

WITOLD WACHOWIAK

Relacje genetyczne pomiędzy polskimi i referencyjnymi populacjami sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z Europy w analizie polimorfizmu sekwencji nukleotydowych loci nDNA*

Genetic relationships between Polish and reference populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Europe based on nucleotide polymorphism study at nuclear loci

ABSTRACT

Wachowiak W. 2015. Relacje genetyczne pomiędzy polskimi i referencyjnymi populacjami sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z Europy w analizie polimorfizmu sekwencji nukleotydowych loci nDNA. Sylwan 159 (1): 53-61.

Adaptation to local environmental gradients is one of main characteristics of living organisms. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the most widely distributed conifer in the world and main forest forming component in Europe. Based on genetic, morphological and growth performance traits, several local ecotypes of the species were distinguished across the species distribution range. The existence of local ecotypes differentiated at many adaptive and phenotypic traits provides unique opportunity for addressing the questions about the genetic basis of local adaptation across the species distribution range. However, information about the underlying population structure between ecotypes is needed for efficient studies of adaptive variation at molecular level. The presented study focused on the genetic variation analysis between nineteen populations of Scots pine from across geographical locations in Poland and eleven reference samples from Northern, Western and Southern Europe. The pattern of nucleotide polymorphisms at 673 polymorphic nucleotide sites found across twenty nine nuclear loci was studied to determine genetic relationship and population structure of different geographical locations. Genetic relationships between populations were conducted based on Bayesian assignment and conventional frequency based statistics at the within and between population level. The results indicate very uniform genetic background of Polish populations of the species that despite high phenotypic and ecological differentiation most likely share the same recolonization history. High genetic similarity was found between Polish and North European range of the species. In contrast, differentiation was found in relation to the reference populations from Scotland and Spain that in previous studies were shown to deviate from simple recolonization model after last glaciations and had unique mtDNA mitotypes not observed in continental continuous range of the species, respectively. Considering high differentiation at quantitative traits between northern and central part of the species range in Europe but very homogenous genetic background found in the presented study, it seems that this part of Scots pine distribution is particularly suitable for association genetic studies to find genomic regions that are involved in species adaptive and phenotypic variation.

*Badania finansowane z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2975/B/P01/2010/39.

KEY WORDSnucleotide polymorphism, recolonization, selection, *Pinus sylvestris***ADDRESSES**

Witold Wachowiak – e-mail: witoldw@man.poznan.pl

Instytut Biologii Środowiska, Uniwersytet im. A. Mickiewicza; ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań
Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk; ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik**Wstęp**

Adaptacja do lokalnych warunków środowiska jest jedną z kluczowych i szeroko rozpowszechnionych cech organizmów roślinnych. Sosna zwyczajna jest głównym składnikiem lasotwórczym Europy i gatunkiem drzewa o największym na świecie zasięgu geograficznym. W Polsce sosna zwyczajna jest kluczowym gatunkiem o znaczeniu ekologicznym i ekonomicznym, stanowiącym ponad 70% drzewostanu leśnego [Boratyński 1993]. Doświadczenia proveniencyjne i eksperymenty z hodowlą w kontrolowanych warunkach eksperymentalnych osobników sosny zwyczajnej wykazały silne zróżnicowanie adaptacyjne populacji pochodzących z różnych stref zasięgu gatunku. Silną zmienność klinalną obserwowano w zakresie wielu cech, m.in. w różnicy czasu zawiązywania pąków zimujących i przerywania spoczynku, odporności na niską temperaturę i stres wodny, odporności na patogeny, a także różnice w pokroju fenotypowym i jakości drewna [Hurme i in. 1997; Shutyaev, Giertych 1998]. Na podstawie analiz genotypowych i biometrycznych oraz cech użytkowych wyróżniono szereg ekotypów sosny zwyczajnej zróżnicowanych geograficznie [Boratyński 1993], jednak genetyczne podstawy zróżnicowania fenotypowego populacji górskich, torfowiskowych i nizinnych, jak i wpływ procesów demograficznych na kształtowanie zmienności nukleotydowej kodujących rejonów genomowego DNA sosny zwyczajnej są nieznanne.

