

<sup>1</sup> Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

<sup>2</sup> Katedra Ekologii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin  
e-mail: krzysztof.kowalczyk@up.lublin.pl

SYLWIA OKOŃ<sup>1</sup>, ELŻBIETA PODSTAWKA-CHMIELEWSKA<sup>2</sup>,  
ALEKSANDRA NUCIA<sup>1</sup>, JOANNA KURUS<sup>2</sup>, TOMASZ OCIEPA<sup>1</sup>,  
EDYTA PACZOS-GRZĘDA<sup>1</sup>, KRZYSZTOF KOWALCZYK<sup>1</sup>

### **Wpływ warunków siedliskowych oraz długotrwałego odłogowania na zmienność genetyczną przytulii czepnej (*Galium aparine* L.)**

The influence of habitat conditions and long-term land lying follow on genetic  
variability of *Galium aparine* L.

**Streszczenie.** Odłogowanie i modyfikacje w użytkowaniu gruntów rolnych przyczyniają się do zmian bioróżnorodności. Skutkiem tego zjawiska jest powolny proces sukcesji wtórnej roślinności, prowadzący do zwiększenia ich zmienności genetycznej. Celem pracy było określenie poziomu zróżnicowania genetycznego przytulii czepnej występującej na dwóch różnych siedliskach gruntów odłogowanych. Oceny zróżnicowania genetycznego dokonano, wykorzystując system markerowy ISSR. Na podstawie wyników badań polimorfizmu markerów ISSR utworzono macierz dystansu genetycznego Dice'a. Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,755 do 1,00. Wykazano niewielką zmienność genetyczną analizowanych genotypów przytulii czepnej. Wspólna klasteryzacja genotypów z poszczególnych siedlisk naturalnych może świadczyć o tym, że typ siedliska, gleba oraz długotrwałe odłogowanie mogą powodować różnicowanie przytulii czepnej.

**Słowa kluczowe:** *Galium aparine* L., ISSR, zmienność genetyczna, odłogowanie

#### WSTĘP

Rodzaj *Galium* L. jest jednym z najliczniejszych rodzajów należących do rodziny marzanowatych (*Rubiaceae* Juss.). Obejmuje ponad 400 gatunków zgrupowanych w 16 sekcjach, do których należą gatunki jednoroczne lub byliny, występujące powszechnie w klimacie tropikalnym i umiarkowanym na całym świecie [Willis 1985, Mabberley 1987]. Przytulia czepna (*Galium aparine* L.) jest gatunkiem jednorocznym. Rośnie w zaroślach, na przydrożach oraz na polach uprawnych, na których jest pospolitym i uciążliwym chwastem. W związku z tym, że owoce przytulii czepnej mają haczykowate szczecinki, mogą być przenoszone przez zwierzęta z odłogów i stanowisk ruderalnych na pola uprawne, co potęguje zachwaszczenie agrocenoz tym gatunkiem.

W uprawach do zwalczania tego chwastu stosuje się najczęściej herbicydy. Presja herbicydowa powoduje zmiany w populacji roślin tego gatunku i sprzyja pojawianiu się form odpornych na związki czynne herbicydów [Rola 1991, Weide 1993, Domaradzki 2006].

