

**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN -
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
w Radzikowie**

**Zróżnicowanie genetyczne odmian i populacji miejscowych fasoli
zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) uprawianych w Polsce**

Jarosław Nowosielski

Autoreferat rozprawy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem:

Promotora: prof. dr hab. Piotra T. Bednarka

Promotora pomocniczego: dr Wiesława Podymy

Recenzenci:

Prof. dr hab. Wojciech Święcicki czł. rzec. PAN

Dr hab. inż. Stefan Stojałowski prof. ZUT w Szczecinie

Radzików 2020

Streszczenie

Fasola zwyczajna zajmuje wśród roślin strączkowych uprawianych na nasiona trzecie miejsce na świecie, a stan zgromadzonych zasobów genetycznych rodzaju *Phaseolus* oceniany jest na 261 963 obiekty. W Polsce w kolekcji fasoli znajdują się unikatowe populacje miejscowe zebrane podczas wypraw badawczych, jak również odmiany hodowlane. Ocena zróżnicowania genetycznego zgromadzonych zasobów genowych pozwoli na zwiększenie stopnia ich wykorzystania.

Materiał badawczy stanowiły wybrane 74 odmiany i 212 populacji miejscowych fasoli zwyczajnej oraz 3 odmiany fasoli wielokwiatowej. Obiekty te zostały zgromadzone podczas ekspedycji terenowych w 18 makroregionach Polski. Analizę DNA przeprowadzono metodą AFLP.

Analiza struktury genetycznej badanych materiałów wykonana zarówno metodą UPGMA, PCoA, jak i statystyką baysyjską pokazała, że tworzą one dwie główne grupy reprezentowane zarówno przez odmiany i populacje miejscowe. Dwie pule genowe mogą odzwierciedlać centra pochodzenia. Analiza struktury danych sugeruje, że prawdopodobny udział w strukturze populacji różnych pul genowych fasoli zwyczajnej jest powiązany z regionem występowania. Sposób grupowania populacji miejscowych może być zależny od regionów geograficznych, co jest pochodną wykształcenia się (selekcji) określonych genotypów lepiej przystosowanych do panujących warunków klimatyczno-środowiskowych. A także, może być związany z pierwotnym pochodzeniem z odmiennych centrów różnicowania się tego gatunku, lub wynikać z tego, że Europa, a tym samym i Polska, stanowi wtórne centrum różnicowania się fasoli zwyczajnej.

Bardziej szczegółowa analiza wyników sugeruje, że odmiany mogą stanowić odrębną podgrupę, co pokazały zarówno analiza PCoA, jak i analizy struktur drugorzędowych. Pula genetyczna populacji miejscowych fasoli jest szersza niż badanych odmian hodowlanych. Populacje miejscowe stanowią odrębną pulę genową w stosunku do odmian hodowlanych. Analiza badanych populacji miejscowych programem PowerCore oparta na bazie markerów AFLP pozwoliła na wybranie 61 obiektów obejmujących w największym stopniu reprezentowaną zmienność w badanej kolekcji. W większości stanowiły je populacje pochodzące ze wschodniej i południowo wschodniej Polski. Można oczekiwać, że populacje te wykazując dużą różnorodność genetyczną, stanowią potencjał do tworzenia nowych odmian o zróżnicowanych cechach, zależnych między innymi od czynników środowiskowych.

1. Wprowadzenie

Fasola zwyczajna (*Phaseolus vulgaris* L.) stanowi bogate źródło białka, witamin i substancji mineralnych, zwłaszcza dla biedniejszych społeczeństw Afryki i Ameryki Południowej (Broughton i in., 2003).

W 2017 r. roczna światowa produkcja fasoli na suche nasiona wyniosła 31,4 mln ton, a fasoli szparagowej 24 mln ton (FAOSTAT, 2019). W Europie fasolę na suche nasiona uprawiano na 434 tys. ha z roczną produkcją 1,1 mln ton, a fasolę szparagową na 1,1 mln ha z roczną produkcją 8,4 mln ton. W Polsce w 2019 r. całkowita produkcja fasoli wyniosła 49,9 tys. ton i stanowiła 28,8% ogólnej produkcji strączkowych jadalnych. Ze względu na dużą popularność uprawy szczególnie przez działkowców, oraz w przydomowych ogrodach warzywnych pula genowa rodzaju *Phaseolus* jest licznie reprezentowana przez obiekty przechowywane *ex situ* w bankach genów.

