

ZBIGNIEW BRODA  
DANUTA KURASIAK-POPOWSKA  
ALEKSANDRA KOWALSKA  
ANNA ĆWIKLIŃSKA

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu

## Analiza podobieństwa genetycznego wybranych gatunków w rodzaju *Secale*

### The analysis of genetic similarity among *Secale* species

Przedmiotem badań była analiza podobieństwa genetycznego form dzikich z rodzaju *Secale*. Materiałem roślinnym były gatunki żyta: *Secale cereale* subsp. *afghanicum*, *Secale cereale* subsp. *dighoricum*, *Secale cereale* subsp. *segetale*, *Secale strictum* subsp. *africanum*, *Secale strictum* subsp. *anatolicum*, *Secale strictum* subsp. *ciliatoglume*, *Secale strictum* subsp. *kuprijanovii*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* oraz *Secale vavilovii*. Analiza prążków RAPD pozwoliła na wytypowanie starterów generujących polimorficzne prążki, pozwalające różnicować badane gatunki i podgatunki z rodzaju *Secale*. Przeprowadzone badania pozwoliły na podział roślin na trzy grupy o różnym stopniu podobieństwa genetycznego. Wieloletnie gatunki z rodzaju *Secale* utworzyły jedną grupę podobieństwa, a gatunki jednoroczne dwie grupy, w których podobieństwo wynosiło od 11 do 21%.

**Słowa kluczowe:** markery RAPD, podobieństwo genetyczne, żyto

The aim of this study was the analysis of genetic similarity among *Secale* species. The plant material included: *Secale cereale* subsp. *afghanicum*, *Secale cereale* subsp. *dighoricum*, *Secale cereale* subsp. *segetale*, *Secale strictum* subsp. *africanum*, *Secale strictum* subsp. *anatolicum*, *Secale strictum* subsp. *ciliatoglume*, *Secale strictum* subsp. *kuprijanovii*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* and *Secale vavilovii*. Based on the RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis primers generating polymorphic products were selected, which made possible to differentiate species and subspecies of *Secale*. Three groups of the *Secale* species were distinguished according to the different degree of genetic similarity. Perennial species were classified in one group of similarity, and annual species in two groups, in which the similarity ranged from 11 to 21%.

**Key words:** RAPD markers, genetic similarity, rye,

#### WSTEP

Molekularne systemy markerowe umożliwiają ocenę zróżnicowania genetycznego w dowolnej populacji roślinnej, oraz pomiędzy oddalonymi jednostkami systematycznymi we wszystkich stadiach wzrostu i rozwoju rośliny niezależnie od warunków środowiskowych oraz przy braku oddziaływań epistatycznych (Wolko i in., 1999;

Kubicka i Lewandowska, 2003). Ocena różnorodności genetycznej wewnątrz i pomiędzy populacjami danego gatunku jest bardzo istotna dla programów hodowlanych.

Najprostszą w wykonaniu techniką pozwalającą na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu jest metoda RAPD wykorzystująca polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA (Kuczyńska i in., 2003).

Celem badań była analiza podobieństwa genomów na poziomie molekularnym w gatunkach z rodzaju *Secale* sp.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiałem roślinnym były dzikie gatunki żyta pochodzące z kolekcji prowadzonej w Ogrodzie Botanicznym — Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej PAN w Warszawie: *Secale cereale* subsp. *afghanicum*, *Secale cereale* subsp. *dighoricum*, *Secale cereale* subsp. *ancestrale*, *Secale cereale* subsp. *segetale*, *Secale strictum*, *Secale strictum* subsp. *africanum*, *Secale strictum* subsp. *anatolicum*, *Secale strictum* subsp. *ciliatoglume*, *Secale strictum* subsp. *kuprijanovii*, *Secale sylvestre* oraz *Secale vavilovii*.

#### Otrzymywanie markerów molekularnych RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Genomowy DNA izolowano zmodyfikowaną metodą Thompsona i Henry'ego (1995) z prób zbiorczych 30 siewek każdego gatunku. Fragmenty liści o powierzchni 2 mm<sup>2</sup> z 10 dniowych siewek żyta traktowano 200 µl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA. Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1M Tris HCl o pH 8,3; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; BSA; 2mM dNTP; starter-5pmoli/µl; Taq polimeraza-5U/µl, ekstrakt DNA-25 ng/µl. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki pochodziły z firmy SIGMA. Amplifikację DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 BIOMETRA firmy POLYGEN. Po wyjęciu prób z termocyklera do każdej z nich dodano 1 µl barwnika (0,25% błękit bromofenolowy; 40% sacharoza; woda dejonizowana)

Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem 1 µl bromku etydyny.

