

PRZEMYSŁAW ZWADUCH, ANDRZEJ LEWANDOWSKI

## Wstępne badania nad zmiennością izoenzymową dębów w doświadczeniu proveniencyjnym w Nadleśnictwie Milicz

Preliminary research on isoenzyme variability of oaks in the provenance experiment in the Milicz Forest District

### ABSTRACT

Zwaduch P., Lewandowski A. 2008. Wstępne badania nad zmiennością izoenzymową dębów w doświadczeniu proveniencyjnym w Nadleśnictwie Milicz. Sylwan 10: 27-35.

The studies were based on the material collected in the provenance experiment established in the territory of the Milicz Forest District where 78 pedunculate (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* [Matt.] Liebl.) provenances from all over the country were planted in 5 replications. The isoenzyme analyses took in dormant buds from 300 trees of randomly selected 5 pedunculate oak and 5 sessile oak provenances. Variation of 6 enzymatic systems was the subject of the analysis. The studied oak populations exhibited a relatively high level of genetic variation, however, it was lower in comparison with the populations from other regions of Europe. Generally, the variation of the sessile oak was greater than of the pedunculate oak. The calculated genetic distance between the two oak species was 0.0284 and it exceeded genetic distances among the populations within the species.

### KEY WORDS

pedunculate oak, sessile oak, provenance, genetic variation, izoenzyme, Poland

### ADDRESSES

Przemysław Zwaduch – Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych we Wrocławiu;  
ul. Grunwaldzka 90; 50-357 Wrocław; e-mail: przemyslaw.zwaduch@wroclaw.lasy.gov.pl

Andrzej Lewandowski – Instytut Dendrologii PAN;  
ul. Parkowa 5; 62-035 Kórnik; e-mail: alew@rose.man.poznan.pl

### Wstęp

Dęby (*Quercus robur* i *Q. petraea*) to gatunki o dużym znaczeniu gospodarczym w Polsce. Zawsze ceniono dostarczany przez nie surowiec, jednak stosunkowo niewielka produkcja drewna i długie koleje rębności nie sprzyjały uprawie dębów w czasie rozpowszechnienia ekonomicznych teorii najwyższej renty leśnej i gruntowej. Pomimo tego, że już w 1877 r. założone zostało przez Kienitza pierwsze doświadczenie proveniencyjne nad dębami [Krahl-Urban 1959], to badania nad wewnątrzgatunkową zmiennością dębów pozostały w tyle za badaniami nad zmiennością gatunków iglastych [Barzdajn 2000]. W Polsce tego typu doświadczenia zakładano po II wojnie światowej, jednak zwykle obejmowały one tylko jeden gatunek dębu lub zaledwie kilka do kilkunastu pochodzeń obu gatunków [Fober 1999; Chmura 2002].

Dęby różnią się nie tylko pokrojem, szybkością wzrostu, cechami morfologicznymi liści czy porą rozpoczynania rozwoju na wiosnę. Wykazują ogromne zróżnicowanie także na poziomie genetycznym. Duży poziom zmienności wewnątrzgatunkowej i wewnątrzpopulacyjnej, przekraczający różnice międzygatunkowe oraz częste wspólne występowanie w drzewostanach

osobników obu gatunków dębów, wynikiem czego jest obserwowany proces krzyżowania obu gatunków, skłaniają do dyskusji nad odrębnością gatunkową obu dębów.

Izoenzymy są od dawna stosowanymi markerami genetycznymi do określania poziomu zmienności genetycznej populacji drzew leśnych [Müller-Starck i in. 1990]. Badania izoenzymowe potwierdziły istnienie w europejskich populacjach dębowych wysokiego polimorfizmu genetycznego, przy czym około 90% całkowitej zmienności przypada na zmienność wewnątrzpopulacyjną, a tylko kilka procent na zmienność międzypopulacyjną [Zanetto i in. 1994; Zanetto, Kremer 1995]. Wykorzystując markery izoenzymowe potwierdzono również bardzo bliskie pokrewieństwo genetyczne pomiędzy dębem szypułkowym i dębem bezszypułkowym [Müller-Starck i in. 1993, 1996; Zanetto i in. 1994].

