

Justyna A. NOWAKOWSKA*

ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP I STS) W GENETYCE DRZEW LEŚNYCH, ENTOMOLOGII, FITOPATOLOGII I ŁOWIECTWIE

MOLECULAR MARKERS (RAPD, SSR, PCR-RFLP AND STS) IN FOREST-TREE GENETICS, ENTOMOLOGY, PHYTOPATHOLOGY AND GAME MANAGEMENT

Abstract. *Molecular markers (RAPD, SSR, PCR-RFLP and STS) are commonly used tools in modern population-genetics. They are very useful in genetic pool conservation and biodiversity maintenance in forest ecosystems concerning populations of forest trees, insects, fungi and animals.*

Based mostly on PCR reaction, the molecular markers may reveal the complexity and polymorphism of the DNA structure at the nuclear, mitochondrial and chloroplast level. First of all, they are commonly used in order to assess the genetic diversity level within and among populations of a given species. The RAPD and SSR markers help a lot in taxonomic identification of organisms, especially when the morphological traits are useless or difficult to measure. The PCR-RFLP and STS markers are the best tool to study kinship and phylogeny among individuals and among species populations. Moreover, these markers are very suitable to the study of population dynamic, via gene flow and phylogeography. Numerous examples of RAPD, SSR, PCR-RFLP and STS application in forest tree genetics, entomology, phytopathology and game management are given.

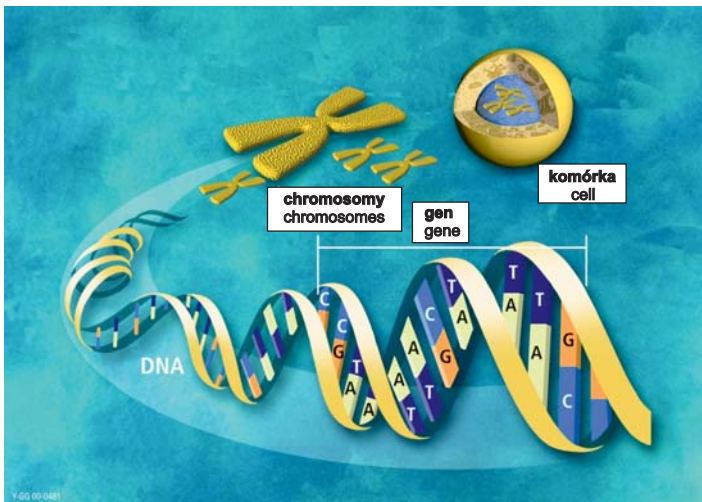
Key words: *chloroplast markers, DNA, entomology, forest tree genetics, mitochondrial markers, molecular markers, nuclear markers, PCR-RFLP, phytopathology, RAPD, SSR, STS, game management.*

* Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Las 05-090 Raszyn, e-mail: j.nowakowska@ibles.waw.pl

1. DEFINICJA MARKERÓW GENETYCZNYCH

Poznanie struktury genetycznej organizmów na poziomie molekularnym DNA jest kluczową informacją, jaka może być wykorzystana w zachowaniu różnorodności biologicznej ekosystemów leśnych, głównie poprzez ochronę *in situ* i *ex situ* rzadkich pul genowych danego gatunku oraz umożliwia selekcję osobników najbardziej odpornych na zmienne warunki środowiska oraz szkodliwe czynniki biotyczne i abiotyczne. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej i inżynierii genetycznej w ostatnich dziesięcioleciach otworzył nowe możliwości badań zmienności genetycznej dla wielu dyscyplin naukowych, w tym również leśnych, takich jak genetyka populacyjna drzew leśnych, entomologia, fitopatologia i łowiectwo.

Identyfikacja organizmów lub ich populacji jest możliwa dzięki różnicom w budowie kwasu deoksyrybonukleinowego DNA (tab. 1, ryc. 1). DNA zbudowane jest z podwójnego łańcucha cukrów prostych, do których przyłączone są w określonym porządku zasady purynowe (cytozyna i tymina) oraz pirymidynowe (adenina i guanina). Precyzyjne ułożenie tych zasad determinuje kod genetyczny, odpowiedzialny za wszystkie funkcje życiowe organizmu. Na kod genetyczny składają się poszczególne sekwencje DNA (geny), które kodują białka odpowiedzialne za wszystkie funkcje życiowe komórki. Sekwencje niekodujące znajdują się poza obszarami genów i często są źródłem polimorfizmu, który może być charakterystyczny dla danej grupy osobników jednego gatunku (zmienność między populacyjna) oraz dla pojedynczych osobników (zmienność wewnątrz populacyjna).



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), nośnika informacji genetycznej (A – adenina, T – tymina, C – cytozyna, G – guanina) (źródło: www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/graphics/slides/01-0085jpg.shtml)

Fig. 1. The structure of the deoxyribonucleic acid (DNA), a carrier of the genetic information (A – adenina, T – tymina, C – cytozyna, G – guanina) (source: www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/graphics/slides/01-0085jpg.shtml)

Tabela 1. Podstawowe terminy genetyczne i objaśnienia używanych skrótów

Table 1. Useful genetic definitions and abbreviations

Termin Definition	Objaśnienie Description
Allel Allele	jedna z możliwych form genu, różniących się sekwencją DNA i odpowiadających za daną cechę one of the several alternative forms of a gene that can exist in a single locus, coding a given trait
Diploid Diploid	organizm o podwójnej liczbie chromosomów an individual with two sets of homologous chromosomes
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy, molekularna podstawa dziedziczości, zawiera informację genetyczną odnośnie struktury i regulacji funkcji życiowych organizmu deoxyribonucleic acid, the molecular basis of heredity, contains all genetic information about the structure and regulation of life processes in any organism
Fenotyp Phenotype	morfologiczne cechy organizmu morphological features of an organism
Gen Gene	fragment DNA, który zawiera podstawową informację genetyczną a fragment of DNA that is essential for a specific function, which is transmitted to the progeny
Genetyka molekularna Molecular genetics	dział genetyki (nauki o dziedziczeniu cech zawartych w DNA), zajmujący się strukturą i funkcjonowaniem genów na poziomie cząsteczkowym a part of genetics (science dealing with heritability of genetic traits coded by DNA), which concerns the structure and the functioning of genes at the molecular level
Genotyp Genotype	całość informacji genetycznej organizmu the whole genetic information of a given organism
G_{ST} , F_{ST}	współczynniki zmienności genetycznej, wyrażające stosunek zmienności międzypopulacyjnej do zmienności całkowitej coefficients of gene differentiation, measure the degree of genetic differentiation of subpopulations
Haploid Haploid	organizm lub organ o pojedynczej liczbie chromosomów the organism or the organ containing one set of homologous chromosomes
Haplotyp Haplotype	kombinacja alleli na poziomie haploidalnym a set of alleles of a haploid cell
Heterozygota Heterozygote	organizm, który posiada dwie różne kopie (allele) danego genu an individual that carries dissimilar alleles of one or more genes
Homozygota Homozygote	organizm, który posiada dwie jednakowe kopie (allele) danego genu an individual that carries the same alleles of one or more genes
Kod genetyczny Genetic code	genetyczny zapis informacji w DNA genetic inscribing of the information in the DNA
Kodujący region Coding region	sekwencja DNA, która zawiera informację genetyczną nt. struktury białka a sequence of DNA with the information of protein structure
Markery genetyczne Genetic markers	fragmenty DNA stosowane do identyfikacji gatunków, osobników i populacji DNA fragments which serve to identify species, individuals and populations

Termin Definition	Objaśnienie Description
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy, w której amplifikowane (namnażane) są fragmenty DNA polymerase chain reaction which amplifies the DNA fragments
RNA	kwas rybonukleinowy, nośnik informacji genetycznej między DNA a cytoplazmą, gdzie powstają białka ribonucleic acid, messenger of the genetic information between the DNA and the cytoplasm, where proteins are created
Starter Primer	niewielki fragment jednoniciowego DNA, komplementarny do DNA matrycy, od którego bierze początek amplifikacja łańcucha DNA w reakcji PCR short fragment of nucleotides, complementary to the DNA matrix, from which starts the PCR amplification
Transkrypcja Transcription	synteza RNA na podstawie informacji genetycznej zawartej w DNA-matrycy RNA synthesis from the DNA matrix

wg King i Stanfield 2002, Eriksson i Ekberg 2001

according to King and Stanfield 2002, Eriksson and Ekberg 2001

W związku z kompleksową budową genomów u większości organizmów, np. 12×10^6 par zasad u drożdży, 3000×10^6 par zasad u człowieka i $30\,000 \times 10^6$ par zasad u świerka, ustalanie tożsamości genetycznej materiału biologicznego i określenie jego filogenezy opiera się na badaniu wybranych fragmentów DNA, przy użyciu markerów genetycznych (Ericsson i Ekberg 2001). Ogólnie, wyróżnia się trzy grupy markerów:

- markery morfologiczne (np. kształt blaszki liściowej, zawartość barwników w plastydach),
- markery biochemiczne (izoenzymy, fenole, terpeny),
- markery molekularne na poziomie DNA (które obejmują kod genetyczny zawarty w DNA jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym).

Marker genetyczny to te fragmenty DNA (wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad), które wykazują zmienność strukturalną w obrębie danego loci i umożliwiają identyfikację genotypu danego organizmu.

Powszechnie przyjmuje się, że markery genetyczne powinny się charakteryzować przede wszystkim dużym polimorfizmem (czyli obecnością licznych form allelicznych), wysoką częstotliwością występowania i równomiernym rozłożeniem w genomie. Dobry marker powinien wykazywać neutralność selekcyjną (czyli brak sprzężenia z genami plejotropowymi) oraz niezależność ekspresji pod wpływem czynników zewnętrznych. Ponadto, marker genetyczny powinien być wykrywalny prostą i szybką metodą, zarówno u homo- jak i heterozygoty (kodominacja).

Niniejsza praca ma na celu przybliżenie podstawowych technik biologii molekularnej, powszechnie stosowanych do analiz zróżnicowania DNA u organizmów żywych. Omówiono w niej poszczególne etapy przygotowania prób do analiz (zbiór, ekstrakcja) oraz technikę PCR, na której opierają się prawie wszystkie analizy markerów molekularnych. Na podstawie czterech głównych markerów

DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS), przedstawiono możliwości szerokiego zastosowania markerów genetycznych w praktyce leśnej z zakresu genetyki drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwa.

2. ZBIÓR MATERIAŁU I EKSTRAKCJA DNA

Podstawowym, bardzo ważnym etapem w badaniu struktur DNA jest pozyskiwanie materiału roślinnego, grzybowego lub zwierzęcego do analiz. Ogólnie przyjmuje się, że wybór osobników w populacji powinien być losowy, a tkanki pobierane są od osobników zdrowych (bez wyraźnych symptomów chorobowych) i zbliżonych wiekiem (Ericsson i Ekberg 2001). Cząsteczki DNA są bardzo niestabilne i szybko ulegają degradacji, np. w usychających czy gnijących tkankach, głównie z powodu działania enzymów proteolitycznych, aktywnych w dodatnich temperaturach. W związku z tym, zebrany materiał roślinny (pąki, liście, igły), grzybowy (strzępki, grzybnie, owocniki) bądź zwierzęcy (tkanki, całe organizmy, cebulki włosowe ssaków, odchody) przechowywany jest w suchych warunkach i w temp. poniżej 0 °C. Przechowywanie tkanek zwierzęcych w alkoholu lub formalinie jest odradzane, gdyż może powodować uszkodzenia łańcucha DNA (Genomic DNA purification 2002).

