

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
e-mail: edyta.paczos@up.lublin.pl

EDYTA PACZOS-GRZĘDA, AGNIESZKA GRĄDZIELEWSKA

**Identyfikacja mieszańców międzyodmianowych
Avena sativa L. oraz potencjalnych markerów
dla genu karłowatości *Dw6*
z wykorzystaniem metody ISSR**

Identification of inter-cultivar hybrids of *Avena sativa* L. and potential markers
of *Dw6* dwarfing gene using ISSR method

Streszczenie. W efekcie krzyżowań międzyodmianowych, przeprowadzonych pomiędzy posiadającymi dominujący gen karłowatości *Dw6* formami niskimi a liniami i odmianami wysokimi, uzyskano 147 ziarniaków reprezentujących 17 kombinacji. Mieszańcowy charakter sześciu kombinacji potwierdzał karłowaty fenotyp roślin F_1 . Do weryfikacji pochodzenia pozostałych form zastosowano metodę ISSR. Z uwagi na wysoki poziom wykrywanego polimorfizmu metoda ISSR okazała się efektywna w identyfikacji mieszańców międzyodmianowych owsa. Ponadto spośród uzyskanych 150 polimorficznych produktów ISSR jeden (SR-37⁹⁷⁰) ulegał amplifikacji we wszystkich analizowanych formach karłowatych. Produkt ten nie był powielany u żadnej z badanych roślin wysokich. Zidentyfikowany fragment po konwersji na marker SCAR może stanowić potencjalny marker dla genu karłowatości *Dw6*.

Słowa kluczowe: ISSR, karłowatość, mieszańce międzyodmianowe, owies zwyczajny

WSTĘP

Owies zwyczajny jest gatunkiem, u którego krzyżowanie międzyodmianowe, mimo braku barier krzyżowalności, charakteryzuje się bardzo niską efektywnością w porównaniu z innymi zbożami [Thomas 1992]. Krzyżowanie roślin polega na kastrowaniu, czyli usuwaniu niedojrzałych pylników w form męskich, a następnie nanoszeniu obcego pyłku form ojcowskich na dojrzałe znamiona form męskich po kilku dniach od kastrowania. Kastrowanie wykonywane jest zazwyczaj manualnie, alternatywą jest stosowanie chemicznych środków sterylizujących [Rodkiewicz i in. 1994]. Zapylenie może

odbywać się poprzez umieszczanie pylników w wykastrowanych kwiatach, potrząsanie pylącą wiechą ojcowską nad wiechą wykastrowaną lub umieszczanie wiechy zapylacza pod jednym izolatorem z formą mateczną [Świerczewski i Mazaraki 1993]. Uzyskanie mieszańcowych ziarniaków określonych kombinacji wymaga niekiedy kilku lat krzyżowań, jeśli prowadzone są one w warunkach polowych, lub kilku cykli wegetacyjnych w szklarni lub fitotronie. Jedną z przyczyn niskiej efektywności krzyżowania jest samopylność owsa i preferencja w stosunku do własnego pyłku. Kolejnymi przyczynami trudności mogą być także niska żywotność nanoszonego pyłku i uszkodzenia słupka podczas kastrowania, które wywołują w zalążni przedwczesną kaskadę reakcji, jaka towarzyszy zapyleniu [Rodkiewicz i in. 1994]. Na efektywność zapylenia mają również wpływ wilgotność powietrza i temperatura. Złożoność procesu zapylenia oraz kwiatostan w postaci wiechy, który znacznie komplikuje czynności manualne towarzyszące kastrowaniu i zapyleniu, sprawiają, że owies jest uznawany za jeden z najtrudniej krzyżujących się gatunków zbożowych.

Dotychczas u gatunków z rodzaju *Avena* opisano osiem genów karłowatości, niemniej jednak tylko jeden z nich, dominujący gen *Dw6*, jest wykorzystywany w programach hodowlanych. Gen ten jest wrażliwy na egzogenny kwas giberelinowy i redukuje wysokość roślin o 30–37%, głównie poprzez skrócenie trzech górnych międzywęźli [Milach i in. 1997]. W liniach z *Dw6* skrócenie dokłosa sprawia, że przy braku optymalnych warunków środowiska wiecha nie w pełni wysuwa się z pochwy liścia flagowego, co negatywnie wpływa na plon. Farnham i in. [1990] wykryli w populacjach pochodzących od *A. sterilis* i *A. fatua* geny modyfikatory, które w obecności genu *Dw6* wydłużają dokłosa i powodują, że rośliny o skróconej słomie normalnie wiechują. Wykrycie tych modyfikatorów znacznie poszerzyło możliwość wykorzystania genu *Dw6* w hodowli owsa o skróconej słomie. Karłowaty typ wzrostu wszystkich polskich niskich linii hodowlanych powodowany jest obecnością dominującego genu *Dw6*, wprowadzonego z australijskiej niskiej, nieoplewionej odmiany Bandicoot.

