

Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie
e-mail: u.piechota@ihar.edu.pl

URSZULA PIECHOTA, ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA,
KINGA SMOLIŃSKA, JERZY HENRYK CZEMBOR

**Nowoczesne technologie genotypowania wykorzystywane
do analizy zmienności w obrębie kolekcji zgromadzonych
w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych
w Radzikowie (IHAR – PIB)**

Modern genotyping technologies used to analyze the variability of collections
at the Polish National Center for Plant Genetic Resources at Radzikow
(PBAI – NRI)

Streszczenie. Celem nadrzędnym Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG) w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym (IHAR – PIB) jest ochrona bioróżnorodności. W przechowalni długoterminowej zdeponowanych jest ponad 83 000 akcesji pozyskanych w trakcie ekspedycji krajowych i zagranicznych oraz na drodze wymian. Ich właściwe opisanie jest ważne ze względów konserwatorskich i hodowlanych. Prowadzone są badania molekularne umożliwiające określenie przynależności gatunkowej, zróżnicowania międzypopulacyjnego oraz podłoża genetycznego cech ważnych gospodarczo. Prace prowadzone są z wykorzystaniem różnych metod, m.in. tych najnowszych, opartych na sekwencjonowaniu (NGS). Przykładami obiektów włączonych do badań molekularnych są: rodzaj owies (określenie przynależności gatunkowej w obrębie kolekcji 2500 obiektów), kolekcja 4000 odmian miejscowych jęczmienia pochodzących z całego świata (określenie uwarunkowań genetycznych cech gospodarczych), kolekcja dzikich gatunków pszenic oraz im pokrewnych (źródło odporności na choroby).

Słowa kluczowe: bank genów, bioróżnorodność, genotypowanie, markery molekularne

WSTĘP

Nadrzędnym celem analiz molekularnych w Banku Genów jest wspomaganie zadań konserwatorskich i hodowlanych. W Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badaw-

czym w Radzikowie stosowane jest szerokie spektrum metod genotypowania z wykorzystaniem klasycznych markerów molekularnych oraz nowoczesnych technik opartych na sekwencjonowaniu.

Genotypowanie to opisywanie determinant genotypu poprzez analizę materiału genetycznego. W procesie wykorzystuje się techniki oparte na markerach molekularnych. Wśród metod można wyróżnić klasyczne markery molekularne oparte na reakcji amplifikacji DNA i obserwowaniu długości uzyskanych produktów. Nowoczesne techniki natomiast wykorzystują sekwencjonowanie DNA i opierają się na zmienności w sekwencji nukleotydowej.

Klasyczne markery DNA znane są od lat 80. ubiegłego wieku. Pojawiły się wraz z rozwojem technik biologii molekularnej. Podstawą ich działania jest reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR). Analiza wariantów markera opiera się na porównaniu długości otrzymanych fragmentów DNA. Wynik uzyskuje się poprzez rozdział elektroforetyczny produktów PCR [Pachota i in. 2016]. Rozwój i dostępność nowoczesnych metod sekwencjonowania zaowocowały powszechnym wykorzystaniem genotypowania opartego na zmienności sekwencji nukleotydowych. Wysokoprzepustowe techniki pozwalają na identyfikację dziesiątków tysięcy zmienności nukleotydowych na podstawie wyników sekwencjonowania *de novo* lub resekwencjonowania [Pachota i in. 2016]. Główną miarą relatywnej informatywności markera jest parametr PIC (ang. *polymorphic information content*). Współczynnik ten, liczony wg algorytmu Roldan-Ruiz [Roldan-Ruiz i in. 2000], zależy od liczby alleli markera oraz częstości ich występowania w populacji.