Istnieje szereg technik ekstrakcji DNA, polegających w pierwszym etapie na lizie ścian komórkowych, ułatwiającej właściwą ekstrakcję kwasów nukleinowych z tkanek roślinnych, grzybowych i zwierzęcych (Bowtell 1987, Dellaporta i in. 1983, Doyle i Doyle 1990, Genomic DNA purification 2002). Bardzo dobrą wydajność ekstrakcji gwarantują gotowe zestawy do izolacji DNA, np. DNeasy Plant Mini Kit (Genomic DNA purification 2002) dla tkanek roślinnych i grzybowych oraz zestaw DNeasy Tissue Kit (Genomic DNA purification 2002) do ekstrakcji DNA z tkanek zwierzęcych. Zaletą tych zestawów jest duża wydajność i czystość otrzymanych ekstraktów DNA, wolnych od takich komponentów komórkowych, jak np. obecne w komórkach roślinnych polisacharydy, które mogą hamować działanie polimerazy w reakcji PCR (Pandey i in. 1996).

Najczęściej pierwszym etapem w pozyskaniu cząsteczek DNA z tkanek roślinnych i zwierzęcych jest wstępna homogenizacja mechaniczna lub rozcieranie materiału w ciekłym azocie. Ciekły azot mechanicznie uszkadza ściany komórkowe, przez co umożliwia łatwiejszy dostęp do łańcuchów DNA, przy równoczesnej ich stabilizacji w niskiej temperaturze (-176 °C). Wydajność ekstrakcji DNA jest następnie badana spektrofotometrycznie lub za pomocą elektroforezy, np. w 1% żelu agarozowym, po uprzednim barwieniu próbek bromkiem etydyny. Wyekstrahowane cząsteczki DNA są następnie przechowywane przez wiele miesięcy (a nawet lat) w buforze stabilizującym (pH 7,0) w temperaturze -75 °C.

3. REAKCJA PCR

Większość technik analizy zmienności genetycznej polega na powielaniu wyekstrahowanych fragmentów DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. PCR, tab.1) przez termostabilny enzym (Taq Polimerazę), wyizolowany z ciepłolubnej bakterii *Thermus aquaticus*. Reakcja PCR polega na umieszczeniu wyizolowanego DNA-matrycy w następującej mieszaninie reakcyjnej, w skład której wchodzi: startery oligonukleotydowe (o długości od 10 do 24 par zasad), cztery rodzaje wolnych nukleotydów (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), jony magnezu ($MgCl_2$), bufor reakcyjny (wyrównujący pH) oraz Taq Polimeraza. Dalej, reakcja namnażania DNA przebiega w termocyklerze, zaprogramowanym na wiele cykli amplifikacji DNA (przeciętnie od 30 do 40). Pierwszy etap amplifikacji trwa ok. 1 minuty i prowadzi do denaturacji dwuniciowej matrycy DNA w temp. 94 °C. Potem następuje etap przyłączania starterów do rozdzielonych nici DNA (temp. 32–60 °C, od 30 sek. do kilku minut) i amplifikacja komplementarnych do matrycy nici DNA (72 °C, 2 min). Temperatura i czas trwania poszczególnych etapów zależą od wielu czynników, przede wszystkim od składu par nukleotydów G/C i A/T w budowie startera oraz wielkości powielanych fragmentów DNA. Wydajność i precyzja reakcji PCR jest bardzo wysoka, teoretycznie pozwala na powielenie wyjściowej cząsteczki DNA-matrycy obecnej w ekstrakcie nawet do 1×10^9 kopii (Sambrook i Russell 2001).

Istnieje kilka odmian reakcji PCR (Sambrook i Russell 2001):

- touch-down PCR, w której część cykli zaprogramowanych jest na zmienną temperaturę przyłączania się starterów),
- real-time PCR, gdzie znakowane fluorescencyjnie startery pozwalają na bieżąco śledzić akumulację produktów reakcji,
- RT-PCR (PCR z reakcją odwrotnej transkrypcji, czyli amplifikacja fragmentów DNA począwszy od cząsteczek mRNA).

Amplifikowane w reakcji PCR fragmenty DNA są następnie rozdzielane przy zastosowaniu elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Podczas elektroforezy naładowane ujemnie cząsteczki DNA migrują w stronę dodatniej elektrody żelu, z prędkością proporcjonalną do ich wielkości i masy cząsteczkowej, tak więc w ciągu paru godzin następuje rozdział puli fragmentów DNA na poszczególne odcinki.

4. KOMPUTEROWA ANALIZA DANYCH

Zróznicowanie genetyczne określane jest na ogół jako prawdopodobieństwo występowania identycznego genotypu między losowo wybranymi osobnikami w populacji. Analiza podobieństwa genetycznego I_N oraz filogenezy opartej na odległości genetycznej D_N umożliwia wstępną ocenę zróznicowania osobników w

Tabela 2. Podstawowe parametry analizy statystycznej, stosowane w genetyce populacji (Nei 1987)
 Table 2. Some statistical parameters used in the population genetics (Nei 1987)

Podobieństwo genetyczne I_N między dwiema populacjami x i y obliczane jest jako częstość występowania n alleli w jednym locus:

Genetic identity I_N between two populations x and y , based on the frequency of n alleles in one locus:

$$I_N = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

dla / with:

$$J_{xy} = \sum p_{ix} p_{iy} \quad J_x = \sum p_{ix}^2 \quad J_y = \sum p_{iy}^2$$

p_{ix} – częstość i allele w populacji x frequency of the i allele in the population x

p_{iy} – częstość i allele w populacji y frequency of the i allele in the population y

Na podstawie podobieństwa genetycznego I_N , obliczany jest dystans genetyczny D_N :

Genetic distance D_N is calculated on the base of the I_N :

$$D_N = -\ln(I_N)$$

I_N – podobieństwo genetyczne Nei'a Nei's genetic identity

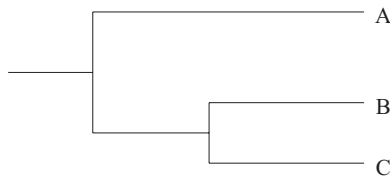
Powiązania filogenetyczne między osobnikami w populacji oraz między populacjami, przedstawiane są na podstawie obliczeń dystansu genetycznego w wyniku analizy skupień metodą średnich połączeń (UPGMA)

Genetic relationship between individuals in a population or between populations result from the neighbor-joining analysis called UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages):

$$D_{(AB)C} = (D_{AC} + D_{BC}) / 2$$

Dendrogram dystansu genetycznego przedstawia odległość genetyczną między osobnikami lub populacjami (tu: A, B i C). Im mniejsza odległość między punktami A, B i C, tym większe pokrewieństwo genetyczne między nimi:

Dendrogram of the genetic distances between points A, B and C measures the genetic similarity level between individuals or populations. Individuals or populations with higher genetic kinship are separated by the shorter distance:



obrębie populacji (tab. 2). W tym celu uzyskany na podstawie rozdziału elektroforetycznego obraz powielonych fragmentów DNA (inaczej elektroforegram) jest przetwarzany na dane liczbowe, przy zastosowaniu np. oprogramowań typu Gel DocTM 2000, Bio-Profil Bio-Gene Windows Application v.99.05 i Gel Pro AnalyzerTM v.2.0.

Szczegółowe obliczenia statystyczne zmienności genetycznej na poziomie DNA są przeprowadzane przy użyciu takich programów, jak np. GenePop v.3.4 (Raymond i Rousset 1995), Arlequin (<http://lgb.unige.ch/arlequin/software/>), PopGene v.1.32 (Yeh i Boyle 1997), Fstat v.2.9.1. (<http://www.unil.ch/izea/software/>)

fstat.html), SPAGeDi v.1.2 (Hardy i Vekemans 2003) i PHYLIP v.3.6b (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Programy te umożliwiają obliczenia podstawowych parametrów genetycznych, jak np. średnia obserwowana n_a i efektywna n_e liczba alleli w locus, indeks zmienności genetycznej I Shannon'a (Lewontin 1972), heterozygotyczność danego locus h , średnia zmienność wewnątrzpopulacyjna (H_S), całkowita zmienność międzypopulacyjna H_T , oraz współczynniki zmienności genetycznej, wyrażające stosunek zmienności międzypopulacyjnej do zmienności całkowitej: G_{ST} i F_{ST} (Nei 1987, Wright 1965). Więcej szczegółów na temat parametrów statystyki opisowej stosowanych w obliczeniach zmienności genetycznej populacji można znaleźć w opracowaniu Nei i Kumar (2000).

5. MARKERY GENETYCZNE

5.1. Markery DNA jądrowego – RAPD i SSR

Markery DNA jądrowego umożliwiają detekcję polimorfizmu DNA we wszystkich komórkach, zarówno diplo- jak i haploidalnych. DNA jądrowe zawiera informację genetyczną obojga rodziców i jest szczególnie cennym źródłem informacji na temat zróżnicowania genetycznego i określania genotypów występujących w populacji.

Istnieje szereg markerów DNA jądrowego, są to m.in. markery: RAPD, AFLP, SCAR, SSR, SAMPL, ISSR, ISTR, VNTR, DAF-DNA, RT-PCR, real-time PCR i SSCP (tab. 3). W niniejszym opracowaniu, więcej uwagi poświęcono markerom RAPD i SSR, jako najczęściej stosowanych w genetyce populacyjnej, również w leśnictwie.

Opracowana przez Williams i in. (1990) oraz Welsh i McClelland (1990) **technika RAPD** umożliwia równoczesną detekcję polimorfizmu wielu loci w całym genomie. Metoda ta polega na stosowaniu jednego startera o losowo dobranej sekwencji (o długości ok. 9–10 par zasad), który przyłącza się na zasadzie komplementarności do genomowego DNA, generując różnej wielkości fragmenty (ryc. 2).

