

JANUSZ SABOR, MARIA JANEČZKO

Geograficzna zmienność zawartości wybranych monoterpenów w korze drzew sosny zwyczajnej

Wstęp i cel

Badanie zawartości monoterpenów u drzew leśnych jest istotnym elementem badań taksonomicznych i ewolucyjnych drzew leśnych. Substancje te odgrywają bowiem dużą rolę w analizach struktury genetycznej różnych gatunków iglastych (5).

Ponieważ skład monoterpenów jest silnie modyfikowany wraz z procesem starzenia się pączków, a jest względnie stabilny w tkankach drewna; praktycznie wszystkie studia nad strukturą populacji są wykonywane głównie przy użyciu tkanek korowych (kora + łyko), gdzie po okresie wzrostu skład terpenów jest praktycznie stały aż do następnego cyklu wzrostowego. Większość badaczy donosi również o względnie małych efektach rocznych cykli przyrostowych na skład monoterpenów w ksylemie i korze drzew. W przypadku sosny zwyczajnej są jednak doniesienia o znacznych zmianach składu olejku żywicznego w igłach (3, 5).

Zmienność geograficzna różnych ras na obszarze występowania gatunku jest analizowana głównie na podstawie histogramów uwidaczniających rozkład prawdopodobieństwa występowania określonych profili terpenowych. W przypadku sosny zwyczajnej jest to analiza częstotliwości genotypu z "wysokim" lub "niskim" Δ^3 karenem oraz α i β -pinenem. Allel kodujący niski poziom karenu jest recesywnym w porównaniu do dominującego allelu odpowiedzialnego za "wysoki" karen (8). Profile terpenowe badanych populacji drzew wyrażone mogą być również procentowym udziałem poszczególnych monoterpenów w odniesieniu do sumy monoterpenów lub też zawartością związku na jednostkę wagową analizowanej tkanki (9, 10). Największą zmienność w zasięgu występowania gatunku wykazują wg ich badań głównie α i β -pinen. Ten ostatni z uwagi na determinizm genetyczny jest ważnym markerem genetycznym wyróżniającym poszczególne odmiany i populacje cząstkowe sosny zwyczajnej. Wysoki procent zawartości α -pinenu stwierdzić można

w południowej części zasięgu z wyjątkiem Grecji; natomiast udział Δ^3 karenu jest względnie wysoki na północy. Pośród pochodzeń południowych proveniencji hiszpańskie określone przez Wrighta i Bulla (11) jako *Pinus sylvestris* var. *iberica* wyraźnie wyróżniają się wysokim poziomem α -pinenu. Sosna z południowej Francji (*P. sylvestris* var. *aquitana*) charakteryzuje się ekotypem o dużym udziale β -pinenu, natomiast z terenu północnych Włoch oraz Turcji i Gruzji (var. *armena*) myrcenem, a *P. sylvestris* var. *rhodopaea* β -pinenem i limonenem.

W Europie centralnej, odmiana niżowa sosny "haska" *P. sylvestris* var. "hagnensis" z południowo-zachodnich Niemiec oraz hercyńska z Wogezów, Czarnego Lasu i Rudaw charakteryzują się wysoką koncentracją Δ^3 karenu i β -pinenu oraz jednocześnie niską zawartością myrcenu i α -pinenu, jak też niewielkim udziałem β -felandrenu i terpinolenu.

Sosna zwyczajna z terenów Polski określana jako *Pinus sylvestris* var. *polonica* wykazuje w badaniach Tobolskiego i Hanovera (9) stosunkowo niską zawartość α - i β -pinenu (9,5 i 22,5%) względnie wysoki udział Δ^3 karenu oraz występowanie myrcenu (8,9%), limonenu (8,1%), β -felandrenu (6,4%) i terpinolenu (3,0%). W części północnej zasięgu występowania sosny zwyczajnej badania Tobolskiego oraz Tigerstedta i innych (8, 9) wskazują na dużą koncentrację Δ^3 karenu. Związek ten wykazuje klinalną zmienność w kierunku SW-NE przy występującej granicy tej ciągłości pomiędzy 63–64° szerokości geograficznej. Zakres zmienności pomiędzy drzewami wewnątrz poszczególnych populacji jest większy od zmienności międzypochodzeniowej. Daje się również zauważyć występowanie w warunkach północy tendencję drzew o lepszym wzroście do podniesionego poziomu Δ^3 karenu. Istnieje również zależność pomiędzy "profilami terpenowymi" pochodzeń sosny zwyczajnej, a ich reakcjami odpornościowymi i cechami morfologicznymi (10).

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, zagadnienie zmienności zawartości α - i β -pinenu oraz Δ^3 karenu i innych węglowodorów monoterpenowych w odniesieniu do polskich pochodzeń jest bardzo fragmentaryczne, podobnie jak nasza wiedza o wpływie na tę cechę efektu sezonowego (wieku).