Markery molekularne wykorzystywane są do mapowania genomu, potwierdzenia obecności pożądanego allelu w materiale roślinnym, identyfikacji taksonomicznej oraz opisywania różnorodności wewnątrzgatunkowej. Znajdują także zastosowanie jako markery użytkowe wspomagające selekcję hodowlaną [Poczai i in. 2013]. We współczesnej hodowli roślin markery molekularne stanowią bardzo praktyczne i czasami jedyne dostępne narzędzie diagnostyczne, które może być wykorzystywane podczas selekcji materiałów wyjściowych (ang. *marker assisted selection*, MAS). W porównaniu z metodami konwencjonalnymi selekcja genu(ów) z wykorzystaniem markerów molekularnych jest szybsza. Dzięki niej znacząco skraca się czas uzyskania pożądanego genotypu. Ma to szczególne znaczenie w pracach hodowlanych, w których stosuje się krzyżowania wypierające (wsteczne) i piramidowanie genów [Ribaut i Hoisington 1998, Pietrusińska i Czembor 2007].

W dostępnej literaturze brak jest pozycji opisujących w sposób kompleksowy metody genotypowania przydatne w bankach genów. Celem niniejszej pracy jest przybliżenie spektrum technik molekularnych wykorzystywanych do realizacji zadań Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR PIB w Radzikowie.

MARKERY SSR

Krótkie powtórzenia mikrosatelitarne (ang. *simple sequence repeat*, SSR) to sekwencje zawierające ciąg dwu- do sześcionukleotydowych sekwencji powtórzonych tandemowo od kilku do nawet 40 razy. Występują powszechnie w DNA jądrowym, chloroplastowym i mitochondrialnym. Zmienność liczby powtórzeń przekłada się na różne długości produktów PCR. Stosuje się unikatowe startery znakowane fluorescencyjnie lub

reakcję prowadzi się w obecności trzech starterów, z wykorzystaniem uniwersalnego znakowanego startera M13 [Onyśk i Boczkowska 2017]. Rozdział produktów przeprowadza się w warunkach denaturującej wysokorozdzielczej elektroforezy płytowej lub kapilarnej w żelach poliakrylamidowych. Wysoka rozdzielczość i czułość tej techniki pozwala obserwować kilkunukleotydowe różnice w długości fragmentów DNA. Zaletą markerów SSR jest powszechność występowania, bardzo duża zmienność i kodominujący charakter [Powell i in. 1996]. Markery SSR są wykorzystywane do potwierdzenia przynależności gatunkowej, analizy zróżnicowania genetycznego w obrębie jednego gatunku. Służą również jako markery cech użytkowych w procesie hodowlanym oraz do mapowania genów.

Łatwość użycia oraz stosunkowo niewielkie koszty są przyczynkiem do powszechnego stosowania markerów SSR. Czynnikiem limitującym ich wykorzystanie jest niezbędna znajomość sekwencji flankujących rejonów satelitarne.

W laboratorium KCRZG wykorzystuje się markery SSR w szeregu realizowanych zadań. Jednym z nich jest mapowanie cechy odporności na mączniaka prawdziwego jęczmienia (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) w odpornych odmianach miejscowych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.). W tym celu wytworzono populacje mapujące F₂, otrzymane po krzyżowaniu linii odpornej z podatną odmianą. Do analiz molekularnych użyto zestawu markerów SSR z różnych *loci* genomu jęczmienia. Wstępną fazę badań stanowiło poszukiwanie markerów polimorficznych z wykorzystaniem analizy zestawu skrajnych segregantów (ang. *bulked segregant analysis*, BSA) [Michelmore i in. 1991]. Otrzymany w metodzie BSA polimorfizm jest ściśle związany z szukanym genem i wynika z różnic pomiędzy dwoma odrębnymi pulami DNA. Metoda BSA może być stosowana do identyfikacji regionu genomu, jak również do poszukiwania markerów molekularnych związanych z cechą kodowaną przez 2–4 geny [Wolko i Bartkowiak-Broda 1997, Malepszy i in. 2001]. Następnie wysycano interesujący region dodatkowymi markerami SSR. Markery polimorficzne wykorzystano do badań całej populacji mapującej F₂. Uzyskane wyniki posłużyły do konstrukcji map sprzężeń i oszacowania dystansu genetycznego w centymorganach (cM) w programie JoinMap 4.0 (Kyazma B V, Plant Research International B.V., P.O. Box 182, 6700 AD Wageningen, Holandia). Badania nad identyfikacją podłoża genetycznego odporności linii jęczmienia na mączniaka prawdziwego są w toku, otrzymane wyniki będą sukcesywnie publikowane.

