

¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, e-mail: katarzyna.kruk@up.lublin.pl

² Katedra Melioracji i Kształtowania Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. S. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

KATARZYNA KRUK¹, MAGDALENA ZAPALSKA¹,
TADEUSZ WĘGOREK², KRZYSZTOF KOWALCZYK¹

Ocena zróżnicowania genetycznego dwóch populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z okolic Puław

Genetic diversity assessment of two Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations
from Puławy area

Streszczenie. W niniejszej pracy do oceny zróżnicowania dwóch populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z okolic Zakładów Azotowych w Puławach i Żyrzyna wykorzystano 13 startów RAPD. Uzyskano 137 produktów amplifikacji, z czego tylko 4 były monomorficzne w obydwu grupach roślin. Dla każdej z populacji oznaczono produkty charakterystyczne tylko dla niej, niepowielane w drugiej populacji. Różnorodność genetyczna (h) wynosiła 0,1718 (Azoty) i 0,1942 (Żyrzyn), natomiast średni poziom heterozygotyczności $H_S = 0,1830$. Ponieważ zróżnicowanie skupione było głównie wewnątrz populacji i H_S stanowiło 95,6% ogólnej heterozygotyczności, obie populacje pod względem genetycznym były do siebie bardzo podobne a różnorodność między nimi wynosiła $H_T - H_S = 0,0088$. Taki stan rzeczy wytłumaczyć można niewielką odległością, jaka dzieliła obie populacje (ok. 7 km), co sprzyja wymianie pyłku między nimi.

Słowa kluczowe: sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.), zróżnicowanie genetyczne, RAPD

WSTĘP

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) jest najbardziej rozpowszechnionym drzewem iglastym na terenie Europy i Azji. Wykazuje duże zdolności adaptacyjne do warunków środowiskowych. Cechuje się niewielkimi wymaganiami glebowymi, szybkim wzrostem i dobrą jakością drewna [Li i in. 2005, Naydenov i in. 2005]. Zasięg występowania tego gatunku rozciąga się od 10°W (Hiszpania) do 150°E (Syberia) oraz od 37°N (Turcja) do 70°N (Skandynawia) [Agee 2000, Repo i in. 2001]. Występuje na obszarach położonych na wysokościach od poziomu morza do 2500 m n.p.m. [Labra i in. 2006].

Ze względu na szeroki zasięg występowania gatunek ten podlega działaniu różnych warunków środowiskowych, co sprzyja dużej zmienności wewnątrzgatunkowej (tworzenie lokalnych ekotypów). Występujące formy różnią się cechami morfologicznymi i właściwościami fizjologicznymi [Lewandowski i in. 2000, Sabor 2006, Hawryś i in. 2008, Sevik i in. 2010].

W Polsce sosna zwyczajna jest gatunkiem dominującym w większości drzewostanów na terenach nizinnych i wyżynnych. Jedynie na obszarach górskich gatunkami panującymi są świerk (zachód) oraz świerk z bukiem (wschód). *P. sylvestris* jest głównym gatunkiem lasotwórczym i użytkowym w kraju, cennym pod względem walorów krajobrazowych i ekologicznych. Jej udział w strukturze gatunkowej lasów polskich wynosi 60,4% (62,2% w lasach PGL LP i 57,7% w lasach prywatnych) [Nowakowska 2003, Dobrowolska 2010, Raport o stanie lasów w Polsce 2010, Szypl-Borowska i in. 2011].

W przeciągu ostatnich stuleci nasilająca się ingerencja człowieka doprowadziła do znacznych zmian w składzie gatunkowym i strukturze lasów w Polsce, takich jak ujednoczenie gatunkowe i wiekowe drzewostanów czy obniżenie różnorodności genetycznej lasów [Nowakowska 2003, Matras 2006].

Zmienność genetyczna to jedna z najważniejszych cech charakteryzujących każdą populację. Różnorodność genetyczna jest podstawą zachowania zdolności adaptacyjnych populacji do zmiennych warunków środowiskowych. Umożliwia zachowanie stabilności i trwałości ekosystemu leśnego przy zmieniających się warunkach klimatycznych i występowaniu stresów środowiskowych. Niski stopień zróżnicowania genetycznego prowadzi zazwyczaj do wzrostu poziomu wsobności i obniżenia zdolności adaptacyjnej populacji [Matras 2006, Nowakowska i in. 2007, Freeland 2008, Sevik i in. 2010].

