

Konrad Celiński, Veronika Zbránková
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ZASTOSOWANIE MARKERÓW ISSR DO OCENY ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO IGLASTYCH

APPLICATION OF ISSR MARKERS TO ESTIMATE GENETIC DIVERSITY OF CONIFERS

Słowa kluczowe: markery molekularne, ISSR, zróżnicowanie genetyczne, iglaste

Key words: molecular markers, ISSR, genetic diversity, conifers

Abstract: In this work we describe advantages and disadvantages of the inter simple sequence repeats (ISSR) technique for genetic diversity studies in conifers. We compare the basic genetic diversity indices estimated by the ISSR markers for selected genera included in *Pinophyta* division. We also compare levels of polymorphism of different DNA markers like: ISSR, allozymes, simple sequence repeats (SSR) and random amplification DNA polymorphism (RAPD). The ISSR markers are useful tool for conservation genetic studies, especially for genetic characterization of endemic or of low-industrial-importance of conifer species.

WSTĘP

Zainteresowanie badaniami nad zróżnicowaniem genetycznym gatunków w ramach tzw. genetyki zachowawczej (ang. conservation genetics) sukcesywnie wzrasta. Zmiany klimatyczne (zarówno te obserwowane jak i prognozowane), niszczenie i nadmierna eksploatacja naturalnych siedlisk to tylko niektóre zagrożenia skutkujące redukcją liczebności i różnorodności organizmów. Redukcja liczebności organizmów prowadzi z kolei do utraty zróżnicowania genetycznego, zwiększonej wsobności, a w konsekwencji - do wzrostu ryzyka wymierania gatunków [Frankham i in. 2002]. Poznanie struktury genetycznej powinno stanowić pierwszy i kluczowy etap opracowania odpowiednich długoterminowych planów ochrony gatunków. Znajomość naturalnego zróżnicowania genetycznego gatunku pozwala właściwie zarządzać jego zasobami genowymi.

Obecnie, najczęściej stosowanymi technikami analizy zróżnicowania genetycznego organizmów są systemy oparte na markerach molekularnych identyfikujących zmienność sekwencji nukleotydowej kwasu deoksyrybonukleinowego - DNA (ang. Deoxyribonucleic Acid, DNA). Wybór odpowiedniego typu markera uzależniony jest m.in. od typu i poziomu wykrywanego polimorfizmu, powtarzalności wyników, kosztów analiz oraz trudności związanych z jego aplikacją [Bornet i Branchard 2001, Sztuba-Solińska 2005].

Charakterystykę struktury genetycznej bardzo często przeprowadza się w oparciu o markery prostych sekwencji powtórzonych (mikrosatelitarnych) (ang. Simple Sequence Repeats, SSR). Markery te odznaczają się, m.in.: dziedziczeniem kodominującym, wysokim poziomem polimorfizmu i powtarzalnością wyników. Wysoki koszt opracowania *de novo* markerów SSR dla każdego gatunku stanowi jednak poważne ograniczenie w ich szerszym stosowaniu.

W celu obniżenia kosztów podejmuje się próby wykorzystania starterów opracowanych dla jednego gatunku, do analizy polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych gatunku pokrewnego (ang. cross- amplification) [González-Martínez i in. 2004, Celiński 2008].

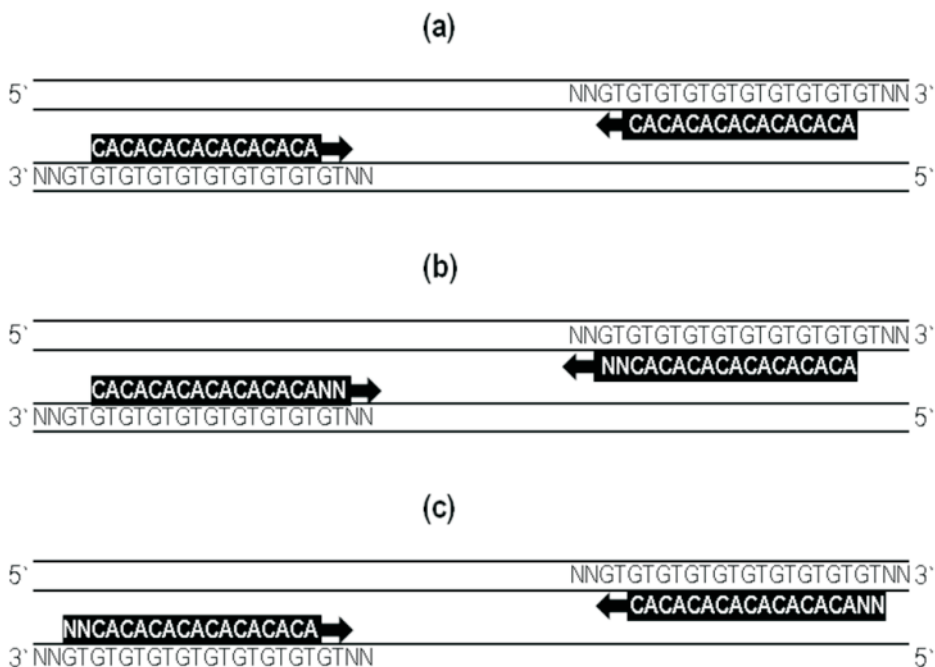
Ciekawą alternatywę w stosunku do markerów SSR stanowią markery polimorfizmu sekwencji międzymikrosatelitarnych (ang. ISSR, Inter Simple Sequence Repeats). Markery te coraz częściej wykorzystywane są do analizy polimorfizmu DNA gatunków o dużym znaczeniu ekologicznym (w tym również gatunków iglastych), dla których opracowanie markerów mikrosatelitarnych jest zbyt kosztowne.