Drugim obszarem badawczym wykorzystującym amplifikowane sekwencje mikrosatelitarne jest tworzenie piramid genowych w ramach zadań hodowlanych. Nadrzędnym celem prowadzonych prac jest zwiększanie odporności pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) i rdzę brunatną (*Puccinia triticina*). Kumulowanie kilku genów odporności z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych umożliwia skuteczną i szybką identyfikację poszczególnych genów wchodzących w skład piramidy genowej. Selekcja na poziomie DNA okazuje się niezbędna w przypadku braku możliwości identyfikacji genów odporności przy użyciu testów fitopatologicznych, w szczególności gdy nie dla wszystkich genów odporności zostały zidentyfikowane wirulentne izolaty patogenu [Pietrusińska i Czembor 2015]. Z udziałem mikrosatelitarnego systemu markerowego można zidentyfikować zarówno geny odporności na rdzę brunatną *Lr* (ang. *leaf rust*), jak również geny odporności na mączniaka prawdziwego *Pm* (ang. *powdery mildew*). W wyniku wieloletnich prac hodowlanych, selekcji fenotypowej oraz molekularnej do polskich odmian pszenic ozimych – Bogatka, Nadobna, Satyna – oraz do niemieckiej odmiany Lexus wprowadzono pira-

midę genów o segmencie odpornościowym ($Lr41(= Lr39) + Pm21$) [Pietrusińska 2010, Pietrusińska i in. 2011, 2013]. Kolejny etap prowadzonych prac obejmuje uzyskanie efektywnych piramid genowych o profilach: ($Lr41(= Lr39) + Pm21 + Lr47$); ($Lr41(= Lr39) + Pm21 + Pm37$); ($Lr41(= Lr39) + Pm21 + Lr47 + Pm37$) [Pietrusińska i in. 2015]. Wytworzony materiał roślinny sukcesywnie przekazywany jest do polskich spółek hodowlanych i włączany w realizowane programy hodowlane.

Markery SSR są również wykorzystywane w analizach zróżnicowania genetycznego. Opracowania literaturowe dotyczą zmienności markerów pomiędzy akcesjami w obrębie jednego gatunku [Dean i in. 1998, Westman i Kresovich 1999, López-Sesé i in. 2002]. Pomimo zwiększania dostępności nowych metod analizy, takich jak NGS, stale poszerzana jest pula znanych i opisanych markerów mikrosatelitarnych. W 2016 r. Dumlupinar i in. opublikowali listę 125 nowych markerów SSR dla owsa [Dumlupinar i in. 2016].

MARKERY ISSR

Markery ISSR (ang. *inter-simple sequence repeat*, ISSR) bazują na reakcji PCR. W tym przypadku startery hybrydują z sekwencjami mikrosatelitarnymi. Wariantowość produktów amplifikacji wynika z różnych sekwencji zawartych pomiędzy regionami mikrosatelitarnymi zorientowanymi w przeciwnych kierunkach. Ich użycie nie wymaga znajomości sekwencji. Markery ISSR są wykorzystywane m.in. do oceny zróżnicowania międzypopulacyjnego w obrębie gatunku, identyfikacji gatunków, określania wzajemnych relacji filogenetycznych, do mapowania genomów czy też przy sporządzaniu map sprzężeń [Joshi i in. 2000, Hou i in. 2005, Uysal i in. 2010]. Markery ISSR są wysoce polimorficzne. Amplifikują nawet do stu kilkudziesięciu *loci* z jednego genomu [Boczkowska i in. 2016]. Stosunkowo niewielkie koszty, łatwość analizy oraz wysoki polimorfizm powodują powszechność ich wykorzystania.