Na podstawie morfologii rośliny F_1 nie zawsze możemy stwierdzić, czy jest ona efektem zapylenia obcym czy własnym pyłkiem. Cechy warunkowane genami dominującymi możemy traktować jako markery potwierdzające mieszańcowość, jeśli donorem tych genów jest forma ojcowska. W sytuacji, gdy cechą dominującą wnosi forma mateczna lub gdy chcemy potwierdzić mieszańcowy charakter roślin na wczesnych etapach rozwoju, należy zastosować jedną z metod molekularnych. Metody te bazują na polimorfizmie cząsteczek białek lub DNA. Identyfikacja polimorfizmu DNA może być dokonana przy wykorzystaniu systemów markerowych będących modyfikacją metody PCR. Celem niniejszej pracy było potwierdzenie mieszańcowego charakteru niskich roślin F_1 , których formy mateczne były niskie, zaś ojcowskie wysokie, stąd fenotyp roślin nie był wskaźnikiem udanego krzyżowania. Do molekularnej analizy DNA wybrano metodę ISSR. Ponadto analizując polimorfizm DNA form wyjściowych oraz mieszańców, poszukiwano potencjalnych markerów dla genu karłowatości *Dw6*.

MATERIAŁ I METODY

Do krzyżowań przeznaczono niskie i wysokie odmiany oraz linie pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce oraz angielską wysoką odmianę Millennium z kolekcji HR Strzelce (tab. 1).

Tabela 1. Formy rodzicielskie
Table 1. Parental forms

Odmiana / linia Cultivar / line	Wysokość Plant height	Oplewiony / nagi Naked / covered
STH 85869b	niski	oplewiony
STH 9787	niski	oplewiony
Milenium	wysoki	oplewiony
Bingo	wysoki	oplewiony
STH 7505	niski	nagi
STH 54411	niski	nagi
STH 8909	wysoki	nagi
STH 98899	wysoki	nagi

Tabela 2. Uzyskane kombinacje mieszańcowe
Table 2. Obtained hybrids

Forma mateczna Maternal form Forma ojcowska Paternal form	STH 85869b	STH 9787	Milenium	Bingo	STH 7505	STH 54411	STH 8909	STH 98899	Suma Total
STH 85869b		4		4					8
STH 9787	9		3	23					35
Milenium		3							3
Bingo		59							59
STH 7505						1	11	16	28
STH 54411					1		1	7	9
STH 8909					2	1			3
STH 98899					1	1			2
Suma Total	9	66	3	27	4	3	12	23	147

Wszystkie formy przeznaczone do krzyżowań wysiewano na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w Czesławicach koło Nałęczowa. W fazie krzewienia z roślin matecznych i ojcowskich pobrano fragmenty liści i zamrożono w temperaturze -70°C do czasu izolacji DNA. Kastrowanie roślin rozpoczęto na początku fazy strzelania w źdźbło. Po 3–4 dniach od usunięcia pylników na dojrzałe znamiona nanoszono pyłek z pylników zebranych z roślin ojcowskich. Po dwóch dniach powtarzano zapylanie pyłkiem pochodzącym z tych samych zapylaczy. Zbiór wiech miał miejsce po osiągnięciu dojrzałości woskowej. Na podstawie liczby wykastrowanych kwiatów oraz liczby zawiązanych ziarniaków określono efektywność krzyżowania.

W roku 2011 ponownie założono eksperyment polowy. Przedmiotem doświadczenia były mieszańce F_1 uzyskane w wyniku krzyżowań w roku poprzednim. W fazie krzewienia pobrano fragmenty liści i zamrożono w temperaturze -70°C do czasu izolacji DNA. W fazie kwitnienia rośliny izolowano, aby zapobiec obcozapyleń. W fazie dojrzałości pełnej rośliny F_1 zebrano.

