

KORNELIA POŁOK, TOMASZ ZWIJACZ-KOZICA, ROMAN ZIELINSKI

Weryfikacja pochodzenia drzewiastych form kosodrzewiny na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego na podstawie polimorfizmu miejsc insercji transpozonów*

Origin assessment of woody mountain pine forms in the Tatra National Park based on transposon insertional polymorphism

ABSTRACT

Polok K., Zwijacz-Kozica T., Zielinski R. 2016. Weryfikacja pochodzenia drzewiastych form kosodrzewiny na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego na podstawie polimorfizmu miejsc insercji transpozonów. Sylwan 160 (7): 573-581.

Closely related *Pinus* species, mountain pine (*Pinus mugo* Turra) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), belong to native woody species in the Tatra National Park (TPN, southern Poland). Their occurrence in close proximity can lead to the formation of natural hybrids known as *Pinus × rhaetica*, which is a woody, often polycormic form. *Pinus × rhaetica* is described in the TPN, but there has been a great deal of disagreement over its origin. The goal of the studies was to verify the taxonomic status of individuals identified as *Pinus × rhaetica* that grew in the eight stands together with *P. mugo* and *P. sylvestris* by SSAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism) analysis of transposon insertional polymorphism. In total, 34 *Pinus × rhaetica*, 25 *P. mugo* and 27 *P. sylvestris* individuals were tested in addition to 20 individuals of *P. uliginosa* from 'Torfowisko pod Węglińcem' and 'Wielkie Torfowisko Batorowskie' as well as 25 individuals of *P. uncinata* from the Austrian Alps as the control groups. Four transposon sequences were employed: a DNA transposon from the CACTA family, *Tpo* and retrotransposons – two *gypsy* (*Ogre*, *IFG7*) and one *copia* like (*Bare*). All species belonging to the *Pinus mugo* complex are highly variable with 49-81% polymorphic loci and genetic diversity, H_T equals 0.228-0.307 with the highest values in *Pinus × rhaetica*. Surprisingly, *P. sylvestris* proves to be the least variable species, likely because of a narrow gene pool in small, scattered stands in the Tatras. Very low Nei's genetic similarities between *P. sylvestris* and *Pinus mugo* complex, especially in comparison with *P. uliginosa* ($I=0.548$) and *P. mugo* ($I=0.558$) exclude unequivocally the possibility of spontaneous hybridization among these taxa. Thus, it undermines the hypothesis about hybrid origin of *Pinus × rhaetica* in the Tatras. It proves to be a morphological form of *P. mugo* as assessed from the Nei's coefficient, $I=0.985$ which is well within a range of conspecific populations. Finally, none of the studied individuals of *Pinus × rhaetica* are derived from seeds of Alpine *P. uncinata*.

KEY WORDS

Pinus × rhaetica, DNA markers, SSAP, genetic similarity

ADDRESSES

Kornelia Polok ^(1,3) – e-mail: korneliapolok@e-gene.eu
 Tomasz Zwijacz-Kozica ⁽²⁾ – e-mail: tzwijacz@tpn.pl
 Roman Zielinski ⁽³⁾

*Badania sfinansowano ze środków funduszu leśnego Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe.

⁽¹⁾ Centre for Evolution, Genomics and Bioinformatics; Herrenhäuser Str. 2, D-30419 Hannover, Niemcy

⁽²⁾ Tatrzański Park Narodowy; Kuźnice 1, 34-500 Zakopane

⁽³⁾ Samodzielny Zakład Genetyki i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski; ul. Hozjusza 15, 11-041 Olsztyn

Wstęp

Blisko spokrewnione sosny dwuigielne: kosodrzewina (*Pinus mugo* Turra) oraz sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) należą do rodzimych gatunków drzewiastych występujących na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego (TPN). Kosodrzewina tworzy własne piętro roślinne powyżej górnej granicy lasu, na wysokości 1550-1800 m n.p.m. [Piękoś-Mirkowa, Mirek 1996]. Pojawia się także w obu leśnych piętrach reglowych, w formie azonalnych skupień przywiązanych do miejsc skalistych i torfowisk, także tych położonych w podtatrzańskich kotlinach. Sosna zwyczajna w Tatrach znana jest przede wszystkim ze stanowisk reliktowych na dolomitowych skałkach w reglu dolnym, rzadziej w reglu górnym [Zwijacz-Kozica 1998a]. Znane są także jej pojedyncze stanowiska ponad górną granicą lasu, aż po 1720 m n.p.m. [Zwijacz-Kozica 2012].

