

ALEKSANDRA WOJNICKA-PÓŁTORAK, KONRAD CELIŃSKI, EWA CHUDZIŃSKA,  
WIEŚLAW PRUS-GŁOWACKI, ADOLF F. KORCZYK

## Profil genetyczny najstarszych drzew *Picea abies* (L.) Karst. w Puszczy Białowieskiej\*

Genetic profile of the oldest *Picea abies* (L.) Karst. trees in the Białowieża Primeval Forest

### ABSTRACT

Wojnicka-Półtorak A., Celiński K., Chudzińska E., Prus-Głowacki W., Korczyk A. F. 2014. Profil genetyczny najstarszych drzew *Picea abies* (L.) Karst. w Puszczy Białowieskiej. Sylwan 158 (5): 370-376.

The aim of this study was to: 1) describe the genetic structure of the population of old *Picea abies* trees in the Białowieża Primeval Forest and 2) design the genetic database for every examined tree in scope of 26 isoenzymatic loci containing: the genotype pattern, the number of stated alleles and the level of individual heterozygosity. We found that 101 out of 117 trees are characterized by a unique genotype pattern and 20 ones are completely homozygous individuals. The oldest Norway spruces in the Białowieża Primeval Forest are characterized by rather low level of genetic variation and their homozygous genotypes that are well adapted to their environment let them live to a ripe old age.

### KEY WORDS

genetic structure, *Picea abies*, isoenzymatic markers, Białowieża Primeval Forest

### ADDRESSES

Aleksandra Wojnicka-Półtorak <sup>(1)</sup> – e-mail: olawp@amu.edu.pl

Konrad Celiński <sup>(1)</sup>, Ewa Chudzińska <sup>(1)</sup>, Wiesław Prus-Głowacki <sup>(1)</sup>, Adolf F. Korczyk <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Zakład Genetyki; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; ul. Umultowska 89; 61-614 Poznań

<sup>(2)</sup> Zamiejscowy Wydział Leśny w Hajnówce; Politechnika Białostocka; ul. Piłsudskiego 8; 17-200 Hajnówka

### Wstęp

Zróżnicowanie genetyczne drzew leśnych odgrywa kluczową rolę w stabilności i dynamice ekosystemów leśnych [Gregorius 1991]. Jest również niezwykle istotne z ekonomicznego punktu widzenia, ponieważ decyduje o trwałości cech gospodarczych, stanowi bazę dla selekcji ukierunkowanej na doskonalenie wybranych cech drzewostanów oraz zmniejsza skutki oddziaływania negatywnych czynników biotycznych i abiotycznych [Matras 2006], zatem ochrona leśnych zasobów genowych jest jednym z ważniejszych priorytetów hodowli lasu [Burczyk, Chybicki 2005]. Uważa się, że stare drzewostany leśne odgrywają nieocenioną rolę w zachowaniu bioróżnorodności [Mosseler i in. 2003]. Polska posiada jeszcze nieliczne fragmenty rodzimych drzewostanów oraz znaczną liczbę pojedynczych starych drzew [Korczyk 2005]. Według Korczyka [1994, 2005] stare drzewostany zachowane w Puszczy Białowieskiej mają ogromną wartość dla nauki, jak i dla gospodarki leśnej; są relikdami rodzimych dzikich populacji powstałych w procesie naturalnej selekcji, ich genotypy powstały w okresie preindustrialnym i nie

\* Praca finansowana z grantu 3P04F 007 25 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce.

podlegały selekcji człowieka, wykazują też dużą zdolność adaptacyjną, dzięki której dożyły tak sędziwego wieku.

Lasy Puszczy Białowieskiej stwarzają unikalną możliwość obserwowania procesów naturalnego odnawiania drzewostanu w ukształtowanym ekosystemie leśnym, który w minimalnym stopniu uległ zniekształceniu wskutek działalności człowieka. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do intensywnie uprawianego od ponad 200 lat świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst.) będącego jednym z głównych gatunków lasotwórczych w Polsce i Europie. Z powyższych względów „genetyczna inwentaryzacja” starych drzew świerka pospolitego z obszaru Puszczy Białowieskiej w celu zbadania i ochrony ich zasobów genowych (pierwotnych pul genowych) jest niezwykle istotna [Korczyk 2008].

