

¹ Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Skromna 8, 20-704 Lublin, e-mail: keska.paulina@wp.pl

² Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Akademicka 13, 20-950 Lublin

PAULINA KĘSKA¹, SYLWIA OKOŃ², JOANNA STADNIK¹

Charakterystyka różnicowania genetycznego i identyfikacja genów *Pm6* w nowych liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej za pomocą markerów DNA

Characterization of genetic diversity and identification of *Pm6* genes
in new breeding lines of common wheat with DNA markers

Streszczenie. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania miały na celu określenie poziomu różnicowania genetycznego wybranych linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej oraz identyfikację genu odporności na mączniaka prawdziwego *Pm6*. Obecność tego genu jest pożądana w puli genowej zbóż, w tym pszenicy, gdyż przyczynia się do wzrostu odporności odmian, a tym samym ograniczenia straty plonów powodowanych mączniakiem prawdziwym. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono obecność genu *Pm6* w 8 obiektach uzyskanych z linii hodowlanych. Oceny różnicowania genetycznego dokonano w oparciu o markery RAPD. W reakcji z 7 starterami uzyskano 58 fragmentów, wśród których 45 (77,6%) było polimorficznych. W jednej reakcji otrzymano od 4 (w przypadku startera A05) do 13 (dla startera D6) amplifikonów. Utworzono macierz indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a w oparciu o wyniki badań polimorfizmu markerów RAPD. Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,72 do 0,96.

Słowa kluczowe: gen *Pm6*, pszenica zwyczajna, mączniak prawdziwy, marker molekularny

WSTĘP

Choroby powodowane przez grzyby pasożytnicze występują co roku i powodują duże straty plonów. Najczęstsze z nich to: mączniak prawdziwy, zgorzel podstawy źdźbła i łamliwość podstawy źdźbła, zgorzel podstawy źdźbła i korzeni oraz rdza na liściach, septorioza plew, fuzarioza kłosów [Korbas i in. 2007, Korbas i Danielewicz 2011]. Największe straty plonów związane są z występowaniem mączniaka prawdziwego, który powodowany jest przez grzyb *Blumeria graminis*, oraz rdzy brunatnej, której czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia recondita* [Korbas i Danielewicz 2011, Cao i in. 2015]. Z roku na rok więcej uwagi poświęca się odporności pszenicy na mączniaka prawdziwego. Z tego względu podejmowane są działania mające na celu kontrolowanie tej choroby

oraz jej zwalczenie. Jedną z najbardziej efektywnych metod ograniczania występowania mączniaka prawdziwego jest uprawa odmian zawierających efektywne geny odporności wspomaganą odpowiednimi zabiegami agrotechnicznymi. Odporność uprawianych odmian zbóż na choroby powodowane przez grzyby i możliwie duże zróżnicowanie linii hodowlanych pod względem genetycznym jest jednym z ważniejszych elementów nowoczesnej produkcji roślinnej. Znajomość rodzaju genów odporności obecnych w uprawianych odmianach jest konieczna do interpretacji współzależności między populacją patogenu a jego gospodarzem. W celu uzyskania pożądanych odmian roślin niezbędne jest dokładne poznanie, izolacja, a następnie wprowadzenie do danego genotypu genów nadających odporność na choroby wywołane obecnością grzybów. Identyfikacja genów odporności na poszczególne patogeny oraz określenie ich *loci* jest działaniem nadającym kierunek hodowli odpornościowej [Cao i in. 2015, Pengtao i in. 2015].