Występowanie blisko spokrewnionych gatunków w obrębie tych samych stanowisk może prowadzić do ich hybrydyzacji. Możliwość powstawania naturalnych mieszańców sosny zwyczajnej i kosodrzewiny, określanych łacińską nazwą *Pinus × rhaetica* Brügger, wskazywana jest od kilkudziesięciu lat [Christensen 1987]. W polskiej literaturze naukowej takson ten pod nazwą sosna drzewokosa pojawił się po raz pierwszy w 1993 roku [Staszkiwicz 1993]. W 2001 roku *Pinus × rhaetica*, pod polską nazwą sosna błotna, wystąpiła na liście roślin objętych ochroną gatunkową [Rozporządzenie... 2001], zastępując wcześniej używane nazwy łacińskie *Pinus uliginosa* [Rozporządzenie... 1983] i *Pinus uliginosa*=*Pinus mugo* ssp. *rotundata* [Rozporządzenie... 1995]. *Pinus × rhaetica* wykazywana jest także w Tatrzańskim Parku Narodowym [Staszkiwicz 1996, 2001; Zwijacz-Kozica 1998b], jednak jej pochodzenie jest przedmiotem kontrowersji. Pod tą nazwą opisane zostały bowiem także osobniki rosnące na zboczu Sarniej Skały, w Dolinie Białego, znane wcześniej jako pochodząca z alpejskich nasion sosna hakowata (*P. uncinata*) [Stecki 1952; Pawłowski 1956; Radwańska-Paryska 1975; Horvath i in. 1980].

Rozstrzygnięcie kwestii, czy rosnące w Tatrach drzewiaste, często polikormiczne formy kosodrzewiny są taksonem obcym, pochodzącym z Alp, czy też naturalnym, objętym ochroną gatunkową mieszańcem sosny zwyczajnej i kosodrzewiny, jest istotne ze względu na ich skrajnie odmienny status ochronny. Stosowane do tej pory metody morfologiczne, enzymatyczne oraz analiza wybranych sekwencji DNA organellowego i jądrowego nie różnicowały jednoznacznie gatunków sosen i tym samym uniemożliwiały ustalenie pochodzenia osobników podejrzewanych o mieszańcowy charakter [Bobowicz i in. 2000; Heuertz i in. 2010]. Najnowsze badania przeprowadzone na wielu gatunkach roślin i zwierząt wykazały, że jednymi z najefektywniejszych systemów markerowych są systemy oparte o ruchome elementy genetyczne – transpozony [Polok 2007]. Występują one powszechnie w genomach roślin i charakteryzują się zmiennością pod względem liczby kopii i lokalizacji miejsc insercji u blisko spokrewnionych gatunków. Odgrywają również istotną rolę w różnicowaniu się gatunków [Vershinin i in. 2003; Polok 2007], zwłaszcza w odpowiedzi na stresowe warunki środowiska [Kalendar i in. 2000], w tym wynikające z działania mutagenów [Polok, Zielinski 2011], a także są głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zmienność rozmiarów genomu, m.in. w rodzaju *Pinus* [Morse i in. 2009]. Jedną z najbardziej czułych metod analizy transpozonów jest metoda SSAP (ang. Sequence Specific Amplification Polymorphism), w której produkty amplifikacji są komplementarne do fragmentu DNA pomiędzy

sekwencjami powtarzalnymi znajdującymi się na końcach transpozonów a miejscem restrykcyjnym w sekwencji flankującej. Dzięki temu technika SSAP umożliwia identyfikację miejsc insercji (loci) elementów ruchomych. Obecność transpozonu w danym miejscu insercji jest cechą dominującą, widoczną jako prążek na żelu.

Celem badań była weryfikacja przynależności gatunkowej osobników o fenotypie sosny drzewokosej (*Pinus × rhaetica*) występujących na stanowiskach tatrzańskich wraz z kosodrzewiną i sosną zwyczajną w oparciu o analizę miejsc insercji transpozonów metodą SSAP. Ponadto podjęto próbę oceny, czy niektóre z badanych form mogą pochodzić z alpejskich nasion sosny hakowatej (*Pinus uncinata*).

Materiał i metody

Łącznie analizowano 86 prób sosen z 8 stanowisk na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego. Weryfikacji poddano 34 osobniki sosny drzewokosej podejrzewane o mieszańcowy charakter. Najwięcej prób pochodziło z Doliny Białego, z populacji opisanej jako pochodząca z alpejskich nasion i zidentyfikowanej jako *Pinus × rhaetica* przez Staszkiwicza [1996]. Ponadto zebrano osobniki pochodzenia naturalnego rozproszone na skałkach śródroglowych od Doliny Chochołowskiej po Dolinę Rybiego Potoku oraz z populacji powstałych z nasadzeń dokonanych w drugiej połowie XX wieku w Dolinie Jaworzynki [Zwijacz-Kozica 1998b]. Kosodrzewina (*P. mugo*) była reprezentowana przez 25, a sosna zwyczajna (*P. sylvestris*) przez 27 prób zebranych w bezpośrednim otoczeniu sosny drzewokosej. Dodatkowo, jako kontrolę w badaniach, wykorzystano inne taksony należące do kompleksu *Pinus mugo* – po 10 prób sosny błotnej (*P. uliginosa* Neumann ex Wimmer) z Torfowiska pod Węglińcem i Wielkiego Torfowiska Batorowskiego oraz 25 prób sosny hakowatej – *P. uncinata* (Ramond ex DC.) Domin. z 5 stanowisk w Alpach austriackich.

