

Anna Jagielska*

Zastosowanie markerów genetycznych w identyfikacji gatunkowej modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) i japońskiego (*Larix kaempferi* Sorg.) oraz ich mieszańców

Application of genetic markers in species identification of European and Japanese larch and their hybrids

Abstract. The mitochondrial marker *fl3* occurring in the Japanese larch only and chloroplast marker *II-Taq I* exhibiting different restriction pattern in relation to the species were used to identify European, and Japanese species of larch (*Larix decidua* Mill. and *Larix kaempferi* Sorg. respectively) as well as their hybrids. Plant material of known origin was obtained from nursery managed by INRA (Institute de la Recherche Agronomique): 10 individuals of *L. decidua*, 13 individuals of *L. kaempferi* and 10 hybrid of generation F1. Additionally 34 hybrid individual of generation F1/F2 were collected in the Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt du Limousin. Applied markers enabled species identification of all pure-bred individual, as well as 99% of hybrids of the generation F1.

Key words: *Larix*, hybrids, species-specific isoenzyme and markers.

1. Wstęp

Do rodzaju modrzew należy 10–24 (wg różnych autorów) gatunków rosnących na półkuli północnej (Hrynkiwicz-Sudnik i in. 1999). Według Bugały (2000) istnieje około 10 gatunków i tyle samo mieszańców. Duża zmienność modrzewia powoduje od dawna liczne problemy taksonomiczne, gdyż gatunki rodzaju *Larix* dość łatwo się krzyżują między sobą. W wielu przypadkach jedyną barierą dla międzygatunkowej hybrydyzacji jest izolacja geograficzna. Istnieją doniesienia na temat powstania spontanicznych hybryd, bądź też o udanym uzyskaniu mieszańców po sztucznym zapyleniu między różnymi gatunkami modrzewi. Przyjmuje się nawet, że niektóre gatunki modrzewi mogą być hybrydami powstałymi na styku zasięgu gatunków rodzicielskich (Bobrov 1972). W taki właśnie sposób mógł powstać modrzew polski, jako takson mieszańcowy na granicy zasięgu modrzewia europejskiego i syberyjskiego (Bobrov 1972). Z ekonomicznego punktu widzenia, najbardziej korzystnym mieszańcem w rodzaju *Larix* jest mieszaniec modrzewia europejskiego i japońskiego (Pâques 1989).

W Polsce występuje jeden rodzimy gatunek modrzewia *Larix decidua* Mill., obejmujący następujące podgatunki: modrzew europejski (*L. decidua* sensu stricto), w obrębie którego wydzielono osobno odmianę z Sudetów [var. *sudetica* (Cies.) Domin.], oraz modrzew polski [*L. decidua* subsp. *polonica* (Racib.) Domin.]. Spośród obcych gatunków modrzewia najczęściej spotykany w naszym kraju jest modrzew japoński (*Larix kaempferi* Sorg.). W wyniku krzyżowania się obu gatunków (*L. decidua* i *L. kaempferi*) powstaje mieszaniec, tzw. modrzew eurojapoński (*Larix* × *eurolepis* Henry).

Ojczyzną modrzewia japońskiego (*L. kaempferi* Sorg.) są regiony górskie wyspy Hondo. Gatunek ten ma charakter drzewa pionierskiego, zwłaszcza na obszarach z o dużej aktywności wulkanicznej (Chylarecki 2000). Na teren Polski został wprowadzony ze względu na wytrzymałość na niską temperaturę, suszę, choroby (przede wszystkim na raka modrzewiowego) oraz łatwość przystosowania się do różnych gleb (Białobok 1986). Jest on sto-

* Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych;
✉ Fax: 0-22 72 00 379; e-mail: A.Jagielska@ibles.waw.pl

sunkowo licznie reprezentowany w Polsce, przede wszystkim w północno – zachodniej części kraju, na terenach znajdujących się w I Krainie przyrodniczo-leśnej (Bałtyckiej), ale można go spotkać we wszystkich częściach kraju (Filipiak 1993). W okresie powojennym *L. kaempferi* trafił do drzewostanów w naszym kraju za sprawą zbioru jego nasion jako nasion modrzewia europejskiego. Drzewostany powstałe w tym okresie posiadają zazwyczaj w swoim składzie zarówno modrzew europejski, jak i modrzew japoński, oraz znaczną liczbę osobników o cechach mieszanych. Mieszaniec wykazuje cechy pośrednie między gatunkami rodzicielskimi, skala zmienności jego cech morfologicznych nakłada się częściowo na skalę zmienności gatunków rodzicielskich (Filipiak 1993), co utrudnia prawidłowe ustalenie przynależności gatunkowej.