W pracach Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR – PIB markery ISSR zostały wykorzystane w analizie blisko stu akcesji z rodzaju *Avena* sp., zgromadzonych w kolekcji KCRZG. Badano zróżnicowanie starych odmian (ang. *old cultivars*) uprawianych przed 1939 r., odmian miejscowych (ang. *landraces*) oraz współczesnych odmian uprawnych owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.). Wszystkie obiekty pochodziły z terenu Polski. Uzyskane wyniki, uzupełnione o dane dla innych markerów molekularnych oraz o opis fenotypowy, zostały zawarte w kilku publikacjach naukowych Boczkowskiej i in. [2013, 2014, 2015, 2016, 2017], Boczkowskiej i Onyśk [2016], Poddymy i in. 2016]. Wykorzystywany zestaw ośmiu starterów ISSR pozwolił na uzyskanie nawet do 143 wysoce polimorficznych *loci* ($PIC > 0,45$) [Boczkowska i Tarczyk 2013]. Analizowane markery ISSR pozwoliły na rozróżnienie nawet blisko spokrewnionych akcesji. Największe zróżnicowanie genetyczne otrzymano w odmianach miejscowych, równocześnie wykazując mniejszą pulę genową starych odmian oraz bardzo słabe zróżnicowanie współczesnych odmian uprawnych. Boczkowska i in. [2014] wykazali testem Mantela statystycznie istotną korelację markerów ISSR z atrybutami morfologicznymi. Dla pozostałych stosowanych metod – AFLP, RAPD i SSR – nie uzyskano takiej korelacji. Nie wykazano natomiast korelacji markera z regionem pozyskania materiału. Wysoce wiarygodne, powtarzalne i zróżnicowane markery ISSR pozwoliły na weryfikację danych i zmianę przypisania taksonomicznego pięciu błędnie sklasyfikowanych akcesji [Boczkowska i in. 2014].

MARKERY SRAP

Markery SRAP (ang. *sequence-related amplified polymorphism*, SRAP) bazują na reakcji amplifikacji DNA. Do reakcji PCR używane są startery komplementarne do otwartych ramek odczytu i kodujących fragmentów genomu. Ukierunkowane startery przednie (ang. *forward*) są bogate w zasady GC i hybrydują do egzonów, natomiast startery wsteczne (ang. *reverse*) wzbogacone w zasady AT – do sekwencji promotorowych, intronów i regionów międzygenowych [Poczai i in. 2013]. Kombinacje starterów *forward* i *reverse* ustala się podczas optymalizacji metody dla konkretnego gatunku. Po elektroforezie produktów PCR uzyskuje się zróżnicowany wzór prążkowy. Markery te są powtarzalne i stosunkowo łatwe do wykonania, nie wymagają też znajomości sekwencji [Li i Quiros 2001]. SRAP wykazują wysoki poziom polimorfizmu. Xie i in. [2009] otrzymali średnio 22,5 prążka na jedną kombinację starterów podczas analizy obiektów rozpleniczy słoniowej (*Pennisetum purpureum* Schum.).

W KCRZG wykonano analizę zróżnicowania genetycznego 32 akcesji owsa szorstkiego (*Avena strigosa* Schreb.). Uzyskano łącznie 234 fragmenty, spośród których 93% było polimorficznych, a 122 określono jako fragmenty rzadkie. Dystans genetyczny, obliczony wg współczynnika Dice'a, wskazuje na duże zróżnicowanie genetyczne między badanymi obiektami. Dzięki analizie SRAP zidentyfikowano 4 główne grupy owsa szorstkiego, które nie odzwierciedlają jednak pochodzenia geograficznego [Boczkowska, nieopublikowane].

Markery SRAP są powszechnie wykorzystywane w analizach zróżnicowania genetycznego, powiązania filogenetycznego, a także konstruowaniu map genetycznych i w analizie sprzężeń [Budak i in. 2004, Tanhuanpää i in. 2008, Xie i in. 2009, Chen i in. 2012, Dai i in. 2012].