Zaletą markerów RAPD jest mała wymagana ilość DNA wyjściowego i łatwość w wykonaniu analiz (tab. 4). Wadą tej techniki jest przede wszystkim dominujący charakter wykrywanych loci. Dominujący charakter markerów RAPD polega na wizualizacji jedynie jednego z dwóch alleli w danym loci, co oznacza, że za pomocą tej techniki nie jest możliwe rozróżnienie homozygot dominujących w przypadku diploidalnych komórek (AA) od heterozygot (Aa) (ryc. 2). W związku z tym, dla określenia różnic na poziomie pojedynczego allela w locus markerami RAPD, zalecane jest badanie haploidalnego materiału, np. prabielma w nasionach drzew (Yazdani i in. 1995). Brak amplifikacji recesywnych loci wynika ze zmian

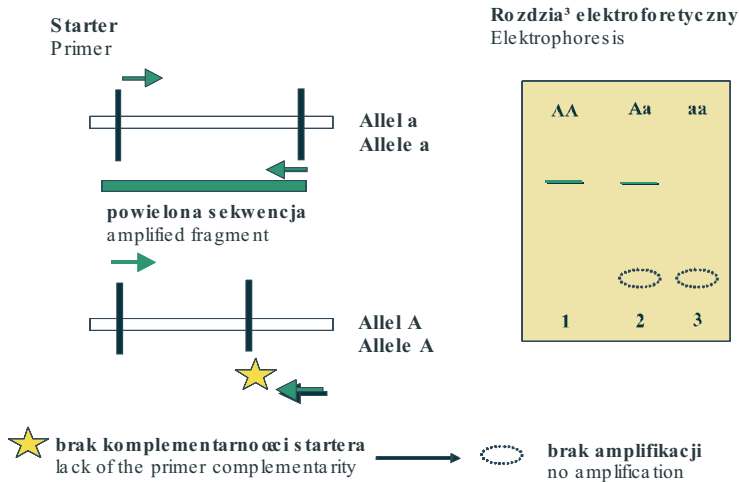
Tabela 3. Lista podstawowych markerów genetycznych

Table 3. List of the most commonly used genetic markers

Marker genetyczny Genetic markers	Objaśnienie Description
AFLP	polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu Amplified Fragment Length Polymorphism
DAF-DNA	fingerprinting ("odcisk palca") przez amplifikację DNA DNA Amplification Fingerprinting
ISSR	polimorfizm odcinków DNA między DNA mikrosatelitarnym Inter-Simple Sequence Repeat
ISTR	odwrócone powtórzenia miejsc sekwencyjnych Inverse Sequence-Tagged Repeat
RAPD	losowo amplifikowany polimorficzny DNA Random Amplified Polymorphic DNA
Real time PCR	PCR w czasie rzeczywistym, marker dynamiki amplifikacji DNA
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej reakcją PCR Reverse Transcription PCR
SAMPL	selektywnie amplifikowany polimorficzny locus mikrosatelitarny Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci
SCAR	sekwencyjnie charakteryzowany amplifikowany region Sequence Characterized Amplified Region
SSCP	polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA Single-Strand Conformation Polymorphism
SSR	mikrosatelitarne DNA Simple-Sequence Repeat
STS	miejsca znaczone sekwencyjnie Sequence-Tagged-Site
VNTR	sekwencje o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń Variable Number of Tandem-Repeats

strukturalnych w miejscach przyłączania się startera do DNA-matrycy, powstałych na skutek insercji lub delecji pojedynczych nukleotydów.

Powtarzalność analiz RAPD między laboratoriami jest różnie oceniana, dla niektórych gatunków nawet dość wysoko (np. 93% w przypadku analizy 43 fragmentów DNA genomowego świerka pospolitego, generowanych przez 18 różnych starterów firmy OPERON, Skov 1998). Łatwość wykonania techniki i względnie tani koszt analiz (przeciętnie ok. 25 zł za jedną próbę), sprawiają, że markery RAPD są powszechnie stosowane w badaniu zróżnicowania DNA jądrowego między osobnikami i populacjami danego gatunku (Collignon i in. 2002). Aby szczegółowo określić zmienność genetyczną na podstawie markerów RAPD zaleca się pobranie DNA z ok. 30–100 osobników z populacji oraz stosowanie



Ryc. 2. Schemat techniki RAPD, w której jedynie fragmenty dominujących alleli „A” są wizualizowane na żelu agarozowym, po reakcji PCR. Recesywne allele „a”, które nie posiadają sekwencji komplementarnych do sekwencji startera w jednym loci, nie są powielone. W technice RAPD, homozygota o genotypie „AA” i heterozygota „Aa” będą posiadały ten sam profil amplifikacji

Fig. 2. RAPD technique consists in PCR amplification of dominant alleles, called 'A'. The recessive alleles 'a' cannot be seen on the agarose gel because the lack of the complementarities in one primer-site. Thus, the RAPD profiles result in the similar pattern for the 'AA' and 'Aa' combinations

wielu starterów tak, aby z jak największym prawdopodobieństwem zidentyfikować różnice w budowie łańcucha DNA (Skov 1998).

Warto zauważyć, że markery RAPD są szczególnie przydatne w pierwszym etapie badań zmienności genetycznej danego gatunku, zwłaszcza gdy zmienność ta nie jest jeszcze znana. Po zlokalizowaniu polimorfizmu markerami RAPD w DNA genomowym, przystępuje się do szczegółowych analiz, stosując inne markery, np. AFLP i SCAR, które są modyfikacją markerów RAPD (Nkongolo i in. 2002).

Bardzo interesującymi markerami DNA jądrowego są **mikrosatelity (SSR)**, które zaliczane są obecnie do jednych z najbardziej precyzyjnych markerów w detekcji zmienności genetycznej osobników w populacji. Sekwencje mikrosatelitarne zbudowane są z długich tandemowych powtórzeń od 1 do 6 nukleotydów, zlokalizowanych głównie w niekodujących regionach genomu (Wang i in. 1994). Drzewa iglaste zawierają w swych komórkach aż 75% powtarzających się sekwencji mikrosatelitarnych, rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) – 10%; drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*) – 4,5%; człowiek – 3% i jedwabnik morwowy (*Bombyx mori*) – 0,31% (Eriksson i Ekberg 2001, Pérez i in. 2001, International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Prasad i in. 2005). Dużą zaletą markerów SSR jest ich wysoki stopień dyskryminacji (nawet na poziomie pojedynczych nukleotydów) oraz kodominacyjna możliwość wykrywania zróżnicowania genetycznego, czyli detekcja obu form allelicznych u heterozygot (ryc. 3, tab. 4). Źródłem polimorfizmu DNA mikrosatelitarnego jest

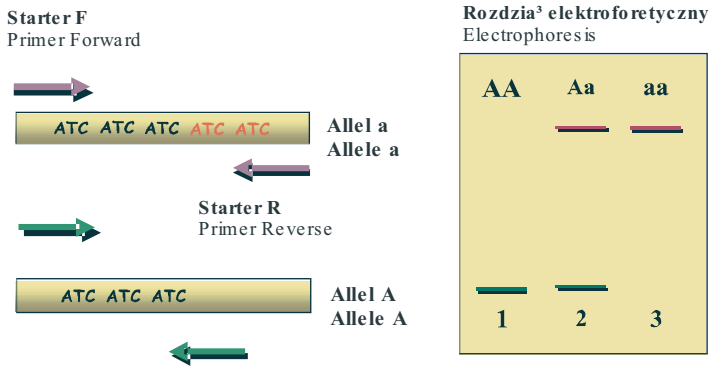
Tabela 4. Ogólna charakterystyka markerów RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS, stosowanych do badań zmienności genomu jądrowego i cytoplazmatycznego (chloroplasty i mitochondria) wg Hamrick i in. (1992), Heuertz (2003)

Table 4. General characteristics of RAPD, SSR, PCR-RFLP and STS markers, commonly used in genetic variation study of the nuclear and cytoplasmatic genome (chloroplasts and mitochondria) according to Hamrick et al. (1992), Heuertz (2003)

Wyszczególnienie Specification	DNA jądrowe nuclear DNA		DNA cytoplazmatyczne cytoplasmatic DNA	
	RAPD	SSR	SSR	PCR-RFLP / STS
Sposób dziedziczenia: Transmission to the progeny:	dominujący dominant	kodominujący codominant	kodominujący codominant	kodominujący, jednorodzielskie codominant, uniparentally
Stopień polimorfizmu: Degree of the polymorphism:	wysoki high	wysoki high	wysoki high	średni medium
Zasada techniki: Procedure:	PCR z jednym starterem, losowa amplifikacja loci PCR with primers randomly amplifying loci	PCR z wybranymi starterami dla niekodujących fragmentów genomu PCR with primers amplifying non coding loci	PCR z wybranymi starterami dla niekodujących fragmentów genomu PCR with primers amplifying non coding loci	PCR z wybranymi starterami dla loci kodujących PCR with primer amplifying coding loci
Poziom wykrywalności różnicowania genetycznego: Detection of the polymorphism:	niski na poziomie zmienności osobniczej średni na poziomie zmienności międzypopulacyjnej low at the intra-population level medium at the inter-population level	wysoki na poziomie zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej high at the intra- and inter-population level	wysoki na poziomie zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej high at the intra- and inter-population level	wysoki na poziomie zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej high at the intra- and inter-population level
Zastosowanie: Application:	badanie różnicowania genetycznego w genomie genetic diversity analysis in the whole genome	badanie różnicowania genetycznego z wysoką precyzją genetic diversity analysis with very high precision	badanie różnicowania genetycznego z wysoką precyzją genetic diversity analysis with very high precision	badanie pokrewieństwa i powiązań filogenetycznych kinship by phylogeny analysis
Zalety: Advantages:	analiza wielu loci jednocześnie analysis of many loci	analiza polimorficznych loci z wysoką powtarzalnością analysis of polymorphic loci with high repeatability	analiza polimorficznych loci z wysoką powtarzalnością analysis of polymorphic loci with high repeatability	analiza pokrewieństwa między potomstwem z wysoką powtarzalnością analysis of the kinship with high repeatability
Wady: Disadvantages:	niska powtarzalność wyników low repeatability	technika pracochłonna; możliwość występowania homoplazji ¹ i alleli null ² laborious technique; homoplasy ¹ , null alleles ²	–	–
Koszt: Cost:	niski low	wysoki high	wysoki high	średni / niski moderate / low

¹allele o tej samej liczbie par zasad mają różną strukturę alleles of the same size but presenting different base-pair composition

²loci nieme, nie powielone w reakcji PCR alleles non amplified in PCR



Ryc. 3. Schemat detekcji sekwencji mikrosatelitarnych (SSR)

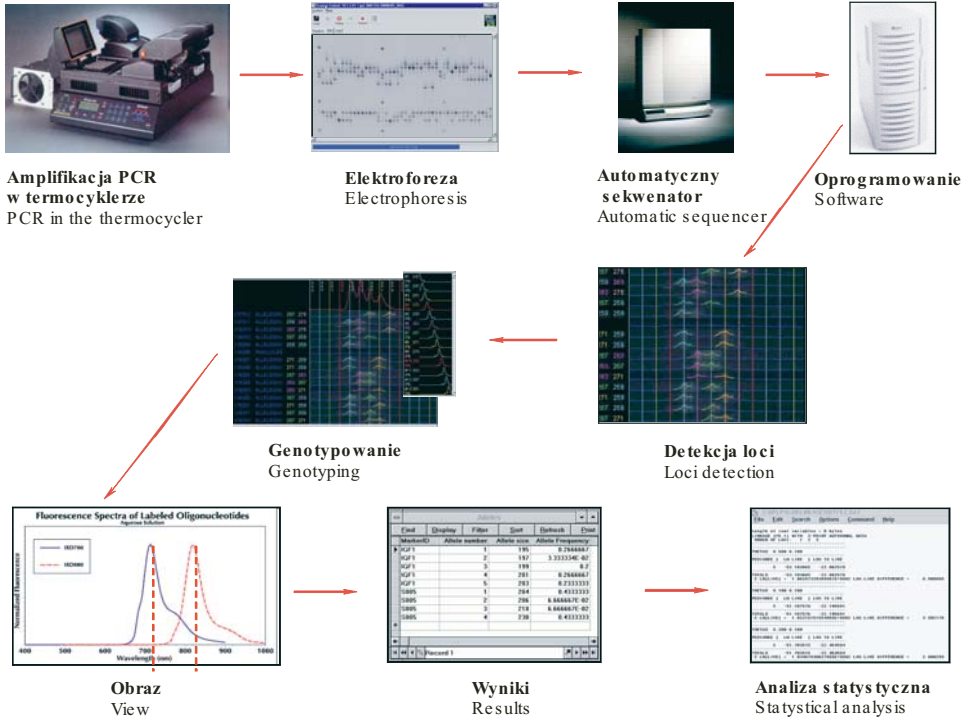
Fig. 3. Scheme of the microsatellite (SSR) detection

różnica długości powtarzających się motywów, np. $(ATC)_n$, $(A)_n(T)_n$, $(AC)_n(GT)_n$, gdzie n może przybierać różne wartości, przeciętnie od kilkudziesięciu do kilkuset. Poza DNA jądrowym, sekwencje mikrosatelitarne występują również w DNA mitochondrialnym (u roślin, grzybów i zwierząt) i chloroplastowym (u roślin). Funkcja DNA mikrosatelitarnego w komórce nie jest jeszcze do końca poznana. Przypuszcza się, że powstałe w trakcie ewolucyjnej reorganizacji genomu sekwencje mikrosatelitarne odgrywają pewną rolę w procesach związanych z powielaniem DNA i regulacją ekspresji genów (Li i in. 2002).

