

JUSTYNA A. NOWAKOWSKA, TOMASZ OSZAKO

Stan zdrowotny i zróżnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA*

Health condition and genetic differentiation level of beech in the Siewierz Forest District assessed with cpDNA markers

ABSTRACT

Nowakowska J. A., Oszako T. 2008. Stan zdrowotny i zróżnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA. Sylwan 9: 11-20.

Beech decline phenomenon has been observed in Poland since the 1980s. The reasons are still unclear but the discovery of pathogens genus *Phytophthora* shed a new light on it. Stems as well as roots of beech trees were severely affected by *P. citricola* and *P. cambivora*. In order to find out the genetic background of infection, three loci of chloroplast microsatellite DNA were investigated in the genetic differentiation study of beeches growing in the Siewierz Forest District in Poland. Parameters of genetic diversity (h Nei) and differentiation (G_{ST}) in the chloroplast genome were estimated and compared between healthy and damaged trees. Healthy beeches were more heterozygous ($h=0.243$) than the damaged ones ($h=0.113$), and the distribution of cpDNA alleles was different between these two groups. Healthy trees were nearly 50% more genetically diversified than declining ones.

KEY WORDS

Fagus sylvatica, chloroplast DNA markers, heterozygosity level, *Phytophthora* spp.

ADDRESSES

Justyna A. Nowakowska – Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych; Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin-Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn; e-mail: j.nowakowska@ibles.waw.pl

Tomasz Oszako – Zakład Fitopatologii Leśnej; Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin-Stary, ul. Braci Leśnej 3; 05-090 Raszyn; e-mail: t.oszako@ibles.waw.pl

Wstęp

Zjawisko zamierania drzewostanów bukowych obserwowane jest w Europie od początku lat osiemdziesiątych XX wieku, przy czym w ostatnich latach przybiera na sile, powodując niekiedy lokalnie poważne konsekwencje dla gospodarki leśnej. Najgorzej pod tym względem wygląda sytuacja na terenie nadleśnictw Dretyń i Lipka (RDLP Szczecinek i Piła). Od kilku lat odnotowuje się tam wysoki odsetek drzew chorych (ponad 70%) i martwych (ok. 20%). Znaczne pogorszenie stanu zdrowotnego buków w ciągu ostatnich 3 lat zanotowano także na terenie nadleśnictw Kolbuszowa, Dębica, Świerczyna, Gryfice oraz w Świętokrzyskim i Roztoczańskim Parku Narodowym. Postawiono hipotezy o udziale lęgniowców *Oomyces* rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* w procesie obumierania korzeni drobnych buków w okresach sprzyjających rozwojowi patogenów (ulewne deszcze, podtopienia drzewostanów itp.). Stwierdzono, że *P. cambivora*, *P. citricola* powodują obumieranie zarówno sadzonek buka w szkółkach [Orlikowski i in. 2004; Stępniewska 2005], jak i w dojrzałych drzewostanach [Jung i in. 2005; Orlikowski i in. 2006]. Szczególnym zagro-

* Praca jest efektem realizacji projektu Lasów Państwowych BLP-313 pt. „Ocena zagrożenia drzewostanów dębowych i bukowych na podstawie występowania organizmów patogennych i symbiontów mikoryzowych”

zeniem są nowopoznane patogeny znajdujące się na międzynarodowych listach organizmów kwarantannowych, m.in. zawleczone prawdopodobnie z Azji *P. ramorum* i *P. kernoviae*, które zagrażają nie tylko europejskim dębom, ale również w dużym stopniu bukom [Brasier i in. 2005]. Zagrożenie to wynika z potwierdzonej eksperymentalnie wrażliwości tkanek pni buka na infekcje przez rodzaj *Phytophthora*. Patogeny te powodują uszkodzenia tkanek pni i związane z tym problemy przewodzenia asymilatów z koron do korzeni [Jung, Blaschke 1996], co powoduje obumieranie tych ostatnich, a w konsekwencji i zamieranie gałęzi w wierzchołkowych częściach koron (ryc. 1), a na pniach powstawanie wysięków soków. W Niemczech korzenie drobne buków oraz tkanki kory pni atakowane są często przez *P. cambivora* i *P. pseudosyringae* [Hartmann, Blank 1998; Jung i in. 2003].

Porównanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy drzewami zdrowymi i chorymi mogłoby wyjaśnić czy podatność drzew na chorobę (fytoftorozę) może być uwarunkowana genetycznie. Dynamiczny rozwój technik opartych na markerach zmienności genetycznej tj. izoenzymów i DNA umożliwił w ostatnich latach przeprowadzenie szczegółowych badań struktury genomu wielu gatunków drzew leśnych [Nowakowska 2006a]. Na pulę genową każdego gatunku składają się różne formy alleli poszczególnych genów zapisanych w łańcuchu DNA. Bogactwo puli genowej najczęściej określane jest na podstawie częstości występowania różnych form alleli w genomie. Im bardziej zróżnicowana jest pula genowa gatunku, tym większe istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia korzystnej kombinacji alleli, gwarantujących przeżywalność i przystosowanie do zmiennych warunków otoczenia [Eriksson, Ekberg 2001]. Na przestrzeni tysiącleci drzewa leśne wykształciły mechanizmy adaptacji do bardzo różnych, czasami wręcz ekstremalnych, warunków klimatycznych i siedliskowych. Przystosowanie to polegało przede wszystkim na naturalnej selekcji, która opiera się na doborze osobników lub populacji najlepiej przystosowanych do panujących warunków siedliska i klimatu. Większość cech adaptacyjnych, np. odporność na patogeny i szkodniki owadzie, jest kodowana przez wiele genów, które działają na zasadzie addytywnej i są regulowane przez czynniki biotyczne i abiotyczne [Stamatoyannopoulos 2004; Nowakowska 2007].



Ryc. 1.

Korony uszkodzonych buków z Nadleśnictwa Siewierz
Crowns of damaged beeches from the Siewierz Forest District

Buk zwyczajny został przebadany pod kątem struktury genetycznej w Europie na podstawie markerów izoenzymatycznych oraz DNA jądrowego i chloroplastowego. W niniejszej pracy wykorzystano doniesienia Grivet i in. [2001], Vettori i in. [2004] oraz Magri i in. [2006], w których wykazano przydatność mikrosatelitarnych markerów DNA chloroplastowego w określeniu zmienności genetycznej populacji bukowych w Europie. Celem badań była identyfikacja patogenów powodujących symptomy chorobowe buków w Nadleśnictwie Siewierz (RDLP Katowice) oraz porównanie poziomu heterozygotyczności u drzew zdrowych i chorych. Wybór drzewostanów bukowych na tym terenie wynikał z faktu zgłoszenia przez leśnictwo Trzebyczka szybkiego tempa pogarszania się stanu zdrowotnego drzew, wykazujących objawy chorobowe charakterystyczne dla fytoftorozы korzeni i podstawy pni.

Materiał i metody

OCENA STANU ZDROWOTNEGO DRZEW. Stan zdrowotny buków w Nadleśnictwie Siewierz analizowano w latach 2005-2007 na terenie leśnictwa Trzebyczka w trzech około stuletnich drzewostanach bukowych (oddz. 28a, 32c i 35a). Próbki drewna pobierano z chorych tkanek pni drzew spod ciemnych wysięków soków, w których po usunięciu kory widoczne były rozległe nekrozy tkanek (ryc. 2) oraz z korzeni, po czym analizowano je według metody opisanej przez Orlikowskiego i in. [2006]. Próbki te posłużyły do izolacji i hodowli patogenów *Phytophthora* na pożywkach PDA. Oprócz próbek drewna, do analiz pobrano również próbki gleby. Za pomocą techniki pułapek roślinnych uzyskano czyste hodowle patogenów rodzaju *Phytophthora* [Orlikowski i in. 2006]. Identyfikację gatunkową wykonano za pomocą analizy DNA zgodnie z metodą Aljanabi i Martinez [1997] oraz Wiejacha i in. [2002].

ZBIÓR MATERIAŁU W TERENIE. W celu określenia zróżnicowania genetycznego buków na poziomie DNA, latem 2007 r. zebrano po 3 g liści losowo rozmieszczonych w koronach 25 zdrowych i 25 porażonych buków. Analizowane drzewa były losowo rozmieszczone w drzewostanie. Odległość między nimi i od granicy drzewostanu wynosiła ok. 25 m. Ulistnione gałązki (2-3 sztuki o długości ok. 10 cm) zestrzelivano śrutem i przechowywano kilka dni w temperaturze 4°C przed wykonaniem analiz.

IZOLACJA DNA GENOMOWEGO. Izolację DNA z liści 50 osobników buka zwyczajnego przeprowadzono za pomocą zestawów DNeasy 250 Plant Mini Kit (QIAGEN). Dla każdego pochodzenia badano wydajność ekstrakcji za pomocą migracji elektroforetycznej na 1% żelu



Ryc. 2.