Niniejsza praca jest kontynuacją badań nad zmiennością jakościową i ilościową monoterpenów w korze drzew w różnych cyklach przyrostowych i obejmuje populacje sosny z całej Polski. Badania te mają również na celu określenie głównych trendów zmienności geograficznej zawartości tych związków w korze sosny jej polskiego zasięgu występowania. Substancje te mogą być istotnymi markerami genetycznymi określającymi zasięg lokalnych ras sosny zwyczajnej w naszym kraju.

Materiał i metodyka

Zmienność zawartości monoterpenów: α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu w korze sosny badanych populacji 16 pochodzeń doświadczenia proveniencyjnego sosny w Polanach k. Grybowa określano dla przyrostu 1988, 1989 i 1992 r. Zawartość monoterpenów w korze drzew ustalono metodą chromatografii gazowej. Przygotowanie próbek, warunki analizy oraz sposób oznaczeń ilościowej i jakościowej zawartości α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu w badanych próbkach kory wykonano wg metodyki opisanej we wcześniejszej pracy (4). W przypadku analizy chromatograficznej monoterpenów w korze drzew próbnych po cyklu

przyrostowym 1991, wprowadzono modyfikację metodyczną polegającą na zastosowaniu kolumny ze stali nierdzewnej 3 m × 4 mm wypełnionej chromosorbem (HP) 80–100 MESH pokrytej 15% Carbowaxem 20 M. W tym przypadku temperatura pracy wynosiła 100°C, temperatura dozownika i detektora 150°C. Zastosowano gaz nośny azot 1 kPAA, wodór 18 ccm/min, powietrze 400 ccm/min, przy czułości 1:100, tłumieniu sygnału 1:100 oraz przesuw taśmy rejestracyjnej 0,5 cm/min.

Zawartość badanych monoterpenu w korze drzew próbnych (po 3 drzewa w pochodzeniu) wyrażono procentowym udziałem poszczególnych związków w odniesieniu do wszystkich węglowodorów monoterpenu. Szczegółowy opis powierzchni doświadczalnej zawierają prace Chodzickiego (1, 2).

Zmienność geograficzną zawartości monoterpenu w korze sosen zobrazowano mapami przeglądowymi.

Na podstawie uzyskanych wyników oceniono moc dyskryminacyjną cechy poziomu występowania monoterpenu w korze drzew oraz ustalono podobieństwo pochodzeń na podstawie wielozmiennej analizy wariancji z jednym kierunkiem klasyfikacji w modyfikacji i zastosowaniu praktycznym programu ANWIEL (7).

TABELA 1

Procentowy udział α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu w ogólnej zawartości węglowodorów monoterpenu w korze sosen pochodzeń doświadczenia proveniencyjnego w Polanach k. Grybowa