Początkowo do oceny zróżnicowania populacji drzew leśnych używano markerów morfologicznych (np. kształt blaszki liściowej, zawartość barwników w plastydach) oraz markerów biochemicznych (izoenzymy, fenole, terpeny). Dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej umożliwił dokładną analizę zróżnicowania genetycznego populacji na poziomie DNA jądrowego (nDNA), chloroplastowego (cpDNA) oraz mitochondrialnego (mtDNA) [Wagner 1992, Nowakowska 2003, Nowakowska 2006, Wang i Gao 2009, Lučić i in. 2010]. Spośród markerów molekularnych używanych do oceny zmienności populacji drzew leśnych stosowano markery RAPD [Nowakowska 2003, Wang i Gao 2009, Lučić i in. 2011], RFLP [Nowakowska i in. 2007], AFLP [Lerceteau i Szmidt 1999, Kim i in. 2010], SSR [Naydenov i in. 2005, Scalfi i in. 2009] oraz ISSR [Labra i in. 2006, Wang i Hao 2010].

Technika RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) opracowana przez Williamsa i in. (1990) umożliwia szybką detekcję polimorfizmu DNA w całym genomie. W metodzie tej reakcja amplifikacji prowadzona jest z użyciem jednego startera o arbitralnej (losowo dobranej) sekwencji, najczęściej o długości 9–10 nukleotydów. Analiza losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD) jest powszechnie stosowana w badaniu zróżnicowania genetycznego między osobnikami i populacjami wielu gatunków roślin. Technika ta charakteryzuje się stosunkowo niskim kosztem analiz, nieskomplikowaną procedurą oznaczeń oraz niewielką ilością wymaganego DNA matrycowego. Ujemną stroną metody jest generowanie markerów dominujących, uniemożliwiających rozróżnianie homozygot dominujących od heterozygot, a także duża wrażliwość na zmianę warunków amplifikacji [Nowakowska 2006, Wang i Gao 2009, Szypl-Borowska i in. 2011].

Celem badań było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego wewnątrz- i międzypopulacyjnego oraz analiza podobieństwa genetycznego dla dwóch populacji sosny zwyczajnej z terenów Lubelszczyzny przy użyciu metody RAPD.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Analizowano dwie populacje sosny zwyczajnej zlokalizowane odpowiednio w okolicy Żyrzyna – populacja Żyrzyn (Nadleśnictwo Puławy, 36 drzew) oraz na terenach Zakładów Azotowych „Puławy” SA – populacja Azoty (zalesienia rekultywacyjne, 31 drzew). Populacje były od siebie oddalone o 7 km. Materiał badawczy stanowiły młode igły zebrane z losowo wybranych drzew oddalonych od siebie o około 50 m. Do czasu analiz próby przechowywano w temperaturze -80°C .

Izolacja DNA

Izolację DNA genomowego z pobranych prób przeprowadzono zmodyfikowaną metodą CTAB wg Porebski i in. [1997]. Oceny jakościowej i ilościowej otrzymanego DNA dokonano przez rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym w buforze $1\times\text{TBE}$. DNA doprowadzono do stężenia $20\text{ ng}/\mu\text{l}$.

Amplifikacja DNA metodą RAPD

Reakcje przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Williamsa i in. [1990]. Spośród wstępnie testowanych 30 starterów wyselekcjonowano 13 (C04, D07, E18, F09, F12, G06, H15, I18, K14, W04, W08, X03, Y02; Operon Technologies, Alameda, California, USA), które generowały polimorficzne i powtarzalne produkty. W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości $15\ \mu\text{l}$ wchodziły: $1\times$ bufor do PCR ($10\text{ mM Tris pH } 8,8$; 50 mM KCl ; $0,08\%$ Nonidet P40) (Fermentas, Litwa); $100\ \mu\text{M}$ każdego dNTP; 300 nM startera; $2,5\text{ mM MgCl}_2$; 60 ng genomowego DNA; $0,5\text{ U Taq DNA Polymerase}$ (Fermentas, Litwa). Reakcje amplifikacji prowadzono w termocyklerze Thermocycler Biometra[®] w dwóch powtórzeniach dla każdego genotypu. Jednocześnie przeprowadzono reakcję kontrolną bez matrycy DNA. Stosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 2 min w 95°C ; 45 cykli: $94^{\circ}\text{C} - 45\text{ s}$, $37^{\circ}\text{C} - 45\text{ s}$, $72^{\circ}\text{C} - 45\text{ s}$; końcowa inkubacja $72^{\circ}\text{C} - 10\text{ min}$. Uzyskane produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze $1\times\text{TBE}$. Po podświetleniu lampą UV na transiluminatorze żel fotografowano i archiwizowano, wykorzystując system dokumentacji Syngene.

