



Kornelia Polok

Roman Zieliński

RAPORT

dla Tatrzańskiego Parku Narodowego



*Przeprowadzenie badania naukowego — weryfikacja
pochodzenia drzewiastych form kosodrzewiny na terenie TPN
za pomocą analiz genetycznych*

Badania sfinansowano ze środków
Funduszu Leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasów Państwowych

Listopad 2015 r

SPIS TREŚCI

| | |
|---|-----------|
| 1 STRESZCZENIE PROJEKTU | 4 |
| 2 CEL ANALIZY I ZADANIA BADAWCZE | 5 |
| 3 MATERIAŁ | 6 |
| 3.1 Zbiór prób <i>Pinus x rhaetica</i> ze stanowisk tatrzańskich | 10 |
| 3.2 Zbiór prób <i>Pinus uncinata</i> ze stanowisk alpejskich..... | 12 |
| 4 METODYKA | 13 |
| 4.1 Izolacja DNA | 13 |
| 4.2 Markery DNA | 13 |
| 4.2.1 Markery B-SAP..... | 13 |
| 4.2.2 Analiza sekwencji transpozonowych przy pomocy SSAP | 16 |
| 4.2.3 Sekwencjonowanie DNA | 24 |
| 4.3. Analiza statystyczna i metody bioinformatyczne | 24 |
| 4.3.1 Ocena zmienności genetycznej badanych populacji | 24 |
| 4.3.2 Określenie powiązań ewolucyjnych..... | 25 |
| 4.3.3 Analiza zbieżności sekwencji B-SAP i SSAP..... | 26 |
| 4.3.4 Wyznaczanie starterów specyficznych gatunkowo | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 5 WYNIKI | 27 |
| 5.1 Zróźnicowanie genetyczne wybranych taksonów | 27 |
| 5.2 Powiązania filogenetyczne w rodzaju <i>Pinus</i> | 29 |
| 5.3 Rozróżnianie gatunków z rodzaju <i>Pinus</i> na podstawie markerów B-SAP oraz sekwencji transpozonowych..... | 33 |
| 5.1.1 Analiza zbieżności i wyznaczanie starterów dla markerów B-SAP specyficznych gatunkowo..... | 34 |
| 5.1.2 ANALIZA ZBIEŻNOŚCI I WYZNACZANIE STARTERÓW DLA SEKWENCJI TRANPOZONU BARE SPECYFICZNEJ GATUNKOWO | 36 |
| 6 WNIOSKI..... | 38 |
| 7 SPIS TABEL..... | 39 |
| 8 SPIS FIGUR | 40 |
| 9 LITERATURA | 41 |

1 STRESZCZENIE PROJEKTU

W różnych miejscach TPN występują drzewiaste formy kosodrzewiny, których pochodzenie nie jest znane. Wstępnie określa się je jako *Pinus x rhaetica*, jednakże pochodzenie tego ostatniego taksonu też jest przedmiotem kontrowersji. Najczęściej uważa się, że jest to takson mieszańcowy powstały ze skrzyżowania sosny z kosodrzewiną. Najnowsze badania molekularne wskazują, iż *Pinus x rhaetica* jest drzewiastą formą kosodrzewiny zaś kosodrzewina nie krzyżuje się z sosną zwyczajną ze względu na istniejącą pełną barierę gatunkową, co oczywiście nie wyklucza introgresji. Stosowane do tej pory metody morfologiczne, enzymatyczne oraz analiza wybranych sekwencji DNA organellowego i jądrowego nie różnicowały gatunków sosen i tym samym nie nadawały się ustalenia pochodzenia *Pinus x rhaetica*. Najnowsze badania pochodzące z wielu gatunków roślin i zwierząt wykazały, że jednym z pierwszych symptomów różnicowania się genomów, często w odpowiedzi na stres środowiskowy są transpozony. Markery SSAP oparte o sekwencje transpozonowe okazały się także efektywne w różnicowaniu populacji sosen, do tej pory nierozróżnialnych na poziomie molekularnym. Analiza sekwencji transpozonów stwarza więc realną szansę na wyjaśnienie pochodzenia sosny drzewokosej w Tatrach. Celem badań była ocena przynależności gatunkowej *Pinus x rhaetica* występującej na stanowiskach tatrzańskich z wykorzystaniem najnowszych i wysoce czułych markerów DNA opartych o sekwencje transpozonowe. Analizowano osobniki *Pinus x rhaetica* ze stanowisk tatrzańskich, które porównano z rosnącymi w pobliżu sosnami, kosodrzewinami, sosną błotną z Węglińca oraz sosną hakowatą, *Pinus uncinata* ze stanowisk alpejskich. Markery B-SAP oraz SSAP potwierdziły wcześniejsze ustalenia wskazujące na istnienie pełnej bariery reprodukcyjnej między sosną i kosodrzewiną wykluczającą tworzenie płodnych mieszańców. Oba taksony mają inne wzory molekularne, prążki wspólne prawie nie występują a ich podobieństwo genetyczne wynosi zaledwie 0,652–0,771. Również sekwencje markera B-SAP, KatGo8 oraz transpozonu Bare mają specyficzne nukleotydy w kilku pozycjach. Różnice genetyczne pomiędzy kosodrzewiną a sosną zwyczajną wykluczają tworzenie płodnych mieszańców i tym samym mieszańcowe pochodzenie *Pinus x rhaetica*. Wszystkie analizowane formy *Pinus x rhaetica* miały wzory B-SAP oraz SSAP typowe dla kosodrzewiny, co wskazuje, iż mogą to być drzewiaste formy przynależne do tego taksonu. Na przynależność *Pinus x rhaetica* do kompleksu *Pinus mugo* wskazuje także obecność tyminy w pozycjach 66 i 69 sekwencji B-SAP, KatGo8. Natomiast analiza sekwencji Bare wskazuje podobieństwo sosny drzewokosej do *P. uliginosa* ze względu na delecję w pozycji 20. Na podstawie sekwencji markerowej KatGo8 oraz Bare skonstruowano startery specyficzne dla badanych gatunków. Startery te po optymalizacji warunków PCR oraz walidacji mogą być wykorzystane do identyfikacji gatunków w obrębie kompleksu *Pinus mugo* jak również do odróżniania ich od sosny zwyczajnej.

2 CEL ANALIZY I ZADANIA BADAWCZE

Celem badania była weryfikacja pochodzenia drzewiastych form kosodrzewiny (sosny drzewokosej) występujących na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego. Za pomocą markerów DNA należało ocenić, czy zebrane próby sosny drzewokosej należą do gatunku *Pinus sylvestris*, *P. mugo* czy stanowią formy mieszańcowe *Pinus x rhaetica*. Aby osiągnąć powyższy cel wykonano następujące zadania badawcze:

1. Zebrano 36 prób sosny drzewokosej ze stanowisk tatrzańskich wraz z 20 próbami z rosnących w pobliżu okazów sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*) i 25 okazów kosodrzewiny (*P. mugo*). Wszystkie okazy zostały sfotografowane.
2. Zebrano 25 prób sosny hakowatej (*P. uncinata*) ze stanowisk alpejskich jako materiał kontrolny. Wszystkie okazy zostały sfotografowane.
3. Dodatkowo jako materiał kontrolny wykorzystano 20 prób sosny błotnej (*P. uliginosa*), po 10 ze stanowiska w Węglińcu oraz Wielkiego Torfowiska Batorowskiego. Wcześniejsze badania wykazały, że kosodrzewina oraz sosna błotna nie różnią się na poziomie molekularnym i stanowią jeden gatunek biologiczny.
4. Określono wzory molekularne charakterystyczne dla typowej sosny hakowatej, *P. uncinata*, kosodrzewiny, *P. mugo*, sosny błotnej, *P. uliginosa* i sosny zwyczajnej, *P. sylvestris* na podstawie analizy markerów B-SAP z wykorzystaniem 8 starterów KatG oraz markerów transpozonowych SSAP z wykorzystaniem 4 kombinacji starterów, Tpo/PstAT, Bare/PstAT, Ogr/PstAT, IFG7/MseC.
5. Określono wzory molekularne sosny drzewokosej, *Pinus x rhaetica* ze stanowisk tatrzańskich wykorzystując markery wymienione w punkcie 4 i porównano je ze wzorami potencjalnych form wyjściowych. Oszacowano poziom zmienności genetycznej, określono podobieństwo genetyczne badanych taksonów i przeprowadzono grupowanie metodą UPGMA, co pozwoliło na ustalenie powiązań filogenetycznych pomiędzy nimi oraz pochodzenia sosny drzewokosej w Tatrach.
6. Zsekwencjonowano markery różnicujące badane gatunki — B-SAP otrzymane przy pomocy starterów KatGo8 oraz SSAP otrzymane przy pomocy startera komplementarnego dla transpozonu Bare. Sekwencje porównano z tymi zdeponowanymi w bazie NCBI. Przeprowadzono analizę zbieżności wyznaczając miejsca mutacji. Zaprojektowano startery pozwalające identyfikować badane taksony na podstawie prostych analiz PCR.

3 MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiły próby pięciu gatunków sosen, z czego trzy gatunki reprezentowały kompleks *Pinus mugo*. Była to sosna hakowata, *Pinus uncinata* Mill. ex. Mirb. (Fig. 3.1), sosna błotna, *Pinus uliginosa* Neum. ex Wim. (Fig. 3.2), kosodrzewina, *Pinus mugo* Turra (Fig. 3.3). Ponadto analizowano próby sosny zwyczajnej, *Pinus sylvestris* L. (Fig. 3.4) oraz sosny drzewokosej, *Pinus x rhaetica* Brugger (Fig. 3.5). Spośród wymienionych gatunków, jedynie trzy, sosna hakowata, kosodrzewina i sosna zwyczajna są wyróżniane w randze gatunków przez ITIS (2015). Sosna błotna, *P. uliginosa* jest często opisywana jako *Pinus rotundata* lub *Pinus x rotundata*, gatunek będący domniemanym mieszańcem między *P. uncinata* i *P. mugo*. Mieszańcowemu charakterowi tego taksonu przeczą wyniki badań molekularnych z zastosowaniem markerów RAPD i ISJ, które wykazały wysokie podobieństwo sosny błotnej do kosodrzewiny (Polok i inni 2006). Natomiast sosna drzewokosa, *Pinus x rhaetica* jest najczęściej uznawana za gatunek mieszańcowy powstały ze skrzyżowania *P. sylvestris* i *P. mugo*, jednakże status ten jest kontrowersyjny ze względu na sprzeczne dane morfologiczne oraz molekularne. W niniejszych badaniach wstępnie za *Pinus x rhaetica* uznawano wszelkie znalezione w Tatrzańskim Parku Narodowym formy pośrednie, których nie można było jednoznacznie zaklasyfikować do kosodrzewiny lub sosny zwyczajnej.



Fig. 3.1 Sosna hakowata, *Pinus uncinata* w Alpach



Fig. 3.2 Sosna błotna, *Pinus uliginosa* na Wielkim Torfowisku Batorowskim



Fig. 3.3 Kosodrzewina, *Pinus mugo* w Tatrach

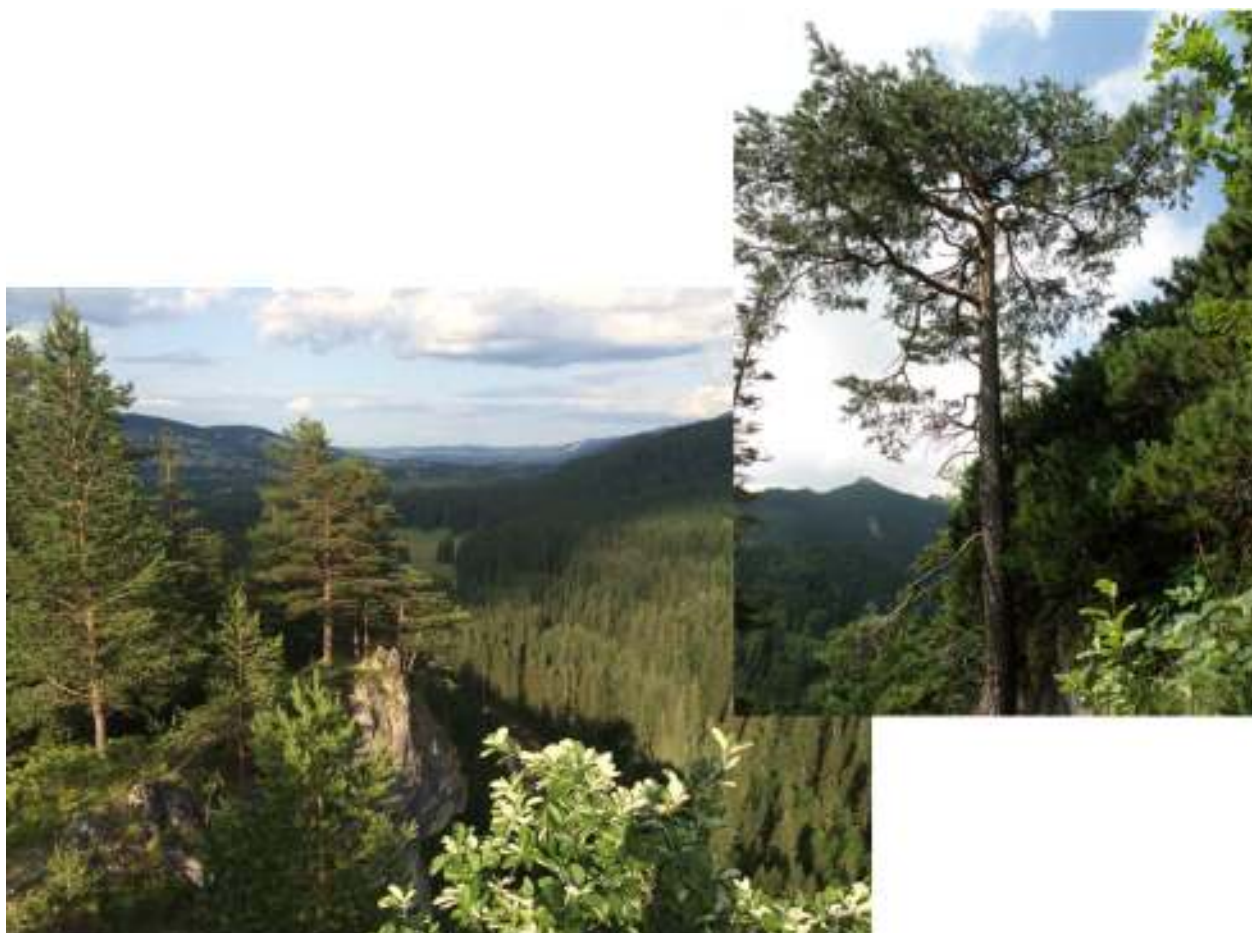


Fig. 3.4 Sosna zwyczajna, *Pinus sylvestris* na Siwiańskich Turniach i w Dolinie Białego



Fig. 3.5 Sosna drzewokosa, *Pinus x rhaetica* w Dolinie Białego i na Sarniej Skale

3.1 Zbiór prób *Pinus x rhaetica* ze stanowisk tatrzańskich

W sumie zebrano próby z 81 tatrzańskich sosen ze rozproszonych na obszarze około 65 km² na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (Fig. 3.6). Wśród zebranego materiału, kosodrzewina, *Pinus mugo* była reprezentowana przez 25 prób, sosna zwyczajna, *Pinus sylvestris* przez 20 prób, a sosna drzewokosa, *Pinus x rhaetica* przez 36 prób. Najwięcej prób *Pinus x rhaetica* pochodziło z Doliny Białego z populacji opisanej jako pochodzącej z alpejskich nasion, a zidentyfikowanej jako *Pinus x rhaetica* przez Staszkiwicza (1996). Ponadto zebrano osobniki pochodzenia naturalnego rozproszone na skałkach śródreglowych od Doliny Chochołowskiej po Dolinę Rybiego Potoku oraz z populacji powstałych z nasadzeń dokonanych w drugiej połowie XX wieku na Kalackim Upłazie i w Dolinie Jaworzynki (Zwijacz-Kozica 1998).

Z każdego okazu zbierano 2 krótkopędy o długości około 5 cm. Umieszczano je w wilgotnych woreczkach i przetrzymywano w temperaturze około 10°C do czasu transportu do laboratorium. Następnie pędy dokładnie myto, igły oddzielono od pędów i dokładnie je czyszczono etanolem w celu pozbycia się żywicy. Tak przygotowane próbki zamykano w woreczkach i umieszczano w temperaturze -20°C aż do czasu izolacji DNA.