Tabela 3. Podobieństwo genetyczne wg Dice'a określone na podstawie polimorfizmu markerów ISSR

Table 3. Dice's genetic similarity based on ISSR markers polymorphism

Odmiana/linia Cultivar / line	STH 85869b	STH 9787	Millenium	Bingo	STH 7505	STH 54411	STH 8909	STH 98899
STH 85869b								
STH 9787	0,80							
Millenium	0,42	0,38						
Bingo	0,67	0,63	0,47					
STH 7505	0,50	0,51	0,32	0,67				
STH 54411	0,38	0,45	0,18	0,50	0,75			
STH 8909	0,65	0,61	0,33	0,65	0,47	0,33		
STH 98899	0,69	0,59	0,32	0,63	0,51	0,32	0,85	

Izolację DNA z liści roślin matecznych, ojcowskich i mieszańców F_1 wykonano metodą CTAB [Doyle i Doyle 1984]. Reakcje amplifikacji produktów ISSR przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Zietkiewicz i in. [1994]. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 10 μL wchodziły: 1 \times bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20) (Fermentas, Litwa); 160 μM każdego dNTP; 0,5 pM startera; 1,3 mM MgCl_2 ; 0,4 mM spermidyny, 30 ng genomowego DNA; 0,35 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Litwa). Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 4 min w 95°C , 38 cykli: denaturacja 94°C – 30 s, przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 50°C – 45 s, trzy kolejne cykle 49°C – 45 s i 32 cykle 48°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min 30 s, z końcową inkubacją 7 min w 72°C . Produkty reakcji rozdzielano 5 h w 2% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano, wykorzystując system dokumentacji żeli PolyDoc.

Na podstawie zidentyfikowanego polimorfizmu produktów ISSR obliczono podobieństwo genetyczne (*SI similarity index*) pomiędzy parami wszystkich badanych form wyjściowych zgodnie z formułą Dice'a [Nei i Li 1979] przy zastosowaniu programu NTSYS – pc [Rohlf 2001].

TAB. 4

TAB. CD 4

WYNIKI I DYSKUSJA

Fenotyp rośliny F_1 potwierdza jej mieszańcowe pochodzenie tylko wówczas, gdy forma ojcowska wnosi gen dominujący. W pozostałych przypadkach nie jest możliwe potwierdzenie mieszańcowego pochodzenia analizowanych form na podstawie fenotypu i jedynym rozwiązaniem jest wykorzystanie markerów molekularnych. W badaniach obejmujących analizy molekularne gatunków z rodzaju *Avena* często wykorzystywano metodę ISSR [Paczos-Grzęda 2007, Paczos-Grzęda i in. 2009]. Jest to metoda wysoce powtarzalna i w dotychczasowych aplikacjach wielokrotnie okazywała się metodą skuteczną. Technikę ISSR wykorzystano także w analizach innych gatunków zbóż i traw, m.in. do oceny polimorfizmu międzyodmianowego u pszenżyta ozimego [Kramek i Paczos-Grzęda 2010] czy zróżnicowania wewnątrzgatunkowego *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy [Grądzielewska i in. 2009]. Fernandez i in. [2002], analizując polimorfizm międzyodmianowy *Hordeum vulgare* L., uznali system ISSR za szybkie i wiarygodne narzędzie użyteczne w fingerprintingu DNA, pozwalające ustalić relacje genetyczne między odmianami odpowiadające informacjom o pochodzeniu.

W 2010 r. przeprowadzono szereg krzyżowań międzyodmianowych pomiędzy posiadającymi dominujący gen karłowatości *Dw6* formami niskimi a liniami i odmianami wysokimi. Efektywność krzyżowania była stosunkowo wysoka i wyniosła 17,8%. Chrząstek i in. [2006], prowadząc krzyżowania międzygatunkowe w obrębie rodzaju *Avena*, najlepszą efektywność krzyżowania uzyskali dla kombinacji *A. sativa* × *A. sterilis* – 9,81%, zaś dla *A. sativa* × *A. fatua* – 6,3%. W efekcie przeprowadzonych krzyżowań otrzymano w sumie 147 ziarniaków reprezentujących 17 mieszańcowych kombinacji, przy czym najwięcej dla Bingo × STH 9787 (59 ziarniaków) (tab. 2). W przypadku dominującego genu karłowatości *Dw6* wszystkie kombinacje mieszańcowe powinny charakteryzować się karłowatym fenotypem [Milach i in. 1997, Tanhuanpaa i in. 2006]. Jednak karłowaty fenotyp rośliny F_1 tylko wówczas świadczy o udanym krzyżowaniu, gdy gen dominujący wnosi forma ojcowska.