Problem odłogowania gruntów ornych pojawił się w Polsce na początku lat 90. XX wieku. Proces ten pociągał za sobą zarówno skutki gospodarcze, jak i ekologiczne [Jabłoński i Widera 1996, Marks i in. 2000, Podstawka-Chmielewska i Kurus 2007, Pranagał i Podstawka-Chmielewska 2012]. W miarę przedłużania się odłogowania w agrocenozach pozbawionych ingerencji człowieka następuje powolny proces sukcesji wtórnej roślinności, prowadzący do odtworzenia dawnych układów ekologicznych, czyli roślinności klimaksowej, charakterystycznej dla danego typu siedliska, lub do wykształcenia nowego ekosystemu [Podstawka-Chmielewska i Kurus 2007; Podstawka-Chmielewska i in. 2007]. Badania nad skutkami odłogowania gruntów ornych rozpoczęto w Akademii Rolniczej w Lublinie w 1995 r. w Gospodarstwie Doświadczalnym Bezek k. Chełma. W tym celu wyłączono dwa płaty gruntów ornych o powierzchni ok. 10 arów każdy. Jeden obiekt badawczy położony był na glebie bielcowej niecałkowitej, wytworzonej z piasku gliniastego, zaliczanej do kompleksu żyniego dobrego, klasy bonitacyjnej IVb. Drugi obiekt badawczy znajdował się na rędzinie brunatnej, zaliczonej do kompleksu pszennego wadliwego, klasy bonitacyjnej IIIb [Malicki i in. 2002]. Na podstawie wieloletnich badań wykonywanych za pomocą zdjęć fitosocjologicznych wykazano, że wraz z upływem czasu zwiększała się bioróżnorodność zbiorowiska roślin na odłogowanym polu, a także zmieniały się proporcje pomiędzy poszczególnymi grupami roślin [Podstawka-Chmielewska i in. 2007]. Jednak nie prowadzono badań w celu określenia zmienności genetycznej roślin występujących na badanych odłogowanych obiektach, dlatego w pracy za pomocą markerów ISSR dokonano oceny podobieństwa genetycznego jednego z gatunków, jakim jest przytulia czepna (*Galium aparine* L.), powszechnie występująca na badanych obiektach odłogowanych oraz polach uprawnych.

#### MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem analiz były 24 genotypy przytulii czepnej pobranej z dwóch różnych parceli wydzielonych z pola doświadczalnego w Gospodarstwie Doświadczalnym Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Bezek k. Chełma (51°12'N, 23°16'E) zlokalizowanych w rejonie Pagórów Chełmskich, należących do Polesia Wołyńskiego. Szczegółowe informacje charakteryzujące obiekty badawcze są podane w pracach Podstawki-Chmielewskiej i Kurus [2007] oraz Pranagala i Podstawki-Chmielewskiej [2012]. Z każdej parceli pobrano po 12 genotypów przytulii, próby zbierano w 3 różnych miejscach parceli. Obiekty pobrane z siedliska założonego na rędzinie brunatnej oznaczono symbolami od P1-1 do P1-12. Genotypy pobrane z siedliska założonego na glebie bielcowej oznaczono symbolami od P2-1 do P2-12.

#### Analizy DNA

Młode liście zebranych genotypów poddano liofilizacji. DNA wyizolowano z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody CTAB [Doyle i Doyle 1987]. Do analizy zróżnicowania genetycznego wykorzystano markery ISSR. Reakcję amplifikacji przeprowadzono

według zmodyfikowanej metody Zietkiewicz i in. [1994]. Do probówek naniesiono po 60 ng DNA wyizolowanego z genotypów przytulii czepnej, następnie dodano mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodziły: bufor Taq 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, dNTP 0,1mM, starter 2 pmol, polimeraza Taq 0,5U. Objętość końcowa mieszaniny wynosiła 25 µl. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Tprofessional Basic Gradient, stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja 95°C – 7 min, 35cykli: denaturacja 95°C – 30 s, przyłączanie starterów w zależności od temperatury topnienia starterów – 45 s, wydłużanie 72°C – 45 s, końcowe wydłużanie 72°C – 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym, zawierającym 0,01% bromku etydyny, w buforze 1 × TBE (89 mM Tris Base, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA pH 8,0). Rozdział prowadzono przez 2 godziny, stosując napięcie 120 V. Rozdzielone w żelu fragmenty DNA podświetlono na transiluminatorze UV i archiwizowano za pomocą programu geneAnalyser. Masę prążków oceniano, porównując z markrem wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus.

### Analiza polimorfizmu

Obecność lub brak prążka traktowano jako pojedynczą cechę i przypisywano jej odpowiednią wartość 1 lub 0. Podobieństwo genetyczne (SI – similarity index) pomiędzy wszystkimi parami badanych form szacowano zgodnie z formułą Dice'a [Nei i Li 1979]:

$$SI = 2N_{xy}/(N_x + N_y),$$

gdzie  $N_{xy}$  oznacza liczbę prążków obecnych w obu porównywanych genotypach X i Y, natomiast  $N_x$  i  $N_y$  oznaczają odpowiednio liczbę prążków obecnych w genotypie X i genotypie Y.