Analiza statystyczna

Do oceny zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego zastosowano program POPGENE wersja 1.31 [Yeh i in. 1999]. Dla każdej populacji określono liczbę i procent *loci* polimorficznych oraz różnorodność genetyczną (h) [Nei 1973] każdej z nich. Zróżnicowanie pomiędzy populacjami określono za pomocą statystyki F, wyliczając najpierw średnią heterozygotyczność oczekiwaną w populacji (H_S) i heterozygotyczność oczekiwaną w obydwu populacjach (H_T). W przypadku metody RAPD w *locus* mogą znajdować

wać się tylko dwa allele (1 lub 0), dlatego do oceny zróżnicowania genetycznego między populacjami wyznaczono współczynnik G_{ST} [Nei 1973]. Na podstawie zróżnicowania genetycznego populacji wyliczono współczynnik przepływu genów (Nm). Dystans (D) oraz podobieństwo genetyczne (I) określono za pomocą metody Nei [1972].

Matryce podobieństwa SI pomiędzy parami form w obrębie populacji Żyrzyn i Azoty szacowane zgodnie z formułą Dice'a [Nei i Li 1979] posłużyły do konstrukcji dendrogramów metodą UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) za pomocą programu NTSYS-pc [Rohlf 2001].

WYNIKI

W badaniach dwóch populacji sosny zwyczajnej z terenów Lubelszczyzny za pomocą 13 starterów RAPD uzyskano łącznie 137 produktów o wielkości od 290 do 1700 pz (tab. 1). Liczba fragmentów DNA amplifikowanych w obecności pojedynczego startera wahała się od pięciu (F09 i H15) do 18 (C04). Średnio na starter przypadało 10,52 produktu. Spośród wszystkich uzyskanych amplikonów 132 były polimorficzne, co stanowiło 96,4%.

Rozpatrując każdą z populacji oddzielnie, oznaczono 14 fragmentów DNA specyficznych tylko dla populacji Żyrzyn i 8 powielanych tylko w obrębie populacji Azoty (tab. 2). Niektóre z amplikonów, polimorficzne w całej próbie, na gruncie pojedynczej populacji były monomorficzne, co nieznacznie zmniejszyło odsetek produktów zróżnicowanych w obrębie każdego ze stanowisk. W przypadku populacji sosny z Żyrzyna uzyskano łącznie 129 produktów, z czego 122 były polimorficzne i stanowiły 94,6%. Fragmentów DNA generowanych w obrębie populacji Azoty było nieco mniej (123), jednak ze względu na mniejszy udział produktów niezróżnicowanych polimorfizm wynosił 95,1%.

Dla każdego startera w obrębie populacji oznaczono również liczbę wzorów prążkowych. Spodziewano się, że startery generujące więcej produktów będą się też charakteryzowały większą liczbą profili. Niemożliwe było jednak odróżnienie wszystkich analizowanych osobników za pomocą profili uzyskanych w wyniku amplifikacji przy użyciu pojedynczego startera. Największą liczbę wzorów prążkowych uzyskano dla startera C04, uczestniczył on także w powieleniu największej liczby produktów. Na uwagę zasługuje starter F12, ponieważ 11 uzyskanych w jego obecności fragmentów DNA utworzyło 30 wzorów w obrębie populacji Żyrzyn. Najmniej profili uzyskano dla starterów F09, H15 oraz I18.