Wyciek soków z kory porażonego buka (zdjęcie z lewej) i nekroza tkanek pnia po usunięciu kory (zdjęcie z prawej) w Nadleśnictwie Siewierz

Exudates on the bark of infected beech (left side) and necrosis of stem tissues appeared after removing of bark (right side)

agarozowym po barwieniu bromkiem etydyny (0,5 µg/ml). Otrzymane ilości DNA analizowano za pomocą spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (TK-Biotech).

AMPLIFIKACJA DNA CHLOROPLASTOWEGO W REAKCJI PCR. Po ekstrakcji DNA z drzew zdrowych i chorych, według procedury opisanej przez Grivet i in. [2001] oraz Weising i Gardner [1999], przeprowadzono analizy zmienności genetycznej za pomocą trzech mikrosatelitarnych loci DNA chloroplastowego: *ccmp4*, *ccmp7* i *ccmp10*. Warunki amplifikacji tych loci chloroplastowych polegały na dodaniu do 20 ng izolowanego DNA następujących odczynników (QIAGEN®): 1×bufor; 5×Q-solution; 2,0 mM MgCl₂; 200 µM każdego z dNTP; 0,2 µM startera wiodącego i powrotnego oraz 1 U Taq polimerazy. Tak przygotowane próbki poddawano namnażaniu DNA w termocyklerze Biometra Gradient zaprogramowanym na 96°C (5 min) początkowej denaturacji nici, a następnie 26 cykli: 94°C (1 min) – denaturacja, 55°C (1 min) przyłączanie starterów i 72°C (1 min) elongacja fragmentów. Końcowe wydłużane powielonych fragmentów trwało 7 min. I wykonywano je w temperaturze 72°C.

ANALIZA HAPLOTYPÓW W SEKWENATORZE. Powielone w reakcji PCR fragmenty DNA poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 8% żelu akrylamidowym w automatycznym sekwenatorze ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). Rozdział poszczególnych fragmentów analizowano w programie ALFwin Fragment Analyser™ 1.0 przy użyciu standardu wielkości fragmentów ALFexpress™ sizer™ 50-500 oraz dwóch standardów ALFexpress™ Sizer™ 100 i 300 (Amersham Pharmacia Biotech).

Obliczenia podstawowych parametrów genetycznych, w tym obserwowaną (n_a) i efektywną (n_e) liczbę alleli polimorficznych, heterozygotyczność (h) i indeks polimorfizmu Shannona (I), wykonano według programu PopGen wersja 1.32 [Yeh, Boyle 1997] na podstawie wyliczeń Nei [1987] oraz Nei i Li [1979].

Wyniki

OBECNOŚĆ PATOGENÓW *PHYTOPHTHORA* W ANALIZOWANYCH PRÓBKACH. Na podstawie przeprowadzonych testów laboratoryjnych stwierdzono, że około 40% korzonków drobnych buków uszkodzone zostało przez lęgniowce *Phytophthora cambivora* i *P. citricola*. Patogeny te powodowały także rakowate zmiany chorobowe na korze pni. Ich występowanie odnotowano u większości analizowanych drzew zarówno w korzeniach, jak w nekrozach tkanek kory na pniach (tab. 1). W próbkach gleby pobranych wokół chorujących drzew występował wyłącznie patogen *P. citricola*.

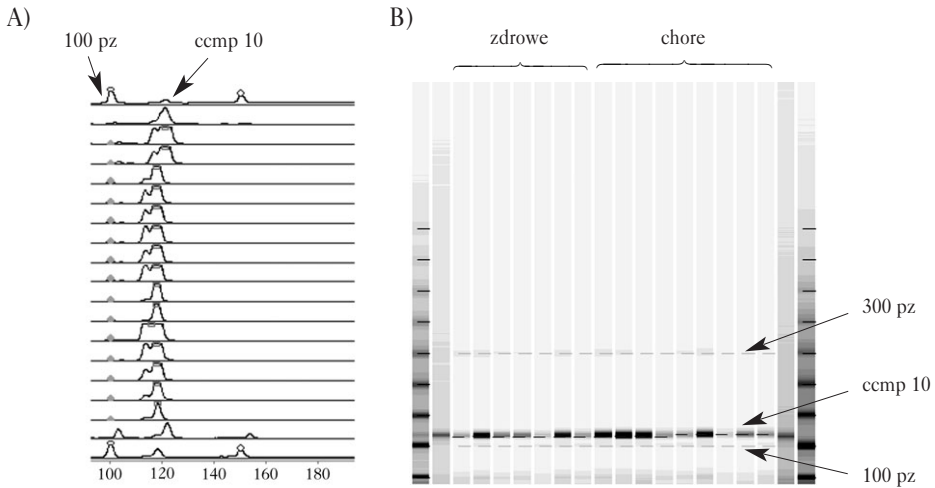
OKREŚLENIE ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO U DRZEW ZDROWYCH I CHORYCH. Dla wszystkich prób liści pobranych ze zdrowych drzew buka średnia zawartość cząsteczek DNA wynosiła 24,84 g DNA/100 mg ś.m. Wśród drzew chorych średnia zawartość cząsteczek DNA w każdej próbce dla badanych pochodzeń buka wynosiła 20,86 g DNA/100 mg ś.m. Dane te posłużyły do ustalenia warunków reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w dalszym etapie badań.