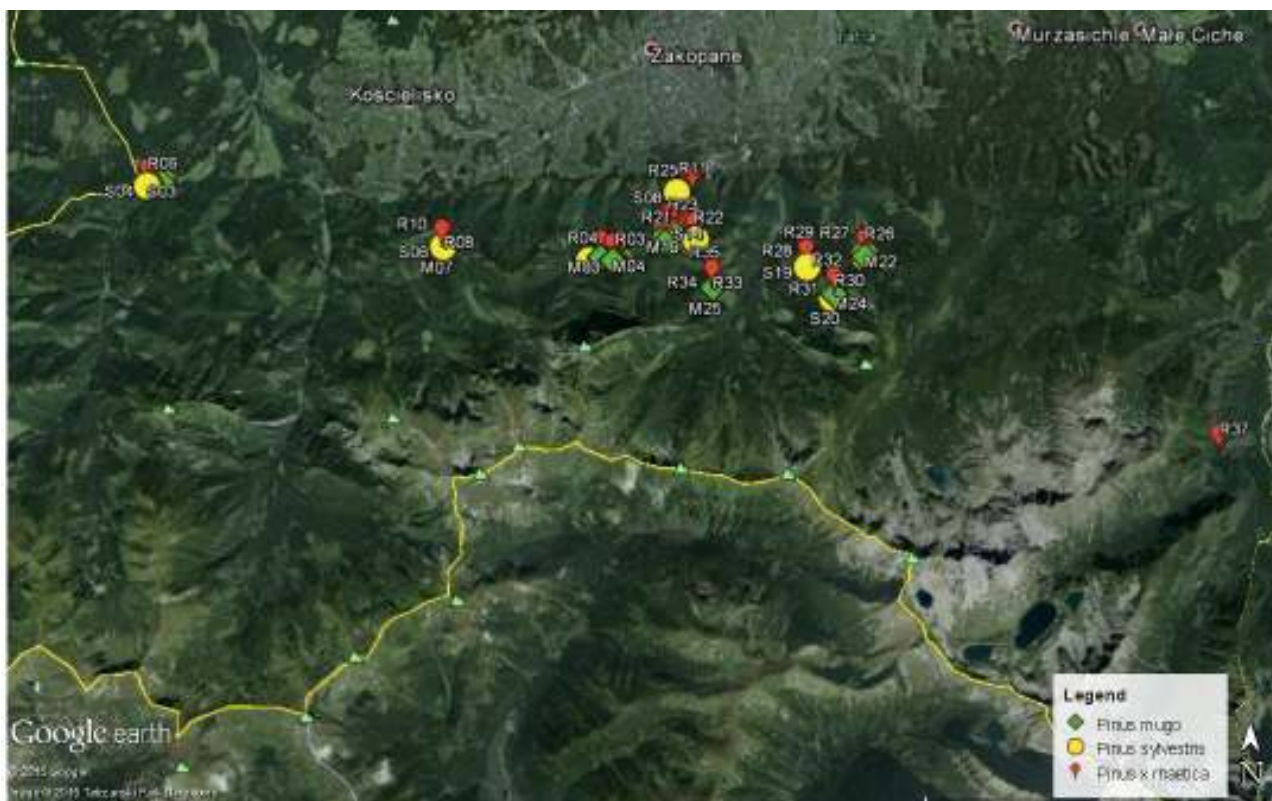


Fig. 3.6 Miejsca zbioru *P. mugo*, *P. sylvestris* oraz *Pinus x rhaetica* w Tatrach

Dodatkowo w badaniach wykorzystano 10 prób sosny błotnej, *P. uliginosa* zebranych ze stanowiska w Węglińcu oraz 10 prób zebranych na obszarze Wielkiego Torfowiska Batorowskiego (Fig. 3.7). Zbiór sosny błotnej dokonano w latach 2010-2012 według procedury opisanej dla stanowisk tatrzańskich.

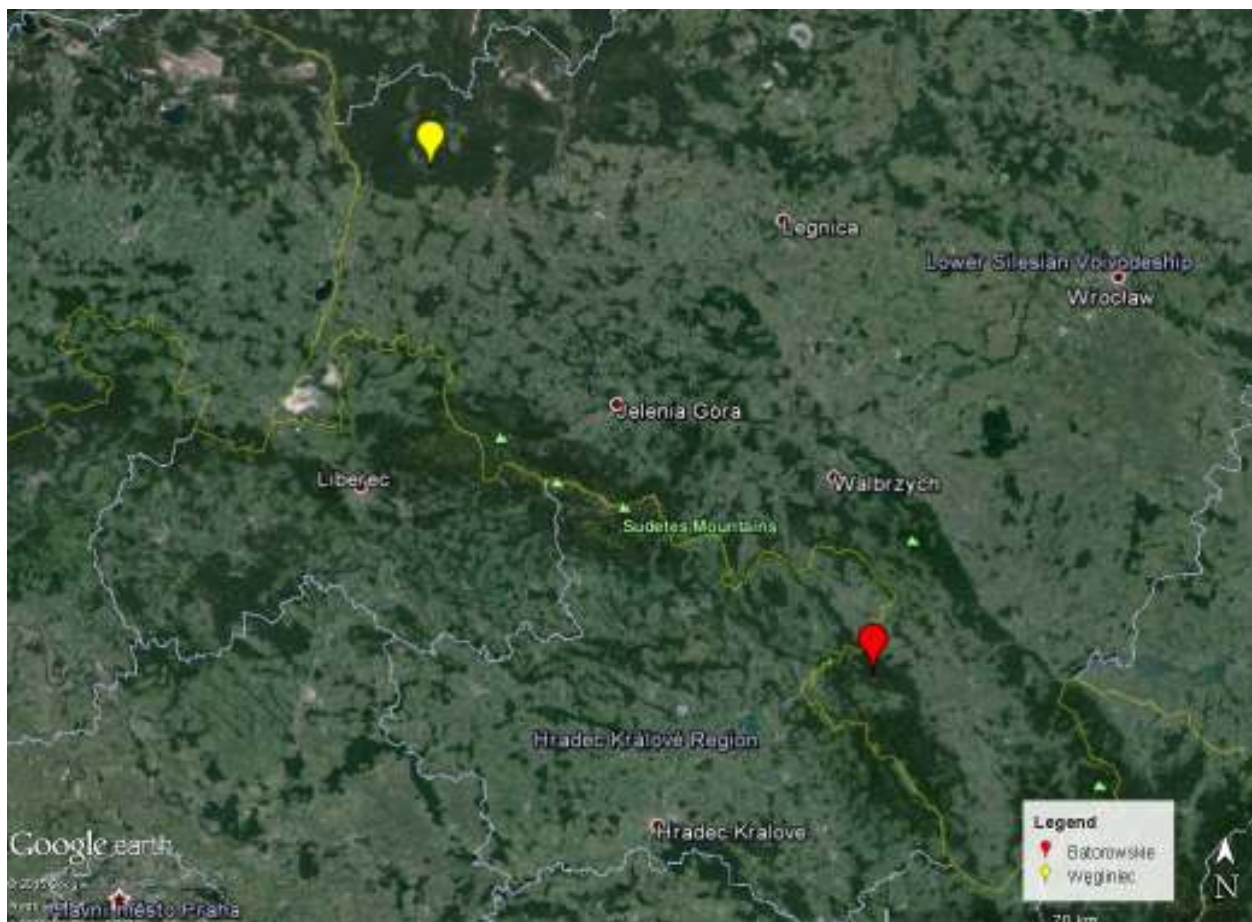


Fig. 3.7 Stanowiska zbioru *P. uliginosa*— Węglińiec oraz Wielkie Torfowisko Batorowskie

3.2 Zbiór prób *Pinus uncinata* ze stanowisk alpejskich

Zebrano 25 prób sosny hakowatej, *Pinus uncinata* z rozproszonych na obszarze 297 km² w Alpach Austriackich (Fig. 3.8). Próby zbierano podobnie jak osobniki tatrzańskie, tj. zbierano po 2 krótkopędy o długości 5 cm, które przechowywano w wilgotnym i chłodnym środowisku do czasu transportu do laboratorium, gdzie je zamrażano po uprzednim usunięciu zabrudzeń i resztek żywicy.



Fig. 3.8 Stanowiska zbioru prób *P. uncinata* w Alpach

4 METODYKA

4.1 Izolacja DNA

DNA izolowano metodą CTAB z modyfikacjami dla sosen (Polok 2007; Chmiel i inni 2008; Androsiuk i inni 2011). Około 2 g igieł oczyszczono z żywicy i powierzchniowo wysterylizowano 70% etanolem, a następnie rozdrobniono w ciekłym azocie z dodatkiem piasku kwarcowego. Otrzymany proszek umieszczono w 10 ml probówkach z 2 ml buforu izolacyjnego podgrzanego do temperatury 60°C. Do każdej z probówek dodano 330 µl 30% sarkosylu, 1 ml 10% PVP i 1 ml 20% CTAB. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 60°C przez 2 godziny. Po tym czasie DNA trzykrotnie ekstrahowano przy pomocy mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego w stosunku 24:1. Kwasy nukleinowe dodatkowo oczyszczono 1 M CsCl, a RNA usunięto za pomocą RNA-azy. Czystość otrzymanego DNA wynosiła średnio od 95% do 96% i była porównywalna u wszystkich gatunków. Średnia ilość DNA wynosiła średnio od 137 µg do 420 µg i była najwyższa u sosny zwyczajnej. Natomiast ilość DNA średnio wyizolowanego z prób kosodrzewiny, sosny drzewokosej i hakowatej była porównywalna u poszczególnych gatunków, ale dwukrotnie niższa niż u sosny zwyczajnej (Tabela 4.1).

| Gatunek | Czystość DNA [%] | Ilość DNA [x±SD] |
|-------------------------|------------------|------------------|
| <i>Pinus uncinata</i> | 96±1 | 235,02±50,97a |
| <i>Pinus uliginosa</i> | 92±5 | 240,75±49,19a |
| <i>Pinus mugo</i> | 96±2 | 137,25±45,67a |
| <i>Pinus sylvestris</i> | 95±2 | 419,66±200,78b |
| <i>Pinus x rhaetica</i> | 95±1 | 139,04±40,48a |

a,b —różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie dla P=0,05 w teście LSD

4.2 Markery DNA

4.2.1 Markery B-SAP

Markery B-SAP wykorzystują sekwencję bakteryjnego genu *KatG* kodującego katalazę-peroksydazę. Opierają się one na założeniu, że peroksydazy roślinne wyewoluowały od wspólnego przodka bakteryjnego poprzez serię duplikacji, konwersji i translokacji. Skuteczność markerów opartych o gen *KatG* w rozróżnianiu blisko spokrewnionych gatunków została potwierdzona u gatunków z rodzaju *Lolium* (Polok 2007), *Pellia* (Polok i inni 2005), a także *Pinus* (Zielinski i Polok 2005). Ponadto markery B-SAP okazały się skuteczne w śledzeniu dróg migracji sosny zwyczajnej (Androsiuk i inni, 2011).

W badaniu wykorzystano 12 par starterów komplementarnych do genu *KatG* (Fig. 4.1) oznaczonych odpowiednio jako katG₁–katG₁₂. W pierwszej kolejności analizowano 12 prób, po 4 reprezentujące *P. uncinata*, *P. mugo* i *P. sylvestris*. Na tej podstawie wybrano 8 par dających powtarzalne i czytelne wzory. Startery te wykorzystano do poszukiwań markerów gatunkowych oraz analizy powiązań filogenetycznych w rodzaju *Pinus*.

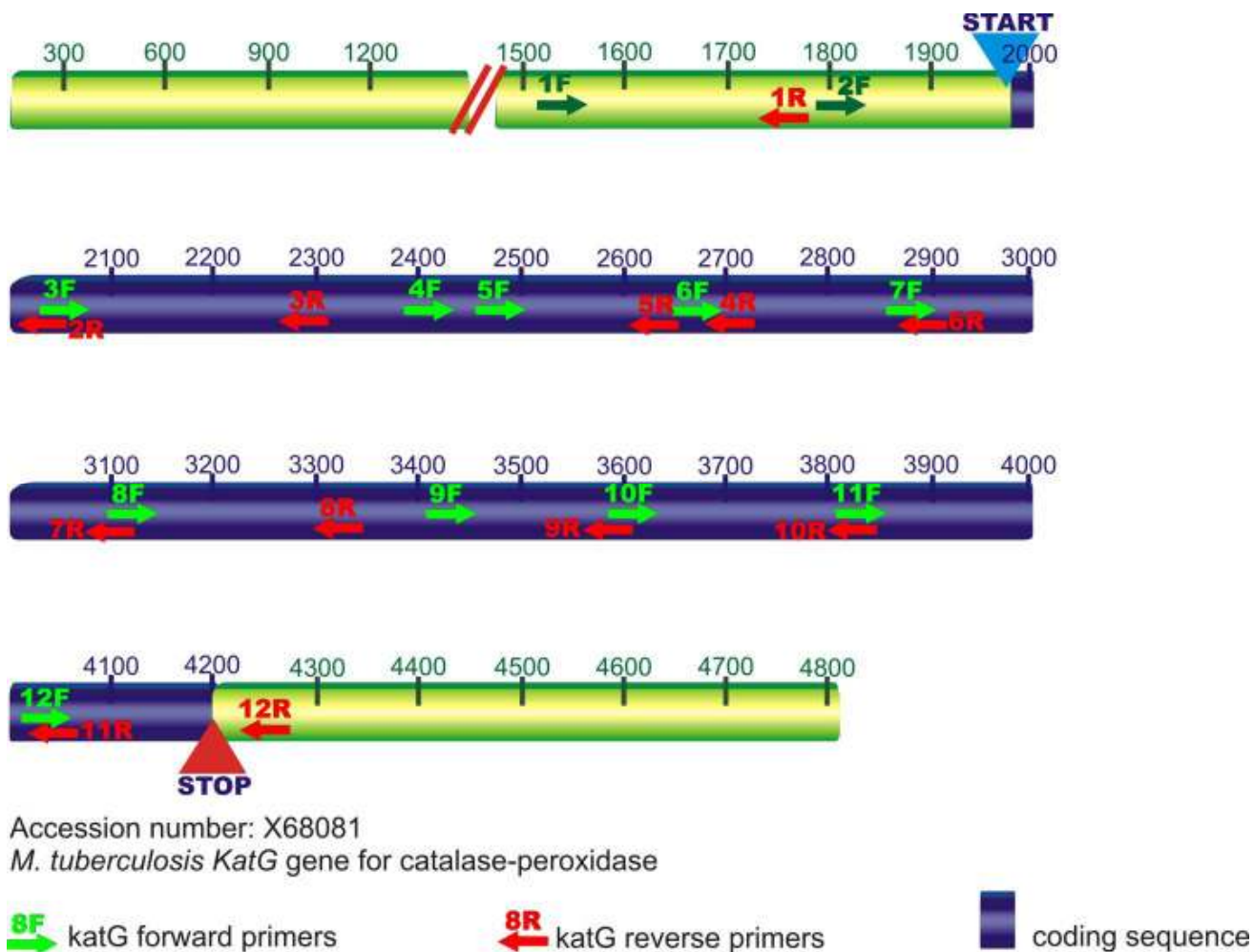


Fig. 4.1 Lokalizacja starterów *KatG* komplementarnych do bakteryjnego genu *KatG* kodującego katalazę-peroksydazę

Warunki reakcji PCR uwzględniały te podane przez Polok (2007) z modyfikacjami dla sosen (Adrosiuk i inni 2011). W skrócie, każdą reakcję PCR prowadzono w 20 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor reakcyjny o składzie 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl_2 , wzmacniacz PCR zawierający 0,5 M betainę, 200 μ M nukleotydy, 1 μ M startery, 1 U Tfl polimerazy firmy Epicentre Technology oraz 100 ng DNA. Mieszaninę podgrzewano do 94°C przez 3 min, w celu wstępnej denaturacji DNA, a następnie w zależności od pary starterów amplifikowano przez 30–35 cykli. Każdy cykl obejmował denaturację DNA w 94°C przez 1 min, przyłączanie starterów (annealing) w 50–53°C przez 1 min, wydłużanie (elongację) w 72°C przez 1–1,5 min. oraz końcowe wydłużanie w 72°C przez 5 min. (Tabela 4.2).

