

MOLEKULARNA IDENTYFIKACJA USTALONYCH I MIESZAŃCOWYCH FORM *CAPSICUM ANNUUM* L. Z WYKORZYSTANIEM MARKERÓW RAPD

Aleksandra Niklas-Nowak✉, Dorota Olszewska
UTP w Bydgoszczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

Streszczenie. Celem badań była molekularna analiza odmian *C. annuum* L.: ‘Sono’, ‘Anchi’, ‘Mino’, androdiploidalnych linii: R1 i R18 oraz mieszańców pokolenia F₁: (‘Sono’×‘Anchi’), (‘Anchi’×‘Sono’), (‘Sono’×‘Mino’), (‘Mino’×‘Sono’), (‘Sono’×R1), (R1×‘Sono’), (‘Sono’×R18), (R18×‘Sono’). Wyboru komponentów rodzicielskich do krzyżowań zwrotnych dokonano na podstawie oceny biometrycznej obejmującej najważniejsze cechy roślin i owoców papryki. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wykazała wysoką wartość użytkową ocenianych genotypów oraz ich zróżnicowanie pod względem analizowanych parametrów. Do identyfikacji form rodzicielskich i mieszańców zwrotnych zastosowano 21 starterów RAPD. Uzyskano 174 produkty, z których 16 (9,2%) stanowiły prążki polimorficzne. Ich obecność pozwoliła na rozróżnienie wszystkich odmian i linii *C. annuum* L. oraz potwierdziła mieszańcowy charakter analizowanych pokoleń F₁. W przypadku mieszańców zwrotnych możliwe było rozróżnienie form: (‘Sono’×R18)F₁, (R18×‘Sono’)F₁ oraz (‘Sono’×R1)F₁, (R1×‘Sono’)F₁.

Słowa kluczowe: *Capsicum annuum* L., analiza biometryczna, PCR-RAPD, mieszańce zwrotne

WSTĘP

Wysoka wartość biologiczna owoców papryki, obfitujących w witaminy, cukry, kwasy organiczne, karotenoidy, a także makroelementy i mikroelementy, sprawia, że są one istotnym składnikiem diety człowieka. Ponadto właściwości prozdrowotne powodują, że znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle przetwórczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym [Deepa i in. 2007, Jakubas i in. 2013]. W zależności od kierunku użytko-

✉niklas@utp.pl

wania oczekuje się odmian o owocach zróżnicowanych co do wielkości, kształtu i barwy. Dla przemysłu przyprawowego atrakcyjne są owoce o wysokiej zawartości suchej masy i ekstraktu oraz o grubym perykarpie, z kolei konsumenci preferują owoce duże, o gładkim perykarpie i nieuszkodzonej skórce. Wymagania te, choć odmienne mogą być zaspokojone dzięki hodowli twórczej. Szczególne znaczenie mają tu formy mieszańcowe, które łączą wysokie parametry użytkowe i jednocześnie zapewniają odpowiednie walory jakościowe owoców [Ganeshreddy i in. 2008, Finger i in. 2010, Jakubas i in. 2013]. W prowadzonych obecnie programach hodowlanych obok opisów biometrycznych wykorzystuje się markery molekularne. W przypadku genotypów z rodzaju *Capsicum* spp. z powodzeniem stosowana jest metoda PCR-RAPD, która umożliwia badanie różnorodności genetycznej, identyfikację form mieszańcowych i linii podwojonych haploidów, badanie filogenezy oraz charakterystykę zasobów genowych. Ogromnymi zaletami tego systemu są szybkość, wydajność i stosunkowo niski koszt analiz w porównaniu z innymi technikami [Sztuba-Solińska 2005, Thul i in. 2012, Olszewska i in. 2015].

Celem badań była identyfikacja za pomocą markerów RAPD odmian i androdiploidalnych linii *C. annuum* L. oraz mieszańców zwrotnych pokolenia F_1 . Wstęp do zaplanowanego eksperymentu stanowiła agromorfologiczna ocena materiałów hodowlanych, która pozwoliła na wyselekcjonowanie wartościowych pod względem użytkowym genotypów do krzyżowań.

