



## Wykorzystanie markerów RAPD do oceny zmienności genetycznej europejskich populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*)

Iwona Szy-p-Borowska<sup>1</sup>, Ramune Staniulyte<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii i Genetyki Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa

<sup>2</sup>Genetic and Biotechnology, Lithuanian Forest Research Institute, Lithuania

### Usefulness of RAPD for genetic distance estimation in the European species *Pinus sylvestris*

#### Summary

Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) technique with single primers was tested for its usefulness in genetic distance estimation and population studies in the coniferous species *Pinus sylvestris*. DNA markers allow for direct analysis both coding and noncoding regions of the genome. The technique of detection DNA variations using RAPD markers has become a popular tool in genetic studies. Different reaction conditions were tested in order to get the optimal resolution of fragments, specificity and reproducibility of patterns.

In this preliminary investigation, a high  $MgCl_2$  concentration (5,5 mM) together with a low primer concentration (0,2  $\mu M$ ) in the polymerase chain reaction (PCR) mixture yielded the best amplification products. Amplified fragments were scored as the presence or absence fragments.

#### Key words:

*Pinus sylvestris*, RAPD.

#### Adres do korespondencji

Iwona Szy-p-Borowska,  
Zakład Fizjologii  
i Genetyki Drzew Leśnych,  
Instytut Badawczy  
Leśnictwa,  
ul. 3 Bitwy Warszawskiej  
1920,  
00-973 Warszawa.

### 1. Wstęp

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris*) charakteryzuje się bardzo rozległym obszarem występowania, największym ze wszystkich gatunków z rodzaju *Pinus* (rys. 1). Swym zasięgiem obejmuje roz-



Rys. 1. Mapa zasięgu naturalnego *Pinus sylvestris* z zaznaczonymi miejscami pochodzenia analizowanych populacji (wg W. B. Critchfield, E. Little, 1991).

ległe obszary środkowej i północnej Europy, Azji Mniejszej i Syberii. Występuje głównie na nizinach oraz w górach, nie wyżej jednak niż 2000 m npm. Przebieg północnej granicy zasięgu *P. sylvestris* jest uzależniony od warunków klimatycznych, południowej zaś od warunków siedliskowych, a w pewnym stopniu także jest efektem działalności człowieka. Olbrzymi naturalny zasięg sosny zwyczajnej, obejm-

mujący wielką różnorodność warunków ekologicznych spowodował, że gatunek ten ewoluował i rozdzielił się na szereg lokalnych ras. Wewnątrz ras i populacji *Pinus sylvestris*, odnotowano wysoki stopień zróżnicowania genetycznego (5).

W dwudziestym wieku powierzchnia zajmowana przez lasy sosnowe zwiększyła się i w ostatnich latach przekroczyła 20% ogólnej powierzchni lasów produkcyjnych w Europie (6). Jest to związane z gospodarczym wykorzystaniem drewna sosnowego i może mieć wpływ na status i rozwój lasów sosnowych w przyszłości. Jedną z podstawowych strategii adaptacyjnych drzew leśnych jest utrzymanie wysokiej zmienności genetycznej wewnątrz populacji (8). Dlatego ochrona, zwłaszcza populacji izolowanych, rosnących w ekstremalnych dla tego gatunku warunkach, ma ogromne znaczenie dla utrzymania zróżnicowanej puli genetycznej. Zmienność genetyczna jest, bowiem podstawą zdolności adaptacyjnych do zmieniających się środowisk życia (gradacja szkodników, choroby, zmiany klimatyczne). Ocena zróżnicowania genetycznego ma zatem istotne znaczenie dla identyfikacji populacji szczególnie cennych.

