

Wstępne badania nad zróżnicowaniem allozymowym *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) na reliktowym stanowisku w Pieninach Centralnych

A preliminary study of allozyme variation in *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) on a relict site in the Central Pieniny Mts.

PIOTR KOSIŃSKI^{1,2}, ALEKSANDRA WOJNICKA-PÓLTORAK³

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Botaniki,
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

²Instytut Dendrologii PAN, ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

³Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Wydział Biologii, Zakład Genetyki,
ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań, e-mail: kosinski@up.poznan.pl

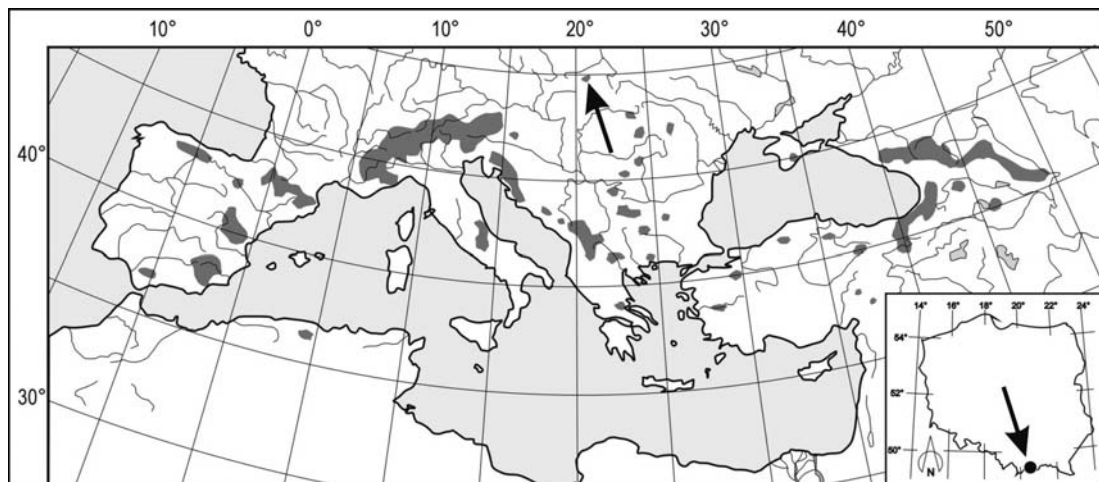
Abstract. Ten individuals from a geographically isolated Savin population were tested for differentiation of nine enzyme systems, providing data for nine putative allozyme loci. Although the diversity indices were rather low (55.6% of polymorphic loci, 1.66 alleles per locus, observed and expected heterozygosity 0.18 and 0.2 respectively), given the small sample size they still reveal relatively high genetic differentiation in this population. Nevertheless, a small population size may gradually lead to further loss of its genetic variation. It is also possible that the current genetic diversity of the population is the result of gene flow from widely grown ornamental representatives of this species, which would lead to a gradual vanishing of the original gene pool.

Key words: genetic, isolated population, Carpathians

WSTĘP

Jałowiec sabiński jest dwupiennym, niskim krzewem (w typowej odmianie poniżej 1 m), rzadziej skarłowaciałym, kilkumetrowym drzewkiem. Ma pędy wyprostowane lub podnoszące się, z końcowymi odgałęzieniami o grubości około 1 mm, pokryte przylegającymi, naprzeciwległymi, łuskowatymi liśćmi o długości 1–2,5 mm; juwenilne liście mają postać 4–5 mm igieł (Farjon 2005). Okrągławe, niebieskoczarne szyszkojagody (galbuli) o średnicy 5–6 mm złożone są z 4–6 łusek

i zawierają na ogół dwa (1–4) nasiona (Adams 2008, Farjon 2005). Gatunek ten występuje w rozproszeniu od południowo-zachodniej Europy (Hiszpania) i północnej Afryki (Algieria) do centralnej Azji (Kazachstan, Mongolia i zachodnie Chiny), na suchych i nasłonecznionych zboczach gór (przede wszystkim w górskich i subalpejskich borach i na pastwiskach), zwykle w pasie wysokości 1500–2500 m n.p.m. (od 600 m na północy do 3000 m w Alpach). W Europie występuje najczęściej w górskich obszarach strefy śródziemnomorskiej.



Ryc. 1. Lokalizacja badanej populacji jałowca sabińskiego *Juniperus sabina* na tle europejskiego zasięgu gatunku. The European range of Savin juniper and location of the studied population.