MATERIAŁ ROŚLINNY

Materiał wyjściowy do badań stanowiły odmiany *C. annuum* L.: ‘Sono’, ‘Anchi’, ‘Mino’ oraz androdiploidalne linie: R1 i R18. Linia R1 została wyprowadzona w kulturach pylników mieszańca wewnątrzgatunkowego F_1 (*C. annuum* L. ATZ1×‘Portos’), a linia R18 z mieszańca wewnątrzgatunkowego F_1 (*C. annuum* L. ATZ1×‘Corno di Toro’). Wymienione odmiany i linie użyto jako formy rodzicielskie do krzyżowań zwrotnych: (‘Sono’×‘Anchi’), (‘Anchi’×‘Sono’), (‘Sono’×‘Mino’), (‘Mino’×‘Sono’), (‘Sono’×R1), (R1×‘Sono’), (‘Sono’×R18), (R18×‘Sono’). Uprawę form rodzicielskich i mieszańców F_1 prowadzono w nieogrzewanych tunelach foliowych, w układzie trzypowtórzeniowego doświadczenia porównawczego. Wszystkie materiały hodowlane pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii Rolniczej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

METODY

Do oceny morfologicznej genotypów rodzicielskich wybrano losowo po pięć roślin, dla których określono plon owoców i liczbę owoców z rośliny. Następnie szczegółowej analizie biometrycznej poddano po trzy owoce z każdej rośliny. Oceniono masę owocu bez szypułki, długość i szerokość owocu, masę technologiczną, masę perykarpu, liczbę komórek, grubość ścian owocu i masę nasion mokrych. Ponadto obliczono wydajność technologiczną wyrażoną stosunkiem masy technologicznej do masy owocu bez szypułki.

Wyniki przeprowadzonych analiz biometrycznych opracowano statystycznie z zastosowaniem programu Statistica, przeprowadzono analizę wariancji oraz test Tukeya.

Do oceny molekularnej form rodzicielskich i mieszańców zwrotnych pobrano po 100 mg tkanki młodych, zdrowych liści z trzech roślin każdego genotypu. Izolację genomowego DNA przeprowadzono z użyciem zestawu GenElute Plant Genomic (Sigma-Aldrich), czystość oceniono elektroforetycznie i spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c/2000, Thermo Scientific). Stężenie DNA w próbach wyrównano, do reakcji PCR pobrano po 20 ng genomowego DNA. Do amplifikacji DNA użyto 0,5 jednostki polimerazy *Taq* (A&A Biotechnology) oraz 21 markerów RAPD (Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN), których sekwencję przedstawiono w tabeli 1. Reakcję PCR-RAPD przeprowadzono według metody opracowanej dla *C. annuum* L. [Olszewska i in. 2017] w termocyklerze ATC 401 Thermal Cycler. Wszystkie reakcje powtórzono dwukrotnie, w analizie statystycznej uwzględniono powtarzalne prążki, których identyfikacja nie budziła wątpliwości. Produkty reakcji PCR-RAPD rozdzielono w 1,8% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Elektroforezę prowadzono przez dwie godziny pod napięciem 100 mV. Wielkość otrzymanych produktów określono z użyciem markera mas cząsteczkowych GPB 3000bp DNA Ladder Mix (GenoPlast Bio-

