

JANUSZ SABOR, KINGA SKRZYSZEWSKA

Rola genetycznych markerów terpenowych w selekcji i taksonomii drzew leśnych

I. Chemizm i synteza – zakres zastosowań

The role of genetic terpene markers in selection and taxonomy
of forest tree species

Part I. Chemistry and synthesis. Scope of application

Abstract. The paper presents the role of terpene markers used to evaluate the coniferous tree species genetic population structure. The paper provides data on chemistry of monoterpenes, sesquiterpenes and polytherpenes, their biosynthesis, as well as principles of genetic control of these compounds. Chromatographic techniques used in the scientific research and application of these techniques for genetic evaluation of pine, spruce and fir populations were described.

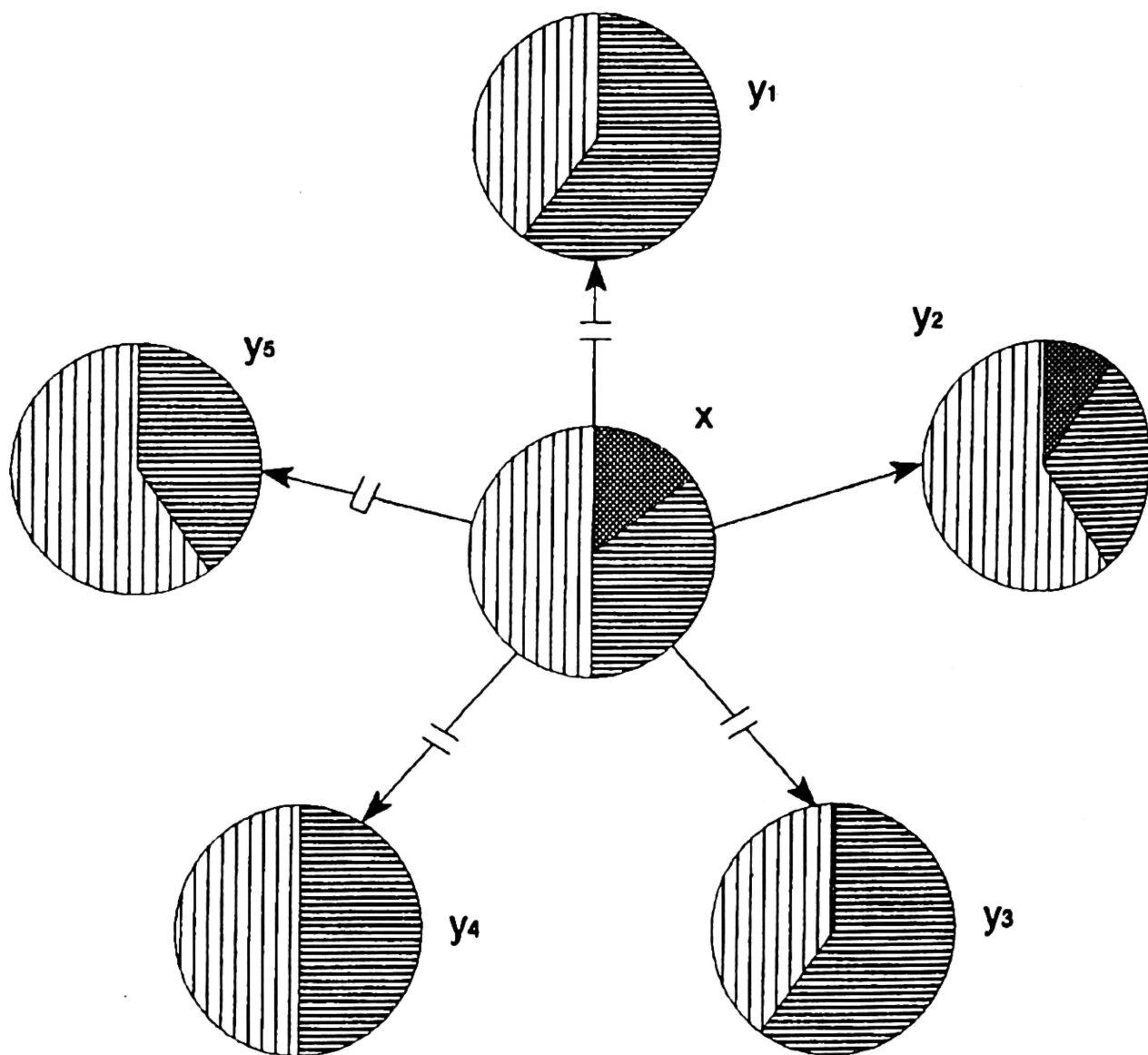
Key words: terpene markers, chromatography, biosynthesis, population genetics