W sześciu kombinacjach z karłowatymi formami ojcowskimi mieszańcowy charakter potwierdzał fenotyp rośliny F_1 . Pozostałych dziesięć kombinacji (80 roślin F_1), których forma mateczna była niska, wymagało potwierdzenia mieszańcowego pochodzenia z wykorzystaniem markerów molekularnych. W pierwszym etapie analiz przeprowadzono amplifikację produktów ISSR form rodzicielskich i wyselekcjonowano startery inicjujące amplifikację fragmentów polimorficznych. Spośród 244 produktów ISSR uzyskanych dla form wyjściowych 150 (61%) było polimorficznych. Paczos-Grzęda [2007], analizując metodą ISSR zróżnicowanie polskich odmian owsa zwyczajnego, wykazała obecność 42% polimorficznych amplikonów. Świadczy to o większym zróżnicowaniu genetycznym analizowanych w niniejszej pracy form. Z kolei Paczos-Grzęda i in. [2006], prowadząc analizę polimorfizmu markerów ISSR u 12 mieszańców F_1 pochodzących z 10 różnych kombinacji *A. sativa* × *A. maroccana* oraz 2 kombinacji *A. sativa* × *A. murphyi*, uzyskali nieznacznie wyższy (64%) aniżeli w niniejszej pracy odsetek produktów polimorficznych. Wynikało to z większego zróżnicowania genetycznego pomiędzy gatunkami *A. sativa*, *A. maroccana* i *A. murphyi*, aniżeli w obrębie gatunku *A. sativa*. Na podstawie polimorfizmu markerów ISSR określono podobieństwo genetyczne form rodzicielskich. Wynosiło ono średnio 0,52, wahając się od 0,18 (Millenium vs. STH 54411) do 0,85 (STH 98899 vs. STH 8909) (tab. 3).

Spośród 20 testowanych wstępnie starterów ISSR do dalszych analiz, obejmujących zarówno formy wyjściowe, jak i rośliny F_1 , wybrano 8. W celu potwierdzenia mieszańcowości porównywano profile markerów ISSR uzyskane dla form rodzicielskich i mieszańców. W roślinach F_1 poszukiwano produktów specyficznych dla form ojcowskich, nieulegających amplifikacji u form matecznych. Obecność takich fragmentów potwierdzała mieszańcowe pochodzenie. Przy użyciu poszczególnych starterów możliwa była weryfikacja mieszańcowości od 2 (sr69) do 9 (sr53) kombinacji, średnio 5,6 (tab. 4). Pojedynczy starter uczestniczył w syntezie od jednego (sr69) do 8 (sr53) (średnio 4,5) polimorficznych produktów występujących w mieszańcach, ale nieobecnych u poszczególnych form matecznych. Określony rodzaj produktu ulegał amplifikacji w jednej do 10 analizowanych roślin (średnio 3,8), potwierdzając ich mieszańcowe pochodzenie. Najwięcej produktów potwierdzających mieszańcowość, bo aż 11, zidentyfikowano u mieszańców STH 9787 \times Bingo oraz STH 85869b \times Bingo, 8 – u STH 54411 \times STH 8909 oraz dwóch spośród 3 roślin STH 7505 \times STH 8909. Zaledwie po 3 produkty pochodzące od form ojcowskich (sr53⁶⁰⁰, sr45⁶⁵⁰ oraz sr17⁸⁸⁰) stwierdzono u mieszańców STH 9787 \times STH 85869b i STH 85869b \times STH 9787. Nie potwierdzono mieszańcowego pochodzenia jednej z roślin F_1 , która miała być efektem krzyżowania STH 7505 \times STH 8909. Wszystkie uzyskane profile dla tej rośliny odpowiadały formie matecznej STH 7505.

W przypadku mieszańców międzyodmianowych identyfikacja polimorficznych fragmentów DNA potwierdzających mieszańcowość jest zdecydowanie trudniejsza aniżeli u mieszańców bardziej odległych taksonów [Pejic i in. 1998]. Im większe jest podobieństwo genetyczne pomiędzy analizowanymi formami, tym trudniej jest znaleźć produkty potwierdzające mieszańcowość. Podobieństwo genetyczne krzyżowanych form miało wpływ na ilość zidentyfikowanych u mieszańców fragmentów DNA potwierdzających mieszańcowy charakter analizowanych kombinacji. W mieszańcach STH 9787 \times STH 85869b i STH 85869b \times STH 9787 zidentyfikowano zaledwie po 3 amplikony specyficzne dla form ojcowskich, co wynikało z dużego podobieństwa genetycznego form matecznych i ojcowskich. Wartość współczynnika SI pomiędzy tymi formami rodzicielskimi oszacowano na 0,8. Zdecydowanie więcej produktów polimorficznych zidentyfikowano dla form rodzicielskich mieszańców STH 9787 \times Bingo czy STH 54411 \times STH 8909, pomiędzy którymi podobieństwo genetyczne było znacznie mniejsze i wynosiło odpowiednio 0,63 oraz 0,33.