Celem niniejszej pracy było: 1) opracowanie charakterystyki struktury genetycznej populacji starych drzew *Picea abies* w Puszczy Białowieskiej; 2) stworzenie genetycznej bazy danych dla każdego badanego drzewa zawierającej jego indywidualny wzór genotypowy, liczbę alleli oraz heterozygotyczność indywidualną w zakresie analizowanych markerów.

## Material i metody

**POWIERZCHNIA BADAWCZA I MATERIAŁ.** Powierzchnia badawcza zlokalizowana jest w Puszczy Białowieskiej w Nadleśnictwie Hajnówka. Badania prowadzono w drzewostanie pochodzącym z naturalnego odnowienia *Picea abies* w oddziale 631A, wydzieleniu „b”, o powierzchni zalesionej 9,9 ha [Korczyk 1994]. Badania obejmowały 117 drzew *Picea abies* w wieku od 89 do 213 lat. Wiek każdego osobnika określono na podstawie pomiaru pierśnicy oraz metodą odwiertu (dla 97 drzew).

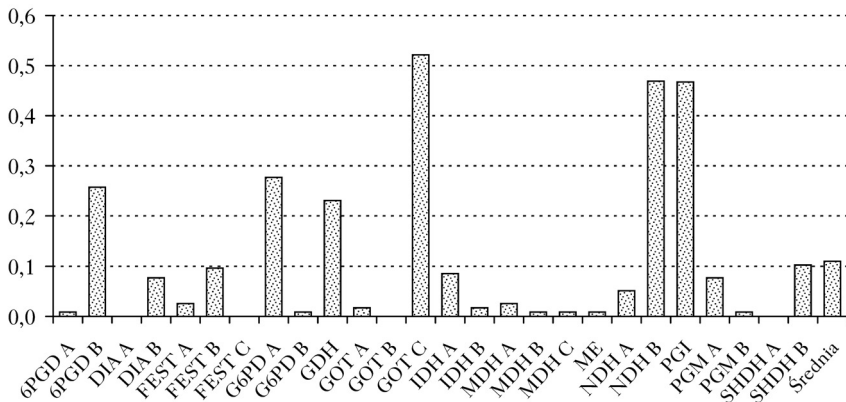
**ANALIZA BIAŁEK ENZYMATYCZNYCH.** Analizę zmienności genetycznej przeprowadzono przy użyciu markerów izoenzymatycznych. Do ekstrakcji białek enzymatycznych użyto 2-3 pąków zimowych z każdego osobnika oraz buforu ekstrakcyjnego 0,5 M TRIS-HCl pH 7,5 zawierającego EDTA, KCl, MgCl<sub>2</sub>, PVP, TRITON. Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono na dwóch systemach buforowych: A) tris-citrate pH 7,0 (bufor elektrodowy) / tris-histidine pH 7,0 (bufor żelowy); B) LIOH-borate pH 8,5 (bufor elektrodowy) tris-citrate-LIOH-borate pH 8,5 (bufor żelowy) [Cheliak, Pitel 1984; Conkle i in. 1982]. Analizę prowadzono dla 13 systemów enzymatycznych kodowanych przez 26 loci: FEST (EC 3.1.1.1. – 3 loci), GDH (EC 1.4.1.2. – 1 locus), GOT (EC 2.6.1.1. – 3 loci), IDH (EC 1.1.1.42 – 2 loci), MDH (EC 1.1.1.37. – 3 loci), SHDH (EC 1.1.1.25 – 2 loci), PGM (EC 2.7.5.1. – 2 loci), 6PGD (EC - 2 loci), G6PD (EC 1.1.1.49 – 2 loci), NDH (EC – 2 loci), PGI (EC 5.3.1.9. – 1 locus), DIA (EC 1.6.4.3. – 2 loci), ME (EC 1.1.1.40 – 1 locus).