Wszystkie badane loci prezentowały 66,6% polimorfizmu. Spośród badanych loci cpDNA, najbardziej polimorficzny był locus *ccmp10* z pięcioma wariantami alleli (od 116 do 124 pz). W locus *ccmp10* występowała największa liczba różnych form alleli zarówno u drzew zdrowych, jak i chorych (ryc. 3). I tak, allele 116 i 118 pz były obecne tylko w drzewach chorych, zaś allele 122 i 124 pz charakteryzowały wyłącznie drzewa zdrowe. Jedynie allel 120 pz występował w obu typach drzew dla tego locus z podobną częstością (tab. 2). Locus *ccmp4* prezentował dwa warianty haplotypów (118 i 120 pz). Wśród drzew zdrowych dla locus *ccmp4* dominował allel 120 pz, zaś wśród drzew chorych – allel 118 pz. Allel 120 pz był w ogóle nieobecny w drzewach chorych w locus *ccmp4*. W przeciwieństwie do pozostałych loci, locus *ccmp7* wykazał brak

Tabela 1.

Organizmy izolowane z drobnych korzeni i rakowatych zmian na pniach chorych buków
Organisms isolated from fine roots and bleeding cankers of trunks of diseased beeches

Rodzaj/Gatunek	Liczba analizowanych drzew	Liczba uzyskanych izolatów
<i>Borytis cinerea</i> Pers.	3	7
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	7	15
<i>Cladosporium herbarum</i> Pers. Link	2	5
<i>Fusarium equiseti</i> (Cda) Sacc.	11	22
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	3	4
<i>Mucor circinelloides</i> van Tieghem	10	12
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	14	32
<i>Periconia pycnospora</i> Freb.	6	13
<i>Phytophthora cambivora</i> (Petri). Buismen	7	26
<i>Phytophthora citricola</i> Sawada	8	28
<i>Torula expansa</i> Pers ex Fries.	8	21



Ryc. 3.

Profil amplifikacji dla locus ccmp10
Amplification profile of the locus ccmp10

A – obraz generowany w automatycznym sekwenatorze; B – elektroforegram na żelu akrylamidowym; Oznaczenia: 100, 300 pz – wyznaczniki wielkości (referencja); ccmp10 – chloroplastowy locus o zmiennej wielkości alleli (ok. 120 pz)
A – picks observed after automatic sequencer analysis; B – electrophoresis on the acrylamide gel; Description: 100, 300 pz – size references; ccmp10 – chloroplast locus with variable allele size around 120 base pairs; zdrowe – healthy; chore – damaged

polimorfizmu w badanych próbach buka, ponieważ przedstawiał obecność tylko jednego wariantu alleli – 147 pz (tab. 2).

Na podstawie frekwencji haplotypów obliczonych dla poszczególnych loci stwierdzono występowanie dużej różnorodności genetycznej w zależności od typu analizowanych liści z drzew zdrowych bądź chorych. Drzewa zdrowe charakteryzowała nieco większa obserwowana liczba alleli na locus ($n_a=2,000$) niż u drzew chorych ($n_a=1,667$). Efektywna liczba alleli w locus była u drzew zdrowych większa ($n_e=1,557$) w porównaniu do drzew chorych ($n_e=1,170$). Indeks zmienności Shannona był dwukrotnie wyższy u drzew zdrowych ($I=0,418$) niż u chorych ($I=0,209$).

Parametry te znalazły odzwierciedlenie w dwukrotnie większej heterozygotyczności cpDNA u drzew zdrowych ($h=0,243$) w porównaniu do drzew chorych ($h=0,113$).