| Tabela 4.2 Startery wykorzystane w metodzie B-SAP i warunki reakcji PCR | | | | |
|---|--|------------------------|-----------------------|--------------|
| Symbol | Sekwencja (5'→'3') | Temperatura annealingu | Czas elongacji [min.] | Liczba cykli |
| katGo2-F katGo2-R | GCG GGG TTA TCG CCG ATG GCC CTC GAC GGG GTA TTT | 52°C | 1,5 | 35 |
| katGo3-F katGo3-R | AAC GGC TGT CCC GTC GTG' GTC GTG GAT GCG GTA GGT G | 52°C | 1,5 | 35 |
| katGo4-F katGo4-R | TCG ACT TGA CGC CCT GAC G CAG GTC CGC CCA TGA GAG | 52°C | 1,5 | 30 |
| katGo6-F katGo6-R | GCA GAT GGG GCT GAT CTA CG ACC TCG ATG CCG CTG GTG' | 52°C | 1,5 | 35 |
| katGo7-F katGo7-R | GCT GGA GCA GAT GGG CTT G ATC CAC CCG CAG CGA GAG | 51°C | 1,0 | 30 |
| katGo8-F katGo8-R | GTC ACT GAC CTC TCG CTG CGC CCA TGC GGT CGA AAC | 50°C | 1,0 | 30 |
| katG10-F katG10-R | CAA AGT GTC CTT CGC CGA CC CAC CTA CCA GCA CCG TCA TC | 50°C | 1,5 | 35 |
| katG11-F katG11-R | TGC TCG ACA AGG AGA ACC TG TCC GAG TTG GAC CCG AAG AC | 52°C | 1,5 | 35 |

Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE (0.09 M Tris-borate, 0.002 M EDTA) przy stałym napięciu 100 V. Elektroforezę prowadzono przez 90 minut, a produkty reakcji wybarwiono bromkiem etydyny dodawanym do żelu w stężeniu 0,5 µg/ml i uwidoczniono w świetle UV (312 nm). Żele fotografowano i archiwizowano jako pliki jpg. Żele odczytywano komputerowo. Ze względu na potwierdzony we wcześniejszych badaniach (Polok 2007; Chmiel i inni 2008; Androsiuk i inni 2011), dominujący sposób dziedziczenia zastosowanych markerów, wszystkie prążki, które można było jednoznacznie odczytać, określono jako loci i oznaczano jako 1 w przypadku obecności prążka i jako 0 przy jego braku. Prążki opisywano jako np. katGo1-2, gdzie katGo1 oznacza parę starterów nr 1 komplementarną do pierwszych 300 bp genu *KatG*, a nr 2 oznacza drugi prążek od anody (elektrody dodatniej).

4.2.2 Analiza sekwencji transpozonowych przy pomocy SSAP

Metoda SSAP wykorzystuje polimorfizm sekwencji powtarzalnych znajdujących się na końcach transpozonów — LTR (ang. Long Terminal Repeats) lub TIR (ang. Inverted Terminal Repeats). Transpozony występują w genomach roślin w znacznej liczbie i charakteryzują się zmiennością zarówno pod względem liczby kopii jak i lokalizacją (miejscem insercji) u blisko spokrewnionych gatunków (Flavell i inni, 1992). Odgrywają one istotną rolę w różnicowaniu się gatunków (Vershinin i inni, 2003; Polok 2007), w odpowiedzi na stresowe warunki środowiska (Kalendar i inni, 2000), w tym wynikające z działania mutagenów (Polok i Zieliński 2011), a także są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zmienność rozmiarów genomu między innymi w rodzaju *Pinus* (Morse i inni 2009).

Metodyka SSAP polega na cięciu genomowego DNA kombinacją enzymów restrykcyjnych, dobranych tak aby jeden rozpoznawał wiele miejsc cięcia (np. *MseI*), a drugi — nieliczne (np. *PstI*). Następnie miejsca cięcia są stabilizowane poprzez przyłączenie (ligację) specyficznych sekwencji nukleotydowych, tzw. adaptorów. Tak przygotowane fragmenty poddaje się wstępnej amplifikacji (pre-amplifikacji), w której starterami są sekwencje komplementarne do adaptorów. Otrzymany produkt zawiera na tyle dużo różnorodnych fragmentów DNA, że ich uwidocznienie czy to na żelu czy za pomocą sekwencjonowania nie jest możliwe, gdyż obserwuje się albo zbyt wiele bardzo słabych prążków, albo wiele nieczytelnych „pików”. Dlatego w ostatnim etapie ogranicza się liczbę produktów PCR poprzez ponowną amplifikację, tzw. amplifikację selektywną, w której matrycą jest produkt preamplifikacji, a jako startery wykorzystuje się jeden starter komplementarny do adaptorów z dodatkowymi 1–6 zasadami selektywnymi oraz jako drugi — starter specyficzny dla sekwencji transpozonowych, otrzymany na bazie LTR lub TIR (Rys. 4.2). Dzięki temu otrzymane fragmenty odpowiadają miejscom insercji transpozonów. Analizę SSAP przeprowadzono według metodyki opisanej przez Polok (2007), z modyfikacjami dla sosen.

W analizie SSAP wykorzystano startery komplementarne do sekwencji retrotranspozonów *gypsy* pochodzące z *Pinus taeda*, do sekwencji *copia* i *gypsy* — rodzin retrotranspozonów rozpowszechnionych w świecie roślin (Bare, OGRE) oraz startery komplementarne do transpozonów DNA z grupy CACTA, które występują w genomach roślin w dużej liczbie kopii (Tabela 4.3). Wszystkie startery były analizowane w kombinacjach z dwoma enzymami restrykcyjnymi, *MseI* i *PstI* oraz z kilkoma kombinacjami zasad selektywnych. Po wstępnej analizie 10 kombinacji wybrano 4 kombinacje starterów dające najbardziej powtarzalne wzory z największą liczbą prążków. Były to kombinacje Tpo/PstAT, Bare/PstAT, OGRE/PstAT i IFG7/MseC

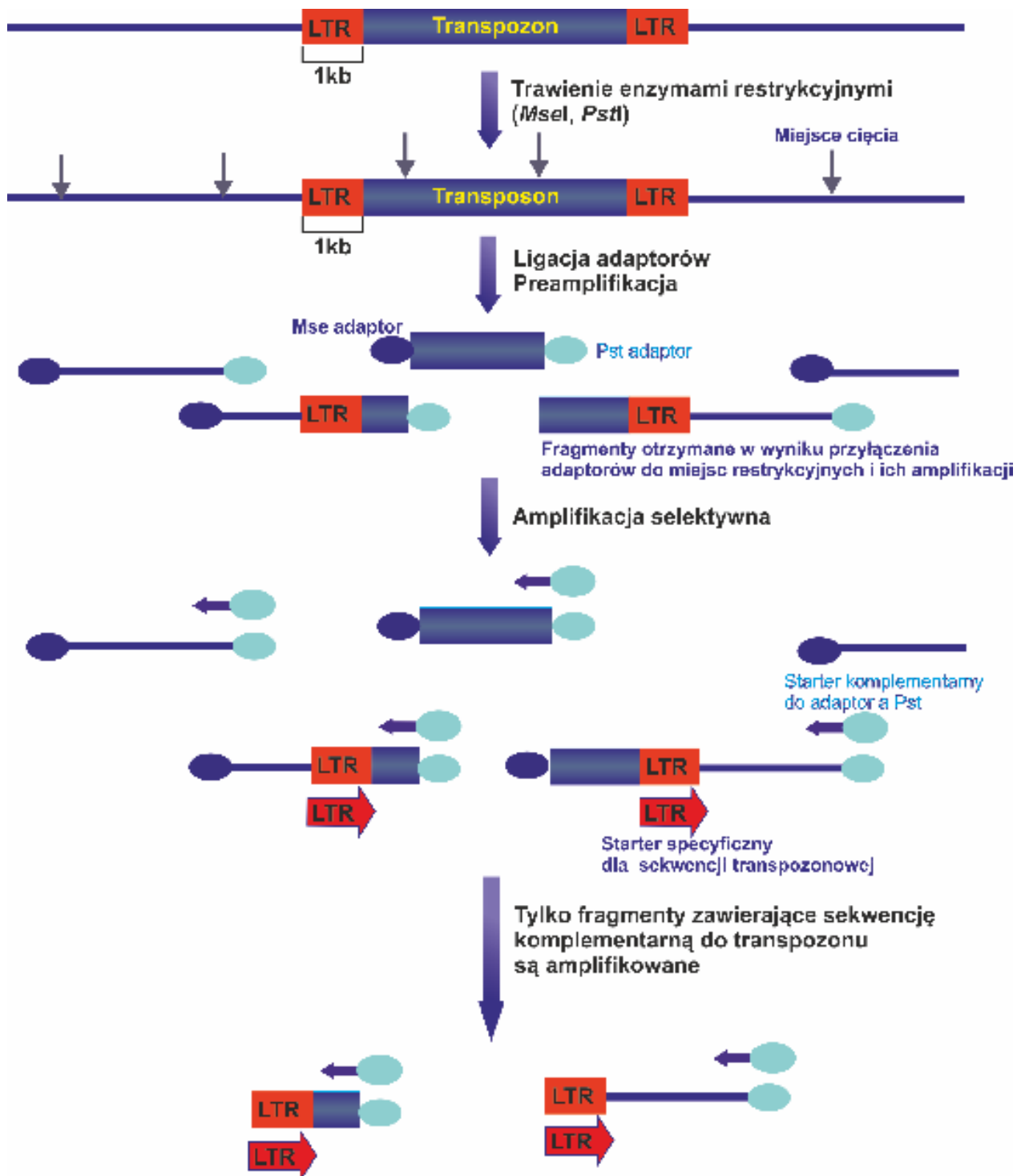


Fig. 4.2 Schemat reakcji SSAP wykrywającej miejsca insercji transpozonów

Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Trawienie enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono w 18 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 33 mM Tris-octan (pH 7,5), 66 mM octan potasowy, CH_3COOK , 10 mM octan magnezowy, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ i 0,5 mM DTT, 3 U enzymu *MseI*, 3 U enzymu *PstI* oraz 360 ng DNA. Mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C przez 24 h. Po tym czasie inaktywowano enzymy restrykcyjne poprzez inkubację w temperaturze 75°C przez 15 min.

Jakość cięcia enzymami restrykcyjnymi sprawdzono elektroforetycznie. W tym celu 5 μ l mieszaniny reakcyjnej obciążano 1 μ l barwnika, 0,25% Xylene Cyanol FF w 30% glicerolu i наносzono na 1% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono przez 15 i 45 min. w buforze TBE (0,09M Tris-borate, 0,002M EDTA) przy stałym napięciu 100 V. Produkty reakcji wybarwiono bromkiem etydyny dodawanym do żelu w ilości 0,5 μ g/ml i uwidacziano w świetle UV (312 nm). Prawidłowo pocięte DNA było widoczne jako lekko świecąca smuga bez wyraźnych prążków po 15 min. i brak wyraźnej smugi po 45 min. (Rys. 4.3).

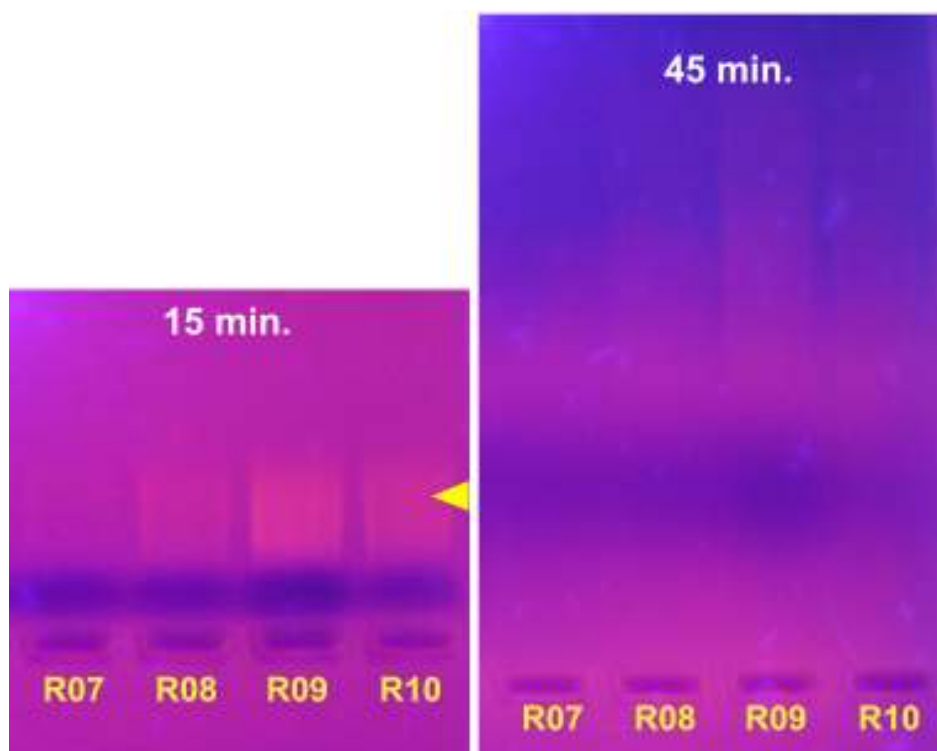


Fig. 4.3 Próby *Pinus x rhaetica* po trawieniu enzymami restrykcyjnymi

| Tabela 4.3 Startery wykorzystane w metodzie SSAP | | | |
|--|---|---------------------------------|---|
| Symbol | Sekwencja (5'→'3') | Zastosowanie | Opis sekwencji |
| MseAd-F MseAd-R | GAC GAT GAG TCC TGA G TAC TCA GGA CTC AT | Ligacja, przyłączenie adaptorów | Adaptory komplementarne do miejsca cięcia enzymem <i>MseI</i> |
| PstAd-F PstAd-R | CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA TGT ACG CAG TCT AC | Ligacja, przyłączenie adaptorów | Adaptory komplementarne do miejsca cięcia enzymem <i>PstI</i> |
| Mseo | GAT GAG TCC TGA GTA A | Preamplifikacja | Sekwencje komplementarne do adaptorów, bez zasad selektywnych (o) lub z jedną zasadą selektywną |
| Psto | GAC TGC GTA CAT GCA G | Preamplifikacja | |
| MseC | GAT GAG TCC TGA GTA AC | Preamplifikacja | |
| PstAT | GAC TGC GTA CAT GCA GAT | Amplifikacja selektywna | Starter komplementarny do miejsca cięcia <i>PstI</i> z 2 zasadami selektywnymi |
| Tpo | GAT TGC CTT TTT CCT AGT AGT G | Amplifikacja selektywna | Starter na bazie transpozonu DNA typu CACTA |
| Bare | CTA GGG CAT AAT TCC AAC AA | Amplifikacja selektywna | Starter komplementarny do retrotranspozonu <i>copia</i> u roślin |
| Ogre | GTC GGC TGG GCT TTA GTG AGA TGC G | Amplifikacja selektywna | Starter komplementarny do retrotranspozonu <i>gypsy</i> u roślin |
| IFG7 | CTA GTA TTA TRR GGA CCR AAC A G | Amplifikacja selektywna | Starter komplementarny do retrotranspozonu <i>gypsy</i> z <i>P. taeda</i> |

Ligacja adaptorów

Do fragmentów DNA otrzymanych w wyniku cięcia enzymami restrykcyjnymi przyłączano adaptory specyficzne dla zastosowanych enzymów *MseI* oraz *PstI* (Tabela 4.3). Reakcję ligacji przeprowadzano w 25 µl buforu dla T₄ DNA ligazy o składzie 33 mM Tris-octan, pH 7,5, 66 mM octan potasowy, CH₃COOK, 10 mM octan magnezowy, (CH₃COO)₂Mg i 0,5 mM DTT. Ponadto mieszanina reakcyjna zawierała 0,4 mM ATP, 1 µM adaptory przyłączane do miejsc cięcia *MseI*, 0,5 µM adaptory dla miejsc cięcia *PstI*, 1 U enzymu T₄ DNA ligazę oraz 250 ng DNA otrzymanego w wyniku cięcia enzymami restrykcyjnymi. Mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po tym czasie sprawdzano efektywność ligacji poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym podobnie jak po cięciu enzymami restrykcyjnymi. Fragmenty DNA z prawidłowo przyłączonymi adaptorami dały obraz wyraźnych prążków po 15 min. i lekko świecących, rozmytych prążków w górnej części żelu po 45 min. (Rys. 4.4). Pozostałą część produktów reakcji ligacji rozcieńczano 10-krotnie wodą dejonizowaną do ostatecznego stężenia DNA 1 ng/µl.