Istnieje wiele sposobów oceny zróżnicowania genetycznego opartych na różnych markerach. Posługiwanie się markerami, czyli prostymi cechami, pozwalającymi na identyfikację genotypu, ma u roślin długą historię. Początkowo w tego typu analizach posługiwano się jedynie cechami morfologicznymi, które obecnie, jak się wydaje, są niewystarczające. Doświadczenia polowe, bowiem pozwalają na oszacowanie genetycznych parametrów cech mierzalnych, ale nie dostarczają informacji na temat tego, jak wiele zmian fenotypowych, może być wytłumaczonych zmianami w obrębie genów, oraz które z tych genów związane są z adaptacją. Uzupełnieniem tych doświadczeń jest zatem zastosowanie markerów molekularnych. Najwcześniejsze prace wiązały się z analizą wtórnych produktów ekspresji genów, (terpeny, fenole, izoenzymy) jako markerów genetycznych. Obecnie możliwa jest identyfikacja polimorfizmu na poziomie sekwencji kwasów nukleinowych (3). Materiał genetyczny wszystkich organizmów charakteryzuje naturalna zmienność, czyli polimorfizm DNA, wynikający z mutacji i rekombinacji. Zmiany te mogą występować zarówno w rejonach kodujących DNA jak i w nie kodujących. Oznacza to, że różnice między osobnikami należącymi do jednego gatunku mogą być znacznie większe niż te wynikające z różnic fenotypowych.

Szczególnie często wykorzystywane są markery, które powstają w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Najprostszą w wykonaniu techniką, która pozwala na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu, jest opracowana przez Williamsa i in. (11), metoda wykorzystująca losowo amplifikowany, polimorficzny DNA (RAPD). W metodzie tej wykorzystuje się pojedynczy, dziesięcionukleotydowy starter o losowej sekwencji. Markery RAPD to markery dominujące, dlatego nie można odróżnić homozygoty dominującej od heterozygoty. Drzewa iglaste są jednak szczególnie przystosowane do stosowania markerów RAPD ze względu na to, że posiadają zarówno komórki diploidalne jak i haploidalne (1).

Celem prezentowanych badań była ocena zróżnicowania genetycznego europejskich populacji sosny zwyczajnej, oraz analiza odległości genetycznej pomiędzy proveniencjami na poziomie molekularnym z wykorzystaniem techniki RAPD.

## 2. Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły igły sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*), pochodzącej z proveniencyjnej powierzchni doświadczalnej IUFRO 1982 zlokalizowanej w Sękoćcinie. Igły zebrano z 76 drzew, z 19 populacji, reprezentowanych na wymienionej powierzchni doświadczalnej. Pochodzenie tych populacji i dane geograficzne przedstawiono w tabeli 1. Całkowite DNA izolowano z około 100 mg igieł przy użyciu zestawu Dneasy Plant Kits firmy QIAGEN. Oceny jakościowej i ilościowej otrzymanego DNA dokonywano przez rozdział elektroforetyczny w 0,8% żelu agarozowym w buforze  $0,5 \times TBE$ . Dobrej jakości DNA powielano następnie w reakcji PCR. Warunki amplifikacji, opisane przez Williamsa (11), modyfikowano w celu uzyskania powtarzalnej procedury otrzymywania markerów RAPD dla sosny zwyczajnej. Testowano takie czynniki jak: stężenie DNA i  $MgCl_2$  w mieszaninie reakcyjnej oraz temperaturę przyłączania starterów. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze TGradient (BIOMETRA). Poszczególne warianty przedstawiono w tabeli 2. Produkty reakcji PCR rozdzielano w barwionym bromkiem etydy w 2% żelu agarozowym w buforze TBE. Przetestowano 12 starterów (Opreon Technologies, Alameda, California, USA). Analiza statystyczna polimorfizmu markerów RAPD została opracowana przy użyciu programów komputerowych: BioGen i Popgen 32 (13).

Tabela 1

Lista pochodzeń sosny zwyczajnej reprezentowanej na powierzchni doświadczalnej IUFRO 1982

Nr	Pochodzenie	Kraj	Dł. geogr. (°E)	Szer. geogr. (°N)	Wysokość npm (m)
1	2	3	4	5	6
1	Roszczinskaja Dacza	Rosja	29°54'	60°15'	80
2	Kondeżskoje	Rosja	33°30'	59°58'	70
3	Serebrjanskoje	Rosja	29°07'	58°5'	80
4	Silene	Łotwa	26°40'	55°45'	165
5	Milomłyn	Polska	20°00'	53°34'	110
6	Supraśl	Polska	23°22'	53°12'	160
7	Spała	Polska	20°12'	51°37'	160
8	Rychtal	Polska	17°55'	51°08'	190
9	Bolewice	Polska	16°03'	52°24'	90
10	Neuhaus	Niemcy	13°54'	53°02'	40
11	Betzhorn	Niemcy	10°30'	52°30'	65