Wszystkie drzewa wykazywały razem średnio 2,667 obserwowanych alleli w locus; 2,197 efektywnych alleli na locus; aż 69,7% zmienności według indeksu Shannona oraz 40,7% heterozygotyczności według Nei [1987] dla $p < 0,01$ (tab. 3).

Obie grupy badanych drzew, tzn. zdrowe i chore, dzielił duży dystans genetyczny ($D_N=0,803$) obliczony na podstawie algorytmu metody skupień średnich połączeń (ang. UPGMA).

Dyskusja

Wykryta obecność patogenów *Phytophthora* (*P. citricola* i *P. cambivora*) w analizowanych bukach z Nadleśnictwa Siewierz nasuwa pytanie o to, czy porażone drzewa mogły być predysponowane genetycznie na występowanie choroby. Przy założeniu, że są one powszechne w drzewostanie (o czym świadczą analizy gleby) oraz że znana jest ich wysoka wirulencja w stosunku do buka jako rośliny gospodarza [Jung i in. 2005; Orlikowski i in. 2004, 2006], to należy spodziewać się wysokiego stopnia zachorowalności drzew w drzewostanie.

W wilgotnych okresach sezonu wegetacyjnego panują idealne warunki do rozwoju lęgniowców *Phytophthora* i *Pythium*, których cykl biologiczny związany jest z wodą. Według Junga i in. [2005] w tym czasie, dzięki masowej produkcji zarodników (ruchliwych zoospor) w zoosporangiach, patogeny te są w stanie opanować cały drzewostan i spowodować zniszczenia nawet do 90% wszystkich korzeni drobnych u drzew. Jeżeli tak się nie stało w leśnictwie Trzebyczka,

Tabela 2.

Frekwencje haplotypów cpDNA występujących w badanych drzewach zdrowych i chorych buka z Nadl. Siewierz

Frequencies of the cpDNA haplotypes occurring in studied beech trees from Siewierz Forest District

Locus	Wielkość alleli w parach zasad (pz)	Typ drzewa	
		zdrowe	chore
ccmp4	118 pz	0,067	1,000
	120 pz	0,933	–
ccmp7	147 pz	1,000	1,000
	116 pz	–	0,067
ccmp10	118 pz	–	0,800
	120 pz	0,200	0,133
	122 pz	0,533	–
	124 pz	0,267	–

Tabela 3.

Genetyczna charakterystyka haplotypów cpDNA w badanych drzewach buka zdrowych i chorych z Nadl. Siewierz

Genetic characterization of cpDNA haplotypes found in both variants of studied trees in Siewierz Forest District

	n_a	n_e	I	h
drzewa zdrowe	2,000	1,557	0,418	0,243*
drzewa chore	1,667	1,170	0,209	0,113*
razem	2,667	2,197	0,697	0,407*

n_a – obserwowana liczba alleli; n_e – efektywna liczba alleli; h – heterozygotyczność według Nei [1987]; I – indeks polimorfizmu Shannona; * – istotne na poziomie 0,01

n_a – observed number of alleles; n_e – effective number of alleles; h – heterozygosity of Nei [1987]; I – Shannon polymorphism index; * – significant at 0,01

to zapewne dzięki indywidualnej odporności buków na infekcję, mimo powszechnej obecności patogenów w drzewostanie.

Odporność ta może być ukierunkowana na danego patogena (jest to silna odporność pionowa) lub na wiele czynników szkodliwych (czyli mniejsza odporność pozioma). Ta ostatnia ma duże znaczenie, gdy nastąpi pogorszenie warunków bytowania drzew w drzewostanie, np. na skutek występowania silnej suszy. Drzewa nieodporne szybko ulegają osłabieniu i stają się podatne na atak patogenów lub szkodników owadzych. Dzieje się tak dlatego, że osłabione zostają aktywne procesy odpornościowe, bazujące na syntezie związków fenolowych, które są silnymi utleniaczami organicznymi limitującymi rozwój infekcji w roślinie. Ten osłabiony stan spowodowany suszą, chętnie wykorzystują owady, np. czerwiec bukowiec (*Cryptococcus fagi*), grzyby (*Nectria galigena*, *N. cinnabarina*, *N. coccinea*, *N. ditissima* oraz opieńki *Armillaria* spp.), a także należące do królestwa Chromista organizmy grzybopodobne, zwane czasami „glonopodobnymi” z grupy lęgniowców *Oomycetes* (*Phytophthora* i *Pythium*).