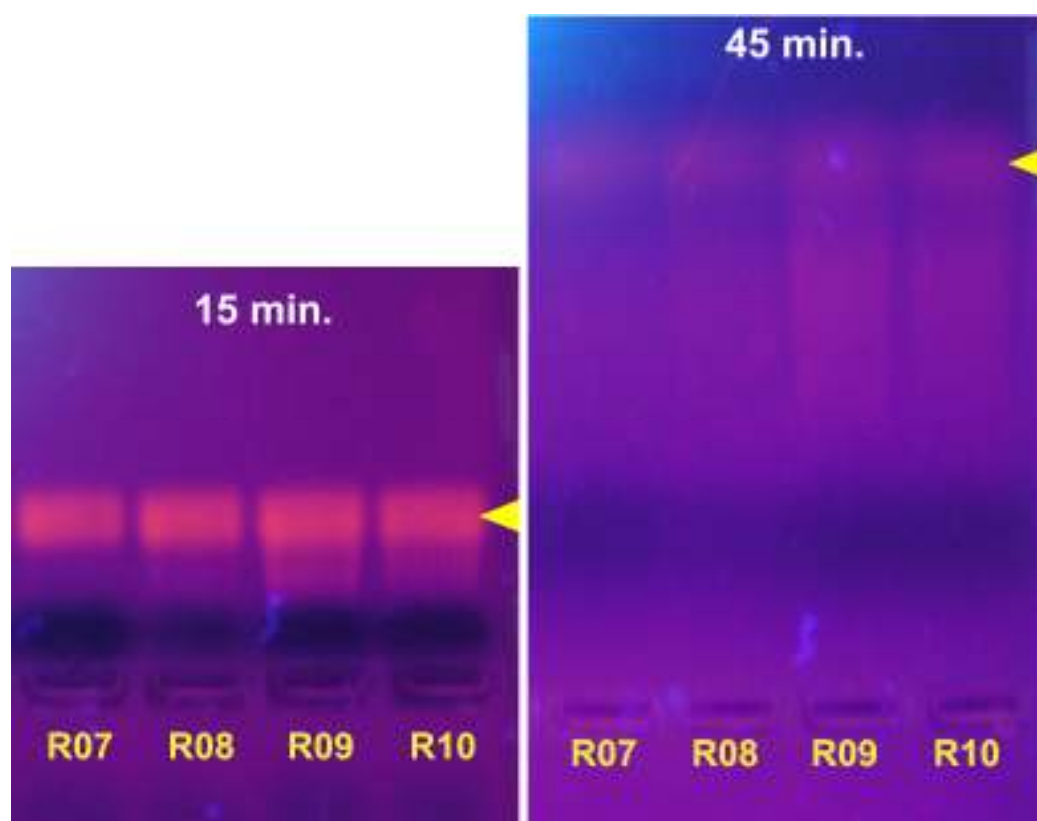


Fig. 4.4 Próby *Pinus x rhaetica* po ligacji — przyłączeniu adaptorów

Preamplifikacja

Fragmenty DNA z przyłączonymi adaptorami amplifikowano bez wstępnej selekcji, tj. z wykorzystaniem starterów komplementarnych do miejsc cięcia *MseI* i *PstI* pozbawionych zasad selektywnych, Mseo i Psto (Tabela 4.3). Amplifikację prowadzono w 15 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor reakcyjny o składzie 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl_2 , wzmacniacz PCR zawierający 0,5 M betainę, 250 μ M nukleotydy, 0,5 μ M startery Mseo i Pst o, 0,5 U polimerazy Tfl (Epicentre Technologies) oraz 5 ng DNA otrzymanego w wyniku rozcieńczenia produktów ligacji (=5 μ l). Amplifikację prowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie bez wstępnej denaturacji przez 13 cykli składających się z denaturacji w 94°C przez 30 s, annealingu przez 30 s w temperaturze od 65°C obniżanej w każdym cyklu o 0,5°C aż do temperatury 56°C, elongacji w temperaturze 72°C przez 60 s. Następnie, przez 28 cykli składających się z denaturacji w temperaturze 94°C przez 30 s, annealingu w temperaturze 56°C przez 30 s, elongacji w 72°C przez 60 s. Otrzymane produkty amplifikacji sprawdzano elektroforetycznie w 5 μ l mieszaniny reakcyjnej według identycznej procedury jak przy trawieniu enzymami restrykcyjnymi i ligacji. Prawidłowa preamplifikacja daje silnie świecące w świetle UV jasne, lekko rozmyte prążki po 15 min. i smugi po 45 min. (Rys. 4.5). Otrzymane produkty preamplifikacji rozcieńczano 5-krotnie i taką mieszaniną używano w następnym etapie, selektywnej amplifikacji.

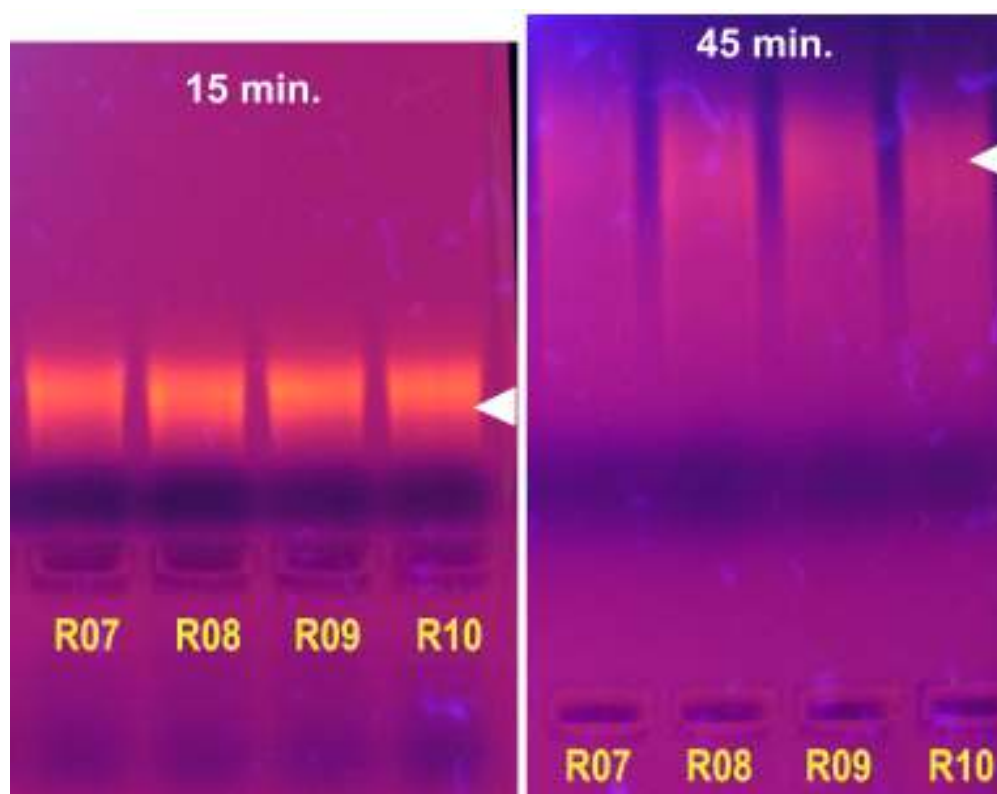


Fig. 4.5 Próby *Pinus x rhaetica* po preamplifikacji

Selektywna amplifikacja

Amplifikację selektywną prowadzono z wykorzystaniem jednego ze starterów komplementarnych do adaptorów i miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi, przy czym wykorzystywano starter mający dodatkowe zasady selekcyjne. Drugi ze starterów był specyficzny dla sekwencji transpozonowej (Tabela 4.3). Mieszanina reakcyjna o łącznej objętości 10 μ l zawierała bufor reakcyjny o składzie 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl_2 , wzmacniacz PCR zawierający 0,5 M betainę, 250 μ M nukleotydy, 0,5 μ M starter komplementarny do adaptoru i miejsca restrykcyjnego (PstAT lub MseC), 0,5 μ M starter specyficzny dla transpozonu, 0,5 U polimerazy Tfl (Epicentre Technologies) oraz 2,5 μ l DNA otrzymanego w wyniku rozcieńczenia produktów preamplifikacji. Amplifikację prowadzono dwuetapowo w identycznych warunkach jak preamplifikację. Przed rozdzieleniem produktów na żelu akrylamidowym, sprawdzano je elektroforetycznie na 1,5% żelu agarozowym z 0,5 μ g/ml bromku etydyny, w buforze TBE (0,09 M Tris-borate, 0,002M EDTA) przy stałym napięciu 100 V. Elektroforezę prowadzono przez 45 min. i produkty reakcji uwidacziano w świetle UV (312 nm). Prawidłowe produkty powinny być widoczne w postaci prążków o różnej ruchliwości, bez pozostałości DNA e studzienkach żelu (Rys. 4.6). Metoda powyższa jest mniej czasochłonna niż żel poliakrylamidowy i pozwala także na wstępną selekcję kombinacji starterów. Startery nie dające dobrych wyników na żelu agarozowym, tzn. brak produktów reakcji lub niewyraźne smugi, dają nieczytelne obrazy na żelu poliakrylamidowym i nie nadają się do wykorzystania w analizie SSAP.

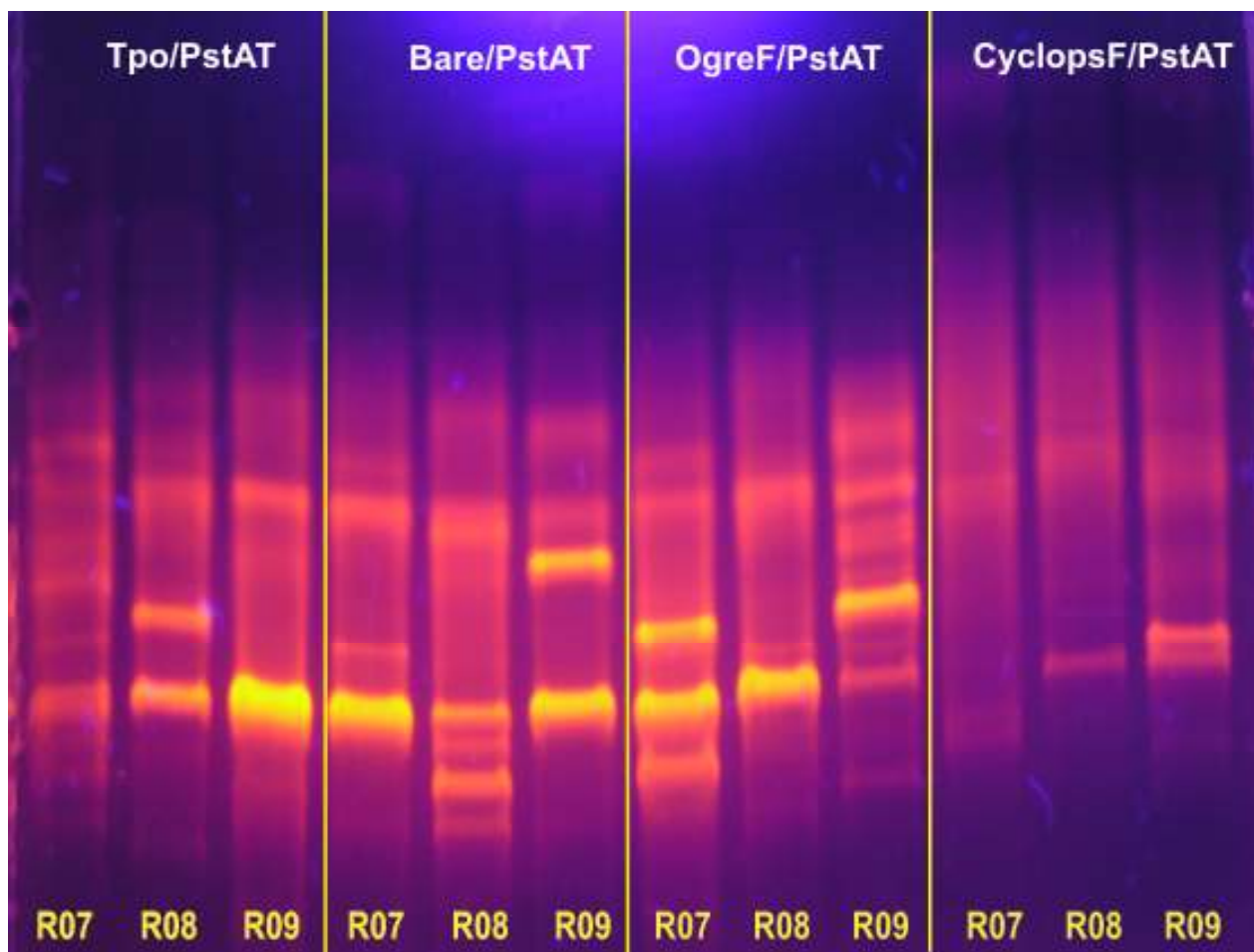


Fig. 4.6 Sprawdzenie jakości selektywnej amplifikacji u prób *Pinus x rhaetica* na żelu agarozowym. Trzy pierwsze kombinacje dają wyraźne prążki, natomiast czwarta jest rozmyta i na żelu poliakrylamidowym będą obserwowane liczne, ale słabo czytelne prążki.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Produkty selektywnej amplifikacji denaturowano w roztworze formamidu (amid kwasu mrówkowego) o składzie 98% formamid (amid kwasu mrówkowego), 10 mM EDTA o pH 8,0 oraz 0,1% barwniki, Bromophenol Blue oraz Xylene Cyanol FF. Do 10 μ l mieszaniny po selektywnej amplifikacji dodawano 8 μ l roztworu formamidu i denaturowano w 94°C przez 5 min. Tak przygotowane próbki, o objętości 10 μ l każda наносono na 6% denaturujący żel poliakrylamidowy, a pozostałą część (8 μ l) zamrażano w celu późniejszego ewentualnego wykorzystania.

Denaturujący 6% żel poliakrylamidowy przygotowywano w buforze TBE (0,09M Tris-borate, 0,002M EDTA) w 7,06 M moczniku o pH 8,3. W celu polimeryzacji dodawano do żelu TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) do uzyskania ostatecznego stężenia 0,047% oraz APS (nadsiarczan amonu) do ostatecznej koncentracji 0,62%. Zimny żel wylewano do uprzednio przygotowanego szklanego aparatu i pozostawiano do spolimeryzowania przez 24 h. Po tym czasie, żel montowano w aparacie do elektroforezy wysokonapięciowej i prowadzono wstępną elektroforezę przez 20 min. przy mocy prądu 45 W (około 1500 V). Umożliwiło to wypłukanie APS ze studzienek żelu oraz jego nagrzanie do temperatury optymalnej dla elektroforezy.

Po zakończeniu wstępnej elektroforezy studzienki wypłukiwano dokładnie za pomocą buforu TBE tak aby pozbyć się rozpuszczonego mocznika, który mógłby utrudnić wnikanie fragmentów DNA do żelu. Na tak przygotowany żel nanoszono grzebień pozwalający nałożyć zdenaturowane próbki DNA. Próbki rozdzielano przy zastosowaniu prądu o mocy 45 W. W trakcie elektroforezy monitorowano temperaturę, która optymalnie powinna wynosić 45–60°C. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE do momentu, gdy szybszy barwnik, Bromophenol Blue wydostał się z żelu.