**ANALIZA DANYCH.** Uzyskane dane poddano analizie statystycznej przy użyciu programu GenAlEx 6.5 [Peakall, Smouse 2012]. Poziom zróżnicowania genetycznego opracowano w ujęciu populacyjnym oraz osobniczym za pomocą następujących parametrów: procent loci polimorficznych, liczba alleli stwierdzonych w analizowanych loci, średnia liczba alleli na locus, heterozygotyczność obserwowana ( $H_o$ ) i spodziewana ( $H_e$ ), indeks wsobności ( $F$  – Fixation index) jako miara odchylenia od równowagi Hardy’ego-Weinberga (testowany testem chi-kwadrat), analiza składowych głównych przeprowadzona w oparciu o dystanse genetyczne [Nei 1972] pomiędzy poszczególnymi drzewami i heterozygotyczność indywidualna dla każdego osobnika ( $H$ -ind). Określono również indywidualny wzór genotypowy każdego drzewa w zakresie analizowanych 26 loci.

## Wyniki

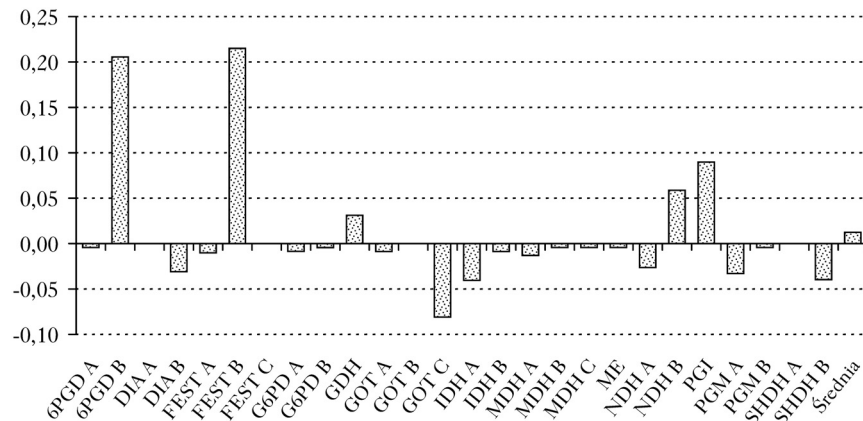
Przeanalizowano zmienność 117 drzew świerka pospolitego w zakresie 26 loci izoenzymatycznych. Procent loci polimorficznych wynosił 85%, cztery loci okazały się monomorficzne: DIA A, FEST C, GOT B i SHDH A.

W całej populacji badanych drzew średnia liczba alleli na locus wynosiła 2,4 (od 1 do 5 w poszczególnych loci). Średnia heterozygotyczność obserwowana była raczej niska (0,110), natomiast znaczne różnice wartości tego parametru (0,000-0,521) występowały w poszczególnych loci (ryc. 1). Najwyższą heterozygotyczność obserwowaną stwierdzono w loci: GOT C, NDH B oraz PGI. Średnia dla wszystkich loci wartość indeksu wsobności – 0,012 – wskazuje, że populacja znajduje się w stanie równowagi Hardy’ego-Weinberga. Wartość tego indeksu była dość zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi loci (–0,081-0,215) (ryc. 2). Statystycznie istotne odchylenie od równowagi Hardy’ego-Weinberga (nadmiar genotypów homozygotycznych), wykazane testem chi-kwadrat, stwierdzono w trzech loci: 6PGD, FEST B i GDH.



Ryc. 1.

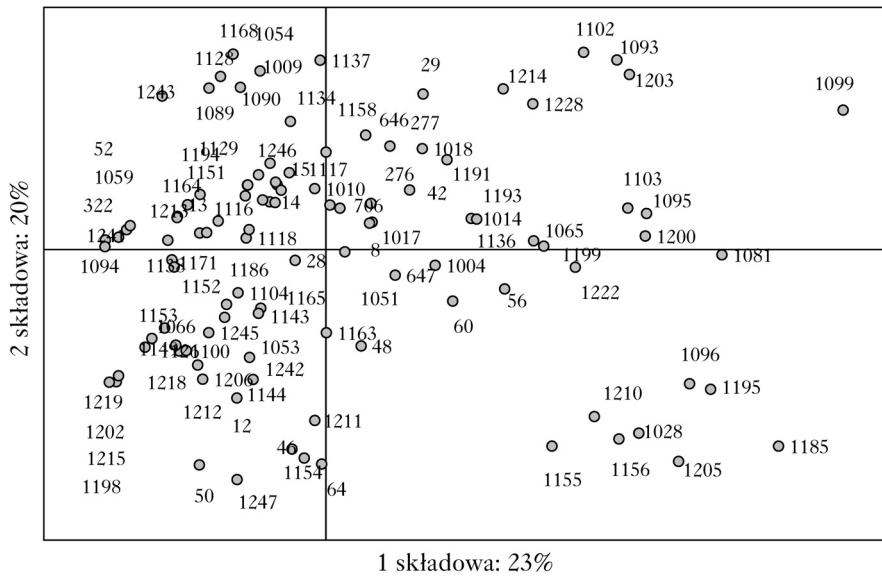
Heterozygotyczność obserwowana w populacji *Picea abies* w 26 analizowanych loci izoenzymatycznych  
Observed heterozygosity of *Picea abies* population in 26 analysed isoenzymatic loci