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu zmienności genetycznej i genetycznego zróżnicowania pomiędzy kilkoma wybranymi populacjami dębu szypułkowego i bezszypułkowego, rosnącymi na powierzchni doświadczalnej w Nadleśnictwie Milicz.

### Materiały i metody

Badania przeprowadzono na materiale roślinnym zebrany w dębowym doświadczeniu proveniencyjnym założonym w Nadleśnictwie Milicz w 1995 roku. Na powierzchni doświadczalnej wysadzono 78 pochodzeń dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i dębu bezszypułkowego (*Quercus petraea* [Matt.] Liebl.) z terenu całej Polski. Na każdym poletku posadzono po 20 drzew w wierzbie 1,5×1,5m. Wszystkie proveniencje posadzono w pięciu powtórzeniach. Do analiz izoenzymowych użyto pąków spoczynkowych 300 drzew należących do losowo wybranych 5 proveniencji dębu szypułkowego (Chełm, Krotoszyn, Czarna Białostocka, Milicz, Lutówko) i 5 proveniencji dębu bezszypułkowego (Syców, Kłobuck, Babki, Trzebież, Świerczyna).

Analizowano zmienność następujących systemów enzymatycznych: transaminaza glutaminianowo-szczawiooctowa (GOT), dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH), fosfoglucoizomeraza, (PGI), fosfoglukomutaza (PGM), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa (6-PDH).

Z każdego drzewa pobrano po 2-4 pąki, usunięto łuski okrywające i homogenizowano w buforze homogenizacyjnym Tris/HCL o pH=7,5 z dodatkiem 4% PVP (K-15), 0,07% Na-EDTA, 0,2% DTT oraz 0,13% albuminy. W zależności od wielkości, homogenizowano 2-4 pąków w 100 ml buforu i około 0,002 g polyclaru AT. Po homogenizacji, homogenatem nasączano paski bibuły Whatmann 3MM i наносono na 12% żel skrobiowy. Do rozdzielania poszczególnych białek enzymatycznych zastosowano dwa systemy buforowe. System I składał się z bufora elektrodowego (0,3 M kwas borowy, 0,06 M wodorotlenek litu, pH 8,2) oraz bufora żelowego (0,03 M Tris, 10% buforu elektrodowego, odczyn wyrównywany kwasem cytrynowym do wartości pH 8,2) [Ridgeway i in. 1970 z drobnymi modyfikacjami]. System II miał w składzie bufor elektrodowy (0,013 M Tris, 0,043 M kwas cytrynowy, pH 7,5). Bufor żelowy przygotowywano przez rozcieńczenie buforu elektrodowego wodą destylowaną w stosunku 1:10 [Siciliano, Shaw 1976]. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 3 godziny, stosując prąd o natężeniu 60 mA i napięciu 250 V dla systemu I i 120 V dla systemu II. W pierwszym systemie buforowym rozdzielano następujące białka enzymatyczne: GOT, PGI, PGM oraz SOD, zaś w drugim – IDH i 6-PGD. Po rozdzielaniu płat żelu rozcinano na odpowiednią liczbę warstw i każdą z nich barwiono na aktywność innego enzymu. Zastosowano standardowo używany skład mieszanin barwiących [Cheliak, Pitel 1984]. Locus, dla którego prążki charakteryzowały się największym tempem migracji podczas trwania elektroforezy w kierunku anody, oznaczono jako 1, następny jako 2, itd.