Technika SSR polega na badaniu zmienności w sekwencjach powtórzeń, otrzymanych w reakcji PCR i wizualizowanych po migracji w żelu akrylamidowym (ryc. 3). Obecnie, analizy DNA mikrosatelitarnego przeprowadza się najczęściej w automatycznym sekwenatorze, który generuje wyniki w postaci danych liczbowych (ryc. 4). Użycie automatycznego sekwenatora gwarantuje dużą precyzję odczytu danych i wysoką powtarzalność wyników, tym niemniej podraża koszt analiz (do ok. 40 zł za próbę). Wadą markerów SSR jest pracochłonny odczyt wyników, występowanie homoplazji (ang. *homoplasy*) i niewykrywalność tzw. alleli niemych (*null alleles*) (tab. 4). Duża specyficzność gatunkowa markerów SSR utrudnia czasami ich analizę w DNA gatunków pokrewnych (Zane i in. 2002). Więcej informacji na temat wad i zalet markerów mikrosatelitarnych można znaleźć w pracach: Deforce i in. 1998, Delmotte i in. 2001, Idury i Cardon 1997, Nowakowska 2005, Pemberton i in. 1995, Wang i in. 2000, Zhang i Hewitt 2003. Większość sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych u różnych gatunków jest na bieżąco publikowana w internetowych bazach danych, np. EBI: <http://www.ebi.ac.uk>, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> i <http://www.blackwell-synergy.com>.

5.2. Markery DNA cytoplazmatycznego — PCR-RFLP i STS

Najczęściej stosowanymi markerami zmienności genetycznej DNA cytoplazmatycznego są markery RFLP, PCR-RFLP i STS. **Markery PCR-RFLP i STS,**



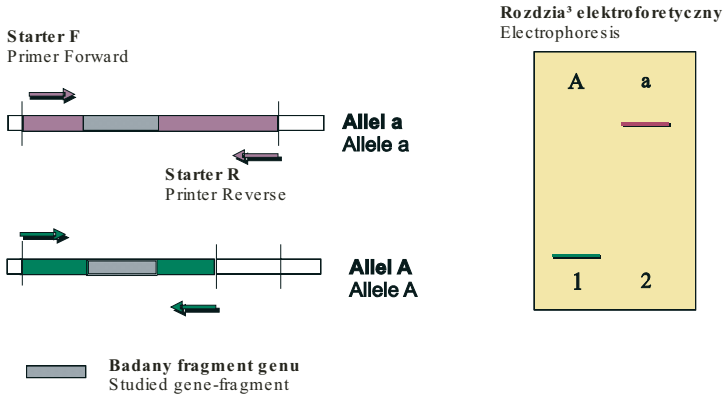
Ryc. 4. Ogólny schemat analizy loci mikrosatelitarnych za pomocą automatycznego sekwenatora. Powielone w reakcji PCR fragmenty SSR są znakowane fluorescencyjnie i odczytywane przez wiązkę lasera podczas rozdzielu w żelu pionowym (za: www.polygen.pl)

Fig. 4. General scheme of the microsatellite loci analysis with the help of the automated sequencer. The PCR products are fluorescence-labeled and then detected via laser while migrating in the vertical gel (source: www.polygen.pl)

rejestrowane uproszczoną techniką RFLP, umożliwiają precyzyjne wykrywanie polimorfizmu, głównie w kodujących regionach DNA, np. mitochondrialnych genów *nad* (NADH dehydrogenazy) i *cox* (oksydazy cytochromowej) (Nowakowska i Rakowski 2005, Sinclair i in. 1999, Soranzo i in. 2000).

Markery PCR-RFLP identyfikują różnice w budowie DNA powstałe na skutek punktowych mutacji w miejscach restrykcyjnych genomu, podczas gdy markery STS dotyczą zmian strukturalnych wynikających z występowania – lub braku – wielokrotnych powtórzeń sekwencji, zlokalizowanych między miejscami restrykcyjnymi. Zmiany te dotyczą głównie niekodujących fragmentów DNA, flankujących (otaczających) konserwatywne fragmenty genów (Petit i in. 1997). Niewątpliwą zaletą tych markerów jest ich kodominujący charakter, czyli możliwość detekcji zarówno dominujących, jak i recesywnych form alleli w tym samym locus.

Techniki detekcji markerów PCR-RFLP i STS opierają się na amplifikacji PCR specyficznych fragmentów genów, które są następnie rozdzielone w żelu



Ryc. 5. Schemat detekcji kodominujących markerów PCR-RFLP i STS. Badane w cytoplazmatycznych organellach (mitochondria, chloroplasty) markery umożliwiają identyfikację zarówno dominujących, jak i recesywnych form alleli „A” i „a”

Fig. 5. The PCR-RFLP and STS codominant markers both detect the dominant ‘A’ and the recessive ‘a’ alleles in cytoplasmic organelles (mitochondria and chloroplasts)

agarozowym lub poliakrylamidowym. W wyniku tej analizy, otrzymujemy różne profile migracyjne w zależności od rodzaju haplotypu w danym loci (ryc. 5).

Markery DNA cytoplazmatycznego najczęściej są stosowane w badaniu DNA mitochondrialnego i chloroplastowego, które zawierają pojedynczą nić DNA (Soranzo i in. 2000). Sposób dziedziczenia DNA cytoplazmatycznego zależy głównie od przynależności taksonomicznej. U grzybów i większości organizmów wyższych, w tym drzew iglastych, DNA mitochondrialne jest przekazywane potomstwu drogą maticzną, natomiast u drzew liściastych – przez pyłek; u tych ostatnich DNA chloroplastowe jest dziedziczone drogą maticzną (Mitton i in. 2000, Csaikl i in. 2002). Cechy te są wykorzystywane na szeroką skalę w badaniach przepływu genów, filogenezie oraz w identyfikacji haplotypów.

Informacja genetyczna DNA mitochondrialnego i chloroplastowego nie podlega procesom rekombinacji, tak więc jest przekazywana w sposób prawie stały z pokolenia na pokolenie. Ponadto DNA mitochondrialne charakteryzuje się wyższym procentem mutacji punktowych niż DNA jądrowe, co pozwala odróżnić osobniki między sobą (Sinclair i in. 1999, Vilà i in. 1999).

Przed zastosowaniem, zarówno markerów PCR-RFLP, jak i STS, konieczne jest rozeznanie struktury sekwencji badanego genu, stąd analizy te są na ogół poprzedzone wyszukiwaniem informacji nt. zmiennych regionów flankujących wybrane loci DNA mitochondrialnego lub chloroplastowego.

6. ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA W GENETYCE DRZEW LEŚNYCH

Wymienione powyżej markery genetyczne (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) znajdują szerokie zastosowanie w badaniach populacyjnych drzew leśnych. Przede wszystkim są one stosowane w identyfikacji zmienności genetycznej na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym wielu gatunków drzew leśnych, np. *Quercus*, *Populus*, *Fraxinus*, *Pinus*, *Picea*, *Ulmus*, *Citrus*, *Eucalyptus*, *Malus* i *Prunus* (Barret i in. 1997, Coleman 2000, Collignon i in. 2002, Heinze i in. 1996, Hick i in. 1998, Jeandroz i in. 1996, Lu i in. 1995, Nkongolo i in. 2002, Nowakowska 2003b, Nowakowska i in. 2004, Rajora i in. 2003, Scheepers i in. 1997, Troggio i in. 2001).

Markery RAPD umożliwiają ponadto identyfikację osobników pochodzących z klonów, np. *Picea abies* L. Karst., *Quercus robur* L., *Populus* × *canadensis*, identyfikację mieszańców *Fraxinus excelsior* i *F. oxyphylla* oraz genotypowanie rzadkich endemicznych populacji wiązów *Ulmus plotii* Druce, *U. minor* i *U. glabra* (Barret i in. 1997, Heinze 1996, Jeandroz i in. 1996, Rajora i in. 2003). Rodzaj materiału roślinnego pobranego do analiz nie wpływa na uzyskane wyniki – u *Quercus robur* L. i *Q. petraea* (Matt.) Liebl. nie wykryto różnic pomiędzy profilem RAPD dla DNA pochodzącego z pędów położonych na różnej wysokości jednej gałęzi, z pąków śpiących czy pędów wyhodowanych in vitro (Barret i in. 1997).

Technikę RAPD stosuje się również w badaniach powiązań filogenetycznych między populacjami danego gatunku drzew leśnych. Na podstawie tych markerów, w Europie wyodrębniono dwie główne grupy pochodzeń świerka pospolitego: grupę północną (pochodzenia szwedzkie i białoruskie) i grupę alpejską (pochodzenia francuskie, austriackie, niemieckie i belgijskie), co potwierdziło hipotezę o naturalnym zasięgu świerka w tym rejonie, otrzymaną na podstawie badań migracji pyłku oraz markerów izoenzymatycznych (Scheepers i in. 1997, Prus-Głowacki i Modrzycki 2003). Badania polskich pochodzeń świerka pospolitego na podstawie markerów RAPD wykazały podział na trzy główne grupy populacji zbliżone filogenetycznie (Nowakowska 2004b). W przypadku polskich pochodzeń sosny i jesionu wykryto większe zróżnicowanie genetyczne populacji z terenów zachodnich ($G_{ST} = 0,190$ dla sosny; $h = 0,201$ dla jesionu) w porównaniu z populacjami ze wschodniej i południowej części kraju (odpowiednio $G_{ST} = 0,177$ dla sosny i $h = 0,169$ dla jesionu) (Nowakowska 2003b, Nowakowska 2004b, Nowakowska i in. 2004). Wynika to prawdopodobnie z większej ingerencji człowieka w gospodarkę leśną na terenach zachodniej Polski 150–200 lat temu, głównie w związku ze znacznym obrotem leśnym materiałem rozmnożeniowym w dawnych zaborach niemieckich.

Markery DNA mikrosatelitarnego są od ok. dziesięciu lat najprecyzyjniejszym narzędziem badawczym w genotypowaniu drzew leśnych. Obecnie poznano już szereg loci mikrosatelitarnych wielu gatunków drzew leśnych, zarówno liściastych, jak i iglastych (por. bazy danych: www.ebi.ac.uk, www.ncbi.nlm.nih.gov). Mikrosatelitarne DNA jest przede wszystkim wykorzystywane w geno-

typowaniu populacji i badaniu przepływu genów między populacjami (Burczyk i in. 2004, Oddou-Muratorio i in. 2003, Robledo-Arnuncio i in. 2004). Genotypy polskich populacji sosny zwyczajnej charakteryzuje niski stopień całkowitego różnicowania genetycznego ($F_{ST} = 0,002$) na podstawie badanych loci mikrosatelitarnych; przy czym populacje z zachodniej części kraju wykazują większe różnicowanie genetyczne ($F_{ST} = 0,032$) w porównaniu z populacjami z Polski południowej ($F_{ST} = 0,018$) i wschodniej ($F_{ST} = 0,027$) (Nowakowska i in. 2005a). Dane te potwierdziły wyniki, otrzymane na podstawie markerów RAPD dla badanych populacji sosny zwyczajnej (Nowakowska 2003b).