Kolekcja fasoli (*Phaseolus* spp.) przechowywana w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych liczy ponad 3 000 obiektów. Są to odmiany uprawiane w Polsce jak i materiały hodowlane. W kolekcji znajdują się unikatowe populacje miejscowe zebrane podczas wypraw badawczych prowadzonych na terenie Polski, a także krajach ościennych. Konieczna jest ich inwentaryzacja celem zidentyfikowania obiektów identycznych, opisanie pod względem pożądanых cech użytkowych, oceny zróżnicowania genetycznego i ewentualnego powiązania markerów DNA z poszczególnymi cechami.

2. Hipoteza badawcza i cel badań

Hipoteza badawcza

Zasoby genowe fasoli zwyczajnej zgromadzone w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG) w Radzikowie wykazują duże zróżnicowanie genetyczne.

Fasola zwyczajna występująca na terytorium Polski podlega selekcji w zależności od warunków środowiskowo-klimatycznych występujących na danym terenie.

Fasola zwyczajna występująca na terytorium Polski odzwierciedla jej zróżnicowanie na świecie.

Populacje miejscowe nie stanowią odrębnej puli genetycznej w stosunku do odmian hodowlanych.

Cel badań

Zgromadzone w banku genów zasoby fasoli zwyczajnej stanowią około 3 000 obiektów, jednak praktycznie nieznana jest ich struktura oraz zróżnicowanie genetyczne. Brak jest również danych dotyczących zmienności genetycznej w zależności od miejsca pochodzenia. Problemem może również być występowanie obiektów o różnych nazwach, a identycznej tożsamości, bądź obiektów występujących pod tą samą nazwą, a będących innymi genotypami. Celem przeprowadzonych badań była:

- ocena zmienności wybranych odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej uprawianych w Polsce i zgromadzonych w banku genów oraz określenie ich struktury genetycznej;
- wykazanie genetycznej odrębności i regionalizacji populacji miejscowych w oparciu o markery molekularne;
- próba określenia pochodzenia fasoli zwyczajnej w Polsce;
- wybór obiektów do utworzenia kolekcji podstawowej, reprezentującej zmienność przechowywanych odmian hodowlanych i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej.

3. Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły 74 odmiany i 212 populacji miejscowych fasoli zwyczajnej, oraz 3 odmiany fasoli wielokwiatowej.

Cechy morfologiczne nasion i roślin zostały przypisane odmianom fasoli zwyczajnej wg charakterystyki COBORU zgodnie z bazą danych charakterystyki i oceny obiektów.

Analiza cech morfologicznych fasoli została wykonana metodą średniej odległości pomiędzy skupieniami (UPGMA) (Sokal i Michener, 1958; Peter i in., 1973) z wykorzystaniem współczynnika dystansu Jaccarda (Jaccard, 1908). Istotność grupowania oceniono na podstawie współczynnika prawdopodobieństwa.

Analizy DNA przeprowadzono metodą AFLP (Vos i in., 1995), zgodnie ze standardowym protokołem (Protocol, 1997) firmy Applied Biosystem na aparacie ABI PRISM 377XL. Analizę skupień wykonano metodą UPGMA. Do obliczenia wartości podobieństwa genetycznego wykorzystano współczynnik Jaccarda. Wariancję molekularną (AMOVA) i analizę głównych

współrzędnych (PCoA) wykonano w programie GenAlEx 6.502 (Peakall i Smouse, 2012). Strukturę genetyczną analizowanych odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej opartą na estymacji bayesowskiej (Woodworth, 2004) badano w programie Structure 2.3.4 (Pritchard i in., 2010). Do obliczeń wykorzystano model uwzględniający zjawisko admiksji. Kolekcję podstawową fasoli zwyczajnej wytypowano za pomocą programu PowerCore 1.0 (Kim i in., 2007), działającego w oparciu o strategię M - maksymalizacji (Schoen i Brown; 1993, Bataillon i David, 1996). Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem heurystycznego modelu wyszukiwania opartego o algorytm Karg i Tompsona (Karg i Thompson, 1964). Zostały wybrane obiekty o największej różnorodności reprezentujące największe pokrycie cech i markerów obecnych w badanej kolekcji.