1	2	3	4	5	6
13	Ardenes	Belgia	4°26'	50°46'	110
14	Haguenau	Francja	7°47'	48°49'	157
15	Sumpberget	Szwecja	15°52'	60°11'	185
16	Zahorie	Słowacja	17°03'	48°46'	160
17	Pornoapati	Węgry	16°28'	47°20'	300
18	Maočnica	Jugosławia	19°30'	43°30'	1200
19	Prusačka Rijeka	Bośnia i Hercegowina	17°21'	44°06'	885
20	Catacik	Turcja	31°10'	40°00'	1400

Tabela 2

## Testowane warunki reakcji PCR\*

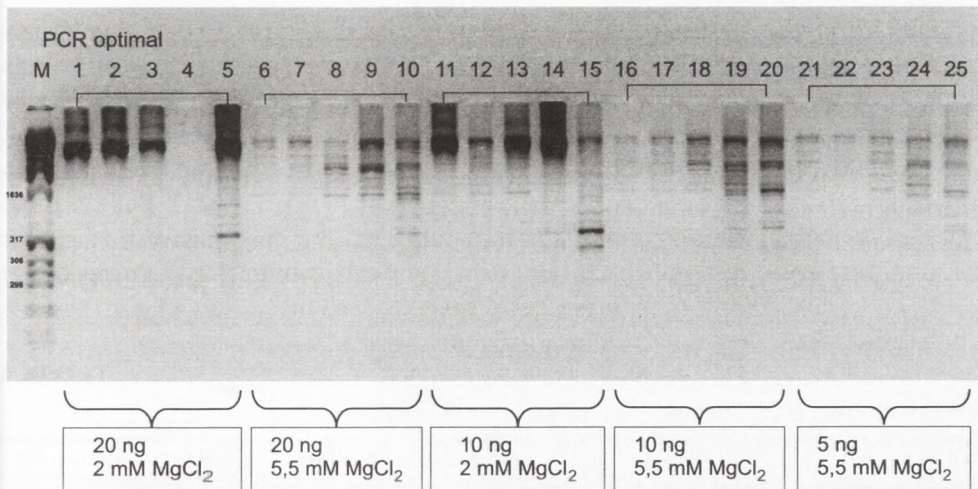
Mieszanina reakcyjna	Testowany czynnik	Stężenie
5,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 μM starter, 200 μM dNTPs, 1 U polimerazy Taq (QIAGEN), 1 × bufor do polimerazy DNA	DNA	20 ng/25 μl 10 ng/25 μl 5 ng/25 μl
10 ng DNA, 0,2 μM starter, 200 μM dNTPs, 1 U polimerazy Taq (QIAGEN), 1 × bufor do polimerazy DNA	MgCl <sub>2</sub>	2 mM 5,5 mM

\* Każda reakcja PCR przeprowadzana była według programu 40 cykli: 1 min – 94°C (denaturacja), 1 min – 32 (34,36,40,42)°C (przyłączanie startera) i 2 min – 72°C (wydłużanie nici). Program poprzedzony był 1,5-minutowym okresem denaturacji w temp. 94°C i kończył się 10-minutowym wydłużaniem produktów w temperaturze 72°C.

## 3. Wyniki i dyskusja

Stężenie DNA równe 10 i 5 ng w mieszaninie reakcyjnej (25 μl) dawało najlepsze wyniki amplifikacji, podczas gdy dla 20 ng DNA próby, obserwowano redukcję liczby prążków. Także stężenie MgCl<sub>2</sub> wpływało znacząco na wyniki PCR (fot. 1). Zastosowanie MgCl<sub>2</sub> w stężeniu 5,5 mM podnosiło jakość otrzymywanych produktów reakcji. Ostatecznie jako optymalne przyjęto stosowanie 10 ng DNA przy stężeniu MgCl<sub>2</sub> równym 5,5 mM, co gwarantowało otrzymanie wyraźnych prążków RAPD. Podobne wyniki otrzymali Göçmen i in. (4) dla *Taxus brevifolia*.