Odporność pszenicy na choroby powodowane przez grzyby uwarunkowana jest występowaniem genów z grupy *Pm*. Do tej pory zidentyfikowano ponad 70 genów *Pm* zlokalizowanych na 49 *loci* [Hao i in. 2015]. Jednym z najbardziej efektywnych genów przeciwko mączniakowi prawdziwemu pszenicy jest gen *Pm6*. Został on przeniesiony do pszenicy zwyczajnej z *Triticum timopheevii* przez rekombinację pomiędzy genomem B *T. aestivum* a genomem G *T. timopheevii* [Rong i in. 2000, Tao i in. 2000, Pengtao i in. 2015]. W celu określenia lokalizacji genów *Pm* na chromosomach stosuje się różne techniki, tj. testy fizjologiczne oparte na interakcji żywiciel-patogen, analizy chromosomowe (cytogenetyczne) oraz analizy oparte na wykorzystaniu markerów molekularnych [Chen i Chelkowski 1999, Zeller i in. 2002]. Najlepszym narzędziem do potwierdzenia obecności genów odporności są markery molekularne. Są wykorzystywane m.in. do wyznaczania genetycznego zróżnicowania materiałów wyjściowych czy genotypowej selekcji roślin [Bohn i in. 1998, Bonnett i in. 2005, Nowakowska 2006, Ćwiklińska i in. 2010, Lamare i Rao 2015].

Celem pracy było określenie poziomu zróżnicowania genetycznego wybranych linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej jarej oraz identyfikacja genu *Pm6* za pomocą markerów molekularnych RAPD.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły 24 próby uzyskane z linii hodowlanych pochodzących z Hodowli Roślin Smolice (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8), Poznańskiej Hodowli Roślin (P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16) oraz Hodowli Roślin Strzelce (P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24).

Materiał do badań stanowiły losowo wybrane ziarniaki badanych linii hodowlanych. Izolację materiału biologicznego przeprowadzono zgodnie z metodą Milligana [1992]. Stężenie DNA oceniono elektroforetycznie na żelu agarozowym poprzez porównanie ze wzorcem masy MssRuler DNA Ladder (Fermentas, Litwa). DNA rozcieńczono do 20 ng/μl, zamrożono w -20°C do czasu dalszych analiz.

W celu identyfikacji genu *Pm6* zastosowano parę starterów: starter R: NAU/STS_{BCD135-2L} (5'-GCTCCCAACCAAGAGAAGAA-3') oraz starter F: NAU/STS_{BCD135-2R} (5'-TCTGTCTGGTCCTCTGATGTG-3') [Ji i in. 2008]. Reakcję amplifikacji prowadzono na termocyklerze Thermalcyler T1 Biometra. W skład mie-

szaniny reakcyjnej wchodziły: bufor (1× stężony); dNTP (0,19 mM); MgCl (2 mM); starter R (0,23 pmol); starter F (0,23 pmol); polimeraza Taq (1U). Zastosowano następujący profil termiczny: denaturacja wstępna – 94°C/240 s; denaturacja – 94°C/30 s; wiązanie starterów – 56°C/60 s; synteza – 72°C/60 s; synteza końcowa – 94°C/300 s; przechowywanie – 4°C; liczba cykli – 44.

Analizę podobieństwa genetycznego prowadzono w oparciu o markery RAPD [Williams i in. 1990]. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: bufor (1× stężony); dNTP (0,2 mM); MgCl (1,5 mM); starter (0,67 pmol); polimeraza Taq (0,7 U). W doświadczeniu zastosowano siedem różnych sekwencji starterowych (tab. 1). Reakcję amplifikacji prowadzono na termocyklerze Thermalcycler T1 Biometra, stosując odpowiednio dobrany profil termiczny (denaturacja wstępna – 94°C/240 s; denaturacja – 94°C/45 s; wiązanie starterów – 56°C/45 s; synteza – 72°C/45 s; synteza końcowa – 94°C/420 s; przechowywanie – 4°C; liczba cykli – 44).