Na podstawie polimorfizmu produktów DNA uzyskanych dzięki metodzie ISSR otrzymano matryce indeksów podobieństwa genetycznego (SI), stosując program Past [Hammer i in. 2001]. Matryca podobieństwa SI uzyskana na podstawie analizy polimorfizmu z wykorzystaniem metody ISSR posłużyła do konstrukcji dendrogramu metodą UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) za pomocą programu Past [Hammer i in. 2001].

### WYNIKI

Ze wstępnie przeanalizowanych 40 starterów ISSR do analiz wybrano 8 generujących stabilne i polimorficzne wzory prążków (tab. 1). Przeprowadzono reakcje z tymi starterami dla badanych genotypów przytulii (fot. 1).

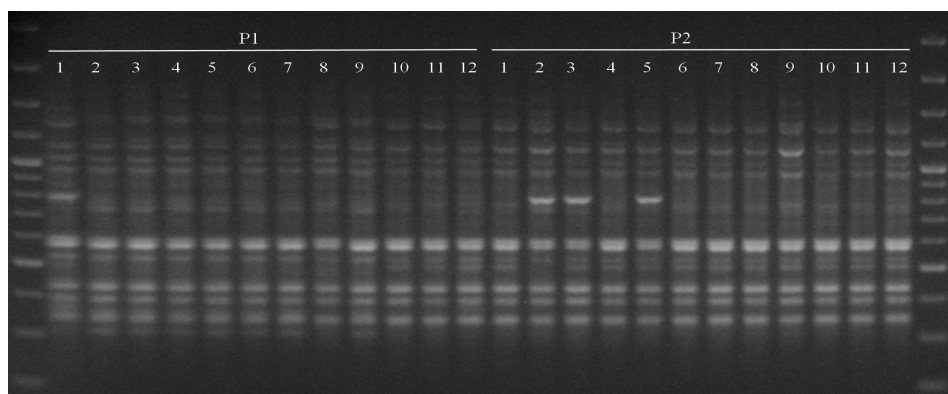
Całkowita liczba fragmentów uzyskanych w wyniku reakcji z 8 starterami ISSR wynosiła 92. Liczba fragmentów amplifikowanych przy użyciu jednego startera wahała się od 6 do 17. Średnio na pojedynczy starter przypadło 11,5 amplifikowanych odcinków DNA, a na jeden genotyp 3,83.

Liczba produktów polimorficznych uzyskanych w wyniku PCR wyniosła 46. Liczba polimorficznych fragmentów generowanych przez pojedynczy starter wahała się od 1 do 11. Na pojedynczy starter przypadło średnio 5,75 polimorficznych fragmentów DNA, na pojedynczy genotyp zaś 1,92.

Tabela 1. Charakterystyka starterów ISSR wykorzystanych do oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych genotypów przytulii czepnej

Table 1. Characteristic of ISSR primers used to estimate genetic variability of the analyzed genotypes *Galium aparine*

Starter Primer	Sekwencja Sequence	Liczba prążków The number of bands		Frekwencja prążków polimorficznych Frequency of polymorphic bands (%)
		całkowita total	polimorficznych polymorphic	
SR23	(CA) <sub>8</sub> GC	14	7	50
SR31	(AG) <sub>8</sub> YC	13	5	38
SR34	(TC) <sub>8</sub> CC	7	1	14
SR36	(AC) <sub>8</sub> CG	13	4	31
SR01	(AG) <sub>8</sub> G	10	8	80
SR11	(AC) <sub>8</sub> G	12	4	33
SR27	(TC) <sub>8</sub> G	6	6	100
SR69	(AC) <sub>8</sub> G	17	11	65
Razem/ Total		92	46	
Średnio prążków/ starter Average/ primer		11,50	5,75	
Średnio prążków/genotyp Average/ genotype		3,83	1,92	



Fot. 1. Obraz produktów amplifikacji uzyskany po włączeniu do PCR startera SR36. P1 (1–12) genotypy pobrane z siedliska założonego na łące brunatnej, P2 (1–12) genotypy pobrane z siedliska założonego na glebie bielcowej

Phot. 1. PCR products amplified by the ISSR primer SR36. P1 (1–12) genotypes collected from fallow located on rendzina, P2 (1–12) genotypes collected from fallow located on podsolic soil