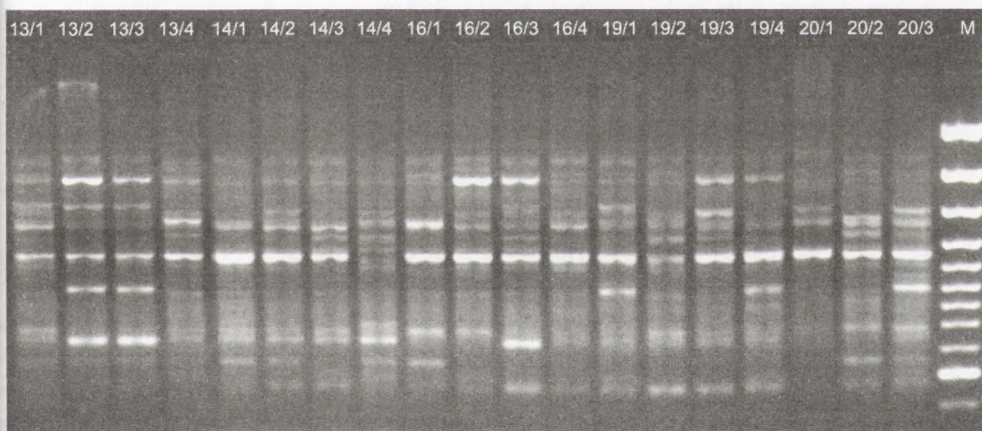
Każda reakcja PCR przeprowadzana była według programu 40 cykli: 1 min – 94°C (denaturacja), 1 min – 32 (34 lub 36 lub 40 lub 42)°C (przyłączanie startera) i 2 min – 72°C (wydłużanie nici). Program poprzedzony był 1,5-minutowym okresem denaturacji w temp. 94°C i kończył się 10-minutowym wydłużaniem produktów w temperaturze 72°C. Podwyższenie temperatury przyłączania startera dawało więcej obserwowanych prążków RAPD. W kolejnych reakcjach przyjęto 37°C za temperaturę optymalną dla uzyskania powtarzalnych wyników amplifikacji. Seria prezentowanych eksperymentów pozwoliła na opracowanie powtarzalnej metodyki RAPD dla sosny zwyczajnej.



Fot. 1. Analiza RAPD pokazująca efekt różnych stężeń DNA i  $MgCl_2$  oraz temperatury wydłużania starterów podczas reakcji PCR.

W celu zidentyfikowania polimorficznych fragmentów DNA, przetestowano 12 starterów, z których 6 (OPA09, OPB08, OPD12, OPE09, OPG09, OPG10) dawało wyraźne profile elektroforetyczne. Na fotografii 2 przedstawiono reprezentatywny przykład rozdziału produktów RAPD ze starterem OPE09.

Poziom polimorfizmu obliczano na podstawie liczby wspólnych prążków porównywanych populacji. Główne parametry genetyczne obliczone dla poszczególnych



Fot. 2. Rozdział produktów RAPD ze starterem OPE09 dla populacji sosny zwyczajnej z Ardennes (13), Haguenau (14), Zahorie (16), Prusačka Rijeka (19), Catacik (20).

M – 100 bp Ladder DNA (MBI Fermentas).

populacji, przedstawiono w tabeli 3. Średnia liczba alleli na locus jest najniższa – 1,23 dla populacji z Belgii (13) i najwyższa – 1,6 dla populacji z Łotwy (4). Populacje bogate, jeśli chodzi o liczbę alleli to populacje z: Supraśla (6), Rychtała (8), Szwecji (15), Słowacji (16), Jugosławii (18) i Turcji (20). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze dane dotyczące zróżnicowania izoenzymów, pochodzące z doświadczeń Prus-Głowackiego (9). Przyczyną zaskakująco niskiej liczby alleli w przypadku populacji belgijskiej, może być fakt, że populacja ta powstała z nasion, pochodzących ze sztucznej populacji utworzonej z plantacji nasiennej pierwszej generacji (wg Kocięckiego).