Tabela 1. Charakterystyka starterów zastosowanych podczas reakcji RAPD
Table 1. Features of primers used in the RAPD reaction

Starter Starter	Sekwencja 5'-3' Sequence 5'-3'
A05	AGG GGT CTT G
A08	GTG ACG TAG G
A9	GGG TAA CGC C
D6	ACC TGA ACG G
U300	GGC TAG GGC G
U534	CAC CCC CTG C
W18	TTC AGG GCA C

Produkty amplifikacji rozdzielono na żelu agarozowym o stężeniu 1,5% w buforze TBE (89 mM Tris-borate, 2,5 mM EDTA) zawierającym bromek etydydy (0,01%). Elektroforezę prowadzono przez 90 minut przy napięciu 120 V. Żele podświetlono lampą UV, a następnie fotografowano, wykorzystując system dokumentacji żeli PolyDoc. Masę prążków określono poprzez porównanie z markerem wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Litwa).

W analizie polimorfizmu brak lub obecność prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednio wartość 0 lub 1. Podobieństwo genetyczne (SI – *similarity index*) pomiędzy parami wszystkich badanych form oszacowano zgodnie z formułą Dice'a [Nei i Li 1979]. W oparciu o matrycę SI wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average), stosując program NTSYS-pc [Rohlf 2001].

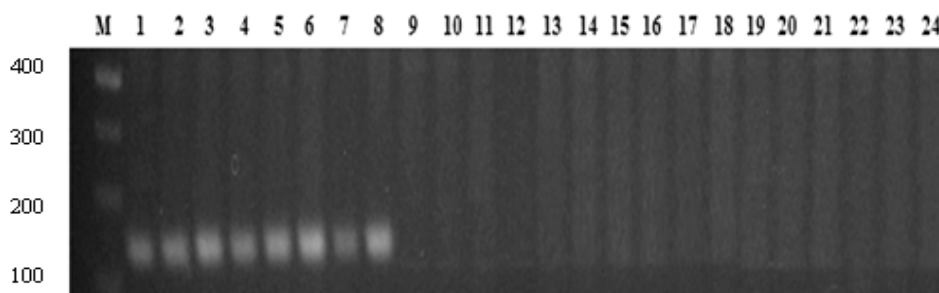
WYNIKI I DYSKUSJA

W prezentowanej pracy dokonano oceny podobieństwa genetycznego w oparciu o polimorfizm identyfikowany metodą RAPD. W tym celu posłużono się techniką matryc

podobieństwa genetycznego Dice'a, a następnie skonstruowano dendrogram badanych genotypów metodą UPGMA. Wyniki badań polimorfizmu markerów RAPD materiału badawczego stanowiły podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a. Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,72 dla P1 do 0,96 pomiędzy P7 a P8. Średnio wartość podobieństwa pomiędzy wszystkimi rozpatrywanymi obiektami wynosiła 0,78. Jednocześnie największe podobieństwo do wszystkich pozostałych genotypów wykazały P2, P3, P4, P5, P7, najmniejsze zaś P1. Na podstawie analizy indeksów podobieństwa można stwierdzić, że genotypy pochodzące z Hodowli Roślin Smolice charakteryzowały się największym podobieństwem genetycznym. Najbardziej zróżnicowane były genotypy pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce. Uzyskana matryca SI, zwana także matrycą indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a, stanowiła podstawę do wykonania analizy skupień metodą UPGMA. W topologii dendrogramu wyróżniono 2 grupy skupień (rys. 2). Na dendrogramie badane obiekty uległy wyraźnie klasteryzacji, wykazując przy tym zróżnicowany stopień pokrewieństwa. Pierwszy klasteryzacji objął pięć badanych obiektów z Hodowli Roślin Strzelce. W obrębie tej grupy najbardziej zbliżone do siebie pod względem genetycznym okazały się P19 oraz P20. Największe różnice zaś wykazały P23 względem P21 i P22. Natomiast w drugiej, największej grupie znalazło się 18 pozostałych genotypów. W tym zbiorze wyodrębnić można 2 subklastry. Większy, obejmujący 12 genotypów, zawiera niemalże wszystkie obiekty pochodzące z Hodowli Roślin Smolice oraz przeważającą część genotypów Poznańskiej Hodowli Roślin. W rozpatrywanej grupie największym podobieństwem cechowały się P7 oraz P8. Są to zarazem najbardziej zbliżone do siebie pod względem genetycznym obiekty wśród wszystkich badanych prób. Drugi subklasteryzacji tworzą 3 obiekty oznaczone jako P10, P11, P12 oraz 3 obiekty pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce. Najbardziej odmienny genetycznie od pozostałych okazał się obiekt P1. Utworzył on na dendrogramie najbardziej odrębną grupę. Analizowany materiał biologiczny charakteryzował się zróżnicowaniem genetycznym. Linie, w których zidentyfikowano geny *Pm6*, prawie całkowicie należą do odrębnego ramienia skupień. Wyjątek stanowi jedna linia – P1, wykazująca jednocześnie najmniejsze pokrewieństwo względem pozostałych obiektów.