Pieniny są najdalej wysuniętym na północ i silnie izolowanym stanowiskiem tego gatunku w Europie Zachodniej i Środkowej (Ryc. 1). Przyjmuje się, że jest on tu reliktem trzeciorzędowym (Smólski 1937; Białobok i in. 1968; Zarzycki, Wróbel 2001), chociaż Pieniny są też uważane za jego plejstocенską lub interglacialną ostoję (Kneblová 1960). Mimo że jest to jałowiec powszechnie uprawiany i wytrzymały na trudne warunki środowiska, w Polsce występuje naturalnie na tym tylko stanowisku, a w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin uznany jest za gatunek narażony na wyginięcie (Zarzycki, Wróbel 2001). Po stronie polskiej jałowiec sabiński występuje w 27 kępach skupionych na trzech stanowiskach: Facimiech – 23 kępy w 9 grupach, Piecki – trzy kępy tworzące jedną grupę, oraz Głowa Cukru – jedna kępa (Wróbel 1998). Po stronie słowackiej został stwierdzony w sześciu miejscach na Mnichach (Kunštárová i in. 2007). W Pieninach rośnie w szczelinach wapiennych ścianek skalnych o ekspozycji południowo-wschodniej, na wysokości 510–740 m n.p.m. (Zarzycki, Wróbel 2001).

Dotychczas brak jest publikacji na temat elektroforetycznej analizy białek enzymatycznych tego gatunku. Ukazało się jednak kilka prac poświęconych innym przedstawicielom sekcji *Sabina*. Kelley i Adams (1978) określili wskaźniki podobieństwa genetycznego północnoamerykańskiego *J. ashei*

na podstawie trzech systemów enzymatycznych. Lewandowski i in. (2000) przedstawili fenotypy 14 loci enzymatycznych oraz przestudiowali ich dziedziczenie w trzech iberyjskich populacjach *J. phoenicea* (makrogametofity i zarodki). Polimorfizmem białek enzymatycznych tego samego gatunku w regionie śródziemnomorskim zajęli się Boratyński i in. (2009). W pracy tej przebadano zróżnicowanie 17 loci enzymatycznych w 14 populacjach jałowca fenickiego (materiał stanowiły makrogametofity nasion z 391 osobników), a uzyskane wyniki zinterpretowano w kontekście taksonomicznym i fitogeograficznym.

Głównym celem badań nad jałowcem sabińskim w Pieninach była wstępna charakterystyka polimorfizmu wybranych białek izoenzymatycznych tego gatunku i wnioskowanie na tej podstawie o zróżnicowaniu genetycznym tej reliktowej populacji, co powinno stanowić przyczynek do możliwości jej zachowania i przetrwania w przyszłości.

MATERIAŁ I METODY

Ze względu na utrudniony dostęp do miejsc występowania jałowca sabińskiego udało się zebrać materiał z zaledwie dziesięciu osobników rosnących w oddzielnych grupach (dziewięć na Facimiechu i jedna na Mnichach po stronie

słowackiej). Pozyskane 4–8 cm końce pędów zostały ukorzenione i posadzone. Utworzona plantacja klonów w trakcie badań stanowiła rezerwar materiału, a po ich zakończeniu posłużyła do stworzenia dwóch upraw zachowawczych (PPN i Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu).

Do ekstrakcji białek wykorzystano zielone końce pędów. Białka enzymatyczne homogenizowano buforem ekstrakcyjnym 0,05 M Tris-HCl o pH 7,5, z dodatkiem EDTA, KCl, MgCl₂, PVP K25 i Tritonu. Nasączone homogenatem bibułki przechowywano w temperaturze –80°C. Elektroforezę horyzontalną prowadzono na 10% żelu skrobiowym w dwóch systemach buforowych: I – o pH 8,3 (bufor żelowy: Tris, kwas cytrynowy, kwas borowy, LiOH; bufor elektrodowy: kwas borowy i LiOH) stosowany był dla następujących systemów enzymatycznych: diaforazy (DIA, E.C. 1.6.4.3), esterazy fluorescencyjnej (FEST, E.C. 3.1.1.1) i transaminazy glutaminianowo-szczawiooctanowej (GOT, E.C. 2.6.1.1); II – o pH 7,0 (bufor żelowy: Tris i chlorowodorek histydyny; bufor elektrodowy: Tris i kwas cytrynowy) używany był dla następujących systemów enzymatycznych: fosfoglukomutazy (PGM, E.C. 2.7.5.1.), dehydrogenazy jabłczanowej (MDH, E.C. 1.1.1.37), dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH, E.C. 1.1.1.42), dehydrogenazy szikimianowej (SHDH, E.C. 1.1.1.25), dehydrogenazy fosfoglukonianowej (6PGD, E.C. 1.1.1.44) i dehydrogenazy glukozy-fosforanowej (G6PD, E.C. 1.1.1.49). Barwienie przeprowadzono zgodnie z procedurą Cheliaka i Pitela (1984). Numeracja alleli oparta została na ich frekwencji – numerem „1” oznaczano najczęstszy allel w danym locus.