Tabela 3

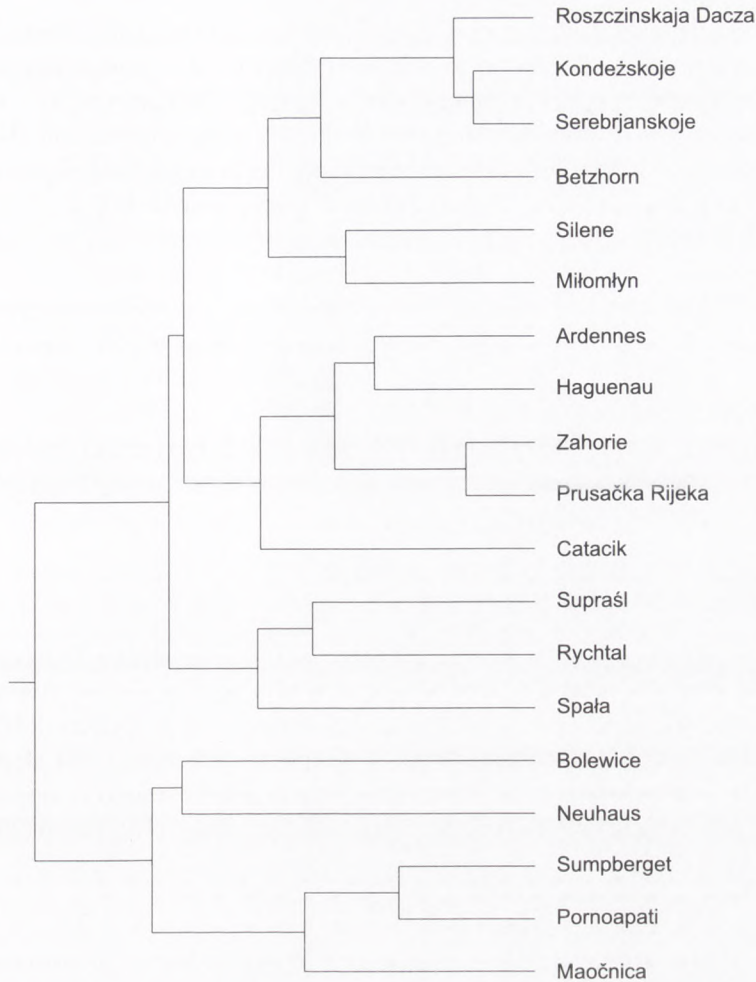
## Główne parametry genetyczne badanych populacji sosny zwyczajnej

Populacja (nr)	$N_a$	h	Liczba polimorfizmu loci	Procent polimorfizmu loci
1	1,3143	0,1244	11	31,43
2	1,3143	0,1296	11	31,43
3	1,4000	0,1620	14	40,00
4	1,6000	0,2397	21	60,00
5	1,3429	0,1665	12	34,29
6	1,5143	0,2222	18	51,43
7	1,4571	0,2010	16	45,71
8	1,4857	0,2226	17	48,57
9	1,4286	0,1870	15	42,86
10	1,4000	0,1596	14	40,00
11	1,3429	0,1463	12	34,29
13	1,2286	0,0941	8	22,86
14	1,3143	0,1296	11	31,43
15	1,5429	0,2264	19	54,29
16	1,4857	0,2131	17	48,57
17	1,3143	0,1170	11	31,43
18	1,4857	0,1819	17	48,57
19	1,4000	0,1593	14	40,00
20	1,4857	0,2052	17	48,57

$N_a$  = średnia obserwowana liczba alleli

h = średnia różnorodność genetyczna wg Nei'a (1973)

Oprócz liczby alleli, ważnym parametrem jest także liczba polimorficznych loci genowych w danej populacji. Najbardziej polimorficzne populacje pochodzą z północy Europy (15,4,6), Słowacji (16), Jugosławii (18), Turcji (20) i Polski (8). Odległość genetyczna między analizowanymi populacjami sosny obliczana była według metody Nei'a (7), a miary tej wielkości zostały następnie użyte do konstrukcji dendrogramu



Rys. 2. Dendrogram obrazujący relacje podobieństwa genetycznego między porównywanymi populacjami sosny zwyczajnej otrzymany metodą UPGMA.