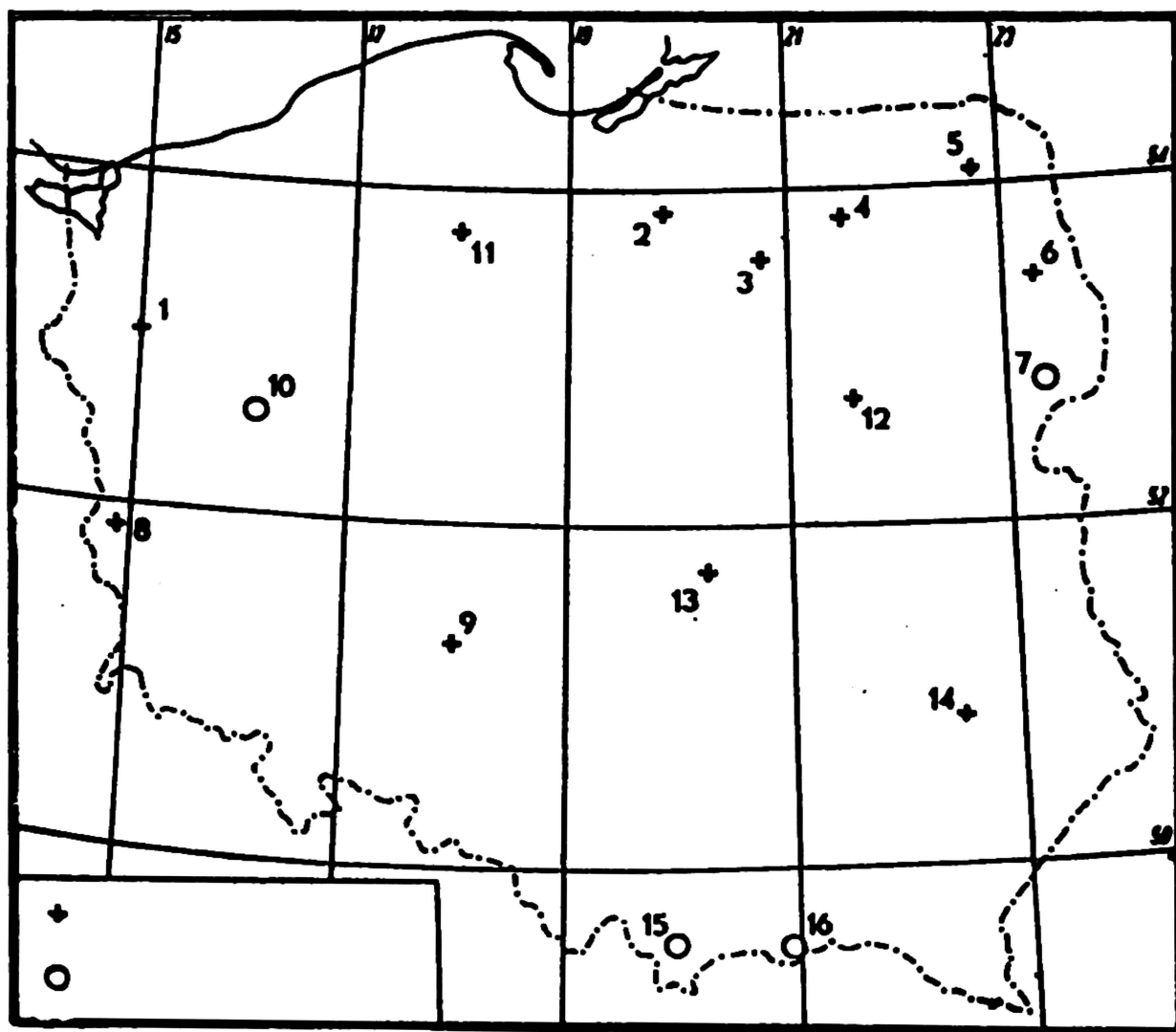
Nr pochodzenia	Nazwa pochodzenia	Średni udział procentowy w rocznym cyklu wegetacyjnym					
		α -pinen		β -pinen		Δ^3 - karenu	
		%	ϕ	%	ϕ	%	ϕ
1	Karsko	10,1	18,49	4,5	12,28	67,0	54,94
2	Tabórz	8,7	17,12	4,4	12,13	69,6	56,53
3	Dłużek	11,8	20,13	6,8	15,16	61,5	51,65
4	Ruciane	11,3	19,67	5,1	13,07	59,6	50,53
5	Rozpuda	13,7	21,73	3,5	10,81	46,4	42,91
6	Supraśl	10,5	18,87	4,4	12,04	62,8	51,84
7	Starzyna	7,9	16,34	3,7	11,16	75,3	60,20
8	Gubin	12,8	20,97	5,0	12,91	45,7	42,55
9	Rychtal	11,7	19,96	5,6	13,64	55,0	47,87
10	Bolewice	6,3	14,49	3,3	10,48	80,1	63,54
11	Lipowa	7,9	16,31	4,6	12,41	68,3	55,74
12	Jegiel	11,2	19,55	4,0	11,52	60,1	50,85
13	Spała	15,1	22,87	2,7	9,39	63,8	53,00
14	Janów Lubelski	12,2	20,48	6,6	14,86	46,4	42,92
15	Nowy Targ	6,3	14,55	3,7	11,08	70,2	56,89
16	Piwniczna	6,7	15,03	3,6	10,90	72,4	58,25
	<i>x</i>	10,1	18,54	4,4	12,12	63,0	52,51
	<i>S</i>	–	2,53	–	1,51	–	6,01
	<i>V%</i>	–	13,4	–	12,1	–	11,5

W celu zbadania, w jaki sposób zawartość monoterpenu różnicuje badane populacje sosny, obliczono odległości Δ^2 Mahalanobisa, będące wskaźnikami odległości (zróżnicowania) pochodzeń wg ograniczeń programu ANWIEL (7).

Granice podobieństw pochodzeń wyznaczono metodą dendrytów zbudowanych na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa średniego udziału procentowego monoterpenu w korze drzew próbnych poszczególnych badanych populacji.

Wyniki badań

Charakterystykę najważniejszych biochemicznych związków markerowych jakimi są α i β -pinen oraz Δ^3 karen przedstawia tabela 1. Jak wynika z zamieszczonych w tabeli danych, największym średnim rocznym procentem α -pinenu w ogólnej zawartości monoterpenu w korze charakteryzowały się drzewa próbne proveniencji Dłużek, Ruciane, Rozpuda, Supraśl, Gubin, Rychtal, Jegiel, Spała, Janów Lubelski, natomiast do pochodzeń o naj-