4. Wyniki

Analiza profili AFLP wykazała, że pojedyncze układy selektywnych par starterów powielały od 3 do 275 fragmentów AFLP o długości od 50 do 500 par zasad, z których wytypowano 7 kombinacji powielających największą liczbę polimorficznych fragmentów o wartościach P% w przedziale 70-76%.

Analiza podobieństwa genetycznego gatunków fasoli, odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej badanego materiału umożliwiła wyodrębnienie skupienia składającego się z 3 odmian hodowlanych fasoli wielokwiatowej i z 8 populacji miejscowych. Odmiany fasoli wielokwiatowej i populacje miejscowe fasoli, które tworzyły z nimi wspólne skupienie zostały wykluczone z dalszych analiz.

Pozostałe próby gromadziły się w dwóch największych skupieniach. Najbardziej liczne skupienie, tworzyły wszystkie 74 odmiany fasoli zwyczajnej wzięte do badań, niezależnie od rodzaju uprawy, przeznaczenia czy też morfologii ich nasion oraz 137 populacji tego gatunku, zebranych na terenie wszystkich wyszczególnionych makroregionów geograficznych Polski.

Drugie co do wielkości skupienie gromadziło pozostałe 62 populacje pochodzące z Niziny Północnopodlaskiej, Niziny Południowopodlaskiej, Polesia Zachodniego oraz po jednej populacji zebranej na terenie Wyżyny Lubelskiej i Polesia Wołyńskiego.

Podobny wynik pokazała analiza głównych współrzędnych (PCoA) wykonana dla odmian i populacji fasoli zwyczajnej. Ujawniła ona grupowanie się materiałów w dwóch głównych skupieniach (α Cronbacha - wskaźnik rzetelności skali wyliczony w programie XLSTAT wynosił 0,995).

Badanie struktury odmian i populacji fasoli zwyczajnej wykazało, że badane materiały tworzyły dwie grupy (wartość współczynnika ΔK była najwyższa dla $K=2$).

Analiza skupień wykonana na podstawie wybranych cech morfologicznych nasion odmian fasoli zwyczajnej (kształt nasion, barwa i wzór okrywy nasiennej, masa tysiąca nasion oraz cech roślin: pokrój, typ użytkowy i dojrzewanie), ujawniła podział badanych odmian na pięć grup. Badanie głównych współrzędnych (PCoA), pozwoliło zaś wyróżnić tylko 3 grupy odmian. Uzyskane podziały nie wykazywały zależności od powyższych cech.

Analiza skupień (UPGMA/Jaccard) wykonana na bazie markerów AFLP wykazała, że nie wszystkie próby o tej samej nazwie odmianowej agregują ze sobą w tych samych skupieniach.

W analizie heurystycznej wykonanej z wykorzystaniem markerów AFLP dla 74 odmian wytypowano 52, które najdokładniej odzwierciedlały zmienność genetyczną badanych materiałów. Obliczony współczynnik efektywności analizy wyniósł 93%. W takiej samej analizie wykonanej dla cech morfologicznych i użytkowych wytypowano 12 odmian, a współczynnik efektywności analizy wyniósł 63%.

Analizę heurystyczną wykonaną z wykorzystaniem markerów AFLP dla populacji miejscowych fasoli zwyczajnej wytypowano 61 populacji, które w najbardziej pełny sposób

obrazowały zmienność genetyczną całości badanych populacji. Współczynnik efektywności analizy w tym przypadku wyniósł 90%.

