

EWA MARIA PAWLACZYK, IZABELA KROPLEWSKA, MARIA ANNA BOBOWICZ

## Postglacialna migracja jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) do Polski – analiza na podstawie polimorfizmu mitochondrialnego DNA

Postglacial migration of silver fir (*Abies alba* Mill.) to Poland – analysis on the basis of mitochondrial DNA polymorphism

### ABSTRACT

Pawlaczyk E. M., Kroplewska I., Bobowicz M. A. 2013. Postglacialna migracja jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) do Polski – analiza na podstawie polimorfizmu mitochondrialnego DNA. Sylwan 157 (6): 458-463.

Mitochondrial DNA marker was applied to 10 populations of silver fir from Poland and one from Belarusia. These populations were located within and beyond the natural range of silver fir. The marker exhibited two highly conserved alleles (first – 230 bp and second – 150 bp) based on an insertion-deletion of 80 bp in the fourth intron of the mitochondrial nad5 gene. The geographical distribution of the maternally inherited mitochondrial variation is known to support the existence of at least two refugia with two recolonizing maternal lineages remaining largely separated throughout the range. Our results provide that in all studied populations the first allele was discovered. Therefore we postulate that the silver fir migrate to Poland from the refugium in western Europe (probably from central Italy).

### KEY WORDS

silver fir (*Abies alba* Mill.), refugium, postglacial migration, mitochondrial marker

### ADDRESSES

Ewa Maria Pawlaczyk – e-mail: ewapaw@amu.edu.pl

Izabela Kroplewska – e-mail: iza22133@wp.pl

Maria Anna Bobowicz – e-mail: mabwa@amu.edu.pl

Zakład Genetyki; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; ul. Umultowska 89; 61-614 Poznań

### Wstęp

Obserwowana dziś zmienność jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) jest wynikiem procesów ewolucyjnych, takich jak mutacje, dryf i selekcja, które miały miejsce w ciepłych refugiach w Europie Południowej, gdzie jodła przetrwała ostatnie zlodowacenie, oraz podczas postglacialnej wędrówki tego gatunku na północ kontynentu. Ta historyczna wędrówka stanowi jeden z głównych powodów obecnego geograficznego zróżnicowania genetycznego i uważa się, że różne populacje jodły będą wykazywały geograficzny model genetycznej zmienności [Konnert, Bergmann 1995].

Jodła pospolita rozpoczęła rekolonizację około 13 tysięcy lat temu i osiągnęła granice obecnego zasięgu mniej więcej 6 tysięcy lat temu. Obszar występowania tego gatunku ukształtował się około 2 tysięcy lat temu i pokrywa się z rozmieszczeniem pasm i masywów górskich. Najbardziej na północ wysunięte, odizolowane stanowisko *A. alba* leży na terenie Nizy Środkowoeuropejskiego, w rezerwacie Tisovik na Białorusi (Puszcza Białowieska). Najdalej na południu gatunek ten rośnie w górach Aspromonte na południu Półwyspu Apenińskiego. Na zachodzie występuje w Pirenejach, a na wschodzie w Starej Planinie w Bułgarii oraz w Karpatach Południowych w Rumunii. W Polsce jodła osiąga północną granicę zasięgu, która przebiega wzdłuż północnego

krańca Niziny Śląskiej, następnie północną krawędzią Pasa Wyżyn Środkowych oraz przecina Nizinę Mazowiecko-Podlaską. Obecnie obserwowane geograficzne rozmieszczenie jodły pospolitej w Europie jest rezultatem postglacjalnej rekolonizacji.

Hipotezy na temat rozmieszczenia refugium glacialnych oparte są na danych izopolowych [Kral 1980; Liepelt i in. 2009], badaniach izoenzymatycznych [Konnert, Bergmann 1995; Breitenbach-Dorfer i in. 1997; Liepelt i in. 2009], badaniach chloroplastowego mikrosatelitarnego DNA [Vendramin i in. 1999; Liepelt i in. 2009] oraz mitochondrialnego DNA [Liepelt i in. 2002, 2009; Gömöry i in. 2004; Ziegenhagen i in. 2005]. Na podstawie tych markerów badacze postulują istnienie pięciu refugium glacialnych w środkowej i/lub wschodniej Francji, środkowych Włoszech, południowych Włoszech (Kalabria), południowej i południowo-wschodniej części Półwyspu Bałkańskiego oraz w Pirenejach. Jako najbardziej prawdopodobne źródła postglacjalnej rekolonizacji podaje się południową część Półwyspu Bałkańskiego, środkowe Włochy i środkowo-wschodnią część Francji. Na podstawie wyników analizy enzymatycznej postulowano istnienie dwóch stref introgresji. Obszary nałożenia się dróg migracji z kilku refugium miałyby występować w Beskidach, Tatrach Wysokich, Karpatach Słowackich, czeskich Rudawach oraz słoweńskiej części Alp, gdzie nałożyły się drogi migracji z refugium z Bałkanów i Włoch, oraz w Masywie Centralnym, Wogezach i Górach Jura, gdzie spotkały się jodły z refugium we Włoszech i Francji.