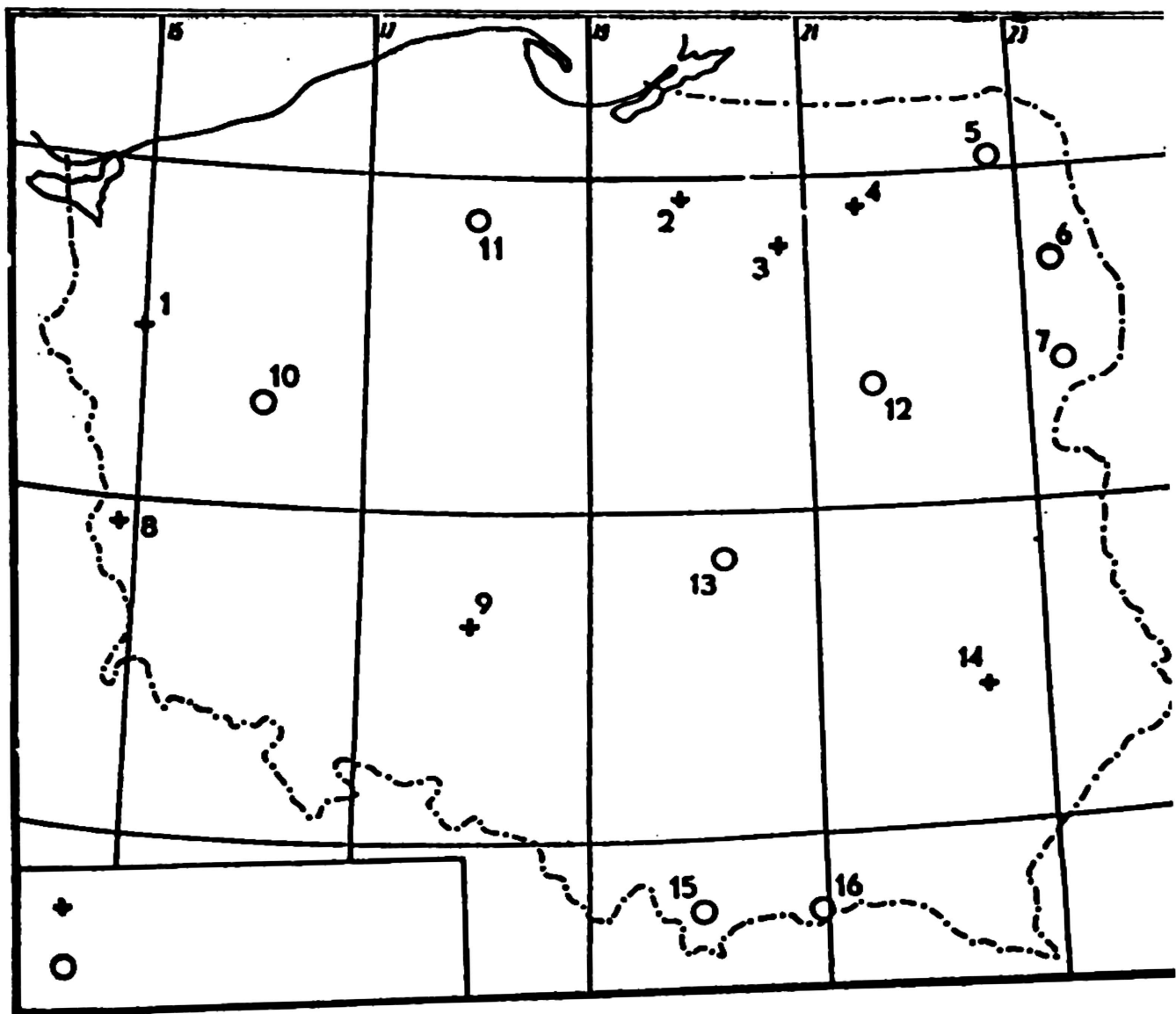


RYC. 1. Geograficzna zmienność przeciętnego udziału α -pinenu w składzie monoterpenu kory sosny doświadczenia proveniencyjnego w Polanach k/Grybowa; + — procent udziału powyżej średniej; 0 — procent udziału poniżej średniej; 1-16 — numeracja pochodzeń wg Chodzickiego (1, 2)