**Tabela 1.**  
 Częstość alleli oraz heterozygotyczność oczekiwana w badanych proveniencjach dębowych  
 Allele frequency and expected heterozygosity in the analysed oak provenances

Locus	Allele	Chelm				Lutówko				Milicz				C.B.				Proweniencja/Gatunek			
		Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.r.	Q.p.	Q.p.	
GOT	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017	
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,983	0,983	
IDH	1	0,000	0,033	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	
	3	0,466	0,333	0,200	0,389	0,389	0,333	0,333	0,050	0,067	0,050	0,067	0,067	0,067	0,100	0,033	0,033	0,033	0,033	0,067	
	4	0,535	0,633	0,800	0,593	0,593	0,667	0,667	0,917	0,783	0,917	0,783	0,917	0,783	0,900	0,967	0,967	0,967	0,967	0,867	
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
PGI-1	2	0,035	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	3	0,966	1,000	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	0,983	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,033	0,017	0,033	0,017	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
PGI-2	2	0,000	0,017	0,050	0,056	0,056	0,050	0,050	0,067	0,183	0,067	0,183	0,067	0,183	0,017	0,067	0,067	0,067	0,017	0,017	
	3	0,983	0,967	0,950	0,944	0,944	0,950	0,950	0,867	0,783	0,867	0,783	0,867	0,783	0,867	0,817	0,817	0,817	0,817	0,967	
	4	0,017	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,050	0,000	0,000	0,000	0,117	0,117	0,117	0,117	0,017	0,017	
	1	0,069	0,000	0,000	0,037	0,037	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
PGM	2	0,397	0,317	0,100	0,426	0,426	0,383	0,383	0,000	0,117	0,000	0,117	0,000	0,117	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,033	
	3	0,517	0,617	0,817	0,537	0,537	0,533	0,983	0,983	0,867	0,983	0,867	0,983	0,867	1,000	0,983	0,983	0,983	0,950	0,950	
	4	0,000	0,033	0,067	0,000	0,000	0,050	0,050	0,017	0,000	0,017	0,000	0,017	0,000	0,000	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	
	5	0,017	0,033	0,017	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,017	0,000	0,017	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
SOD	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
	2	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
6-PGD	1	0,948	1,000	1,000	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
	2	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Q.r. – *Quercus robur*; Q.p. – *Quercus petraea*; C.B. – Czarna Białostocka

Do obliczenia parametrów zmienności genetycznej i zróżnicowania genetycznego populacji zastosowano program komputerowy PopGen 1.31 [Yeh i in. 1999], obliczając następujące parametry: średnią ( $N_a$ ) i efektywną ( $N_e$ ) liczbę alleli w locus, procent loci polimorficznych (P), heterozygotyczność obserwowaną ( $H_o$ ) i oczekiwaną ( $H_e$ ), współczynnik wsobności Wrighta (F), współczynnik zróżnicowania genetycznego między populacjami ( $F_{st}$ ), dystans genetyczny według Nei'a (D) [Nei 1978]. Na bazie dystansów genetycznych skonstruowano metodą średnich arytmetycznych nieważonych (UPGMA) [Sneath, Sokal 1973] dendrogram obrazujący podobieństwa pomiędzy badanymi populacjami.

## Wyniki

W badanym materiale analizowano łącznie 7 loci, z czego 6 było polimorficznych. Monomorficznym okazał się locus SOD. Częstości alleli w poszczególnych loci przedstawia tabela 1.

Spośród loci polimorficznych najmniej zmiennymi były GOT, PGI-1 oraz 6-PGD, gdzie sporadycznie w niektórych populacjach pojawiały się rzadkie allele, z częstościami zwykle poniżej 5%. Najbardziej zmiennym okazał się locus PGM, w którym stwierdzono pięć alleli. Dla wszystkich badanych populacji, w poszczególnych loci, zawsze ten sam allel był allelem najczęstszym. Największe różnice pomiędzy dwoma badanymi gatunkami dębów pod względem częstości alleli stwierdzono w locus IDH oraz PGM. W locus IDH allel 3 występował w populacjach *Q. robur* z większą częstością (od 0,200 do 0,466) niż w populacjach *Q. petraea* (od 0,033 do 0,100). Podobnie było w przypadku locus PGM, gdzie allel 2 w populacjach *Q. robur* występował z częstością od 0,100 do 0,426, a w populacjach *Q. petraea* był rzadszy. Stwierdzono go tylko w dwóch populacjach w Babkach z częstością 0,117 i Świerczynie z częstością 0,033.

