

Jan Chmiel

Tatrzański Park Narodowy
ul. Gładkie 10, 34–500 Zakopane
jchmiel@tpn.pl

Tomasz Milewski, Kornelia Polok

Katedra Genetyki, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
ul. Plac Łódzki 3, 10–967 Olsztyn
kpolok@moskit.uwm.edu.pl

Received: 22.04.2008

Reviewed: 26.06.2008

OCHRONA NATURALNEJ PULI GENOWEJ RODZIMEJ LIMBY *PINUS CEMBRA* L. Z TATR W ŚWIETLE BADAŃ MOLEKULARNYCH

Protection of native Swiss stone pine *Pinus cembra* L.
gene pool in the Tatras in the light of molecular studies

Abstract: Three marker systems, RAPD, ISJ and B–SAP were used to access genetic identity between five *P. cembra* populations from the Tatra Mountains. The data showed a common gene pool of Polish and Slovak populations further characterised by high genetic similarities ranging from 0.93 to 0.98. Moreover, the high value of Nei's similarity ($I = 0.99$) between the Swiss stone pine population introduced to the Kościeliska Valley in the XIX century and native populations excluded the possibility that the former is an alien element to the Tatra flora. A small population size of stone pine populations in the Tatras lied behind the very low level of DNA polymorphism in all analysed populations (14.5%). This resulted from negative anthropogenic impact in the past and replacing Swiss stone pines by spruce observed recently. High homogeneity of Swiss stone pine populations makes them prone to stresses and contributes significantly to the danger of extinction.

Key words: *Pinus cembra*, the Tatras, DNA markers, conservation biology.

Wstęp

Tatry są jedynym obszarem naturalnego występowania limby *Pinus cembra* L. w Polsce. W przeszłości na skutek intensywnego użytkowania jej drewna przez człowieka naturalny zasięg limby uległ w Tatrach znacznemu ograniczeniu do niewielkich stanowisk w trudno dostępnych rejonach górskich (Ryc. 1). Aby zapobiec hodowli wsobnej i utrzymać minimalną wielkość populacji zapewniającej przeżycie tego cennego gatunku, na przełomie XIX i XX wieku Towarzystwo Tatrzańskie



Ryc. 1. *P. cembra* w Tatrach.

Fig. 1. *P. cembra* in the Tatras.

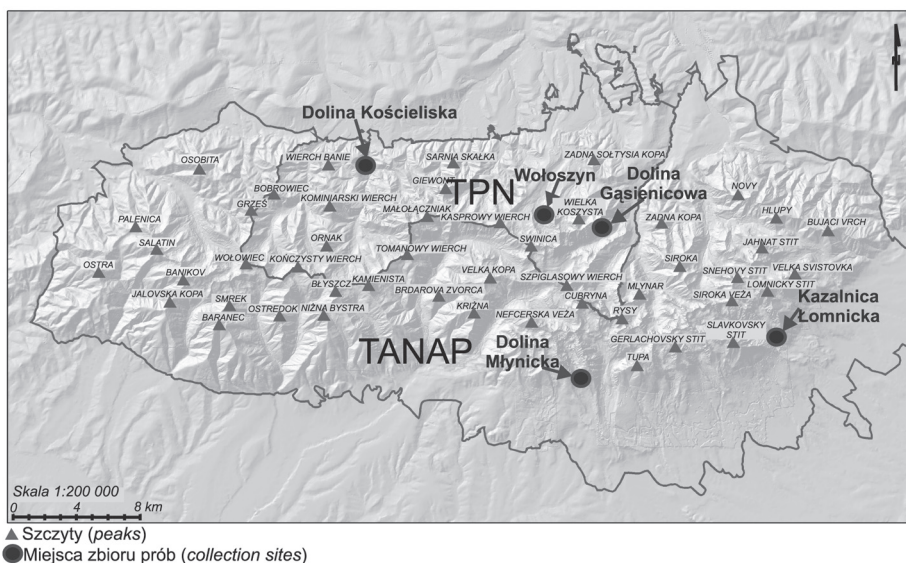
przeprowadziło niekontrolowaną akcję nasadzeń limbą obcego pochodzenia, prawdopodobnie syberyjską i alpejską, w różnych częściach obecnego Tatrzańskiego Parku Narodowego – TPN (Paryski 1971). Jednym z miejsc gdzie wysadzono limby niewiadomego pochodzenia była Świńska Turnia w Dolinie Kościeliskiej. Obecnie w rejonie tym na wysokości od 1050 do 1310 m n.p.m. rośnie około 700 obradzających już limb (Chmiel 1993). Podobne akcje wysiewania nasion i wysadzania limb niewiadomego pochodzenia po stronie słowackiej Tatr przeprowadziło Węgierskie Towarzystwo Karpackie w II połowie XIX w. Liczebność populacji limby wynosi w całych Tatrach około 12 tysięcy drzew, czyli proporcjonalnie do podawanych powierzchni, po polskiej stronie powinno rosnąć około 4 tysiące dorosłych drzew (Myczkowski, Bednarz 1974; Chmiel 1996).

Wzbogacenie zasobów genowych limby w jej tatrzańskiej ostoi jest jednym z najważniejszych zadań gospodarki rezerwatuowej od połowy lat siedemdziesiątych XX wieku. Z drugiej strony, współczesne strategie ochrony zalecają zapobieganie erozji zasobów genowych poprzez eliminowanie elementów obcych dla danej flory. Z tego punktu widzenia wprowadzona limba, poprzez hybrydyzację z populacją natywną, może prowadzić do erozji tej ostatniej. Metody analizy DNA w oparciu o reakcję łańcuchową polimerazy (ang. „Polymerase Chain Reaction”, PCR) stanowią jedno z najcenniejszych narzędzi pozwalających określić pochodzenie różnych populacji i ich historię. Ocena tzw. współczynnika podobieństwa genetycznego (I) w oparciu o wzory DNA pozwala określić na ile genomy badanych osobników czy populacji różnią się. Wysoka wartość I (0,9–1,0) jest charakterystyczna dla populacji jednego gatunku, podczas gdy gatunki biologiczne mają podobieństwo genetyczne poniżej 0,5. Populacje należące do jednego gatunku, ale o różnym pochodzeniu geograficznym, na ogół charakteryzują się niższym podobieństwem niż populacje z tego samego obszaru geograficznego lub o tym samym pochodzeniu. Ponadto, dla populacji o różnym pochodzeniu można znaleźć pewną liczbę różniących je markerów DNA (Zielinski, Polok 2005; Polok 2007).