Różnorodność genowa (h , heterozygotyczność oczekiwana) dla populacji Żyrzyn wahała się od 0,00 (w przypadku braku produktu w populacji) do 0,50, natomiast dla populacji Azoty górna wartość tego współczynnika była nieco mniejsza: 0,49. Zróżnicowanie h dla każdej z populacji wynosiło odpowiednio 0,1942 i 0,1718, a średnia heterozygotyczność przypadająca na populację (H_S – zmienność wewnątrzpopulacyjna) wynosiła 0,1830. Heterozygotyczność wszystkich *loci* z obydwu populacji (H_T – zmienność całkowita) była zbliżona, osiągając wartość 0,1918. Obydwa parametry posłużyły do obliczenia rozkładu zróżnicowania wśród roślin zebranych z obydwu stanowisk. Zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne stanowiło 95,4% (H_S/H_T) całej heterozygotyczności. Różnorodność międzypopulacyjna, obliczona na podstawie wzoru $H_T - H_S$, miała wartość 0,0088.

Tabela 1. Charakterystyka produktów RAPD uzyskanych w wyniku badania sosny zwyczajnej (*P. sylvestris* L.) populacji Azotów i Żyrzyna
 Table 1. Characteristics of RAPD products obtained for analysis of Scots pine (*P. sylvestris* L.) of Azoty and Żyrzyn populations

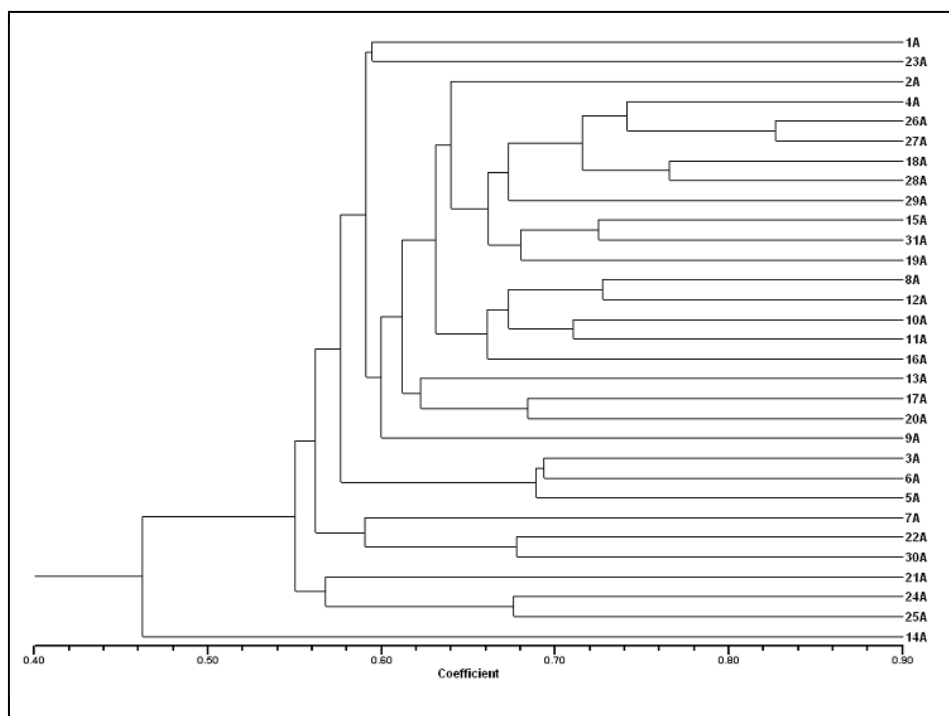
Starter	Liczba produktów Number of products			Liczba produktów polimorficznych Number of polymorphic products			% produktów polimorficznych Percentage of polymorphic products			Liczba profili produktów Number of products' profiles	
	Azoty	Żyrzyn	Azoty + Żyrzyn	Azoty	Żyrzyn	Azoty + Żyrzyn	Azoty	Żyrzyn	Azoty + Żyrzyn	Azoty	Żyrzyn
C04	16	18	18	16	18	18	100	100	100	28	33
D07	10	11	12	10	11	12	100	100	100	23	25
F12	11	11	13	11	11	13	100	100	100	22	30
E18	9	9	9	8	8	8	88,9	88,9	88,9	13	22
F09	5	5	5	4	4	4	80	80	80	7	8
G06	8	8	8	8	7	8	100	87,5	100	16	18
H15	5	5	5	5	4	5	100	80	100	9	7
K14	9	9	9	9	9	9	100	100	100	18	26
I18	7	8	8	6	7	7	85,7	87,5	87,5	7	14
W04	11	10	11	10	9	10	90,9	90	90,9	19	24
W08	9	11	12	9	11	12	100	100	100	11	18
X03	11	13	15	11	13	15	100	100	100	19	29
Y02	12	11	12	10	10	11	83,3	90,9	91,7	23	21
Razem/średnia Total/mean	123	129	137	117	122	132	95,1	94,6	96,4	-	-