Na poziomie genomu procesy ewolucyjne, w tym mutacja, selekcja i dryf genetyczny, wpływają na wzór zmienności polimorfizmu nukleotydowego segregującego w naturalnych populacjach [Wright, Gaut 2005]. W skali zasięgu danego gatunku i gradiencie czynników środowiskowych lokalna adaptacja występuje jako balans pomiędzy różnicującym wpływem naturalnej selekcji w populacji a przepływem genów pomiędzy populacjami o odmiennym optimum adaptacyjnym [Savolainen i in. 2007]. Genetyczne analizy cech ilościowych wskazują na silną odziedziczalność cech fenotypowych istotnych w aspekcie optymalnego dostosowania się organizmów do lokalnych warunków środowiskowych. W celu skutecznej identyfikacji rejonów genomowych poddanych działaniu naturalnej selekcji konieczna jest wiedza na temat struktury (tła genetycznego) naturalnych populacji. Wynika to z faktu, że czynniki demograficzne, takie jak ekspansja populacji, efekt założyciela czy tzw. bottleneck (wąskie gardło populacji wynikające z obniżenia liczebności połączonej z ekspansją populacji), mogą mieć podobny efekt na poziom zmienności genetycznej jak czynniki selekcyjne. Procesy selekcyjne działają punktowo na określone miejsca w genomie, zaś procesy demograficzne (związane np. ze zmianą wielkości populacji) mają jednakowy wpływ na wszystkie miejsca w genomie [Wright, Gaut 2005]. Istnienie szeregu ekotypów sosny zwyczajnej występujących w różnych strefach geograficznych o odmiennych warunkach ekologicznych, natężeniu czynników selekcyjnych i zróżnicowanych pod względem cech adaptacyjnych i fenotypowych stwarza doskonałą możliwość analiz genetycznych podstaw adaptacji. Jednak w badaniach procesów adaptacyjnych na poziomie molekularnym konieczne jest najpierw określenie tła genetycznego populacji będącego wynikiem historii populacji związanej m.in. z postglacjalną migracją gatunku.

Głównym celem pracy było określenie stopnia podobieństwa genetycznego oraz wpływu procesów demograficznych związanych z historią populacji na kształtowanie zmienności genetycznej (polimorfizmu nukleotydowego) w rejonach genomowych znanych ekotypów sosny zwyczajnej (populacje nizinne, wysokogórskie, torfowiskowe), a także referencyjnych populacji europejskich występujących w różnych strefach geograficznych o odmiennych warunkach ekologicznych i natężeniu czynników selekcyjnych. Badania przeprowadzono w oparciu o analizę polimorfizmu nukleotydowego łącznie 29 rejonów genomowych sosny zwyczajnej celem lepszego poznania relatywnego wpływu procesów ewolucyjnych i demograficznych na poziom zmienności sekwencji genomowych. Polimorfizm DNA wykorzystano do określenia wpływu czynników demograficznych na obserwowaną zmienność wewnątrzpopulacyjną i pomiędzy badanymi populacjami sosny zwyczajnej.

Materiał i metody

MATERIAŁ ROŚLINNY I IZOLACJA DNA. Badaniom molekularnym poddano łącznie 19 populacji górskich, torfowiskowych i nizinnych sosny zwyczajnej z terenu Polski, w tym szereg populacji znanych ekotypów gatunku uznanych za reliktowe (tab. 1) [Boratyński 1993]. Do porównań zmienności molekularnej włączono 11 referencyjnych populacji gatunku z Europy Północnej (populacje szwedzkie i fińskie), północno-zachodniego skraju zasięgu gatunku (populacje szkockie) oraz z południa Europy (populacje hiszpańskie). Badane stanowiska pochodzą z gradientu czyn-

Tabela 1.