Tabela 1. Charakterystyka starterów wykorzystanych w reakcji PCR-RAPD

Table 1. Characteristics of primers used in PCR-RAPD reaction

Nazwa i sekwencja starterów Name and sequence of primers 5' → 3'	Wielkość produktów (pz) Size of products (bp)	Całkowita liczba prążków Total number of bands	Liczba prążków polimorficznych Number of polymorphic bands
A01 – CAGGCCCTTC	194–1330	8	0
A04 – AATCGGGCTG	128–1421	9	0
A06 – GGTCCCTGAC	144–1604	8	0
A07 – GGTCCCTGAC	229–770	6	0
A08 – GAAACGGGTG	129–1927	8	0
A09 – GGGTAACGCC	125–1990	10	1
A10 – GTGATCGCAG	213–1446	10	0
A11 – CAATCGCCGT	138–1503	9	5
A12 – TCGGCGATAG	151–2030	7	0
A15 – TTCCGAACCC	154–2069	9	0
A16 – AGCCAGCGAA	180–1180	8	0
A17 – GACCGCTTGT	181–2122	9	0
A19 – CAAACGTCGG	143–1225	6	0
AE11 – AAGACCGGGA	165–1870	5	1
AB09 – GGGCGACTAC	290–2689	11	4
AE10 – CTGAAGCGCA	310–1893	8	3
D12 – CACCGTATCC	158–2037	7	0
Q7 – CCCCGATGGT	192–2118	11	1
RAD01 – TCCTACGCAC	258–2120	6	1
RAD07 – CAAACGTCCC	118–1242	9	0
V06 – ACGCCCAGGT	203–1381	10	0

chemicals) oraz programu komputerowego GelAnalyzer 2010a. Do wizualizacji i archiwizacji uzyskanych fragmentów DNA zastosowano transiluminator Gel Doc 2000 UV. Dystans genetyczny między badanymi genotypami określono, korzystając z formuły Nei i Li [1979]. Dendrogram skonstruowano metodą UPGMA przy zastosowaniu programu komputerowego TREECON.

WYNIKI I DISKUSJA

Zwiększenie zmienności genetycznej wśród roślin uprawnych jest najistotniejszym zadaniem programów hodowlanych. Cel ten może być realizowany zarówno w wyniku krzyżowań wewnątrzgatunkowych, jak i między różnymi gatunkami. Takiego zróżnicowania poszukuje się także w obrębie *C. annuum* L. [Sanatombi i in. 2010, Thul i in. 2012]. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na skuteczność hodowli jest odpowiedni dobór genotypów, przekładający się na obecność pożądaných cech agromorfologicznych i właściwości uzyskiwanych owoców. W przetwórstwie warzywnym pożądanę są wysokopienne odmiany charakteryzujące się grubościennymi owocami, wyrównanymi pod względem wielkości i kształtu, dlatego w hodowli papryki analizie poddaje się cechy morfologiczne, mające decydujący wpływ na pożądanę przez konsumentów parametry jakościowe owoców [Ayuso i in. 2008, Rożek i in. 2012, Jakubas i in. 2013]. W prezentowanym doświadczeniu opracowanie statystyczne wyników biometrycznych wykazało zróżnicowanie między badanymi odmianami i liniami (tab. 2). Najbardziej wydajna pod względem plonu i liczby owoców z rośliny była odmiana 'Anchi'. Test Tukeya wykazał, że pod względem wymienionych parametrów odmiana ta stanowiła statystycznie odrębną grupę. Odmiana 'Mino' charakteryzowała się najwyższą masą owocu bez szypułki, masą technologiczną i masą perykarpu. W przypadku androgenicznych linii R1 i linii R18 uzyskano wysokie wartości masy owocu bez szypułki, masy technologicznej oraz masy perykarpu, porównywalne z odmianami 'Anchi' i 'Sono'. Te ważne pod względem gospodarczym cechy zdecydowały o włączeniu androdiploidalnych linii R1 i R18 do krzyżowań zwrotnych. Analizowane w doświadczeniu genotypy nie wykazały istotnych różnic statystycznych pod względem wydajności technologicznej, jednak wysokie wartości tego parametru (powyżej 75%) potwierdziły, że stanowią one cenny surowiec dla przemysłu przetwórczego (tab. 2).

