programem Scion Image Beta 2.

Wyniki

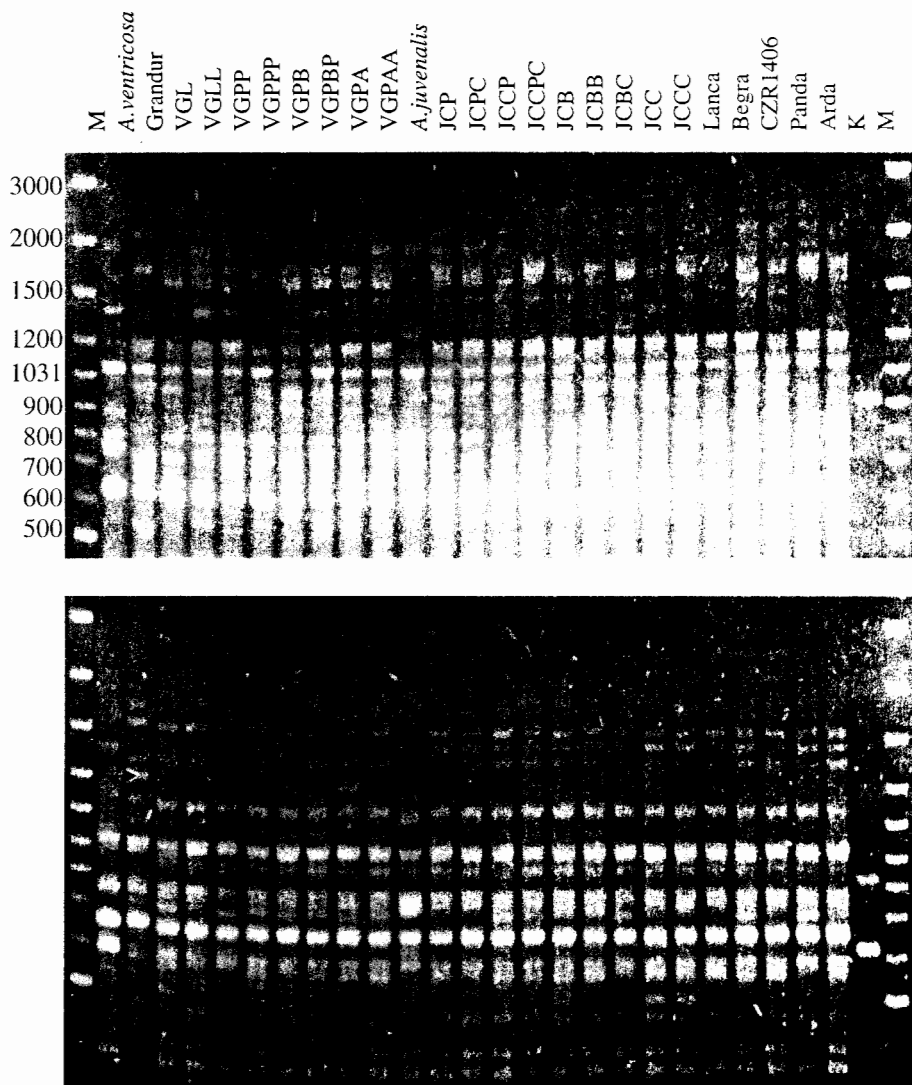
Testowane startery selekcyjne różniły się pod względem wydajności w wykrywaniu polimorfizmu (tab. 2). W analizowanym zestawie genotypów jeden starter dawał średnio 12,6 polimorficznych prążków, z czego 36,5% przypadało na dwa gatunki *Aegilops*, w tym 22 markery były specyficzne dla *A. ventricosa*, 18 dla *A. juvenalis* a 6 markerów generowanych ze starterami P35, P42, P44 i P48 było wspólnych tylko dla tych gatunków i mogą być przypuszczalnie markerami specyficznymi rodzajowo (do genomu M). Liczba polimorfizmów w obrębie rodzaju *Triticum* była niższa: 80 prążków z czego 2 markery były specyficzne dla odmiany 'Grandur'. Dodatkowo należy uwzględnić markery potwierdzające transfer DNA z gatunków *Aegilops* i pszenicy twardej. Przeprowadzone analizy dowodzą wprowadzenia materiału genetycznego z *A. ventricosa* do kombinacji VGL (P43-950), VGLL (P63-1390), VGPP (P43-540; P44-1030; P63-1390), VGPA (P43-525) i VGPPB