MARKERY TYPU SNP I IN/DEL

Markery zmienności pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) oraz niewielkich insercji lub delecji (ang. *insertion/deletion*, In/Del) wymagają zastosowania metod sekwencjonowania DNA. Jedną z metod taksonomicznych wykorzystującą zmienność na poziomie sekwencji nukleotydowej jest DNA-barkoding. Metoda ta opiera się na sekwencjonowaniu określonych krótkich fragmentów DNA, których odczyt pozwala na jednoznaczną identyfikację taksonomiczną materiału. Takie regiony nazywane są barkodowym DNA (ang. *DNA- barcode*). Barkod to fragment DNA powszechnie występujący, jednocześnie konserwatywny w obrębie gatunku i charakterystycznie zmienny pomiędzy gatunkami [Hollingsworth i in. 2011, Fazekas i in. 2012].

W Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR – PIB w celach identyfikacji taksonomicznej materiału roślinnego wykorzystuje się sekwencjonowanie pięciu fragmentów genomu chloroplastowego: *mat K*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*. Dla dwóch ostatnich nie ma dostępnej sekwencji referencyjnej w bazach danych. Sekwencjonowanie prowadzono na sekwenatorze kapilarnym pracującym wg metody Sangera [Sanger i in. 1977]. Analizowano sekwencje barkodowe cpDNA uzyskane dla 30 akcesji z rodzaju *Avena* sp. przypisanych do dziewięciu gatunków. Badanie umożliwi-

ło potwierdzenie klasyfikacji czterech akcesji i wykluczenie prawidłowości opisu taksonomicznego dla kolejnych czterech obiektów zdeponowanych w banku genów KCRZG. Analiza sekwencjonowanych fragmentów pozwoliła zidentyfikować dziewięć pozycji o potencjalnym zastosowaniu w identyfikacji gatunków w rodzaju *Avena* sp. Przyrównania sekwencji dokonano w programie CLUSTAL W metodą łączenia najbardziej podobnych sekwencji (ang. *maximum likelihood estimation*). Drzewa powiązań filogenetycznych, podział na klady i położenie badanych obiektów różniły się w zależności od analizowanego fragmentu. Nie uzyskano jednoznacznej klasyfikacji taksonomicznej przy zastosowaniu wybranych barkodów [Boczkowska, nieopublikowane].

MARKERY DARTSEQ

Diversity Array Technology Pty. Ltd jest platformą do analizy DNA. Pierwotnie wykorzystywano technologię hybrydyzacji DNA na mikromacierzach [Jaccoud i in. 2001]. Obecnie platforma DArT oferuje analizy w oparciu o technologię sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) – DArTseq [Von Cruz i in. 2013]. W metodzie DArTseq stosuje się redukcję złożoności genomu przez trawienie enzymami restrykcyjnymi, a następnie sekwencjonowanie krótkich odczytów. Wybór kombinacji restryktaz pozwala na wyodrębnienie wysoce informatywnych niskokopijnych fragmentów genomu. Nawet 90% otrzymanych markerów DArTseq jest komplementarnych do sekwencji unikatowych genomu [Courtois i in. 2013, Von Cruz i in. 2013]. Analiza DArTseq generuje dwa zestawy danych. Pierwszy zawiera markery dominujące, drugi markery kodominujące z wyszczególnionymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów. Otrzymuje się co najmniej trzykrotnie większą liczbę dominujących markerów niż konwencjonalną metodą DArT [Sansaloni i in. 2011]. Głębokie sekwencjonowanie stosowane przez platformę DArT umożliwia identyfikację heterozygotyczności u poliploidalnych organizmów, takich jak pszenica.

W Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR – PIB korzysta się z platformy DArT do poszukiwania zmienności zasocjowanych z pożądaną cechą fenotypową. W ten sposób zmapowano *loci* odporności na mączniaka prawdziwego u odmian miejscowych jęczmienia zwyczajnego. W tym celu DNA z wytworzonych populacji mapujących F₂ zostały zanalizowane metodą DArTseq. Wynikową macierz kilkunastu tysięcy fragmentów przeanalizowano statystycznie pod kątem korelacji z oceną fenotypową odporności na mączniaka. Procedura ta ujawniła od 4 do 16 fragmentów skorelowanych z badaną cechą w zależności od analizowanej linii. Obecnie wybrane markery DArTseq są konwertowane na markery PCR. Badania są w toku, a uzyskane wyniki będą wkrótce publikowane.