Obliczony na podstawie obydwu współczynników heterozygotyczności współczynnik G_{ST} wynosił 0,0459, co potwierdza niewielkie zróżnicowanie pomiędzy analizowanymi populacjami (jego udział w ogólnym zróżnicowaniu genetycznym stanowił 4,6%). Duże podobieństwo genetyczne $I = 0,9785$ potwierdzone było również dużą wartością przepływu genów $N_m = 10,38$.

Tabela 2. Produkty RAPD specyficzne dla populacji Azoty i Żyrzyn
Table 2. RAPD products specific for Azoty and Żyrzyn populations

Populacja – Population	Produkty specyficzne – Specific products
Azoty	D07 ⁷⁰⁰ , F12 ¹¹⁰⁰ , F12 ⁶⁵⁰ , W04 ¹¹⁵⁰ , W08 ⁹⁵⁰ , X03 ¹²⁰⁰ , X03 ⁶⁸⁰ , Y02 ⁶⁵⁰
Żyrzyn	C04 ¹²⁰⁰ , C04 ¹⁰⁰⁰ , D07 ¹⁰⁵⁰ , D07 ⁸⁰⁰ , F12 ⁸⁵⁰ , F12 ⁶⁰⁰ , I18 ⁷²⁰ , W08 ⁹⁰⁰ , W08 ⁶⁰⁰ , W08 ⁴⁵⁰ , X03 ¹⁵⁰⁰ , X03 ¹³⁵⁰ , X03 ⁸⁰⁰ , X03 ⁶⁰⁰

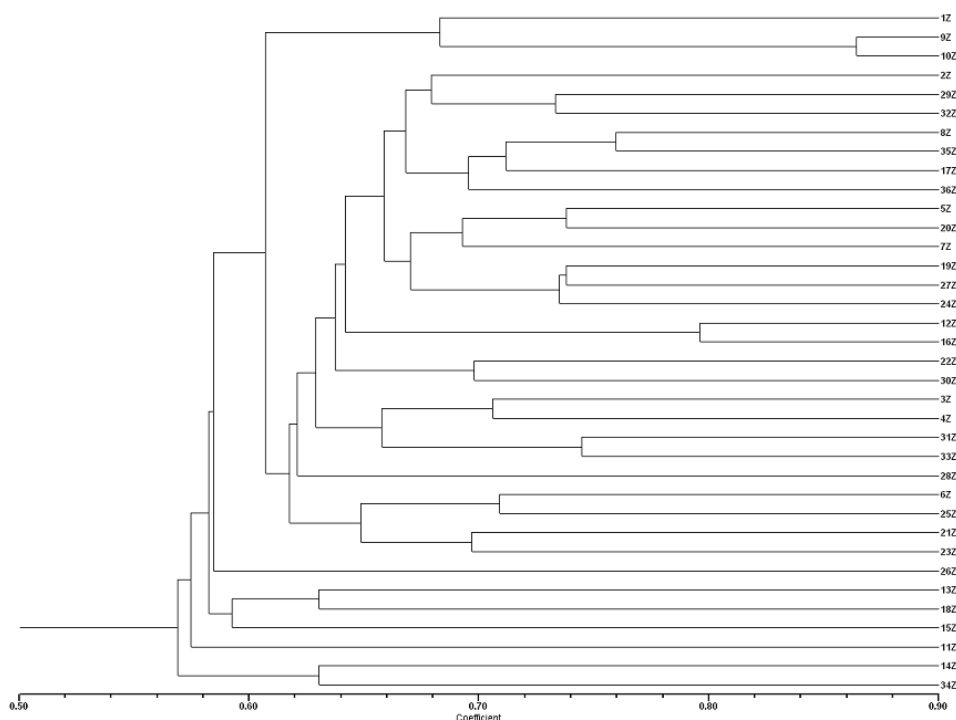
Na dendrogramie uzyskanym metodą UPGMA dla populacji Azoty (ryc. 1) wyróżniono grupę skupień obejmującą 21 osobników. W jej obrębie obiekty o numerach 1 i 23 charakteryzowały się najmniejszym podobieństwem. Pozostałe osobniki nie ulegały klasteryzacji, natomiast najbardziej odmienną rośliną spośród wszystkich w obrębie tej populacji był osobnik o numerze 14.