TECHNIKA ISSR

Technika ISSR polega na amplifikacji fragmentu DNA zawartego między dwoma przeciwlegle skierowanymi, identycznymi regionami zawierającymi powtórzenia mikrosatelitarne [Pradeep Reddy i in. 2002]. Najczęściej stosuje się startery o długości od 16 do 25 pz. Ich sekwencje odpowiadają motywowi danego powtórzenia mikrosatelitarnego. Startery wykorzystywane w technice ISSR mogą być dwojakiego rodzaju (Rycina 1): 1) jeśli sekwencje starterów składają się wyłącznie z powtórzeń typu dwójkowego, trójkowego, czy czwórkowego, np. $(CA)_8$, $(ATG)_5$, $(GACA)_4$ to są to startery niezakotwiczone (Rycina 1.a); 2) jeśli natomiast oprócz motywów powtórzeniowych zawierają dodatkowo od 1 do 4 dodatkowych zasad na 3' lub 5' końcu startera, np. $(AG)_8T$ czy $(AC)_8YA$ to są to startery zakotwiczone (Rycina 1.b/c).

Startery niezakotwiczone np. $(CA)_8$ (Rycina 1.a) mogą wiązać się w dowolnym miejscu powtórzenia $(GT)_n$ na matrycy DNA. Przemieszczanie się starterów niezakotwiczonych w kierunku 3' bądź 5' skutkuje powstawaniem w reakcji PCR kilku produktów o nieznacznie różniących się długościami zamiast jednego ampliconu o stałej długości. Różnice w długości produktów powstające podczas amplifikacji tego samego regionu skutkują powstaniem niewyraźnych prążków na żelu. Utrudnia to ich właściwą interpretację [Pradeep Reddy i in. 2002].

Dodatkowe zasady na końcu 3' lub 5' startera zakotwiczonego (Rycina 1.b/c) umożliwiają nie tylko specyficzne wiązanie się startera do matrycy i tworzenie wyraźnych prążków, lecz także pozwalają ograniczyć liczbę powstających w reakcji PCR produktów (ampliconów). W pojedynczej reakcji ISSR-PCR powstaje zazwyczaj od kilku do kilkudziesięciu (nawet 60) produktów o długości od 200 do 2000 pz. Produkty te najczęściej rozdziela się następnie



Ryc.1. Schematyczne przedstawienie sekwencji startera w technice ISSR ($(CA)_8$, niezakotwiczonego (a), zakotwiczonego na końcu 3' (b), oraz zakotwiczonego na końcu 5' (c). Starter $(CA)_8$ wiąże się z powtórzeniem $(GT)_n$ i umożliwia amplifikację fragmentu DNA zawartego między dwoma identycznymi, skierowanymi przeciwnie regionami z powtórzeniem $(GT)_n$.

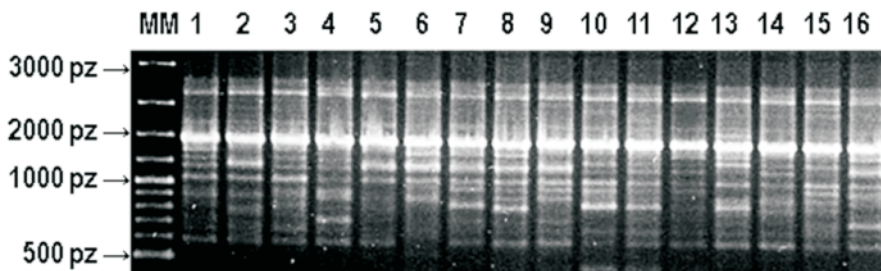
Źródło: Opracowanie własne.

elektroforetycznie w żelu agarozowym, wybarwia bromkiem etydyny i analizuje w świetle UV. Przykładowy obraz powstały po takim rozdziale przedstawia Rycina 2.

Znacznie bardziej precyzyjny od rozdziału w żelu agarozowym jest rozdział ampliconów w żelu poliakrylamidowym (ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE). Wizualizacji produktów PCR dokonuje się wówczas przez barwienie srebrem bądź wcześniejsze znakowanie radioaktywne [Pradeep Reddy i in. 2002]. W praktyce, podejście to jest dość rzadko stosowane ze względu na duży nakład pracy oraz potencjalną szkodliwość zdrowotną.