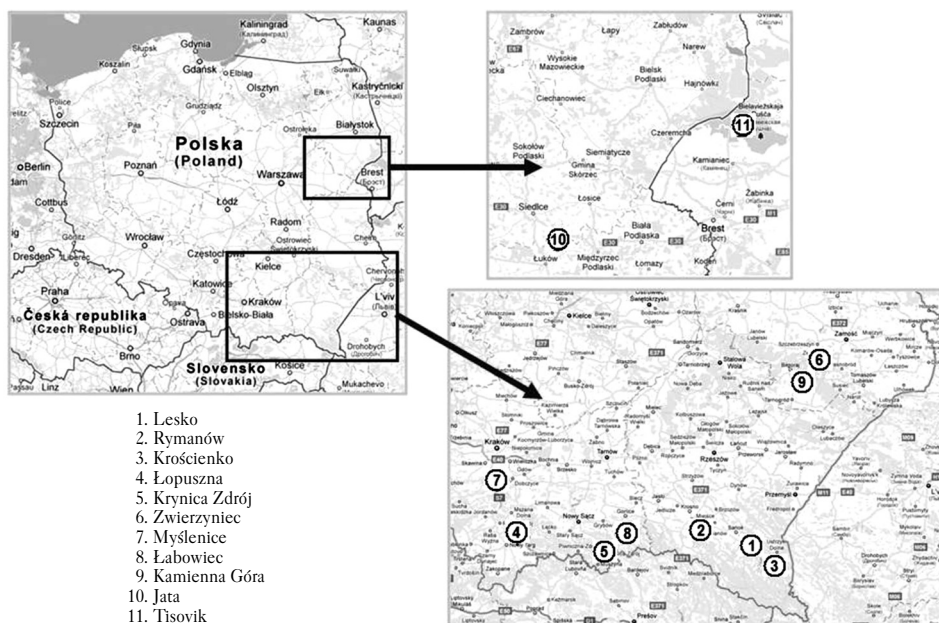
Badania molekularne prowadzono na mitochondrialnym i chloroplastowym DNA [Vendramin i in. 1999; Liepelt i in. 2002, 2009, 2010; Gömöry i in. 2004]. Na podstawie analiz mitochondrialnego DNA wykryto dwa allele o długości 230 (allel 1) i 150 (allel 2) par zasad. Stwierdzono występowanie w Europie trzech grup jodły pospolitej. Pierwsza grupa (z allelem 1) obejmuje kraje zachodniej Europy. Do grupy drugiej (z allelem 2) należą kraje południowo-wschodniej Europy (głównie kraje bałkańskie). Trzecia grupa, zawierająca obydwa allele, obejmuje Chorwację, Słowenię i północno-wschodnie Włochy.

Polskie populacje jodły pospolitej w powyższych badaniach były słabo reprezentowane, dlatego celem niniejszej pracy było zweryfikowanie hipotez na temat migracji jodły pospolitej do Polski po ostatnim zlodowaczeniu.

## Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły pąki wegetatywne i igły z 319 drzew z 10 polskich i jednej białoruskiej populacji jodły pospolitej (ryc. 1). Populacje oznaczone na rycinie 1 numerami 1-9 znajdują się w zwartym zasięgu jodły pospolitej, populacja 10 zlokalizowana jest na skraju zasięgu, a populacja białoruska – 120 km poza zasięgiem występowania gatunku. Populacje 1-10 reprezentowane były przez 30 osobników każda, a populacja z Tisovika (Białoruś) przez wszystkie 19 występujące na tym stanowisku osobniki.