Wizualizacja prążków za pomocą srebrzenia

Po zakończeniu elektroforezy fragmenty DNA uwidacziano za pomocą srebrzenia. Wszystkie roztwory używane do wybarwiania miały temperaturę 4–6°C. Wszystkie czynności wykonywano jednocześnie wytrząsając żel przy obrotach 130–150 obrotów/min, co zapobiegało gromadzeniu się barwników w jednym miejscu żelu. Żel przyczepiony do jednej z szyb aparatu elektroforetycznego umieszczano w 10% kwasie octowym i wytrząsano przez 20 min. aż barwniki elektroforetyczne przestały być widoczne. Następnie żel płukano 3-krotnie, ultra czystą wodą dejonizowaną. Każdorazowo żel płukano przez 2-3 min. jednocześnie delikatnie wytrząsając. Żel przekładano do 0,1% roztworu azotanu srebra, przykrywano i wytrząsano 2-5 min. Po tym czasie dodawano 36–38% formaldehyd do ostatecznego stężenia 0,090–0,095% i wytrząsano kolejne 25–30 min. Żel wyciągano z roztworu srebra i płukano przez **maksymalnie 10 s** w wodzie dejonizowanej. W możliwie jak najkrótszym czasie żel przenoszono do 3% roztworu węglanu sodowego z formaldehydem o ostatecznym stężeniu 0,071–0,076% oraz tiosiarczanu sodowego o ostatecznym stężeniu 0,0002% (w/v). Ostatnie dwa składniki dodawano bezpośrednio przed włożeniem żelu do roztworu. Początkowo wykorzystywano 1/2 r-ru węglanu sodowego, w którym wytrząsano żel przez 2–4 min. aż do pojawienia się widocznych prążków na dole żelu. Dopiero wówczas wlewano pozostałą część węglanu sodowego i wytrząsano przez kolejne 4–10 min. aż do uzyskania pożądanego obrazu prążków. Reakcję zatrzymywano poprzez wytrząsanie żelu w 5% kwasie octowym przez 4–5 min. Na koniec żel płukano w wodzie i suszono na powietrzu. Po 2–3 dniach żel skanowano i ewentualnie wykorzystywano do elucji prążków.

Prążki odczytywano jako 1 dla obecności miejsca insercji oraz 0 dla braku. Numerację prążków określano podobnie jak w przypadku markerów B-SAP, od anody oznaczając poszczególne prążki symbolem użytej sekwencji transpozycyjnej.

4.2.3 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie objęło markery B-SAP otrzymane przy pomocy pary starterów katGo8 oraz sekwencji transpozonu Bare. Wybrane markery umożliwiały rozróżnienie pomiędzy gatunkami z kompleksu *Pinus mugo* oraz sosną zwyczajną. Sekwencjonowanie przeprowadzono metodą di—deoxy przy pomocy automatycznego sekwenatora.

Przygotowanie matrycy do sekwencjonowania markerów B-SAP

Wybrane prążki B-SAP wyluowano z żelu agarozowego za pomocą zestawu gel-out i oczyszczono na kolumnkach. Otrzymaną matrycę DNA zamplifikowano w celu sprawdzenia jakości oraz czystości DNA. Jeżeli ponowna amplifikacja dała pojedynczy prążek, matrycę poddawano sekwencjonowaniu. W przeciwnym wypadku procedurę elucji powtarzano aż do otrzymania produktu o satysfakcjonującej jakości.

Przygotowanie matrycy do sekwencjonowania sekwencji transpozonowych

Sekwencje transpozonowe wyizolowano ze srebrzonych żeli poliakrylamidowych. Około 20 µl sterylnej wody dejonizowanej nakraplano na dobrze wybarwiony prążek i pozostawiano na 20 min. Po tym czasie odciągano otrzymany roztwór. Około 5 µl wykorzystywano do sprawdzenia jakości DNA, a pozostałą część poddawano sekwencjonowaniu. Ze względu na wysoką czystość sekwencji uzyskanych z tego typu żeli nie było potrzeby ich oczyszczania.

4.3. Analiza statystyczna i metody bioinformatyczne

4.3.1 Ocena zmienności genetycznej badanych populacji

W celu oceny zmienności genetycznej dla każdej populacji obliczono liczbę (P) i procent loci polimorficznych (% P), średnią liczbę alleli w locus w populacji (A), efektywną liczbę alleli w locus w populacji (E), oraz średnią wartość zróżnicowania genetycznego Nei'a (1987) — heterozygotyczność oczekiwaną w populacji (H).

$$A = \frac{A_i}{r} \quad \text{Równanie 4.1}$$

gdzie
 $A_i =$ liczba alleli w locus i w populacji

$$E = \frac{1}{\sum p_i^2} \quad \text{Równanie 4.2}$$

gdzie
 $p_i =$ częstość allele i w locus w populacji

$$H = \frac{\sum h_i}{r}$$

Równanie 4.3

gdzie

 $h_i =$ heterozygotyczność oczekiwana w locus i w populacji $r =$ liczba loci

$$h = \frac{2n(1 - \sum p_i^2)}{2n - 1}$$

Równanie 4.4

gdzie

 $p =$ częstość allele i w populacji

Wartości powyższych parametrów obliczono przy pomocy programu POPGENE v. 1.32, (Yeh i Rong-Cai 1999), natomiast istotność statystyczną określono na podstawie testu LSD w programie STATISTICA.

4.3.2 Określenie powiązań ewolucyjnych

Powiązania ewolucyjne pomiędzy badanymi gatunkami oszacowano na podstawie łącznej analizy markerów B-SAP i SSAP. Różnice genetyczne pomiędzy gatunkami określono na podstawie współczynnika podobieństwa genetycznego, I oraz odległości genetycznej, D Nei'a (1987). Podstawą oceny jest założenie, że różnice w obecności prążków DNA na żelu są spowodowane co najmniej jedną zmianą nukleotydową. Stąd średnia liczba różnic na poziomie nukleotydów może być oszacowana z częstości występowania fragmentów DNA.

Współczynnik podobieństwa genetycznego Nei'a obliczono na podstawie częstości występowania alleli w porównywanych populacjach, natomiast odległość jako ujemny logarytm naturalny wartości podobieństwa.

$$I = \frac{p_x p_y}{\sum p_x^2 p_y^2}$$

Równanie 4.5

gdzie

 $p_x =$ częstość allele i w populacji x $p_y =$ częstość allele i w populacji y

$$D = -\ln I$$

Równanie 4.6

Współczynnik podobieństwa genetycznego przyjmuje wartości od 0 do 1, przy czym 1 oznacza brak jakichkolwiek różnic genetycznych pomiędzy badanymi populacjami, natomiast 0 oznacza całkowitą odrębność genetyczną. Wartość współczynnika Nei'a dla porównywanych populacji zależy od poziomu różnic genetycznych — im są one większe tym wartość I jest niższa. I tak populacje jednego gatunku mają na ogół współczynnik Nei'a w zakresie 0,87–1,00 w zależności od typu markera. Wartości niższe oznaczają zaawansowaną dywergencję z obecnością bariery reprodukcyjnej (Avisé 2004; Polok 2010). Ewolucja jest procesem ciągłym, stąd też pomiędzy populacjami będącymi na różnych poziomach dywergencji może dochodzić do introgresji pojedynczych genów na skutek przypadkowych, jednorazowych krzyżowań.

Powstałe mieszańce mają ograniczoną płodność i żywotność. Na poziomie molekularnym introgresja jest obserwowana jako pojedyncze prążki „obcego pochodzenia”. W populacji, wszystkie formy pochodzące od introgresanta będą miały „obcy prążek”, a przy dawnej introgresji prążek może być obecny w całym gatunku. Im mniej odległe genetycznie są populacje, tym większa częstość introgresji. Natomiast populacje jednego gatunku charakteryzują się wspólną pulą genową i tworzą całkowicie płodne mieszańce. Na poziomie molekularnym taki mieszańiec posiada sumę wzorów form rodzicielskich. Populacje mieszańcowe posiadają większość alleli rodzicielskich, które na skutek segregacji tworzą różne kombinacje dając w efekcie większe zróżnicowanie genetyczne populacji mieszańcowej.

Dendrogramy obrazujące powiązania filogenetyczne w rodzaju *Pinus* wykreślono na podstawie współczynnika podobieństwa genetycznego, który przekształcono w macierz odległości. Macierz tę wykorzystano do grupowania metodą UPGMA. Obliczenia przeprowadzono w programie STATISTICA.

4.3.3 Analiza zbieżności sekwencji B-SAP i SSAP

Otrzymane sekwencje markerów różnicujących badane gatunki porównano z sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI (c2009) za pomocą narzędzia BLAST dla sekwencji nukleotydowych. Celem porównania było określenie potencjalnej funkcji i pochodzenia zidentyfikowanych fragmentów DNA.

W celu określenia podobieństwa zidentyfikowanych sekwencji u gatunków sosen nałożono je i uliniowano (alignment) w programie CLUSTAL (2014). Globalną analizę zbieżności wykonano na podstawie drzewa oraz poprzez 5-krotną iterację. Następnie fragmenty sekwencji liniowano z wykorzystaniem lokalnej analizy zbieżności. Dla otrzymanych sekwencji określono liczbę mutacji z uwzględnieniem poszczególnych typów — substytucji typu tranzycji (zamiana zasady purynowej na purynową, tj. A na G lub odwrotnie lub pirymidynowej na pirymidynową czyli T na C lub odwrotnie), transwersji (zamiana zasady purynowej na pirymidynową czyli A na T, G na T, A na C, G na C) oraz typu in-del, czyli insercji i delecji. Insercje i delecje traktuje się łącznie, gdyż insercja u jednego gatunku jest delecją u drugiego.

4.3.4 Wyznaczanie starterów specyficznych gatunkowo

Startery specyficzne gatunkowo zaprojektowano wykorzystując fragmenty sekwencji, w których występowały mutacje charakterystyczne dla danego gatunku. Startery konstruowano tak, aby region docelowy nie znajdował się w obrębie ostatnich 5 zasad. Ponadto w celu zwiększenia stabilności i specyficzności starterów, uwzględniano tylko takie, które zawierały co najmniej 40% par GC, unikano polinukleotydowych sekwencji na końcu 3' oraz starano się aby temperatura topnienia była w zakresie 50–58°C. Startery wyznaczano za pomocą narzędzia Primer-BLAST dostępnego na stronach bazy NCBI. W programie odczytywano także hipotetyczną długość fragmentu, który mógłby być zamplifikowany przy pomocy analizowanej pary starterów. Temperaturę annealingu podawano w zakresie od 5°C poniżej temperatury topnienia.

5 WYNIKI

5.1 Zróżnicowanie genetyczne wybranych taksonów

Łączna analiza B-SAP oraz SSAP pozwoliła zidentyfikować 213 loci, z których większość stanowiły miejsca insercji transpozonów (172 loci). Zarówno markery B-SAP jak i SSAP charakteryzowały się wysokim polimorfizmem u badanych taksonów (Tabela 5.1), co potwierdza ich przydatność w badaniach sosen. Generalnie, wysoki polimorfizm mierzony wszystkimi parametrami, a więc liczbą (P) i procentem loci polimorficznych (% P), liczbą alleli (A) oraz liczbą alleli efektywnych w locus (E), a także współczynnikiem oczekiwanej heterozygotyczności (H) był typowy dla taksonów z kompleksu *Pinus mugo*. Wartości powyższych parametrów dla tej grupy gatunków były 2–3 krotnie wyższe niż dla sosny zwyczajnej. Przykładowo, średnio 27 loci B-SAP (65%) oraz 91 miejsc insercji transpozonów (53%) było polimorficznych w kompleksie *Pinus mugo*, podczas gdy sosna zwyczajna miała odpowiednio 10 (24%) i 12 (7%) loci polimorficznych. Podobną zależność obserwowano dla heterozygotyczności oczekiwanej, której wartości były od 2,5 do 6,5 razy niższe niż w kompleksie *Pinus mugo*. Stosunkowo niski polimorfizm markerów B-SAP u sosny zwyczajnej był również obserwowany we wcześniejszych badaniach (Androsiuk i inni 2010). Natomiast zaskakujące jest małe zróżnicowanie miejsc insercji transpozonów, gdyż markery te charakteryzuje duża zmienność (Polok 2007). Z drugiej strony analizowane sosny mogą reprezentować zawężoną pulę genową. Zebrane one były z ograniczonego obszaru Tatr, gdzie sosna jest reliktem polodowcowym rosnącym w niewielkich skupiskach na najbardziej niedostępnych terenach. Taki rozerwany zasięg, a także niska liczebność populacji sprzyja chowowi wsobnemu.

W obrębie kompleksu *Pinus mugo*, wszystkie gatunki charakteryzowały się podobnym poziomem polimorfizmu, różnice w wartościach większości parametrów nie były istotne statystycznie. Wyjątek stanowi *Pinus x rhaetica*, u której obserwowano 2-krotnie więcej polimorficznych miejsc insercji transpozonów, co znalazło odzwierciedlenie w wyższej liczbie alleli oraz efektywnej liczbie alleli w locus, a także oczekiwanej heterozygotyczności. Zróżnicowanie genetyczne *Pinus x rhaetica* odpowiada obserwowanemu zróżnicowaniu morfologicznemu.

Wysoka zmienność markerów B-SAP u *P. ulginosa* jak i *P. mugo* jest wynikiem niespodziewanym. Markery B-SAP na ogół są konserwatywne u danego gatunku wykazując niski polimorfizm. Z drugiej strony populacje kosodrzewiny wykazywały znaczne zróżnicowanie na poziomie molekularnym (Fig. 5.1), co znalazło odzwierciedlenie w wartościach obliczanych parametrów.

| Tabela 5.1 Zmienność i zróżnicowanie genetyczne badanych gatunków sosen | | | | | |
|---|--------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| Gatunek | Liczba loci polimorficz- | Procent loci polimorficz- | Liczba alleli w locus | Efektywna liczba alleli | Heterozygotyczność |

| | nych [P] | nych [%P] | [A] | w locus [E] | oczekiwana [H] |
|---|-------------|--------------|--------|----------------|-------------------|
| B-SAP | | | | | |
| <i>P. uncinata</i> | 20 | 48,8 | 1,49ab | 1,33a | 0,190a |
| <i>P. uliginosa</i> | 28 | 68,3 | 1,68a | 1,29a | 0,189a |
| <i>P. mugo</i> | 33 | 80,5 | 1,80a | 1,41a | 0,248a |
| <i>P. sylvestris</i> | 10 | 24,4 | 1,24b | 1,16b | 0,090b |
| <i>Pinus x rhaetica</i> | 25 | 60,9 | 1,61a | 1,40a | 0,223a |
| SSAP (miejsca insercji transpozonów) | | | | | |
| <i>P. uncinata</i> | 67 | 38,9 | 1,39b | 1,28a | 0,161b |
| <i>P. uliginosa</i> | 76 | 44,2 | 1,44b | 1,31a | 0,183b |
| <i>P. mugo</i> | 62 | 36,1 | 1,36b | 1,25a | 0,149b |
| <i>P. sylvestris</i> | 12 | 6,9 | 1,07c | 1,05b | 0,029b |
| <i>Pinus x rhaetica</i> | 159 | 92,4 | 1,92a | 1,42a | 0,265a |

a,b —różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie dla $P=0,05$ w teście LSD

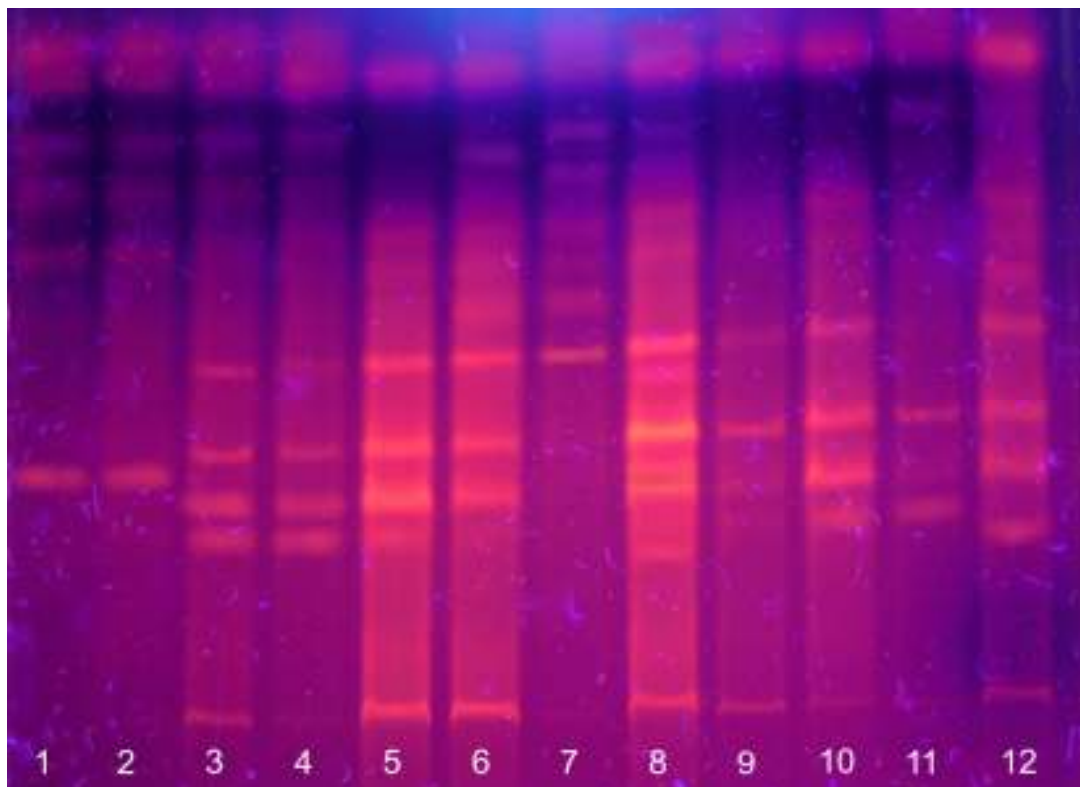


Fig. 5.1 Zróżnicowanie kosodrzewiny, *P. mugo* w Tatrach, ujawnione za pomocą starterów B-SAP, KatG03

5.2 Powiązania filogenetyczne w rodzaju *Pinus*

Badane taksony charakteryzowały się podobieństwem genetycznym wyrażonym współczynnikiem Nei'a, mieszczącym się w zakresie 0,656–0,960 dla markerów B-SAP (Tabela 5.2) oraz 0,652–0,942 (Tabela 5.3) dla markerów SSAP. Najwyższe podobieństwo genetyczne stwierdzono pomiędzy sosną błotną, *P. uliginosa* a kosodrzewiną, *P. mugo* (0,960 i 0,922 w zależności od typu markera), co klasyfikuje oba taksony jako jeden gatunek biologiczny. Na podobnie wysokim poziomie, wykluczającym odrębność gatunkową było podobieństwo pomiędzy kosodrzewiną, *P. mugo* oraz sosną drzewokosą, *Pinus x rhaetica* (0,923 i 0,942) jak również pomiędzy sosną błotną oraz drzewokosą (0,902 i 0,899). Na dendrogramach UPGMA gatunki te tworzą jedną grupę wyraźnie oddzieloną od *P. uncinata* i *P. sylvestris* (Fig. 5.2, 5.3). Na poziomie molekularnym *P. uliginosa*, *P. mugo* i *Pinus x rhaetica* są nierozróżnialne ze względu na liczne wspólne prążki B-SAP i miejsca insercji (Fig. 5.4, 5.5), co jednoznacznie wskazuje na jedną pulę genową.