Lokalizacja geograficzna badanych populacji sosny zwyczajnej i liczba badanych osobników z każdej populacji w nawiasie

Location of analysed Scots pine populations and number of investigated individuals in parentheses

Populacja	E	N	Populacja	E	N
Polska, rejon południowo-zachodni South-Western Poland [PL_SW]			Polska, rejon północny Northern Poland [PL_N]		
Wegliniec (12)	15°14'	51°17'	Woziwoda (10)	17°55'	53°40'
Chojnik (10)	15°38'	50°50'	Pisz (10)	21°46'	53°36'
Szczeliniec (10)	16°14'	50°26'	Tabórz (10)	20°02'	53°45'
Tarnowskie Góry (10)	18°56'	50°30'	Miłomłyn (10)	19°50'	53°45'
Polska, rejon zachodni Western Poland [PL_W]			Europa Północna Northern Europe [EU_N]		
Gubin (10)	14°43'	51°57'	Finlandia, Punkaharju (10)	29°23'	61°45'
Barlinek (10)	15°14'	52°59'	Finlandia, Kolari (10)	24°03'	67°11'
Bolevice (10)	16°07'	52°23'	Szwecja, Tjärnbergsheden (7)	20°48'	64°37'
Syców (10)	17°43'	51°18'	Szwecja, Väster Mjöingenn (8)	13°34'	62°45'
Polska, rejon południowy Southern Poland [PL_S]			Europa Północno-Zachodnia North-Western Europe [EU_NW]		
Pusta Wielka (10)	20°27'	49°28'	Szkocja, Shieldaig (10)	-5°38'	57°30'
Koryciska Wielkie (10)	19°48'	49°16'	Szkocja, Glen Tanar (10)	-2°51'	57°20'
Pieniński PN (10)	20°33'	49°42'	Szkocja, Rothiemurcys (10)	-3°46'	57°08'
Tarnawa (10)	22°49'	49°06'	Szkocja, Glen Affric (10)	-4°55'	57°16'
			Szkocja, Black Wood (10)	-4°19'	56°40'
Polska, rejon wschodni Eastern Poland [PL_E]			Europa Południowa Southern Europe [EU_S]		
Wyszków (10)	21°29'	52°40'	Hiszpania, Trevenque (10)	3°32'	37°05'
Hajnowka (10)	23°57'	52°74'	Hiszpania, Valsain (10)	4°02'	40°51'
Rezerwat Liski (10)	23°52'	50°56'			

ników środowiskowych związanych m.in. z długością geograficzną, wysokością czy długością okresu wegetacyjnego. Do molekularnych analiz genetycznych wykorzystano DNA wyizolowany z nasion zebranych z około 10 osobników z każdej z badanych populacji (tab. 1). Genomowy DNA wyizolowano z haploidalnej tkanki nasiennej (makrogametofitu) otaczającej zarodek z wykorzystaniem zestawu do izolacji DNA roślinnego (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen).

Izolacja, amplifikacja i sekwencjonowanie DNA. Analizom polimorfizmu nukleotydowego poddano łącznie 29 loci genomowego DNA. Badane loci poddano amplifikacji z wykorzystaniem dostępnych primerów PCR (tab. 2), sekwencjonowaniu i analizie polimorfizmu nukleotydowego w obrębie badanych populacji oraz pomiędzy wyróżnionymi rejonami geograficznymi sosny zwyczajnej (tab. 1). Amplifikacje DNA metodą PCR przeprowadzono dla każdego z badanych osobników i locus w całkowitej objętości 15 µl reakcji zawierającej około 15 ng genomowego DNA, 10 µM każdego z dNTP, 0,2 µM każdego z primerów, 0,15 jednostki (U) polimerazy DNA, 1,5 µM MgCl₂, 1×BSA oraz 1×stężony bufor reakcyjny do PCR (BioLabs). Zastosowano

Tabela 2.