SEKWENCJONOWANIE NASTĘPNEJ GENERACJI

Od 2017 r. laboratorium molekularne Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych ma sekwenator następnej generacji w technologii Illumina. Praca z wykorzystaniem NGS pozwoli na sekwencjonowanie *de novo* i resekwencjonowanie z zastosowa-

niem różnych protokołów (ang. *targeted sequencing*, *small-genome sequencing*, *shotgun*) w szerokim zakresie analiz. Dzięki procedurze przesiewowego genotypowania (ang. *screening*) będzie możliwe opisanie nowych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów oraz innych wariantów zmienności, takich jak delecje/insercje czy sekwencje mikrosatelitarne. Wysoka przepustowość MiSeq Illumina umożliwia jednoczesną analizę nawet 1500 amplikonów z 96 obiektów (96 indeksów) i pozwala na kumulatywne pokrycie nawet do 650kb w ciągu jednego cyklu pracy. Strategia ta pozwala wykryć nawet kilkadziesiąt tysięcy zmienności (SNP, In/Del) na jednej płytce reakcyjnej. Otrzymane złożone sekwencje posłużą do wysoce wiarygodnej i bardzo szczegółowej analizy filogenetycznej, identyfikacji taksonomicznej oraz zróżnicowania wewnątrzgatunkowego. Zakres analiz nieporównywalnie wykróczy poza sekwencje dotychczas analizowane, flankowane wybranymi starterami [Quail i in. 2012, Swerdlow i Gu 2012, Buermans i den Dunnen 2014].

PODSUMOWANIE

Szybki rozwój technik biologii molekularnej stwarza możliwość genotypowania z wykorzystaniem szeregu markerów klasycznych oraz metod nowoczesnych bazujących na sekwencjonowaniu. Obecna hodowla opiera się na bardzo wąskiej i stale podlegającej erozji puli genowej. Ponad 7 milionów akcesji zdeponowanych w przeszło 1700 bankach genów na świecie (FAO 2010) stanowi bogate źródło bioróżnorodności. Do wykorzystania zgromadzonych materiałów w hodowli i nauce niezbędny jest dokładny i wiarygodny opis, zarówno cech fenotypowych, jak i genetycznych. Choć markery molekularne były stosowane w pracach banków genów od dawna, dopiero zastosowanie wysokoprzepustowych technologii umożliwiło szybką i wiarygodną identyfikację oraz opis zdeponowanych materiałów [Tanksley i McCouch 1997, McCouch i in. 2012].

W laboratorium molekularnym Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR – PIB stosuje się szerokie spektrum metod genotypowania. Wykorzystuje się zarówno klasyczne markery długości fragmentów DNA, jak i nowoczesne – bazujące na zmienności sekwencji nukleotydowej. Stosowane markery pozwalają na mapowanie alleli cech fenotypowych, potwierdzenie przynależności taksonomicznej oraz oszacowanie zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku. Opracowywane nowe markery znajdują zastosowanie w selekcji hodowlanej. Dostępność wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania nowej generacji znacząco zmniejsza ograniczenia oraz otwiera nowe możliwości badawcze i aplikacyjne.

PIŚMIENNICTWO

- Boczkowska M., Tarczyk E., 2013. Genetic diversity among Polish landraces of common oat (*Avena sativa* L.). *Genet. Resour. Crop. Ev.* 60 (7), 2157–2169.
- Boczkowska M., Nowosielski J., Nowosielska D., Podyma W., 2014. Assessing genetic diversity in 23 early Polish oat cultivars based on molecular and morphological studies. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 61(5), 927–941.