Celem badań była ocena podobieństwa genetycznego pomiędzy natywną, tatrzańską populacją *Pinus cembra* z Hali Gąsienicowej (TPN), Wołoszyna (TPN), Kazalnicy Łomnickiej (TANAP) i Doliny Młynickiej (TANAP) oraz populacją tego gatunku o nieznanym pochodzeniu, introdukowaną w Dolinie Kościeliskiej Tatr Polskich. Uzyskane wyniki powinny odpowiedzieć na pytanie czy introdukowana w Dolinie Kościeliskiej limba jest faktycznie elementem obcym dla flory Tatr i czy w związku z tym stanowi realne zagrożenie dla populacji natywnych. Tym samym powinny one stać się podstawą odpowiednich decyzji administracyjnych w odniesieniu do ochrony puli genowej rodzimych populacji limby.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 65 drzew *Pinus cembra* zebranych z pięciu populacji występujących na terenie Tatr. Trzy z tych populacji występowały po stronie polskiej, a dwie po słowackiej stronie Tatr (Ryc. 2):



Ryc. 2. Miejsca zbioru prób *P. cembra* z Tatr.

Fig. 2. Collection sites of *P. cembra*.

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. Dolina Kościeliska | 30 drzew, <i>P. cembra</i> , introdukowana, Polska |
| 2. Wołoszyn | 11 drzew, <i>P. cembra</i> , rodzima, Polska |
| 3. Dolina Gąsienicowa | 10 drzew, <i>P. cembra</i> , rodzima, Polska |
| 4. Dolina Młynicka | 10 drzew, <i>P. cembra</i> , Słowacja |
| 5. Kazalnica Łomnicka | 4 drzewa, <i>P. cembra</i> , Słowacja. |

W celu oceny podobieństwa genetycznego zastosowano markery skanujące genom typu RAPD (ang. „Random Amplified Polymorphic DNA”) wykorzystujące pojedynczy 10-nukleotydowy starter o przypadkowo dobranej sekwencji oraz markery ISJ (ang. „Intron Splice Junction” markers), wykorzystujące startery komplementarne do styków egzon-intron (Weining, Langridge 1991; Polok 2007). Ponadto zastosowano nowy system markerowy oparty na konserwatywnych sekwencjach bakteryjnych, B-SAP (ang. „Bacteria Specific Amplification Polymorphism”), w tym markery B-SAP/katG, amplifikowane za pomocą starterów komplementarnych do sekwencji genu bakteryjnego katalazy-peroksydazy (*KatG*) oraz B-SAP/IS, amplifikowane za pomocą starterów komplementarnych do bakteryjnej sekwencji insercyjnej IS6110 (Polok 2007). Markery B-SAP okazały się wysoce efektywne w rozróżnianiu gatunków traw z rodziny *Poaceae* (Polok 2005; 2007), gatunków z rodzaju *Polygonatum* (Szczecińska i in. 2006), blisko spokrewnionych gatunków sosen *P. sylvestris* i *P. mugo* (Polok i in. 2006), a także gatunków wątrobowców z rodzaju *Pellia* (Zielinski, Polok 2005) i *Aneura* (Bączkiewicz i in. 2008). Ze względu na niski polimorfizm wewnątrzgatunkowy przy jednoznacznie różnych wzorach uzyskiwanych dla gatunków biologicznych markery te wydają się być szczególnie przydatne do odpowiedzi na pytanie, czy limba w Dolinie Kościeliskiej jest tym samym gatunkiem, co limba rodzima.

Izolację DNA przeprowadzono metodą CTAB z modyfikacjami (Polok 2007). DNA izolowano z około 1,5 g igieł. Przed izolacją igły dokładnie oczyszczono i sterylizowano powierzchniowo 70% etanolem. Pocięte igły ucierano w ciekłym azocie z dodatkiem piasku kwarcowego aż do uzyskania jednorodnego proszku. Otrzymany proszek umieszczono w 10 ml probówkach z 2 ml buforu izolacyjnego podgrzanego do temperatury 60°C. Do każdej z probówek dodano 330 µl 30% sarkosylu, 1 ml 10% PVP i 1 ml 20% CTAB. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 60°C przez 2 godziny, mieszając przez inwersję co 15 minut. Po tym czasie DNA ekstrahowano trzykrotnie przy pomocy mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego w stosunku 24:1. Kwasy nukleinowe dodatkowo oczyszczano 1M CsCl, RNA usuwano za pomocą RNA-azy. Zawartość DNA w próbach wynosiła od 25 do 58 µg, a jego czystość mieściła się w przedziale od 89% do 97%.

Analizę markerów RAPD, ISJ i B-SAP przeprowadzono według metodyki opisanej przez Polok (2007). Wszystkie reakcje przeprowadzono w 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Stężenia poszczególnych składników i warunki termiczne reakcji podano w tabeli 1, natomiast sekwencje starterów w tabeli 2. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1 x TBE (Tris-Borate-EDTA) przy

Tabela 1. Warunki reakcji PCR dla markerów DNA zastosowanych w analizie *P. cembra* z Tatr.**Table 1.** PCR conditions for DNA markers used in analyses of *P. cembra* from the Tatras.

Składnik <i>Reagent</i>	Stężenie <i>Concentration</i>			
	RAPD	ISJ	B-SAP/katG	B-SAP/IS
20 x bufor PCR <i>20 x PCR buffer:</i> 200 mM (NH ₄)SO ₄ 1 M Tris-HCl, pH 9.0	1 x	1 x	1 x	1 x
MgCl ₂	2 mM	2 mM	1,5 mM	1,5 mM
10 x wzmacniacz <i>10 x Enhancer</i> containing betaine	2 x	2 x	1 x	1 x
Nukleotydy <i>Nucleotides (dNTPs)</i> (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
Startery <i>Primers</i>	0,3 µM	0,4 µM	1 µM	1 µM
Polimeraza TFL <i>TFL polymerase</i> (Epicentre Technology)	1 U	1 U	0,75 U	0,75 U
DNA	80 ng	80 ng	100 ng	100 ng
	Warunki termiczne reakcji <i>Thermal conditions</i>			
Wstępna denaturacja <i>Initial denaturation</i>	94°C 3 min.	94°C 3 min.	94°C 3 min.	94°C 3 min.
Liczba cykli <i>Number of cycles</i>	46	46	30	40
Denaturacja <i>Denaturation</i>	94°C 1 min.	94°C 1 min.	94°C 1 min.	94°C 1 min.
Przyłączanie starterów <i>Annealing</i>	36°C 1 min.	36°C, 48°C ¹ 1 min.	50°C	52°C
Wydłużanie <i>Elongation</i>	72°C 2,5 min.	72°C 2,5 min.	72°C 1 min.	72°C 1,5 min.
Końcowe wydłużanie <i>Final elongation</i>	72°C 5 min.	72°C 5 min.	72°C 5 min.	72°C 5 min.