Primery do reakcji PCR wykorzystane w badaniach
PCR primers applied in the study

Locus	Primer PCR (F/R)	Locus	Primer PCR (F/R)
Pr1_5	¹ GATCATTTCTAGGCACAGCACAAG ² CCTGTACCGTGTTCATCAATTTAGCAAG	Pr2_41	¹ GAAAAGGATCAAATTTGTGGG ² GCTAACATTTGGCTGTGG
Pr1_11	¹ GACCAGGCAAGGAAACAAAAG ² TTGGCAATCGGTTGATGGGGAG	Pr2_42	¹ GCATAGCCATCCATATC ² GGGTGTGAATTTTTTTGGTG
Pr1_15	¹ CATTATTATCCAAGGGCGAG ² GAGGCTTTGAGTCACCGTTAC	Pr2_47	¹ TTTCATAAAGCCCCCATCC ² TCTGATTTCAAAGTCGCC
Pr1_18	¹ AAGCGACTCAAAAGGGG ² TCCGCTGTATTGTCTC	Pr2_48	¹ GCTATGCCTTACTTGG ² TGAGTTGAGCTGCTTG
Pr1_22	¹ TGAAGGGAGAGGACTAC ² ACCCAGAAACACAAAGAGGAAAC	dhn2PP	CTGCAGAGACTGTGCCTGAGC CCAGGGAGCTTTTCCTTGATCT
Pr1_26	¹ CCCATTTTAGCAAACCC ² GAAGTGAAGATGAGCATAAG	PhytP	TGCAGGGCATAGACGAACTTAGC GGCAATCTGCAAGAAACAAAACGAC
Pr1_28	¹ GCAACTTCCCCTTTTTTC ² ACAGTGTGAGAGACGAG	Pr4-1	¹ CCGATGCTGACTCTTCTAAC ² AGCGAATTTGGAGGATGA
Pr1_31	¹ TGTGAAGCAGAGGAAC ² GATGGTAAGGATGGTG	Pr4-4	¹ TGTCACTGCCAGAGCTATTC ² ATCACAGCCGCTCCAAAAC
Pr1_36	¹ GCGTTCATCATCTCAAGCC ² CTAATCTCTCTTATFGTCATCTCCACC	Pr4-6	¹ AATTCCTTTGGTCTTGGAG ² AGTTTGCCGTGTGAAAGTTTTG
Pr1_43	¹ GGACATTTGACTGTTGG ² GGGTAATGGAAGAGTATTGG	Pr4-8	¹ GCCAGAAATATGTGATTAGAAGCC ² AGTTTTCCACCATTACAAG
Pr1_46	¹ ATCCAGTCCCTTCTCCACCTATCC ² AAGTGCTAAGCATCAAGCAGATAATCC	Pr4-9	¹ CATTTTGCAGAGGCAAG ² TGCGTAAGGCAGAACAG
Pr2_5	¹ ATTCATCCACTTCCCCC ² GTGTATTTGGTGTTCGAG	Pr4-11	¹ CCTTCTATTTGAATCCCCTTG ² CATAGTAACAGCCTACAG
Pr2_16	¹ TCACTTGGCAGAAGAC ² GAGAGATTCTTTGGAGAC	Pr4-12	¹ CTGCTCAAGTGAAGG ² CTGATTGTGGATTCTGTG
Pr2_30	¹ CACCTGTGATCTGCTC ² CTTGGAAGGATAGAATCTG	Pr4-19	¹ CTCTACCACATCATCTCC ² TTTCACTCTCGTGTCTTTCCACC
Pr2_35	¹ ACCCACAAATTTGCCAG ² GCCGTGATTTATCGAAGAG		

1,2 – część wspólna primerów; common part of the primers 1=GTA AACGACGGCCAGT; 2=CAGGAAACAGCTATGACC