Ryc. 2.

Indeks wsobności Wrighta w populacji drzew *Picea abies* w 26 analizowanych loci izoenzymatycznych  
Fixation index of *Picea abies* population in 26 analysed isoenzymatic loci

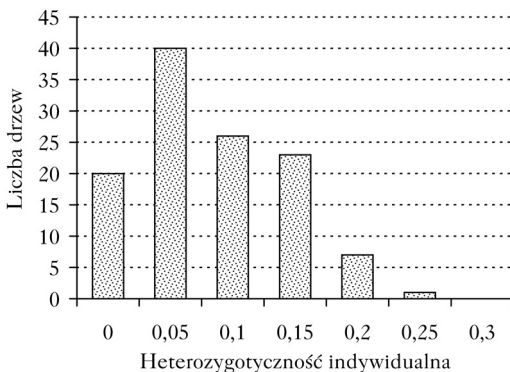
Dla każdego badanego drzewa określono wzór genotypowy w zakresie 26 analizowanych loci izoenzymatycznych (tabela ze szczegółowymi parametrami genetycznymi dostępna do wglądu u autora korespondencyjnego). Sześć wzorów genotypowych, oznaczonych jako A, B, C, D, E i F, stwierdzono w dwóch, trzech i pięciu osobnikach. Pozostałe wzory genotypowe, oznaczone od 1 do 101, okazały się unikatowe, reprezentowane tylko przez jedno drzewo. Na podstawie wartości dystansów genetycznych pomiędzy poszczególnymi drzewami przeprowadzono analizę składowych głównych (ryc. 3). Wykazała ona stosunkowo jednorodny charakter badanej populacji drzew *Picea abies*, z wyjątkiem ośmiu osobników (1028, 1096, 1155, 1156, 1185, 1195, 1205, 1210), które formują odrębną genetycznie grupę. Wszystkie te osiem drzew cechuje unikatowy wzór genotypowy w zakresie 26 loci. Ponadto w locus 6PGD B osobniki te okazały się heterozygotami. Heterozygotyczność obliczona dla poszczególnych osobników (H-ind: heterozygotyczność indywidualna) wynosiła 0,00-0,25 (ryc. 4). Całkowicie homozygotyczne w zakre-



Ryc. 3.

Analiza składowych głównych skonstruowana na podstawie dystansu genetycznego Nei'a między poszczególnymi drzewami *Picea abies*

PCA of Nei's genetic distance for individual trees



Ryc. 4.

Średnia heterozygotyczność indywidualna dla poszczególnych świerków  
Mean individual heterozygosity for investigated spruces

sie 26 analizowanych loci było 20 drzew świerka pospolitego, zaś najwyższe wartości H-ind (0,20-0,25) stwierdzono tylko u 8 osobników.