Ryc. 1. Dendrogram analizowanych osobników sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*) wchodzących w skład populacji Azoty uzyskany metodą UPGMA

Fig. 1. UPGMA dendrogram of Scots pine (*P. sylvestris*) individuals for Azoty population

W topologii dendrogramu obrazującego podobieństwo Dice'a w populacji Żyrzyn (ryc. 2) również oznaczono jedną grupę skupień, w skład której wchodziło 26 obiektów. Analogicznie do poprzedniej populacji, pozostałe osobniki nie tworzyły odrębnych skupień.



Ryc. 2. Dendrogram analizowanych osobników sosny zwyczajnej (*P. sylvestris*) wchodzących w skład populacji Żyrzyn uzyskany metodą UPGMA

Fig. 2. UPGMA dendrogram of Scots pine (*P. sylvestris*) individuals for Żyrzyn population

DYSKUSJA

Zróżnicowanie organizmów tworzących gatunek jest niezbędnym warunkiem zapewniającym mu równowagę, a w dłuższej perspektywie również przetrwanie. Nagły spadek liczebności populacji (dryf genetyczny), spowodowany np. zalaniem siedlisk w wyniku roztopów lub intensywnych opadów, oznacza również eliminację pewnych alleli, co powoduje zubożenie genetyczne. W takich populacjach zostaje zachwiana równowaga Hardy'ego-Weinberga, czego efektem jest niedobór heterozygot w porównaniu z wartościami oczekiwanymi. Jeśli zjawisko to dotyczy pojedynczej populacji cząstkowej, gatunek jako całość nie jest zagrożony, a sama populacja w wyniku np. napływu osobników może odzyskać równowagę. Jeśli jednak zjawisko dryfu genetycznego obejmuje cały gatunek, to utrata heterozygotyczności przy braku przepływu genów może doprowadzić do całkowitej zagłady tego gatunku. Z tego względu ocena zróżnicowania jest niezbędnym elementem w badaniach związanych z ochroną organizmów.

Stosowane powszechnie markery molekularne pozwalają obecnie na bezpośrednie porównywanie różnych osobników, co ułatwia bardziej jednoznaczną ocenę zróżnicowania populacji. Przed rozwojem tych technik różnorodność populacji szacowano na podstawie cech fenotypowych, które są podatne na wpływ czynników środowiska, a więc mogą ulegać zmianom podczas życia osobniczego. W przeciwieństwie do nich markery molekularne umożliwiają ocenę zmienności na poziomie białek, enzymów lub DNA, które nie podlegają presji selekcyjnej środowiska i są stałe w czasie, dzięki czemu można wyznaczyć rzeczywisty poziom zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego.

W niniejszej pracy porównywano zróżnicowanie genetyczne dwóch populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z terenów Lubelszczyzny za pomocą metody RAPD. Dość niskie wartości różnorodności wewnątrzpopulacyjnej (h) (Żyrzyn: 0,1942, Azoty: 0,1718) były zbliżone do wyników otrzymanych przez Nowakowską [2003], która badała zmienność 30 proveniencji sosny z całej Polski. Należy jednak podkreślić, że analizowane przez nią populacje z regionu południowo-wschodniego charakteryzowały się większym zróżnicowaniem genetycznym (0,180–0,232) w porównaniu z badaniami własnymi. Poziom heterozygotyczności sześciu populacji sosny chińskiej (*P. tabulaeformis* Carr.) określony za pomocą metody RAPD [Wang i Gao 2009] był nieznacznie wyższy w odniesieniu do wyników przedstawionych przez Nowakowską [2003]. Wang i Hao [2010] w pracy, w której do oceny zmienności 13 stanowisk sosny chińskiej zastosowali metodę ISSR, zanotowali wyższe wartości zróżnicowania genetycznego. Autorzy podkreślają jednak, że przyczyną tego może być m.in. większe zróżnicowanie *loci* mikrosatelitarnych. W przypadku analizy markerów dominujących zróżnicowanie genetyczne może maksymalnie przyjmować wartość 0,5 ze względu na fakt, iż w każdym *locus* mogą znajdować się tylko dwa allele, którym przypisuje się wartości 0 lub 1. Heterozygotyczność wewnątrzpopulacyjna określona przez Scalfi i in. [2009] na podstawie jądrowych i chloroplastowych sekwencji mikrosatelitarnych mieściła się w granicach od 0,74 do 0,95, co potwierdza tezę o dużej zmienności genetycznej sosny zwyczajnej [Kostia i in. 1995, Puglisi i Attolico 2000, Labra i in. 2006]. W świetle tych faktów należy uznać, że analizowane populacje sosny były zróżnicowane.