Z pąków i igieł izolowano DNA metodą Doyle i Doyle [1990] na buforze ATMAB (bromek alkilo-3-metylo-amonu). Reakcje PCR wykonano w termocyklerze MultiGene™ Gradient Thermal Cycler firmy LabNet dla markera mitochondrialnego czwartego intronu mitochondrialnego genu dehydrogenazy NAD w podjednostce 5 (nad5-4). Do amplifikacji użyto następujących sekwencji startera: 5'-GGACAATGACGATCCGAGATA-3' oraz 5'-CATCCCTCCCA-TTGCATTAT-3' [Liepelt i in. 2002]. Do reakcji wzięto 20 ng matrycy DNA, 0,5 jednostki Taq polimerazy (Novazym), 0,1 mM każdego nukleotydu dNTP, 0,2 µM każdego startera, buforu do reakcji PCR oraz 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>. Reakcje wykonano w objętości 10 ul. Wstępna denaturacja trwała 3 minuty i odbywała się w temperaturze 94°C. Następnie wykonano 30 cykli: 1 min w 92°C (denaturacja), 1 min w temperaturze 54°C (przyłączanie starterów) oraz 1 min i 20 s w 72°C (wydłu-



Ryc. 1.

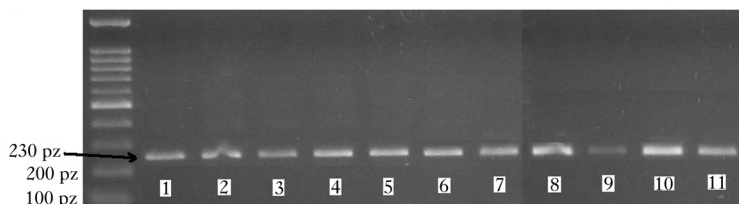
Rozmieszczenie badanych populacji jodły pospolitej  
Location of studied populations of silver fir

żanie łańcucha). Końcowe wydłużanie odbywało się w temperaturze 72°C przez 8 minut. Następnie wynik reakcji PCR został sprawdzony elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Elektroforezę poziomą prowadzono przez 1h w 6V/cm.

## Wyniki i dyskusja

We wszystkich badanych populacjach wykryto tylko allel o długości 230 pz (ryc. 2). Wynik ten świadczy o możliwej migracji jodły pospolitej do Polski z refugium z zachodniej Europy (prawdopodobnie z refugium włoskiego). Przykładowe wyniki dla populacji z rezerwatu Łabowiec zamieszczono na rycinie 3.

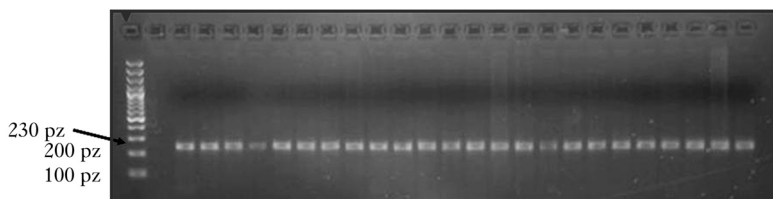
Na podstawie badań izopolowych wykryto trzy/cztery refugia jodły pospolitej, gdzie gatunek ten przetrwał ostatnie zlodowacenie w południowej Europie. Zlokalizowane są one na Półwyspie Iberyjskim (w Pirenejach), w Apeninach, na Półwyspie Bałkańskim oraz ewentualnie w południowej Francji [Bertsch 1935; Langer 1963; Scheifele 1970; Kral 1980; Korpel i in. 1982; Larsen 1986]. Starano się również określić drogi migracji jodły z refugium do centralnej Europy [Kral 1980]. Jodła ze środkowej części Włoch migrowała trzema drogami. Pierwsza, tzw. „droga jurajska”, prowadziła przez Dolinę Rodanu oraz szwajcarskie i francuskie Góry Jura do Wogezów i Schwarzwald. Druga, czyli „droga alpejsko-algawska”, wiodła z rejonu położonego w Alpach w Tessin do Doliny Renu, Jeziora Bodeńskiego i Gór Algawskich w południowych Niemczech. Z kolei „droga wschodnioalpejska” okrążyła Alpy od wschodu i prowadziła do Bawarii, Czech, Lasów Turyngii i Rudaw. Jodła z refugium na Półwyspie Bałkańskim (południowa Bośnia i Macedonia) wędrowała na północ szlakiem „wschodnim” przez Karpaty do Tatr w północnej Słowacji oraz „zachodnim” przez Góry Dynarskie do Chorwacji i południowych Alp [Horwat-Marolt, Kramer 1982].



Ryc. 2.