standardowe warunki reakcji amplifikacji DNA z początkową denaturacją prób w 94°C przez 3 min oraz 35 cyklami reakcji z 30-sekundową denaturacją matrycy DNA w 94°C, 30-sekundowym annealingiem primerów w 60°C, etapem wydłużania primerów przez 90 s w 72°C oraz etapem końcowej inkubacji prób przez 5 min w 72°C. Fragmenty DNA po amplifikacji oczyszczono z wykorzystaniem systemu enzymatycznego ExoI-Sap (egzonukleazy I oraz alkalicznej fosfatazy). Około 20 ng produktu PCR wykorzystano do reakcji sekwencyjnej w całkowitej objętości 10 µl reakcji z zastosowaniem zestawu do sekwencjonowania DNA (Big Dye Terminator DNA Sequencing Kit, Applied Biosystems). Ponieważ amplifikacji poddano DNA wyizolowany z haploidalnej tkanki, uzyskane i oczyszczone produkty PCR sekwencjonowano bez konieczności ich wcześniejszego klonowania. Etap reakcji sekwencyjnych i rozdzielenia prób wykonano przy użyciu serwisu sekwencyjnego Genomed S.A. (Warszawa). Badane fragmenty DNA zostały zsekwencjonowane w jednym kierunku. Do analiz danych chromatograficznych w tym oceny stopnia polimorfizmu oraz zestawienia sekwencji dla poszczególnych badanych rejonów genomowych i osobników wykorzystano pakiet komputerowy CodonCode Aligner ver. 3.7.1 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA).

ANALIZA DANYCH SEKWENYJNYCH. Analizę struktury genetycznej prób przeprowadzono na poziomie poszczególnych populacji oraz grup geograficznych wydzielonych dla badanego zasięgu sosny w Polsce oraz w odniesieniu do trzech referencyjnych grup populacji gatunku z Europy Północnej, Północno-Zachodniej oraz Południowej (tab. 1). Ocena wzajemnych relacji genetycznych pomiędzy badanymi populacjami przeprowadzono z wykorzystaniem grupowania populacji metodą Bayesa, a także analizy odchylenia częstości alleli i miejsc polimorficznych (markerów SNPs) w obrębie i pomiędzy populacjami względnej zmienności kształtowanej w wyniku procesów mutacji i rekombinacji oraz losowych zmian puli genowej (dryfu genetycznego). W analizie grupowania klastrowym metodą Bayesa przy użyciu pakietu komputerowego BAPS 6.0 [Corander, Tang 2007] każdy locus został włączany do analiz w postaci osobnego pliku fasta z wykorzystaniem formatu danych MLST. Dziesięć niezależnych analiz przeprowadzono dla każdej z możliwych liczb klastrowych K (1-30) równej liczbie badanych populacji, stosując model sprzężenia kodonów, a liczba iteracji użyta do określenia stopnia admiksji populacji oraz liczba osobników z populacji referencyjnej w zastosowanym modelu wynosiła 100. Analizę polimorfizmu nukleotydowego przeprowadzono dla wykrytych miejsc polimorficznych w grupie poszczególnych osobników z wykorzystaniem pakietu Arlequin v. 3.5 [Excoffier i in. 2005]. Istotność statystyczną zróżnicowania genetycznego dla poszczególnych par populacji określono, wykorzystując metodę losowej permutacji prób (1000-krotnej) pomiędzy poszczególnymi populacjami i wydzielonymi grupami geograficznymi. Zróżnicowanie genetyczne badano jako współczynnik wsobności (F_{ST}) Wrighta [Weir, Cockerham 1984]. Wzajemne relacje genetyczne między próbami na podstawie wartości F_{ST} określono z wykorzystaniem metod najbliższego sąsiedztwa przy użyciu pakietu komputerowego MEGA 5.2 [Tamura i in. 2011]. Określono również hierarchiczne rozmieszczenie molekularnej zmienności genetycznej w obrębie i pomiędzy badanymi grupami populacji z wykorzystaniem metod analizy wariancji (ANOVA) z użyciem pakietu Arlequin 3.5.