5. Dyskusja

Zastosowany system markerowy - AFLP (Papa i Gepts, 2003), w porównaniu z innymi systemami markerowymi, takimi jak np. RAPD, semi-random, ISSR, SSR (Marotti i in., 2007; Zhang i in., 2008; Ceylan i in., 2014), okazał się bardzo efektywny, za pomocą siedmiu par selektywnych starterów zostało powielonych 1771 fragmentów DNA, z których 1292 były polimorficzne.

Analiza AFLP wykazała, że w zdecydowanej większości błąd eksperymentalny określony na bazie powtórzeń tych samych prób nie przekraczał 1%. Informatywność systemu markerowego oceniona na podstawie indeksu I znajdowała się na średnim poziomie i zależała od zastosowanego podziału materiałów roślinnych.

Obszar Polski jest podzielony pod względem fizycznogeograficznym na szereg makroregionów (Kondracki, 2002), które różnią się między sobą ukształtowaniem terenu, warunkami glebowymi i klimatycznymi. Zatem można przypuszczać, że przepływ materiałów pomiędzy poszczególnymi makroregionami mógł być ograniczony i na poszczególnych obszarach mogły być uprawiane formy pochodzące np. z odmiennych centrów różnicowania się gatunku. Analiza wartości oczekiwanej heterozygotyczności (u_{He}) dla populacji reprezentujących podział fizycznogeograficzny (makroregiony) wykazała niewysoki poziom heterozygotyczności w badanych materiałach (Nei, 1987; Qi-Lun i in., 2008).

W analizie molekularnej wariancji każdy z makroregionów został potraktowany jako oddzielna populacja, a zebrane w nich próby populacji miejscowych jako osobniki wchodzące w skład tej populacji. Analiza ta wykazała znaczne różnice między tymi obszarami i wyższy procent wytłumaczonej wariancji niż pomiędzy nimi (jest to zgodne z wartością I oraz u_{He}). Mniejsze zróżnicowanie pomiędzy regionami niż w ich obrębie sugeruje, że populacje są podobne genetycznie i możemy mieć do czynienia z ograniczoną pulą genów lub brakiem barier utrudniających wymianę genów. Poparciem ostatniej tezy może być fakt, że umowne określenie granicy jednostki fizycznogeograficznej nie jest tożsame z barierą przepływu genów i nie ogranicza mieszania się populacji. Wydaje się więc, że podział badanych materiałów na podstawie makroregionów ma charakter wyłącznie ilustracyjny. Większe zróżnicowanie populacji wewnątrz makroregionów niż pomiędzy nimi wynika zapewne z faktu, że rozpatrywano wszystkie zebrane próby populacji w danym makroregionie, bez uwzględnienia różnic w fenotypie nasion, roślin czy formie użytkowej.

Analiza AFLP odmian i populacji fasoli zwyczajnej wykonana metodą UPGMA/Jaccard pokazała że odmiany fasoli zwyczajnej grupują się oddzielnie. Analiza PCoA wyodrębniła 2 (ewentualnie 3 w zależności od interpretacji) skupienia, przy czym odmiany hodowlane zgromadzone zostały w grupie oddzielonej od populacji miejscowych. Zbliżone grupowania dała również analiza baysianowska. Wyodrębniane zostały również dwie grupy danych wykazujące podobny rozkład badanych populacji fasoli zwyczajnej jak w przypadku UPGMA i PCoA.

Uwzględniony w analizie materiał badawczy obejmował obszerną kolekcję odmian o różnym przeznaczeniu, formie uprawy i własnościach użytkowych. Szerokie spektrum odmian uwzględnionych w analizach, reprezentujących różne cechy hodowlane, a wprowadzone do uprawy na terenie Polski przez ostatnie 50 lat ubiegłego wieku, miało być punktem odniesienia w stosunku do miejscowych populacji i zwiększyć prawdopodobieństwo znalezienia ich genetycznych odpowiedników wśród badanych populacji miejscowych zebranych na terenie Polski. Otrzymane wyniki nie pozwalają na takie porównania, gdyż

wszystkie odmiany hodowlane, które zostały wykorzystane w badaniach, tworzyły albo jedno skupienie, jak w analizie PCoA albo wspólne agregowały na jednej z gałęzi dendrogramu w analizie aglomeracyjnej, a w analizie struktury tworzyły samodzielne podstruktury drugiego rzędu.