¹36°C dla starterów 10-nukleotydowych, 48°C dla starterów 18-nukleotydowych / 36°C for 10-nucleotide primers, 48°C for 18-nucleotide primers

Tabela 2. Startery wykorzystane w analizie *P. cembra* z Tatr.**Table 2.** Primers used in analyses of *P. cembra* from the Tatras.

Typ markera <i>Marker type</i>	Nazwa startera <i>Primer name</i>	Sekwencja (5'→3') <i>Sequence (5'→3')</i>
RAPD	OPD03	GTC GCC GTC A
	OPD05	TGA GCG GAC A
	OPD06	ACC TGA ACG G
	OPD13	GGG GTG ACG A
ISJ	ISJ2	ACT TAC CTG AGG CGC CAC
	ISJ3	TGC AGG TCA G
	ISJ4	GTC GGC GGA CAG GTA AGT
B-SAP/katG	katG8-F	GTC ACT GAC CTC TCG CTG
	katG8-R	CGC CCA TGC GGT CGA AAC
	katG9-F	GCG AAG CAG ATT GCC AGC C
	katG9-R	ACA GCC ACC GAG CAC GAC
B-SAP/IS	IS-F	ACC CCA TCC TTT CCA AGA AC
	IS-R	GGC TGA GGT CTC AGA TCA G

stałym napięciu 100 V. Elektroforezę prowadzono przez 90 minut. Produkty reakcji wybarwiano bromkiem etydydy dodawanym do żelu w stężeniu 0,5 µg/ml, uwidaczniło w świetle UV (312 nm), fotografowano i archiwizowano jako pliki jpg. Żele odczytywano komputerowo przy pomocy programu Corel Photo-Paint 12. Ze względu na potwierdzony we wcześniejszych badaniach (Polok 2007) dominujący sposób dziedziczenia zastosowanych markerów, wszystkie prążki, które można było jednoznacznie odczytać, określano jako loci i oznaczano jako 1 w przypadku obecności prążka i jako 0 przy jego braku. Poszczególne loci (prążki) oznaczano symbolem startera i numerem prążka w kolejności wzrastającej licząc od anody. I tak katG8-2 oznacza locus ujawniony przez parę starterów katG8 i widoczny jako drugi prążek licząc od anody.

Podobieństwo genetyczne (I) obliczono na podstawie liczby wspólnych prążków według Nei i Li (1979) z modyfikacjami dla danych typu RAPD (Clark, Lanigan 1993). Dendrogramy skonstruowano wykorzystując grupowanie przy pomocy metody średnich nieważonych (UPGMA) oraz odległości Euklidesowej. Ponadto uzyskane macierze podobieństwa genetycznego pomiędzy populacjami wykorzystano w analizie składowych głównych oraz w skalowaniu wielowymiarowym. Obliczenia przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA 7.1.

Wyniki

Polimorfizm DNA w populacjach tatrzańskich *P. cembra*

Wykorzystanie trzech różnych systemów markerowych pozwoliło na ujawnienie 62 loci, przy czym najwięcej loci (28) zidentyfikowano za pomocą markerów RAPD (Tab. 3). Najmniej loci (14) zidentyfikowano przy pomocy metody

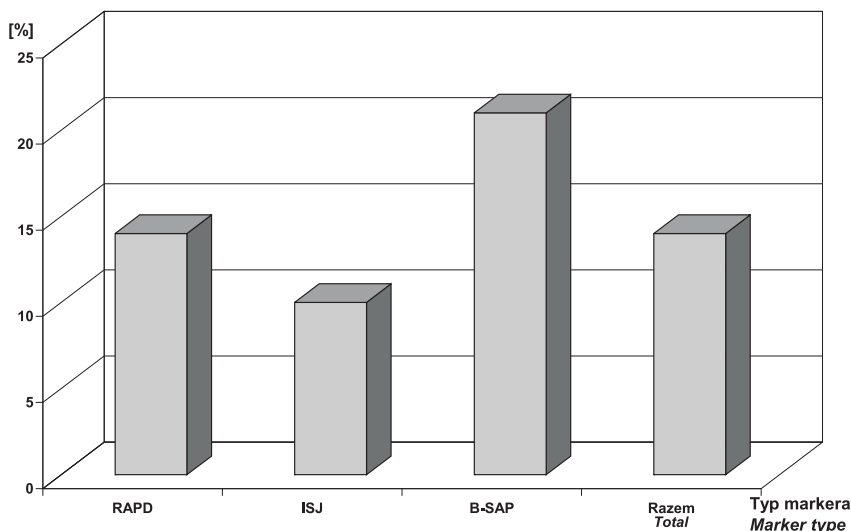
Tabela 3. Efektywność markerów DNA zastosowanych u *P. cembra*.

Table 3. Efficiency of DNA markers applied in *P. cembra*.

Typ markera Marker type	Liczba loci N° of loci	Średnia liczba loci na starter Mean N° of loci per a primer	Liczba loci polimorficznych N° of polymorphic loci	Średnia liczba loci polimorficznych na starter N° of polymorphic loci per a primer
RAPD	28	7,0	4	1,0
ISJ	20	6,7	2	0,7
B-SAP	14	4,7	3	1,0
Razem Total	62	6,2	9	0,9

B-SAP, wykorzystującej startery komplementarne do sekwencji bakteryjnych, przy czym 9 loci ujawniono za pomocą starterów komplementarnych do bakteryjnego genu kodującego katalazę-peroksydazę (markery B-SAP/katG), podczas gdy startery komplementarne do sekwencji insercyjnej IS6110 ujawniły 5 loci (markery B-SAP/IS). Markery skanujące genom typu RAPD i ISJ ujawniały taką samą liczbę loci na starter, natomiast nieco niższa była liczba prążków obserwowanych w metodzie B-SAP. Liczba polimorficznych loci była zbliżona dla każdego typu markera. Niespodziewanie, procent loci polimorficznych był najwyższy dla z zasady konserwatywnych markerów B-SAP (Ryc. 3), co mogło być wynikiem bardzo małej liczby prążków wykazujących polimorfizm w badanych populacjach (od 2 do 4).

Populacje *P. cembra* ze słowackiej i polskiej części Tatr były prawie identyczne pod względem liczby ujawnionych loci, zarówno przez poszczególne typy markerów jak i łącznie (Tab. 4). Poziom polimorfizmu obserwowany u limby był stosunkowo niski i wynosił 14,5% (Ryc. 3). Niższy polimorfizm w populacjach słowackich (Tab. 5) wynikał z jednorodnych wzorów DNA ujawnionych za pomocą markerów ISJ we wszystkich próbach oraz z niższego o 50% polimorfizmu stwierdzonego przy pomocy markerów B-SAP. Częściowo mogło to być związane ze znacznie mniejszą liczbą drzew zebranych z populacji słowackich niż polskich. Poszczególne populacje polskie różniły się między sobą pojedynczymi prążkami,



Ryc. 3. Procent polimorficznych loci ujawnionych u *P. cembra* za pomocą różnych kategorii markerów.