Do rozróżniania podgatunków modrzewi najczęściej stosowana jest ocena na podstawie budowy morfologicznej. Problem pojawia się, gdy na miejscu drzewostanów złożonych z modrzewia europejskiego lub modrzewia japońskiego znajdujemy populacje mieszańca, mające zazwyczaj cechy pośrednie między gatunkami rodzicielskimi, np. kształt szyszek, grubość ugałęzienia czy dynamikę wzrostu (Chylarecki 2000). W naszym kraju należy się spodziewać istnienia licznych form mieszańcowych modrzewia europejskiego i japońskiego jako następstwo wprowadzania do upraw leśnych tego ostatniego gatunku.

Ogromne trudności w ustaleniu przynależności gatunkowej nasion modrzewia wykorzystywanych do zakładania upraw leśnych sprawiają, iż często używa się nieświadomie materiału sadzeniowego modrzewia japońskiego lub jego mieszańców.

W Lasach Państwowych opracowano „Program ochrony leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce na lata 2011–2035”, w którym przewiduje się założenie bazy obiektów zachowawczych (WDN) dla 19 gatunków lasotwórczych, w tym modrzewia, z których pozyskiwany będzie materiał rozmnożeniowy, tak, aby była zachowana wysoka różnorodność genetyczna w odnawianych drzewostanach oraz pełna kontrola przed napływem leśnego materiału rozmnożeniowego obcego pochodzenia (Matras 2005).

Ostatnio opracowano skuteczne i szybkie metody identyfikacji gatunkowej oparte na analizie struktury DNA: jądrowego (DNA mikrosatelitarne) i organellowego (DNA chloroplastowe i mitochondrialne). Istnieje kilka metod, w większości opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), umożliwiających identyfikację gatunkową, np: markery RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Field Fragment*

Length Polymorphism) oraz SSR (*Simple Sequence Repeats*), czyli analiza sekwencji mikrosatelitarnych.

Do identyfikacji gatunkowej modrzewi (*Larix decidua* i *Larix kaempferi*) oraz ich mieszańców mogą zostać użyte m.in. markery RAPD (Arcade i in. 1996). Analiza losowo amplikowanego polimorficznego DNA (RAPD) jest metodą, która umożliwia precyzyjną detekcję polimorfizmu w genomie. Scheepers i in. (2000) opisali zastosowanie markerów RAPD do przeprowadzenia charakterystyki gatunkowej modrzewia europejskiego oraz japońskiego. Wadą metody RAPD może być mała powtarzalność, wynikająca z wrażliwości tej metody na zmiany warunków amplifikacji (Malewski 2005); w związku z tym powtarzalność analiz RAPD pomiędzy laboratoriami jest różnie oceniana. Jednak łatwość techniki, wymagana mała ilość DNA wyjściowego oraz stosunkowo niski koszt sprawiają, że technika ta jest stosowana w określeniu przynależności gatunkowej drzew leśnych.

Markery PCR - RFLP umożliwiają także identyfikację taksonomiczną, gdyż ukazują one różnice w budowie DNA powstałe na skutek punktowych mutacji. Technika detekcji jest oparta na amplifikacji (powieleniu) w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) specyficznych fragmentów łańcucha DNA, które następnie są trawione enzymami restrykcyjnymi, rozdzielane na żelu agarozowym i wizualizowane w świetle UV (Nowakowska 2006).

2. Materiał i metody

W celu dokonania identyfikacji gatunkowej modrzewia japońskiego i europejskiego oraz ich mieszańców przeanalizowano w 2006 r. w Instytut National de la Recherche Agronomique (INRA) we Francji próbę składającą się z 67 osobników. Materiał roślinny o znanym pochodzeniu został pobrany ze szkółki prowadzonej przez INRA: 10 osobników *L. decidua*, 13 osobników *L. kaempferi* oraz 10 mieszańców pokolenia F1, przy czym osobniki mieszańcowe F1/F2 zostały zebrane w Direction Regionale de l'Agriculture et de la Forêt du Limousin (34 osobniki).

DNA wyizolowano przy użyciu zestawu do ekstrakcji DNA (DNeasy Plant Mini Kit–Qiagen). Wydajność ekstrakcji DNA została zbadana elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym, po barwieniu bromkiem etydylnym oraz sprawdzona spektrofotometrycznie za pomocą Nanodrop 3.1.0.