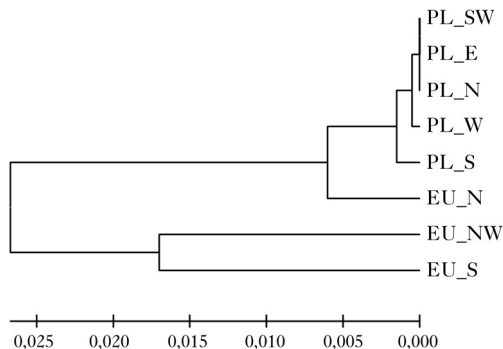
Wyniki

W grupie 29 badanych loci uzyskano sekwencje DNA o łącznej długości 13 153 pary zasad. Analiza polimorfizmu w grupie łącznie 297 badanych osobników pozwoliła na identyfikację 673 miejsc polimorficznych (SNPs). Wykryto bardzo bliskie pokrewieństwo genetyczne pomiędzy polskimi, a także polskimi i referencyjnymi populacjami gatunku zaklasyfikowanymi do jednej

grupy w analizie grupowania klasterów metodą Bayesa. W analizie zróżnicowania genetycznego na podstawie wszystkich miejsc polimorficznych wykryto niewielkie zróżnicowanie genetyczne jedynie pomiędzy populacjami z Hajnówki i Gubina. Nie wykryto żadnego istotnego statystycznie zróżnicowania genetycznego pomiędzy wydzielonymi rejonami geograficznymi sosny zwyczajnej w Polsce. Polskie populacje nie wykazały również istotnego zróżnicowania genetycznego względem populacji z Europy Północnej. Wyraźne podobieństwo pomiędzy polskim i północnoeuropejskimi populacjami względem pozostałych populacji referencyjnych gatunku zobrazowano w analizie najbliższego sąsiedztwa na podstawie wartości F_{ST} (ryc.). Z wyjątkiem populacji z południowego zachodu o niewielkim stopniu zróżnicowania genetycznego (<2%) w odróżnieniu do populacji z północy Europy, wszystkie polskie populacje gatunku wykazały istotne zróżnicowanie względem populacji z Europy Północno-Zachodniej oraz Europy Południowej. Hierarchiczna analiza wariancji AMOVA w grupie polskich populacji wykazała duże zróżnicowanie genetyczne w obrębie poszczególnych populacji, a zmienność genetycznej pomiędzy populacjami i geograficznymi grupami osobników była znikoma (od 1,4 do 0,1%). Podobnie, w odniesieniu do referencyjnych populacji gatunku z zasięgu europejskiego, od 92% (dla populacji polskich vs. hiszpańskich) do 98% (dla populacji polskich vs. północnoeuropejskich) zmienności genetycznej było obserwowanych w obrębie poszczególnych grup geograficznych (tab. 3).

Dyskusja

W pracy określono polimorfizm sekwencji łącznie 29 rejonów genomowych w rodzimych populacjach sosny zwyczajnej, a polimorfizm nukleotydowy skontrastowano pomiędzy europejskimi populacjami gatunku celem określenia stopnia podobieństwa i relacji filogeograficznych badanych stanowisk. Wyniki badań wskazują na bardzo jednorodną strukturę polskich populacji gatunku, które pomimo silnego zróżnicowania fenotypowego i ekologicznego (niewielkie, reliktowe populacje górskie i torfowiskowe vs. populacje nizinne) odznaczają się jednorodnym tłem genetycznym. Losowy rozkład zmienności nukleotydowej wskazuje, że polimorfizm badanych rejonów jest w przeważającej części wynikiem neutralnych procesów ewolucyjnych. U sosen, podobnie jak u innych wiatropylnych organizmów roślinnych, bardzo efektywny przepływ genów przez pyłek powoduje zacieranie selektywnie neutralnych różnic genetycznych pomiędzy odległymi geograficznie populacjami. Wysokie podobieństwo genetyczne polskich populacji jest zgodne z modelem zmienności genetycznej dla populacji z ciągłego zasięgu gatunku o efektywnym przepływie genów [Wachowiak i in. 2009]. W dotychczasowych badaniach niewielkie zróżnicowanie genetyczne dla markerów izoenzymatycznych (około 2%) obserwowano pomiędzy populacjami skandynawskimi i azjatyckimi [Karhu i in. 1996], a także pomiędzy populacjami europejskimi w analizie rejonów mikrosatelitarnych chloroplastowego DNA [Provan i in. 1998]. Prezentowa-



Ryc.