(P63-1390) natomiast z *T.durum* 'Grandur' do kombinacji: VGL (P43-610; P43-560), VGPA (P43-895, P43-610, P65-1180), VGPP, VGPA (P43-610) i VGPPP (P43-560), (rys. 1, 2). Daje to dodatkowo 9 markerów specyficznych dla rodziców zarazem świadczących o określonym przepływie materiału genetycznego. Przeprowadzone badania dowodzą dużej przydatności i wydajności uproszczonej metody AFLP do potwierdzania obecności materiału genetycznego *Aegilops* w tle pszenicy.



Rys. 1. Rozdział produktów PstI-AFLP ze starterami P43 i P44. Oznaczenia: przerywane strzałki wskazują przykłady transferu DNA z *A. ventricosa*, strzałki ciągłe – transferu z *T. durum* 'Grandur', K – kontrola negatywna bez DNA, M – marker wielkości

Fig. 1. Resolution of PstI-AFLP products obtained with the P43 and P44 primers
Description: broken arrows show the examples of DNA transfer from *A. ventricosa*, continuous arrows – transfer from *T. durum* 'Grandur', K – negative control without DNA, M – size marker



Rys. 2. Rozdział produktów PstI-AFLP ze starterami P63 i P65. Oznaczenia jak przy rys. 1

Fig. 2. Resolution of PstI-AFLP products obtained with the P63 and P65 primers. Description see Fig. 1

Dyskusja

Istnieje wiele przykładów świadczących o przydatności metody RAPD do potwierdzania wprowadzenia chromosomów lub ich segmentów z innych gatunków do pszenicy zwyczajnej [FRANCIS i in. 1995; IQBAL, RAYBURN 1995; KING i in.

1993; Qi i in. 1996]. W badaniach nad wcześniejszymi pokoleniami analizowanych rodów mieszańcowych stosując metodę RAPD potwierdzono obecność DNA *A. ventricosa* w kombinacjach VGPB i VGPA [TYRKA i in. 2001] oraz *A. juvenalis* w kombinacjach JCCC i JCPC. Analizy PstI-AFLP potwierdziły transfer DNA jedynie do rodów uzyskanych w następstwie krzyżowań z *A. ventricosa*. Nie stwierdzono natomiast obecności żadnego prążka charakterystycznego dla *A. juvenalis* w rodach uzyskanych w następstwie krzyżowań z tym gatunkiem.

Tabela 2; Table 2

Charakterystyka starterów i uzyskanego polimorfizmu
Description of the primers and polymorphism obtained

Symbol startera Primer symbol	nukleotydy selektywne 5'3' selective nucleotides	Liczba fragmentów Number of bands			Markery świadczące o transferze DNA DNA transfer confirming markers
		specyficznych specific	monomorficznych monomorphic	polimorficznych polymorphic	
P33	AAG	8	4	16	0
P34	AAT	5	0	11	0
P35	ACA	6	2	14	0
P42	AGT	4	2	12	0
P43	ATA	4	0	20	6
P44	ATC	3	1	11	1
P45	ATG	2	3	12	0
P48	CAC	6	1	14	0
P63	GAA	4	2	11	1
P65	GAG	1	2	5	1
Razem; Total		43	17	126	9

Różnice w wydajności transferu materiału genetycznego z obu gatunków *Aegilops* mogą wynikać z różnic w ich budowie genomowej. W badaniach własnych do uzyskania mieszańców nie wykorzystano mutantów locus Ph1, dlatego prawdopodobnie transfer genów miał miejsce głównie pomiędzy chromosomami należącymi do genomu D. Biorąc pod uwagę, że genom D u *A. juvenalis* (DDMMUU) jest znacznie zmodyfikowany [ZHAO, KIMBER 1984] należało oczekiwać większej skuteczności transferu w przypadku kombinacji z gatunkiem *A. ventricosa* (D^vD^vM^vM^v). Uzyskane wyniki świadczą o dużej skuteczności zastosowanego jako pomost gatunku *T. durum*.