Wstęp

Zwiększający się handel nasionami i sadzonkami drzew leśnych wymaga zastosowania odpowiednich metod ich identyfikacji pochodzeniowej, w tym również porównania właściwości genetycznych badanych populacji. Testowanie genetyczne opiera się na tzw. prawie wykluczenia Backmanna (1986). Ocena ta obejmuje jedną lub więcej cech, których fenotypowa zmienność opiera się na zróżnicowaniu genotypowym. Zastosowanie prawa wykluczenia do identyfikacji genetycznej populacji drzew przedstawia rycina 1.

Do oceny podobieństwa genetycznego populacji wykorzystuje się zwykle genetyczne markery biochemiczne, w tym także markery terpenowe. Związki te będące oryginalnym produktem metabolizmu drzew noszą nazwę tzw. markerów fizjologicznych. Jeśli terpeny tworzą określoną strukturę biochemiczną, a ich budowa lub skład są kodowane przez poszczególne loci genowe pozwalające na identyfikację pojedynczych drzew, ras lub ekotypów, uważa się je za tzw. markery genetyczne (Arbez 1988, Sabor 2000).

Substancje terpenowe odgrywają istotną rolę w analizach struktury genetycznej populacji cząstkowych różnych gatunków drzew iglastych (Squillace 1976). Badanie zawartości



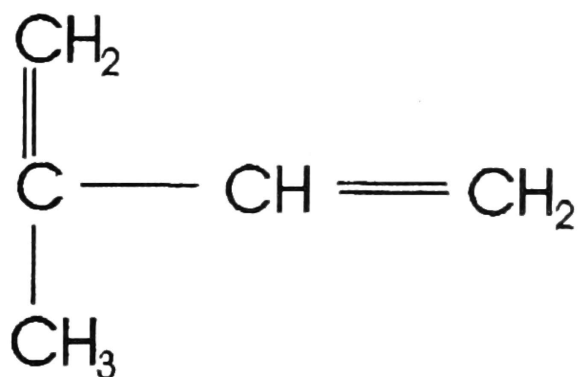
RYC. 1. Prawo wykluczenia. Frekwencje alleli są reprezentowane przez sektory w kole. Jeśli próbka nasion x posiada allel nie występujący w populacji y_i ($i=1,3,4,5$) należy wykluczyć możliwość przynależności do y_i . Próbka x może pochodzić od y_2 lecz nie ma wiarygodnej identyfikacji, czy jest to jedyna możliwość (według: Backmann, 1986).

monoterpenów u drzew leśnych jest również istotnym elementem badań taksonomicznych i ewolucyjnych.