Markery mikrosatelitarne znajdują ponadto szerokie zastosowanie w identyfikacji drzew ojcowskich, konstrukcji map genetycznych oraz filogenetyce, np. u *Pinus pinaster* Ait., *P. sylvestris* L., *Picea abies* (L.) Karst., *Populus* ssp., *Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Sorbus torminalis* L. Crantz., *Fraxinus* ssp., *Prunus avium* L. (Chagné i in. 2004, Morand i in. 2002, Nowakowska i in. 2005a, Oddou-Muratorio i in. 2001, Rajora i Rahman 2003, Wunsch i Hormaza 2002, Vendramin i in. 2000).

Markery DNA jądrowego (RAPD i mikrosatelity) mogą być również stosowane w identyfikacji źródła pochodzenia leśnego materiału rozmnożeniowego, identyfikacji gatunków krzyżujących się (np. *Fraxinus excelsior* i *F. angustifolia*) oraz w analizie zmienności somaklonalnej w rozmnażanych in vitro kulturach drzew leśnych (Lefort i in. 1999, Rahman i Rajora 2001). Szersze omówienie wszechstronnego zastosowania markerów mikrosatelitarnych w genetyce drzew leśnych można znaleźć w pracach: Nowakowska 2005, Wang i in. 1994, Zhang i Hewitt 2003.

Markery DNA cytoplazmatycznego (PCR-RFLP i STS) są podstawowym narzędziem badawczym stosowanym w filogenetyce i przy odtwarzaniu głównych dróg migracji różnych gatunków drzew leśnych z południowych i północno-wschodnich refugium polodowcowych w Europie. Kilka międzynarodowych projektów badawczych (m.in. CYTOFOR, OAKLOW, DYNABEECH, FOSSILVA, FRAXIGEN) miało na celu oznaczenie dróg migracji takich gatunków, jak: klon, olsza, brzoza, grab, leszczyna, buk, jesion, topola, czereśnia, dąb, wierzba, jarząb, lipa, wiąz, dąb i jesion na podstawie markerów cytoplazmatycznych (por. <http://www.pierroton.inra.fr/cytofor>, <http://www.pierroton.inra.fr/oakflow>, <http://www.biotheon.com/dynabeech>, <http://www.imep-cnrs.com/fossilva/home.htm>, <http://www.fraxigen.net/>). Projekty te dotyczyły bardzo szerokiego zakresu badań różnorodności genetycznej drzew leśnych, np. projekt CYTOFOR miał na celu zbadanie różnorodności genetycznej drzew leśnych na potrzeby legislacji obrotu leśnym materiałem rozmnożeniowym w Unii Europejskiej, a projekt FOSSILVA był poświęcony analizie DNA ze skamienielin z zachowanym materiałem roślinnym *Fagus sylvatica*, *Quercus* spp., *Abies* spp., *Pinus sylvestris*, *Pinus pinaster* i *Picea abies*.

Badania filogenetyczne gatunków drzew liściastych oparte są w większości na analizie polimorficznych loci DNA chloroplastowego, np. *trnL trnL*, *trnF*, intronu *tRNA^{Leu1}*, które wykazują dużą zmienność w obrębie haplotypów (Demesure i in.

1995). Zastosowanie tych markerów do badań haplotypowej zmienności DNA chloroplastowego w europejskich pochodzeniach dębu wykazało, że były trzy główne polodowcowe refugia: półwyspy Iberyjski, Apeniński oraz Bałkański, z których następowała ekspansja gatunków *Quercus* spp. na północ Europy (Petit i in. 2002, Finkeldey i Mátyás 2003).

Badania pokrewieństwa genetycznego i analiza migracji polodowcowej drzew iglastych są oparte głównie na zmienności mitochondrialnych genów *nad1* i *cox1* (Sinclair i in. 1998, Mitton i in. 2000, Gugerli i in. 2001, Gout i Nowakowska 2005). Niektóre badania zmienności tych genów markerami PCR-RFLP i STS wskazują, że europejskie populacje sosny zwyczajnej i świerka pospolitego wywodzą się najprawdopodobniej z południowych refugium położonych na półwyspach: Iberyjskim, Apenińskim i Bałkańskim (Sinclair i in. 1999, Soranzo i in. 2000). Trwają badania nad filogenezą polskich pochodzeń sosny i świerka. Jak dotąd wykazano, iż polskie populacje sosny zwyczajnej położone na pograniczu z Ukrainą wykazują podobieństwo zróżnicowania haplotypowego genu *nad1*, tak więc migracja sosny na południowe tereny Polski następowała prawdopodobnie również z południowo-wschodniej Europy (Nowakowska i in. 2005b).

Informacje na temat polodowcowego rozmieszczenia gatunków, pokrewieństwa filogenetycznego oraz kierunku przepływu genów w populacjach mogą być podstawą do ustalenia zasad współczesnej ochrony zasobów genowych drzew leśnych w Europie. Równocześnie coraz częściej markery DNA jądrowego i cytoplazmatycznego są stosowane do oznaczania cech ilościowych (ang. QTL) drzew leśnych. Na przykład w odniesieniu do sosny i świerka stosuje się markery AFLP, SCAR i SSR, aby zidentyfikować geny odpowiedzialne za gęstość drewna i syntezę lignin, jedlicy *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco – markery RFLP do poznania genów odpowiedzialnych za reakcje adaptacji drzew do zmiennych warunków środowiska, tj. niskiej temperatury i stresu wodnego (Brown i in. 2003, Markussen i in. 2004, Jermstad i in. 2003). Identyfikacja odpowiednich cech jakościowych na poziomie molekularnym ma ogromne znaczenie w selekcji i hodowli leśnego materiału rozmnożeniowego (Szyp-Borowska 2005).

7. ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA W ENTOMOLOGII

We współczesnej entomologii istotne znaczenie ma analiza genomu osobników i populacji owadów, w tym szkodników leśnych, za pomocą markerów genetycznych. W pierwszym rzędzie markery molekularne są stosowane do identyfikacji taksonomicznej gatunku, zwłaszcza wtedy, gdy morfologiczne cechy nie pozwalają odróżnić podgatunków i rzędów wg ogólnej przyjętej klasyfikacji. Dla przykładu, na podstawie mitochondrialnego genu *cox2* Miller i in. (1999) zidentyfikowali trudne do rozróżnienia morfologicznie larwy z rzędu Coleoptera: *Lepidota ssp.* i *Antitrogus ssp.*

Zmienność genetyczna borecznika sosnowego (*Diprion pini* L.), badana na poziomie wewnątrz- i między populacyjnym u przy użyciu markerów DNA mikrosatelitarnego i RAPD, pozwoliła rozróżnić francuskie i fińskie populacje nizinne od wyżynnych (Rouleux-Bonnin i in. 1996, Baumann i in. 2003). Również mitochondrialne markery PCR-RFLP genu *cox1* umożliwiły identyfikację taksonomiczną osobników z rzędu Coleoptera, Orthoptera, Blattoidea, żyjących na oddalonych od siebie wyspach Nowej Zelandii (Trewick 2000). Połączenie danych morfologicznych z danymi polimorfizmu genów rybosomalnych i *cox1* umożliwiło rozróżnienie linii błonkówek ‘Symphyta’ oraz potwierdziło filogenetyczne powiązania między badanymi osobnikami (Schulmeister 2003).

DNA szkodników *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera), *Th. wilkinsoni*, *Th. solitaria* i *Th. processionae*, których żery powodują znaczną defoliację w lasach południowej Europy i północnej Afryki, zostało przeanalizowane za pomocą markerów mikrosatelitarnych (Rousselet i in. 2004). Szczegółowe rozpoznanie struktury genetycznej owadów drzew leśnych ma na celu monitoring dynamiki populacji, ich tempa migracji i zdolności adaptacyjnej. Podobne badania owadów z rzędu Lepidoptera prowadzili Ibrahim i in. (2004), Luque i in. (2002) oraz Salvato (2002).

Markery DNA jądrowego i mitochondrialnego mogą dostarczyć interesujących informacji również na temat interakcji owad – parazytoid. Na podstawie markerów RAPD wyróżniono 26 szczepów *Bacillus thuringiensis*, parazytoida owadów z rzędu Lepidoptera, Hymenoptera i Diptera (Gaviria Rivera i Priest 2003). Analiza genu *crybns3-3* w szczepie BNS3 *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki, wykazała genetyczne powinowactwo *crybns3-3* z genem toksycznego białka delta-endotoksyny *CryIIa*, co umożliwiło m.in. klasyfikację szczepu BNS3 jako wirulentny (Tounsi i in. 2003).

Analiza mitochondrialnego genu *cox1* u parazytoida błonkówek *Agathis* sp. wykazała, że zmienność genetyczna parazytoida pokrywa się ze zróżnicowaniem populacji gospodarza, określonym na podstawie behawioru owada i jest związana z geograficznym rozmieszczeniem gatunków roślin, na których żerują *Agathis* sp. (Althoff i Thompson 2001).

Markery mitochondrialnego DNA umożliwiają analizę migracji gatunku wielu owadów oraz pozwalają określić, ile osobników spoza populacji brało udział w procesie reprodukcyjnym. Tego typu badania przeprowadzono nad europejskimi pochodzeniami chrząszczy *Timarcha goettingensis* i *Carabus solieri* oraz północno-amerykańskimi populacjami mrówki *Leptothorax regatulus* (Garnier i in. 2004, Gómez-Zurita i Juan 2000, Ruppell i in. 2003). Badania ośmiu haplotypów kornika drukarza (*Ips typographus* L.) w Europie, scharakteryzowanych na podstawie markerów PCR-RFLP, wskazały na dwie główne drogi polodowcowej migracji tego gatunku z refugium położonych w Alpach i północnej Rosji (Stauffer i in. 1999). Warto nadmienić, że drogi ekspansji kornika na kontynencie europejskim pokrywają się z głównymi kierunkami migracji polodowcowej świerka pospolitego, głównego gospodarza tego szkodnika (tamże).

8. ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA W FITOPATOLOGII

Precyzyjna identyfikacja taksonomiczna wielu gatunków i szczepów patogennych grzybów ma kluczowe znaczenie w fitopatologii leśnej. W tej dziedzinie markery DNA są stosowane przede wszystkim w celu rozróżnienia szczepów, których identyfikacja na podstawie cech morfologicznych jest trudna lub niemożliwa. Dotyczy to m.in. różnych podgatunków *Ophiostoma* identyfikowanych na podstawie markerów RFLP w rybosomalnym DNA (Pipe i in. 2000). W podobny sposób rozpoznano również hybrydy *Ophiostoma ulmi* spp. *novo-ulmi* i *O. ulmi* spp. *americana* dzięki identyfikacji różnic w strukturze genu *col1* na podstawie markerów PCR-RFLP (Konrad i in. 2002, Santini i in. 2005).