## Dyskusja

Zestawienie uzyskanych wyników z wcześniejszymi pracami nad zmiennością izoenzymatyczną populacji świerka pospolitego daje dość ciekawy obraz. Populacja z Puszczy Białowieskiej (P% 85; A/L 2,4;  $H_o=0,110$ ) wykazuje nieco niższy poziom zmienności genetycznej szczególnie w odniesieniu do naturalnych populacji tego gatunku z Austrii (P% 45; A/L 2,8-3,3;  $H_o=0,165-0,170$ ) [Geburek 1998] i Łotwy (P% 69-81; A/L 2,0-2,5;  $H_o=0,171-0,201$ ) [Goncharenko i in. 1995] oraz wcześniejszych doniesień Krzakowej i Korczyka [1995] dotyczących wybranych drzew z Puszczy Białowieskiej (P% 100;  $H_o=0,237$ ). Szczególnie ta ostatnia praca prezentuje znacznie wyższy poziom zmienności genetycznej populacji *Picea abies*. Różnice te w dużej mierze mogą być efektem innego doboru loci izoenzymatycznych różniących się poziomem polimorficzności, jak również wieku badanych drzew. Potwierdza to duży zakres wartości heterozygotyczności obserwowanej w poszczególnych loci (0,000-0,521) wykazany w niniejszej pracy. Badana populacja z Puszczy Białowieskiej wykazuje niższy poziom heterozygotyczności obserwowanej również w stosunku do proveniencji świerka z doświadczeń IUFRO:  $H_o=0,076-0,174$  [Lagercrantz, Ryman 1990];  $H_o=0,190-0,310$  [Kannenberg, Gross 1997];  $H_o=0,106-0,234$  [Prus-Głowacki, Modrzyński 2003]. Zarówno wyniki opisanych analiz, jak i doniesień Krzakowej i Korczyka [1995] wskazują, że populacja najstarszych drzew świerka pospolitego w Puszczy Białowieskiej znajduje się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga. Wyniki uzyskane dla populacji z Puszczy Białowieskiej nie potwierdzają hipotezy postulowanej przez Lagercrantza i Rymana [1990] oraz popieranej przez Goncharenkę i in. [1995] o wyższym poziomie genetycznej zmienności populacji świerka ze wschodniej części zasięgu europejskiego.

Dla każdego z badanych drzew opracowano rodzaj „genetycznej metryki” zawierającej wzór genotypowy w zakresie analizowanych 26 loci izoenzymatycznych, liczbę stwierdzonych alleli oraz poziom heterozygotyczności indywidualnej. Okazało się, że spośród 117 drzew 101 cechuje się unikatowym (niepowtarzalnym) wzorem genotypowym, a 20 osobników jest całkowicie homozygotycznych w zakresie badanych loci. Takie „genetyczne metryki” pozwalają identyfikować poszczególne osobniki, jak również ich wegetatywne potomstwo w archiwum klonów.

Dystanse genetyczne osiągają raczej wyrównane wartości pomiędzy poszczególnymi osobnikami, na co wskazuje wykres analizy składowych głównych. Wyjątek stanowi osiem drzew formujących odrębną genetycznie grupę. Uzyskane wyniki nie potwierdzają podziału populacji na dwie „genetyczne subpopulacje” wykazane w pracy Krzakowej i Korczyka [1995]. Rozbieżności te prawdopodobnie wynikają z liczby i rodzaju analizowanych loci markerowych oraz struktury wiekowej badanych drzew. Rezultaty badań pozwalają stwierdzić, że najstarsze drzewa *Picea abies* w Puszczy Białowieskiej charakteryzują się raczej niskim, na tle gatunku, poziomem zmienności genetycznej, a ich homozygotyczne w większości genotypy, dobrze zaadaptowane w swoim środowisku, pozwoliły im dożyć tak sędziwego wieku.

## Literatura

- Burezyk J., Chybiński I. 2005. Przepływ genów w populacjach drzew leśnych a ochrona leśnych zasobów genowych. W: Ochrona leśnych zasobów genowych i hodowla selekcyjna drzew leśnych w Polsce – stan i perspektywy. Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Techniczna. Malinówka k. Ełku 8-10.06.2005. SITLD, Warszawa. 90-100.
- Cheliak W. M., Pitel J. A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Institute.