Wnioski

1. Przeprowadzone analizy potwierdziły obecność materiału genetycznego *A. ventricosa* lub *T. durum* w siedmiu rodach (VGL, VGLL, VGPP, VGPA, VGPBP, VGPA i VGPPP).
2. Nie stwierdzono obecności żadnego z 18 markerów specyficznych dla *A. juvenalis* w rodach otrzymanych z udziałem tego gatunku.

Literatura

- BARIANA H.S., MCINTOSH R.A. 1994. *Characterization and origin of rust and powdery mildew resistance genes in VPM1 wheat*. Euphytica 76: 53–61.
- COX T. S., SEARS R. S., BEQUETTE R. K. 1995. *Use of winter wheat x Triticum tauschii backcross populations for germplasm evaluation*. Theor. Appl. Genet. 90: 571–577.
- DOSBA, F., AUTRAN J-C. 1983. *Les lignées d'addition blé – Aegilops ventricosa*. IV – *Caractérisation des lignées et de leurs progéniteurs au moyen des électrophorogrammes des gliadines*. Agronomie 3(6): 555–567.
- DOSBA, F., CAUDERON Y. 1972. *A new interspecific hybrid: Triticum aestivum ssp. vulgare x Aegilops ventricosa*. Wheat Inform Service 35: 22–24.
- DOSBA, F., JOUDRIER P., KOBREHEL K. 1983. *Les lignées d'addition blé-Aegilops ventricosa*. V – *Caractérisation des lignées et de leurs progéniteurs au moyen des électrophorogrammes des β amylases et des peroxydases*. Agronomie 3(6): 569–576.
- DOUSSINAULT G., DELIBES A., SANCHEZ-MONGE R., GARCIA-OLMEDO F. 1983. *Transfer of dominant gene for resistance to eyespot disease from a wild grass to hexaploid wheat*. Nature 303: 698–700.
- FRANCIS A., LEITCH A.R., KOEBNER R.M.D. 1995. *Conversion of RAPD-generated PCR product, containing novel dispersed repetitive element, into a fast and robust assay for the presence of rye chromatin in wheat*. Theor. Appl. Genet. 90: 636–642.
- GUPTA P.K., VARSHNEY R.K., SHARMA P.C., RAMESH B. 1999. *Molecular markers and their applications in wheat breeding*. Plant Breed. 118: 369–390.
- IQBAL M.J., RAYBURN A.L. 1995. *Identification of the IRS rye chromosome segment in wheat by RAPD analysis*. Theor. Appl. Genet. 91: 1048–1053.
- KING I.P., PURDIE K.A., REZANOOR H.N., KOEBNER R.M.D., MILLER T.E., READER S.M., NICHOLSON P. 1993. *Characterization of Thinopyrum bessarabicum chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and genomic in situ hybridization*. Theor. Appl. Genet. 86: 895–900.
- KNOTT D.R. 1987. *Transferring alien genes to wheat*, in: *Wheat and wheat improvement (second edition)*. E.G. Heyne (Ed.): 462–471.
- MAIA N. 1967. *Obtention de Bles tendres résistants au Pietin verse (Cercospora herpotrichoides) par croisements interspécifiques*. C.R. Acad. Agric. France 53(1): 149–154.
- MENA M., ORELLANA J., LOPEZ-BRANA I., GARCIA-OLMEDO F., DELIBES A. 1993. *Characterization of wheat/Aegilops ventricosa introgression and addition lines with respect to M(V) genome*. Theor. Appl. Genet. 86: 197–204.
- MENA M., ORELLANA J., LOPEZ-BRANA M., GARCIA-OLMEDO F., DELIBES A. 1989. *Biochemical and cytological characterization of wheat/Aegilops ventricosa addition and transfer lines carrying chromosome 4M⁵*. Theor. Appl. Genet. 77: 184–188.
- MILLIGAN B.G. 1992. *Plant DNA isolation*, in: *Molecular analysis of populations: a practical approach*. IRL Press, Oxford, UK: 59–88.
- QI L., CAO M., CHEN P., LI W., LIU D. 1996. *Identification, mapping, and application of polymorphic DNA associated with resistance gene Pm21 of wheat*. Genome 39: 191–197.
- STEFANOWSKA G. 1995. *Charakterystyka niektórych cech morfologicznych i plonotwórc*

czych mieszańców *Triticum aestivum* L. i *Triticum durum* Desf. z *Aegilops ventricosa* Tausch. i *Aegilops juvenalis* (Thell.) Eig. Biul. IHAR 194: 35–43.