Poznanie stopnia zróżnicowania genetycznego danego gatunku ma szczególne znaczenie wobec zmieniających się warunków środowiska. W przeszłości zasięg wielu gatunków drzew leśnych ulegał zmianom pod wpływem działania mechanizmu naturalnej selekcji. Odpowiedzią drzew na fluktuacje zmian środowiska są często zmiany we frekwencji występowania genów, które determinują wartość cech fenotypowych [Oleksiak i in. 2002]. Dodatkowo, aktywna ingerencja człowieka w środowisko naturalne w ciągu ostatnich stuleci, w znaczący sposób wpłynęła na strukturę i zdrowotność wielu gatunków drzew leśnych, w tym również drzewostanów bukowych. Przypuszcza się, że wraz z postępującym ocieplaniem klimatu obecny zasięg buka i dębu obejmie również północną Europę. Badania paleontologiczne potwierdzają, iż w przeszłości gatunki drzew leśnych potrafiły zaadaptować się do nowych warunków klimatu i siedliska, które wywierały silną presję selekcyjną [Kremer 2007].

Jak dotąd, badania zmienności genetycznej buka na podstawie DNA chloroplastowego przeprowadzono głównie we Włoszech. Analizy Vettori i in. [2004] dotyczyły większej liczby (67) populacji bukowych, położonych na Półwyspie Apenińskim i były w głównej mierze oparte o loci *ccmp4*, *ccmp6*, *ccmp7* oraz *ccmp10*. Badania te wykazały geograficzną różnorodność rozmieszczenia haplotypów jedynie dla loci *ccmp4* i *ccmp7*. Pozostałe loci (*ccmp6* i *ccmp10*) nie wykazały polimorfizmu we włoskich populacjach buka. Całkowite zróżnicowanie populacji było dość wysokie $G_{ST}=0,855$, co świadczy o tym, że badane populacje bardzo różniły się od siebie pod względem struktury cpDNA [Vettori i in. 2004]. Badania Magri i in. [2006], przeprowadzone na podstawie trzech loci *ccmp4*, *ccmp7* i *ccmp10*, również wykazały wysoki procent zróżnicowania genetycznego ($G_{ST}=0,810$) dla ok. 400 europejskich populacji buka. Podobne wyniki otrzymano na podstawie badań izoenzymatycznych loci u buka w Europie, gdzie bogactwo alleli (allelic richness) i heterozygotyczność drzewostanów bukowych utrzymuje się na wysokim poziomie, mimo znacznej redukcji populacji w okresie ostatniego zlodowacenia [Comps i in. 2001].

Niniejsze wyniki analiz dwóch grup drzew (zdrowych i chorych) z Nadl. Siewierz wpisują się w cytowane powyżej badania, przedstawiając stopień zróżnicowania genetycznego na mniejszym niż europejski poziomie $G_{ST}=0,563$. Liczba ta wskazuje na ponad 50% różnicę w strukturze genetycznej między analizowanymi 25 zdrowymi i 25 chorymi drzewami *F. sylvatica*.

Stosowane w badaniach markery cpDNA są markerami neutralnymi, czyli niepowiązanyymi z żadną cechą morfologiczną lub odpornościową, stąd można jedynie przypuszczać, że większe bogactwo form genów na podstawie badanych loci może się przekładać na ogólnie większą zmienność genetyczną u osobników zdrowych, w porównaniu do drzew chorych, mniej zmiennych genetycznie.

Istnieje wiele danych literaturowych na temat zmienności genetycznej na poziomie osobniczym. Na podstawie wyników badań izoenzymatycznych stwierdzono, że drzewostany starszych klas wieku wykazują większą heterozygotyczność (czyli większą liczbę różnych form genów) niż drzewostany młode. Prawdopodobnie wynika to z przystosowania puli genowej do określonych warunków środowiska na drodze naturalnej selekcji [Kremer 2007]. Końcowym efektem takiej selekcji zachodzącej we wczesnych fazach wzrostu jest zwiększona różnorodność genetyczna drzewostanów dojrzałych. Zakłada się, że populacje o bardziej zróżnicowanym genotypie mają większe możliwości adaptacyjne wobec zmian zachodzących w ekosystemach leśnych [Mitton 1997]. Müller-Starck [1988] udowodnił pozytywną korelację pomiędzy poziomem heterozygotyczności u drzew a ich odpornością na zanieczyszczenia przemysłowe. W analizach tych, drzewa odporne były bardziej zróżnicowane, czyli posiadały dużą heterozygotyczność, niż drzewa wrażliwe, przy czym stopień odporności rósł wraz ze stopniem zanieczyszczenia środowiska.