Całkowita zmienność obydwu populacji (H_T) w porównaniu z innymi badaniami [Žvingila i in. 2002, Nowakowska 2003, Wang i Gao 2009, Wang i Hao 2010] była znacznie niższa. Ponieważ heterozygotyczność przypadająca głównie na populacje, zróżnicowanie pomiędzy stanowiskami było niskie: $H_T - H_S = 0,0088$, co stanowiło jedynie 4,6% ogólnej heterozygotyczności ($G_{ST} = 0,046$). Niski poziom zróżnicowania międzypopulacyjnego jest normalnym zjawiskiem u sosny [Li i Gu 2003, Li i in. 2005]. Przyczyną tego jest wysoki poziom przepływu genów warunkowany przez zdolność pyłku do pokonywania dużych odległości, nawet 100–200 km [Heuertz 2003]. Mimo to, zróżnicowanie genetyczne obydwu populacji było niższe o rząd wielkości od przytaczanych wyników, co można wytłumaczyć niewielkim dystansem, jaki je dzielił. Nowakowska [2003] badała stanowiska sosny z terenu całej Polski, Scalfi i in. [2009] oceniali zróżnicowanie populacji z Alp i Apenin oddalonych o 180 km, natomiast Wang i Gao [2009] analizowali stanowiska sosny chińskiej, które dzielił dystans nawet 1400 km. Niewielkie zróżnicowanie międzypopulacyjne w warunkach badań własnych sprzężone było z wysokim poziomem przepływu genów $N_m = 10,38$, niespełna czterokrotnie wyższym niż oznaczyli Wang i Hao [2010] dla 13 populacji sosny chińskiej, rozciągniętych na dystansie ok. 2000 km.

WNIOSKI

1. Stanowiska sosny zwyczajnej z okolic Zakładów Azotowych w Puławach i Żyrzyna wykazały się zróżnicowaniem wewnątrzpopulacyjnym charakterystycznym dla gatunku.

2. Niski poziom zróżnicowania pomiędzy tymi populacjami można wytłumaczyć niewielką odległością, jaka je dzieliła, czego potwierdzeniem jest wysoki przepływ genów.

PIŚMIENNICTWO

- Agee J.K., 2000. Fire and pine ecosystems. W: Ecology and biogeography of *Pinus*, Richardson D. A. (red), Cambridge University Press, Cambridge, 202–205.
- Dobrowolska D., 2010. Warunki powstawania odnowień naturalnych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Tuszyma. Leś. Pr. Bad., 71(3), 217–224.
- Freeland J.R., 2008. Ekologia molekularna. PWN Warszawa, 59–70.
- Hawryś Z., Zwoliński J., Kwapis Z, Matuszczyk I., 2008. Rozwój różnych pochodzeń sosny zwyczajnej na pożarzysku w Nadleśnictwie Potrzebowice. Leś. Pr. Bad., 69(1), 57–65.
- 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, 17–30.
- Kim M.S., Richardson B.A., McDonald G.I., Klopfenstein N.B., 2010. Genetic diversity and structure of western white pine (*Pinus monticola*) in North America: a baseline study for conservation, restoration, and addressing impacts of climate change. Tree Genet. Genomes, 7, 11–21.
- Kostia S., Vario S.L., Vakkari P., Pulkkinen P., 1995. Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. Genome, 38, 1244–1248.
- Labra M., Grassi F., Sgorbati S., Ferrari C., 2006. Distribution of genetic variability in southern populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the Alps and Apennines. Flora, 201, 468–476.
- Lerceteau E., Szmidt A.E., 1999. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. Heredity, 82, 252–260.
- Lewandowski A., Boratyński A., Mejnartowicz L., 2000. Allozyme investigations on the genetic differentiation between closely related pines – *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata*, and *P. uliginosa* (Pinaceae). Plant Syst. Evol., 221, 15–24.
- Li B., Gu W., 2003. Review on genetic diversity in *Pinus* [J]. Hereditas, 25(6), 740–748.
- Li H., Jiang J., Liu G., Ma X., Dong J., Lin S., 2005. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. J. For. Res., 16(3), 216–218.
- Lučić A., Isajev V., Rakonjac L., Ristić D., Kostadinović M., Babić V., Nikolić A., 2011. Genetic divergence of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Serbia revealed by RAPD. Arch. Biol. Sci., 63(2), 371–380.
- Lučić A., Mladenović-Drinić S., Stravretović N., Isejev V., Lavadinović V., Rakonjac L., Novaković M., 2010. Genetic diversity of Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) populations in Serbia. Revealed by RAPD. Arch. Biol. Sci., 62(2), 329–336.
- Matras J., 2006. Ochrona leśnych zasobów genowych. W: Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych, Sabor J. (red), Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 573–577.