Różnorodność genetyczna populacji została opisana za pomocą: udziału loci polimorficznych (P), średniej liczby alleli na locus (A), heterozygotyczności oczekiwanej (H_E) i obserwowanej (H_O), indeksu wsobności Wrighta (F) i polimorfizmu genotypowego (P_G), które wyliczone zostały w programie PopGene (Yeh i in. 1999).

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania przeprowadzono na dziewięciu systemach enzymatycznych, uzyskując dane dla dziewięciu loci izoenzymatycznych. W przypadku

J. phoenicea niektóre systemy enzymatyczne miały więcej stref aktywności: GOT trzy loci, pozostałe po dwa (FEST, MDH, PGM i SHDH) (Lewandowski i in. 2000; Boratyński i in. 2009). Może to wynikać z różnic taksonomicznych (dwa różne gatunki), materiału użytego do badań (wegetatywna tkanka pędów vs haploidalne makrogameofity), mniejszej liczby przebadanych osobników czy w końcu odmiennych warunków reakcji.

W badanej populacji 55,6% loci było polimorficznych (Tab. I): 6PGD, FEST, G6PD, IDH i PGM (monomorficzne były pozostałe cztery loci: DIA, GOT, MDH i SHDH). W świetle danych dotyczących jałowca fenickiego (Boratyński i in. 2009), w których udział loci polimorficznych wahał się między 41% a 100% (przy średniej 72%) na populację, uzyskany rezultat lokowałby pinińską populację jałowca sabińskiego wśród mniej zmiennych pod tym względem (wciąż jest to jednak wartość przeciętna wśród roślin nagozalążkowych). Można jednak przypuszczać, że uwzględnienie w badaniach większej liczby osobników pozwoliłoby wykryć pewne rzadsze

Tabela I. Częstość alleli.
Allele frequencies.

Locus	Numery alleli The numbers of alleles	Frekwencja Frequency [%]
6PGD	1	0,85
6PGD	2	0,15
DIA	1	1,00
FEST	1	0,75
FEST	2	0,25
G6PD	1	0,85
G6PD	2	0,15
GOT	1	1,00
IDH	1	0,35
IDH	2	0,65
MDH	1	1,00
PGM	1	0,70
PGM	2	0,25
PGM	3	0,05
SHDH	1	1,00
Liczba alleli Number of alleles		15
Liczba alleli na locus (A) Number of alleles per locus		1,66

allele, co mogłoby zwiększyć odsetek loci polimorficznych.

Największym polimorfizmem cechował się locus PGM (3 allele), podczas gdy pozostałe loci polimorficzne reprezentowane były przez formy dwulalleliczne (Tab. I). Średnia liczba alleli na locus była niska (1,66) i mieściła się w dolnym zakresie wartości *J. phoenicea* (1,64–2,82, średnia 2,11; Boratyński i in. 2009). Podobnie jak w przypadku udziału loci polimorficznych także na wartość tego wskaźnika ma wpływ wielkość próby.

Wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej wyniosły odpowiednio 0,18 i 0,2, co wskazuje na niewielki nadmiar homozygot ($F=0,1$). W przypadku populacji jałowca fenickiego heterozygotyczność oczekiwana przyjmowała wartości od 0,128 do 0,248, ze średnią 0,187 (Boratyński i in. 2009), a więc w populacji pienińskiej *J. sabina* była ona relatywnie wysoka. Największą liczbę kombinacji alleli stwierdzono w locus PGM – cztery genotypy, i IDH – trzy genotypy (w pozostałych loci polimorficznych występowały dwa genotypy; średnia 1,9), przy czym częstsze były formy homozygotyczne (Tab. II).