Chemiczny charakter związków terpenowych

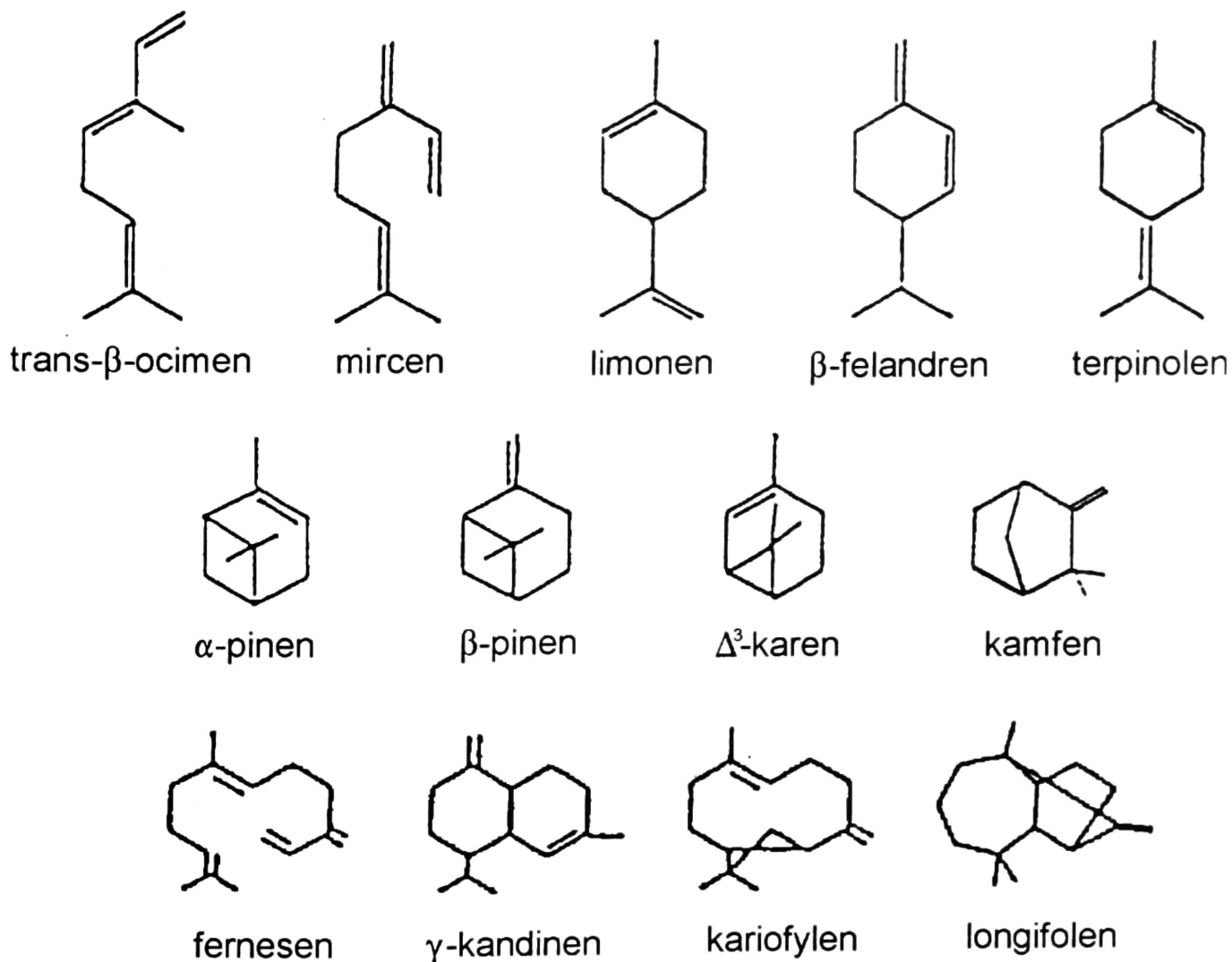
Terpeny tworzą odrębną grupę węglowodorów spokrewnionych z izoprenem (ryc. 2). Są podstawowymi składnikami lotnych związków w olejkach eterycznych (żywicznych) produkowanych w igłach, drewnie oraz tkance korowej większości gatunków iglastych. Do grupy związków terpenowych należą również ich pochodne tlenowe. Związki te charakteryzuje występowanie podwójnej liczby molekuly izoprenu $(C_5H_8)_2$.

Liczba jednostek izoprenu w związkach terpenowych waha się od 2 do 12. Przy dwóch jednostkach określa się je jako monoterpeny (C_{10}), przy trzech – seskwiterpeny (C_{15}), czterech – dwuterpeny, a przy n jednostkami – politerpeny. Większość składników lotnych



RYC. 2. Struktura izoprenu

w olejkach żywicznych zawiera monoterpeny węglowodorowe ze szkieletem węglowym, składającym się z dwóch połączonych jednostek izoprenu, oraz tzw. seskwiterpeny. Stopień cykliczności może być mniej lub bardziej kompletny: od struktur acyklicznych, takich jak mircen, ocimen, geraniol, farnesen, do dwucyklicznych (α -, β -pinen, kariofyllen) lub trójcyklicznych (longifolen) (ryc. 3). Część tych składników można znaleźć w całym drzewie, m.in. α - i β -pinen, a w mniejszej ilości kariofyllen, longifolen i humulen, podczas gdy inne związki terpenowe występują tylko wewnątrz specyficznych organów lub tkanek. Seskwiterpeny występują głównie w olejkach eterycznych igieł. Ich zawartość wzrasta z