- Boczkowska M., Harasimiuk M., Onyśk A., 2015. Studies on genetic variation within old Polish cultivars of common oat. *Cereal Res. Commun.* 43 (1), 12–21.
- Boczkowska M., Łapiński B., Kordulasińska I., Fu-Dostatny D., Czembor J.H., 2016. Promoting the Use of Common Oat Genetic Resources through Diversity Analysis and Core Collection Construction. *PLoS ONE* 11(12): e0167855.
- Boczkowska M., Onyśk A., 2016. Unused genetic resources: a case study of Polish common oat germplasm. *Ann. Appl. Biol.* 169, 155–165.
- Boczkowska M., Żebrowski J., Nowosielski J., Kordulasińska I., Nowosielska D., 2017. Environmentally-related genotypic, phenotypic and metabolic diversity of oat (*Avena sativa* L.) landraces based on 67 Polish accessions. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 246 (64), <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0555-8>.
- Budak H., Shearman R.C., Parmaksiz I., Gaussoin R.E., Riordan T.P., Dweikat I., 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 108 (2), 328–334.
- Buermans H.P.J., den Dunnen J.T., 2014. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *BBA Mol. Basis Dis.* 1842, 1932–1941.
- Chen S.S., Chen G.Y., Chen H., Wei Y.M., Li W., Liu Y.X., Liu D.C., Lan X.J., Zheng Y.L., 2012. Mapping stripe rust resistance gene *YrSph* derived from *Tritium sphaerococcum* Perc. with SSR, SRAP, and TRAP markers. *Euphytica* 185 (1), 19–26.
- Courtois B., Audebert A., Dardou A., Roques S., Ghneim-Herrera T., Droc G., Frouin J., Rouan L., Gozé E., Kilian A., Ahmadi N., Dingkuhn M., 2013. Genome-wide association mapping of root traits in a Japonica rice panel. *PLoS ONE* 8 (11), 1–18.
- Dai X.J., Yang Y.Z., Zhou L., Ou L.J., Liang M.Z., Li W.J., Kang G.P., Chen L.B., 2012. Analysis of indica- and japonica-specific markers of *Oryza sativa* and their applications. *Plant Syst. Evol.* 298 (2), 287–296.
- Dean R.E., Dahlberg J.A., Hopkins M.S., Mitchell S.E., Kresovich S., 1998. Genetic Redundancy and Diversity among ‘Orange’ Accessions in the U.S. National Sorghum Collection as Assessed with Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Crop Sci.* 4 (39), 1215–1221.
- Dumlupinar Z., Brown R., Campbell R., Jellen E.N., Anderson J., Bonman J.M., Carson M., Chao S., Obert D., Jackson E., 2016. The art of attrition: development of robust oat microsatellites. *Plant Breed.* 135 (3), 323–334.
- Fazekas A.J., Kuzmina M.L., Newmaster S.G., Hollingsworth P.M., 2012. DNA Barcoding Methods for Land Plants. *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. Kress W. J., Erikson D. L. ed, *Methods Mol Biol* 858 Springer Science + Business Media 858, 223–252.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. The Second Report on the State of the World’s plant genetic resources for food and agriculture Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome.
- Hollingsworth P. M., Graham S. W., Little D. P., 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254.
- Hou Y.C., Yan Z.H., Wei Y.M., Zheng Y.L., 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genet. Newsletter* 35, 9–22.
- Jaccoud D., Peng K., Feinsein D., Kilian A., 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29 (4), E25.
- Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 100 (8), 1311–1320.
- Li G., Quiros C. F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103, 455–461.