Prace hodowlane prowadzące do powstania nowych odmian w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych wymagają potwierdzenia mieszańcowego charakteru powstałych osobników, jednak ich identyfikacja na podstawie cech morfologicznych nie zawsze jest możliwa [Orlikowska i in. 2001, Costa i in. 2006]. Problem ten dotyczy przede wszystkim blisko spokrewnionych genotypów, kiedy niewielkie różnice fenotypowe uniemożliwiają jednoznaczną interpretację wyników. W takim przypadku identyfikację odmian, linii i mieszańców *C. annuum* L. można przeprowadzić na poziomie molekularnym [Ballester i Vincente 1998, Costa i in. 2006, Prasad i in. 2013]. W doświadczeniu przeprowadzono analizę mieszańców zwrotnych i ich form wyjściowych z użyciem 21 markerów RAPD (tab. 1). Zastosowane startery generowały 174 produkty, z których 16 (9,2%) było prążkami polimorficznymi (rys. 1). Wielkość otrzymanych produktów mieściła się w zakresie od 118 do 2122 pz. W literaturze znajduje się wiele przykładów

Tabela 2. Charakterystyka biometryczna analizowanych form *C. annuum* L.Table 2. Biometric characteristics of the analyzed genotypes of *C. annuum* L.

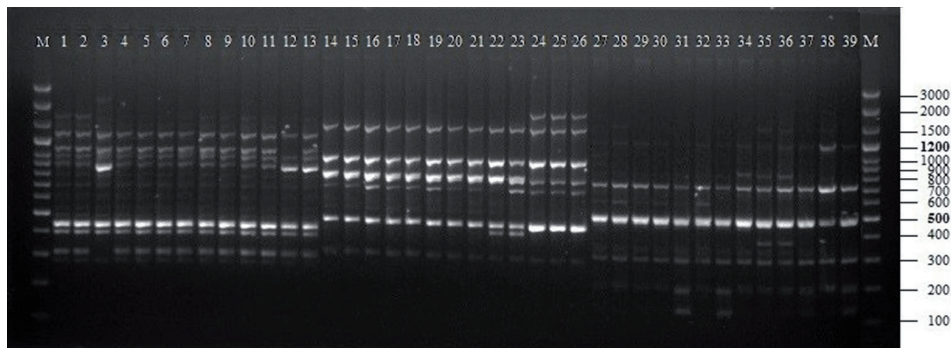
Genotyp Genotype	'Sono'	'Anchi'	'Mino'	R1	R18
Plon owoców z rośliny Fruit yield per plant [g]	1114,30 ^{a*}	1740,63 ^b	1162,47 ^{ab}	1194,71 ^{ab}	1326,24 ^{ab}
Liczba owoców z rośliny Number of fruit per plant	10,67 ^{a*}	19,33 ^b	6,33 ^a	9,67 ^a	9,33 ^a
Masa owocu bez szypułki Weight of fruit without stalk [g]	119,18 ^{ab}	110,22 ^a	208,32 ^c	149,96 ^b	138,53 ^{ab}
Długość owocu Fruit length [mm]	88,07 ^a	138,24 ^b	102,71 ^a	88,41 ^a	150,91 ^b
Szerokość owocu Fruit width [mm]	76,71 ^b	56,79 ^a	90,97 ^c	77,32 ^b	56,14 ^a
Masa technologiczna Technological mass [g]	101,04 ^a	98,04 ^a	174,09 ^b	123,31 ^a	114,45 ^a
Masa perykarpu Pericarp mass [g]	108,65 ^a	102,94 ^a	193,82 ^b	131,08 ^a	121,70 ^a
Liczba komór Number of chambers	3,33 ^{**}	3,44 ^{**}	3,44 ^{**}	2,78 ^{**}	3,44 ^{**}
Grubość ścian owocu Wall thickness of the fruit [mm]	5,65 ^{ab}	5,84 ^a	5,74 ^a	5,77 ^a	4,90 ^b
Masa nasion mokrych Weight of wet seeds [g]	1,95 ^a	2,28 ^a	3,41 ^b	4,91 ^c	2,82 ^{ab}
Wydajność technologiczna Technological efficiency [%]	84,78 ^{**}	88,95 ^{**}	83,57 ^{**}	82,23 ^{**}	82,62 ^{**}

* Wartości dla określonej cechy (w wierszu) oznaczone tą samą literą nie są istotnie zróżnicowane dla $\alpha = 0,05$ (test Tukeya) – Values for defined traits (in line) signed with the same letter are not significantly different at $\alpha = 0.05$ (Tukey's test).