W efekcie przeprowadzonych analiz wyselekcjonowano startery, które mogą zostać wykorzystane do potwierdzenia bądź wykluczenia mieszańcowego charakteru pozostałych 60 roślin F_1 . W celu przeprowadzenia weryfikacji mieszańców należy wykonać dwie reakcje z jedną z kombinacji starterów, np. sr37 i sr17, sr37 i sr45 lub sr53 oraz sr36.

Ponadto wśród uzyskanych dla form wyjściowych 150 polimorficznych produktów ISSR, oprócz amplikonów potwierdzających mieszańcowość, poszukiwano potencjalnych markerów dla genu karłowatości *Dw6*. Marker taki powinien ulegać amplifikacji w analizowanych liniach niskich, zarówno oplewionych, jak i nagich. Zidentyfikowano tylko jeden taki produkt – SR37⁹⁷⁰. Fragment o wielkości 970 pz ulegał amplifikacji w obecności startera sr37 we wszystkich analizowanych formach karłowatych, zarówno liniach wyjściowych, jak i mieszańcach F_1 . Jednocześnie produkt ten nie powstawał u żadnej z badanych roślin wysokich. Zidentyfikowany fragment może stanowić potencjalny marker dla genu karłowatości *Dw6*, wymaga on jednak konwersji na marker specyficzny SCAR.

Gen *Dw6* jako jeden z ośmiu znanych genów karłowatości u owsa jest najczęściej wykorzystywany w programach hodowlanych ukierunkowanych na skrócenie słomy z uwagi na mniejszy w porównaniu z pozostałymi genami negatywny wpływ na plon, stąd poszukiwania efektywnego markera molekularnego prowadzone są od lat. Milach i in. [1997] znaleźli marker RFLP dla tego genu – Xum145B zlokalizowany w odległości 3,3 cM. Markery RFLP, z uwagi na dużą pracochłonność metody, nie mają znaczenia praktycznego. Z kolei Tanhuanpaa i in. [2006] uzyskali markery SNP w oparciu o produkty RAPD oraz REMAP zlokalizowane w odległości odpowiednio 12,6 oraz 5,2 cM od genu. Żaden z tych markerów nie różnicuje polskich linii karłowatych od form wysokich. Molnar i in. [2012] zlokalizowali gen *Dw6* na 33 grupie sprzężeń mapy Kanota × Ogle. Gen ten koduje najprawdopodobniej podjednostkę H wakuolarną protonową ATPazy, która odpowiedzialna jest między innymi za utrzymanie odpowiedniego pH tonoplastu oraz wydłużanie komórek. Wykorzystując mapowanie porównawcze oraz linie bliskoizogeniczne *Dw6/dw6* autorzy opracowali dwa markery SCAR: ubc333ks i ubc165ms, położone odpowiednio w odległości 7 oraz 1–6 cM. Markery te nie różnicowały linii izogenicznych, ale wg autorów mają szansę zostać wykorzystane w selekcji wspomaganą markerami (MAS). Markery te wymagają weryfikacji na polskich liniach hodowlanych, niemniej jednak jak najbardziej uzasadnione jest opracowanie na polskich materiałach markerów blisko sprzężonych z genem *Dw6*.

WNIOSKI

1. Metoda ISSR jest wysoce efektywna w identyfikacji mieszańców międzyodmianowych owsa. Przy jej udziale potwierdzono lub wykluczono mieszańcowe pochodzenie wszystkich analizowanych roślin.

2. Zróżnicowanie genetyczne materiałów przeznaczonych do krzyżowań było bardzo duże. Szczególnie cennym źródłem zmienności dla polskiej hodowli jest odmiana Millennium.

3. W efekcie przeprowadzonych analiz wyselekcjonowano pary starterów, które mogą zostać wykorzystane do weryfikacji mieszańcowego pochodzenia roślin F_1 uzyskanych w oparciu o krzyżowania form rodzicielskich wykorzystanych w pracy.