Wiele badań poświęcono detekcji szczepów opieńiek (*Armillaria* spp.) i korzeniowca wieloletniego (*Heterobasidion annosum*) i ustaleniu ich taksonomii z wykorzystaniem markerów PCR-RFLP i SSR (Chillali i in. 1998, Coetzee i in. 2002, Langrell i in. 2001, Lefrancois i in. 2002, Vainio i Hantula 1999).

Diagnostyka patogenów grzybowych w roślinie, glebie i wodzie wykorzystuje również szeroki asortyment markerów DNA, np. markery RAPD, PCR-RFLP i SSCP są powszechnie stosowane w detekcji i badaniu ilościowym szczepów *Phytophthora* spp. (De Merlier i in. 2005, Nechwatal i in. 2001, Oszako i in. 2005, Schubert i in. 1999). Technikę real-time PCR z powodzeniem stosuje się do oznaczania dynamiki namnażania DNA patogena w roślinie (Mackay 2004, Vandemark i Barker 2003). W przypadku *Phytophthora* spp., zaletą technik opartych na markerach DNA jest bardzo wysoka czułość detekcji w porównaniu z klasycznymi metodami wykrywalności patogenów grzybowych w roślinie, przed pojawieniem się symptomów choroby w roślinie. Poznanie interakcji patogen – roślina na poziomie ekspresji genów odbywa się również przy użyciu mikromacierzy DNA (Huitema i in. 2003, Kazan i in. 2001, Nowakowska 2003a).

Markery RAPD, RFLP oraz DNA mikrosatelitarnego są z powodzeniem stosowane w detekcji symbiontów mikoryzowych drzew leśnych, np. maślaka *Suillus grevillei*, lakówki *Laccaria amethystina*, podgrzybka *Xerocomus* spp. oraz *Cenococcum geophilum* (Fiore-Donno i Martin 2001, Jany i in. 2002, Saari i in. 2005, Zhou i in. 2001).

Postępujący rozwój technik molekularnej detekcji i identyfikacji patogenów i symbiontów grzybowych umożliwi w najbliższej przyszłości precyzyjną selekcję najbardziej korzystnych interakcji szczepów mikoryzowych z rośliną-gospodarzem.

9. ZASTOSOWANIE MARKERÓW DNA W ZOOLOGII

Badania populacji zwierząt leśnych dotyczą przede wszystkim identyfikacji taksonomicznej i badania struktury genetycznej populacji na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym. W tym celu pozyskuje się materiał organiczny (tkanki, fragmenty skóry, cebulki sierści lub piór, odchody) do badań DNA. Poznano już m.in. zróżnicowanie genetyczne populacji jelenia (*Cervus elaphus*), dzika (*Sus scrofa*), rysia (*Lynx lynx*), wilka (*Canis lupus*) borsuka (*Meles meles*) oraz lisa (*Vulpus vulpus*) przy użyciu markerów RAPD, RFLP i SSR (Flagstad i in. 2003, Frantz i in. 2003, Klukowska i in. 2004, Palomares i in. 2002, Pérez i in. 1998, Rueness i in. 2003, Sundqvist i in. 2001). Również ważne pod względem ekologicznym gatunki ssaków (np. nietoperze) przebadano pod kątem zróżnicowania między populacjami oraz w obrębie kolonii. Wykorzystane w tym celu markery DNA mitochondrialnego i mikrosatelitarnego umożliwiły identyfikację poszczególnych populacji i potwierdziły znaczący wpływ środowiska na behavior tych ssaków, np. wybór partnera i formowanie grup (Echenique-Diaz i in. 2002, Kerth i in. 2002, Salgueiro i in. 2004, Storz 2000).

Ustalanie płci i rodzicielstwa wybranych osobników jest również coraz częściej oparte na markerach DNA. W tym celu stosuje się markery mitochondrialne przekazywane potomstwu przez matkę oraz markery mikrosatelitarne, umożliwiające ustalenie podobieństw genetycznych na zasadzie „odcisku palca” między spokrewnionymi osobnikami. Mikrosatelitarne loci pozwoliły m.in. ustalić płeć osobników oraz genotypy chronionego gatunku orła cesarskiego (*Aquila heliaca*) oraz nocka Bechsteina (*Myotis bechsteinii*) (Kerth i in. 2002, Rudnick i in. 2005).

Dynamika populacji, przestrzenne rozmieszczenie osobników, identyfikacja imigrantów oraz przepływu genów w populacji zostały szczegółowo przebadane markerami PCR-RFLP i DNA mikrosatelitarnego m.in. u sarny (*Capreolus capreolus*), rysia (*Lynx lynx*), kojota (*Canis latrans*), norki europejskiej (*Mustela lutreola*) i borsuka (*Meles meles*) (Frantz i in. 2003, Michaux i in. 2005, Rueness i in. 2003, Wang i Schreiber 2001, Vilà i in. 1999). Wpływ migracji na przepływ genów i fragmentację pul genetycznych wilka (*Canis lupus*) został szczegółowo zbadany przy użyciu markerów DNA mikrosatelitarnego i mitochondrialnego w Europie i Ameryce Północnej (Carmichael i in. 2001, Flagstad i in. 2003, Lucchini i in. 2004, Sundqvist i in. 2001, Vilà i in. 1999).

Filogeografia (badanie zależności między geograficznym rozmieszczeniem organizmów i ich strukturą genetyczną) w znacznej mierze korzysta z danych, jakich dostarczają badania markerów DNA. Dzięki markerom PCR-RFLP i SSR określono obszar występowania m.in. wilka szarego i norki europejskiej (Fleming i Cook 2002, Vilà i in. 1999).

Filogenetyczne badania pomiędzy populacjami wielu gatunków ssaków pozwoliły na odtworzenie dróg ekspansji po okresie ostatniego zlodowacenia. Stosowane w tym celu markery DNA mitochondrialnego (gł. PCR-RFLP) wykazały główne szlaki migracyjne takich gatunków, jak wilk, ryś i niedźwiedź (Lucchini i in. 2004, Rueness i in. 2003, Ruiz-Garcia 2003, Taberlet i in. 1998).

10. PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej metody badawcze dla markerów RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS są aktualnie stosowane w wielu interdyscyplinarnych badaniach z zakresu genetyki drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i ekologii leśnej. Wymienione techniki znajdują zastosowanie przede wszystkim w identyfikacji zróżnicowania genetycznego na poziomie między- i wewnątrzpopulacyjnym, oraz umożliwiając precyzyjne oznaczenie pokrewieństwa między osobnikami rodzicielskimi i ich potomstwem (tab. 4).

Markery RAPD to łatwo wykrywalne, dominujące i tanie w kosztach narzędzie badawcze do oznaczenia zróżnicowania genetycznego na poziomie całego genomu. Są one najczęściej stosowane w pierwszych etapach badań genomu danego gatunku, zwłaszcza gdy jego zmienność genetyczna nie jest jeszcze poznana.

Najbardziej przydatne do identyfikacji osobniczej oraz populacyjnej są markery jądrowego DNA - mikrosatelity, głównie ze względu na kodominujący sposób detekcji alleli, wysoki poziom wykrywania pokrewieństwa między osobnikami, średni koszt analiz oraz dużą powtarzalność wyników między jednostkami laboratoryjnymi.

Techniki PCR-RFLP i STS pozwalają na precyzyjne wykrywanie polimorfizmu kodominujących genów na poziomie haplotypów i przez to określają przynależność osobników do poszczególnych populacji, form lub ras. Markery DNA chloroplastowego są wykorzystywane w celu badania zmienności drzew liściastych, natomiast analiza DNA mitochondrialnego ma ogromne znaczenie w badaniu filogenetycznych powiązań między populacjami drzew iglastych, owadów, grzybów i kręgowców. W badaniach tej ostatniej grupy organizmów markery PCR-RFLP również znajdują zastosowanie w określaniu płci osobników oraz dynamiki populacji i filogeografii wielu gatunków zwierząt.

Obecnie prowadzone są intensywne badania genomów wielu gatunków roślin, grzybów i zwierząt. W internetowych bazach danych (np. <http://www.ebi.ac.uk>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> i <http://www.blacwell-synergy.com>) można znaleźć dane odnośnie ok. 1 500 000 sekwencji z 85 genomów gatunków roślin, 1 020 000 sekwencji DNA z 136 gatunków grzybów, 8000 sekwencji DNA z 62 gatunków owadów oraz 5 000 000 genów poznanych u 270 gatunków ssaków. Informacje te mogą posłużyć jako dane wyjściowe przy rozpoczynaniu badań zróżnicowania genetycznego u gatunków, u których nie zbadano jeszcze struktury DNA. Bowiem dzięki stałej strukturze sekwencji wielu genów możliwe jest przeniesienie (w obrębie gatunku, a nawet rodzaju) modelu badawczego z jednego organizmu na drugi.

Markery DNA znajdują szczególne zastosowanie w detekcji zróżnicowania genetycznego populacji danego gatunku. Są one bardzo przydatne w identyfikacji taksonomicznej organizmów, zwłaszcza gdy ich morfologiczna ocena jest niewystarczająca. Ponadto, są nieodzownym narzędziem badawczym przy ustalaniu

pokrewieństwa między osobnikami danego gatunku (filogenezy) oraz w badaniu zmian dynamiki populacji poprzez przepływ genów i filogeografię. Dalsze doskonalenie technik wykorzystujących markery molekularne na poziomie DNA przyniesie w przyszłości wysoce wyspecjalizowane narzędzia badawcze, dzięki którym możliwe będą takie osiągnięcia, jak np. precyzyjna identyfikacja źródła pochodzenia pojedynczych osobników czy identyfikacja mieszańców wywodzących się z gatunków blisko spokrewnionych.

Praca została złożona 13.07.2005 r. i przyjęta przez Komitet Redakcyjny 24.08.2005 r.

MOLECULAR MARKERS (RAPD, SSR, PCR-RFLP AND STS) IN FOREST-TREE GENETICS, ENTOMOLOGY, PHYTOPATHOLOGY AND GAME MANAGEMENT

Summary

Modern population-genetics is founded on molecular markers detecting the DNA variation inside the genome. Based on PCR reaction, the molecular markers mainly reveal the complexity and polymorphism of the DNA structure at the nuclear, mitochondrial and chloroplast level. Among numerous genetic markers, the RAPD, SSR, PCR-RFLP and STS are commonly used in the genetic diversity assessment, the gene-pool conservation purposes and the biodiversity maintenance in forest ecosystems.

The RAPD markers detect the genomic polymorphism with low degree at the intra-population level and medium degree at the inter-population level. Based on one primer amplification in the whole genome, they are cheap and easy to perform. Nevertheless they are dominant and may display low repeatability among laboratories. Thus the RAPD markers are often used in preliminary investigations of genetic diversity within a species, followed more detailed studies.

The microsatellite markers (SSR) are the most relevant in assessment of the genetic diversity level within and among populations of a particular species. They are codominant, highly polymorphic and highly repeatable. The high cost of analysis, the homoplasy and the occurrence of "null" alleles are considered as the disadvantages of SSR analysis.

The PCR-RFLP and STS markers detect the polymorphism of the coding sequences of DNA with high precision. They are codominant, highly polymorphic and repeatable. Because of their uniparental way of inheritance, they constitute the best tool to study the kinship and the phylogeny among populations and species.

Modern forest-tree genetics, entomology, phytopathology and game management rely on the RAPD and SSR markers for the taxonomic identification of organisms (especially when the morphological features are difficult to measure), the identification of hybrids, the sex determination, the gene flow measurement and the genetic differentiation of species.