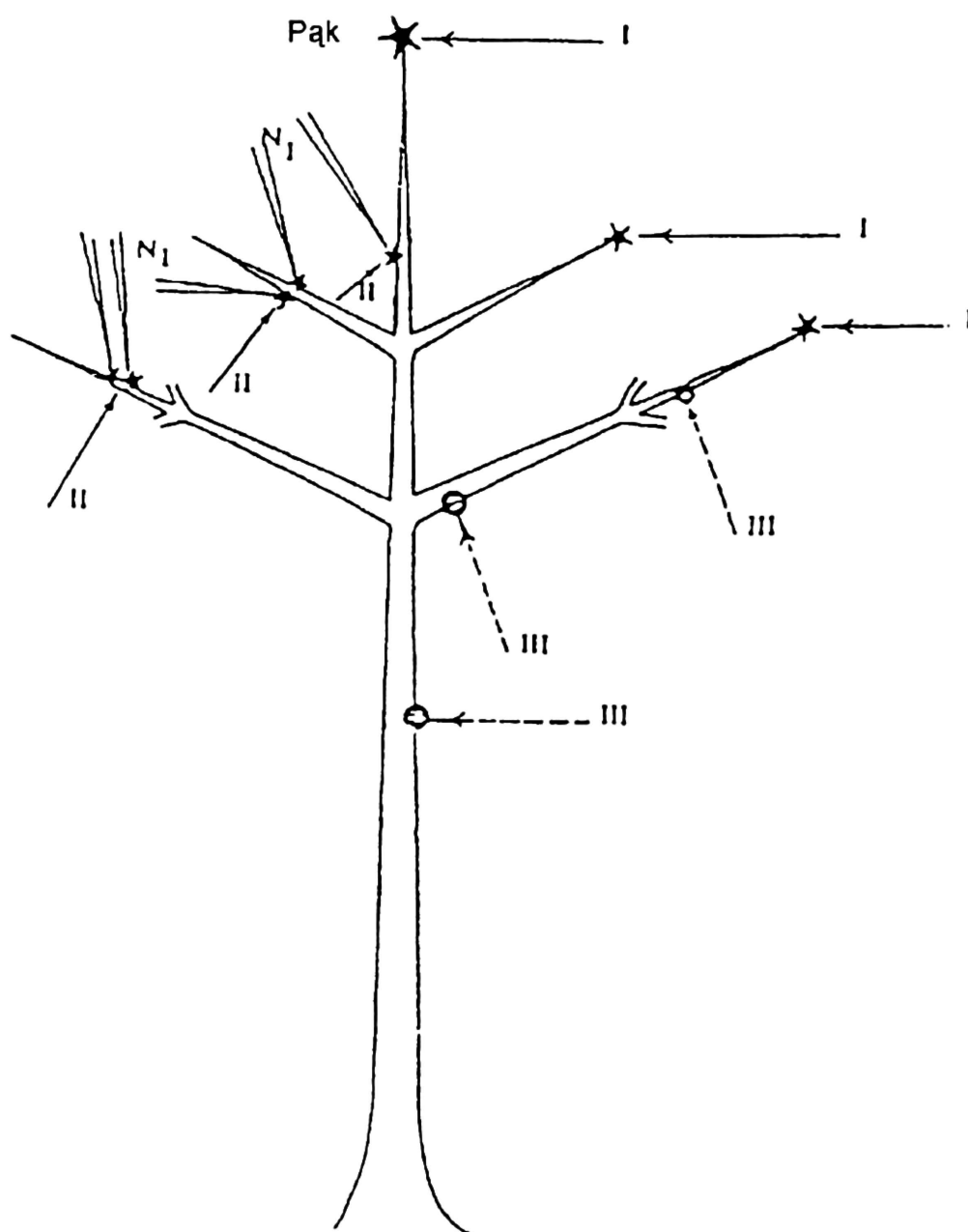


RYC. 3. Struktura cykliczna wybranych związków terpenowych (według Bernard-Dagan, 1988)

poziomu 0 – w okresie wiosennego rozwoju pączków – do 40% pod koniec wegetacji. Stosunek składników tlenowych olejku do węglowodorów zmniejsza się w czasie rozwoju igieł. Obserwowana jest też duża zmienność tych związków pomiędzy tkankami pojedynczych drzew, wyjaśniona m.in. przez następstwo metabolizmu związków terpenowych.