DNA izolowano z 2 g igieł metodą CTAB z modyfikacjami dla sosen [Androsiuk i in. 2011]. W analizie SSAP wykorzystano cztery startery komplementarne do sekwencji transpozonów w kombinacji z dwoma enzymami restrykcyjnymi, *Pst*I oraz *Mse*I – *Tpo*/*Pst*AT, *Bare*/*Pst*AT, *Ogre*/*Pst*AT i *IFG7*/*Mse*C. Starter *Tpo* jest komplementarny do transpozonów DNA z grupy CACTA, które występują w genomach roślin w dużej liczbie kopii, startery *Bare* i *Ogre* są specyficzne dla roślinnych retrotranspozonów, odpowiednio typu *copia* i *gypsy*. Starter *IFG7* jest komplementarny do retrotranspozonu *gypsy* pochodzącego z *Pinus taeda*. Analizę SSAP prowadzono według standardowej metodyki z modyfikacjami dla roślin o dużych genomach [Polok 2007; Polok, Zielinski 2011]. W celu oceny zmienności genetycznej dla każdego gatunku i stanowiska obliczono procent loci polimorficznych (P), średnią liczbę alleli w locus (A), efektywną liczbę alleli w locus (E), heterozygotyczność oczekiwaną w populacji (H) i dla gatunku (H_T) oraz współczynnik wsobności dla populacji (F_{IT}) i gatunku (F_{ST}). Pochodzenie prób sosny drzewokosej określono na podstawie podobieństwa genetycznego Nei'a (I), które posłużyło także do wykreślenia dendrogramów metodą UPGMA. Wszystkie parametry obliczono, wykorzystując wzory podane przez Nei'a [1987]. Istotność różnic pomiędzy parametrami oceniono na podstawie analizy wariancji (ANOVA) w programie Statistica.

Wyniki

U badanych sosen zidentyfikowano 172 loci SSAP będące miejscami insercji transpozonów. Najwięcej miejsc insercji wykryto dla transpozonu DNA z grupy CACTA, *Tpo* (109 loci). Retrotranspozony *Bare* (*copia*) i *Ogre* (*gypsy*) występowały w niższej liczbie kopii, odpowiednio 32 i 21, natomiast najmniej miejsc insercji (10 loci) obserwowano dla retrotranspozonu typu *gypsy*, *IFG7*.

Wysoki polimorfizm mierzony wszystkimi parametrami, a więc procentem loci polimorficznych (P), średnią liczbą alleli (A) oraz efektywną liczbą alleli w locus (E), cechował taksony z kompleksu *Pinus mugo* (tab. 1). Wartości powyższych parametrów dla tej grupy gatunków były nawet dwukrotnie wyższe niż dla sosny zwyczajnej. Przykładowo średnio 64% miejsc insercji transpozonów było polimorficznych w kompleksie *Pinus mugo*, podczas gdy sosna zwyczajna miała ich tylko 34%. Podobnie wartości zróżnicowania genetycznego (H_T) dla gatunków kompleksu *Pinus mugo* mieściły się w zakresie 0,228-0,307 i były blisko dwukrotnie wyższe w porównaniu z sosną zwyczajną ($H_T=0,151$). W obrębie kompleksu *Pinus mugo*, najbardziej zmienna była sosna drzewokosa, u której aż 81% miejsc insercji było polimorficznych, co znalazło odzwierciedlenie w najwyższej średniej liczbie alleli (1,81) oraz efektywnej liczbie alleli w locus (1,56), a także w zróżnicowaniu genetycznym ($H_T=0,307$). Sosna błotna oraz kosodrzewina charakteryzowały się podobnym poziomem zmienności (P=65 i 64% oraz $H_T=0,281$ i 0,272), natomiast najniższy polimorfizm obserwowano u sosny hakowatej (P=49%, $H_T=0,228$). U wszystkich gatunków osobniki zebrane z poszczególnych stanowisk reprezentowały większość zmienności obserwowanej dla gatunku, od 87,2% u sosny hakowatej ($F_{ST}=0,128$) do 94,2% u sosny błotnej ($F_{ST}=0,058$).

Zmienność genetyczna w obrębie poszczególnych stanowisk odpowiadała wartościom obserwowanym na poziomie gatunków. I tak najwyższe wartości parametrów stwierdzono dla stanowisk sosny drzewokosej, a najniższe – sosny zwyczajnej (tab. 1). Najwięcej polimorficznych miejsc insercji (P=69-74%) i najwyższe zróżnicowanie ($H=0,282$ -0,304) stwierdzono u *Pinus × rhaetica* z Sarniej Skały (R5), Kazalnicy w Dolinie Białego (R6n i R6s) oraz z okolic Polany Olczyńskiej, Boczania i Jaworzynki (R10n i R10s). Stanowiska te reprezentowały niemal 100% zmienności gatunku ($F_{IT}=0,012$ -0,080). Warto zaznaczyć, że również kosodrzewina z rejonu Sarniej Skały (M5) i Doliny Białego (M6 i M7) charakteryzowała się stosunkowo wysokim poziomem zmienności (P=60-62%, $H=0,253$ -0,269). Natomiast analiza wariancji (ANOVA) potwierdziła brak istotnych różnic w wartościach parametrów zmienności genetycznej u osobników sosny drzewokosej pochodzących z prawdopodobnych nasadzeń i natywnych (stanowiska R6n i R6s oraz R10n i R10s).