Alternatywę, w stosunku do wspomnianych wyżej metod wizualizacji, stanowi dodanie do reakcji PCR jednego, znakowanego fluorescencyjnie nukleotydu a następnie rozdział i detekcja powstałych ampliconów na sekwenatorze. Technika ta znana jest pod nazwą FISSR (ang. Fluorescence Inter Simple Sequence Repeat, FISSR) i w porównaniu do klasycznej metody ISSR pozwala wykryć nawet dwa razy więcej produktów [Nagaraju i in. 2002, Yasodha i in. 2004].

Na podstawie obecności (1) lub braku (0) na żelu ampliconów o tej samej długości konstruuje się matrycę z danymi binarnymi. Matryca ta stanowi podstawę



Ryc. 2. Przykładowy obraz rozdziálu elektroforetycznego amplikonów powstałych w reakcji ISSR-PCR w 1.2% żelu agarozowym [Celiński i in. 2010 w przygotowaniu]. MM - GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); 1-16 - osobniki *Pinus mugo* Turra.
Źródło: Badania własne.

do obliczeń statystycznych i umożliwia przedstawienie zróżnicowania badanych populacji (gatunków) za pomocą różnych parametrów genetycznych. Najważniejsze z nich to: procent *loci* polimorficznych (P), procent produktów (prążków) polimorficznych (ang. Percentage of Polimorphic Bands, PPB), liczba alleli na *locus* obserwowana (A_o) i efektywna (A_e), heterozygotyczność oczekiwana (H_e). Na poziomie gatunku określa się m.in.: wewnątrzpopulacyjną różnorodność genetyczną (H_s), całkowite zróżnicowanie genetyczne (H_T), indeks Shannona (S) oraz współczynniki: względnego zróżnicowania genetycznego (G_{ST}), przepływu genów (N_m), identyczności (I) i dystansu genetycznego (D) wg Nei'a. W celu procentowego podziału obserwowanej zmienności między populacjami stosuje się analizę wariancji molekularnej (ang. Analysis of Molecular Variance, AMOVA).

Wzajemne powiązania filogenetyczne między osobnikami w populacji oraz między populacjami przedstawia się na podstawie dystansu genetycznego i analizy skupień metodą średnich połączeń (ang. Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages, UPGMA).

ZRÓŻNICOWANIE GENETYCZNE ROŚLIN IGLASTYCH

Do gromady iglastych (*Pinophyta*) zaliczanych jest obecnie około 600 gatunków roślin. Zdecydowaną większość z nich stanowią drzewa lub krzewy wiecznie zielone. Wśród nich znaleźć można gatunki o dużym znaczeniu gospodarczym, tj.: *Pinus sylvestris*, *Abies nephrolepis* jak i gatunki o dużym znaczeniu ekologicznym, tj. *Araucaria cunninghamii*, czy *Pinus squamata*.

W Polsce iglaste reprezentowane są przez dziesięć gatunków, tj.: Jodłę pospolitą (*Abies alba* Mill.), Sosnę limbę (*Pinus cembra* L.), Sosnę górską - kosodrzewinę (*Pinus mugo* Turra), Sosnę zwyczajną (*Pinus sylvestris* L.), Sosnę błotną (*Pinus uliginosa* Neumann), Cis pospolity (*Taxus baccata* L.), Jałowiec pospolity (*Juniperus communis* L.), Jałowiec sabiński (*Juniperus sabina* L.), Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.) oraz Świerk pospolity (*Picea abies* L.).

Zróżnicowanie genetyczne wielu gatunków z tej gromady, jak np. *Araucaria cunninghamii* z rodziny *Araukariaceae* [Pye i in 2009], *Calocedrus*

macrolepis [Wang i in. 2004], *Cupressus chengiana* [Hao i in. 2006] i *Juniperus phoenicea* [Meloni i in. 2006] z rodziny *Cupressaceae*, czy *Pinus koraiensis* [Feng et al. 2006] i *Picea sitchensis* (Bong.) Carr [Gapare i in. 2005] z rodziny *Pinaceae*, określono na podstawie polimorfizmu markerów ISSR.

Szczegółowa analiza wartości parametrów genetycznych, tj.: indeksu Shannon'a (S) czy całkowitego (H_T) i względnego (G_{ST}) zróżnicowania genetycznego wskazuje na duże różnice pomiędzy wybranymi 16 gatunkami w obrębie gromady iglastych (*Pinophyta*) (Tabela 1).

Pośród zebranych w tabeli gatunków, najwyższą wartość indeksu Shannon'a ($S=0.515$) odnotowano dla *Taxus wallichiana* var. *mairei* [Zhang i in. 2008] z rodziny *Taxaceae* a najniższą ($S=0.03$) dla *Pinus squamata* [Zhang i in. 2005] z rodziny *Pinaceae*. Dla pozostałych gatunków wartości indeksu Shannon'a kształtowały się w zakresie od $S=0.158$ (*Pinus sylvestris*) do $S=0.497$ (*Araucaria cunninghamii*).

Wartości całkowitego zróżnicowania genetycznego (H_T), podobnie jak wartości indeksu Shannon'a, różnią się dość znacznie między poszczególnymi gatunkami.