The PCR-RFLP and STS markers are mostly used to establish the postglacial migration routes of studied species and the kinship among individuals. These markers are very suitable to the study of population dynamic, especially in entomology and game management, via gene flow and phylogeography.

Numerous applications of RAPD, SSR, PCR-RFLP and STS markers in forest-tree genetics, entomology, phytopathology and zoology are reviewed and the examples are listed.

LITERATURA

- Althoff D. M., Thompson J. N. 2001: Geographic structure in the searching behaviour of a specialist parasitoid: combining molecular and behavioural approaches. *J. Evol. Biol.*, 14(3): 406-417.
- Barret C., Lefort F., Douglas G. C. 1997: Genetic characterization of oak seedlings, epicormic, crown and micropropagated shoots from mature trees by RAPD and microsatellite PCR. *Sc. Hort.*, 70: 319-330.
- Baumann R., Schubert R., Heitland W., Auger-Rozenberg M.-A., Faivre-Rimpant P., Müller-Starck G. 2003: Genetic diversity within and among populations of *Diprion pini* (Hym., Diprionidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. *J. Appl. Ent.*, 127(5): 258-264.
- Bowtell D. D. 1987: Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.*, 162: 463-465.
- Brown G. R., Bassoni D. L., Gill G. P., Fontana J. R., Wheeler N. C., Megraw R. A., Davis M. F., Sewell M. M., Tuskan G. A., Neale D. B. 2003: Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL verification and candidate gene mapping. *Genetics*, 164: 1537-1546.
- Burczyk J., Lewandowski A., Chałupka W. 2004: Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *For. Ecol. Manag.*, 197: 39-48.
- Carmichael L. E., Nagy J. A., Larter N. C., Strobeck C. 2001: Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Mol. Ecol.*, 10(12): 2787-2798.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T., Vendramin G. G., Garcia V., Frigerio J.-M., Echt C., Richardson T., Plomion C. 2004: Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 1204-1214.
- Chillali M., Wipf D., Guillaumin J.-J., Mohammed C., Botton B. 1998: Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. *New Phytol.*, 138(3): 553-561.
- Coetzee M. P. A., Wingfield B. D., Harrington T. C., Steimel J., Coutinho T. A., Wingfield M. J. 2001: The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers. *Mol. Ecol.*, 10(2): 387-396.
- Coleman M. 2000: Application of RAPDs to the critical taxonomy of the English endemic elm *Ulmus plotii* Druce. *Botan. J. Linn. Soc.*, 133: 241-262.
- Collignon A. M., Van de Sype H., Favre J. M. 2002: Geographical variation in random amplified polymorphic DNA and quantitative traits in Norway spruce. *Can. J. For. Res.*, 32: 266-282.
- Csaikl U. M., Glaz I., Baliuckas V., Petit R. J., Jensen J. S. 2002: Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland. *For. Ecol. Manag.*, 156: 211-222.
- Deforce D. L. D., Millecamps R. E. M., Van Hoofstat D., Van den Eeckhout E. G. 1998: Comparison of slab gel electrophoresis and capillary electrophoresis for the detection of the fluorescently labeled polymerase chain reaction products of short tandem repeat fragments. *J. Chromatogr. A.*, 806: 149-155.
- Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. 1983: A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 1: 19-21.
- Delmotte F., Leterme N., Simon J. C. 2001: Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique. *BioTechniques*, 31: 810-818.
- Demesure B., Sodzi N., Petit R. J. 1995: A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.*, 4: 129-131.
- De Merlier D., Chandelier A., Debruxelles N., Noldus M., Laurent F., Dufays E., Claessens H., Cavalier M. 2005: Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers for their specific detection. *J. Phytopath.*, 153(2): 99-107.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1990: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus*, 12: 13-15.
- Echenique-Diaz L. M., Yokoyama J., Kawata M., Abe S., Ishibashi Y. 2002: Isolation and characterization of microsatellite loci in the Bang's leaf-nosed bat *Hipposideros turpis*. *Mol. Ecol. Notes*, 2(4): 396-397.

- Ericsson G., Ekberg I. 2001: An introduction to forest genetics. SLU Repro, Uppsala, 2001. Sweden.
- Finkeldey R., Mátyás G. 2003: Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 346-352.
- Flagstad Ø., Walker C. W., Vilà C., Sundqvist A.-K., Fernholm B., Hufthammer A. K., Wiig Ø., Koyola I., Ellegren H. 2003: Two centuries of Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Mol. Ecol.*, 12(4): 869-880.
- Fleming M. A., Cook J. A. 2002: Phylogeography of endemic ermine (*Mustela erminea*) in southeast Alaska. *Mol. Ecol.*, 11(4): 795-807.
- Fiore-Donno A.-M., Martin F. 2001: Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytol.*, 152(3): 533-542.
- Frantz A. C., Pope L. C., Carpenter P. J., Roper T. J., Wilson G. J., Delahay R. J., Burke T. 2003: Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Mol. Ecol.*, 12(6): 1649-1661.
- Garnier S., Brouat C., Mondor-Genson G., Prieur B., Sennedot F., Rasplus J.-Y. 2002: Microsatellite DNA markers for two endemic ground beetles: *Carabus punctatoauratus* and *C. solieri*. *Mol. Ecol. Notes*, 2(4): 572-574.
- Gaviria Rivera A. M., Priest F. G. 2003: Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26(2): 254-261.
- Genomic DNA purification. Technical hints, applications, and protocols. 2002: www.qiagen.com.
- Gómez-Zurita J., Petitpierre E., Juan C. 2000: Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Mol. Ecol.*, 9(5): 557-570.
- Gosselin I., Shou Y., Bousquet J., Isabel N. 2002: Megagametophyte-derived linkage maps of white spruce (*Picea glauca*) based on RAPD, SCAR and ESTP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 987-997.
- Gout R., Nowakowska J. 2004: Application of gene-specific STS-makers for studies of population genetic polymorphism in conifers. *Naukovyj Wisnik*, 14(5): 45-53.
- Gugerli, F., Senn, J., Anzidei, M., Madaghiele, A., Büchler, U., Sperisen, C., Vendramin, G. G. 2001: Chloroplast microsatellites and mitochondrial nad1 intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*), and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*). *Mol. Ecol.*, 10: 1489-1497.
- Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. 1992: Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124
- Hardy O. J., Vekemans X. 2003: SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 618-620.
- Heinze B., Westcott R., Schmidt J., Glössl J. 1996: Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genetic variation in Norway spruce. *New Forests*, 11: 173-184.
- Heuertz M. 2003: Population genetics structure in common ash: a focus on southeastern European genetic resources. Free University of Brussels. Public research Centre - Gabriel Lippmann 2003.
- Hick M., Adams D., O'Keefe S., Macdonald E., Hodgetts R. 1998: The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*). *Genome*, 41: 797-805.
- Huitema E., Vleeshouwers V. G. A. A., Francis D. M., Kamoun S. 2003: Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.*, 4(6): 487-500.
- Ibrahim K. M., Yassin Y., Elgouzouli A. 2004: Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Mol. Ecol. Notes*, 4 (4): 653-655.
- Indury R. M., Cardon L. R. 1997: A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Res.*, 7: 1104-1109.
- International Human Genome Sequencing Consortium: initial sequencing and analysis of the human genome. 2001: *Nature*, 409: 860-921.

- Jany J.-L., Garbaye J., Martin F. 2002: *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytol.*, 154(3): 651-659.
- Jeandroz S., Frascaria-Lacoste N., Bousquet J. 1996: Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. *For. Gen.*, 3(4): 237-242.
- Jermstad K. D., Bassoni D. L., Jech K. S., Ritchie G. A., Wheeler N. C., Neale D. B. 2003: Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir: III. QTL by environment interactions. *Genetics*, 165: 1489-1506.
- Kazan K., Schenk P. M., Wilson I., Manners J. M. 2001: DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.*, 2(3): 177-185.
- Kerth G., Mayer F., Petit E. 2002: Extreme sex-biased dispersal in the communally breeding, nonmigratory Bechstein's bat (*Myotis bechsteinii*). *Mol. Ecol.*, 11(8): 1491-1498.
- King R. C., Stanfield W. D. 2002: Słownik terminów genetycznych. Przekł. zbiorowy pod red. W. Prus-Głowackiego. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań 2002.
- Klukowska J., Strabel T., Mackowski M., Switonski, M. 2003: Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *J. Animal Breeding and Genetics*, 120(2): 88-94.
- Konrad H., Kirisits T., Riegler M., Halmschlager E., Stauffer, C. 2002: Genetic evidence for natural hybridization between the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. *Plant Pathol.*, 51(1): 78-84.
- Langrell S. R. H., Lung-Escarmant B., Decroocq S. 2001: Isolation and characterization of polymorphic simple sequence repeat loci in *Armillaria ostoyae*. *Mol. Ecol. Notes*, 1(4): 305-307.
- Lefort F., Brachet, S., Frascaria-Lacoste, N., Edwards, K. J., Douglas, G. C. 1999: Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). *Mol. Ecol.*, 8: 1088-1090.
- Lefrancois J.-B., Lung-Escarmant B., Langrell S. R. H. 2002: Development of novel polymerase chain reaction (PCR) based microsatellite markers in *Armillaria gallica* by cross-species amplification and species-specific cloning. *Mol. Ecol. Notes*, 2(2): 182-184.
- Lexer C., Heinze, B., Gerber, S., Macalka-Kampfer, S., Steinkellner, H., Kremer, A., Glossl, J. 2000: Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pendunculate oak. II. Inferring the number of pollen donors from the offspring. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 858-865.
- Lewontin R. C. 1972: The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.*, 6: 381-398.
- Li Y.-C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002: Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11: 2453-2465.
- Lu M. Z., Szmidt A. E., Wang X. R. 1995: Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Hereditas*, 74: 582-589.
- Lucchini V., Galov A., Randi E. 2004: Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Mol. Ecol.*, 13(3): 523-536.
- Luque C., Legal L., Staudter H., Gers C., Wink M. 2002: ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, 136 (3): 251-253.
- Mackay I. M. 2004: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiol. and Infection*, 10(3): 190-212.
- Markussen T., Tusch A., Stephan B. R., Fladung M. 2004: Identification of molecular markers for selected wood properties of Norway spruce *Picea abies* L. (Karst.) I. Wood density. *Silvae Genetica*, 53(2): 45-50.
- Michaux J. R., Hardy O. J., Justy F., Fournier P., Kranz A., Cabria M., Davison A., Rosoux R., Libois R. 2005: Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the west European population. *Mol. Ecol.*, 14(8): 2373-2388.
- Miller L. J., Allsopp P. G., Graham G. C., Yeates D. K. 1999: Identification of morphologically similar canegrubs (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthini) using a molecular diagnostic technique. *Australian J. Entomol.*, 38 (3): 189-196.
- Mitton J. B., Kreiser B. R., Latta R. G. 2000: Glacial refugia of limber pine (*Pinus flexilis* James) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.*, 9: 91-97.