Być może podobna tendencja istnieje w przypadku heterozygotyczności drzew i ich odporności na patogeny grzybowe i lęgniowce, chociaż mechanizmy odporności nie są jeszcze do końca poznane. Wiadomo, że bierze w nich udział szereg procesów fizjologicznych uwarunkowanych regulowaną ekspresją wielu genów [Nowakowska 2006b]. Na ekspresję genów mają wpływ czynniki zarówno biotyczne, jak i abiotyczne, które w dalszej konsekwencji wpływają na powstanie cech fenotypowych i odpornościowych, gwarantujących adaptację osobników do określonego środowiska [Kremer 2007].

Zróżnicowanie genetyczne drzew może mieć szczególne znaczenie w obserwowanych zmianach klimatycznych (globalne ocieplenie) i towarzyszących im ekstremalnym warunkom meteorologicznym, m.in. wysoka/niska temperatura, susze/powodzie. Oczekiwać można, że drzewa o wysokim poziomie heterozygotyczności lepiej przetrwają zachodzące zmiany i to właśnie one dadzą początek nowemu pokoleniu lasu.

Wnioski

- ✦ Głównymi sprawcami zmian chorobowych buków w Nadleśnictwie Siewierz są *Phytophthora citricola* i *P. cambivora*, powodujące uszkodzenia drobnych korzeni oraz rakowate zmiany i wysięki soków na korze pni.
- ✦ Jedynie dwa z trzech z badanych loci chloroplastowego DNA u buka wykazują polimorfizm w strukturze i częstości występujących alleli u buka w Nadl. Siewierz. Są to loci ccmp4 i ccmp10. Locus ccmp7 jest monomorficzny, gdyż nie wykazał żadnych różnic w strukturze i częstości alleli między drzewami zdrowymi i chorymi.
- ✦ Drzewa zdrowe posiadają odmienną w porównaniu do drzew chorych częstość występowania alleli loci ccmp4 i ccmp10. Niektóre allele występują wyłącznie u drzew zdrowych, a niektóre charakteryzują wyłącznie drzewa chore.
- ✦ Drzewa zdrowe charakteryzuje dwukrotnie większy ($h=0,243$) polimorfizm badanych loci chloroplastowych w porównaniu do drzew chorych ($h=0,113$). Zatem drzewa zdrowe posiadają większą gamę alleli cpDNA w porównaniu do drzew chorych.
- ✦ Obie grupy badanych drzew dzieli duży dystans genetyczny ($D_N=0,803$) wyznaczony na podstawie analiz UPGMA.
- ✦ Badana grupa 25 zdrowych buków jest aż w 56,3% bardziej zróżnicowana od grupy 25 drzew chorych. W związku z tym, podatność drzew na chorobę ma silne uwarunkowanie genetyczne.

Podziękowania

Autorzy dziękują Paniom Jolancie Bieniek i dr Małgorzacie Sułkowskiej z Zakładu Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa za pomoc w wykonaniu analiz laboratoryjnych oraz Panu mgr. inż. Jackowi Sieradzkiemu z Nadleśnictwa Siewierz za zbiór materiału roślinnego w terenie. Serdeczne podziękowania autorzy składają również na ręce prof. Leszka B. Orlikowskiego – kierownika Zakładu Ochrony Roślin w Instytucie Sadownictwa i Kwaciarnictwa w Skierniewicach, za pomoc w oznaczaniu wyizolowanych patogenów.