Fig. 3. Percent of polymorphic loci identified in *P. cembra* by different marker types.

Tabela 4. Liczba loci zidentyfikowanych u *P. cembra*.

Table 4. Number of identified loci in *P. cembra* populations.

Populacja <i>Population</i>	Liczba zidentyfikowanych loci <i>Number of identified loci</i>			
	RAPD	ISJ	B-SAP	Razem <i>Total</i>
Dolina Młynicka Słowacja (<i>Slovakia</i>)	27	20	13	60
Kazalnica Łomnicka Słowacja (<i>Slovakia</i>)	24	20	12	56
Słowacja (<i>Slovakia</i>)	27	20	13	60
Wołoszyn Polska (Poland)	28	20	12	60
Dolina Kościeliska ¹ Polska (Poland)	27	20	13	60
Dolina Gąsienicowa Polska (Poland)	27	18	13	58
Polska (<i>Poland</i>)	28	20	13	61

¹Populacja introdukowana / *introduced population*

co dało 13% polimorficznych loci uwzględniając wszystkie populacje łącznie. Poziom polimorfizmu wewnątrz populacji był znacznie niższy i wynosił od 3–5%.

Tabela 5. Polimorfizm w populacjach *P. cembra*.

Table 5. Polymorphism in *P. cembra* populations.

Populacja <i>Population</i>	Liczba loci polimorficznych <i>Number of polymorphic loci</i> [n]				Procent loci polimorficznych <i>Percent of polymorphic loci</i> [%]			
	RAPD	ISJ	B-SAP	Razem <i>Total</i>	RAPD	ISJ	B-SAP	Razem <i>Total</i>
Słowacja (<i>Slovakia</i>)	3	0	1	4	11	0	8	7
Polska (<i>Poland</i>)	4	2	2	8	14	10	15	13
Wołoszyn Polska (<i>Poland</i>)	3	0	0	3	11	0	0	5
Dolina Kościeliska ¹ Polska (<i>Poland</i>)	1	0	1	2	4	0	8	3
Dolina Gąsienicowa Polska (<i>Poland</i>)	0	2	1	3	0	11	8	5

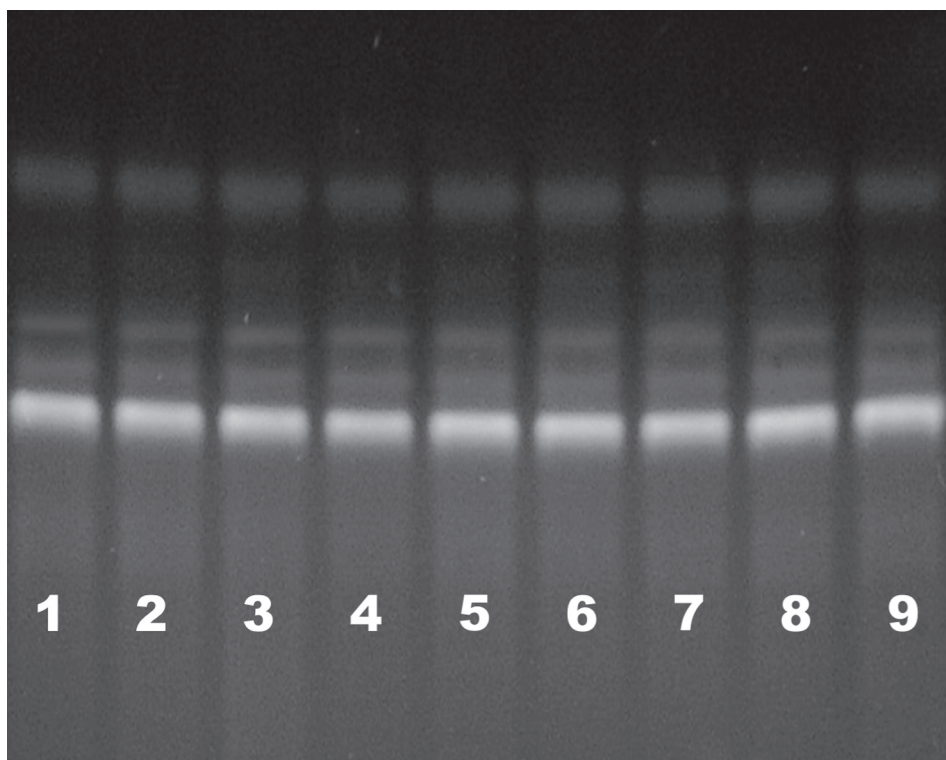
¹Populacja introdukowana / *introduced population*

Wszystkie analizowane populacje, zarówno polskie jak i słowackie posiadały jedną pulę genową, o czym świadczył w zasadzie brak prążków markerowych charakterystycznych tylko dla jednej populacji (Ryc. 4). Wyjątek stanowiły jedynie cztery prążki (0,6%), z których po jednym ujawniły odpowiednio metody RAPD i B-SAP/IS, a dwa metoda ISJ. W locus OPD06-3 prążek pojawił się tylko w populacji *P. cembra* z Wołoszyna, prążki w loci ISJ3-5 i ISJ3-6 obserwowano jedynie u limb rosnących w Dolinie Gąsienicowej, zaś limby w Dolinie Młynickiej wyróżniały się obecnością prążka w locus B-SAP/IS-3.

Populacja *P. cembra* introdukowana w Dolinie Kościeliskiej nie różniła się od populacji rodzimych ani liczbą polimorficznych loci, ani poziomem polimorfizmu (Tab. 4, 5). Nie stwierdzono też występowania markerów specyficznych dla tej populacji, co stanowi potwierdzenie, że nie jest ona elementem obcym dla flory Tatr.

Podobieństwo genetyczne

Populacje słowackie nie różniły się od populacji polskich, o czym świadczy wartość podobieństwa $Nei'a$ równa 0,97, liczona dla wszystkich markerów DNA łącznie. Podobieństwo genetyczne pomiędzy poszczególnymi populacjami



Ryc. 4. Wzory amplifikacji uzyskane metodą B-SAP z wykorzystaniem starterów katG8 u *P. cembra*.

Fig. 4. Amplification products revealed by B-SAP with katG8 primers in *P. cembra*.