Wynik reakcji PCR dla markera mitochondrialnego nad5-4 na żelu agarozowym z bromkiem etydyny dla wszystkich badanych populacji

The result of PCR reaction for nad5-4 mitochondrial marker on agarose gel with ethidium bromide for all studied populations



Ryc. 3.

Wynik reakcji PCR dla populacji z rezerwatu Łabowiec

Result of PCR reaction for population from the Łabowiec Reserve

Badania enzymatyczne prowadzone były w 8 systemach, w których przebadano 48 proveniencji z 15 krajów europejskich [Konnert, Bergmann 1995]. Stwierdzono, że przyjmując za kryterium obecność lub brak alleli o niskiej frekwencji, badane proveniencje można podzielić na 4 grupy. Niektóre z tych alleli pojawiały się tylko w określonych rejonach zasięgu jodły i zostały nazwane allelami specyficznymi. Pierwszy region stanowiły południowe Włochy i Pireneje. Allele stwierdzone w populacjach z tego regionu różniły nie tylko te proveniencje od innych, ale również od siebie nawzajem. Drugi region obejmował populacje z zachodniej i środkowej Europy na zachód od Śląska. Trzeci region to wschodnia i środkowa Europa, a czwarty – stanowiska ze wschodniej części Europy. Na podstawie przeprowadzonych badań wykryto, że refugia z Bałkanów i z Włoch spotkały się i stworzyły tzw. strefę introgresji. Ten wniosek został oparty na znalezieniu populacji, które zawierają zarówno allele charakterystyczne dla Bałkanów z jednej strony i Europy Środkowej z drugiej. Analogiczna strefa występuje w Alpach Słoweńskich, gdzie jodła z południowych Bałkanów spotkała się z migrującą drogą wschodnioalpejską jodłą ze środkowych Włoch. Dodatkowo kilka populacji jodły z najbardziej na południe wysuniętych stanowisk na Półwyspie Bałkańskim (Bułgaria, Macedonia) zawierało unikalne allele nieobserwowane w żadnych innych populacjach. Te szczególne allele zostały znalezione także u jodły bułgarskiej (*Abies borisii-regis*), co dowodzi, że przepływ genów między tymi dwoma gatunkami był efektywny w strefach nakładania się zasięgów.

Na podstawie badań enzymatycznych wykryto pięć refugium, ale tylko z trzech nastąpiła rekolonizacja do środkowej i wschodniej Europy. Refugia z Pirenejów i południowych Włoch (Kalabria) są izolowanymi stanowiskami jodły. Ze środkowych Włoch do środkowej i wschodniej Europy prowadziły dwie drogi: „zachodnioalpejska” (dzieląca się na „drogę jurajską” i „drogę alpejsko-algawską”) oraz „wschodnioalpejska”. Refugium ze środkowej i wschodniej Francji (Masyw Centralny) wprowadziło jodłę na zachodnie stanowiska Europy Środkowej (Wogezy,

Schwarzwald, Jura), a z refugium południowego i południowo-wschodniego regionu Półwyspu Bałkańskiego (Macedonia, Bułgaria, Rumunia) ekspansja prowadziła wzdłuż Gór Dynarskich do Słowenii i wzdłuż Rumuńskich Karpat do wschodniej części Beskidów. Postulowano istnienie dwóch stref introgresji, a mianowicie strefę w Beskidach, Tatrach Wysokich, Karpatach Słowackich i Rudawach oraz Alpach Słoweńskich, a także strefę w Masywie Centralnym, Wogezach i Górach Jura.

### Podsumowanie

Niniejsze badania potwierdziły wnioski płynące ze wcześniejszych analiz. Prawdopodobnie jodła pospolita przywędrowała do Polski z zachodniego refugium w środkowej części Włoch. Nie potwierdziła się natomiast oparta na badaniach izoenzymatycznych hipoteza, że gatunek ten tworzy w naszym kraju strefę introgresji refugium bałkańskiego i włoskiego.

### Podziękowanie

Autrzy pragną podziękować prof. dr. hab. Adolfowi F. Korczykowi z Zamiejscowego Wydziału Leśnego Politechniki Białostockiej w Hajnówce oraz dr Ewie Chudzińskiej z Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu za udostępnienie materiału roślinnego do badań.