Badane taksony charakteryzowały się podobieństwem genetycznym wyrażonym współczynnikiem Nei'a w zakresie 0,548-0,985 (tab. 2). Najwyższe podobieństwo genetyczne stwierdzono pomiędzy *Pinus × rhaetica* a *P. mugo* (0,985) oraz *P. uliginosa* (0,953), a także pomiędzy *P. mugo* i *P. uliginosa* (0,945), co klasyfikuje te trzy taksony jako jeden gatunek biologiczny. Taksony te utworzyły na dendrogramie jedną grupę wyraźnie oddzieloną od *P. uncinata* (ryc.). Podobieństwo genetyczne Nei'a pomiędzy sosną hakowatą a sosnami: drzewokosą, kosodrzewiną i sosną błotną mieściło się w zakresie 0,796-0,815 (tab. 2).

Sosna zwyczajna stanowiła grupę zewnętrzną względem kompleksu *Pinus mugo*, przy czym najbliższa tej sośnie była sosna hakowata ($I=0,673$). Wartości współczynnika Nei'a pomiędzy *P. sylvestris* a pozostałymi taksonami były typowe dla dobrze wyodrębnionych gatunków i wynosiły 0,548 dla sosny błotnej i 0,558 dla kosodrzewiny (tab. 2). Sosna drzewokosa była wyraźnie oddzielona od sosny zwyczajnej ($I=0,605$), jak również od sosny hakowatej ($I=0,815$), a jej stanowiska na dendrogramie występowały łącznie z kosodrzewiną, często z tego samego miejsca (ryc.). Przykładowo wszystkie stanowiska *Pinus × rhaetica* z okolic Sarniej Skały (R5) i Doliny Białego (R6, R7) grupowały się z *P. mugo* z tych stanowisk (M5, M6, M7). Podobnie sosna drzewokosa z Polany Olczyńskiej, Boczania i Jaworzynki (R10) była najbardziej zbliżona do kosodrzewiny z tego regionu (M10). Osobniki sosny drzewokosej pochodzące z nasadzeń (R6s i R10s) grupowały się z formami natywnymi z tych samych stanowisk (R6n i R10n) z wysokim podo-

Tabela 1.

Zróżnicowanie genetyczne badanych gatunków sosen na podstawie miejsc insercji transpozonów: P – procent loci polimorficznych [%], A – średnia liczba alleli w locus, E – efektywna liczba alleli w locus, H – heterozygotyczność oczekiwana w populacji, H_T – heterozygotyczność oczekiwana dla gatunku; F_{IT} – współczynnik wsobności dla populacji; F_{ST} – współczynnik wsobności dla gatunku

Genetic diversity of *Pinus* species based on transposon insertion sites: P – percent of polymorphic loci [%], A – mean number of alleles in a locus, E – effective number of alleles in a locus, H – gene diversity in a population; H_T – gene diversity in a species; F_{IT} – fixation index in a population; F_{ST} – fixation index in a species

		P	A	E	H	F_{IT}
<i>Pinus uncinata</i> (Alpy)						
UN1	Seespitze	47,67	1,48	1,35	0,194	0,149
UN2	Ammerwald	43,02	1,43	1,37	0,196	0,141
UN3	Kleiner Plansee	48,26	1,48	1,38	0,209	0,081
UN4	Ehrenberg	47,09	1,47	1,39	0,208	0,089
UN5	Fernpass	41,28	1,41	1,35	0,187	0,179
Łącznie Total		49,42	1,49	1,43	$H_T=0,228$	$F_{ST}=0,128$
<i>Pinus uliginosa</i> (Sudety)						
UL1	Torfowisko pod Węglińcem	63,95	1,64	1,51	0,279	0,009
UL2	Wielkie Torfowisko Batorowskie	59,88	1,60	1,45	0,252	0,106
Łącznie Total		64,53	1,65	1,51	$H_T=0,281$	$F_{ST}=0,058$
<i>Pinus sylvestris</i> (Tatry)						
S1	Wielkie Koryciska	31,40	1,31	1,26	0,137	0,089
S2	Siwiańskie Turnie	29,65	1,30	1,23	0,126	0,163
S6*	Kazalnica, Dolina Białego	34,30	1,34	1,25	0,138	0,086
S7*	Siwarowe Gazdowskie	34,88	1,35	1,26	0,143	0,050
S8*	Siwarowe Pańskie	34,88	1,35	1,23	0,131	0,129
S10	Olczyńska, Boczań, Jaworzynka	28,49	1,28	1,23	0,124	0,179
Łącznie Total		34,47	1,35	1,27	$H_T=0,151$	$F_{ST}=0,116$
<i>Pinus mugo</i> (Tatry)						
M1	Wielkie Koryciska	56,40	1,56	1,43	0,236	0,134
M5	Sarnia Skała	60,47	1,60	1,46	0,253	0,071
M6*	Kazalnica, Dolina Białego	61,63	1,62	1,49	0,269	0,012
M7*	Siwarowe Gazdowskie	57,56	1,58	1,48	0,256	0,061
M10	Olczyńska, Boczań, Jaworzynka	61,05	1,61	1,42	0,240	0,120
Łącznie Total		63,95	1,64	1,50	$H_T=0,272$	$F_{ST}=0,080$
<i>Pinus × rhaetica</i> (Tatry)						
R1	Wielkie Koryciska	60,47	1,60	1,43	0,251	0,185
R3	Rapasiowa Turnia	65,70	1,66	1,31	0,278	0,094
R5	Sarnia Skała	70,35	1,70	1,53	0,291	0,052
R6n*	Kazalnica, Dolina Białego	70,93	1,71	1,56	0,303	0,013
R6s*	Kazalnica, Dolina Białego	68,60	1,69	1,57	0,304	0,012
R7*	Siwarowe Gazdowskie	63,95	1,64	1,50	0,272	0,116
R10n	Olczyńska, Boczań, Jaworzynka	65,70	1,66	1,47	0,265	0,138
R10s	Olczyńska, Boczań, Jaworzynka	73,84	1,74	1,50	0,282	0,080
Łącznie Total		80,81	1,81	1,56	$H_T=0,307$	$F_{ST}=0,086$