1 – Dolina Młynicka, 2 – Kazalnica Łomnicka, 3-4 – Wołoszyn, 5-7 – Dolina Kościeliska, 8-9 – Dolina Gąsienicowa

P. cembra również było wysokie (0,93–0,98), typowe dla populacji jednego gatunku (Tab. 6). Brak różnic genetycznych pomiędzy badanymi populacjami znajduje odzwierciedlenie w dendrogramie otrzymanym metodą UPGMA na podstawie podobieństwa genetycznego (Ryc. 5). Limby w Dolinie Kościeliskiej, na Wołoszynie oraz Kazalnicy Łomnickiej stanowią jedną grupę, która łączy się z populacją z Doliny Młynickiej. Jedynie populacja z Doliny Gąsienicowej była bardziej odmienna, różniąc się od większości pozostałych populacji. Świadczył o tym niższy współczynnik podobieństwa genetycznego (0,81–0,86) w porównaniu z populacjami z Polskich Tatr (Wołoszyn, Dolina Kościeliska) oraz z limbami rosnącymi na Kazalnicy Łomnickiej (Tatry Słowackie). Populacja ta wykazała największe podobieństwo do limb w Dolinie Młynickiej po słowackiej stronie Tatr.

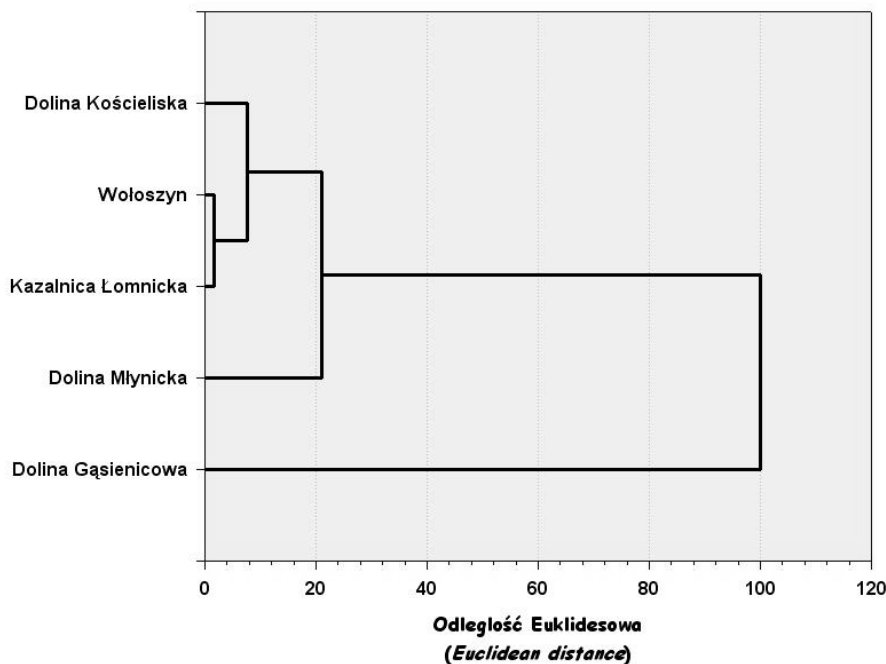
Analiza rozproszenia populacji metodą składowych głównych (Ryc. 6) oraz skalowania wielowymiarowego (Ryc. 7) potwierdziły wysokie podobieństwo populacji polskich i słowackich, i odrębną pozycję limb w Dolinie Gąsienicowej. Interesujące jest, że analiza dwóch pierwszych składowych głównych (PCA) pokazała, że populacja z Wołoszyna (Tatry Polskie) jest najbardziej podobna do

Tabela 6. Podobieństwo genetyczne (I) pomiędzy populacjami tatrzańskimi *P. cembra* na podstawie łącznej analizy markerów RAPD, ISJ i B-SAP.

Table 6. Genetic similarities between *P. cembra* populations from Tatras based on the RAPD, ISJ and B-SAP markers.

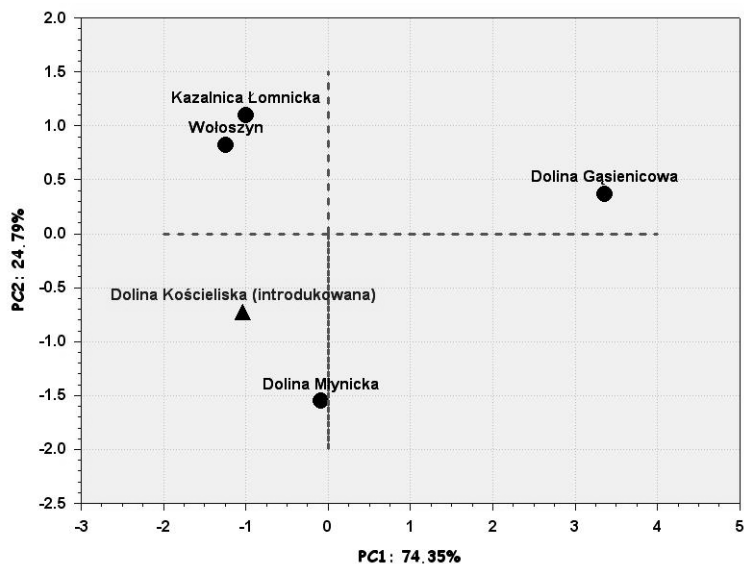
	1	2	3	4	5
1 Dolina Młynicka Słowacja (Slovakia)	1,00	0,93	0,94	0,98	0,93
2 Kazalnica Łomnicka Słowacja (Slovakia)		1,00	0,98	0,96	0,83
3 Wołoszyn Polska (Poland)			1,00	0,97	0,81
4 Dolina Kościeliska ¹ Polska (Poland)				1,00	0,86
5 Dolina Gąsienicowa Polska (Poland)					1,00

¹Populacja introdukowana / introduced population



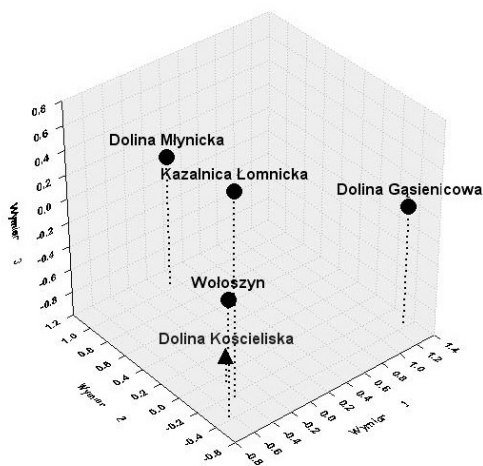
Ryc. 5. Grupowanie tatrzańskich populacji *P. cembra* na podstawie podobieństwa genetycznego Nei'a metodą UPGMA dla 62 loci RAPD, ISJ i B-SAP.

Fig. 5. UPGMA grouping of *P. cembra* from the Tatras based on Nei's genetic identities for 62 RAPD, ISJ and B-SAP loci.