Przyczyn takiego stanu rzeczy można doszukiwać się w tym, że populacje miejscowe warunkowane biologią rozmnażania się tego gatunku przekrzyżowują się w innym spektrum dostępnej zmienności, kształtowanym warunkami klimatyczno-środowiskowymi. Wynikiem takiego rozdziału może być również to, iż hodowcy chętniej wykorzystują do krzyżowań materiał będący w ich posiadaniu, tym samym utrwalając różnice pomiędzy odmianami i populacjami miejscowymi (Góral i in., 2010).

Wyniki grupowania odmian fasoli zwyczajnej wykonane na podstawie szeregu cech morfologicznych i użytkowych nasion w oparciu o analizę skupień i analizę PCoA dały nieco odmienne rezultaty niż analiza skupień dla danych AFLP tych materiałów. Wprawdzie obie analizy wykazywały identyczną liczbę grup, jednak ich liczebność oraz skład był w dużej mierze odmienny. Na to, że cechy morfologiczne czy użytkowe roślin nie powinny być podstawą w ocenie zróżnicowania odmian lub populacji wskazuje szereg badaczy (Tar'an i in., 2005; Duminil i Di Michele, 2009) sugerując, że badania zróżnicowania oparte o metody molekularne i cechy morfologiczne oraz użytkowe powinny się wzajemnie uzupełniać. Dowodzi tego też analiza skupień (UPGMA/Jaccard), wykonana na bazie markerów AFLP. Pokazała ona, że nie wszystkie odmiany o tej samej nazwie agregują ze sobą we wspólnych skupieniach, choć na bazie danych morfologicznych i cech użytkowych występują w obrębie tej samej grupy.

Analiza struktury genetycznej wykonana zarówno UPGMA, PCoA jak i statystyką baysianowską pokazała, że badane materiały tworzyły dwie główne grupy reprezentowane zarówno przez odmiany i populacje miejscowe. Bardziej szczegółowa analiza wyników sugeruje, że odmiany mogą stanowić odrębną podgrupę, co pokazała zarówno analiza PCoA, jak i analizy struktur drugorzędowych.

Należy zwrócić uwagę, że powstałe skupienia dla wszystkich wykorzystanych metod pod względem genetycznym grupują razem populacje miejscowe pochodzące z południowej, centralnej i północnej Polski, oraz z regionów północno i południowowschodnich (Nizina Północnopodlaska, Nizina Południowopodlaska, Polesie Zachodnie i Polesie Wołyńskie).

Otwartą kwestią pozostaje hipoteza sugerująca, że identyfikowane metodami molekularnymi oraz analizami statystycznymi podziały pomiędzy badanymi próbkami fasoli zwyczajnej są wynikiem pierwotnego pochodzenia z odmiennych centrów różnicowania się gatunku. Na korzyść stwierdzenia o występowaniu w Europie, a więc i w Polsce, materiałów pochodzących z dwóch centrów przemawiają prace wielu naukowców opierające się na badaniach morfologicznych, fitopatologicznych, biochemicznych czy też genetycznych (Gepts i Bliss, 1985; Gepts i in., 1986; Haley i in., 1994; Beebe i in., 2000, 2001; Kwak i Gepts, 2009). Zakładając jednak, że taki podział był wynikiem zmienności materiałów ze względu na pierwotne centra różnicowania się fasoli, rozłożenie geograficzne prób powinno wskazywać, że fasole pochodzące z andyjskiego centrum różnicowania się tego gatunku występują w północnych i południowych regionach Polski i są częściej spotykane. Wynika to z nierównocennej frekwencji genotypów reprezentatywnych dla wyodrębnionych pól genowych oraz z faktu, że z Ameryki Południowej i Ameryki Środkowej została sprowadzona do Europy ograniczona liczba nasion fasoli (Escribano i in., 1998). W Europie andyjski typ dominuje na półwyspie Iberyjskim, we Włoszech oraz Centralnej i Północnej Europie (Sicard i in., 2005). W Europie Wschodniej częściej są spotykane fasole typu mezoamerykańskiego (Papa i in., 2006). Dokładnie zjawisko to opisała Angioi, która badała rozprzestrzenianie się fasoli w Europie (Angioi i in., 2010). Stwierdziła ona, że 67% europejskich odmian miejscowych ma pochodzenie andyjskie. Zaobserwowała również duży udział genotypów będących