Relacje genetyczne między badanymi rejonami sosny zwyczajnej w Polsce (PL) i populacjami referencyjnymi z północy (EU_N), północnego zachodu (EU_NW) oraz południa (EU_S) Europy
Genetic relations among investigated Scots pine regions in Poland (PL) and reference populations in Northern (EU_N), North-Western (EU_NW) and Southern (EU_S) Europe

Tabela 3.

Wyniki AMOVA między badanymi rejonami geograficznymi
 AMOVA results for investigated regions

Źródło zmienności Source of variability	Suma kwadratów Sum of squares	Składowe zmienności Variation components	Procent zmienności Variation share
PL vs. EU_N			
Pomiędzy populacjami Between populations	87,39	0,83	1,97
W obrębie populacji Within population	8661,16	41,04	98,03
Całkowita zmienność Total	8748,55	41,87	
PL vs. EU_NW			
Pomiędzy populacjami Between populations	185,57	1,95	4,62*
W obrębie populacji Within population	9121,37	40,32	95,39
Całkowita zmienność Total	9306,94	42,27	
PL vs. EU_S			
Pomiędzy populacjami Between populations	168,70	3,64	8,30*
W obrębie populacji Within population	7974,07	40,22	91,70
Całkowita zmienność Total	8142,77	43,86	

* istotne $p < 0,01$

* significant at $p < 0,01$

wane badania wskazują, że zróżnicowanie ekologiczne populacji nie ma wpływu na poziom różnorodności genetycznej analizowanych fragmentów genomowych. Uzyskane dane wskazują, że badane populacje łączy wspólna historia rekolonizacji obszarów ich występowania w okresie po ostatnim zlodowaceniu.

W odniesieniu do zasięgu europejskiego gatunku wyniki badań wykazały duże podobieństwo genetyczne pomiędzy polskimi i północnoeuropejskimi populacjami sosny zwyczajnej. Zbliżone tło genetyczne wskazuje na wspólną historię rekolonizacyjną populacji w obu regionach geograficznych. Znacznie bardziej zróżnicowane genetycznie okazały się dwa pozostałe rejony geograficzne, na co wskazują statystycznie istotne różnice częstości alleli w porównaniu do populacji z północnego zasięgu. Prezentowane wyniki wspierają wcześniejsze obserwacje dotyczące polimorfizmu genetycznego populacji szkockich względem populacji z zasięgu kontynentalnego, niezgodnego z prostym modelem ekspansji populacji i kolonizacji [Wachowiak i in. 2010]. Uzyskane dane wskazują również na odmienny charakter populacji hiszpańskich, dla których opisano polimorfizm rejonów mitochondrialnego DNA oraz alleli izoenzymowych odmienny względem populacji z ciągłego zasięgu europejskiego, co może świadczyć o tym, że populacje te nie brały udziału w rekolonizacji Europy [Soranzo i in. 2000; Prus-Głowacki i in. 2012].

Uzyskane dane z analiz AMOVA wskazują na stosunkowo niewielkie zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi regionami geograficznymi z przeważającą liczbą wielu wspólnych miejsc polimorficznych w obrębie każdej populacji, co w konsekwencji wpłynęło na brak podziału populacji na mniejsze jednostki geograficzne w analizie klastrowej. Prezentowane wyniki

badania wskazują, że populacje drzew leśnych wykazują tendencję do utrzymywania dużego poziomu zmienności genetycznej w obrębie populacji, który przeciwstawia się gwałtownym zmianom poziomu różnorodności genetycznej w skali zasięgu gatunku spowodowanej zmianami wielkości populacji i przesunięciami ich zasięgu. Wynika to po części z charakterystyki wielu gatunków drzew leśnych, które cechuje długowieczność, nakładające się pokolenia i duża efektywna wielkość populacji, co w efekcie opóźnia utrwalanie mutacji w rejonach genomowych i dywergencję na poziomie loci neutralnych genomu [Austerlitz i in. 2000; Ray i in. 2003; Excoffier 2004].