** Wartości dla określonej cechy (w wierszu) nie są istotnie zróżnicowane dla $\alpha = 0,05$ – Values for defined traits (in line) are not significantly different at $\alpha = 0.05$.

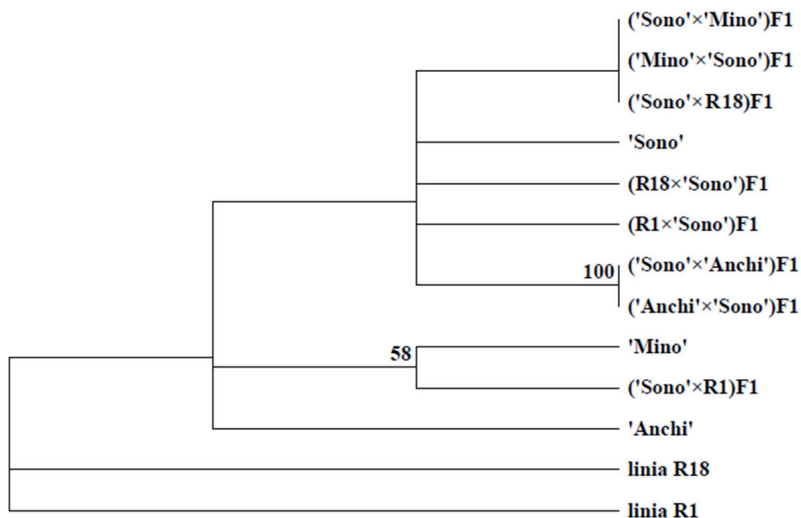
dotyczących polimorfizmu w obrębie *C. annuum* L. Zdaniem autorów, prezentowany poziom zróżnicowania zależy od testowanych genotypów oraz liczby użytych starterów [Vazquez i in. 1996, Subramanyam i in. 2012, Peeraullee i Ranghoo-Sanmukhiya 2013]. Wyniki otrzymane w doświadczeniu zbliżone są pod względem liczby otrzymanych produktów polimorficznych ilości polimorficznego DNA oraz ich wielkości do wartości uzyskanych dla *C. annuum* L. przez Ilbi [2003].

Szacowanie odległości genetycznej między genotypami pozwala na ustalenie podobieństw genetycznych występujących między nimi. Otrzymane informacje mogą być wykorzystane w pracach hodowlanych prowadzonych w celu genetycznego doskonalenia odmian. Na podstawie przeprowadzonych analiz obliczono współczynniki dystansu genetycznego, które dla ocenianych genotypów przyjmowały wartości od 0 do 0,037 (tab. 3). Skonstruowano także dendrogram ilustrujący stopień zróżnicowania genetycznego między formami rodzicielskimi i mieszańcami zwrotnymi (rys. 2). Uzyskane wyniki pozwoliły na rozróżnienie wszystkich genotypów użytych do krzyżowań, wskazując



Rys. 1. Produkty reakcji PCR-RAPD generowane przez startery AB09 (1–13), AE10 (14–26), A11 (27–39); M-marker, genotypy – ('Sono'×'Anchi')F₁: 1, 14, 27; ('Anchi'×'Sono')F₁: 2, 15, 28; 'Anchi': 3, 16, 29; 'Sono': 4, 17, 30; ('Sono'×'Mino')F₁: 5, 18, 31; ('Mino'×'Sono')F₁: 6, 19, 32; 'Mino': 7, 20, 33; ('Sono'×R1)F₁: 8, 21, 34; (R1×'Sono')F₁: 9, 22, 35; R1: 10, 23, 36; ('Sono'×R18)F₁: 11, 24, 37; (R18×'Sono')F₁: 12, 25, 38; R18: 13, 26, 39