Literatura

- Aljanabi S. M., Martinez I. 1997. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based technologies. *Nucl. Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Brasier C. M., Beales P. A., Kirk S. A., Denman S., Rose J. 2005. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. *Mycol. Res.* 109: 853-859.
- Comps B., Gömöry D., Letouzey J., Thiébaud B., Petit R. 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157: 389-397.
- Eriksson G., Ekberg I. 2001. An introduction to forest genetics. SLU Repro, Uppsala, 2001. Sweden.
- Grivet D., Heinze B., Vendramin G. G., Petit R. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1: 345-349.
- Hartmann G., Blank R. 1998. Buchensterben auf zeitweise nassen Standorten unter Beteiligung von *Phytophthora*-wurzelfaule. *Forst. U. Holz* 53: 187-193.
- Jung T., Blaschke H. 1996. *Phytophthora* root rot in declining forest trees. *Phyton (Horn)* 36: 95-102.
- Jung T., Hudler G. W., Jensen Tracy S. L., Griffiths H. M., Fleischmann F., Osswald W. F. 2005. Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist* 19: 159-166.
- Jung T., Nechwatal J., Cooke D. E. L., Hartmann G., Blaschke H., Osswald W. F., Duncan J. M., Delatour C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov. a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycol. Res.* 107: 772-789.
- Kremer A. 2007. How well can existing forests withstand climate change? W: Koskela J., Buck A., Teissier du Cros [red.]. *Climate change and forest genetic diversity: Implications for sustainable forest management in Europe*. Biodiversity International, Rome, Italy. 3-17.
- Magri D., Vendramin G. G., Comps B., Dupanloup I., Geburek T., Gömöry D., Latalowa M., Litt T., Paule L., Roure J. M., Tantau I., van der Knaap W. O., Petit R., Beaulieu J. L. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: paleobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytol.* 171(1): 199-221.
- Mitton J. B. 1997. *Selection in natural populations*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Müller-Starek G. 1988. Genetic implications of environmental stress in adult forest stands. W: Scholtz F., Gregorius H. R., Rudin D. [red.]. *Genetic effects of air pollution in forest tree populations*, Springer Verlag, Berlin, Germany. 127-142.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 127-142.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- Nowakowska J. A. 2006a. Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. *Leś. Pr. Badaw.* 2006/1: 73-101.
- Nowakowska J. A. 2006b. Detekcja ekspresji genów drzew leśnych za pomocą mikromacierzy DNA. *Sylvan* 4: 33-43.
- Nowakowska J. A. 2007. Markery DNA i detekcja ekspresji genów jako nowe narzędzia badawcze w genetyce leśnej. W: Sierota Z. [red.]. *Quo vadis, Forestry? IBL, Sekocin Stary*. 486-496.
- Oleksiak M. F., Churchill G. A., Crawford D. L. 2002. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature genetics* 32: 261-343.
- Orlikowski L. B., Duda B., Szkuta G. 2004. *Phytophthora citricola* on European beech and silver fir in Polish forest nurseries. *J. Plant. Prot. Res.* 44(1): 57-64.
- Orlikowski L. B., Oszako T., Szkuta G. 2006. First record on *Phytophthora* spp. associated with the decline of European beech stand in south-west Poland. *Phytopathol. Pol.* 42: 37-46.
- Stamatoyannopoulos J. A. 2004. The genomic gene expression. *Genomics* 84: 449-457.
- Stępniewska H. 2005. *Phytophthora* spp. na siewkach buka w wybranych szkółkach leśnych Polski południowej. *Leśn. Pr. Bad.* 1: 45-52 (Supl.).
- Vettori C., Vendramin G. G., Anzidei M., Pastorelli R., Paffetti D., Giannini R. 2004. Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109: 1-9.

- Weising K., Gardner R. C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Wiejacha K., Szkuta G., Orlikowska T. 2002. Optimization of DNA isolation procedure as the first step in identification of *Phytophthora* spp. *Bull. Po. Acad. Sci. 50, Biol. Sci.* 3: 165-171.
- 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.

SUMMARY

Health condition and genetic differentiation level of beech in the Siewierz Forest District assessed with cpDNA markers

Genetic diversity ensures the survival of forest tree species, which can adapt and evolve under changing environmental conditions. Global warming also favours species of pathogens genus *Phytophthora*. Two species *P. cambivora* and *P. citricola* were identified causing fine root damage and necroses of stem tissues followed by exudates on the bark. The hypothesis that less diverse trees are more vulnerable to the attack of those pathogens was proposed. In order to check that, three loci of chloroplast microsatellites ccmp4, ccmp7 and ccmp10 have been investigated in the genetic differentiation study among 25 healthy and 25 damaged beech trees from the Siewierz Forest District (southern Poland).

Among studied microsatellite sequences only two loci, ccmp4 and ccmp10, have shown 66.6% of polymorphism, whilst the third one (ccmp7) has been monomorphic.

The healthy trees have harboured different frequencies of ccmp4 and ccmp10 alleles, and some of the alleles have been exclusively found in the healthy or the damaged beech trees. The healthy trees were twice as heterozygous ($h=0.243$) as the damaged ones ($h=0.113$). According to the UPGMA clustering, analysed beech trees groups have been separated by high genetic distance $D_N=0,803$.

More than 50% of gene diversity have differentiated the healthy trees from those sharing some disease symptoms. We can then presume that higher gene diversity at the level of a single tree is likely to be correlated with tree resistance against pathogens. This portioning of the heterozygosity level between healthy and damaged beech trees might be correlated to adaptation to environmental changes i.e. pathogen infections occurring in the stand.