W badanych populacjach stwierdzono zróżnicowany poziom zmienności genetycznej. Procent loci polimorficznych wahał się w szerokim zakresie od 29% do 86% (tab. 2). Średnie i efektywne liczby alleli w locus wynosiły odpowiednio: od 1,43 do 2,43 i od 1,08 do 1,36, natomiast średnia heterozygotyczność oczekiwana wyniosła od 0,062 do 0,194. W większości populacji średnia wartość współczynnika wsobności Wrighta przyjmowała wartości dodatnie. Wyjątkiem była populacja Lutówko. Ogólnie, *Q. robur* charakteryzował się wyższym poziomem zmienności genetycznej od *Q. petraea* (tab. 3).

Tabela 2.

Wartości charakteryzujące między- i wewnątrzpopulacyjną zmienność badanych proveniencji dębowych  
Values characterising the inter- and intrapopulation variation of the analysed oak provenances

Proweniencja	Gatunek	$N_a$	$N_e$	P	Fis	$H_o$	$H_e$
Chełm	<i>Q. robur</i>	2,00	1,36	71,43	0,01	0,168	0,181
Lutówko	<i>Q. robur</i>	2,00	1,30	42,86	-0,03	0,157	0,153
Milicz	<i>Q. robur</i>	1,71	1,15	42,86	0,36	0,076	0,105
Czarna Białostocka	<i>Q. robur</i>	1,71	1,32	42,86	0,19	0,116	0,161
Krotoszyn	<i>Q. robur</i>	2,43	1,36	85,71	0,02	0,171	0,194
Trzebież	<i>Q. petraea</i>	2,00	1,08	57,14	0,002	0,067	0,066
Babki	<i>Q. petraea</i>	1,86	1,20	42,86	0,25	0,105	0,135
Kłobuck	<i>Q. petraea</i>	1,43	1,08	28,57	0,02	0,057	0,059
Syców	<i>Q. petraea</i>	1,71	1,09	57,14	0,02	0,057	0,064
Świerczyna	<i>Q. petraea</i>	2,00	1,08	57,14	0,12	0,057	0,062

$N_a$  – liczba alleli w locus;  $N_e$  – efektywna liczba alleli w locus; P – procent polimorficznych loci; Fis – współczynnik wsobności Wrighta;  $H_o$  – heterozygotyczność obserwowana;  $H_e$  – heterozygotyczność oczekiwana [Nei, 1978]

$N_a$  – number of allele in locus;  $N_e$  – effective number of allele in locus; P – frequency of polymorphic loci; Fis – Wright's inbreeding coefficient;  $H_o$  – observed heterozygosity;  $H_e$  – Nei's [1978] expected heterozygosity

Stwierdzono niski poziom zróżnicowania między populacjami ( $F_{st}=0,132$ ), co oznacza, że tylko 13% całkowitej zmienności genetycznej przypada na różnice międzypopulacyjne. Jednak wartość ta jest znacznie większa od tej, jaką stwierdza się pomiędzy populacjami tego samego gatunku, gdzie w obu przypadkach  $F_{st}=0,04$ . Na bliższe podobieństwo pomiędzy populacjami tego samego gatunku wskazują wyliczone wartości dystansów genetycznych. Jedyne populacja dębu szypułkowego z Milicza jest bardziej zbliżona do populacji dębów bezszypułkowych. Bardziej zmienne populacje *Q. robur* okazały się również bardziej zróżnicowane od populacji *Q. petraea*. Średni dystans genetyczny między populacjami *Q. robur* wyniósł 0,0078 (od 0,0001 do 0,0206), a *Q. petraea* 0,0033 (od 0,0003 do 0,0076). Natomiast średni dystans genetyczny między dwoma gatunkami dębów jest znacznie wyższy i wyniósł 0,0284. Różnice pomiędzy populacjami i gatunkami dobrze ilustruje dendrogram (ryc.).