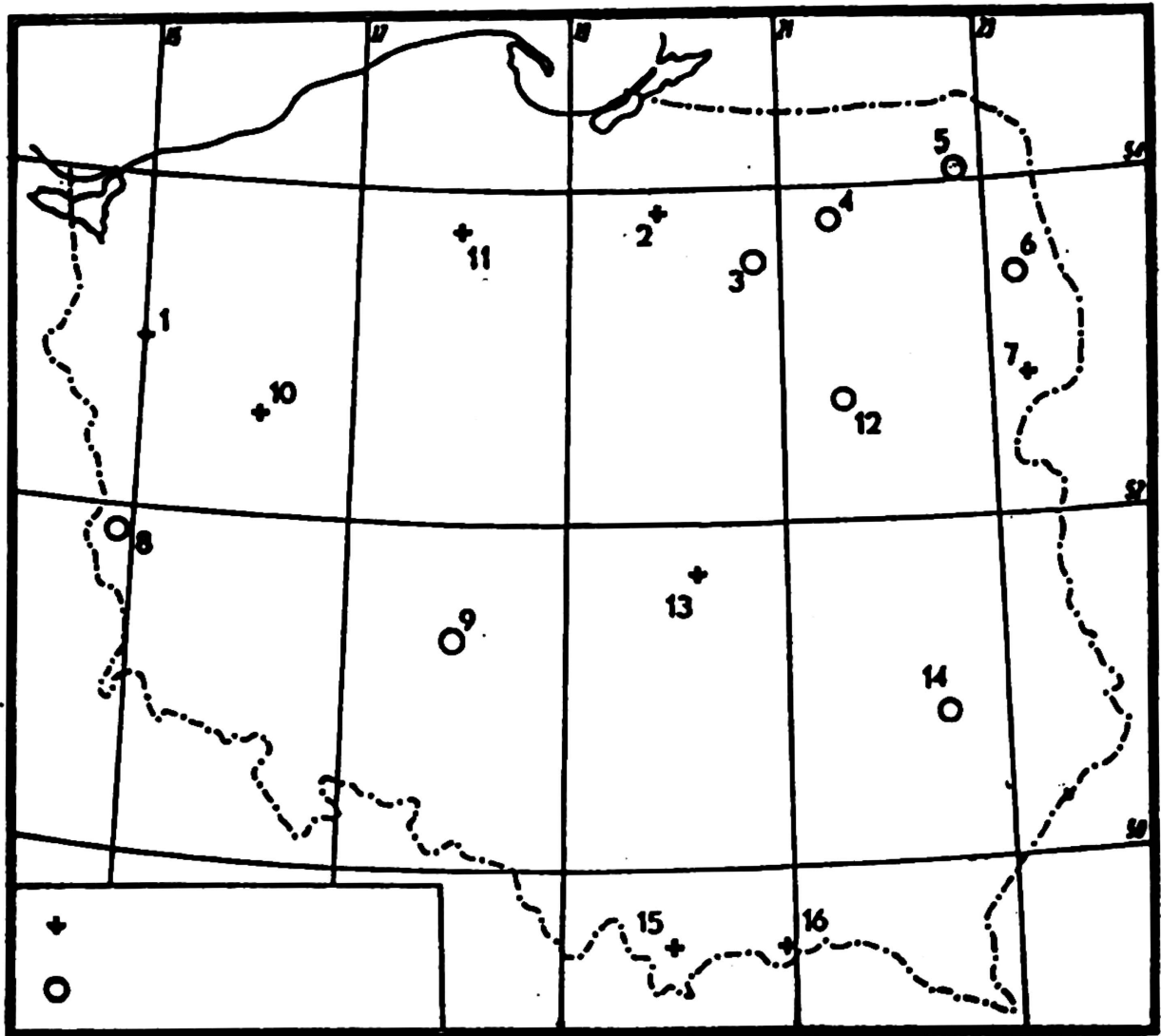
mniejszym udziale procentowym pinenu należy zaliczyć m.in. górskie sosny z Nowego Targu i Piwnicznej (ryc. 1).

Dużym udziałem β -pinenu odznaczały się sosny pochodzeń z Karska, Taborza, Dłużka, Rucianego, Gubina, Rychtała, Lipowej, Janowa Lubelskiego. Do grupy pochodzeń o zdecydowanie niskim udziale tego związku zaliczają się sosny pochodzeń: Rozpuda, Bolewice, Spała oraz górskie z Nowego Targu i Piwnicznej (ryc. 2).

Większą zawartością od średniej Δ^3 karenu w korze drzew charakteryzowały się sosny populacji cząstkowych z Karska, Taborza, Starzyny, Bolewic, Lipowej, Spały oraz górskie pochodzenia z Nowego Targu i Piwnicznej. Najniższym procentem przeciętnej zawartości tego związku odznaczały się drzewa próbne z Gubina, Rozpudy, Janowa Lubelskiego, oraz Rucianego, Rychtała i Dłużka (ryc. 3).



RYC. 2. Geograficzna zmienność przeciętnego udziału β -pinenu w składzie monoterpenów kory sosen doświadczenia proveniencyjnego w Polanach k/Grybowa; + — procent udziału powyżej średniej; O — procent udziału poniżej średniej; 1–16 — numeracja pochodzeń wg Chodzickiego (1, 2)



RYC. 3. Geograficzna zmienność przeciętnego udziału Δ^3 — karenu w składzie monoterpenów kory sosen doświadczenia proveniencyjnego w Polanach k/Grybowa. + — procent udziału powyżej średniej, o — procent udziału poniżej średniej; 1–16 — numeracja pochodzeń wg Chodzickiego

Ocenę stopnia dyskryminacji pojedynczych cech oraz ich grup konfiguracji określoną na podstawie wartości D^2 przedstawiono w tabeli 2. Jak wynika z analizy wartości D^2 , statystyki lambda oraz wartości F , żadna konfiguracja cech nie miała istotnej statystycznie mocy dyskryminacyjnej badanej populacji sosny zwyczajnej z Polan k. Grybowa. Konfiguracja cech udziału monoterpenów w korze drzew wykazywały oddzielne dla lat 1988 i 1989 stosunkowo małą dyskryminację pod względem badanej cechy.