Wyniki badań polimorfizmu markerów ISSR genotypów przytulii czepnej stanowiły podstawę do utworzenia matrycy indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (SI). Wartość indeksów podobieństwa wahała się od 0,755 do 1,00, a średnio wynosiła 0,893. Genotypy P2-8 i P2-10 były identyczne pod względem genetycznym. Średnia wartość indeksów podobieństwa obliczona dla genotypów pochodzących z siedliska założonego



## DYSKUSJA

Markery molekularne są wygodnym narzędziem do oceny zróżnicowania genetycznego różnych gatunków roślin, zarówno uprawnych, jak i występujących w siedliskach naturalnych [Okoń i in. 2013, Hammami i in. 2014, Mosaféri i in. 2015, Vidyakin i in. 2015, Bishoyi i in. 2016, Ko i in. 2016, Santos i in. 2016]. Hübner i in. [2003] analizowali zróżnicowanie genetyczne populacji *Galium aparine* pochodzących z różnych krajów. Autorzy zidentyfikowali niewielki poziom zróżnicowania analizowanych populacji. Ernst [2003] analizowała zmienność genetyczną populacji przytulii czepnej w oparciu o markery RAPD. Khalik i in. [2014] analizowali za pomocą markerów RAPD i ISSR zróżnicowanie genetyczne różnych gatunków należących do rodzaju *Galium*. Kraska i in. [2009] wykorzystali markery RAPD do oceny podobieństwa genetycznego populacji przytulii pobranych z pól uprawnych. W prezentowanej pracy oceniono zróżnicowanie genetyczne przytulii czepnej pochodzącej z naturalnych siedlisk. Wykorzystano do tego celu markery ISSR. Kraska i in. [2009] wykazali, że przytulia czepna pochodząca z pól uprawnych charakteryzowała się dużym podobieństwem genetycznym. Wartości indeksów podobieństwa uzyskane przez autorów wahały się w granicach od 0,446 do 0,984, a średnio wyniosły 0,860. W badaniach własnych uzyskano wyższe wartości indeksów podobieństwa dla genotypów rosnących w naturalnych siedliskach, wahały się one w granicach od 0,755 do 1,00, jednakże średnia wartość podobieństwa była zbliżona i wyniosła 0,893. W badaniach własnych genotypy pochodzące z różnych siedlisk skupiały się blisko siebie na uzyskanym dendrogramie. Kraska i in. [2009] nie zanotowali korelacji pomiędzy pochodzeniem genotypów a ich klasteryzacją na dendrogramie. Natomiast Hübner i in. [2003] stwierdzili niewielką zależność pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym badanych populacji przytulii a ich pochodzeniem geograficznym.

## WNIOSKI

1. Analizowane genotypy przytulii czepnej charakteryzowały się niewielkim zróżnicowaniem genetycznym.
2. Większe zróżnicowanie genetyczne zanotowano wśród genotypów pochodzących z siedliska założonego na glebie bielicowej.
3. Wspólna klasteryzacja genotypów z poszczególnych siedlisk naturalnych może świadczyć o tym, że typ siedliska, gleba oraz długotrwałe odłogowanie mogą powodować różnicowanie przytulii czepnej.

## PIŚMIENNICTWO

- Bishoyi A.K., Sharma A., Kavane A., Geetha K.A., 2016. Varietal discrimination and genetic variability analysis of *Cymbopogon* using RAPD and ISSR markers analysis. Appl. Biochem. Biotechnol. 179 (4), 659–70.
- Domaradzki K., 2006. Minimum effective doses for *Galium aparine* control in the spring cereals. Prog. Plant Prot. 46 (2), 267–272.

- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Ernst V., 2003. Zur Diversität von *Galium aparine* L.-Herkünften. Doctoral Diss. Hohenheim University, Stuttgart.
- Hammami R., Jouve N., Soler C., Frieiro E., González J.M., 2014. Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *Plant System. Evol.* 300 (9), 2029–2040.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electronica* 4 (1), 1–9.
- Hübner R., Fykse H., Hurle K., Klemsdal S.S., 2003. Morphological differences, molecular characterization, and herbicide sensitivity of catchweed bedstraw (*Galium aparine*) populations. *Weed Sci.* 51 (2), 214–225.
- Jabłoński W., Widera M., 1996. Ekologiczno-ekonomiczne aspekty kształtowania fotocenozy na obszarach odłogowanych. *Acta Agrobot.* 49, 3–11.
- Khalik K.A., El-Twab M.A., Galal R., 2014. Genetic diversity and relationships among Egyptian *Galium* (Rubiaceae) and related species using ISSR and RAPD markers. *Biologia, Sec. Botanica* 69 (3), 300–310.
- Ko W.R., Sa K.J., Roy N.S., Choi H.-J., Lee J.K., 2016. Analysis of the genetic diversity of super sweet corn inbred lines using SSR and SSAP markers. *Genet. Mol. Res.* 15 (1), 1–13.
- Kraska P., Okoń S., Pałys E., 2009. Weed infestation of a winter wheat canopy under the conditions of application of different herbicide doses and foliar fertilization. *Acta Agrobot.* 62, 193–206.
- Mabberley D.J., 1987. *The plant-book*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Malicki L., Kurus J., Pałys E., Podstawka-Chmielewska E., 2002. Fitocenoza odłogu na glebie lekkiej i ciężkiej jako element krajobrazu rolniczego. *Fragm. Agron.* 19, 1 (73), 32–40.
- Marks M., Nowicki J., Szwejkowski Z., 2000. Odłogi i ugory w Polsce. Cz. I. Przyczyny odłogowania i zjawiska towarzyszące. *Fragm. Agron.* 1, 5–19.
- Mosaferi S., Sheidai M., Keshavarzi M., Noormohammadi Z., 2015. Genetic diversity and morphological variability in *Polygonum aviculare* s.l. (Polygonaceae) of Iran. *Phytotaxa* 233 (2), 166–178.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 5269–5273.
- Okoń S., Surmacz-Magdziak A., Paczos-Grzęda E., 2013. Genetic diversity among cultivated and wild Chamomile germplasm based on ISSR analysis. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 12 (2), 43–50.
- Podstawka-Chmielewska E., Kurus J., 2007. Wpływ wieloletniego odłogowania pola ornego na właściwości chemiczne gleby. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 520, 845–850.
- Podstawka-Chmielewska E., Pałys E., Kurus J., 2007. Sukcesja roślinności w czasie 10-letniego odłogowania gruntów poornych na glebie lekkiej. *Acta Bot. Warm. Mas.* 4, 23–34.
- Pranagal J., Podstawka-Chmielewska E., 2012. Physical properties of a Rendzic Phaeozem during a ten-year period of fallowing under the conditions of south-eastern Poland. *Geoderma* 189–190, 262–267.
- Rola J., 1991. Ekologiczno-ekonomiczne podstawy chemicznej walki z chwastami na polach uprawnych. *Mat. 31 Sesji Nauk. IOR* 1, 110–124.
- Santos E., Matos M., Silva P., Figueiras A.M., Benito C., Pinto-Carnide O., 2016. Molecular diversity and genetic relationships in *Secale*. *J. Genet.* 95, 273–2812.
- Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechayeva Yu.S., Pryshnivskaya Ya.V., Boboshina I.V., 2015. Genetic variation, population structure, and differentiation in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Northeast of the Russian plain as inferred from the molecular genetic analysis data. *Russ. J. Genet.* 51, 1213–1220.

- van der Weide R.Y., 1993. Population dynamics and population control of *Galium aparine* L. 15–18.
- Willis J.C., 1985. A dictionary of the flowering plants and ferns. Cambridge University Press, Cambridge, 1294 pp.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.

**Summary.** The land lying fallow and modifications to the use of agricultural lands cause changes in biodiversity. The slow process of secondary succession causes an increase of their genetic variability. The aim of the presented work was to estimate the level of genetic variation among *Galium aparine* genotypes from two different fallow lands. The assessment of genetic diversity was based on the ISSR markers. The genetic distance matrix was calculated based on the Dice's formula. The value of similarity index ranged from 0.755 to 1.00. The research showed that the analysed genotypes were characterised by quite a low level of genetic variability. The common grouping of genotypes collected from two habitats can attest to the fact that the type of habitat, soil and long-term land lying fallow can influence *Galium aparine* variability.

**Key words:** *Galium aparine* L., ISSR, genetic variability, fallow lands