Tabela 5.2 Podobieństwo genetyczne badanych gatunków sosen (Nei 1987) na podstawie markerów B-SAP

| | <i>P. uliginosa</i> | <i>P. mugo</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>Pinus x rhaetica</i> |
|----------------------|---------------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| <i>P. uncinata</i> | 0,792 | 0,831 | 0,697 | 0,793 |
| <i>P. uliginosa</i> | | 0,960 | 0,757 | 0,902 |
| <i>P. mugo</i> | | | 0,771 | 0,923 |
| <i>P. sylvestris</i> | | | | 0,656 |

Tabela 5.3 Podobieństwo genetyczne badanych gatunków sosen (Nei 1987) na podstawie miejsc insercji transpozonów

| | <i>P. uliginosa</i> | <i>P. mugo</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>Pinus x rhaetica</i> |
|----------------------|---------------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| <i>P. uncinata</i> | 0,845 | 0,791 | 0,670 | 0,795 |
| <i>P. uliginosa</i> | | 0,922 | 0,673 | 0,899 |
| <i>P. mugo</i> | | | 0,652 | 0,942 |
| <i>P. sylvestris</i> | | | | 0,682 |

Sosna hakowata, *P. uncinata* pochodząca z Alp odróżnia się na dendrogramach (Fig. 5.2, 5.3) od grupy trzech taksonów (sosna błotna, kosodrzewina, sosna drzewokosa), tworząc odrębną gałąź. Podobieństwo genetyczne 0,792–0,831 dla markerów B-SAP oraz 0,791–0,845 dla SSAP, jakie występuje pomiędzy sosną hakowatą a pozostałymi gatunkami kompleksu *Pinus mugo* wskazuje na bliskie powiązania ewolucyjne, jednakże wartość podobieństwa sugeruje występowanie bariery reprodukcyjnej. Jednocześnie podobieństwo sosny hakowatej do sosny zwyczajnej ($I = 0,697$ i $0,670$) oraz pozycja na dendrogramach wskazuje na odrębność tych gatunków. Wyniki powyższe potwierdzają pozycję taksonomiczną *P. uncinata* jako gatunku zaliczanego do kompleksu *Pinus mugo*. Należy podkreślić, że przeprowadzone w niniejszej pracy badania nie wskazują, że sosna hakowata mogła stanowić formę rodzicielską dla sosen drzewokosych opisywanych w Tatrach. Świadczy o tym odrębna pozycja na dendrogramach i podobieństwo Nei'a wynoszące 0,793 i 0,795 dla B-SAP i SSAP.

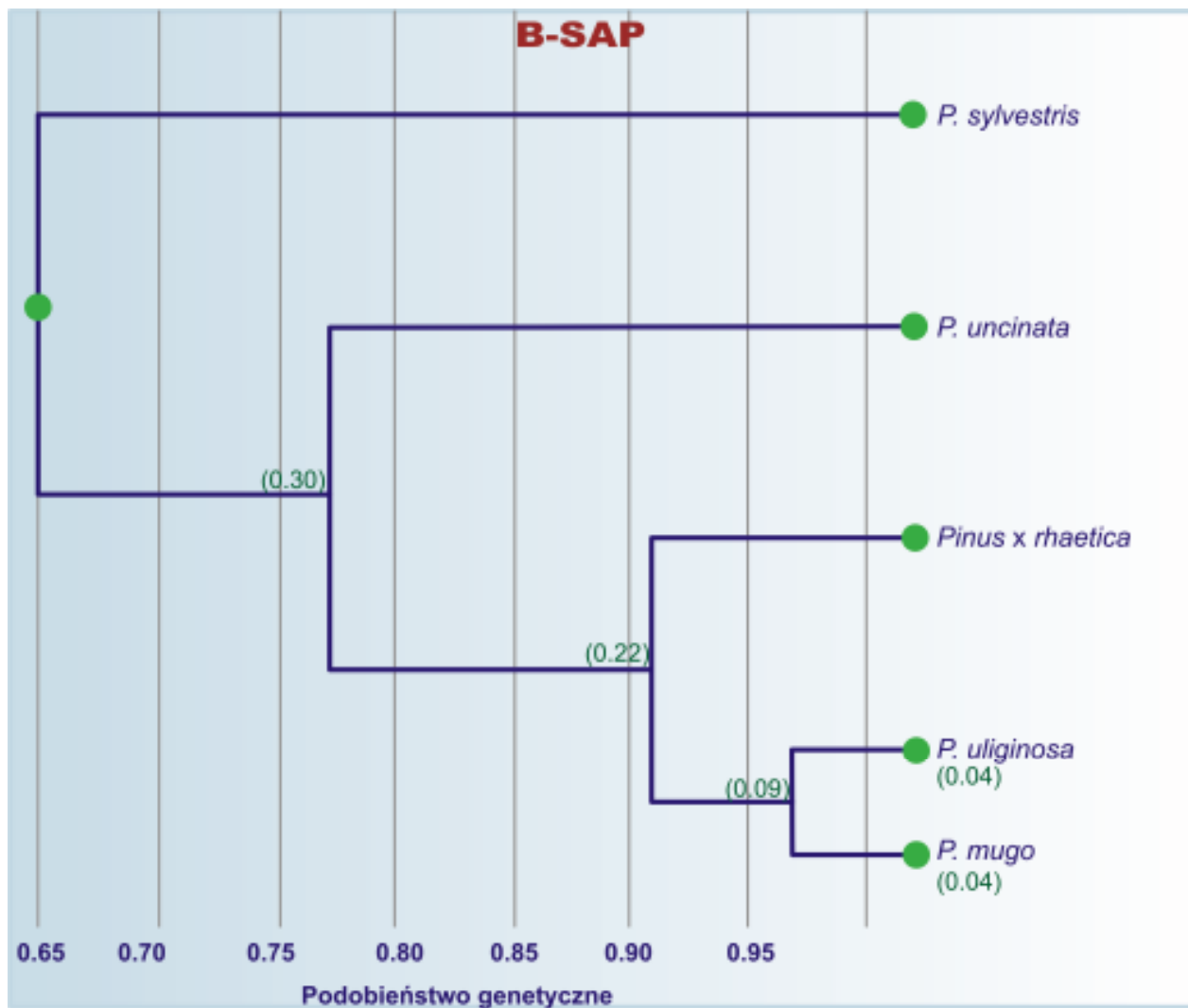


Fig. 5.2 Grupowanie UPGMA gatunków sosen na podstawie markerów B-SAP. Wartości podane w nawiasach oznaczają odległość genetyczną.

Wszystkie taksony kompleksu *Pinus mugo* są wyraźnie oddzielone od sosny zwyczajnej na dendrogramach (Fig. 5.2, 5.3). Wzory B-SAP oraz SSAP, z odrębnymi prążkami i miejscami insercji potwierdzają odrębne pochodzenie *P. sylvestris*. Również współczynniki podobieństwa genetycznego niższe niż pomiędzy gatunkami kompleksu *Pinus mugo* (0,697–0,771 dla B-SAP oraz 0,652–0,673 dla SSAP) potwierdzają istnienie odrębnych puli genowych, a w następstwie bariery reprodukcyjnej. Niskie wartości współczynnika I są szczególnie charakterystyczne dla markerów SSAP, co jest zgodne z faktem, iż ewolucja genomów sosen odbywa się głównie na poziomie sekwencji transpozonowych.

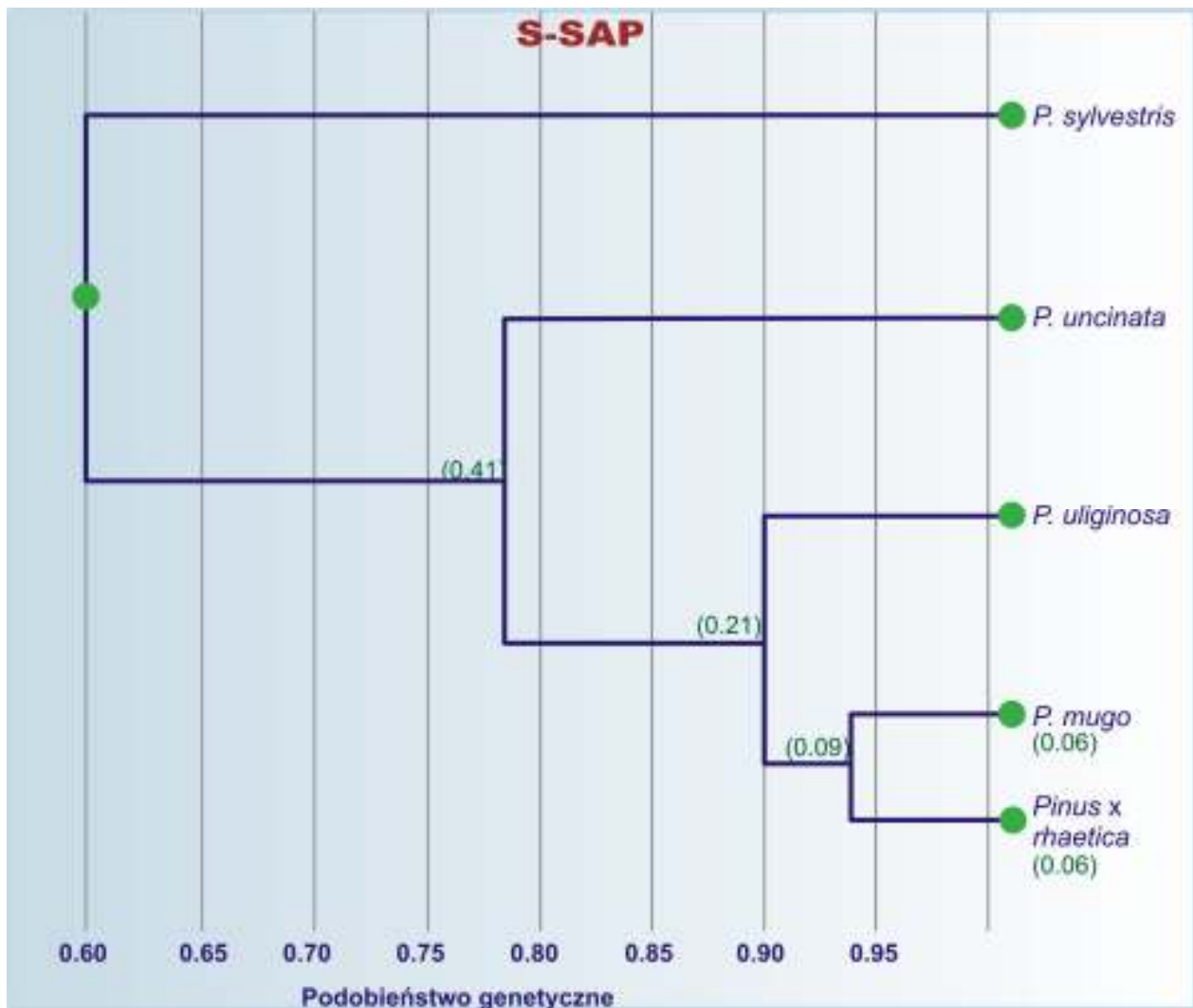


Fig. 5.3 Grupowanie UPGMA gatunków sosen na podstawie miejsc insercji transpozonów ujawnionych metodą SSAP. Wartości podane w nawiasach oznaczają odległość genetyczną.

Sosna drzewokosa, *Pinus x rhaetica* uważana za mieszańca między sosną zwyczajną a kosodrzewiną wyraźnie klasyfikuje się w grupie z kosodrzewiną i sosną błotną, odróżniając się jednocześnie od sosny zwyczajnej. Podobieństwo genetyczne pomiędzy sosną drzewokosą a sosną zwyczajną wynoszące 0,656 w przypadku markerów B-SAP oraz 0,682 dla SSAP wskazuje, że taksony te mają odrębne pule genowe, które pozwalają zaklasyfikować je jako odrębne gatunki biologiczne. Jednocześnie dane B-SAP oraz SSAP wykluczają możliwość swobodnego krzyżowania pomiędzy kosodrzewiną a sosną zwyczajną z terenu TPN ($I = 0,771$ oraz 0,652). Powyższe wyniki nie potwierdzają pochodzenia *Pinus x rhaetica* jako taksonu mieszańcowego wywodzącego się z *P. sylvestris* i *P. mugo*. W tym ostatnim przypadku należałoby się spodziewać wyższego podobieństwa genetycznego i grupowania *P. sylvestris* razem z *Pinus x rhaetica* i *P. mugo* oraz wzorów molekularnych będących przynajmniej w pewnym stopniu sumą taksonów wyjściowych.