Współczynniki podobieństwa genetycznego (GS) badanych gatunków obliczono

korzystając ze wzoru (Nei i Li, 1979):  $GS = \frac{2n_{xy}}{(n_x + n_y)}$

gdzie  $n_{xy}$  oznacza liczbę alleli obecnych zarówno u gatunku  $x$  jak i u gatunku  $y$ ,  $n_x$  — liczbę alleli obecnych u gatunku  $x$  i  $n_y$  — liczbę alleli obecnych u gatunku  $y$ .

#### WYNIKI

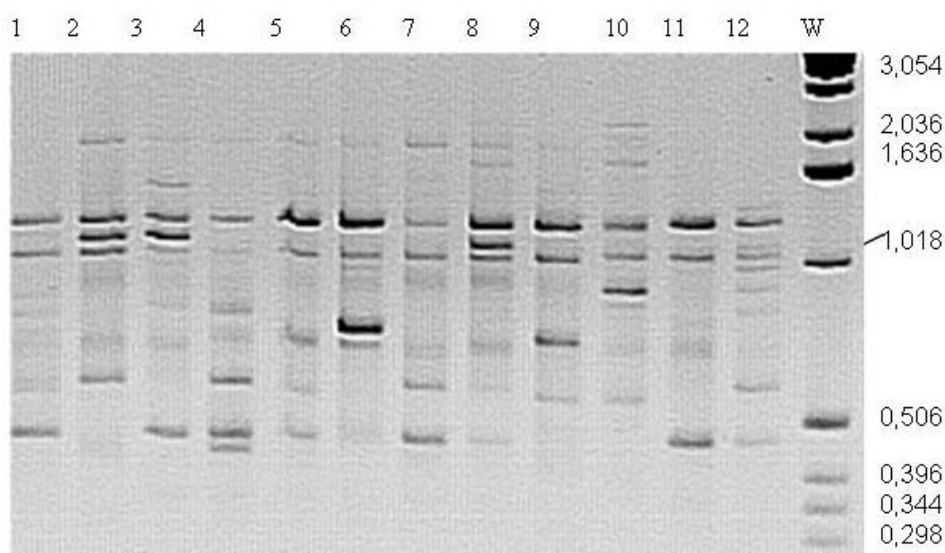
Spośród 70 testowanych starterów oligonukleotydowych 13 generowało wysoki polimorfizm prążkowy, który pozwolił na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy

badanymi liniami żyta. Startery, ich sekwencje nukleotydowe oraz liczbę produktów amplifikacji zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1

**Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm w gatunkach z rodzaju *Secale* sp.**  
**Sequences of primers detecting polymorphism of *Secale* sp.**

Numer startera Primer No.	Sekwencja nukleotydowa Sequences 5'-3' of primers	Liczba produktów amplifikacji The number of amplification products	
		ogółem — total	Polimorficzne — polymorphic
OPA04	AATCGGGCTG	7	6
OPA07	GAAACGGGTG	7	4
OPA09	GGGTAACGCC	10	10
OPA10	GTGATCGCAG	8	7
OPA12	TCGGCGATAG	6	6
OPB08	GTCCACACGG	8	8
OPB10	CTGCTGGGAC	10	8
OPB11	GTAGACCCGT	8	7
OPB17	AGGGAACGAG	5	3
OPD04	TCTGGTGAGG	6	6
OPG10	AGGGCCGTCT	8	7
OPJ04	CCGAACACGG	6	6
OPJ15	TGTAGCAGGG	8	7
Ogółem — Total		97	85



Numery ścieżek odpowiadają: Paths in order respond to the following species:

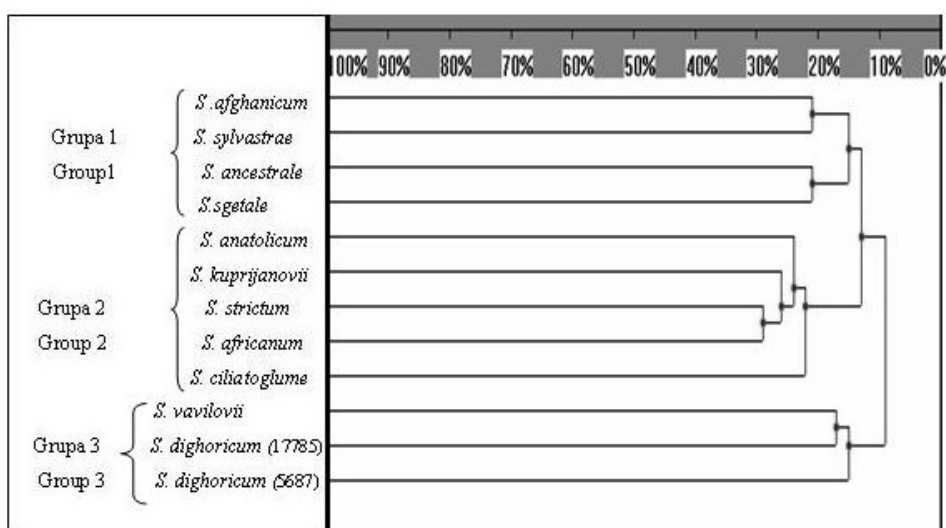
- 1 — *S. cereale afghanicum*, 2 — *S. cereale ancestrale*, 3 — *S. cereale segetale*, 4 — *S. sylvastrae* 5 — *S. anatolicum*,  
 6 — *S. ciliatoglume*, 7 — *S. kuprianovii*, 8 — *S. strictum* 6038, 9 — *S. africanum* 10 — *S. vavilovii*,  
 11 — *S. dighoricum* 17785, 12 — *S. dighoricum* 5687, W — Wzorzec; -Standard 1 KB DNA Ladder.

**Rys. 1. Elektroforegram polimorfizmu produktów amplifikacji DNA wykonany techniką RAPD – PCR z zastosowaniem startera OPB 10 o sekwencji: 5' CTGCTGGGAC 3'.**

**Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments obtained by RAPD amplification with the primer OPB 10 with sequence 5' CTGCTGGGAC 3'**

Jeden starter średnio generował 7 różnej wielkości fragmentów DNA. Największą liczbę prążków (10) otrzymano w reakcji ze starterami: OPA 09 oraz OPB 10 (rys. 1). Najmniejszą liczbę prążków (6) uzyskano ze starterami OPA 12 oraz OPJ 04. Zamieszczone w niniejszej pracy startery dały ogółem 97 fragmentów o różnej masie cząsteczkowej, a spośród nich 12 stwierdzono u wszystkich badanych gatunków z rodzaju *Secale*.

Analiza dendrogramu UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means) (rys. 2) wykreślonego na podstawie indeksu podobieństwa pozwoliła na określenie dystansu genetycznego pomiędzy badanymi gatunkami żyta. Dendrogram wskazuje na obecność trzech głównych grup skupień.



Rys. 2 Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne pomiędzy analizowanymi obiektami  
Fig. 2. Dendrogram showing relationships of the genetic similarity among the analyzed objects

Podobieństwo w pierwszej grupie, do której zaliczono trzy podgatunki *S. cereale* oraz *S. sylvastrae* wynosiło od 14% do 21%. Największą drugą grupę stanowiły gatunki *S. strictum* oraz *S. strictum* subsp. *africanum*, *anatolicum*, *kuprijanovii*, oraz *ciliatoglume*. Wszystkie gatunki z drugiej grupy zalicza się do roślin wieloletnich. W grupie tej podobieństwo pomiędzy *S. strictum* i *S. africanum* wynosiło 29%. Grupę trzecią stanowiły jednoroczne gatunki: *S. dighoricum* oraz *S. vavilovii* podobne do siebie pod względem genetycznym w granicach 11–17%.