W dalszym etapie badań wykonano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), z zastosowaniem markerów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA. Dla każdego osobnika przygotowano 25 µl następującej mieszaniny reakcyjnej (dla markera chloroplastowego i mi-

tochondrialnego): 20–40 ng DNA genomowego, bufor reakcyjny, MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,3 mM), startery (0,3 mM), polimerazę Taq (1,5 U)*.

Amplifikacja została wykonana przy użyciu termocyklera MJ Research PTC – 100 i obejmowała 4 etapy (1 etap: temp. 94°C przez 4 min., 2 etap: 3 cykle przy temp. 94°C 1min. 30 s., 45 s. 55°C, 3 min. 30 s. przy temp. 70°C, 3 etap: 30 cykli przy 92°C przez 1 min. 30 s., 45 s. przy temp. 55°C, 3 min. 30 s. przy temp. 70°C, 4 etap 10 min. przy temp. 72°C). Powielone fragmenty DNA były rozdzielane następnie podczas elektroforezy w 1,5 % żelu agarozowym i wizualizowane za pomocą światła UV.

W przypadku chloroplastowego markera II przeprowadzono dodatkowo trawienie enzymem restrykcyjnym Taq I przez 4 godz. w temp. 65°C. Trawione fragmenty DNA były następnie rozdzielane podczas elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym i wizualizowane, po uprzednim barwieniu bromkiem etydyny (0,5 mg/ml).

Dla każdego osobnika wykonano po dwie reakcje PCR, z mitochondrialnym i chloroplastowym markerem.

3. Wyniki i dyskusja

W pracy zastosowano markery opisane przez Acheré i in. (2004), umożliwiające identyfikację gatunkową modrzewia europejskiego i japońskiego oraz ich mieszańców: mitochondrialny marker *f13*, występujący wyłącznie w modrzewiu japońskim oraz chloroplastowy marker II-Taq I, pokazujący inny wzór restrykcyjny w zależności od gatunku.

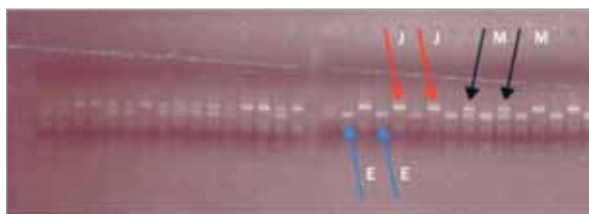
Na podstawie otrzymanych wyników dla badanych prób modrzewia stwierdzono, że markery *f13* oraz II-Taq I mogą zostać wykorzystane do identyfikacji taksonomicznej modrzewia japońskiego i europejskiego oraz ich mieszańców. Marker *f13* występuje jedynie w modrzewiu japońskim. Dzięki niemu, na podstawie obecności lub braku prążka można dokonać identyfikacji gatunkowej (ryc. 1). Marker II-Taq I rozróżnił wszystkie badane osobniki modrzewia europejskiego i modrzewia japońskiego. Okazało się, że fragment restrykcyjny 601 par zasad (pz) występuje w modrzewiu japońskim, podczas gdy fragment wielkości 481 pz jest charakterystyczny dla modrzewia europejskiego (ryc. 2). Polimorfizm ten jest wynikiem pojedynczych nukleotydowych substytucji w miejscu restrykcyjnym, rozpoznawanym przez enzym restrykcyjny Taq I: TCGA w modrzewiu europejskim i TCAA w modrzewiu japońskim.

U rodziny *Pinaceae* genom mitochondrialny jest dziedziczony matelycznie, podczas gdy chloroplastowy po



Rycina 1. Obraz uzyskany po reakcji PCR z mitochondrialnym markerem *f13*; strzałką J wskazano prążek obecny w modrzewiu japońskim, a strzałką E jego brak w modrzewiu europejskim

Figure 1. Picture obtained after the PCR reaction with mitochondrial marker *f13*; J indicates one band in Japanese larch, while E indicates the lack of it in European larch



Rycina 2. Obraz po reakcji PCR i trawieniu enzymem restrykcyjnym chloroplastowego markera II. Niebieska strzałka wskazuje obraz charakterystyczny dla modrzewia europejskiego, czerwona – obraz charakterystyczny dla modrzewia japońskiego, a czarna strzałka – obraz charakterystyczny dla mieszańców międzygatunkowych

Figure 2. Picture obtained after the PCR reaction and restricted enzyme digestion of chloroplast marker II. Blue arrows point the picture characteristic for European larch, red – for Japanese larch and black ones – for hybrids of the two species