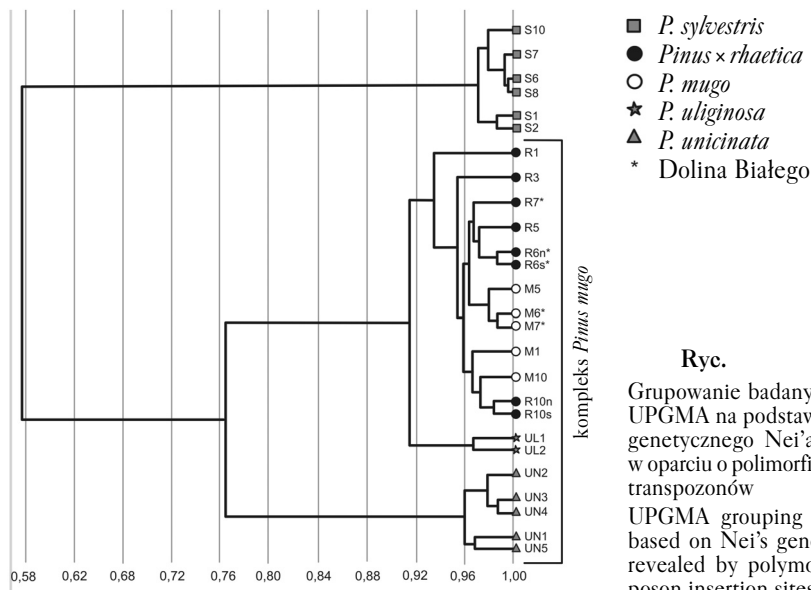
*stanowiska w Dolinie Białego; n – grupa osobników natywnych na stanowisku, s – grupa osobników prawdopodobnie z nasadzeń

*stands in Dolina Białego; n – native individuals in a stand, s – introduced individuals in a stand

Tabela 2.

Podobieństwo genetyczne Nei'a (I, prawa górna część) i odległość genetyczna Nei'a (D, lewa dolna część) badanych gatunków sosen wyznaczone na podstawie miejsc insercji transpozonów
 Nei's genetic similarity (I, top right) and distance (D, bottom left) based on transposon insertion sites

	<i>P. uncinata</i>	<i>P. uliginosa</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. mugo</i>	<i>Pinus × rhaetica</i>
<i>P. uncinata</i>	1,000	0,802	0,673	0,796	0,815
<i>P. uliginosa</i>	0,221	1,000	0,548	0,945	0,953
<i>P. sylvestris</i>	0,396	0,601	1,000	0,558	0,605
<i>P. mugo</i>	0,228	0,056	0,584	1,000	0,985
<i>Pinus × rhaetica</i>	0,205	0,048	0,502	0,015	1,000



Ryc.

Grupowanie badanych sosen metodą UPGMA na podstawie podobieństwa genetycznego Nei'a (I) obliczonego w oparciu o polimorfizm miejsc insercji transpozonów

UPGMA grouping of *Pinus* species based on Nei's genetic similarity (I) revealed by polymorphism of transposon insertion sites

bieństwem genetycznym 0,99 dla Kazalnicy w Dolinie Białego (R6) i 0,98 dla Polany Olczyskiej, Boczania i Jaworzynki (R10).