Dotychczasowe badania cech ilościowych sosny zwyczajnej wskazują na duże zróżnicowanie cech adaptacyjnych lokalnych populacji na tle innych populacji w obrębie gatunku, w tym zmienność klinalną obserwowaną we wzroście, fenologii (okres zawiązywania pąków zimowych, przerywania spoczynku), odporności na niską temperaturę czy stres wodny i patogeny [Hurme i in. 1997; Shutyaev, Giertych 1998]. Korelacja pomiędzy zmiennością wielu cech fenotypowych a gradientem nasilenia czynników stresowych wskazuje, że obserwowane różnice pomiędzy populacjami w obrębie gatunku są wynikiem procesów naturalnej selekcji i adaptacji [Hurme i in. 2000]. Silne zróżnicowanie fenotypowe i niewielkie zróżnicowanie tła genetycznego dla loci neutralnych świadczy o istnieniu u sosny zwyczajnej rejonów genomowych poddanych działaniu naturalnej selekcji i odpowiedzialnych za istnienie wewnątrzgatunkowego zróżnicowania fenotypowego populacji w wyniku lokalnej adaptacji. Prezentowane wyniki badań wskazują na bliskie podobieństwo genetyczne nie tylko pomiędzy badanymi polskimi populacjami sosny zwyczajnej, ale także w odniesieniu do populacji z Europy Północnej. Biorąc pod uwagę silne zróżnicowanie adaptacyjne gatunku w gradiencie czynników selekcyjnych, zarówno polskie populacje, jak i centralna i północna część zasięgu sosny zwyczajnej stanowią doskonały obiekt badawczy w analizach korelacji genetycznych celem wykrycia rejonów genomowych leżących u podstaw obserwowanej zmienności adaptacyjnej i zróżnicowania fenotypowego lokalnych populacji.

Literatura

- Austerlitz F., Mariette S., Machon N., Gouyon P. H., Godelle B. 2000. Effects of colonization processes on genetic diversity: Differences between annual plants and tree species. *Genetics* 154: 1309-1321.
- Boratyński A. 1993. Systematics and geographical distribution. W: Białobok S., Boratyński A., Bugała W. [red.]. *Biology of Scots pine*. Sorus, Poznań – Kórnik.
- Corander J., Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205: 19-31.
- Excoffier L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853-864.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Hurme P., Repo T., Savolainen O., Paakkonen T. 1997. Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 27: 716-723.
- Hurme P., Sillanpää M. J., Arjas E., Repo T., Savolainen O. 2000. Genetic basis of climatic adaptation in Scots pine by Bayesian quantitative trait locus analysis. *Genetics* 156: 1309-1322.
- Karhu A., Hurme P., Karjalainen M., Karvonen P., Kärkkäinen K., Neale D., Savolainen O. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theoretical and Applied Genetics* 93: 215-221.
- Provan J., Sorozano N., Wilson N. J., McNicol J. W., Cottrell J., Powell W. 1998. Gene-pool variation in the caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences* 265: 1697-1705.
- Prus-Głowacki W., Urbaniak L., Bujas E., Curtu A. L. 2012. Genetic variation of isolated and peripheral populations of *Pinus sylvestris* (L.) from glacial refugia. *Flora* 207: 150-158.

- Ray N., Currat M., Excoffier L. 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20: 76-86.
- Savolainen O., Pyhäjärvi T., Knürr T. 2007. Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 595-619.
- Shutyayev A. M., Giertych M. 1998. Height growth variation in a comprehensive Eurasian provenance experiment of (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica* 46: 332-349.
- Soranzo N., Alía R., Provan J., Powell W. 2000. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology* 9: 1205-1211.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Wachowiak W., Balk P., Savolainen O. 2009. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics & Genomes* 5: 117-132.
- Wachowiak W., Salmela M. J., Ennos R. A., Iason G., Cavers S. 2010. High genetic diversity at the extreme range edge: nucleotide variation at nuclear loci in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland. *Heredity* 106: 775-787.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright S. I., Gaut B. S. 2005. Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Molecular Biology and Evolution* 22: 506-519.