- Conkle M. T., Hodgskiss P. D., Nunnally L. B., Hunter S. C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA for. Serv. Tech. Rep. PSW-64.
- Geburek T. 1998. Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) populations in Austria. I. Digenic equilibrium and microspatial patterns derived from allozymes. *Forest Genetics* 5 (4): 221-230.
- Goncharenko G. G., Zadeika I. V., Birgelis J. J. 1995. Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations in Latvia. *Forest Ecol. and Management* 72: 31-38.
- Gregorius H. R. 1991. Gene conservation and the preservation of adaptability. W: Seitz A., Loeschke V. [red.]. *Species conservation: a population-biological approach*. Birkhäuser, Basel. 31-47.
- Kannenbergh N., Gross K. 1997. Allozymic variation in some Norway spruce populations of the international IUFRO provenance-testing programme of 1964-1968. *Silvae Genetica* 48 (5): 209-217.
- Korczyk A. F. 1994. Preservation of more than 200 year old Scots pine trees gene resources in the Białowieża Primeval Forest (in Polish and Beylarussian sides). *Proc. of the IUFRO Symposium Lithuania 1994: Scots pine breeding and genetics*. 101-103.
- Korczyk A. F. 2005. Rola starych drzew i ginących gatunków drzewiastych w zachowaniu zasobów genowych i odtwarzaniu ginących populacji. W: *Ochrona leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce – stan i perspektywy*. Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Techniczna. DGLP, IBL, SITLiD, PTL. Malinówka k. Elku 8-10.06.2005. 117-121.
- Korczyk A. F. 2008. Inwentaryzacja drzew starych i drzew gatunków ginących w Puszczy Białowieskiej. *Leśne Prace Badawcze* 69 (2): 117-126.
- Krzakowa M., Korczyk A. F. 1995. Enzymatic diversity of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. from the Białowieża Forest. W: Paschalis P., Rykowski K., Zajączkowski S. [red.]. *Protection of forest ecosystems biodiversity of Białowieża Primeval Forest*. Warszawa. 81-93.
- Lagercrantz U., Ryman N. 1990. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44: 38-53.
- Matras J. 2006. Ochrona leśnych zasobów genowych. W: Sabor J. [red.]. *Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych*. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa. 573-577.
- Mosseler A., Thompson I., Pendrel B. A. 2003. Overview of old-growth forests in Canada from a science perspective. *Environmental Review* 11: 1-7.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-un update. *Bioinformatics* 28 (19): 2537-9.
- Prus-Głowacki W., Modrzyński J. 2003. Zmienność izoenzymatyczna niektórych polskich populacji świerka (*Picea abies* (L.) Karst.) z doświadczenia proweniencyjnego IUFRO-1972. *Sylvan* 147 (3): 3-10.

## SUMMARY

### Genetic profile of the oldest *Picea abies* (L.) Karst. trees in the Białowieża Primeval Forest

Old-growth forests are considered essential for maintaining biodiversity. 'Genetic inventory' of old *Picea abies* (L.) Karst. trees from the Białowieża Primeval Forest is very important to investigate and protect their genetic resources (primary gene pool). The aim of this study was to: 1) describe of the genetic structure of the population of old *Picea abies* trees in the Białowieża Primeval Forest and 2) design the genetic database for every examined tree in scope of 26 isoenzymatic loci containing: the genotype pattern, the number of stated alleles and the level of individual heterozygosity. The study was located in the Hajnówka Forest District in the Białowieża Primeval Forest (eastern Poland). Studies were conducted in naturally regenerated Norway spruce population and included 117 trees at the age of from 89 to 213 years. Genetic variability was performed using isozyme markers (26 loci).

The share of polymorphic loci was 85%, while four loci were monomorphic (DIA A, FEST C, GOT B and SHDH A). The mean number of alleles was 2.4 per locus. Mean observed heterozygosity was rather low (0.110), but significant differences for this parameter (0.000 to 0.521) occurred in particular loci. Fixation index value (0.012) indicates that the population

is in Hardy-Weinberg equilibrium. Six genotype patterns, marked as A, B, C, D, E, F were stated for two, three and five individuals. 101 remaining patterns turned out to be unique, represented only by one tree. Individual heterozygosity (H-ind) for particular trees ranged 0.00-0.25. Completely homozygous characterized 20 spruces, whereas maximum values H-ind (0.20-0.25) were observed only in 8 individuals. Genetic distances demonstrate rather balanced values between individuals, as exhibited by principal component analysis. The exception is the eight trees that form a genetically distinct group. The oldest Norway spruces in the Białowieża Primeval Forest are characterized by rather low level of genetic variation and their homozygous genotypes that are well adapted to their environment let them live to a ripe old age.