Fig. 1. PCR-RAPD products generated by: AB09 (1–13), AE10 (14–26), A11 (27–39); M-marker, genotypes – ('Sono'×'Anchi')F₁: 1, 14, 27; ('Anchi'×'Sono')F₁: 2, 15, 28; 'Anchi': 3, 16, 29; 'Sono': 4, 17, 30; ('Sono'×'Mino')F₁: 5, 18, 31; ('Mino'×'Sono')F₁: 6, 19, 32; 'Mino': 7, 20, 33; ('Sono'×R1)F₁: 8, 21, 34; (R1×'Sono')F₁: 9, 22, 35; R1: 10, 23, 36; ('Sono'×R18)F₁: 11, 24, 37; (R18×'Sono')F₁: 12, 25, 38; R18: 13, 26, 39



Rys. 2. Dendrogram genotypów *C. annuum* L. uzyskany metodą UPGMA

Fig. 2. Dendrogram of *C. annuum* L. genotypes with UPGMA cluster analysis

Tabela 3. Współczynniki dystansu genetycznego między formami *C. annuum* L.

Table 3. Coefficients of genetic distance between *C. annuum* L. genotypes

Genotyp Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 ('Sono'×'Anchi')F ₁	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2 ('Anchi'×'Sono')F ₁	0,000	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3 'Anchi'	0,011	0,011	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4 'Sono'	0,014	0,014	0,025	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5 ('Sono'×'Mino')F ₁	0,009	0,009	0,019	0,006	0,000	–	–	–	–	–	–	–	–
6 ('Mino'×'Sono')F ₁	0,009	0,009	0,019	0,006	0,000	0,000	–	–	–	–	–	–	–
7 'Mino'	0,017	0,017	0,023	0,020	0,014	0,014	0,000	–	–	–	–	–	–
8 ('Sono'×R1)F ₁	0,014	0,014	0,025	0,017	0,014	0,014	0,009	0,000	–	–	–	–	–
9 R1	0,028	0,028	0,028	0,019	0,026	0,026	0,034	0,037	0,000	–	–	–	–
10 (R1×'Sono')F ₁	0,009	0,009	0,014	0,017	0,011	0,011	0,014	0,017	0,031	0,000	–	–	–
11 ('Sono'×R18)F ₁	0,006	0,006	0,017	0,009	0,003	0,003	0,017	0,014	0,023	0,014	0,000	–	–
12 (R18×'Sono')F ₁	0,011	0,011	0,023	0,009	0,009	0,009	0,017	0,002	0,023	0,020	0,006	0,000	–
13 R18	0,026	0,026	0,031	0,028	0,028	0,028	0,019	0,017	0,031	0,034	0,025	0,019	0,000

jednocześnie na ich bliskie pokrewieństwo. Wyodrębniono jednak linie R1 i R18, które różniły się najbardziej pod względem genetycznym od pozostałych ocenianych genotypów. Potwierdzono ponadto mieszańcowy charakter analizowanych pokoleń F_1 poprzez ich rozróżnienie od form matecznych i tym samym wykluczenie samozapylenia. W przypadku mieszańców zwrotnych możliwa była identyfikacja w obrębie par: ('Sono'×R18) F_1 , (R18×'Sono') F_1 oraz ('Sono'×R1) F_1 , (R1×'Sono') F_1 . W obu wariantach do krzyżowań użyto androdiploidalnych linii R1 i R18, które charakteryzował większy dystans genetyczny od pozostałych genotypów.

Na podstawie uzyskanych w doświadczeniu wyników stwierdzono, że technika PCR-RAPD jest użytecznym narzędziem w identyfikacji ustalonych i mieszańcowych genotypów *C. annuum* L. i może być z powodzeniem stosowana w programach hodowlanych papryki.