W hodowli roślin bardzo ważnym zagadnieniem jest szybka i pewna identyfikacja genów odporności na choroby wywołane obecnością grzybów, w tym mączniaka prawdziwego. Obecnie jednym z najbardziej efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego w pszenicy jest gen *Pm6*. Jego obecność w znacznym stopniu przyczynia się do poprawy plonowania. Cennym narzędziem w hodowli roślin stają się dobrze opracowane markery molekularne umożliwiające precyzyjną selekcję pożądanych genotypów. Nad opracowaniem skutecznych znaczników molekularnych dla genu *Pm6*, umożliwiających identyfikację tego genu w pszenicy, pracowali Tao i in. [2000]. Materiałem badawczym były izogeniczne linie zawierające gen *Pm6*. W celu zmapowania odpowiedniego fragmentu chromosomu i identyfikacji genu wykorzystali metodę RFLP. Autorzy zidentyfikowali dwa markery, które okazały się skuteczne w wykrywaniu polimorficznych *loci*. Dalsze badania przeprowadzone na pokoleniu F₂ potwierdziły przydatność sondy BCD135 w wykrywaniu *loci* *xbcd135* na długim ramieniu chromosomu 2B, ściśle skorelowanym z genem *Pm6*. W oparciu o wiedzę na temat skutecznego zastosowania fragmentu BCD135 w analizie RFLP dalsze badania podjęli Ji i in. [2008]. Ich celem było opracowanie znaczników STS umożliwiających skuteczną i wysokowydajną identyfikację genu *Pm6*. Autorzy badali 4 markery skonstruowane na bazie sekwencji BCD135

(NAU/STSBCD135-1; NAU/STSBCD135-2; STS003 i STS004). W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzili, że markery STS003 oraz STS004 nie są skuteczne w identyfikacji genu *Pm6* (w ich przypadku nie zaobserwowano polimorficznych produktów). Wyniki wykazały, że zarówno NAU/STSBCD135-1, jak i NAU/STSBCD135-2 były ściśle powiązane z genem *Pm6*, jednak dokładniejsze rezultaty odnotowano przy zastosowaniu znacznika NAU/STSBCD135-2. Wyniki te potwierdzają badania Kowalczyka i in. [2011], którzy zastosowali ten właśnie marker do wykrywania genu odporności *Pm6* w pszenżycie. W badaniach własnych do identyfikacji genu *Pm6* wykorzystano startery opracowane przez Ji i in. [2008]. Po włączeniu do PCR starterów NAU/STSBCD135-2 uzyskano produkty amplifikacji o wielkości 135 pz w 8 liniach należących do Hodowli Roślin Smolice (rys. 1). Obecność tego fragmentu DNA potwierdza obecność genu *Pm6* odporności na mączniaka prawdziwego w badanych genotypach pszenicy.