- Morand M.-E., Brachet S., Rossignol P., Dufour J., Frascaria-Lacoste N. 2002: A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Mol. Ecol.*, 11: 377-385.
- Nechwatal J., Schlenzig A., Jung T., Cooke D. E. L., Duncan J. M., Oßwald W. 2001: A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *For. Pathol.*, 31(2): 85-97.
- Nei M. 1987: Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nei M., Kumar S. 2000: Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press Inc., 231-264.
- Nkongolo K. K., Michael P., Gratton W. S. 2002: Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among Pine species. *Genome*, 45: 51-58.
- Nowakowska J. 2003a: Biotechnologia drzew leśnych. *Prace Inst. Bad. Leś.*, A, 3: 124-128.
- Nowakowska J. 2003b: Zróżnicowanie genetyczne wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz RAPD. *Sylvan*, 11: 26-37.
- Nowakowska J. 2004a: Genetic variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations at regional level revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Miskininkyste*, 2(56): 13-20.
- Nowakowska J. 2004b: Zmienność genetyczna świerka pospolitego w Polsce na podstawie markerów RAPD. *Notatnik Naukowy Inst. Bad. Leś.*, 7(67): 1-8.
- Nowakowska J. 2005: Microsatellite sequences in Scots pine as a new tool in forest-tree genetics. [W:] *Proceedings from International Workshop "Analysis of microsatellite sequences in Scots pine"*. Ed. J. Nowakowska, FRI, PROFOREST Centre of Excellence, Warsaw, 9-24.
- Nowakowska J., Bastien C., Musch B. 2005a: Genetic variability of Polish Scots pine provenances assessed with microsatellite markers. *Proceedings from International Workshop "Analysis of microsatellite sequences in Scots pine"* (ed. J. Nowakowska). FRI, PROFOREST Centre of Excellence, Warsaw, 79-88.
- Nowakowska J., Gout R., Verbovitska Y., Bieniek J. 2005b: Zróżnicowanie genetyczne wybranych pochodzeń sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z pogranicza polskiego i ukraińskiego na podstawie analizy mitochondrialnego DNA. *Leś. Pr. Bad.*, 2: 141-147.
- Nowakowska J., Jabłonowski S., Bieniek J., Mockeliunaite R. 2004: Comparison of genetic variability within and among Polish and Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) based on RAPD analysis. *Baltic Forestry*, 10(1): 57-64.
- Nowakowska J., Rakowski K. 2005: Charakterystyka zmienności genetycznej sosny napiwodzkoramuckiej i spalskiej na podstawie analiz mitochondrialnego DNA. *Leś. Pr. Bad.*, 2: 73-91.
- Oddou-Muratorio S., Houot M.-L., Demesure-Musch B., Austerlitz F. 2003: Pollen flow in the wild service tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Mol. Ecol.*, 12(12): 3427-3439.
- Oddou-Muratorio S., Petit R. J., Le Guerroué B., Guesnet D., Demesure B. 2001: Patterns of seed dispersal in a scattered forest tree (*Sorbus torminalis*) based on multi-scale investigation of population genetic structure for chloroplast DNA. [W:] *Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions* (ed. G. Müller-Starck and R. Scubert). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London: 271-280.
- Oszako T., Kozłowska A., Voitka D. 2005: Possibilities for using molecular biology techniques in the detection and identification of forest tree pathogens of the genus *Phytophthora*. *Proceedings from International Workshop "Analysis of microsatellite sequences in Scots pine"* (ed. J. Nowakowska). FRI, PROFOREST Centre of Excellence, Warsaw: 113-122.
- Palomares F., Godoy J. A., Piriz A., O'Brien S. J., Johnson W. E. 2002: Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.*, 11(10): 2171-2182.
- Pandey R. M., Adams R. P., Flournoy L. E. 1996: Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 14: 17.
- Pemberton J. M., Slate J., Bancroft D. R., Barrett J. A. 1995: Nonamplifying alleles at microsatellites loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.*, 4: 249-252.

- Pérez M. A., Gallego F. J., Martínez I., Hidalgo P. 2001: Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Appl. Microbiol.*, 33 (6): 461-466.
- Pérez T., Albornoz J., Domínguez A. 1998: An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.*, 7(10): 1347-1357.
- Perry D. J., Bousquet J. 2001: Genetic diversity and mating system of post-fire and post-harvest black spruce: an investigation using codominant sequence-tagged-site (STS) markers. *Can. J. For. Res.*, 31: 32-40.
- Petit R. J., Latouche-Hallé C., Pemonge M. H., Kremer A. 2002: Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *For. Ecol. Manag.*, 156: 115-129.
- Petit R. J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. 1997: Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9996-10001.
- Pipe N. D., Brasier C. M., Buck, K. W. 2000: Evolutionary relationships of the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi* to other *Ophiostoma* species investigated by restriction fragment length polymorphism analysis of the rDNA region. *J. Phytopath.*, 148(9-10): 533-539.
- Prasad M. D., Muthulakshmi M., Madhu M., Archak S., Mita K., Nagaraju J. 2005: Survey and analysis of microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetics*, 169: 197-214.
- Prus-Głowacki W., Modrzyński J. 2003: Zmienność izoenzymatyczna niektórych polskich populacji świerka [*Picea abies* (L.) Karst.] z doświadczenia proweniencyjnego IUFRO-1972. *Sylvan*, 3: 3-10.
- Rahman M. H., Rajora O. P. 2001: Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell Reports*, 20: 531-536.
- Rajora O. P., Rahman M. H. 2003: Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus* × *canadensis*) cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 470-477.
- Raymond M., Rousset F. 1995: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86: 248-249.
- Robledo-Arnuncio J. J., Smouse P. E., Gil L., Alía R. 2004: Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *For. Ecol. Manag.*, 197: 245-255.
- Rouleux-Bonnin F., Renault S., Bigot Y., Periquet G. 1996: Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae). *Eur. J. Biochem.* 238 (3): 752-759.
- Rousselet J., Magnoux E., Kerdelhué C. 2004: Characterization of five microsatellite loci in the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Notodontidae, Thaumetopoeinae). *Mol. Ecol. Notes*, 4(2): 213-214.
- Rudnick J. A., Katzner T. E., Bragin E. A., Rhodes O. E., Dewoody J. A. 2005: Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Mol. Ecol.* (w druku).
- Ruess E. K., Jorde P. E., Hellborg L., Stenseth N. C., Ellegren H., Jakobsen K. S. 2003: Cryptic population structure in a large, mobile mammalian predator: the Scandinavian lynx. *Mol. Ecol.*, 12(10): 2623-2633.
- Ruiz-García M. 2003: Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the northern Andean area. *Hereditas*, 138(2): 81-93.
- Rüppell O., Strätz M., Baier B., Heinze J. 2003: Mitochondrial markers in the ant *Leptothorax rugatulus* reveal the population genetic consequences of female philopatry at different hierarchical levels. *Mol. Ecol.*, 12 (3): 795-801.
- Saari S. K., Campbell C. D., Russell J., Alexander I. J., Anderson I. C. 2005: Pine microsatellite markers allow roots and ectomycorrhizas to be linked to individual trees. *New Phytol.*, 165(1), 295-304.

- Salgueiro P., Coelho M. M., Palmeirim J. M., Ruedi M. 2004: Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (*Nyctalus azoreum*). *Mol. Ecol.*, 13(11): 3357-3366.
- Salvato P., Battisti A., Concato S., Masutti L., Tomaso Patarnello T., Zane L. 2002: Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* – *wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.*, 11 (11): 2435-2444.
- Sambrook J., Russell D. W. 2001: Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA., Vol. 1 i 2.
- Santini A., Montagni A., Vendramin G. G., Capretti P. 2005: Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. *J. Phytopathol.*, 153(2): 73-79.
- Scheepers D., Eloy M. C., Briquet M. 1997: Use of RAPD patterns for clone verification and studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor. Appl. Genet.*, 94: 480-485.
- Schubert R., Bahnweg G., Nechwatal J., Jung T., Cooke D. E. L., Duncan J. M., Müller-Starck G., Langebartels C., Sandermann H., Oßwald W. 1999: Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Eur. J. For. Pathol.*, 29(3): 169-188.
- Schulmeister S. 2003: Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biol. J. Linn. Soc.*, 79 (2): 245-275.
- Skov E. 1998: Are RAPD-markers reproducible between different laboratories? A case study of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genetica*, 47(5-6): 283-287.
- Sinclair W. T., Morman J. D., Ennos R. A. 1998: Multiple origins for Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Scotland: evidence from mitochondrial DNA variation. *Heredity*, 80: 233-240.
- Sinclair W. T., Morman J. D., Ennos R. A. 1999: The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.*, 8: 83-88.
- Soranzo N., Alia 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. *Mol. Ecol.*, 9: 1205-1211.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998: Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.*, 7: 1260-1261.
- Stauffer C., Lakatos F., Hewitt G. M. 1999: Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Mol. Ecol.*, 8(5): 763-773.
- Storz J. F. 2000: Variation at tri- and tetranucleotide repeat microsatellite loci in the fruit bat genus *Cynopterus* (Chiroptera: Pteropodidae). *Mol. Ecol.*, 11(12): 2537-2551.
- Sundqvist A.-K., Ellegren H., Olivier M., Vilà C. 2001: Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 10(8): 1959-1966.
- Szyp-Borowska I. 2005: Mapowanie loci cech ilościowych jako nowe narzędzie w hodowli selekcyjnej drzew leśnych. *Leś. Pr. Bad.*, 2005/1: 99-107.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.-G., Cosson J.-F. 1998: Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.*, 7(4): 453-464.
- Troggio M., Kubisiak T. L., Bucci G., Menozzi P. 2001: Randomly amplified polymorphic DNA linkage relationships in different Norway spruce populations. *Can. J. For. Res.*, 31: 1456-1461.
- Touns S., Zouari N., Jaoua S. 2003: Cloning and study of the expression of a novel *cryIIa*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.*, 95(1): 23-28.
- Trewick S. A. 2000: Molecular evidence for dispersal rather than vicariance as the origin of flightless insect species on the Chatham Islands, New Zealand. *J. Biogeogr.*, 27(5): 1189-1200.
- Vainio E. J., Hantula, J. 1999: Variation of RAMS markers within the intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in Europe. *Eur. J. For. Pathol.*, 29(3): 231-246.
- Vandemark G. J., Barker B. M. 2003: Quantifying *Phytophthora medicaginis* in susceptible and resistant alfalfa with a real-time fluorescent PCR assay. *J. Phytopathol.*, 151(11-12): 577-583.
- Vendramin G. G., Anzidei M., Madaghiele A., Sperisen C., Bucci G. 2000: Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43: 68-78.

- Vilà C., Amorim I. R., Leonard J. A., Posada D., Castroviejo J., Petrucci-Fonseca F., Crandall K. A., Ellegren H., Wayne R. K. 1999: Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Mol. Ecol.*, 8(12): 2089-2103.
- Wang M., Schreiber A. 2001: The impact of habitat fragmentation and social structure on the population genetics of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Central Europe. *Heredity*, 86(6): 703-715.
- Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D. 1994: Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 1-6.
- Welsh J., McClelland M. 1990: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.*, 18: 7213-7218.
- Williams J. K. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalsky J. A., Tynges S. V. 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.*, 18: 6531-6535.
- Wright S. 1965: The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Wunsch, A., Hormaza, J. I. 2002: Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89: 56-63.
- Yazdani R., Yeh F. C., Rimsha J. 1995: Genomic mapping of *Pinus sylvestris* (L.) using random amplified polymorphic DNA markers. *For. Gen.*, 2 (2): 109-116.
- Yeh F. C., Boyle T. J. B. 1997: Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian J. Bot.*, 129: 157.
- Zane L., Bargelloni L. Patarnello T. 2002: Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.*, 11: 1-16.
- Zhang D. X., Hewitt G. M. 2003: Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.*, 12: 563-584.
- Zhou Z., Miwa M., Hogetsu T. 2001: Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations. *New Phytol.*, 149(2): 339-348.