Największe różnice wartości H_T stwierdzono w rodzinie *Pinaceae* (Tabela 1). Najwyższą wartość ($H_T=0.415$) odnotowano dla *Pinus tabulaeformis* [Wang i in. 2010], a blisko czternaście razy niższą ($H_T=0.029$) dla *Pinus squamata* [Zhang i in. 2005].

Dla pozostałych gatunków z rodziny *Pinaceae*, różnice w wartościach H_T nie są już tak znaczne ($H_T=0.239-0.348$). Niska wartość zróżnicowania genetycznego w przypadku *Pinus squamata* może być wynikiem niewielkiej liczebności tego gatunku. Jak do tej pory opisano tylko jedno stanowisko na świecie (Chiny), liczące zaledwie 31 osobników tego gatunku [Zhang i in. 2005].

W rodzinach: *Cupressaceae* i *Taxaceae* różnice w wartościach H_T są znacznie mniejsze, niż te notowane dla rodziny *Pinaceae*. W rodzinie *Cupressaceae* najmniej zróżnicowanym gatunkiem jest *Juniperus phoenicea* ($H_T=0.148$). Dwukrotnie wyższe zróżnicowanie stwierdzono dla *Cupressus chengiana* ($H_T=0.313$) z tej samej rodziny. Najbardziej wyrównane wartości całkowitego zróżnicowania genetycznego notuje się w rodzinie *Taxaceae*, od $H_T=0.141$ dla *Amentotaxus yunnanensis*, po $H_T=0.212$ dla *Pseudotaxus chienii* (Tabela 1).

Różnice w wartościach względnego zróżnicowania genetycznego (G_{ST}) w gromadzie iglastych są także duże (Tabela 1) i wynoszą od $G_{ST}=0.042$ dla *Calocedrus macrolepis* z rodziny *Cupressaceae*, do $G_{ST}=0.630$ dla *Torreya jackii* z rodziny *Taxaceae*.

Wartości polimorfizmu genetycznego opisywane na podstawie markerów ISSR są zazwyczaj wyższe od tych stwierdzonych z użyciem markerów losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (ang. Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), np. wartość zróżnicowania genetycznego określona na podstawie

Tab.1. Wartości całkowitego zróżnicowania genetycznego (H_T), względnego zróżnicowania genetycznego (G_{ST}) oraz indeksu Shannon'a (S) dla wybranych rodzin i gatunków z gromady iglastch (*Pinophyta*).

Rodzina	Gatunek	H_T	G_{ST}	S	Źródło
Araucariaceae	<i>Araucaria cunninghamii</i>	-	-	0.497	Pye i in. 2007
Cupressaceae	<i>Calocedrus macrolepis</i>	-	0.042	0.166	Wang i in. 2004
Cupressaceae	<i>Cupressus chengiana</i>	0.313	0.479	0.474	Hao i in. 2006
Cupressaceae	<i>Juniperus phoenicea</i>	0.148	0.120	-	Meloni i in. 2006
Pinaceae	<i>Abies nephrolepis</i>	0.262	0.082	0.369	Woo in. 2008
Pinaceae	<i>Pinus koraiensis</i>	0.348	0.270	-	Feng i in. 2006
Pinaceae	<i>Pinus sibirica</i>	0.270	-	-	Yang i in. 2005
Pinaceae	<i>Pinus squamata</i>	0.029	-	0.030	Zhang i in. 2005
Pinaceae	<i>Pinus sylvestris</i>	0.239	0.603	0.158	Li i in.2005
Pinaceae	<i>Pinus sylvestris</i>	0.263	-	-	Labra i in. 2006
Pinaceae	<i>Pinus tabulaeformis</i>	0.308	0.136	-	Cui i in. 2008
Pinaceae	<i>Pinus tabulaeformis</i>	0.415	-	-	Wang i in. 2010
Pinaceae	<i>Pseudotsuga gaussenii</i>	0.336	0.237	0.497	Li i in. 2010
Taxaceae	<i>Amentotaxus yunnanensis</i>	0.141	-	0.214	Ge i in. 2005
Taxaceae	<i>Amentotaxus argotaenia</i>	0.184	-	0.287	Ge i in. 2005
Taxaceae	<i>Pseudotaxus chienii</i>	0.212	0.615	-	Su i in. 2009
Taxaceae	<i>Torreya jackii</i>	0.210	0.630	0.310	Li i Jin 2007
Taxaceae	<i>Taxus wallichiana</i> var. <i>mairei</i>	-	0.407	0.515	Zhang i in. 2008

Źródło: Opracowanie własne

markerów ISSR dla *Pinus tabulaeformis* jest znacznie wyższa od wartości uzyskanej dla tego gatunku we wcześniejszych badaniach z zastosowaniem markerów RAPD [Wang i Gao 2009]. Różnice te wynikać mogą zarówno z wyższego, w porównaniu do RAPD, stopnia polimorfizmu markerów ISSR jak i z odmiennych lokalizacji analizowanych populacji. Populacje z siedlisk bardziej zróżnicowanych charakteryzują się zazwyczaj wyższym stopniem polimorfizmu niż populacje rosnące w warunkach jednorodnych [Wang i in 2010].