Dyskusja

Ocena przynależności taksonomicznej jest podstawą ochrony gatunkowej, gdyż zarówno rozporządzenie w sprawie ochrony gatunkowej roślin [Rozporządzenie... 2014], jak i akty międzynarodowe (Konwencja berneńska, Konwencja waszyngtońska) operują pojęciem gatunku. Jednocześnie, wraz z rozwojem zaawansowanych technik molekularnych, okazało się, że wiele chronionych gatunków roślin (np. kukułka lapońska *Dactylorhiza lapponica*, kaktus *Echinocereus lloydii*) i zwierząt (np. wilk rudy *Canis rufus*, lampart plamisty *Panthera pardus*) nie spełnia kryterium gatunku biologicznego, co istotnie wpływa na status ochrony [Geffen i in. 2007; Morrison i in. 2009]. W Polsce sytuacja taka występuje w odniesieniu do sosny drzewokosej *Pinus × rhaetica*. W zależności od tego, czy uznaje się tę formę za mieszańca międzygatunkowego pomiędzy sosną zwyczajną i kosodrzewiną [Christensen 1987; Staszkiwicz 1993], czy też za formę kosodrzewiny [Filppula i in. 1992; Polok i in. 2006; Polok 2010], zmienia się jej status ochrony – z ochrony ścisłej na częściową [Rozporządzenie... 2014]. Problem identyfikacji gatunkowej pogłębia klasyfikowanie osobników jako *Pinus × rhaetica* jedynie na podstawie morfologii i brak weryfikacji mieszań-

cowego charakteru na poziomie molekularnym. Związane jest to z trudnościami w rozróżnianiu potencjalnych gatunków rodzicielskich za pomocą markerów enzymatycznych czy powszechnie stosowanych w taksonomii unikalnych sekwencji DNA [Bobowicz i in. 2000; Heuertz i in. 2010]. Niewątpliwie trudności te są związane z ewolucją genomu sosen, głównie poprzez rozprzestrzenianie sekwencji transpozonowych i ich różnicowanie [Morse i in. 2009]. Stosunkowo wysoki polimorfizm miejsc insercji wszystkich typów transpozonów (CACTA, *copia*, *gypsy*) u analizowanych w pracy taksonów potwierdza istotną rolę ruchomych elementów genetycznych w ewolucji sosen oraz ich przydatność w rozróżnianiu blisko spokrewnionych gatunków.

Gatunki z rodzaju *Pinus* należą do najbardziej polimorficznych [Polok i in. 2005; Monteleone i in. 2006; Nowakowska 2007]. Większość badanych w pracy sosen nie odbiegała od tej zasady. Zmienność analizowanych gatunków z kompleksu *Pinus mugo* na podstawie miejsc insercji transpozonów jest porównywalna ze zmiennością RAPD (ang. Random Amplified Polymorphic DNA) obserwowaną u *P. mugo* z Alp przez Monteleone i in. [2006]. Przykładowo tatrzańska kosodrzewina miała około 1,6 alleli w locus, podczas gdy alpejska 1,4-1,7. Odpowiednie wartości H mieściły się w zakresie 0,236-0,269 w Tatrach i 0,228-0,381 w Alpach. Podobnie jak w Alpach, osobniki zebrane z poszczególnych stanowisk w Tatrach reprezentowały około 85-95% zmienności gatunków. Zaskakujące jest natomiast małe zróżnicowanie miejsc insercji transpozonów u sosny zwyczajnej. Wcześniejsze badania z wykorzystaniem markerów RAPD wykazały dwukrotnie wyższy polimorfizm *P. sylvestris* niż w niniejszej pracy [Polok i in. 2005]. Przyczyną może być zawężenie puli genowej w Tatrach. Osobniki zebrane były z ograniczonego obszaru, gdzie sosna zwyczajna jest reliktem polodowcowym rosnącym w niewielkich skupiskach na najbardziej niedostępnych terenach. Taki rozerwany zasięg, a także niska liczebność populacji, sprzyjają chowowi wsobnemu. Podobne zjawisko obserwowano w tatrzańskich populacjach limby, u której stwierdzono zaledwie 14,5% loci polimorficznych [Chmiel i in. 2008].

Analiza miejsc insercji transpozonów wykazała odrębność genetyczną sosny zwyczajnej w stosunku do wszystkich gatunków kompleksu *Pinus mugo*, szczególnie w odniesieniu do sosny błotnej ($I=0,548$) i kosodrzewiny ($I=0,558$). Wyniki te potwierdziły wcześniejsze dane uzyskane za pomocą kilku kategorii markerów DNA, wskazujące na niskie podobieństwo genetyczne *P. sylvestris* ($I=0,47-0,61$) w porównaniu z *P. uliginosa* i *P. mugo* [Zielinski, Polok 2005; Polok 2010]. Z obszernych danych enzymatycznych, sekwencji organellowego i jądrowego DNA, a także różnorodnych markerów opartych o reakcję PCR (w tym markerów transpozonowych) zgromadzonych w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat dla wielu gatunków roślin i zwierząt wynika, że dobrze wyodrębnione gatunki biologiczne z pełną barierą reprodukcyjną charakteryzują się współczynnikiem Nei'a od 0,517 do 0,795 [Awise 2004; Polok 2007, 2010]. Tym samym niskie podobieństwo genetyczne sosny zwyczajnej i kosodrzewiny (a także sosny zwyczajnej i sosny błotnej) wyklucza swobodne krzyżowanie się tych taksonów i tworzenie płodnych mieszańców pomiędzy nimi. Liczne zaburzenia procesu embriogenezy wraz z występującą aborcją zarodków u potencjalnych mieszańców potwierdzają powyższy pogląd [Kormutak i in. 2008].