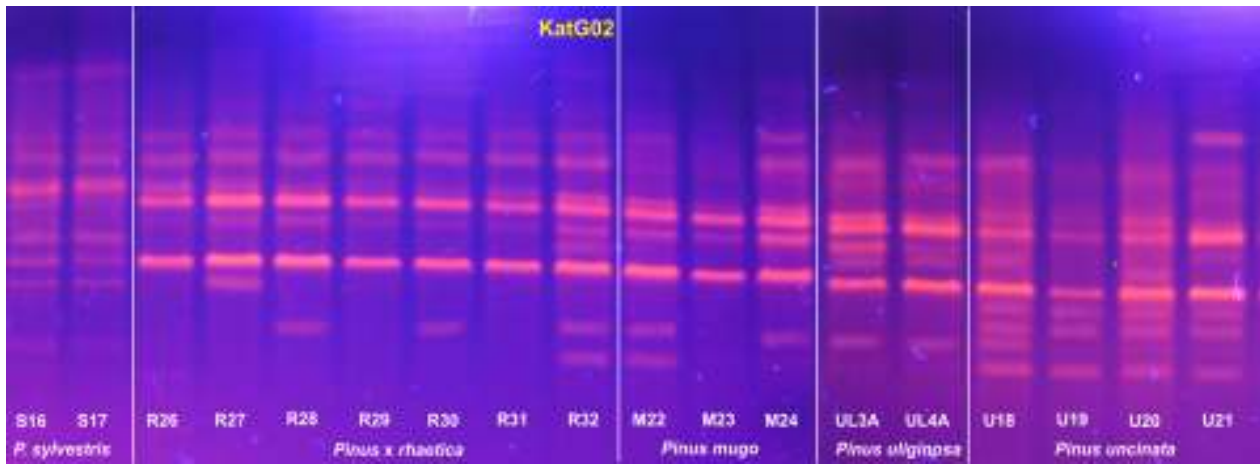


Fig. 5.4 Wzory badanych gatunków sosen ujawnione za pomocą starterów B-SAP — KatG02

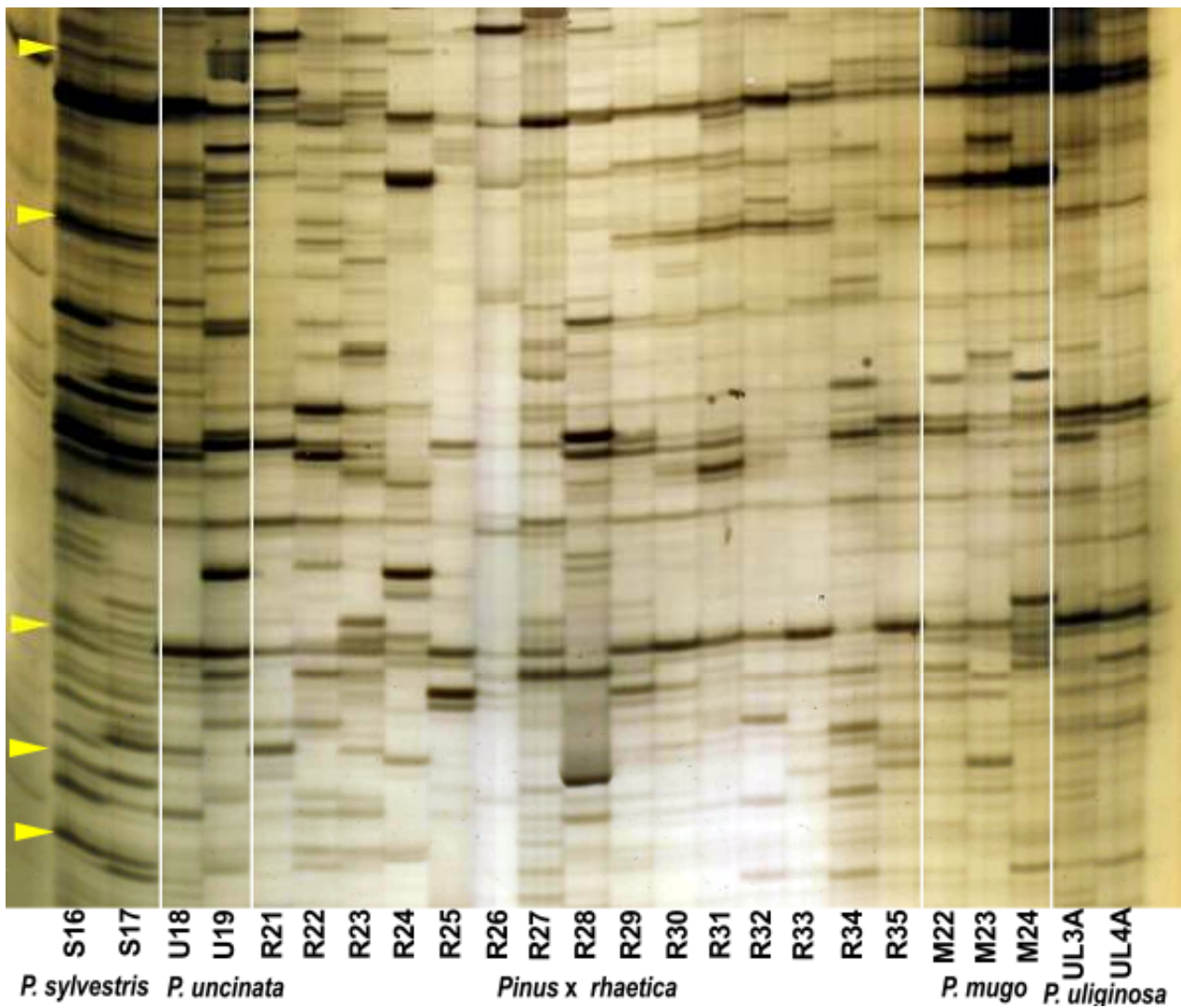


Fig. 5.5 Miejsca insercji transpozonu DNA, Tpo ujawnione za pomocą SSAP

5.3 Rozróżnianie gatunków z rodzaju *Pinus* na podstawie markerów B-SAP oraz sekwencji transpozonowych

Porównanie taksonów z rodzaju *Pinus* pozwoliło wyróżnić 18 prążków różnicujących badane gatunki. Za markery specyficzne gatunkowo uznawano tylko te, które występowały u jednego gatunku i nie obserwowano ich u innych gatunków (Tabela 5.4). Część prążków poddano sekwencjonowaniu celem sprawdzenia ich pochodzenia i wykrycia ewentualnych różnic.

Tabela 5.4 Markery DNA różnicujące badane gatunki sosen

| Marker | <i>P. uncinata</i> | <i>P. uliginosa</i> | <i>P. mugo</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>Pinus x rhaetica</i> |
|---------------|--------------------|---------------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| KatGo3-7 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| KatGo3-9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| KatGo8-9 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| KatGo8-10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Tpo/PstAT-15 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Tpo/PstAT-63 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Tpo/PstAT-65 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1/0 |
| Tpo/PstAT-79 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Bare/PstAT-03 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Bare/PstAT-04 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Bare/PstAT-05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Bare/PstAT-05 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Bare/PstAT-19 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| IFG7/MseC-05 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1/0 |
| Ogre/PstAT-02 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ogre/PstAT-05 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ogre/PstAT-19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ogre/PstAT-30 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

1 oznacza obecność prążka, a 0 brak prążka u wszystkich osobników danego gatunku. Pogrubienie oznacza markery, dla których przeprowadzono analizę zbieżności i zaprojektowano startery umożliwiające rozróżnianie gatunków.

Spośród 18 markerów różnicujących badane taksony, najwięcej, bo aż 50% pozwalało na rozróżnienie pomiędzy sosną zwyczajną a gatunkami z kompleksu *Pinus mugo*, przy czym w 89% marker występował u sosny, a brakowało go u pozostałych gatunków. Jedynym wyjątkiem był marker KatGo8-9, który obserwowano u wszystkich gatunków kompleksu *Pinus mugo*, przy jednoczesnym braku u sosny zwyczajnej. Marker ten wybrano do sekwencjonowania wraz z markerem KatGo8-10, który był typowy dla *P. sylvestris* a różnica w ruchliwości w stosunku do markera KatGo8-9 była nieznaczna. Może to sugerować, że oba markery (KatGo8-9, KatGo8-10) różnią się pojedynczymi nukleotydami.

Znacznie trudniej było wytypować markery różnicujące gatunki kompleksu *Pinus mugo*. Jedyne transpozon Ogrę ujawnił prążki charakterystyczne tylko dla *P. uncinata* (Ogrę/PstAT-02, Ogrę/PstAT-05). Markerów typowych dla *P. uliginosa*, *P. mugo* oraz *Pinus x rhaetica* nie udało się wyodrębnić. Nawet jeżeli znajdowano marker występujący u wszystkich osobników sosny błotnej lub kosodrzewiny, to najczęściej pojawiał się on również u części osobników sosny drzewokosej. Przykładem mogą być markery Tpo/PstAT-65 oraz IFG7/MseC. Wyjątek stanowiła jedynie grupa markerów wyznaczona za pomocą transpozonu Bare. Trudność w wyznaczeniu markerów gatunkowych dla sosny błotnej, kosodrzewiny oraz sosny drzewokosej potwierdza ich wspólne pochodzenie i sugeruje, że są one przejawem zmienności pomiędzy populacjami jednego gatunku.

5.3.1 Analiza zbieżności i wyznaczanie starterów dla markerów B-SAP specyficznych gatunkowo

Przeszukiwanie bazy NCBI przy pomocy algorytmu BLAST wykazało, że fragmenty otrzymane przy zastosowaniu pary starterów KatGo8 komplementarnych do bakteryjnego genu *KatG*, kodują hipotetyczne białko u dużej grupy organizmów, w tym roślin wyższych. Dokładna funkcja tego białka nie została poznana i wymaga zastosowania modelowania.

Otrzymana sekwencja różniła się u badanych gatunków obecnością substytucji w 3 pozycjach (Fig. 5.6). Wszystkie zmiany są transwersjami zasady pirymidynowej na purynową przy czym w dwóch pozycjach, 66 i 69 bp jest to transwersja tyminy do adeniny (T na A), a w pozycji 108 bp cytozyny do adeniny (C na A). Sosna zwyczajna posiada we wszystkich wymienionych pozycjach adeninę (A), natomiast wszystkie gatunki kompleksu *Pinus mugo* zawierają tyminę (T) w dwóch pozycjach oraz cytozynę (C) w jednej. Zróznicowanie powyższe pozwala odróżnić *P. sylvestris* od gatunków kompleksu *Pinus mugo*, natomiast rozróżnienie gatunków wewnątrz tego kompleksu nie jest możliwe przy pomocy powyższej sekwencji, ze względu na jej konserwatyzm.

U *Pinus x rhaetica*, sekwencja KatGo8 posiada T w pozycjach 66 i 69 bp oraz C w pozycji 108 jednoznacznie potwierdzając przynależność tego taksonu do kompleksu *Pinus mugo*.

Na podstawie analizowanego fragmentu zaprojektowano startery PCR specyficzne dla sosny zwyczajnej oraz gatunków kompleksu *Pinus mugo* (na żółto zaznaczono różnicujące fragmenty sekwencji).

1. *P. sylvestris*

Forward: 5'ACTATAAA**ACGAT**TCAACCGGA3' — 40% GC, Tm = 54°C

Reverse: 5' CCTTCCCTTGACCGGG3' — 68%GC, Tm = 55°C

Długość produktu: 119 bp, temperatura annealingu — 50–54°C

Forward: 5'AACTATAAA**ACGA**TCAACCGGA3' — 38% GC, Tm = 55°C

Reverse: 5' CTTCCCTTGACCGGG3' — 66%GC, Tm = 52°C

Długość produktu: 119 bp, temperatura annealingu — 50–54°C

2. Kompleks *Pinus mugo*

Forward: 5' TATAAT**TCGT**TCAACCGGACG3' — 45% GC, Tm = 55°C

Reverse: 5' AGCCACCGAGCACGA3' — 67% GC, Tm = 58°C

Długość produktu: 137 bp, temperatura annealingu — 52–55°C

Forward: 5' ATATAA**TCGT**TCAACCGGACG3' — 45% GC, Tm = 55°C

Reverse: 5' GCCACCGAGCACGAC3' — 73% GC, Tm = 57°C

Długość produktu: 135 bp, temperatura annealingu — 52–56°C

Forward: 5' TAATCGTTCAACCGGACG3' — 50% GC, Tm = 55°C

Reverse: 5' CCACCGAGCACGACC3' — 73% GC, Tm = 57°C

Długość produktu: 133 bp, temperatura annealingu — 52–55°C

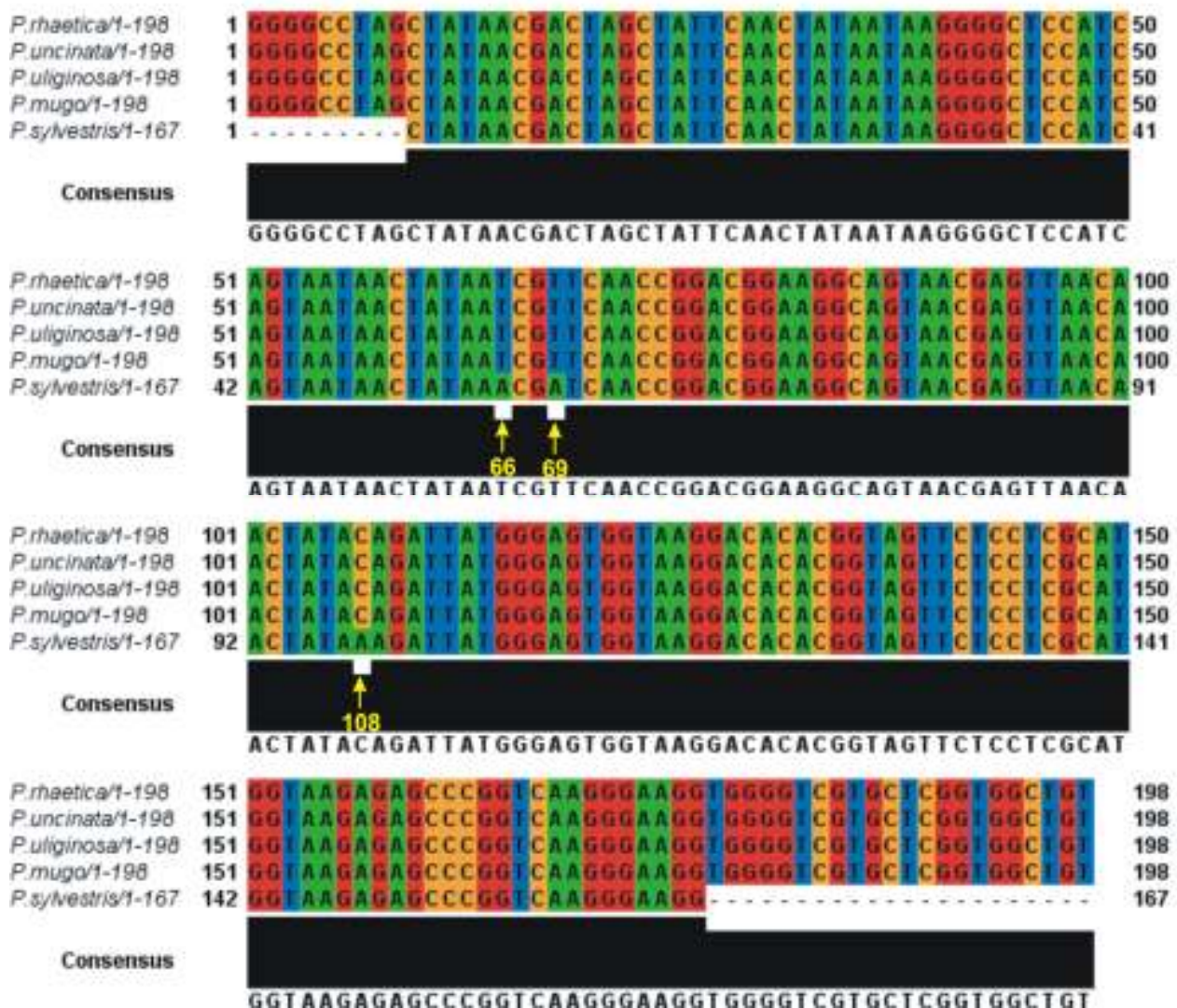


Fig. 5.6 Analiza zbieżności sekwencji ujawnionej przez starter KatG08. Strzałki wskazują miejsca substytucji.

5.3.2 Analiza zbieżności i wyznaczenie starterów dla sekwencji transpozonu Bare specyficznej gatunkowo

Porównanie sekwencji wyizolowanej z badanych gatunków pomocy startera specyficznego dla transpozonu LTR, Bare pierwotnie wyizolowanego u roślin jednoliściennych do sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI wykazało, 96% podobieństwo do transpozonów LTR *Pinus taeda*. Potwierdziło to, że analizowane markery SSAP stanowią miejsca insercji transpozonów.

Analiza zbieżności sekwencji Bare u 5 porównywanych taksonów wykazała występowanie mutacji punktowych w regionie 15–20 bp, które są wysoce specyficzne, pozwalając na rozróżnienie *P. sylvestris* od gatunków kompleksu *Pinus mugo* jak również zróżnicowanie gatunków w obrębie powyższego kompleksu (Fig. 5.7). Sekwencja *P. sylvestris* jest krótsza o 9 bp na końcu 3, począwszy od pozycji 81 bp'. Ponadto w pozycji 15 bp występuje transwersja zasady pirymidynowej C do zasady purynowej A, a także insercja A w pozycji 20. W obrębie kompleksu *Pinus mugo*, u *P. mugo* występuje in-del adeniny (A) w pozycji 20. Adenina występuje u *P. mugo*, ale brak jej u *P. uncinata*, *P. uliginosa* oraz *Pinus x rhaetica*. Dodatkowo *P. mugo* charakteryzuje się tranzycją C do T w pozycji 67 natomiast *Pinus x rhaetica* charakteryzuje się obecnością insercji C w pozycji 16.