- López-Sesé A.I., Staub J., Katzir N., Gómez-Guillamón M.L., 2002. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. *Euphytica* 127 (1), 41–51.
- Malepszy, S. red., 2001. *Biotechnologia Roślin*. Wydawnictwo Naukowe PAN, Warszawa.
- McCouch S.R., McNally K.L., Wang W., Hamilton R.S., 2012. Genomics of gene banks: a case study in rice. *Am. J. Bot.* 99(2), 407–423.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (21), 9828–9832.
- Onyśk A., Boczkowska M., 2017. M13-tailed simple sequence repeat (SSR) markers in studies of genetic diversity and population structure of common oat germplasm. In: S. Gasparis (ed.), *Oat Methods in Molecular Biology* 1536. Humana Press, New York, 159–168.
- Pachota K., Niedziela A., Orłowska R., Bednarek P., 2016. Nowoczesne metody genotypowania DArT i GBS w hodowli gatunków roślin użytkowych. *Biul. IHAR* 279, 3–18.
- Pietrusińska A., 2010. Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 256, 31–54.
- Pietrusińska A., Czembor J.H., 2015. Piramidyzacja genów – powszechne narzędzie używane w programach hodowlanych. Gene pyramiding – a tool commonly used in breeding programs. *Biul. IHAR* 278, 3–16.
- Pietrusińska A., Czembor J.H., Czembor P.Cz., 2011. Pyramiding of two resistance genes for leaf rust and powdery mildew resistance in common wheat. *Cereal Res. Commun.* 39 (4), 577–588.
- Pietrusińska A., Czembor P. Cz., 2007. Ocena wybranych metod izolacji DNA pod względem ich przydatności w hodowli pszenicy. *Biul. IHAR* 236, 41–48.
- Pietrusińska A., Czembor P.Cz., Czembor J.H., 2013. Lr39 + Pm21, as a new effective combination of resistance genes for leaf rust and powdery mildew. *Czech J. Genet. Plant* 49, 109–115.
- Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J.P.T., Hyvönen J., 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9(6). DOI: 10.1186/1746-4811-9-6.
- Podyma W., Boczkowska M., Wolko B., Fu-Dostatny D., 2016. Morphological, isoenzymatic and ISSRs-based description of diversity of eight sand oat (*Avena strigosa* Schreb.) landraces. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 64 (7), 1661–1674.
- Powell W., Machray G.C., Provan J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1(7), 215–222.
- Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 341(13).
- Ribaut J.M., Hoisington D., 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3 (6), 236–239.
- Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M., 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6, 125–134.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12), 5463–5467.
- Sansaloni C., Petrolini C., Jaccoud D., Carling J., Detering F., Grattapaglia D., Kilian A., 2011. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of *Eucalyptus*. *BMC Proceedings* 5 (Suppl. 7): P54.

- Tanhuanpää P., Kalendar R., Schulman A.H., Kiviharju E., 2008. The first doubled haploid linkage map for cultivated oat. *Genome* 51(8), 560–569.
- Tanksley S.D., McCouch S.R., 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277(5329), 1063–1066.
- Uysal H., Fu Y.B., Kurt O., Peterson G.W., Diederichsen A., Kusters P., 2010. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 57 (7), 1109–1119.
- Von Cruz M., Kilian A., Dierig D.A., 2013. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. Collection of the new oilseed crop lesquerella and related species. *PLoS ONE* 8 (5), e64062.
- Westman A.L., Kresovich S., 1999. Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica* 109(2), 85–92.
- Wolko B., Bartkowiak-Broda I., 1997. Metody diagnostyki molekularnej w hodowli roślin. Materiały z I Krajowej Konferencji „Hodowla Roślin”, Poznań, 19–20 listopada 1997, 389–402.
- Xie X.M., Zhou F., Zhang X.Q., Zhang J.M., 2009. Genetic variability and relationship between MT-1 elephant grass and closely related cultivars assessed by SRAP markers. *J. Genet.* 88(3), 281–290.

Praca realizowana w ramach Programu Wieloletniego na lata 2015–2020 oraz Badań Podstawowych na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej na lata 2014–2020 finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Summary. Plant biodiversity protection is the main objective of the Polish National Center for Plant Genetic Resources (NCPGR), Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute. Over 83,000 accessions are deposited in the long-term repository, acquired during domestic and foreign expeditions and exchanges. Their proper description is important from the point of view of conservation and breeding. Molecular researches are carried out to determinate the species, inter-population diversity, and genetic background of economic traits. This aim is achieved with various methods, and the newest are based on sequencing (NGS). Examples of objects that have been included in molecular research are oats (species identification within the 2,500 collection), a collection of 4,000 barley landraces from all over the world (genetic determinants of useful traits), wild wheat collections and wild relatives (source of disease resistance).

Key words: biodiversity, genotyping, molecular markers, gene bank

Otrzymano/ Received: 5.10.2017
Zaakceptowano/ Accepted: 14.11.2017