## DYSKUSJA

Problem ograniczonej zmienności genetycznej odmian populacyjnych żyta wskazuje na konieczność poszerzenia zmienności genetycznej dla dalszego doskonalenia odmian. Jedną z możliwości rozwiązania tego problemu jest wykorzystanie dzikich podgatunków

żyta jako komponentów w krzyżowaniach oddalonych z żytem uprawnym *Secale cereale* ssp. *cereale* oraz otrzymanie mieszańców oddalonych. Gatunkami posiadającymi geny odporności na rdzę brunatną i mączniaka są *Secale montanum* i *S. kuprijanovi* (Kobyljanski i Solodukhina 1996, Wehling i in., 2003), a gatunki *S. sylvestre*, *S. anatolicum* i *S. vavilovii* wykorzystuje się w hodowli odmian odpornych na wyleganie i porastanie (Rzepka, 1993). Dzikie gatunki żyta mogą posłużyć do polepszania takich cech jak zimotrwałość, zawartość białka w ziarnie czy długość źdźbła (Kobyljanski, 1987; Mackiewicz i Broda, 2004). Większa ilość informacji o dzikich gatunkach żyta, w tym o ich podobieństwie genetycznym zwiększa możliwość ich praktycznego wykorzystania do tworzenia nowych odmian.

Technika RAPD jest jedną z prostszych metod stosowanych w ocenie zróżnicowania genetycznego i z powodzeniem była wykorzystywana w badaniach roślin uprawnych, w tym zbóż (Cao i in., 1999; Masojć, 2000; Kuczyńska i in., 2001; Myśków i in., 2001; Milczarski i in., 2001; Persson i in., 2001; Fernandez i in., 2002; Drossou i in., 2004). Markery RAPD okazały się użyteczne do badania podobieństwa genetycznego odmian i ekotypów *Secale cereale* rosnących na terenach Europy, Ameryki Północnej i Południowej oraz Azji (Matos i in., 2001; Ma i in., 2004; Ćwiklińska, 2007).

W badaniach własnych relacje dystansu genetycznego wskazują na oddzielną grupę podobieństwa dla podgatunków wieloletnich: *Secale africanum*, *anatolicum*, *ciliatoglume*, *kuprijanovii* i *strictum* należących do gatunku *S. strictum*. Podobnie Chikmawati i wsp. (2005) badając podobieństwo genetyczne w rodzaju *Secale* sp. przy użyciu markerów AFLP zaobserwowali osobne zgrupowanie form rocznych oraz wieloletnich. Z kolei analiza sekwencji powtórzonych DNA w rodzaju *Secale* przeprowadzona przez Cuadrado i Jouve (1997) za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazała, że gatunki wieloletnie oraz obcopolne gatunki z rodzaju *Secale* sp. tworzą jedną grupę. Dalsze badania przeprowadzone przez tych badaczy sugerują, że duże zróżnicowanie w lokalizacji sekwencji (AAC)<sub>5</sub> oraz (AAG)<sub>5</sub> pomiędzy *S. sylvestre* oraz resztą gatunków świadczy o wczesnym oddzieleniu się *S. sylvestre* od *S. strictum*. W badaniach własnych gatunek *S. sylvestre* znajduje się w jednej grupie podobieństwa z trzema podgatunkami *S. cereale*, natomiast grupa ta jest w 14% podobna do drugiej grupy podobieństwa, która stanowiły gatunki *S. strictum*.

Analiza dystansu genetycznego 42 odmian żyta przeprowadzona przez Ma i wsp. (2004) ukazała wyraźny podział na formy jare i ozime a w nich na grupy skupień odpowiadające terytorialnemu pochodzeniu nasion. Ścisły podział na takie grupy w zależności od pochodzenia nasion w przypadku badań własnych nie jest obserwowany.

Badane gatunki w rodzaju *Secale* sp. zebrane zostały w różnych miejscach Europy i Azji Środkowej, z wyjątkiem *S. vavilovii*, którego miejscem pochodzenia jest Iran. *S. vavilovii* został szybko oddzielony od pozostałych gatunków z rodzaju *Secale* sp. (Cuadrado i Jouve, 2002). W badaniach własnych *S. vavilovii* znalazł się w jednej grupie podobieństwa z dwoma gatunkami *S. dighoricum* pochodzącymi ze Szwecji i Rosji. W badaniach Chikmawati i wsp. (2005) przy użyciu techniki AFLP gatunki *S. dighoricum* pochodziły z terenu Polski, a *S. vavilovii* z obszaru Polski i Afganistanu, a podobieństwo

pomiędzy tymi gatunkami wynosiło 30%, podczas gdy w przypadku wyników własnych wynosi ono tylko 11%.