- Naydenov K. D., Tremblay F. M., Alexandrov A., Fenton N. J., 2005. Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 1226–1245.
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106, 283–291.
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3321–3323.
- Nei M., Li .H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 5269–5273.
- Nowakowska J., 2003. Zróżnicowanie genetyczne wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz RAPD. *Sylwan*, 11, 26–37.
- Nowakowska J. A., 2006. Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. *Leś. Pr. Bad.*, 1, 73–101.
- Nowakowska J. A., Oszako T., Bieniek J., Rakowski K., 2007. Charakterystyka genetyczna PCR-RFLP oraz ocena zdrowotności wybranych populacji dębu elbląskiego i krotoszyńskiego. *Leś. Pr. Bad.*, 3, 33–51.
- Porebski S., Grant Bailey L., Baum B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rept.*, 15(1), 8–15.
- Puglisi S., Attolico M., 2000. Allozyme variation in natural populations of the Italian range of *Pinus sylvestris* L. *For. Genet.*, 7, 221–232.
- Raport o stanie lasów w Polsce 2010. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 12–13.
- Repo T., Nilsson J-E., Rikala R., Ryyppö A., Sutinen M-L., 2001. Cold hardiness of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). W: *Conifer cold hardiness*, Bigras F. J., Colombo S. J. (red), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 463–464.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y.
- Sabor J., 2006. Zmienność wewnątrzgatunkowa drzew leśnych. Sosna zwyczajna i świerk pospolity. W: *Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych*, Sabor J. (red), Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 127–132.
- Scalfi M., Piotti A., Rossi M., Piovani P., 2009. Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *Eur. J. Forest Res.*, 128, 377–386.
- Sevik H., Ayan S., Turna I., Yahyaoglu Z., 2010. Genetic diversity among populations in Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) seed stands of Western Black Sea Region in Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, 9(43), 7266–7272.
- Szyp-Borowska I., Ukalska J., Simińska J., 2011. Markery RAPD sprzężone z genami cech ilościowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Leś. Pr. Bad.*, 72(3), 205–211.
- Wagner D.B., 1992. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests*, 6, 373–390.
- Wang M.B., Gao F-Q., 2009. Genetic variation in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*), a woody species endemic to China. *Biochem. Genet.*, 47, 154–164.
- Wang M.B., Hao Z.Z., 2010. Rangewide genetic diversity in natural populations of Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*). *Biochem. Genet.*, 48, 590–602.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531–6535.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T., 1999. Popgene, Version 1.31, University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Žvingila D., Verbylaitė R., Abraitis R., Kuusiene S., Ozolinčius R., 2002. Assessment of genetic diversity in plus tree clones of *Pinus sylvestris* L. using RAPD markers. *Baltic For.*, 8(2), 2–7.

Summary. In this paper genetic diversity among two Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations from the area of Zakłady Azotowe “Puławy” and a little town Żyrzyn was estimated. 13 RAPD primers were used to obtain 137 bands and only 4 of them were monomorphic. There were also DNA fragments specific only for one population and absent in another. Genetic diversity (h) within each population was 0.1718 (Azoty) and 0.1942 (Żyrzyn). The mean diversity H_S value was 0.1830. Genetic diversity was focused within populations and it accounted for 95.6% of total variability, which resulted in little diversity among populations of 0.0088. This can be explained by a small distance of about 7 km, which is connected with a high level of pollen exchange between populations.

Key words: Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), genetic diversity, RAPD