WNIOSKI

1. Ocena agromorfologiczna cech roślin i owoców wykazała zróżnicowanie między badanymi odmianami: 'Sono', 'Anchi', 'Mino' oraz liniami R1 i R18 *C. annuum* L. Potwierdziła również wysoką wartość technologiczną badanych form, co zdecydowało o ich wyborze jako komponentów do krzyżowań zwrotnych.
2. Zastosowanie 21 starterów RAPD pozwoliło na uzyskanie 9,2% produktów polimorficznych, które umożliwiły identyfikację wszystkich odmian i linii użytych do krzyżowań.
3. Technika PCR-RAPD potwierdziła mieszańcowy charakter wszystkich pokoleń F_1 . W przypadku mieszańców zwrotnych możliwe było rozróżnienie form: ('Sono'×R18) F_1 i (R18×'Sono') F_1 oraz ('Sono'×R1) F_1 i (R1×'Sono') F_1 .

LITERATURA

- Ayuso M.C., Bernalte M.J., Lozano M., García M.I., de Espinosa V.M., Pérez M.M., Hernández M.T., Somogyi N., 2008. Quality characteristics of different red pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) for hot paprika production. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 557–563.
- Ballester J., Vicente M.C., 1998. Determination of F_1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica* 103, 223–226.
- Costa F.R., Pereira T.N.S., Vitória A.P., Campos K.P., Rodrigues R., Silva D.H., Pereira M.G., 2006. Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breed Appl. Biotechnol.* 6, 18–23.
- Deepa N., Kaur Ch., George B., Singh B., Kapoor H.C., 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT – Food Sci Technol.* 40, 121–129.
- Finger F.L., Lannes S.D., Schuelter A.R., Doege J., Comerlato A.P., Gonçalves L.S., Ferreira F.R., Clovis L.R., Scapim C.A., 2010. Genetic diversity of *Capsicum chinensis* (*Solanaceae*) accessions based on molecular markers and morphological and agronomic traits. *Genet. Mol. Res.* 9(3), 1852–1864.

- Ganeshreddy M., Mohan Kumar H.D., Salimath P.M., 2008. Heterosis studies in chillies (*Capsicum annuum* L.). Karnataka J. Agric. Sci. 21(4), 570–571.
- Ilbi H., 2003. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. Sci. Hort. 97, 211–218.
- Jakubas A., Cebula S., Kalisz A., Sękara A., 2013. Ocena wzrostu i plonowania polskich odmian papryki słodkiej (*Capsicum annuum* L.) w uprawie polowej. Episteme 1(20), 341–356.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci., 5269–5273.
- Olszewska D., Niklas-Nowak A., Kisiała A., Dzwonkowska M., Nowaczyk P., 2015. Agromorfologiczna i molekularna ocena linii podwojonych haploidów papryki (*Capsicum annuum* L.). Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln. 580, 95–104.
- Olszewska D., Niklas-Nowak A., Nowaczyk P., 2017. Estimation of genetic divergence within androgenic regenerants of *Capsicum annuum* L. ATZ1×*C. frutescens* F₁ Plants Using Random Amplified Polymorphic DNA markers. BioTechnology 3, 175–182.
- Orlikowska T., Wiejacha K., Marasek A., 2001. Identyfikacja roślinnych mieszańców oddalonych – przegląd metod. Biul. Inst. Hod. Rośl. 220, 3–22.
- Peeraullee N., Ranghoo-Sanmukhiya V.M., 2013. Assessment of genetic diversity in local chilli (*Capsicum annuum*) varieties in Mauritius. Int. J. Agr. Biol. 15, 891–896.
- Prasad B., Khan R.G., Radha T., Ravi Ch., Venkataiah P., Subhash K., Reuben T.Ch., 2013. DNA profiling of commercial chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Afr. J. Biotechnol. 12(30), 4730–4735.
- Rożek E., Nurzyńska-Wierdak R., Kosior M., 2012. The yield structure and technological traits of fruits of several sweet pepper cultivars from a single harvest. Acta Sci. Pol. Hortorum 11(5), 31–41.
- Sanatombi K., Sen-Mandi S., Sharma G.J., 2010. DNA profiling of *Capsicum* landraces of Manipur. Sci. Hort. 124, 405–408.
- Subramanyam K., Subramanyam K., Rajasekhar., Reddy C.S., 2012. Assessment of genetic relationships among South Indian chilli (*Capsicum annuum* L.) cultivars using RAPD and ISSR markers. Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol. 6(1), 48–52.
- Sztuba-Solińska J., 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54(2–3), 227–239.
- Thul S.T., Darokar M.P., Shasany A.K., Khanuja S.P.S., 2012. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. Mol. Biotechnol. 51(2), 137–147.
- Vazquez F.J.L.H., Jimenez J.M.C., Vico F.R., 1996. RAPD fingerprinting of pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding lines. Capsicum and Eggplant Newsletter. 16, 37–40.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF OPEN POLLINATED AND HYBRID GENOTYPES OF *CAPSICUM ANNUUM* L. USING OF THE RAPD MARKERS