Niewielka liczba przeanalizowanych okazów nie pozwala na wyciąganie daleko idących wniosków. Biorąc jednak pod uwagę uzyskane wyniki, można stwierdzić, że populacja ta cechuje się nadal stosunkowo wysokim zróżnicowaniem genetycznym. Z jednej strony może ono być w jakimś stopniu odzwierciedleniem długiej historii tej populacji, sięgającej wg niektórych autorów okresu poprzedzającego plejstocenię zlodowacenia lub któregoś z interglacjałów. W ostatnim interglaciale eemskim (132–115 tysięcy lat p.n.e.) temperatury były wyższe od obecnych o 2–3°C, co mogło sprzyjać migracji wielu gatunków południowych. Istnieją wiarygodne informacje, że jeszcze do niedawna jałowiec sabiński występował w Pieninach obficie, a do jego znacznego przetrzebiecia przyczynić się mogło intensywne pozyskiwanie tego gatunku jako surowca zielarskiego znajdującego zastosowanie w medycynie ludowej (Smólski 1937). Z drugiej strony nie można wykluczyć, że obecne zróżnicowanie genetyczne populacji jest efektem wzbogacania jej puli genowej dokonujące się bądź to za pośrednictwem pyłku z okazów uprawianych w sąsiedztwie, bądź

Tabela II. Frekwencja genotypów.
Genotype frequencies.

Locus	Genotyp Genotype	Frekwencja Frequency [%]
6PGD	1 1	0,70
6PGD	1 2	0,30
DIA	1 1	1,00
FEST	1 1	0,50
FEST	1 2	0,50
G6PD	1 1	0,70
G6PD	1 2	0,30
GOT	1 1	1,00
IDH	1 1	0,20
IDH	1 2	0,30
IDH	2 2	0,50
MDH	1 1	1,00
PGM	1 1	0,60
PGM	1 2	0,10
PGM	1 3	0,10
PGM	2 2	0,20
SHDH	1 1	1,00
Liczba genotypów Number of genotypes		17
Liczba genotypów na locus (P_G) Number of genotypes per locus		1,9

w wyniku epizodów kolonizacji tego stanowiska wskutek roznoszenia nasion przez ptaki. Zjawiska te prowadziłyby to do stopniowego „rozcieńczenia” pierwotnej puli genowej. Dodatkowym zagrożeniem jest niewielka wielkość tej populacji, której efektem może być dalsza stopniowa utrata jej zmienności genetycznej. Weryfikacja tych hipotez wymagałaby jednak bardziej szczegółowych badań obejmujących większą liczbę osobników z tej populacji (oraz ich potomstwa w postaci nasion), a także okazy uprawiane w najbliższym sąsiedztwie.

PODZIĘKOWANIA. Autorzy składają serdeczne podziękowania Państwu Iwonie i Sławomirowi Wróblom za pomoc w zbiorze materiału, a także anonimowemu recenzentowi – za pomocne uwagi.

PIŚMIENNICTWO

Adams R. P. 2008. *Junipers of the World: The genus Juniperus*. — Trafford Publishing Co., Vancouver, wyd. 2, 402 s.

- Białobok S., Browicz K., Gostyńska-Jakuszczyńska M. 1968. Atlas rozmieszczenia drzew i krzewów w Polsce. 7. — PWN, Poznań.
- Boratyński A., Lewandowski A., Boratyńska K., Montserrat J.M., Romo A. 2009. High level of genetic differentiation of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in the Mediterranean region: geographic implications. — *Plant Systematics and Evolution*, **277**(3–4): 163–172.
- Cheliak W.M., Pitel J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. — Information Report PI-X-42, 1–49. — Petawawa National Forestry Institute, Agriculture Canada, Canadian Forestry Service, Chalk River, Ontario, Canada.
- Farjon A. 2005. A monograph of Cupressaceae and *Sciadopitys*. — Royal Botanic Gardens, Kew, 643 s.
- Kelley W.A., Adams R.P. 1978. Analysis of isozyme variation in natural populations of *Juniperus ashei*. — *Rhodora*, **80**: 107–134.
- Knebllová V. 1960. Paleobotanický výzkum interglaciálních travertinů v Gánovcích. — *Biologické Práce*, **6**(4): 1–42.
- Kunštárová V., Klč V., Wróbel S. 2007. Borievka netatová L. (*Juniperus sabina* L.) v Pieninách. — *Bulletin Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, **29**: 79–82.
- Lewandowski A., Samoćko J., Boratyński A., Mejnartowicz L. 2000. Inheritance and linkage of allozymes in *Juniperus phoenicea* L. — *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **69**(3): 201–205.
- Smólski S. 1937. Jałowiec Sawina (*Juniperus Sabina* L.) w Pieninach. — *Ochrona Przyrody*, **17**: 216–221.
- Wróbel S. 1998. Inwentaryzacja stanowisk jałowca sawiny (*Juniperus sabina* L.) w polskiej części Pienin w świetle opracowywanego planu ochrony Pienińskiego Parku Narodowego. — *Pieniński Park Narodowy, Krościenko n/D.*, msk. 20 s.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. 1999. Popgene version 1.31. — University of Alberta, Canada.
- Zarzycki K., Wróbel S. 2001. *Juniperus sabina* L., jałowiec sawina. [W:] R. Kaźmierczakowa, K. Zarzycki (red.), *Polska Czerwona Księga Roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*. — Instytut Botaniki i Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, ss. 66–68.