Silna bariera reprodukcyjna pomiędzy *P. sylvestris* i *P. mugo* podważa tezę o mieszańcowym pochodzeniu *Pinus × rhaetica* w Tatrach. Niskie podobieństwo genetyczne sosny drzewokosej do sosny zwyczajnej ($I=0,605$) i bardzo wysoka, typowa dla populacji jednego gatunku wartość tego parametru pomiędzy *Pinus × rhaetica* a *P. mugo* ($I=0,985$) sugeruje, że *Pinus × rhaetica* jest formą morfologiczną kosodrzewiny. W przypadku mieszańcowego pochodzenia sosny drzewokosej należałoby się spodziewać wyższego podobieństwa genetycznego i grupowania *P. sylvestris* razem z *Pinus × rhaetica* i *P. mugo*. Tymczasem sosna drzewokosa wyraźnie grupuje się z kosodrzewiną. Co więcej, oba te gatunki pochodzące z jednego stanowiska mają tendencję do tworzenia jed-

nego skupienia, np. sosna drzewokosa z okolic Doliny Białego grupuje się z kosodrzewiną z tego terenu (stanowiska R5, R6, R7 i M5, M6, M7). Podobnie jest w przypadku stanowisk z Polany Olczyńskiej, Boczniana i Jaworzynki (R10 i M10). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia, które zakwestionowały występowanie hybrydyzacji pomiędzy *P. sylvestris* i *P. mugo* w oparciu o analizę enzymatyczną i cpDNA [Filppula i in. 1992].

W obrębie kompleksu *Pinus mugo* alpejska sosna hakowata tworzyła wyraźnie odrębną grupę od tatrzańskiej kosodrzewiny oraz sosny drzewokosej. Niskie podobieństwo genetyczne sosny drzewokosej względem *P. uncinata* (I=0,815) wyklucza pochodzenie osobników z Doliny Białego z alpejskich nasion sosny hakowatej, jak to sugerowano wcześniej [Stecki 1952; Pawłowski 1956; Radwańska-Paryska 1975; Horvath i in. 1980]. Osobniki pochodzące ze sztucznych nasadzeń (stanowiska R6n i R10n) nie różniły się od natywnych, tatrzańskich form sosny drzewokosej. Należy więc podejrzewać, że nasadzenia przeprowadzono przy wykorzystaniu materiału pochodzącego z Tatr, lub, jeśli był to materiał alpejskiej proveniencji, reprezentował on *P. mugo*, a nie *P. uncinata*.

Podsumowanie

Markery transpozonowe okazały się efektywnym narzędziem do rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Pinus*. Pozwoliły one zweryfikować pochodzenie osobników sosny drzewokosej, które okazały się formą morfologiczną kosodrzewiny *P. mugo*. Nie potwierdziła się więc hipoteza o mieszańcowym pochodzeniu sosny drzewokosej (*P. sylvestris* × *P. mugo*) w Tatrzańskim Parku Narodowym, a także hipoteza o obecności *P. uncinata* w Dolinie Białego.

Literatura

- Androsiuk P., Zielinski R., Polok K. 2011. B-SAP markers derived from the bacterial KatG gene differentiate populations of *Pinus sylvestris* and provide new insights into their postglacial history. *Silva Fenn.* 45: 3-18.
- Avise J. C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland (USA).
- Bobowicz M. A., Danielewicz W., Pieczyńska B., Wojnicka-Półtorak A., Prus-Głowacki W. 2000. Isoenzymatic variability in progeny of *Pinus mugo* Turra × *Pinus sylvestris* L. hybrids from Bór na Czerwonem, in experimental culture. *Acta Soc. Bot. Pol.* 69: 137-144.
- Chmiel J., Milewski T., Polok K. 2008. Ochrona naturalnej puli genowej rodzimej limby *Pinus cembra* L. z Tatr w świetle badań molekularnych. *Roczniki Bieszczadzkie* 16: 215-232.
- Christensen K. 1987. Taxonomic revision of the *Pinus mugo* complex and *P. × rhaetica* (*P. mugo* × *P. sylvestris*) (*Pinaceae*). *Nord. J. Bot.* 7 (4): 383-408.
- Filppula S., Szmídt A. E., Savolainen O. 1992. Genetic comparison between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* using isozymes and chloroplast DNA. *Nord. J. Bot.* 12: 381-386.
- Geffen E., Luikart G., Waples R. 2007. Impacts of modern molecular genetic techniques on conservation biology. Publication, Agencies and Staff of the U.S. Department of Commerce.
- Heuertz M., Teufel J., González-Martínez S. C., Soto A., Fady B., Alía R., Vendramin G. G. 2010. Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in western Europe. *J. Biogeogr.* 37: 541-556.
- Horvath I., Bretović S., Pawłowski B., Pawłowska S., Zarzycki K. Z. 1980. Mapa fitosocjologiczna Sarniej Skały w Tatrach Zachodnich (rok 1958). *Ochrona Przyrody* 43: 75-90.
- Kalender R., Tanskanen J., Immonen S., Nevo E., Sculman A. H. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6603-6607.
- Kormutak A., Vookova B., Manka P., Salaj J., Camek V., Gömöry D. 2008. Abortive embryogenesis in hybrid swarm populations of *Pinus sylvestris* L., and *Pinus mugo* Turra. *Trees* 22: 657-662.
- Monteleone I., Ferrazzini D., Belletti P. 2006. Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies uncinata and mugo of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fenn.* 40: 391-406.
- Morrison III W. R., Lohr J. L., Duchon P., Wilches R., Trujillo D., Mair M., Renner S. S. 2009. The impact of taxonomic change on conservation: does it kill, can it save, or is it just irrelevant? *Biol. Conserv.* 142: 3201-3206.