Summary. The most important objective of breeding programmes is increasing the genetic diversity of cultivated plants. This objective can be achieved through intraspecies crossings and through crossings of different species. The source material used in the presented study comprised of *C. annuum* L. cultivars: ‘Sono’, ‘Anchi’, ‘Mino’ and androdiploid lines: R1 and R18. Their utility for interspecies crossings was assessed on the basis of statistical analysis of the most important agromorphological traits of pepper. ‘Anchi’ variety proved to be

the most productive when it comes to yield of fruit and the number of fruit from a plant. The Tukey's test shown that as long as these parameters are concerned, it was statistically a separate group. The biggest weight of fruit without the stalk, technological weight and pericarp weight were found in 'Mino' variety traits. High results of fruit weight, technological weight and pericarp weight, comparable with 'Anchi' and 'Sono' variety were achieved in case of androgenic lines R1 and R18. Because of these economically crucial traits, the androdiploid R1 and R18 lines were included in the crossings. 21 RAPD markers were used in the molecular analysis of the hybrids: ('Sono'×'Anchi'), ('Anchi'×'Sono'), ('Sono'×'Mino'), ('Mino'×'Sono'), ('Sono'×R1), (R1×'Sono'), ('Sono'×R18), (R18×'Sono') and their parental forms. DNA amplification was done with the application of *Taq* polymerase and the method for *C. annuum* L. was used for PCR-RAPD reaction. To define the size of the received products GPB 3000bp DNA Ladder Mix molecular mass marker and GelAnalyzer 2010a computer programme was used. Genetic distance between the genotypes from the study was defined using the formula of Nei and Li (1979). Dendrogram was constructed with UPGMA method with the application of TREECON computer programme. The starters generated 174 products and 16 of them (9.2%) were polymorphic bands. The size of the products ranged between 118 and 2,122 bp. Coefficients of the genetic distance were calculated on the basis of the analyses, which ranged from 0 to 0.037 for the assessed genotypes. A dendrogram illustrating the degree of genetic diversity between parental forms and reciprocal hybrids was also constructed. The results allowed to identify all genotypes used for crossings and indicated their close relationship with R1 and R18 lines forming separate groups. Moreover, hybrid nature of the analyzed F₁ generations was confirmed through their distinction from maternal forms that allowed to exclude self-pollination. In case of reciprocal hybrids identification within the following pairs was possible: ('Sono'×R18)F₁, (R18×'Sono')F₁ and ('Sono'×R1)F₁, (R1×'Sono')F₁. In both variants androdiploid lines R1 and R18 were used as they had a bigger genetic distance than the other genotypes.

Key words: *Capsicum annuum* L., biometrical analysis, PCR-RAPD, reciprocal hybrids