mieszkańcami między andyjską a mezoamerykańską pulą genową, przy czym ich rozkład geograficzny nie był równomierny i charakteryzował się wysoką frekwencją tych mieszkańców w Europie Centralnej. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki struktury genetycznej populacji miejscowych występujących w Polsce oraz dane literaturowe dotyczące na jakich obszarach Europy mogą występować genotypy z poszczególnych centrów, hipoteza o występowaniu na terytorium Polski fasoli zwyczajnej pochodzącej z różnych centrów różnicowania się gatunku wydaje się prawdopodobna.

Europa, a tym samym i Polska, może być miejscem wtórnego różnicowania się tego gatunku. Zostało to zasugerowane na podstawie analiz cech morfologicznych biochemicznych i genetycznych przez szereg badaczy (Rodiño i in., 2003; Santalla i in., 2002; Angioi i in., 2010; Lioi i Piergiorganni, 2013). Uzyskane wyniki z każdej zastosowanej metody analizy danych wydają się potwierdzać taką możliwość, ponieważ populacje miejscowe fasoli zwyczajnej pochodzące z makroregionów wschodniej Polski na tyle różnią się od pozostałych badanych prób tego gatunku, że można uznać, iż tworzą one oddzielną grupę. Tereny te potencjalnie można też traktować jako wtórne centrum różnicowania się tego gatunku w Polsce, zwłaszcza że pula genetyczna populacji miejscowych wydaje się być inna niż badanych odmian hodowlanych. Nie można jednak wykluczyć, że obserwowany podział badanych populacji miejscowych na dwie grupy może być wynikiem selekcyjnej presji środowiska, sposobu uprawy lub np. preferencji konsumentów zamieszkujących dane regiony.

O wpływach presji środowiska czy też sposobu uprawy można domniemywać na podstawie analizy rozmieszczenia geograficznego badanych populacji, gdyż fasola, jako roślina warzywna, uprawiana jest w przydomowych ogrodach, na działkach lub poletkach w stosunkowo małych ilościach i głównie na własne potrzeby gospodarstw domowych. Wynikiem takiego sposobu uprawy może być obserwowane wysokie zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi populacjami miejscowymi pokazane przez analizy AMOVA i słabsze powiązania z odmianami hodowlanymi.

Jednym z zadań banków genów jest pełne zachowanie zmienności genetycznej roślin. Jedno z podejść polega na tworzeniu kolekcji podstawowych odzwierciedlających strukturę genetyczną populacji (Kim i in., 2007). Wytypowane kolekcje na podstawie analizy molekularnej charakteryzowały się niską wartością współczynnika różnicy średnich (MD%) dla odmian i nieco wyższą wartością dla populacji miejscowych. Wartość tego współczynnika wskazała, że średnia wartość cech w wytypowanych kolekcjach podstawowych na bazie analizy genetycznej jest zbliżona do średniej całej kolekcji badanych odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej. Niska wartość różnicy wariancji - VD% (15,74%) wskazuje, że wariancja kolekcji podstawowej odmian utworzonej na podstawie markerów AFLP, różni się nieznacznie od wariancji dla całej kolekcji.