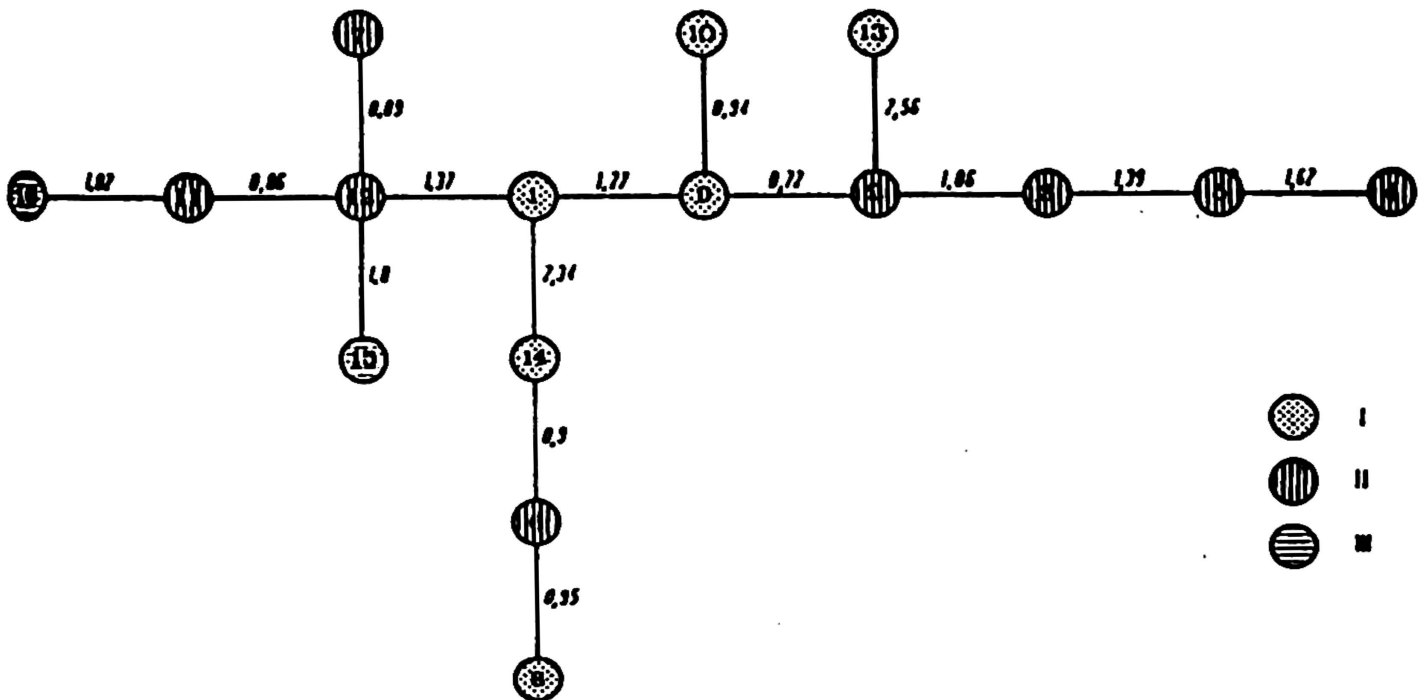
Przedstawiony dla przyrostu 1988 roku dendryt, zbudowany na podstawie najkrótszych odległości Mahalanobisa, wykazuje brak istotnych różnic pomiędzy grupami pochodzeń. Daje się natomiast zauważyć podobieństwo pomiędzy pochodzeniami Tabórz, Dłużek, Rozpuda, Ruciane grupy mazursko-podlaskiej, jak również wyraźna segregacja sosen pochodzeń górskich z Piwnicznej i Nowego Targu.

Podobne zależności obrazują dendryty określające moc dyskryminacyjną konfiguracji monoterpenów w innych latach okresu badawczego.