4. Analiza polimorfizmu produktów ISSR umożliwiła identyfikację potencjalnego markera dla genu karłowatości *Dw6* – SR37⁹⁷⁰.

PIŚMIENNICTWO

- Chrząstek M., Paczos-Grzęda E., Kowalczyk K., Miazga D., Kruk K., 2006. Mieszańce międzygatunkowe owsa. PAGEN. Centre of Excellence in Plant Agrobiology and Molecular Genetics. Vol. 7. Mieszańce oddalone roślin uprawnych, 49–62.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Fernandez M., Figueiras A., Benito C., 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104, 845–851.
- Farnham, M.W., Stuthman D.D., Biesboer D.D., 1990. Cellular expression of panicle exertion in semidwarf oat. *Crop Sci.* 30, 323–328.

- Grądzielewska A., Paczos-Grzęda E., Gruszecka D., 2009. Zastosowanie metod RAPD i ISSR do oceny podobieństwa genetycznego greckich form *Dasyphyrum villosum* (L.) P. Candargy. Biul. IHAR 253, 297–307.
- Kramek A., Paczos-Grzęda E., 2010. Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian pszenżyta ozimego za pomocą markerów ISSR. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 555, 249–258.
- Milach S.C., Rines H.W., Phillips R.L., 1997. Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. Theor. Appl. Genet. 95, 783–790.
- Molnar S.J., Chapados J.T., Satheeskumar S., Wight C.P., Bancroft B., Orr W., Luckert D.E., Kibite S., 2012. Comparative mapping of the oat *Dw6/dw6* dwarfing locus using NILs and association with vacuolar proton ATPase subunit H. Theor. Appl. Genet. 124, 1115–1125.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 5269–5273.
- Paczos-Grzęda E., 2007. Wykorzystanie metod ISSR i RAPD oraz analizy rodowodów do oceny podobieństwa międzyodmianowego *Avena sativa* L. 2007. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 517, 547–558.
- Paczos-Grzęda E., Chrząstek M., Miazga D., Wacko S., 2006. Analiza molekularna mieszańców *Avena sativa* L. × *A. maroccana* Gdgr oraz *A. sativa* L. × *A. murphyi* Ladiz. PAGEN. Centre of Excellence in Plant Agrobiolgy and Molecular Genetics. Vol. 7. Mieszańce oddalone roślin uprawnych, 135–141.
- Paczos-Grzęda E., Chrząstek M., Okoń S., Grądzielewska A., Miazga D., 2009. Zastosowanie markerów ISSR do analizy wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego *Avena sterilis* L. Biul. IHAR 252, 215–223.
- Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplicek V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M., 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theor. Appl. Genet. 97, 248–255.
- Rodkiewicz B., Śnieżko R., Fyk B., Niewęglowska B., Tchórzewska D., 1994. Embriologia *Angiospermae* – rozwojowa i eksperymentalna. Wydaw. UMCS, Lublin.
- Rohlf F.J., 2001. NTSYS – pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Setauket, N.Y. Exeter Publish. Ltd.
- Świerczewski A., Mazaraki M., 1993. Hodowla owsa. W: Biologia i agrotechnika owsa. Mazurek J. (red.). Wydaw. IUNG, Puławy.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Laurila J., Schulman A.H., Manninen O., Kiviharju E., 2006. Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa* L.). Genome 49, 282–287.
- Thomas H., 1992. Cytogenetics of *Avena*. W: Oat science and technology, H.G. Marshall and M.E. Sorrells (eds.). American Society of Agronomy. Agronomy Monograf 33, Madison, Wis., USA 473–507.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176–183.

Summary. Numerous crosses between dwarf lines with the dominant dwarfing gene *Dw6* and tall cultivars and lines resulted in 147 seeds representing 17 F₁ hybrid combinations. Dwarf phenotype of six F₁ hybrids confirmed their origin. The hybrid status of the remaining combinations was confirmed with the ISSR method. The ISSRs identified high polymorphism and proved to be efficient and successful for the identification of oat hybrids. Moreover, out of 150 obtained polymorphic ISSR fragments only one (SR-37⁹⁷⁰) was amplified in all the analyzed dwarf genotypes. This product was not amplified in tall cultivars and lines. The selected fragment, after conversion into SCAR, could be a potential marker for dwarfing gene *Dw6*.

Key words: common oat, dwarfing, inter-cultivar hybrids, ISSR