Biosynteza i genetyczna kontrola węglowodorów

Większość procesów biosyntezy związków terpenowych (C₁₀, C₁₅, C₂₀) odbywa się w przewodach żywicznych różnicujących się zależnie od rodzaju merystemu (merystemy pierwotne i wtórne). Ten system wydzielniczy występuje w tkance parenchymatycznej całej rośliny, m.in. w pączkach, igłach, tkankach chlorofilowych, w parenchymie ksylemu i floemu.

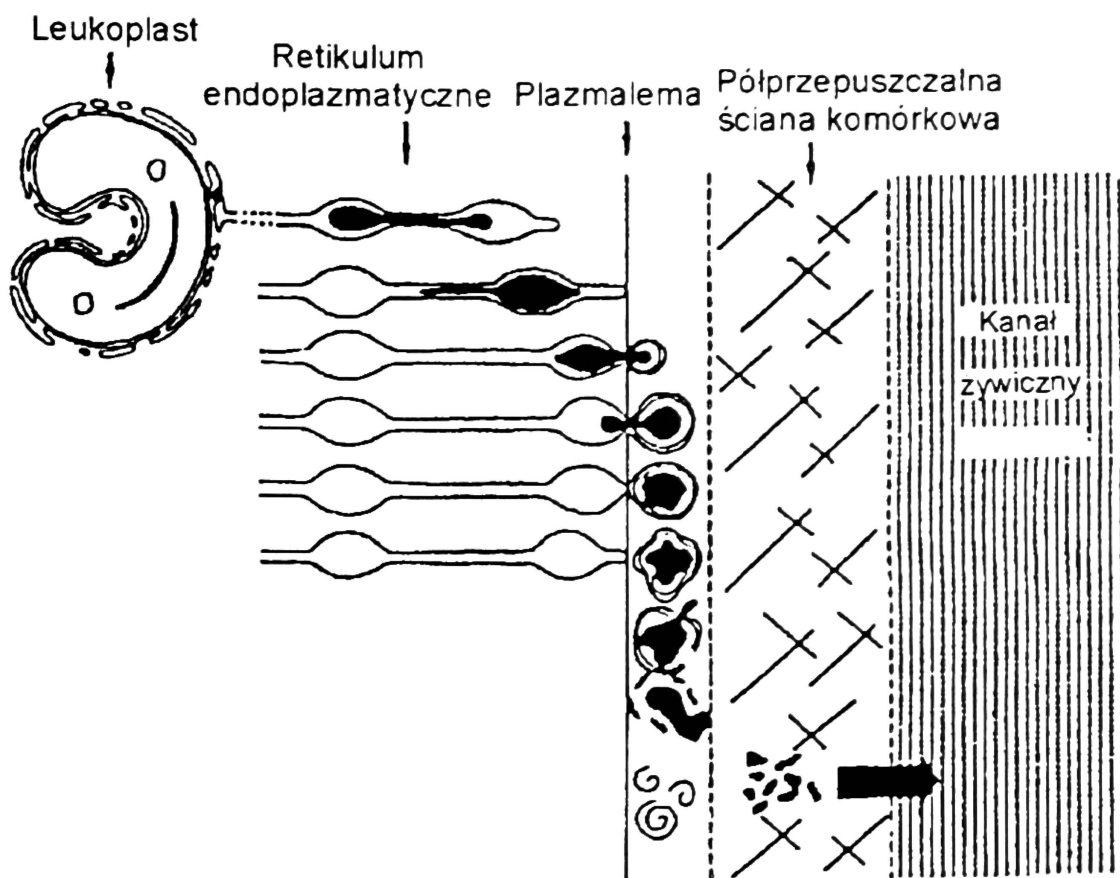


RYC. 4. Lokalizacja różnych systemów wydzielniczych na drzewie sosny; typ I (z merystemu pierwotnego pąków), typ II (z merystemu pierwotnego igieł), typ III (z merystemu wtórnego – kambium) (według Bernard-Dagan, 1988)