Rycina 3. Identyfikacja gatunkowa *L. decidua* i *L. kaempferi* dokonana przez Bergmann i Ruetz (1987) przy wykorzystaniu systemu enzymatycznego dehydrogenazy szikimowej SKDH. Oba gatunki charakteryzuje występowanie 2 różnych form alleli (prążków), podczas gdy mieszańce zawierają 2 formy alleli jednocześnie

Figure 3. Species identification of *L. decidua* and *L. kaempferi* made by Bergmann and Ruetz (1987) with the use of shikimic dehydrogenase enzyme system SKDH. Each species was characterized by different forms of alleles, while the hybrids showed both of them at the same time

* podano stężenia końcowe

ojcu. W związku z tym specyficzne markery DNA chloroplastowego i mitochondrialnego są idealnym narzędziem, umożliwiającym identyfikację międzygatunkowych mieszańców oraz ich gatunków rodzicielskich. Mieszańce mogą być identyfikowane na podstawie obecności mitochondrialnych sekwencji odziedziczonych z jednego gatunku rodzicielskiego i chloroplastowych sekwencji, odziedziczonych z drugiego gatunku (Eriksson i Ekberg 2001).

Dotychczasowa identyfikacja gatunków modrzewia oraz mieszańców opierała się przede wszystkim na cechach morfologicznych lub analizie markerów izoenzymowych, jednak w porównaniu z innymi gatunkami drzew iglastych ilość dostępnych markerów izoenzymowych dla modrzewia jest niewielka (Lewandowski 1994). Bergmann i Ruetz (1987) dokonali identyfikacji gatunkowej *L. decidua* i *L. kaempferi* oraz ich mieszańców przy wykorzystaniu systemu enzymatycznego dehydrogenazy szikimowej (SKDH) (ryc. 3).

W 1991 r. Häcker i Bergmann wykorzystali do identyfikacji gatunkowej modrzewia europejskiego i japońskiego systemy enzymatyczne SKDH i NDH (dehydrogenaza). Dla modrzewia japońskiego zaobserwowali oni tylko najszybciej migrujące allele: *NDH-A2*, *SKDH-A3*, natomiast u modrzewia europejskiego w locus SKDH zanotowali 3 allele, zaś w locus NDH zaobserwowali 2 allele.

Dla modrzewi, w przeciwieństwie do innych gatunków drzew iglastych, takich jak: sosna, jodła czy świerk (dla których sekwencje SSR są szeroko dostępne), niewielka jest liczba znanych sekwencji mikrosatelitarnych umożliwiających identyfikację gatunkową. Jak dotąd, specyficzne gatunkowo markery mikrosatelitarne pozwoliły na identyfikację gatunkową modrzewia alpejskiego (*L. lyallii* Parl.) i modrzewia zachodniego (*L. occidentalis* Nutt.) (Khasa 2000), jednak nadal brak markerów umożliwiających identyfikację taksonomiczną modrzewia japońskiego i europejskiego.

Problem rozpoznawania mieszańców ma duże znaczenie w leśnictwie, należy więc rozwinąć oraz udoskonalić techniki wykorzystujące metody oparte na markerach genetycznych, jak np: wykorzystanie izoenzymów, czy markerów DNA. Umożliwi to wyjaśnienie wielu nierozwiązanych kwestii z zakresu hodowli i genetyki tych drzew, które są konieczne dla prawidłowej gospodarki leśnej. Identyfikacja na podstawie markerów genetycznych jest jedną z najskuteczniejszych i najszybszych metod ustalenia przynależności gatunkowej dla wielu innych gatunków drzew leśnych, takich jak: topola, jesion i dąb (Nowakowska 2006).

4. Wnioski

Użyte markery w 100% potwierdziły przynależność gatunkową osobników pochodzących z czystych linii,

markery *f13* i *II-Taq I* pozwoliły prawidłowo rozróżnić mieszańce pokolenia F1 w 99%.

Markery polimorfizmu DNA umożliwiają szybką i pewną identyfikację taksonomiczną modrzewia europejskiego i japońskiego oraz ich mieszańców. Zastosowanie markerów genetycznych DNA chloroplastowego i mitochondrialnego stanowi jedną z najskuteczniejszych i najszybszych metod ustalenia przynależności gatunkowej modrzewia.