SUMMARY

The Savin population of Pieniny (Fig. 1) consists of 27 clumps growing on inaccessible and steep calcareous cliffs (Wróbel 1998). It is widely assumed that Savin is a tertiary relict (Smólski 1937; Białobok et al. 1968; Zarzycki and Wróbel 2001), although sometimes the Pieniny Mts. are considered to be its interglacial or Pleistocene

refugium (Knebllová 1960). To date there has been a lack of publications related to electrophoretic analysis of allozymes in Savin, and only a few refer to other juniper species from the section *Sabina*. Among them the most extensive is the work of Boratyński et al. (2009), who examined the variation at 17 enzymatic loci in 14 populations (391 individuals) of the Phoenician juniper in the Mediterranean region.

We managed to collect material, in the form of 4–8 cm-long shoots, from just ten individuals. Homogenization was performed in 0.05 M Tris-HCl extraction buffer (pH 7.5), with the addition of EDTA, KCl, MgCl₂, PVP, K25 and Triton. Separation of nine enzymatic systems was performed using electrophoresis on 10% starch gel in two buffer systems. System I at pH 8.3 (gel buffer: Tris, citric acid, boric acid, LiOH; electrode buffer: boric acid and LiOH) was used for DIA, FEST and GOT. System II at pH 7.0 (Tris-histidine gel buffer and Tris-citrate electrode buffer) was used for: PGM, MDH, IDH, SHDH, 6PGD and G6PD. Standard staining procedures with some minor modifications were applied (Cheliak and Pitel 1984).

The investigation of nine enzymatic systems provided data for nine allozyme loci. Five loci of the Savin population were polymorphic (56%), whereas the remaining four were monomorphic (Tab. I). The share of polymorphic loci in populations of the Phoenician juniper (Boratyński et al. 2009) ranged from 41% to 100% (average 72%). The PGM locus with three alleles displayed the highest polymorphism, while the remaining polymorphic loci were represented by two-allelic forms. In general, the average number of alleles per locus was low (1.66), lying in the lower range of values found in *J. phoenicea* (1.64–2.82 per population, mean 2.11). The average observed and expected heterozygosity was 0.18 and 0.20 respectively, indicating a small, statistically insignificant excess of homozygotes ($F=0.1$). The expected heterozygosity in populations of the Phoenician juniper ranged from 0.128 to 0.248 (mean 0.187). The greatest number of combinations of alleles were found at the locus PGM – four genotypes, and IDH – three genotypes (mean 1.9) (Tab. II).

The small number of individuals examined

does not allow us to draw any far-reaching conclusions. However, the genetic diversity within population appears to be relatively high. On the one hand this may reflect the long history of this population (as a remnant of a larger population it may still reflect its former genetic richness). “According to reliable sources, it is known that the Savin Juniper was found in abundance in the Pieniny Mts. until recently; the intensive harvesting of this species as a raw herb for use *as a natural remedy* probably exacerbated its decline” (Smólski 1937).

On the other hand, it is possible that the current genetic diversity within the population is

the result of the enrichment of the gene pool by pollen-mediated gene flow from outside (*J. sabina* is a widely grown ornamental), as well as episodes of colonization of this area by means of seeds dispersed by birds. Such a situation would cause the gradual “dilution” of the original, local gene pool. An additional risk is the limited population size, which may gradually lead to further loss of its primeval genetic variation. Verification of these hypotheses, however, would require more detailed study involving a larger number of individuals and their progeny, as well as comparative material from specimens cultivated in the direct neighbourhood.