Merystemy pierwotne są ulokowane w pączku szczytowym oraz w podstawach rosnących igieł (Typ I i Typ II), natomiast merystemy wtórne reprezentują strefę kambialną pnia (Typ III) (ryc. 4). W biosyntezie węglowodorów monoterpenu i prawdopodobnie 3-cyklicznych kwasów żywicznych uczestniczą specyficzne organelle – leukoplasty. Aktywność leukoplastów zależy od rodzaju komórek systemu wydzielniczego. Mechanizm tworzenia się i przepływu terpenów w komórkach systemów wydzielniczych przedstawia rycina 5.

Synteza i skład terpenów pozostają pod silną kontrolą genetyczną. Najczęściej badania nad genetyczną kontrolą monoterpenu prowadzi się przy użyciu tkanki korowej (kora + floem), pobranej z jednorocznych pędów. Po ich wzroście skład terpenów w pędach jest praktycznie stały do następnego cyklu przyrostowego. Studia nad przekazywalnością mechanizmu biosyntezy węglowodorów terpenowych prowadzone są na wyselekcjonowanych klonach o znanym profilu terpenowym i potomstwem (full-sib) otrzymanym drogą kontrolowanego krzyżowania.

Używając klonów ze znanymi profilami terpenowymi można wykazać, że mechanizmy biosyntetyczne są kontrolowane genetycznie. Porównanie spodziewanych i otrzymanych frekwencji różnych fenotypów przy odmiennych mechanizmach kojarzenia wykazało monogeniczną kontrolę syntezy czterech monoterpenu i dwóch seskwiterpenu: Δ^3 -karenu, terpinolenu, mircenu, limonenu, kariofellenu i longifolenu. Podobny system przekazu stwierdza się również u β -pinenu. W przypadku sosny, Hanover (1996, 1971) udowodnił m.in., że u *P. monticola* Δ^3 -karen jest kontrolowany przez dwa allele w jednym locus. Zbliżony mechanizm kontroli określono dla mircenu i β -pinenu u *P. ellioti*, a dla limonenu i β -felandrenu u *P. taeda*.



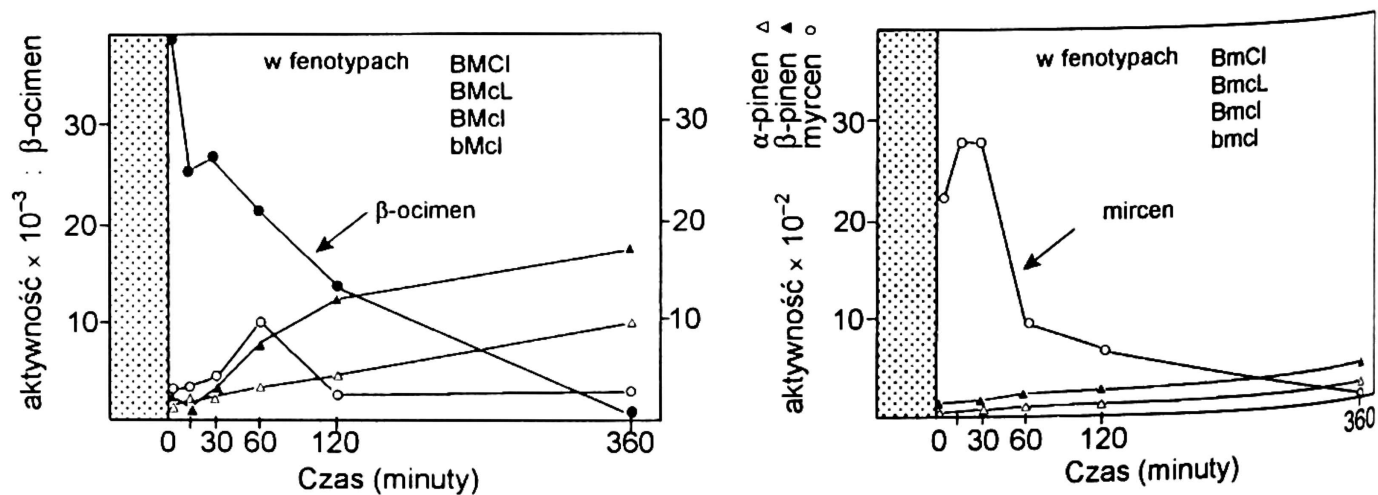
RYC. 5. Schemat przemieszczania się terpenów w komórce wydzielniczej z aktywnego leukoplastu do kanału żywicznego (według Bernard-Dagan, 1988)