Określenie różnic międzygatunkowych modrzewia na poziomie struktury DNA może pomóc w ustaleniu przynależności taksonomicznej osobników o nieokreślonej czy niepewnej pozycji taksonomicznej, co może być wykorzystane przy wyborze (weryfikacji) drzewostanów wykorzystywanych jako baza nasienna. Identyfikacja przy pomocy markerów genetycznych może być wykonana niezależnie od stadium rozwoju rośliny, co nabiera dużego znaczenia praktycznego w szkółkach i przy testowaniu czystości gatunkowej nasion. Z uwagi na dokładność i powtarzalność wyników markery te stanowią alternatywę dla najczęściej jeszcze stosowanych metod opartych na cechach morfologicznych.

Podziękowanie

Autorka dziękuje dr Luc Pâques za umożliwienie przeprowadzenia badań w INRA Orleáns (Francja), Catherine Sindou i Corrine Buret (INRA Orleáns) za pomoc w wykonaniu analiz laboratoryjnych oraz dr Justynie Nowakowskiej (IBL) za pomoc w opracowaniu wyników pracy.

Literatura

- Acheré V., Faivre Rampant P., Pâques L. E., Prat D. 2004: Chloroplast and mitochondrial molecular tests identify European×Japanese larch hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 1643-1649.
- Arcade A., Faivre Rampant P., Le Guerroué B., Pâques L. E., Prat D. 1996: Heterozygosity and hybrid performance in larch. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1274-1281.
- Arcade A., Anselin F., Faivre Rampant P., Lesage M. C., Pâques L. E., Prat D. 2000: Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 299-307.
- Belletti P., Lanteri S. Leonardi S. 1997: Genetic variability among european larch (*Larix decidua* Mill.) populations in Piedmont, north-western Italy. *For. Gen.*, 4(3): 133-121.
- Bergmann F., Ruetz W. 1987: Short Note: Identifizierung von Hybridlärchensaatgut aus Samenplantagen mit Hilfe eines Isoenzym – Markers. *Silvae Gen.*, 36(2): 102-105.
- Białobok S. 1986: Modrzewie *Larix* Mill. Nasze Drzewa Leśne; Monografie Popularnonaukowe, Warszawa, PWN, T. 6.

- Bobrov E. G. 1972. Istorija i sistematika listvennic. Kama-rowskie Ctenija 25.
- Bugała W. 2000: Drzewa i krzewy iglaste. Wyd. Rolne i Leśne, 117-125.
- Chylarecki H. 2000: Modrzewie w Polsce. Dynamika wzrostu, rozwój i ekologia wybranych gatunków i ras. Wydawnictwo Naukowe Bogucki, Warszawa.
- Eriksson G., Ekberg I. 2001: An introduction to forest genetics. SLU Repro Uppsala, 2001. Sweden.
- Filipiak M. 1993: Wskazówki dotyczące uprawy modrzewia japońskiego w północno-zachodniej Polsce. Lasy Państwowe. Dyrekcja Generalna Lasów Państwowych.
- Hrynkiewicz-Sudnik J., Sękowski B., Wilczkiewicz M. 1999: Rozmnażanie drzew i krzewów nagozależkowych. Warszawa, PWN.
- Häcker M., Bergmann F. 1991: The proportion of hybrids in seed from a seed orchard composed of two larch species (*L. europeae* and *L. leptolepis*). Ann. Sci. For., 48: 631-640.
- Khasa P. D., Newton C. H., Rahman M. H., Jaquish B, Dancik P. 2000: Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch. Genome, 43: 439-448.
- Lewandowski A., Nikkanen T., Burczyk J. 1994: Production of Hybrid seed in a seed orchard of two larch species, *Larix siberica* and *Larix decidua*. Scand. J. For. Res., 9: 214-217.
- Matras J. 2005. Ochrona leśnych zasobów genowych i ich wykorzystanie w selekcji drzew oraz w nasiennictwie i szkółkarstwie leśnym. [W:] Ochrona leśnych zasobów genowych i hodowla selekcyjna drzew leśnych w Polsce – stan i perspektywy. Malinówka, czerwiec 2005 r. Wyd. ZG SITLiD, Warszawa 2005, 5–15.
- Malewski T. 2005: Metody badań polimorfizmu DNA. [W:] Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych (red. M. Pilot, R. Rutkowski). Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
- Nowakowska J. A. 2006: Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR - RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. Leś. Pr. Bad., 1 :73-101.
- Pâques L. E. 1989: A critical review of larch hybridization and its incidence on breeding strategies. Ann. Sci. For., 46: 141-153.
- Scheepers D., Eloy M. C., Briquet M. 2000: Identification of larch species (*Larix decidua*, *Larix kaempferi* and *Larix x eurolepis*) and estimation of hybrid fraction in seed lots by RAPD fingerprints. Theor. Appl. Gen., 1071-1074.