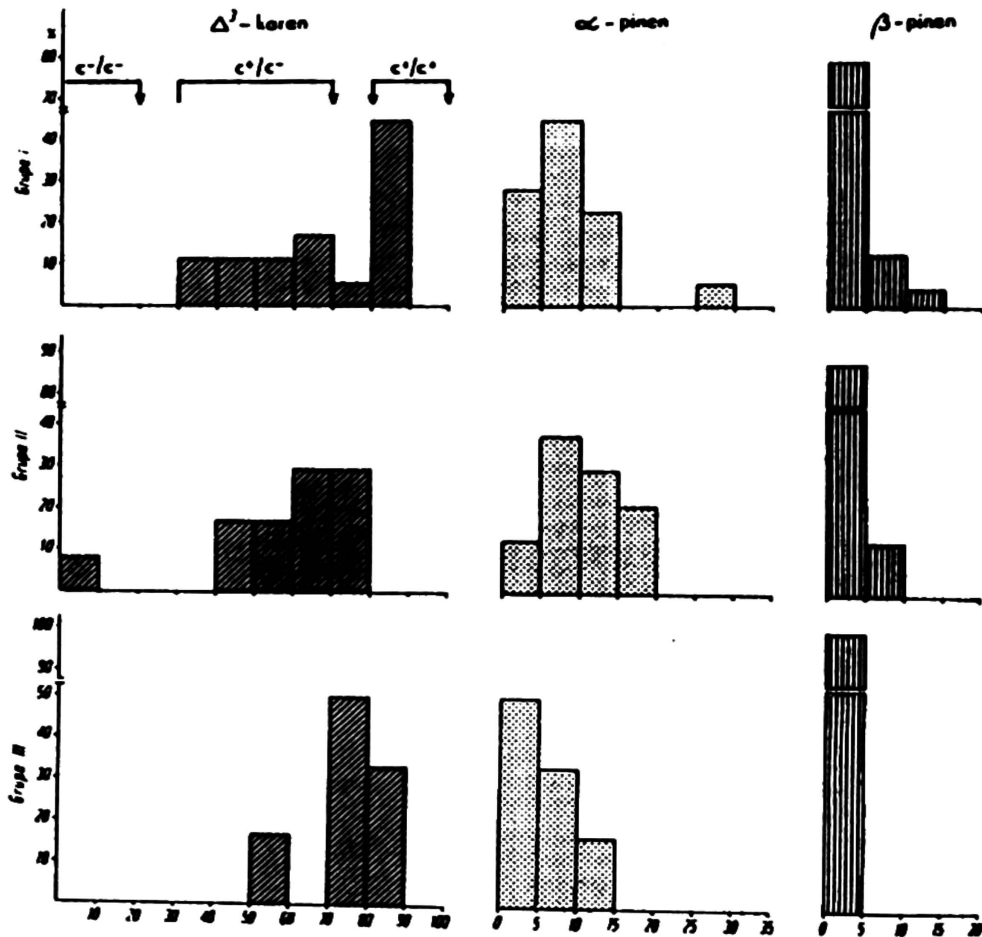
TABELA 2

Ocena siły dyskryminacyjnej wybranych cech sosny zwyczajnej doświadczenia proveniencyjnego w Polanach k/Grybowa. Wg [7]

Grupa cech	Konfigu- -racja cech	D ² obl.	Statystyka lambda	Wartość F	Stopień swobody	F _{tob.}
Udział monoterpenów (1988)	1	0,73				F _{0,05} =1,49
	2	0,73				
	3	0,53				F _{0,01} =1,76
α-pinen(1)	1,2	0,51	0,219	1,350	45 91	
β-pinen(2)	1,3	0,37				F _{0,10} =1,39
Δ ³ -karen(3)	2,3	0,31				
<hr/>						
Udział monoterpenów (1989)	1	0,51				F _{0,05} =1,49
	2	0,65				
	3	0,66				F _{0,01} =1,76
α-pinen	1,2	0,35	0,220	1,343	45 91	
β-pinen(2)	1,3	0,34				F _{0,10} =1,39
Δ ³ -karen	2,3	0,40				



RYC. 4. Dendryt pochodzeń doświadczenia proveniencyjnego sosny zwyczajnej w Polanach k/Grybowa określony na podstawie najmniejszych odległości Mahalanobisa, grupa cech — zawartość monoterpenów w korze sosen. Rok 1988. I, II — grupy pochodzeń niżowych, III — pochodzenia górskie, 1-16 — numeracja pochodzeń wg Chodzickiego



RYC. 5. Rozkład frekwencji drzew z "niskim" c^-/c^- i wysokim c^+/c^+ Δ^3 -karenem oraz zróżnicowanym udziałem α - i β -pinenu w tkance korowej. Rok 1988. I, II, III — grupy klimatyczne pochodzeń (III grupa — pochodzenia górskie z 16 — Piwnicznej i 15 Nowego Targu); wg (6)

Segregację tę potwierdza też analiza rozkładu frekwencji drzew z "niskim" $[c^-/c^-]$ i wysokim $[c^+/c^+]\Delta^3$ -karenem w populacjach lasów doświadczalnych pochodzących z różnych stref klimatycznych (ryc. 5) [6].

Dyskusja i wnioski

W porównaniu do badań Tobolskiego i Hanovera oraz Wrighta (9, 10) poziom α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu w korze drzew próbnych polskich pochodzeń różnił się istotnie. W badaniach tych poziom pinenu był znacznie wyższy (22,5%), natomiast Δ^3 karenu niższy (34,0%). Dla α - i β -pinenu przeprowadzone badania określają podobny procent średniorocznego udziału procentowego tego składnika monoterpenowego (9,5 i 10,1%). Udział Δ^3 karenu w korze sosen był bardziej zbliżony do poziomu określonego u Tigerstedta (8) dla populacji z północnego zasięgu występowania gatunku.