Zbliżony mechanizm kontroli określono dla mircenu i β -pinenu u *P. ellioti*, a dla limonenu i β -felandrenu u *P. taeda*.

Odziedziczalność seskwiterpenów była analizowana głównie u *P. pinaster*. Z wyjątkiem kariofyllenu, allele, które określają wysoką koncentrację tych związków, są dominujące lub kodominujące, w porównaniu do alleli określających ich niski poziom w tkankach drzew.

Biosynteza monoterpenu (Δ^3 -karen, terpinolen, myrcen, limonen i prawdopodobnie β -pinen) oraz seskwiterpenów (kariofyllen i longifolen) u sosny nadmorskiej (*P. pinaster*) jest kontrolowana przez dwa allele tego samego locus. Ten system kontroli genowej szczególnie uwidacznia się w strukturach wydzielniczych typu I i II, tj. w pączku, korze oraz rozwijających się pędach i igłach, natomiast w innych tkankach (typ III) odnajdywane są tylko α - i β -pinen oraz 3-cykliczne kwasy żywiczne.

Interesującą konsekwencją odziedziczalności terpenów jest nieuchwytność ich biosyntetycznych ścieżek. Przy pomocy próbek nasyconych C_{14} w igłach sosny *P. pinaster*, sekwencja znaczników węglowodorowych ujawniła fizjologiczną rolę acyklicznych węglowodorów. Jak pokazuje rycina 6, myrcen i trans- β -ocimen funkcjonują jako przekaźniki metaboliczne wywołujące biosyntezę końcowych produktów monoterpenu, takich jak α - i β -pinen. Także acykliczny trans- β -farnesen ukazuje się krótkotrwale przed późniejszą cyklizacją mono-, bi-, lub tricyklicznych węglowodorów seskwiterpenowych.



RYC. 6. Czas oznaczania głównych węglowodorów monoterpenu w igłach różnych fenotypów sosny nadmorskiej po 15 minutach ekspozycji na $^{14}CO_2$ (według Bernard-Dagan, 1988)

Mircen występuje jako czasowy składnik tylko w drzewach z tzw. ubogim myrcenem (m) o genotypie M-/M-. Allele wywołujące zdolności (lub niezdolności) do syntezy terpeny oznaczamy przykładowo dla mircenu M+ lub M-. U drzew bogatych w ten związek (M+), wstępnie formowany jest trans- β -ocimen, a dopiero potem mircen oraz α - i β -pinen. Ogólnie można stwierdzić, że jakkolwiek genetyczna kontrola terpenów przez enzymy zależy od wielu czynników, to najważniejszym z nich jest struktura komórek, w których składniki te są syntetyzowane (Bernard-Dagan, 1988).

Wnioski

Oceniając aktualny poziom rozwoju technik chromatograficznych można stwierdzić, że terpenowe znaczniki genetyczne mogą odgrywać istotną rolę w ocenie poliformizmu genetycznego populacji cząstkowych iglastych gatunków drzew leśnych, pod warunkiem zastosowania właściwej metodyki badawczej, uwzględniającej stabilność struktur terpenowych w badanych tkankach, wyboru odpowiedniej techniki rozdziału chromatograficznego tych związków oraz objęcia badaniami licznej, reprezentatywnej populacji drzew określającej pełne zróżnicowanie analizowanych populacji cząstkowych.