Niskie MD% i VD% oraz wysokie VR% i sugerują, że podzbiór kolekcji podstawowej zapewnia właściwą reprezentację genetycznej różnorodności wyjściowej kolekcji odmian i populacji fasoli. Wśród populacji miejscowych wybranych przez program PowerCore jako te, które pokrywają sobą największe obserwowane spektrum zmienności większość stanowiły populacje ze wschodniej i południowo wschodniej Polski (Nizina Północnopodlaska, Nizina Południowopodlaska, Polesie Zachodnie) oraz zebrane w makroregionie Wzniesienia Południowomazowieckie. To szerokie spektrum zmienności obserwowane dla tych populacji miejscowych wynika z nadal zachowanego tradycyjnego modelu uprawy fasoli na tamtych terenach, gdzie brak systematycznej wymiany nasion na nowe odmiany i wysiewanie ich z roślin uprawianych w latach ubiegłych, skutkuje utrwaleniem cech i obserwowaną różnorodnością populacji miejscowych pochodzących z tych regionów. Uzyskane wyniki sugerują więc, że badane populacje miejscowe fasoli wykazują dużą różnorodność genetyczną, stanowiącą potencjał do tworzenia nowych odmian o zróżnicowanych cechach, zależnych

między innymi od czynników środowiskowych. Można oczekiwać, że miejscowe populacje fasoli zwyczajnej mogą dysponować zmiennością genetyczną determinującą odporność na patogeny i niekorzystne warunki klimatyczne.

6. Wnioski

1. Użyteczność wybranej metody doboru markerów do przeprowadzonych analiz molekularnych została potwierdzona. Błąd eksperymentalny nie przekraczał 1%.
2. Wykorzystany w niniejszej pracy system markerowy jest właściwym, powtarzalnym narzędziem analitycznym, pozwalającym na opis kolekcji i ocenę zróżnicowania genetycznego.
3. Wykorzystanie markerów uzyskanych metodą AFLP pozwala na odróżnienie gatunku *Phaseolus coccineus* od *Phaseolus vulgaris*.
4. Analiza struktury danych sugeruje występowanie co najmniej dwóch pul genowych fasoli zwyczajnej uprawianej w Polsce, które są powiązane z regionem występowania.
5. Dwie pule genowe mogą odzwierciedlać centra pochodzenia i/lub wtórne centrum różnicowania fasoli zwyczajnej.
6. Pula genetyczna populacji miejscowych fasoli jest szersza niż badanych odmian hodowlanych.
7. Badane populacje miejscowe stanowią odrębną pulę genową, która potencjalnie może być wykorzystana w pracach hodowlanych.
8. Badane odmiany i populacje miejscowe fasoli zwyczajnej uprawiane w Polsce różnią się między sobą, ale nie wykazują silnego ustrukturyzowania sugerującego istotną odrębność tych materiałów.
9. Kolekcję podstawową fasoli zwyczajnej zgromadzonej w KCRZG tworzy 40,6% odmian i populacji wykorzystanych w analizach, o różnym pochodzeniu, które dobrze reprezentują zmienność genetyczną całej kolekcji.

7. Literatura

- Angioi, S. A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., i in. (2010). Beans in Europe: Origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 121, 829–843. doi:10.1007/s00122-010-1353-2.
- Bataillon, T. M., and David, J. L. (1996). Neutral genetic markers and conservation genetics: Simulated germplasm collections. *Genetics* 144, 409–417. doi:10.1007/978-1-4020-9005-9_14.
- Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M. C., and Tohme, J. (2001). Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Sci.* 41, 854–862.
- Beebe, S., Skroch, P. W., Tohme, J., Duque, M. C., Pedraza, F., and Nienhuis, J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Sci.* 40, 264–273. doi:10.2135/cropsci2000.401264x.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. *Plant Soil* 252, 55–128. doi:10.1023/A:1024146710611.
- Ceylan, A., Öcal, N., and Akbulut, M. (2014). Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markers. *Biochem Syst Ecol.* 54, 219–229. doi:10.1016/j.bse.2014.01.014.

Duminil, J., and Di Michele, M. (2009). Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosyst.* 143, 528–542. doi:10.1080/11263500902722964.

Escribano, M. R., Santalla, M., Casquero, P. A., and De Ron, A. M. (1998). Patterns of genetic diversity in landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. *Plant Breed.* 117, 49–56. doi:10.1111/j.1439-0523.1998.tb01447.x.