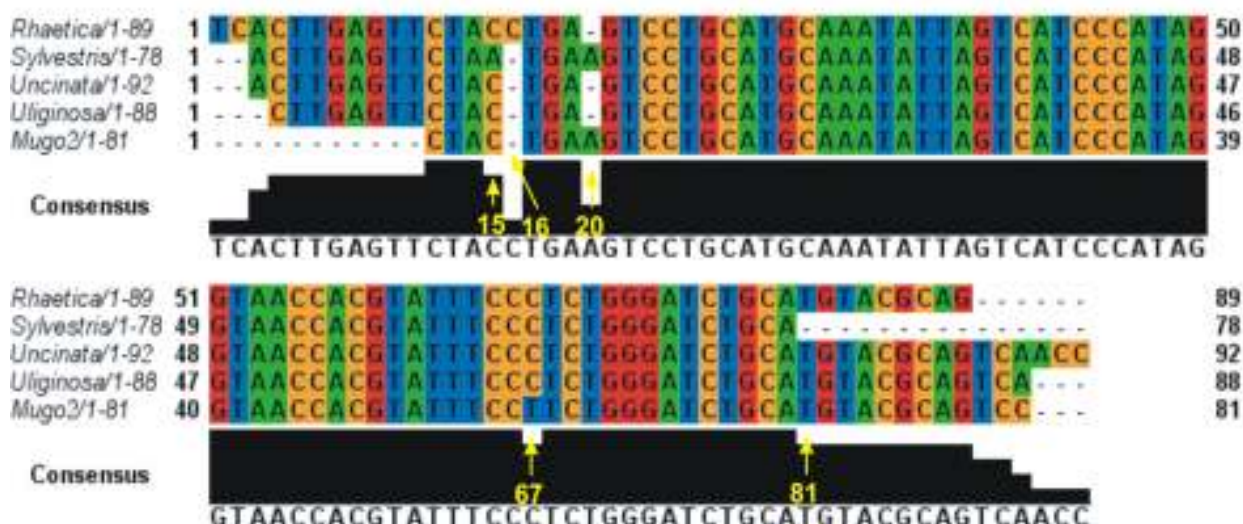


Fig. 5.7 Analiza zbieżności sekwencji transpozonu Bare wyizolowanej przy pomocy metody SSAP. Strzałki wskazują miejsca mutacji punktowych.

Ze względu na swoją specyfikę region 15–20 może być wykorzystany do zaprojektowania starterów PCR specyficznych gatunkowo.

1. Startery specyficzne dla *P. sylvestris*

Forward: 5'GAGTTCTA**ATGAA**GTCCTGC3' — 45% GC, Tm = 53°C

Reverse: 5'TGCAGATCCCAGAGGG3' — 62% GC, Tm = 54°C

Długość produktu: 74 bp, temperatura annealingu — 49–54°C

Forward: 5'AGTTCTA**ATGAA**GTCCTGC3' — 42% GC, Tm = 52°C

Reverse: 5'GCAGATCCCAGAGGG3' — 67% GC, Tm = 52°C

Długość produktu: 72 bp, temperatura annealingu — 48–52°C

Forward: 5'GTTCTA**ATGAA**GTCCTGC3' — 44% GC, Tm = 50°C

Reverse: 5'TGCAGATCCCAGAGG3' — 60% GC, Tm = 50°C
 Długość produktu: 72 bp, temperatura annealingu — 45–50°C

2. Startery specyficzne dla *P. uncinata*

Forward: 5'GAGTTCTA**CTGA**GTCCTGC3' — 43% GC, Tm = 54°C
 Reverse: 5'**GGT**TGACTGCGTACATGC3' — 56% GC, Tm = 57°C
 Długość produktu: 88 bp, temperatura annealingu — 52–57°C

Forward: 5'TTCTA**CTGA**GTCCTGCAT3' — 44% GC, Tm = 52°C
 Reverse: 5'**GGT**TGACTGCGTACAT3' — 50% GC, Tm = 51°C
 Długość produktu: 85 bp, temperatura annealingu — 47–52°C

3. Startery specyficzne dla *P. uliginosa*

Forward: 5'AGTTCTA**CTGA**GTCCTGC3' — 50% GC, Tm = 53°C
 Reverse: 5'**T**GACTGCGTACATGC3' — 53% GC, Tm = 50°C
 Długość produktu: 84 bp, temperatura annealingu — 48–53°C

4. Startery specyficzne dla *P. mugo*

Forward: 5'CTA**CTGAA**GTCCTGCATG3' — 50% GC, Tm = 52°C
 Reverse: 5'**G**GACTGCGTACATG3' — 57% GC, Tm = 46°C
 Długość produktu: 84 bp, temperatura annealingu — 45–52°C

5. Startery specyficzne dla *Pinus x rhaetica*

Forward: 5'TGAGTTCTA**CCTGA**GTCCTG3' — 50% GC, Tm = 56°C
 Reverse: 5'TGCGTACATGCAGATCCC3' — 55% GC, Tm = 57°C
 Długość produktu: 83 bp, temperatura annealingu — 52–57°C

Forward: 5'TTGAGTTCTA**CCTGA**GTCCTG3' — 48% GC, Tm = 56°C
 Reverse: 5'GCGTACATGCAGATCCC3' — 58% GC, Tm = 55°C
 Długość produktu: 84 bp, temperatura annealingu — 51–56°C

Forward: 5'TTGAGTTCTA**CCTGA**GTCCT3' — 45% GC, Tm = 55°C
 Reverse: 5'TGCGTACATGCAGATCC3' — 52% GC, Tm = 54°C
 Długość produktu: 84 bp, temperatura annealingu — 50–55°C

Forward: 5'TGAGTTCTA**CCTGA**GTCCT3' — 47% GC, Tm = 54°C
 Reverse: 5'GCGTACATGCAGATCC3' — 56% GC, Tm = 52°C
 Długość produktu: 82 bp, temperatura annealingu — 49–54°C

Forward: 5'GAGTTCTA**CCTGA**GTCCTG3' — 53% GC, Tm = 54°C
 Reverse: 5'CGTACATGCAGATCCC3' — 56% GC, Tm = 51°C
 Długość produktu: 84 bp, temperatura annealingu — 48–53°C

6 WNIOSKI

1. Osobniki *Pinus x rhaetica* na terenie TPN nie są mieszańcami międzygatunkowymi między sosną zwyczajną, *P. sylvestris* a kosodrzewiną, *P. mugo*. Wyklucza to niskie podobieństwo genetyczne do sosny oraz bardzo wysokie w stosunku do kosodrzewiny, a także obecność u *Pinus x rhaetica* nukleotydów typowych dla gatunków kompleksu *Pinus mugo* w sekwencji KatGo8 oraz Bare. Nie wyklucza to jednak możliwości introgresji.
2. Sosna błotna, *P. uliginosa*, kosodrzewina, *P. mugo*, oraz sosna drzewokosa, *Pinus x rhaetica* posiadają wspólną pulę genową i wysokie podobieństwo genetyczne (współczynnik Nei'a równy lub wyższy od 0,9) co świadczy iż stanowią one gatunek biologiczny, który należałoby traktować jako gatunek złożony. Osobniki *Pinus x rhaetica* na terenie TPN są przejawem zmienności wewnątrzgatunkowej.
3. *Pinus uncinata* pochodząca z Alp należy do tej samej grupy co kosodrzewina, sosna błotna oraz sosna drzewokosa tworząc kompleks *Pinus mugo*. Jednocześnie jej odrębna pozycja na dendrogramach i stosunkowo niskie podobieństwo wykluczają ją jako formę rodzicielską sosny drzewokosej.
4. Markery rozróżniające badane taksony obejmują 4 markery B-SAP oraz 16 miejsc insercji transpozonów. Większość markerów pozwala na odróżnienie sosny od gatunków kompleksu *Pinus mugo*. Rozróżnienie gatunków w obrębie tego kompleksu jest trudniejsze, gdyż większość prążków była wspólna u wszystkich gatunków.
5. Sosnę, *P. sylvestris* od gatunków kompleksu *Pinus mugo* (*P. mugo*, *P. uliginosa*, *P. rhaetica*, *P. uncinata*) odróżnia sekwencja hipotetycznego białka otrzymana w wyniku sekwencjonowania markera KatG-o8. W trzech pozycjach sosna zwyczajna zawiera adeninę (A) natomiast gatunki kompleksu *Pinus mugo* — tyminę (T) lub cytozynę (C). Sekwencję tę można wykorzystać do rozróżniania sosny zwyczajnej od gatunków kompleksu *Pinus mugo*.
6. Transpozony okazały się efektywne w rozróżnianiu badanych gatunków sosen. Mutacje punktowe w regionie 15–20 bp odróżniają zarówno sosnę zwyczajną od gatunków kompleksu *Pinus mugo* jak i pozwalają na różnicowanie gatunków w obrębie tego kompleksu, tj. *P. uncinata*, *P. uliginosa*, *P. mugo* oraz *Pinus x rhaetica*. Na podstawie sekwencji transpozonu Bare zaprojektowano startery specyficzne dla badanych gatunków sosen.

7 SPIS TABEL

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 4.1 | Średnia jakość i ilość DNA wyizolowanego z prób tatrzańskich i alpejskich sosen | 13 |
| Tabela 4.2 | Startery wykorzystane w metodzie B-SAP i warunki reakcji PCR | 15 |
| Tabela 4.3 | Startery wykorzystane w metodzie SSAP..... | 19 |
| Tabela 5.1 | Zmienność i zróżnicowanie genetyczne badanych gatunków sosen..... | 27 |
| Tabela 5.2 | Podobieństwo genetyczne badanych gatunków sosen (Nei 1987) na podstawie markerów B-SAP | 29 |
| Tabela 5.3 | Podobieństwo genetyczne badanych gatunków sosen (Nei 1987) na podstawie miejsc insercji transpozonów | 29 |
| Tabela 5.4 | Markery DNA różnicujące badane gatunki sosen..... | 33 |

8 SPIS FIGUR

| | | |
|----------|--|----|
| Fig. 3.1 | Sosna hakowata, <i>Pinus uncinata</i> w Alpach | 6 |
| Fig. 3.2 | Sosna błotna, <i>Pinus uliginosa</i> na Wielkim Torfowisku Batorowskim..... | 7 |
| Fig. 3.3 | Kosodrzewina, <i>Pinus mugo</i> w Tatrach | 8 |
| Fig. 3.4 | Sosna zwyczajna, <i>Pinus sylvestris</i> na Siwiańskich Turniach i w Dolinie Białego | 8 |
| Fig. 3.5 | Sosna drzewokosa, <i>Pinus x rhaetica</i> w Dolinie Białego i na Sarniej Skale | 9 |
| Fig. 3.6 | Miejsca zbioru <i>P. mugo</i> , <i>P. sylvestris</i> oraz <i>Pinus x rhaetica</i> w Tatrach..... | 10 |
| Fig. 3.7 | Stanowiska zbioru <i>P. uliginosa</i> — Węgliniec oraz Wielkie Torfowisko Batorowskie | 11 |
| Fig. 3.8 | Stanowiska zbioru prób <i>P. uncinata</i> w Alpach..... | 12 |
| Fig. 4.1 | Lokalizacja starterów KatG komplementarnych do bakteryjnego genu <i>KatG</i> kodującego katalazę-peroksydazę. | 14 |
| Fig. 4.2 | Schemat reakcji SSAP wykrywającej miejsca insercji transpozonów..... | 17 |
| Fig. 4.3 | Próby <i>Pinus x rhaetica</i> po trawieniu enzymami restrykcyjnymi..... | 18 |
| Fig. 4.4 | Próby <i>Pinus x rhaetica</i> po ligacji — przyłączeniu adaptorów..... | 20 |
| Fig. 4.5 | Próby <i>Pinus x rhaetica</i> po preamplifikacji | 21 |
| Fig. 4.6 | Sprawdzenie jakości selektywnej amplifikacji u prób <i>Pinus x rhaetica</i> na żelu agarozowym. | 22 |
| Fig. 5.1 | Zróźnicowanie kosodrzewiny, <i>P. mugo</i> w Tatrach ujawnione za pomocą starterów B-SAP, KatG03..... | 28 |
| Fig. 5.2 | Grupowanie UPGMA gatunków sosen na podstawie markerów B-SAP. | 30 |
| Fig. 5.3 | Grupowanie UPGMA gatunków sosen na podstawie miejsc insercji transpozonów ujawnionych metodą SSAP. | 31 |
| Fig. 5.4 | Wzory badanych gatunków sosen ujawnione za pomocą starterów B-SAP — KatG02..... | 32 |
| Fig. 5.5 | Miejsca insercji transpozonu DNA, Tpo ujawnione za pomocą SSAP | 32 |
| Fig. 5.6 | Analiza zbieżności sekwencji ujawnionej przez starter KatG08..... | 35 |
| Fig. 5.7 | Analiza zbieżności sekwencji transpozonu Bare wyizolowanej przy pomocy metody SSAP..... | 36 |

9 LITERATURA

- Androsiuk P, Zielinski R, Polok K. 2011. B-SAP markers derived from the bacterial *KatG* gene differentiate populations of *Pinus sylvestris* and provide new insights into their postglacial history. *Silva Fenn* 45: 3–18.
- Avise JC. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 684 p.
- Chmiel J, Milewski T, Polok K. 2008. Ochrona naturalnej puli genowej rodzimej limby *Pinus cembra* L. z Tatr w świetle badań molekularnych. *Roczniki Bieszczadzkie* 16: 215–232.
- [Clustal X] Clustal W / Clustal X multiple alignment of nucleic acid and protein sequences. Release 2.1. 2014. Dublin (Ireland): Conway Institute UCD [cytowane 205.11.04.]. Dostęp: <http://www.clustal.org>
- Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R, Kumar A. 1992. *Ty1-copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res* 14: 3639–3644.
- [ITIS] Integrated Taxonomic Information System. 2015. [cytowane 2015.11.02.]. Dostęp: <http://www.itis.gov/index.html>
- Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E., Sculman AH. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6603–6607.
- Morse AM, Peterson DG, Nurullislam-Faridi M, Smith KE, Magbanua Z, Garcia SA, Kubisiak TL, Amerson HV, Carlson JE, Nelson CD, Davis JM. 2009. Evolution of genome size and complexity in *Pinus*. *PLoS One* 4: e4332.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. c2009. Bethesda MD: U.S. National Library of Medicine [cytowane 2015.11.04.]. Dostęp: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Guildford, Surrey: Columbia University Press. 511 p.
- Polok K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Olsztyn (Poland): Studio Poligrafii Komputerowej "SQL". 317 pp.
- Polok K. 2010. Genetyka i ewolucja. Olsztyn: Studio Poligrafii Komputerowej "SQL". 112 pp. ISBN 978-83-88125-91-1.
- Polok K, Pietkiewicz J, Zielinski R. 2006. Pochodzenie sosny błotnej, *Pinus uliginosa* Neumann w świetle badań molekularnych. W: Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów (Mirek Z, Cieślak E, Paszko B, Paul W, Ronikier M eds). Kraków: Instytut Botaniki im. W. Szafera. p. 124.
- Polok K, Sawicki J, Kubiak K, Szczecińska M, Korzekwa K, Szandar K, Zielinski R. 2005. Evolutionary divergence within *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dum. From Poland. In: Variability and evolution — new perspectives (Prus-Głowacki W, Pawlaczyk EM eds). Poznań: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza. Seria Biologia nr 72: 241–251.
- Polok K, Zielinski R. 2011. Mutagenic treatment induces high transposon variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agric Slov* 97: 179–188.
- Staszkiwicz J. 1996. Naturalne mieszańce *Pinus mugo* x *P. sylvestris* (Pinaceae) w Tatrach. *Frag. Flor. Geobot. Ser. Polonica* 3: 23–30.
- Vershinin AV, Allnutt TR, Knox MR, Amrose MJ, Ellis THN. 2003. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition in *Pisum* diversity, evolution and domestication. *Mol Biol Evol* 20:2067–2075.
- Yeh FC, Yang Rong-Cai. 1999. POPGENE. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis.
- Zielinski R, Polok K. 2005. Molecular evolution and taxonomy of plants. In: Variability and evolution — new perspectives (Prus-Głowacki W, Pawlaczyk EM eds). Poznań: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza. Seria Biologia nr 72: 37–55.
- Zwijacz-Kozica T, 1998. Występowanie sosny drzewokosej (*Pinus x rhaetica* Brügger) w Tatrzańskim Parku Narodowym. *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody* 17.4: 3–12.