Markery ISSR wykrywają także nieco wyższy poziom polimorfizmu w porównaniu do markerów izoenzymatycznych. Poziom zróżnicowania genetycznego populacji alpejskich i apenińskich *Pinus sylvestris* określony na podstawie markerów ISSR ($H_T=0.263$, Labra i in. 2006) jest porównywalny z wynikami analiz polimorfizmu izoenzymatycznego populacji pochodzących z tych samych regionów ($H_T=0.219$) [Puglisi i Attolico 2000] oraz z terenów Hiszpanii i Francji [Prus-Głowacki i in. 2003] odpowiednio $H_T=0.314$ i $H_T=0.318$.

W porównaniu z markerami SSR, markery ISSR prezentują jednak dużo niższy poziom polimorfizmu. Zróżnicowanie genetyczne *Pinus sylvestris* z terenu Bułgarii określone z zastosowaniem markerów SSR wynosi $H_T=0.41$ [Neydenov i in. 2005] oraz $H_T=0.991$ [Provan i in. 1998].

PODSUMOWANIE

Obecnie istnieje szereg różnych metod analizy zróżnicowania organizmów i ich genomów. Od mniej zaawansowanych technicznie jak RAPD, przez markery ISSR i SSR aż po te najbardziej wymagające, jak np. amplifikowany polimorfizm długości fragmentów (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP). Wybór odpowiedniego narzędzia do analiz uzależniony jest zawsze od wielu czynników, tj.: cel analizy, dostępność opracowanych dla danego gatunku markerów i sekwencji nukleotydowych, liczba analizowanych populacji i osobników oraz (a czasami przede wszystkim) wysokością środków finansowych przeznaczonych na badania.

Przedstawione w tej pracy markery ISSR głównie z racji ich łatwości aplikacji i niskich kosztów analiz znalazły szerokie zastosowanie m.in.: w mapowaniu genomów i opracowywaniu map sprzężeń [Arcade i in. 2000, Chen i in. 2010], identyfikacji gatunków i mieszańców międzygatunkowych [Nkongolo i in. 2005, Mehes i in. 2007] czy ustalaniu wzajemnych relacji filogenetycznych [Liu i in. 2005].

Polimorfizm sekwencji międzymikrosatelitarnych najpowszechniej wykorzystywany jest jednak do określania zmienności genetycznej na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym wielu gatunków, w tym również tych z gromady iglastych, np. *Araucaria*, *Calocedrus*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Amentotaxus*, *Pseudotaxus* czy *Taxus* [Wang i in. 2004, Gapare i in. 2005, Ge i in. 2005, Li i in. 2005, Yang i in. 2005, Feng i in. 2006, Hao i in. 2006, Labra i in. 2006, Meloni i in. 2006, Lee i in. 2008, Li i in. 2008, Shah i in. 2008, Woo i in. 2008, Zhang i in. 2008, Pye i in. 2009, Su i in. 2009, Wang i in. 2010].

Uniwersalność techniki ISSR stanowi jeden z jej największych atutów. Te same startery mogą być wykorzystane do analizy polimorfizmu DNA u różnych, czasami bardzo odległych filogenetycznie gatunków. ISSR łączą w sobie większość zalet markerów SSR oraz AFLP z uniwersalnością RAPD. W odróżnieniu jednak od RAPD (10 nukleotydów), markery ISSR wykorzystują dłuższe startery (16-25 nukleotydów). Pozwala to na stosowanie wyższych temperatur wiązania startera (45-60°C). Większa specyficzność wiązania prowadzi do wyższej, w porównaniu do RAPD, powtarzalności wyników. Badania prowadzone nad powtarzalnością wyników pokazują, że jedynie te prążki, które są słabo widoczne (ang. ghost) są mało powtarzalne. Około 92-95% zliczonych fragmentów może być powtórzone w próbach DNA [Fang i Roose 1997, Moreno i in. 1998, za Pradeep Reddy i in. 2002].

Technika ISSR nie wymaga drogiej i specjalistycznej aparatury laboratoryjnej. Aby przeprowadzić analizę zróżnicowania genetycznego z zastosowaniem tych markerów wystarczy posiadać termocykler, wirówkę, aparat do elektroforezy oraz system do dokumentacji żeli lub zwykły aparat cyfrowy.

Możliwość wykonywania analiz nawet na podegradowanym DNA to kolejna zaleta markerów ISSR. Długość amplifikowanych fragmentów najczęściej

nie przekracza 2000 pz. Ilość matrycy niezbędna do reakcji PCR zawiera się zazwyczaj w przedziale od 10 – 100 ng na 20 µl mieszaniny reakcyjnej.

Poziom polimorfizmu wykrywanego dzięki markerom ISSR jest zazwyczaj wyższy od poziomu polimorfizmu wykrywanego markerami RAPD, niższy natomiast od markerów SSR. Wysoki poziom polimorfizmu markerów SSR i ISSR, za który odpowiada wysokie tempo mutacji sekwencji mikrosatelitarnych, pozwala na stosowanie obu tych markerów w analizie gatunków i populacji, które w swojej historii przeszły drastyczny spadek liczebności (ang. bottleneck).