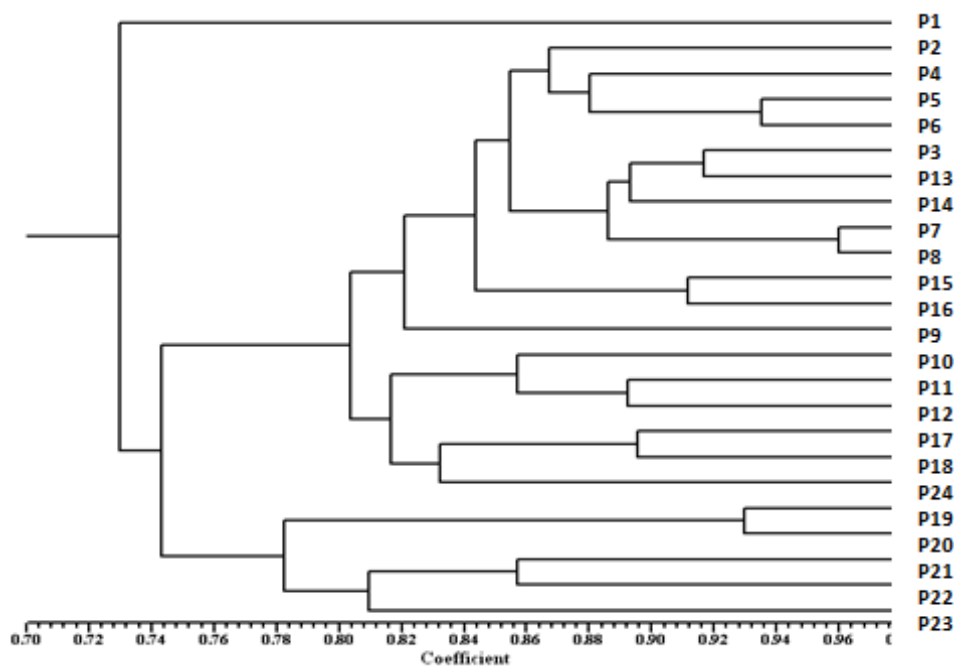


Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów uzyskanych w wyniku reakcji ze starterem NAU/STSBCD135-2. M – marker wielkości; ścieżka 1–8 – próby pszenicy jarej pochodzące z Hodowli Roślin Smolice, ścieżka 9–16 – próby pochodzące z Poznańskiej Hodowli Roślin; ścieżka 17–24 – próby pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce

Fig. 1. Electrophoretic separation of products obtained by reaction with primer NAU/STSBCD135-2. M – size marker; path 1–8 – attempts from Plant Breeding Smolice, path 9–16 – attempts from the Poznan Plant Breeding; path 17–24 – attempts from Strzelce Plant Breeding

Efektywność programów hodowlanych może być zwiększona poprzez poszerzenie puli genowej i bioróżnorodności odmian. Ocena zróżnicowania genetycznego w oparciu o markery molekularne dostarcza informacji na temat zróżnicowania odmian i materiałów hodowlanych, dystansu genetycznego materiałów wyjściowych oraz ich filogenezy [Nagaoka i Ogihara 1997, Ćwiklińska i in. 2010, Lamare i Rao 2015]. W badaniach własnych do analizy polimorfizmu linii hodowlanych pszenicy zwyczajnej wykorzystano 7 starterów RAPD. Wszystkie generowały stabilne, wyraźne prążki, co potwierdza przydatność tych znaczników molekularnych w niniejszej analizie. Łącznie uzyskano 58 fragmentów DNA. W jednej reakcji otrzymano od 4 (w przypadku startera A05) do 13 (dla startera D6) odcinków DNA. Spośród zidentyfikowanych fragmentów aż 77,6% (45) było polimorficznych. Najmniej prążków polimorficznych ulegało amplifikacji po zastosowaniu startera A9 – 2, a najwięcej w przypadku starterów D6 oraz W18 – po 12. Produkty monomorficzne pojawiły się w wyniku amplifikacji ze wszystkimi zastosowanymi starterami. Otrzymano 13 takich fragmentów, co stanowiło 22,4% ogólnej puli

produktów. Najwięcej, bo aż 30,8% (4) prążków monomorficznych uzyskano w przypadku reakcji ze starterem U300. Znacznie mniej produktów wykazujących monomorfizm, bo po 1 prążku (po 7,7%), zidentyfikowano w przypadku starterów A05, A08 i U534. Spośród analizowanych starterów ponad połowa (4) inicjowała amplifikację produktów specyficznych dla pojedynczych genotypów, dając ogółem 7 takich amplikonów. Wśród wszystkich zastosowanych markerów genetycznych najbardziej skuteczny okazał się D6 oraz W18, generując w jednakowym stopniu największą ilość fragmentów, w tym także największą liczbę odcinków polimorficznych.