## WNIOSEK

Przeprowadzone badania za pomocą markerów molekularnych typu RAPD wykazały że, wieloletnie gatunki *Secale strictum* (*S. strictum*, *S. s. africanum*, *S. s. anatolicum*, *S. s. ciliatoglume*, *S. s. kuprijanovii*) tworzą odrębną grupę podobieństwa a gatunki jedno-roczone dwie grupy (*S. c. afghanicum*, *S. c. ancestrale*, *S. c. segetale*, *S. sylvestre* oraz *S. dighoricum* i *S. vavilovii*) co dowodzi o różnej filogenezie tych gatunków.

## LITERATURA

- Cao, W., Scoles, G. and Hucl, P. 1999. The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.* 98: 602 — 607.
- Chikmawati T., Skovmand B., Gustafson J.P. 2005. Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphism. *Genome* 48: 792 — 801.
- Cuadrado A., Jouve N. 1997. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Genome* 40(3): 309 — 317.
- Cuadrado A., Jouve N. 2002. Evolutionary trend of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale*. *The J. of Heredity* 93: 339 — 345.
- Ćwiklińska A. 2007. Analiza podobieństwa genetycznego w gatunkach z rodzaju *Secale* L. *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie*, w druku.
- Drossou A., Katsiotis A., Leggett J. M., Loukas M., Tsakas S. 2004. Genome and species relationships in genus *Avena* based on RAPD and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 48 — 54.
- Fernandez M. E., Figueiras A.M. and 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.
- Kubicka H., Lewandowska R. 2003. Zastosowanie techniki AFLP w połączeniu z BSA do identyfikacji markerów sprzężonych z cechą karłowatości u żyta. *Biul. IHAR* 226/227: 71 — 80.
- Kuczyńska A., Bocianowski J., Masojć P., Surma M., Adamski T. 2003. Zastosowanie markerów RAPD do określenia podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). *Biul. IHAR* 226/227/1: 81 — 85.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42: 43 — 48.
- Kobyljanski V. D., Solodukhina O.V. 1996. Genetic bases and practical breeding utilization of heterogeneous resistance of rye to brown rust. *Votr. Pflanzenzüchtg* 35: 155 — 163.
- Kobyljanski V. D. 1987. Studies of rye and their relations to aspects of breeding. *Vestn. Selsch. Nauki* 111: 35 — 41.
- Ma R., Yli-Mattila T., Pulli S. 2004. Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryegrasses (*Secale cereale* L.) determined by RAPD\_PCR markers. *Hereditas* 140: 210 — 221.
- Mackiewicz D., Broda Z. 2004. Ocena przydatności hodowlanej mieszańców żyta uprawnego *Secale cereale* (L) z dzikimi gatunkami z rodzaju *Secale*. *Biul. IHAR* 231: 265 — 277.
- Matos M., Pinto-Carnide O., Benito C. 2001. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134: 229 — 236.
- Masojć P. 2000. Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin* 206, *Agricultura* (82): 179 — 184.
- Mysków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szołkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42: 1 — 4.

- Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P. 2001. Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. Biul. IHAR. 261 — 267.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. Proceedings of the Academy of Sciences of the USA 76: 5269 — 5273.
- Persson K., Diaz O., Bothmer R. V. 2001. Extent and patterns of RAPD variation in landraces and cultivars of rye (*Secale cereale* L.) from Northern Europe. Hereditas 134: 237 — 243.
- Rzepka D. 1993. Badania nad mieszańcami *S. cereale* × *S. vavilovi* Gross w aspekcie ich przydatności w hodowli odmian żyta odpornych na porastanie. Część 1. Ocena odporności na porastanie mieszańców międzygatunkowych żyta. Hod. Rośl. Aklim. 37 95/6): 69 — 79.
- Wehling P., Linz A., Hackauf B., Roux S.R., Ruge B., Klocke B. 2003. Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2*. Theor. Appl. Genet. 107: 432 — 438.
- Wolko B., Irzykowska L., Świącicki W. K. 1999. AFLP i SSR — systemy markerowe przydatne w hodowli roślin. Post. Nauk Roln. 2/99: 59 — 71.