Technika ISSR ma jednak i swoje wady. Najważniejszą z nich, podobnie jak w markerach RAPD, jest taka sama mobilność elektroforetyczna fragmentów (amplikonów), które nie pochodzą z regionów homologicznych. Brak możliwości rozróżnienia tych niehomologicznych fragmentów prowadzi do wypaczenia wyników analiz. Sporym mankamentem ISSR jest także konieczność optymalizacji, w zasadzie dla każdego charakteryzowanego genetycznie gatunku z osobna. Optymalizacja warunków prowadzenia reakcji PCR jest procedurą dość czasochłonną. Obejmuje m.in.: ustalenie stężenia matrycy (10-100 ng/reakcję), starterów (0.1-100 µM), jonów magnezu (1.5-4 mM), czasu (30-120 sek.) i temperatury wiązania startera (45-60 °C) oraz liczby cykli (25-45). Warunki rozdziału elektroforetycznego także wymagają ustalenia rodzaju żelu (poliakrylamidowy czy agarozowy) i jego procentowości, długości rozdziału (120-600 min.) oraz systemu buforowego (TAE, TBE).

Podsumowując, markery ISSR, stanowią przydatne narzędzie do oceny zróżnicowania genetycznego różnych gatunków roślin, także iglastych. Markery te znajdują często zastosowanie w przypadku gatunków mniej znanych lub o niewielkim znaczeniu przemysłowym. Dzięki tym markerom możliwa jest szybka i niedroga wstępna analiza polimorfizmu DNA z zachowaniem wysokiej powtarzalności wyników. Pełna charakterystyka struktury genetycznej danego gatunku pozwalająca na określenie m.in. heterozygotyczności obserwowanej czy poziomu wsobności wymaga zastosowania bardziej zaawansowanych markerów (np. SSR), które dostarczają znacznie większej ilości informacji niż markery ISSR.

LITERATURA

- Arcade A., Anselin F., Faivre Rampant P., Lesage M.C., Pâques L.E., Prat D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor Appl Genet* 100: 299–307
- Bornet B., Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209–215
- Celiński K. 2008. Struktura genetyczna populacji *Pinus mugo* Turra ze zróżnicowanych siedlisk w Tatrach badana markerami molekularnymi. (Rozprawa doktorska). Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

- Chen M.-M., Feng F., Sui X., Li M.-H., Zhao D., Han S. 2010. Construction of a framework map for *Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc. using SRAP, SSR and ISSR markers. Trees. Published online: 27 kwietnia 2010 r.
- Feng F.-J., Han S.-J., Wang H.-M. 2006. Genetic diversity and genetic differentiation of natural *Pinus koraiensis* population. Journal of Forestry Research 17(1): 21–24
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe. 2010. Introduction to Conservation Genetics. Second edition. Cambridge: Cambridge University Press.
- González-Martínez S.C., Robledo-Arnuncio J.J., Collada C., Díaz A., Williams C.G., Alía R., Cervera M.T. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. Theor Appl Genet 109: 1204–1214
- Gapare W.J., Aitken S.N., Ritland C.E. 2005. Genetic diversity of core and peripheral Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr) populations: implications for conservation of widespread species. Biological Conservation 123: 113–123
- Ge X.-J., Zhou X.-L., Li Z.-C, Hsu T.-W., Schaal B.A., Chiang T.-Y. 2005. Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting. J Plant Res 118: 415–422
- Hao B., Li W., Linchun M., Li Y., Rui Z., Mingxia T., Weikai B. 2006. A Study of Conservation Genetics in *Cupressus chengiana*, an Endangered Endemic of China, Using ISSR Markers. Biochemical Genetics 44(1/2):31–45
- Labra M., Grassi F., Sgorbati S., Ferrari C. 2006. Distribution of genetic variability in southern populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Alps to the Apennines. Flora 201: 468–476
- Li C., Chai B., Wang M. 2008. Population Genetic Structure of *Pinus tabulaeformis* in Shanxi Plateau, China. Russian Journal of Ecology 39(1): 34–40
- Li H.-Y., Jiang J., Liu G.-F., Ma X.-J., Dong J.-X., Lin S.-J. 2005. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. Journal of Forestry Research 16(3): 216–218
- Li J., Jin Z. 2007. Genetic variation and differentiation in *Torreya jackii* Chun, an endangered plant endemic to China. Plant Science 172: 1048–1053
- Li Y., Lu S.-B., Liu X.-Y., Jiang Y.-M., Li S.-G., Zhu D. 2010. ISSR Analysis on Genetic Diversity of Endanged Plant *Pseudotsuga gaussenii* Flous. Journal of Wuhan Botanical Research 28:(1): 38–42
- Liu G.-F., Dong J.-X., Jiang Y., Lu Y.-F, Jiang J., Zhao G.-Y. 2005. Analysis of genetic relationship in 12 species of *Section Strobis* with ISSR markers. Journal of Forestry Research 16(3): 213–215
- Mehes M.S., Nkongolo K.K., Michael P. 2007. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers. Pl. Syst. Evol. 267: 47–63
- Meloni M., Perini D., Filigheddu R., Binelli G. 2006. Genetic Variation in Five Mediterranean Populations of *Juniperus phoenicea* as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. Annals of Botany 97: 299–304
- Nagaraju J., Kathirvel M., Subbaiah E.V., Muthulakshmi M., Kumari L.D. 2002. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping. Molecular and Cellular Probes 16: 67–72