Rys. 2. Dendrogram UPGMA w oparciu o markery RAPD. P1–P8 – próby pszenicy jarej pochodzące z Hodowli Roślin Smolice, P9–P16 – próby pochodzące z Poznańskiej Hodowli Roślin, P17–P24 – próby pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce

Fig. 2. UPGMA dendrogram based on RAPD markers. P1–P8 – attempts from Plant Breeding Smolice, P9–P16 – attempts from the Poznan Plant Breeding, P17–P24 – attempts from Strzelce Plant Breeding

Nagaoka i Ogihara [1997] wykorzystali markery RAPD, ISSR i RFLP do oceny zróżnicowania genetycznego zbóż. Autorzy stwierdzili, że markery ISSR oraz RFLP generują więcej polimorficznych fragmentów DNA niż RAPD, jednak genetyczna ocena pokrewieństwa dokonywana na podstawie polimorfizmu dawała podobne rezultaty w przypadku 3 zastosowanych wariantów. Do podobnych wniosków doszli Kojima i in. [1998], którzy zajmowali się oceną przydatności tych systemów markerowych do opracowania map genetycznych pszenicy. Za pomocą systemu RAPD zidentyfikowano geny *Pm1*, *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm4a*, *Pm12*, *Pm13*, *Pm18*, *Pm25* oraz *Pm28* [Alam

i in. 2011]. Tak więc technika RAPD ze względu na szybkość i łatwość wykonania jest słusznie wykorzystywana do oceny polimorfizmu u różnych gatunków roślin. Rozwiązaniem takim posłużono się m.in. w celu wykrywania polimorficznych *loci* żyta [Myśków i in. 2001] czy oceny podobieństwa genetycznego mieszańców pszenżyta z *Aegilops juvenalis* [Grądzielewska i in. 2009].

WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność markerów NAU/STSBCD135-2 do identyfikacji genu *Pm6* odporności na mączniaka prawdziwego w liniach hodowlanych pszenicy zwyczajnej.

2. Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność metody RAPD do oceny różnicowania genetycznego linii hodowlanych pszenicy.

3. Analizowane obiekty charakteryzowały się zróżnicowaniem genetycznym, przy czym stwierdzono, że linie pochodzące z poszczególnych firm hodowlanych w większości ulegały wspólnej klasteryzacji na uzyskanym dendrogramie.

PIŚMIENNICTWO

- Alam A., Xue F., Wang H., Ji W., 2011. Powdery mildew resistance genes in wheat: Identification and genetic analysis. *J. Mol. Biol. Res.* 1, 20–39.
- Bohn M., Utz H., Melchinger A., Kronen T., 1998. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.* 39, 228–237.
- Bonnett D.G., Rebetzke G.J., Spielmeier W., 2005. Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Mol. Breed.* 15, 75–85.
- Cao S., Luo H., Jin M., Jin S., Dua X., Zhou Y., Chen W., Liu T., Jia Q., Zhang B., Huang J., Wang X., Shang X., Sun Z., 2015. Intercropping influenced the occurrence of stripe rust and powdery mildew in wheat. *Crop Prot.* 70, 40–46.
- Chen Y., Chelkowski J., 1999. Genes for resist to wheat powdery mildew. *J. Appl. Gen.* 40, 317–334.
- Ćwiklińska A., Broda Z., Bocianowski J., Dobrzycka A., 2010. The usefulness of RAPD and AFLP markers for determining genetic similarity in Rye (*Secale L.*) species and subspecies. *Acta Biol. Cracov Bot.* 52(1), 19–25.
- Grądzielewska A., Gruszecka D., Leśniowska-Nowak J., 2009. Ocena podobieństwa genetycznego mieszańców pszenżyta z *Aegilops Juvenalis* (Thell.) Eig. *Acta Agrophys.* 14, 591–602.
- Hao Y., Parks R., Cowger C., Chen Z., Wang Y., Bland D., Murphy J., Guedira M., Brown-Guedira G., Johnson J., 2015. Molecular characterization of a new powdery mildew resistance gene *Pm54* in soft red winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 128, 465–476.
- Ji J., Qin B., Wang H., Cao A., Wang S., Chen P., Zhuang L., Du Y., Liu D., Xiue Wang S., 2008. STS markers for powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat. *Euphytica* 2, 159–165.
- Kojima T., Nagaoka T., Noda K., Ogihara Y., 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 1, 37–45.
- Korbias M., Danielewicz J., 2011. Mączniak prawdziwy traw i zbóż. *Świat Zbóż* 16, 26–28.

- Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., 2007. Podręczny atlas chorób pszenicy. Plantpress, Kraków.
- Kowalczyk K., Gruszecka D., Nowak M., Leśniowska-Nowak J., 2011. Resistance of Triticale hybrids with *Pm4b* and *Pm6* genes to powdery mildew. Acta Biol. Cracov., Ser. Botanica 53, 57–62.
- Lamare A., Rao S.R., 2015. Efficacy of RAPD, ISSR and DAMD markers in assessment of genetic variability and population structure of wild *Musa acuminata* colla. Physiol. Mol. Biol. Plants 21(3), 349–358, DOI 10.1007/s12298-015-0295-1.
- Milligan B.G., 1992. Plant DNA isolation. In: Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. IRL Press, Oxford, UK, 59–88.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szolkowski A., 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. J. App. Genet. 42, 1–14.
- Nagaoka T., Ogihara Y., 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 5, 597–602.
- Nei M., Li W., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 76, 5269–5273.
- Nowakowska J., Bieniek J., Jabłonowski S., 2006. RAPD polymorphism of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) populations in Poland. FFP, Series A 48, 27–44.
- Pengtao M., Hongxing X., Yunfeng X., Lihui L., Yanmin Q., Qiaoling L., Xiaotian Z., Xiuquan L., Yilin Z., Diaoguo A., 2015. Molecular mapping of a new powdery mildew resistance gene *Pm2b* in Chinese breeding line KM2939. Theor. Appl. Genet. 128, 613–622.
- Rohlf F.J., 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: Geometric interpretations. Evolution 55(11), 2143–2160.
- Rong J., Millet E., Manisterski J., Feldman M., 2000. A new powdery mildew resistance gene: Introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. Euphytica 115, 121–126.
- Tao W., Liu D., Y. Feng Y., Chen P., 2000. Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis. Theor. Appl. Genet. 3, 564–568.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J., Tingey S., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531–6535.
- Zeller F., Kong L., Hartl L., Mohler V., Hsam S., 2002. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 7. Gene *Pm29* in line Pova. Euphytica 123, 187–194.

Summary. The study focused on determining the level of genetic diversity of selected breeding lines and identifying *Pm6* gene. The presence of this gene is desirable in the gene pool of cereals, including wheat, as it contributes to the development of resistance variations and thereby reduces crop losses caused by powdery mildew. The research confirmed the presence of the *Pm6* gene in 8 objects obtained from the breeding lines. Assessment of genetic diversity was based on RAPD markers. In the reaction with seven primers 58 fragments were obtained, 45 (77.6%) of which were polymorphic. In one reaction from 4 (for primer A05) to 13 (for primer D6) amplicons were obtained. Dice's genetic similarity matrix indexes based on the results of research RAPD polymorphism markers was created. The value of the similarity index ranged from 0.72 to 0.96.

Key words: *Pm6* gene, common wheat, powdery mildew, molecular marker