- Morse A. M., Peterson D. G., Islam-Faridi M. N., Smith K. E., Magbanua Z., Garcia S. A., Kubisiak T. L., Amerson H. V., Carlson J. E., Nelson C. D., Davis J. M. 2009. Evolution of genome size and complexity in *Pinus*. *PLoS One* 4: e4332.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Guildford, Surrey: Columbia University Press, New York.
- Nowakowska J. 2007. Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz polimorfizmu DNA. Rozpr. Habilit. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary.
- Pawłowski B. 1956. Flora Tatr. Tom I. PWN, Warszawa.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z. 1996. Zbiorowiska roślinne. W: Mirek Z. [red.]. Przyroda Tatrzańskiego Parku Narodowego. TPN, Kraków-Zakopane. 237-274.
- Polok K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Studio Poligrafii Komputerowej „SQL”, Olsztyn.
- Polok K. 2010. Genetyka i ewolucja. Studio Poligrafii Komputerowej „SQL”, Olsztyn.
- Polok K., Skierska S., Zielinski R. 2006. Charakterystyka genetyczna gatunku mieszańcowego *Pinus × rhaetica* z rezerwatu Bór na Czerwonym. W: Mirek Z., Cieślak E., Paszko B., Paul W., Ronikier M. [red.]. Rzadkie, ginące i reliktowe gatunki roślin i grzybów. Inst. Bot. im. W. Szafera, Kraków.
- 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., Pawlaczyk E. M. [red.]. Variability and evolution – new perspectives. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań. Seria Biologia 72: 253-267.
- Polok K., Zielinski R. 2011. Mutagenic treatment induces high transposon variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agric. Slov.* 97: 179-188.
- Radwańska-Paryska Z. 1975. Materiały do rozmieszczenia dendroflory Tatr i Podtatrza. *Studia Ośrodka Dokument. Fizjograficznej PAN* 4: 13-77.
- Rozporządzenie Ministra Leśnictwa i Przemysłu Drzewnego z dnia 30 kwietnia 1983 r. w sprawie wprowadzenia gatunkowej ochrony roślin. 1983. *Dz. U.* Nr 27, poz. 134.
- Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 6 kwietnia 1995 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. 1995. *Dz. U.* Nr 41, poz. 214.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin. 2014. *Dz. U.* Nr 0, poz. 1409.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 września 2001 r. w sprawie określenia listy gatunków roślin rodzimych dziko występujących objętych ochroną gatunkową ścisłą i częściową oraz zakazów właściwych dla tych gatunków i odstępstw od tych zakazów. 2001. *Dz. U.* Nr 106, poz. 1167.
- Staszkiwicz J. 1993. *Pinus × rhaetica* Brügger – sosna drzewokosa. W: Zarzycki K., Kaźmierczakowa R. [red.]. Polska Czerwona Księga Roślin. Inst. Bot. im. W. Szafera, Kraków. 38-39.
- Staszkiwicz J. 1996. Naturalne mieszańce *Pinus mugo × P. sylvestris* (*Pinaceae*) w Tatrach. *Frag. Flor. Geobot. Ser. Polonica* 3: 23-30.
- Staszkiwicz J. 2001. *Pinus × rhaetica* Brügger – sosna drzewokosa. W: Zarzycki K., Kaźmierczakowa R. [red.]. Polska Czerwona Księga Roślin. Inst. Bot. im. W. Szafera, Kraków. 65-66.
- Stecki K. 1952. Osobliwe i rzadkie drzewa regli zakopiańskich. *Rocz. Sekcji Dendr. PTB* 8: 379-385.
- Vershinin A. V., Allnutt T. R., Knox M. R., Amrose M. J., Ellis T. H. N. 2003. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition in *Pisum* diversity, evolution and domestication. *Mol. Biol. Evol.* 20: 2067-2075.
- Zielinski R., Polok K. 2005. Molecular evolution and taxonomy of plants. W: Prus-Głowacki W., Pawlaczyk E. M. [red.]. Variability and evolution – new perspectives. Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań. Seria Biologia 72: 37-55.
- Zwijacz-Kozica T. 1998a. Występowanie sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. w Tatrzańskim Parku Narodowym. *Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody* 17 (2): 56-68.
- Zwijacz-Kozica T. 1998b. Występowanie sosny drzewokosej (*Pinus × rhaetica* Brügger) w Tatrzańskim Parku Narodowym. *Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody* 17 (4): 3-12.
- Zwijacz-Kozica T. 2012. Ciekawostki dendrologiczne i nie tylko. *Tatry* 42 (4): 40-41.