- Nkongolo K.K., Michael P., Demers T. 2005. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome* 48: 302-311
- Nowakowska J.A. 2006. Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. *Leśne Prace Badawcze* 1: 73-101
- Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17
- Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., McNicol J.W., Forrest G.I., Cottrell J., Powell W. 1998. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 1697-1705
- Prus-Głowacki W., Stephan B.R., Bujas E., Alia R., Marciniak A. 2003. Genetic differentiation of autochthonous populations of *Pinus sylvestris* (Pinaceae) from the Iberian peninsula. *Plant Syst. Evol.* 239: 55-66
- Puglisi S., Attolico M. 2000. Allozyme variation in natural populations of the Italian range of *Pinus sylvestris* L. *Forest Genetics* 7(3):221-232
- Pye G.P., Henwood M.J., Gadek P.A. 2009. Differential levels of genetic diversity and divergence among populations of an ancient Australian rainforest conifer, *Araucaria cunninghamii*. *Plant Syst Evol* 277: 173-185
- Su Y., Wang T., Ouyang P. 2009. High genetic differentiation and variation as revealed by ISSR marker in *Pseudotsuga chienii* (Taxaceae), an old rare conifer endemic to China. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 579-588
- Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos.* 54(2-3): 227-239
- Wang D.-L., Li Z.-C., Hao G., Chiang T.-Y., Ge X.-J. 2004. Genetic diversity of *Calocedrus macrolepis* (Cupressaceae) in southwestern China. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 797-807
- Wang M.B., Gao F.Q. 2009. Genetic variation in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*), a woody species endemic to China. *Biochem Genet* 47(1): 154-164
- Wang M.-B., Hao Z.-Z. 2010. Rangewide Genetic Diversity in Natural Populations of Chinese Pine (*Pinus tabulaeformis*). *Biochem Genet* 48: 590-602
- Woo L.S., Hoon Y.B., Don H.S., Ho S.J., Joo L.J. 2008. Genetic variation in natural populations of *Abies nephrolepis* Max in South Korea. *Ann. For. Sci.* 65(3): 302
- Yang C.P., Wei L., Jiang J., Liu G.F., Zhou G.Y. 2005. Analysis of Genetic Diversity for Nineteen Populations of *Pinus sibirica* Du Tour with Technique of ISSR. *J. Northeast For. Univ.* 33: 1-3.
- Yasodha R., Kathirvel M., Sumathi R., Gurumurthi K., Sunil Archak, Nagaraju J. 2004. Genetic analyses of Casuarinas using ISSR and FISSR markers. *Genetica* 122: 161-172
- Zhang Z.-Y., Chen Y.-Y., Li D.-Z. 2005. Detection of Low Genetic Variation in a Critically Endangered Chinese Pine, *Pinus squamata*, Using RAPD and ISSR Markers. *Biochemical Genetics* 43 [5/6]:239-249

STRESZCZENIE

Zainteresowanie badaniami nad zróżnicowaniem genetycznym gatunków w ramach tzw. genetyki zachowawczej sukcesywnie wzrasta. Redukcja liczebności organizmów na skutek naturalnych siedlisk prowadzi do utraty zróżnicowania i wzrostu ryzyka wymierania gatunków. Poznanie struktury genetycznej stanowi pierwszy etap opracowania odpowiednich długoterminowych planów ochrony gatunków. Obecnie, zróżnicowanie genetyczne analizuje się przy użyciu markerów molekularnych identyfikujących zmienność na poziomie DNA. Jednymi z częściej stosowanych są markery SSR, odznaczające się wysokim poziomem wykrywanego polimorfizmu. Wysoki koszt opracowania de novo markerów SSR dla każdego analizowanego gatunku stanowi jednak poważne ograniczenie w ich szerszym stosowaniu.

Ciekawą alternatywę w stosunku do markerów SSR stanowią markery polimorfizmu sekwencji międzymikrosatelitarnych (ISSR). Technika ISSR polega na amplifikacji fragmentu DNA zawartego między dwoma przeciwlegle skierowanymi, identycznymi regionami zawierającymi powtórzenia mikrosatelitarne. Najczęściej stosuje się startery o długości od 16 do 25 pz. Ich sekwencje odpowiadają motywowi danego powtórzenia mikrosatelitarnego. W pojedynczej reakcji ISSR-PCR powstaje zazwyczaj od kilku do kilkudziesięciu produktów (amplikonów) o długości od 200 do 2000 pz. Produkty te najczęściej rozdziela się elektroforetycznie w żelu agarozowym, wybarwia bromkiem etydydy i analizuje w świetle UV. Rzadko stosuje się bardziej precyzyjny rozdział w żelu poliakrylamidowym i barwienie produktów srebrem ze względu na duży nakład pracy oraz potencjalną szkodliwość zdrowotną. Na podstawie obecności (1) lub braku (0) na żelu amplikonów o tej samej długości konstruuje się matrycę z danymi binarnymi. Matryca ta stanowi podstawę do obliczeń statystycznych i umożliwia przedstawienie zróżnicowania analizowanych gatunków za pomocą różnych parametrów genetycznych.