według metody UPGMA (rys. 2). Obrazuje on stopień podobieństwa genetycznego między badanymi populacjami. Powstały w ten sposób dwie grupy główne, podzielone na mniejsze, składające się z kilku populacji. Pierwsza obejmuje populacje z: Rosji (1-3) oraz proveniencje sosny z krajów nadbałtyckich (4,5,11). Sosny z północno-wschodnich rejonów Polski (5) są podobne do populacji z Łotwy (4). W skład kolejnej wydzielonej grupy wchodzi populacje z Belgii (13) i Francji (14). Następną grupę tworzą populacje rosnące na granicy zasięgu południowego sosny (16,19,20) i polskie populacje z Supraśla (6), Rychtala (8) i Spały (7). Proveniencja z Bolewic (9) wykazuje natomiast znaczne podobieństwo do populacji z Niemiec (10). Interese



sujący wydaje się także fakt, że populacja ze Szwecji (15) i populacje bałkańskie stanowią jedną grupę. Potwierdzono to, jak się wydaje, we wcześniejszych badaniach nad polimorfizmem nukleotydów u sosny zwyczajnej pochodzącej z Turcji i Szwecji, które wykazywały znaczne podobieństwo pomiędzy tymi populacjami (10).

Przedstawione na dendrogramie relacje pomiędzy europejskimi populacjami sosny zwyczajnej, pokrywają się z opracowanymi na podstawie doświadczeń proweniencyjnych przez Wrigta i Bulla (12) obszarami występowania ras i ich wzajemnym podobieństwem.

Obserwowana w wynikach niższa liczba loci polimorficznych, w przypadku populacji rosnących na granicy zasięgu, sugeruje, że podlegają one silniejszej selekcji, podczas gdy populacje wewnątrz zasięgu są bardziej stabilne i posiadają znaczne różnicowanie genetyczne.

Prezentowane w ramach tego sprawozdania wyniki przynajmniej częściowo uzupełniają naszą wiedzę co do genetycznego różnicowania populacji *Pinus sylvestris*.

#### 4. Wnioski

1. W prezentowanych badaniach, markery RAPD były bardzo skutecznym narzędziem do identyfikowania zmienności genetycznej populacji sosny zwyczajnej.

2. Podstawowe znaczenie w otrzymaniu powtarzalnej procedury RAPD miały: optymalizacja ilości DNA, stężenia  $MgCl_2$  i temperatury przyłączania straterów.

3. Populacje o wysokim poziomie różnicowania genetycznego to populacje pochodzące z północy Europy (15,4,6), Słowacji (16), Jugosławii (18), Turcji (20) i Polski (8).

Badania przedstawiane w pracy były finansowane ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej na zamówienie Ministerstwa Środowiska.

#### Literatura

1. Bartels H., (1971), *Planta*, 99, 283-289.
2. Critchfield W. B., Little E., (1991), *Geographic Distribution of the Pines of the World*, USDA Forest Service Misc. Publication 991. (<http://dendrome.ucdavis.edu/Image/Rangemap/sylvestris.html>.)
3. Forrest G. I., (1994), *Forestry Abstracts*, 55, 123-153.
4. Göçmen B., Jermstad K. D., Neale D. B., Kaya Z., (1996), *Can. J. For. Res.*, 26, 497-503.
5. Hamrick J. L., Godt M. J., (1990), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, Sinauer Press, London, 43-63.
6. Mason W. L., Alia R., (1999), *Current and future status of Scots pine (Pinus sylvestris) forests in Europe. Silviculture and biodiversity of Scots pine forest in Europe*. Proceedings of the final meeting of a Concerted Action (FAIR CT-95-1447) funded by the European Union under the Fourth Framework Programme, CENEAN – Valsain, Spain, 26, 317-333.
7. Nei M., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3321-3323.

8. Parker K. C., Hamrick J. L., (1996), *Can. J. For. Res.*, 21, 123-128.
9. Prus-Głowacki W., (1994), Materiały z sympozjum IUFRO pt. *Scots Pine Breeding and Genetics*, Litwa 1994, 63-70.
10. Wang X., Suyama Y., Szmidt A. E., (2002), Materiały z sympozjum IUFRO pt. *Population and Evolutionary Genetics of Forest Trees*, Stara Lesna, Słowacja, 25-29.08.2002, 25.
11. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
12. Wright J. W., Bull W. J., (1963), *Silvae Genetica*, 6 (1), 2-14.
13. Yeh F. C., Boyle T. J. B., (1997), *Belgian Journal of Botany*, 129, 157-160.