### Literatura

- Bertsch K. 1935. Der deutsche Wald im Wandel der Zeiten. Tübingen.
- Breitenbach-Dorfer M., Pinski W., Starlinger F., Geburek T. 1997. The contact zone between two migration routes of silver fir, *Abies alba* (Pinaceae), revealed by allozyme studies. *Plant Systematics and Evolution* 206: 259-272.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gömöry D., Longauer R., Liepelt S., Ballian D., Brus R., Kraigher H., Parpan V. I., Parpan T. V., Paule L., Stupar V., Ziegenhagen B. 2004. Variation patterns of mitochondrial DNA of *Abies alba* Mill. in suture zones of postglacial migration in Europe. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 73 (3): 203-206.
- Horvat-Marolt S., Kramer W. 1982. Die Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Jugoslawien. *Forstarchiv* 53: 172-180.
- Konnert M., Bergmann F. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution* 195: 19-30.
- Korpel S., Paule L., Laffers I. 1982. Genetics and breeding of the silver fir (*Abies alba* Mill.). *Ann. Forest.* 915: 151-184.
- Kral F. 1980. Waldgeschichtliche Grundlagen für die Ausscheidung von Okotypen bei *Abies alba*. W: Meyer H. [red.]. *Proceedings 3. IUFRO Tannensymposium Wien, Österreichischer Agrarverlag, Wien.* 158-168.
- Langer H. 1963. Einwanderung und Ausbreitung der Weißtanne in Süddeutschland. *Forstw. Centralbl.* 83: 33-52.
- Larsen J. B. 1986. Das Tannensterben. Eine neue Hypothese zur Klärung dieser rätselhaften Komplexkrankheit der Weißtanne (*Abies alba* Mill.). *Forstw. Centralbl.* 105: 381-396.
- Liepelt S., Bialozyt R., Ziegenhagen B. 2002. Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *The Proceedings of National Academy of Science USA* 99: 14590-14594.
- Liepelt S., Cheddadi R., de Beaulieu J.-L., Fady B., Gömöry D., Hussendorfer E., Konnert M., Litt T., Longauer R., Terhürne-Berson R., Ziegenhagen B. 2009. Postglacial range expansion and its genetic imprints in *Abies alba* (Mill.) – a synthesis from paleobotanic and genetic data. *Review of Palaeobotany and Palynology* 153:139-149.
- Liepelt S., Mayland-Quellhorst E., Lahme M., Ziegenhagen B. 2010. Contrasting geographical patterns of ancient and modern genetic lineages in Mediterranean *Abies* species. *Plant Systematics and Evolution* 284: 141-151.
- Scheifele M. 1970. Die Tanne von Aude. – *Allg. Forstzeitung* 49: 1039-1041
- Vendramin G. G., Degen B., Petit R.J., Anzidei M., Madaghiale A., Ziegenhagen B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. *Molecular Ecology* 8: 1117-1126.
- Ziegenhagen B., Fady B., Kuhlenkamp V., Liepelt S. 2005. Differentiating groups of *Abies* species with a simple molecular marker. *Silvae Genetica* 54 (3): 123-126.

## SUMMARY

Postglacial migration of silver fir (*Abies alba* Mill.) to Poland – analysis on the basis of mitochondrial DNA polymorphism

Observed intraspecies variability of silver fir (*Abies alba* Mill.) is the result of postglacial recolonisation, which began about 13 000 years ago in southern Europe in warm refugia, where species survived the last glaciation and reached the ends of the current range around 6000 BC.

Early hypotheses on the distribution of glacial refugia were based on pollen data and isozyme research. On the basis of these markers the existence of five glacial refugia was postulated and the most likely routes of postglacial recolonization were identified. This migration began from three refugia (the southern part of the Balkan Peninsula, central Italy and central-eastern part of France). We hypothesized that firs from two refugia in the Balkans and from central Italy met and formed introgression zone between them.

Recent studies using molecular mitochondrial DNA marker nad5-4 revealed the existence of three groups of European silver fir. The first group with first allele of 230 bp in length includes the countries of Western Europe, the other group of second allele at 150 bp long, which includes the countries of southeastern Europe (mainly the Balkans), and a third group that contains a mixture of alleles which includes Croatia, Slovenia and north-eastern Italy.

The aim of this study was to describe the migration routes of silver fir after the last glaciation in Poland, where investigated species reaches its north-eastern border of range. The study was based on analysis of mitochondrial nad5-4 marker. 10 Polish fir populations as well as one Belarusian (Tisovik) were selected. Analysis showed that all studied populations include the 230 bp allele. This result indicates that in all studied populations the first allele was discovered. The fir on the Polish territory migrated from one refugium in western Europe.