*Katedra Nasiennictwa, Szkółkarstwa i Selekcji Drzew Leśnych
Akademia Rolnicza w Krakowie
Al. 29 Listopada 46, 31-425 Kraków*

Literatura

- Arbez M.** 1988. Méthodes biochimiques de caractérisation variétale des arbres forestiers. Rev. For. Fr., nr sp., 71-76.
- Bacmann F.** 1986. Genetic Means of Verifying Observance of the Law. I. Methodical principles of provenance identification. IUFRO Joint Meeting of WP.S.2.2.03-14 on Biochemical Genetic and Legislation of Forest Reproductive Material. Bundesforsch. für Forst- und Holzw., Hamburg.
- Bernard-Dagan C.** 1988. Biosynthesis of lower Terpenoids: Genetic and physiological controls in woody plants. [W:] Genetics manipulation of woody plants. Wyd. James W. Hanover and Daniel E. Keathley (Plenum Publishing Corporation), 329-351.
- Hanover J. W.** 1966. Genetics of terpenes. I. Gene control of monoterpene levels in *Pinus monticola* Dougl. Heredity 21 (1), 73-84.
- Hanover J. W.** 1971. Genetics of terpenes. I. Genetic variances and interrelationships of monoterpene concentrations in *Pinus monticola* Dougl. Heredity 27 (2), 447-450.
- Paule L., Yazdani R., Gömöry D.** 1988. Monoterpene composition of silver fir (*Abies alba* Mill.) foliar oleoresin. [W:] 5. IUFRO - Tannensymposium. Zvolen, 49-66.
- Sabor J.** 1993. Zmienność sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) i hodowlana wartość jej polskich proveniencji w warunkach siedliskowych Beskidu Sądeckiego. Zesz. Nauk. AR w Krakowie. Rozpr. habilit. Nr 185.
- Sabor J.** 1997. Ocena zróżnicowania genetycznego świerka rasy istebniańskiej pochodzeń Inwentaryzacyjnego Doświadczenia Proveniencyjnego Świerka Pospolitego IPTNS-IUFRO 1964/1968 markerami terpenowymi. [W:] Zachowanie leśnych zasobów genowych i hodowla selekcyjna świerka pospolitego w Nadleśnictwie Wisła. Katedra Nasiennictwa, Szkółkarstwa i Selekcji Drzew Leśnych AR w Krakowie. Maszynopis 67-75.
- Sabor J.** 2000. Nasiennictwo, szkółkarstwo i selekcja drzew leśnych. Cz. III. Podstawy selekcji drzew. Skrypt do wykładów i ćwiczeń. Wyd. II poprawione. Wyd. AR w Krakowie.
- Skrzyszewska K.** 1999. Ocena struktury genetycznej jodły pospolitej markerami monoterpenu na powierzchni porównawczej Jd PL. 86/90 w Nadleśnictwie Baligród. Zesz. Nauk. AR w Krakowie, ser. Sesja Naukowa, z. 16, 67-86.
- Squillace A. E.** 1976. Analyses of Monoterpenes of Conifers by Gas-Liquid Chromatography. [W:] Modern Methods in Forest Genetics. Ed. J.P. Miksche. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York, 120-157.
- Witkiewicz Z.** 1995. Podstawy chromatografii. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa
- Wof H.** 1992. Untersuchungen zur genetischen Variation des Monoterpenmusters im Nadelharz der Weisstanne (*Abies alba* Mill.). Forstl. Forschungs, München, 116.

Summary

The role of genetic terpene markers in selection and taxonomy of forest tree species Part I. Chemistry and synthesis. Scope of application

The methods for the assessment of the population genetic similarity are based on the variation in the contents of terpene compounds in the tissues being the product of tree metabolic activity and coded by individual loci. Monoterpenes and sesquiterpenes of varying cyclicality are regarded as genetic markers contained in volatile oils synthesised in resin canals and differentiated in the primary and secondary meristems. The synthesis is under genetic control. The monogenic control revealed i.a. Δ^3 -karene, terpinolene, mircene, limonene, caryophyllene, and longifolene. The role of metabolic transmitters of mircene and trans- β -ocimene that take place in the final synthesis of the terpene compounds described e.g. α - and β -pinene and others used in the assessment of the genetic polymorphism of partial populations of conifers.