Ryc. 6. Analiza rozproszenia populacji *P. cembra* metodą składowych głównych na podstawie 62 markerów DNA (RAPD, ISJ, B-SAP).

Fig. 6. Principal Component Analysis (PCA) of *P. cembra* populations based on 62 DNA markers (RAPD, ISJ, B-SAP).



Ryc. 7. Skalowanie wielowymiarowe populacji *P. cembra* na podstawie 62 markerów DNA (RAPD, ISJ, B-SAP).

Fig. 7. Multidimensional scaling of *P. cembra* populations based on 62 DNA markers (RAPD, ISJ, B-SAP).

populacji z Kazalnicy Łomnickiej w słowackiej części Tatr, potwierdzając tym samym wynik grupowania metodą UPGMA. Natomiast skalowanie wielowymiarowe przedstawiające rozmieszczenie populacji w trójwymiarowej przestrzeni wskazuje na większe podobieństwo limb z Wołoszyna do limb introdukowanych w Dolinie Kościeliskiej, podczas gdy populacje słowackie (Dolina Młynicka, Kazalnica Łomnicka) wykazują tendencję do tworzenia jednej grupy.

Analiza podobieństwa genetycznego oraz grupowanie populacji potwierdziły dane z analizy polimorfizmu, że populacja introdukowana w Dolinie Kościeliskiej nie różni się od limb rodzimych rosnących w Tatrach. Świadczył o tym bardzo wysoki współczynnik podobieństwa genetycznego wynoszący 0,99 i liczony łącznie w stosunku do wszystkich populacji rodzimych. Podobnie wysokie były wartości podobieństwa Nei'a (0,96–0,98) gdy obliczano je pomiędzy poszczególnymi populacjami rodzimymi a populacją introdukowaną (Tab. 6). Analiza dendrogramu oraz rozproszenia populacji pokazała, że limby w Dolinie Kościeliskiej są najbardziej podobne do limb z Wołoszyna i Kazalnicy Łomnickiej (Ryc. 5–7).

Dyskusja

Limba jest postrzegana jako stary, trzeciorzędowy gatunek, który w związku z długą izolacją prawdopodobnie podzielił się na dwie geograficzne i ekologiczne rasy. Pierwsza z nich to rasa zachodnia, zwana alpejsko-karpacką, z europejskim zasięgiem, a druga wschodnia, czyli syberyjska, z głównym zasięgiem w azjatyckiej części Rosji oraz obejmująca Kazachstan, Mongolię i Chiny. Na tej podstawie niektórzy autorzy rasy te traktują jako podgatunki, *Pinus cembra* ssp. *cembra* i *P. cembra* ssp. *sibirica*. Z kolei inni badacze rasom tym nadają rangę gatunków, *P. cembra* i *P. sibirica*. W obrębie limby europejskiej wyróżnia się dwie formy (*prostrata* i *helvetica*) natomiast u limby syberyjskiej wyróżniono pięć form (*humistrata*, *coronans*, *turfosa*, *depresja* i *nana*). Często wyróżnia się także formy na podstawie budowy kory lub koloru igieł (Bednarz 1971). Jak wykazały przeprowadzone badania molekularne, populacje tatrzańskie są jednorodne, prawdopodobnie stanowiąc jeden takson. Świadczy o tym przede wszystkim wysokie podobieństwo genetyczne stwierdzone w niniejszej pracy, brak markerów typowych dla poszczególnych populacji, a także porównywalny poziom polimorfizmu. Niewątpliwie populacje polskie i słowackie reprezentują jedną pulę genową.

Zastanawiający jest bardzo niski poziom polimorfizmu w badanych populacjach *P. cembra*, u których obserwowano te same allele, a loci polimorficzne stanowiły zaledwie 14,5%. Jest to o tyle zaskakujące, że gatunki z rodzaju *Pinus* należą do najbardziej polimorficznych. Przykładowo, ocenia się, że 90% loci enzymatycznych (Goncharenko i in. 1994) i 63% loci DNA jest polimorficzne u *P. sylvestris* (Polok i in. 2005). Z kolei *P. cembra* rosnąca w Dolinie Koetschach niedaleko Salzburga (Au-

stria) charakteryzuje się obecnością 48 różnych alleli w 22 loci enzymatycznych, co daje średnio powyżej 2 alleli w każdym locus i 100% loci polimorficznych (Klumpp, Stefsky 2004). Tymczasem w przeprowadzonych badaniach własnych na poziomie DNA jedynie 9 spośród 62 zidentyfikowanych loci było polimorficzne, co istotnie różni obecne dane od danych z Austrii. Wynik ten jest o tyle zastanawiający, że według powszechnej opinii na poziomie DNA obserwuje się wyższy polimorfizm niż w przypadku loci enzymatycznych. Należy jednak stwierdzić, że obszerne badania własne u traw z rodzaju *Lolium*, oparte o kilka kategorii markerów DNA wykazały, że pogląd ten nie jest do końca słuszny. Często polimorfizm enzymatyczny może być wyższy lub porównywalny z tym stwierdzanym na poziomie DNA. I tak dla markerów RAPD, wykorzystanych również w niniejszej pracy, uzyskano 16% mniej polimorficznych loci niż w przypadku enzymów (Polok 2007). Biorąc jednak pod uwagę, że odpowiednie wartości u *Lolium* wynosiły 80% loci polimorficznych dla enzymów i 64% dla RAPD, należałoby się spodziewać również wyższych niż 14,5% wartości u limby w niniejszych badaniach.

Z drugiej strony niski polimorfizm może być wynikiem zawężenia puli genowej i krzyżowania się osobników w obrębie niewielkiego obszaru. Występowanie limby w małych, rozproszonych populacjach, jak to obserwuje się w Tatrach, niewątpliwie utrudnia przepływ genów. Takie populacje są szczególnie narażone na chów wsobny i erozję zasobów genowych, tym bardziej, że procesom tym może sprzyjać samozapylenie, które czasami występuje u limby (Ulber i in. 2004). Hipotezę tę może potwierdzać, porównywalny z obecnymi wynikami, stosunkowo niski polimorfizm DNA obserwowany we wcześniejszych badaniach i wynoszący 14% w populacji z Doliny Kościeliskiej oraz 32% w populacji z Doliny Gąsienicowej (Chmiel, Polok 2005).

Głównym czynnikiem przyczyniającym się do utraty różnorodności genetycznej są antropogeniczne zmiany w środowisku bytowania gatunku i jego fragmentacja, które bezpośrednio powodują redukcję rozmiarów populacji. W przypadku limby za utratą bioróżnorodności *P. cembra* w Tatrach stoi bardzo intensywne wykorzystanie jej drewna w przeszłości. Przykład spokrewnionej z limbą *P. strobus* w lasach Ontario (Kanada) pokazuje, że wycinka lasów może doprowadzić do utraty aż 25% alleli enzymatycznych oraz obniżenia poziomu polimorfizmu o 33% tylko na skutek pojedynczej wycinki (Buchert i in. 1997).