Gepts, P., and Bliss, F. A. (1985). Differential geographic origin of F1 hybrid weakness-inducing genes suggesting two gene pools in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Hered.* 76, 447–450.

Gepts, P., Osborn, T. C., Rashka, K., and Bliss, F. A. (1986). Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) – evidence for multiple centers of domestication. *Econ. Bot.* 40, 451–468.

Góral, H., Stojakowski, S., Tyrka, M., and Wedzony, M. (2010). Inheritance of fertility restoration in winter triticale with cytoplasm of *Triticum timopheevi*. *Folia Pomeranae Univ. Technol. Stetin. Agric. Aliment. Piscaria Zootech.* 13, 11–18.

Haley, S., Miklas, P., Afanador-Kafuri, L., and Kelly, J. (1994). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker Variability between and within Gene Pools of Common Bean. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 119, 122–125. doi:10.21273/JASHS.119.1.122.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223–270.

Karg, R. L., and Thompson, G. L. (1964). A Heuristic Approach to Solving Travelling Salesman Problems. *Manag. Sci.* 10, 225–248. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2627296>.

Khaidizar, M. I., Haliloglu, K., Elkoca, E., Aydin, M., and Kantar, F. (2012). Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces grown in northeast anatolia of turkey assessed with simple sequence repeat markers. *Turk. J. F. Crop.* 17, 145–150.

Kim, K.-W., Chung, H.-K., Cho, G.-T., Ma, K.-H., Chandrabalan, D., Gwag, J.-G., i in. (2007). PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. *Bioinformatics* 23, 2155–62. doi:10.1093/bioinformatics/btm313.

Kondracki, J. (2002). *Geografia Regionalna Polski*. Warszawa: PWN.

Kwak, M., and Gepts, P. (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor. Appl. Genet.* 118, 979–992. doi:10.1007/s00122-008-0955-4.

Lioi, L., and Piergiovanni, A. R. (2013). “European common bean,” in *Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement* (Elsevier).

Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P., and Dinelli, G. (2007). Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 175–188. doi:10.1007/s10722-005-3133-4.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Press, New York.

Papa, R., and Gepts, P. (2003). Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.* 106, 239–250. doi:10.1007/s00122-002-1085-z.

Papa, R., Nanni, L., Sicard, D., Rau, D., and Attene, G. (2006). “The evolution of genetic diversity in *Phaseolus vulgaris* L.,” in *New Approaches to the Origins, Evolution and Conservation of Crops. Darwin’s Harvest*, eds. T. J. Motley, N. Zerega, and H. Cross (Columbia University Press, New York), 121–142.

Peakall, R., and Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460.

Peter, H., Sneath, A., and Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH Freeman.

Pritchard, J. K., Wen, X., and Falush, D. (2010). Documentation for STRUCTURE software, version 2.3. University of Chicago, Chicago, IL.

Protocol, A. P. M. (1997). Perkin-Elmer Corporation.

Qi-Lun, Y., Ping, F., Ke-Cheng, K., and Guang-Tang, P. (2008). Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. *J. Genet.* 87, 287–291. doi:10.1007/s12041-008-0046-y.

Rodiño, A. P., Santalla, M., De Ron, A. M., and Singh, S. P. (2003). A core collection of common bean from the Iberian Peninsula. *Euphytica* 131, 165–175. doi:10.1023/A:1023973309788.

Santalla, M., Rodiño, A. P., and De Ron, A. M. (2002). Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for the common bean. *Theor. Appl. Genet.* 104, 934–944. doi:10.1007/s00122-001-0844-6.

Schoen, D. J., and Brown, A. H. D. (1993). Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10623–10627. doi:10.1073/pnas.90.22.10623.

Sokal, R. R., and Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systemic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409–1438.

Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A., and Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48, 257–72.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. Van De, Hornes, M., et al. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414. doi:10.1093/nar/23.21.4407.

Woodworth, G. G. (2004). *Biostatistics: a Bayesian introduction*. Wiley-Interscience.

Zhang, X., Blair, M. W., and Wang, S. (2008). Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 117, 629–640. doi:10.1007/s00122-008-0807-2.