STEFANOWSKA G., MASŁOWSKI J. 1994. Species from *Aegilops* genera as the source of tolerance for high aluminium ions concentration. Genet. Pol. 35B: 263–267.

SUTKA J. 1994. Genetic control of frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica 77: 277–282

TYRKA M. 2002. The use of simplified AFLP method for fingerprinting of common wheat cultivars. J. Appl. Genet. 43(2): 131–143.

TYRKA M., G. STEFANOWSKA, W. BRZEZIŃSKI. 2001. Transfer genów z *Aegilops ventricosa* do *Triticum aestivum*. Biotechnologia 2(53): 57–62.

TYRKA M., STEFANOWSKA G. 2001. Ocena zróżnicowania cech plonotwórczych mieszańców *Aegilops juvenalis* i *Aegilops ventricosa* z pszenicą. Biul. IHAR 218/219: 57–68.

ZHAO Y.H., KIMBER G. 1984. New hybrids with D genome wheat relatives. Genetics 106: 509–515.

Słowa kluczowe: *Aegilops ventricosa* TAUSCH., *Aegilops juvenalis* THELL. EIG., AFLP, *Triticum aestivum* L., transfer

Streszczenie

17 rodów mieszańcowych pszenicy uzyskanych w wyniku krzyżowania *A. ventricosa* i *A. juvenalis* z różnymi odmianami pszenicy zwyczajnej i odmianą pszenicy twardej oraz formy rodzicielskie analizowano przy wykorzystaniu uproszczonej metody AFLP. Celem badań była ocena zmienności genetycznej i wykazanie transferu materiału genetycznego z gatunków *Aegilops* oraz *T. durum* do uzyskanego potomstwa.

Uzyskano ogółem 143 prątki, spośród których 17 było monomorficznych a 43 były specyficzne genotypowo. Przeprowadzone analizy potwierdzają transfer DNA z *Aegilops ventricosa* i *T. durum* do rodów VGL, VGPP i VGPA i z *A. ventricosa* do kombinacji VGLL oraz VGPBP. Średnie wartości podobieństwa Dice'a w obrębie mieszańców z *A. ventricosa* i *A. juvenalis* wynosiły 0,919 i 0,925, odpowiednio. Podobieństwo w grupie odmian pszenicy zwyczajnej było wyższe (0,932). Wyniki świadczą o dużej wydajności zastosowanej metody do wykrywania DNA pochodzącego z innych gatunków w rodach pszenicy zwyczajnej.

APPLICATION OF PstI-AFLP METHOD TO EVALUATING OF *Aegilops* × *Triticum* HYBRID STRAINS

Mirosław Tyrka, Grażyna Stefanowska

Institute of Genetics and Plant Breeding, Agricultural University, Lublin

Key words: *Aegilops ventricosa* TAUSCH., *Aegilops juvenalis* THELL. EIG., AFLP, *Triticum aestivum* L., transfer

Summary

17 hybrid strains obtained as a result of crosses of *Aegilops ventricosa* and *Aegilops juvenalis* with some cultivars of common and durum wheats along with parental forms were analyzed by simplified AFLP method. The purpose of this study was to assess the level of genetic diversity and to verify the presence of *Aegilops* and *T. durum* DNA in resultant progeny.

We obtained totally 143 bands, out of them 17 were monomorphic, and 43 were genotype-specific. Analyses confirmed the DNA transfer from *A. ventricosa* and *T. durum* to VGL, VGPP, and VGPA strains and from *A. ventricosa* to VGLL and VGPPB. Average Dice similarity indices for materials derived from crosses with *A. ventricosa* and *A. juvenalis* were 0.919 and 0.925, respectively. Affinity within common wheat cultivars studied was higher (0.932). Results proved high efficiency of the method employed to detection of alien DNA introgression into wheat.

Dr Mirosław **Tyrka**
Instytut Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza
ul. Akademicka 15
20-934 LUBLIN
e-mail: mtyrka@hortus.ar.lublin.pl