Analiza geograficznej zmienności poziomu zawartości pojedynczych składników monoterpenowych w korze drzew próbnych badanych pochodzeń, jak też siły dyskryminacyjnej ich konfiguracji nie wykazała wyraźnych trendów geograficznego zróżnicowania się tej cechy.

Niemniej jednak w całej badanej populacji, zdecydowanie wyróżniają się populacje górskie, które charakteryzują się małym udziałem α - i β -pinenu oraz wysokim Δ^3 karemem. Potwierdzają to również analizy dendrologiczne. Sosny pochodzeń zachodnich i północnych wykazują zwiększający się trend zawartości Δ^3 karenu. Wydaje się jednak, że zawartość tych związków nie daje na obecnym etapie analiz, podstaw do wyróżniania ras w niżowym zasięgu występowania gatunku. Badania potwierdzają natomiast istotność wyodrębnienia sosny tzw. *Pinus sylvestris* var. *polonica* w ramach subpopulacji sosny europejskiej wyróżnionej w swoich badaniach przez Tobolskiego. Potwierdzają się również oceny Tigerstedta i innych o klinalnej zmienności Δ^3 karenu w kierunku północnym.

Na podstawie uzyskanych wyników można przedstawić następujące wnioski:

- Pochodzenia górskie wyraźnie odbiegają od pozostałych małą zawartością α i β -pinenu oraz dużym udziałem Δ^3 karenu. Porównanie procentu zawartości w korze drzew próbnych badanych proveniencji sosny zwyczajnej z Polan k. Grybowa wskazuje również na większy udział Δ^3 karenu u sosen północnych, nizinnych pochodzeń przy czym ogólny trend tej zmienności nie ma wyraźnych prawidłowości.
- Badania potwierdzają rolę związków monoterpenu α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu jako istotnych markerów biochemicznych i genetycznych różnicujących niżowe i górskie rasy polskiej sosny zwyczajnej.
- Na podstawie analizy poziomów zawartości α i β -pinenu oraz Δ^3 karenu można potwierdzić istotność wyodrębnienia (w ramach populacji centralno-europejskiej) sosny polskiej, *Pinus sylvestris* var. *polonica* (Tobolski, Hanover) (9). Niemniej, populacja ta nie obejmuje pochodzeń górskich.

Literatura

1. **Chodzicki E.** Badania proveniencyjne nad wzrostem *Pinus sylvestris* L. z terenów PRL w reglu dolnym Karpat w latach 1966–1972. "Zesz. Nauk. AR w Krakowie", Leśnictwo, nr 11, 1978, s. 23–36.
2. **Chodzicki E.** Wstępne wyniki uprawy porównawczej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) różnych pochodzeń krajowych w reglu dolnym Beskidu Sądeckiego. "Sylwan" nr 2, 1975, s. 1–13.
3. **Juvonen S.** Über die terpenbiosynthese-beeinflussenden Faktoren in *Pinus sylvestris* L. "Acta Boton. Fenn." nr 71, 1966, s. 1–92.
4. **Sabor J.** Wstępna ocena biochemicznego poliformizmu polskich pochodzeń sosny zwyczajnej na podstawie analizy zawartości monoterpenu w korze drzew. "Sylwan", nr 10, 1991, s. 37–42.
5. **Squillace A.E.** Analyses of monoterpenes of Conifers by Gas-Liquid Chromatography. W: Modern methods in forest genetics. Berlin Heidelberg, New York 1976, Springer Verlag.

6. **Sabor J.** Zmienność sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i hodowlana wartość jej polskich proveniencji w warunkach siedliskowych Beskidu Sądeckiego. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie. Rozprawa habilitacyjna. Nr 185 Kraków 1993.
7. **Stanuch H.** Programy użytkowe analizy wariancji dla układu krzyżowego nieortogonalnego z dwoma czynnikami (ZBIOR) oraz oceny mocy dyskryminacyjnej cech (ANWIEL). Zakład Informatyki AM w Krakowie 1990.
8. **Tigerstedt P.M.A., Hiltunen R., Chung M.S., Moren E.** Inheritance and genetic variation of monoterpenes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) W: Proc. Conf. on Biochemical Genetics of Forest Trees. Umea 1978, s. 29–39.
9. **Tobolski J.J., Hanover J.W.** Genetics Variation in the Monoterpenes of Scotch Pine. "Forest Sci", nr 17, 3, m 1971, s. 293–299.
10. **Wright J.W.** Introduction to Forest Genetics. New York, San Francisco, London 1976, Academic Press.
11. **Wright J.W., Bull W.I.** Geographic Variation in Scots Pine. "Silv. Genet.", nr 12(1), 1963, s. 1–25.

*Z Zakładu Nasiennictwa, Szkółkarstwa i Selekcji Drzew Leśnych
Akademii Rolniczej w Krakowie*