Niekorzystnym zjawiskiem, przyczyniającym się pośrednio do erozji zasobów genowych limby, jest obserwowane wypieranie *P. cembra* przez świerk. W latach 1975–1991 około 8% rodzimej populacji limby zostało zastąpione świerkiem (Chmiel 1996; 2004). Zjawisko to powoduje dalszą fragmentację populacji i ograniczenie zasięgu limby w Tatrach jedynie do najwyższych partii górskich. Proces ten jest dobrze widoczny w Tatrach, gdzie limba występuje na niewielkich obszarach rozrzuconych w obrębie Doliny Gąsienicowej, Pańszczycy, Waksmundzkiej, Roztoki i Rybiego Potoku. Ekstremalne zjawiska atmosferyczne w piętrze

subalpejskim mogą dodatkowo wpływać na redukcję różnorodności genetycznej poprzez eliminację osobników w wyniku lawin, pożarów czy innych, nieprzewidywalnych czynników pogodowych. Utrata różnorodności genetycznej odbywa się stopniowo na skutek dryfu genetycznego (losowe procesy zachodzące w populacjach), którego efektem może być chów wsobny. Przykładowo wysoki poziom inbrodu, wynikający z rozproszenia populacji, obserwuje się między innymi u *Pinus sabiniana* w lasach sawannowych Kalifornii (Ledig 1999).

Populacje jednorodne genetycznie są bardziej narażone na stresy biotyczne i abiotyczne. Dlatego można przypuszczać, że obserwowana utrata różnorodności w populacjach limby badanych w niniejszej pracy stanowi istotne zagrożenie dla istnienia tego gatunku w Tatrach. Zróżnicowanie genetyczne jest cechą dynamiczną i pewna utrata różnorodności może być postrzegana jako proces naturalny. Jednakże zbyt szybka jej utrata, nie skorelowana z procesami naturalnymi, z jaką prawdopodobnie mamy do czynienia w przypadku limby tatrzańskiej, stanowi wyzwanie w kontekście ochrony gatunkowej i zachowania puli genowej limby rodzimej przy jednoczesnym zapobieganiu erozji zasobów genowych. Podstawową strategią ochrony limby powinno być zachowanie *in situ* istniejących naturalnych stanowisk (Ulber i in. 2004) i zapobieżenie wprowadzaniu obcych elementów do rodzimej flory. Introdukcja elementów obcych, gatunków a nawet odmian danego gatunku, poprzez wysadzanie czy wysiew nasion, może w sposób nieodwracalny przyczynić się do wyparcia gatunków rodzimych powodując erozję zasobów genowych na skutek krzyżowania, jak również wypierając je z zajmowanych środowisk. Niestety praktyka ta była powszechna w przeszłości i również miała miejsce w odniesieniu do limby, którą introdukowano w Dolinie Kościeliskiej. W tym aspekcie oszacowanie czy populacja ta stanowi element obcy dla flory Tatr jest szczególnie istotne i powinno stanowić podstawę odpowiednich decyzji administracyjnych dotyczących ochrony limby w TPN.

Przeprowadzona w pracy analiza DNA jednoznacznie pokazała, że limba w Dolinie Kościeliskiej nie różni się od populacji rodzimych, o czym świadczą zarówno wysokie podobieństwo genetyczne, podobny poziom polimorfizmu jak i brak markerów wyróżniających tę populację. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi danymi uzyskanymi przez Chmiela i Polok (2005), i w związku z tym powinien stać się podstawą do stworzenia planu ochrony tej populacji poprzez zapewnienie jej optymalnych warunków wzrostu. Tym bardziej, że obserwacje własne wskazują, iż około 10% z 700 limb wysadzonych na Świńskiej Turni w Dolinie Kościeliskiej wyginęło w ciągu ostatnich 15 lat (Chmiel, dane niepublikowane). Inną sprawą jest pochodzenie populacji z Doliny Kościeliskiej. Jej wysokie podobieństwo do populacji rodzimych może wskazywać, iż nasiona pochodziły z populacji tatrzańskich. Z drugiej strony dane TPN wskazują na niewiadome pochodzenie nasion ze wskazaniem na alpejskie lub syberyjskie. Podobieństwo limby z Doliny Kościeliskiej do limby syberyjskiej *P. sibirica* obliczone na podstawie 86

markerów RAPD, ISJ i B-SAP jest wysokie i wynosi średnio 0,84 (Chmiel, Polok 2005), co może wskazywać na syberyjskie pochodzenie tej populacji. Zarówno w obecnej pracy jak i we wcześniejszych badaniach nie prowadzono porównań pomiędzy limbą syberyjską i alpejską, i nie można wykluczyć, że stanowią one jeden gatunek. W takiej sytuacji jedynie znalezienie markerów specyficznych dla poszczególnych populacji mogłoby dać odpowiedź na pytanie dotyczące pochodzenia nasion wysianych przez Towarzystwo Tatrzańskie w Dolinie Kościeliskiej.

Wnioski

1. Badane populacje tatrzańskie limby z polskiej i słowackiej strony Tatr wykazują wysokie podobieństwo molekularne, charakteryzujące się wysokim współczynnikiem podobieństwa genetycznego $I = 0,97$, co może świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu.
2. Zawężenie puli genowej badanych populacji *P. cembra* w Tatrach, przejawiające się niskim polimorfizmem, jest najprawdopodobniej wynikiem występowania limby w małych populacjach, rozrzuconych na terenie Tatr, co ogranicza przepływ genów i promuje chów wsobny. Jednorodność badanych populacji czyni je bardziej podatnymi na czynniki stresowe i stanowi istotne zagrożenie dla istnienia tego gatunku w Tatrach.
3. Przeprowadzone badania molekularne potwierdzają wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy introdukowaną do Doliny Kościeliskiej limbą niewiadomego pochodzenia, a limbą rodzimą, zarówno z polskiej jak i słowackiej części Tatr. Wynik ten powinien być podstawą do stworzenia planu ochrony tej populacji.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Prof. dr hab. Romanowi Zielinskiemu za cenne wskazówki podczas redagowania tekstu pracy oraz owocną dyskusję.

Badania wykonano w ramach grantu finansowanego przez Unię Europejską: Marie Curie Host Fellowships for the Transfer of Knowledge, GenCrop. Contract N° MTKD-CT-2004-509834.

Literatura

Bączkiewicz A., Sawicki J., Buczkowska K., Polok K., Zielinski R. 2008. Application of different DNA markers in studies on cryptic species of *Aneura pinguis* (Jungermannnopsida, Metzgeriales). Cryptogamie Bryol. 29: 3–21.