Do gromady iglastych (Pinophyta) zaliczanych jest obecnie około 600 gatunków roślin. Zdecydowaną większość z nich stanowią drzewa lub krzewy wiecznie zielone. Wśród nich znaleźć można gatunki o dużym znaczeniu gospodarczym, tj.: *Pinus sylvestris*, *Abies nephrolepis* jak i gatunki o dużym znaczeniu ekologicznym, tj. *Araucaria cunninghamii*, czy *Pinus squamata*. Na podstawie analizy polimorfizmu markerów ISSR określono/poznano zróżnicowanie genetyczne wielu gatunków z tej gromady, jak np. *Araucaria cunninghamii* z rodziny Araukariaceae, *Calocedrus macrolepis*, *Cupressus chengiana* i *Juniperus phoenicea* z rodziny Cupressaceae, czy *Pinus koraiensis* i *Picea sitchensis* (Bong.) Carr z rodziny Pinaceae. Szczegółowa analiza wartości parametrów genetycznych, tj.: indeksu Shannon'a (S) czy całkowitego (H_T) i względnego (G_{ST}) zróżnicowania genetycznego wskazuje na dość duże różnice pomiędzy wybranymi 16 gatunkami w obrębie gromady iglastych (Pinophyta).

Markery ISSR z uwagi na szereg zalet m.in.: uniwersalność gatunkowa, wysoką powtarzalność, łatwość aplikacji oraz niskie koszty analiz znalazły szerokie zastosowanie do określania zmienności genetycznej na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym wielu gatunków. Stanowią przydatne narzędzie do oceny zróżnicowania genetycznego różnych gatunków roślin, także iglastych. Markery te znajdują często zastosowanie w przypadku wstępnej analizy polimorfizmu DNA gatunków mniej znanych lub o niewielkim znaczeniu przemysłowym.

SUMMARY

Research in genetic diversity of species in the frame of conservation genetics is receiving significant interest. The reduction in number of organisms due to damage of natural habitats entails loss of diversity and risk of species extinction. Determination of genetic structure constitutes the first stage of development of long-term strategies of species protection. Currently, genetic diversity is analyzed through molecular markers that identify diversity at the DNA level. Among the most frequently used are the SSR markers, characterized by high level of polymorphism. However, high cost of de novo development of the SSR markers for each analyzed species, causes serious limitation of broad usage of this marker.

Markers of inter simple sequence repeats (ISSR) are an interesting alternative to the SSR markers. The ISSR technique consists of amplification of DNA fragment located between two inversely oriented, identical regions of microsatellites repeats. Sequence of ISSR starters corresponds to a motif of a particular microsatellite repeat. Starters of 16 to 25 bp in length are most frequently used. Usually, in a single ISSR-PCR reaction, few to few dozen of amplicons of 200 to 2000 bp in length are generated. These products are subsequently separated in an agarose gels, stained with ethidium bromide and analyzed in the UV light. More precise separation in polyacrylamide gels and silver staining are rarely used due to potential harmfulness to health and substantial workload. Based on the presence (1) or the absence (0) of amplicons of the same length, a matrix of binary data is constructed. This matrix constitutes a basis to statistical calculations and enables presentation of diversity of analyzed species by the means of various genetical parameters.

Ca. 600 of plant species are classified as a division of conifers (Pinophyta). Most of these are ever-green trees or shrubs. Among them, species of economic importance, i.e. : *Pinus sylvestris*, *Abies nephrolepis*, as well as species of ecological significance, i.e.: *Araucaria cunninghamii*, or *Pinus squamata* can be found. Based on the analysis of the ISSR markers polymorphism, genetic diversity of many species from this division was determined, e.g.: *Araucaria cunninghamii* (family: Araucariaceae), *Calocedrus macrolepis*, *Cupressus chengiana* i *Juniperus phoenicea* (family: Cupressaceae), or *Pinus koraiensis* i *Picea sitchensis* (Bong.) Carr (family: Pinaceae). The detailed analysis of genetic parameters, i.e.: Shannon index (S), or total (H_T) and relative (G_{ST}) genetic diversity, indicates that the 16 selected species from a division of conifers (Pinophyta) differ significantly.

The ISSR markers, due to multiple merits, e.g.: species versatility, high reproducibility, and low costs of the analyses, have found broad application in determination of genetic diversity at the within- and among-population level of many plant species, also conifers. These markers are frequently applied in preliminary analysis of DNA polymorphism of less known species or of low industrial/economic significance.