- Bednarz Z. 1971. Systematyka i zmienność. W: Białobok S. (red.), Limba *Pinus cembra* L. Nasze Drzewa Leśne. Tom II, PWN, Warszawa-Poznań, ss. 15–20.
- Buchert G. P., Rajora Om. P., Hood J. V., Dancik B. P. 1997. Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth Eastern white pine in Ontario, Canada. *Conserv. Biol.* 11: 747–758.
- Chmiel J. 1993. Nowe stanowisko limby *Pinus cembra* w Dolinie Kościeliskiej w Tatrach. *Chrońmy Przyr. Ojcz.* 5: 71–73.
- Chmiel J. 1996. Naturalny zasięg, a rozsiedlenie limby *Pinus cembra* w Tatrach Polskich. *Przyroda TPN a człowiek*, T. 2, Biologia, Kraków-Zakopane, ss. 62–73.
- Chmiel J. 2004. Tatrzańskie reliktowe bory limbowe. *Tatry* 2: 46–47.
- Chmiel J., Polok K. 2005. Use of DNA markers for assessing the genetic identity between native and introduced stone pine (*Pinus cembra*) in the Tatra Mountains. W: Prus-Głowacki W. (ed.) *Variability and evolution*. Adam Mickiewicz Univ., Poznań, ss. 137–147.
- Clark A. G., Lanigan C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1096–1111.
- Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E. 1994. Allozyme variation in natural populations of Eurasian pines. III. Population structure, diversity, differentiation and gene flow in central and isolated populations of *Pinus sylvestris* L. in Eastern Europe and Siberia. *Silvae Genet.* 43: 119–132.
- Klumpp R. T., Stefsky M. 2004. Genetic variation of *Pinus cembra* along elevational transect in Austria. W: Śnieżko R. A., Samman S., Scott S. E., Kriebel H. B. (ed.) *Breeding and genetic resources of five needle pines: growth, adaptability and pest resistance*. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, ss. 136–140.
- Ledig T. F. 1999. Genetic diversity, genetic structure, and biogeography of *Pinus sabiniana* Dougl. *Divers. Distrib.* 5: 77–90.
- Myczkowski S., Bednarz Z. 1974. Rodzime drzewa Tatr. Studium Fizjograficzne.
- Nei M., Li W-H. 1979. Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269–5273.
- Paryski H. W. 1971. Sadzenie i przesadzanie limby. W: Białobok S. (red.), Limba *Pinus cembra* L. Nasze Drzewa Leśne. Tom II, PWN, Warszawa-Poznań, ss. 50–56.
- Polok K. 2005. Evolutionary status of closely related *Lolium* taxa. W: Prus-Głowacki W. (ed.) *Variability and evolution*. Adam Mickiewicz Univ., Poznań, ss. 195–207.
- Polok K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. *Studio Poligrafii Komputerowej "SQL"*, Olsztyn, 317 ss.
- Polok K., Urbaniak L., Korzekwa K., Androsiuk P., Ciągło S., Kubiak K., Zielinski R. 2005. Genetic similarity of *Pinus sylvestris* populations on the base of DNA markers. W: Prus-Głowacki W. (ed.) *Variability and evolution*. Adam Mickiewicz Univ., Poznań, ss. 253–267.
- Polok K., Pietkiewicz J., Zielinski R. 2006. Pochodzenie sosny błotnej *Pinus uliginosa* Neumann w świetle badań molekularnych. W: Mirek Z., Cieślak E., Paszko B., Paul W., Ronikier M. (red.) *Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów* Instytut Botaniki im. W. Szafera, Kraków, ss. 124.
- Szczecińska M., Sawicki J., Polok K., Hołdyński Cz., Zielinski R. 2006. Comparison of three *Polygonatum* species from Poland based on DNA markers. *Ann. Bot. Fennici.* 43: 379–388.
- Ulber M., Gugerli F., Bozic G. 2004. W: Giordano C. (ed.) *EUROFGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Swiss stone pine (Pinus cembra)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Italy, 6 ss.
- Weining S., Langridge P. 1991. Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82: 209–216.
- Zielinski R., Polok K. 2005. Molecular evolution and taxonomy of plants. W: Prus-Głowacki W. (ed.) *Variability and evolution*. Adam Mickiewicz Univ., Poznań, ss. 37–55.

Summary

The Tatras are the only area in Poland where native Swiss stone pine, *Pinus cembra* L. can be found. Unfortunately, due to high anthropogenic pressure in the past, the natural range of Swiss stone pine has significantly reduced. Therefore, to prevent inbreeding depression and sustain an appreciate population size, uncontrolled introduction of stone pine of unknown origin took place in Dolina Kościeliska in the 19th and 20th century. In contrast, although preserving genetic diversity at all possibly levels in the phylogenic hierarchy has continuously been the most important goal of modern conservation policy, nowadays it has been focused rather on promoting ecological and evolutionary processes that foster and sustain biodiversity. Typically, it means sustaining undisturbed and diverge natural habitats with native plants and avoiding any introduction of strange elements. Thus, the appraisal of genetic diversity and relationships between Swiss stone pine populations scattered across the Tatras was the main goal of the research. Moreover, attempts were undertaken to answer whether or not the population introduced to Dolina Kościeliska is an alien element to the Tatra flora. Five populations, two from Slovak part (Dolina Młynicka, Kazalnica Łomnicka) and three from the Polish part of the Tatras (Wołoszyn, Dolina Kościeliska, Dolina Gąsienicowa) were analysed by means of three DNA marker systems i.e., RAPD, ISJ based on intron-exon junctions, and B-SAP employing primers complementary to bacterial sequences. In total 62 amplification products were identified with the highest number of bands for RAPD (28 loci) and the lowest for B-SAP (14 loci). Populations from the Slovak and Polish Tatras were similar as judge by nearly equal numbers of identified loci and high genetic identity ($I = 0.97$). In principle, lower polymorphism of Slovak stone pines (7%) in comparison with Polish ones (13%) resulted from somehow smaller samples of the former. The relatively low polymorphism observed in all Swiss stone pine populations in the Tatras (14.5%) was mostly due to small size of populations promoting inbreeding. The loss of polymorphism has probably followed harvesting in the past and replacing by spruce observed recently. High homogeneity of Swiss stone pine populations is an infallible danger for further existence of this valuable species. The Swiss stone pine population introduced to Dolina Kościeliska is not an alien element for the Tatra flora as proved by similar numbers of identified loci in comparison with native populations, the lack of unique bands and high genetic similarities to the majority of native populations, ranging from 0.96 to 0.98. These data should unequivocally entail the implementation of appreciate conservation plans aimed at areas management and dynamic *in situ* conservation within its present habitat.