**Tabela 3.**

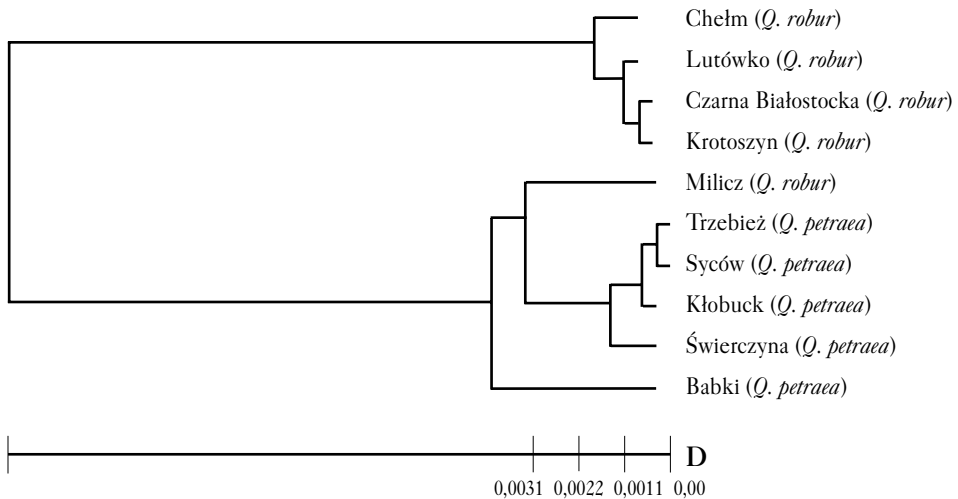
Wartości charakteryzujące międzypopulacyjną i wewnątrzpopulacyjną zmienność w obrębie badanych gatunków dębów

Values characterising the inter- and intrapopulation variation within the analysed oak species

Parametr	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>
Na	2,71	2,43
Ne	1,31	1,10
% polimorficznych loci	85,71	71,43
Ho	0,138	0,069
He	0,165	0,080
Fst	0,04	0,04
D	0,0001-0,026	0,0003-0,0076
średni D	0,0078	0,0033

Fst – współczynnik zmienności międzypopulacyjnej; D – dystans genetyczny [Nei 1978]

Fst – interpopulation variation coefficient; D – genetic distance [Nei 1978]



**Ryc.**

Dendrogram obrazujący pokrewieństwa pomiędzy badanymi proveniencjami dębowymi na podstawie wartości dystansów genetycznych Nei'a [1978]

Dendrogram illustrating the similarity among the analysed oak provenances on the basis of Nei's genetic distances [1978]

## Dyskusja

Do tej pory pojawiło się kilka doniesień, w których wykorzystywano markery izoenzymowe w badaniach nad poziomem zmienności genetycznej populacji dębowych w Europie. W badaniach często analizuje się różne zestawy loci izoenzymowych, co w pewnym stopniu ogranicza możliwości porównywania wyników między sobą. W niniejszej pracy największe zróżnicowanie pomiędzy populacjami i gatunkami wykryto w systemach IDH, PGI-2 i PGM, co pokrywa się częściowo z wynikami innych badaczy. Najbardziej zbliżone wyniki otrzymali Zanetto i in. [1994], którzy również te trzy systemy enzymatyczne uznawali za najbardziej zmienne i najlepsze przy odróżnianiu gatunków dębów europejskich populacji. Dużą zmienność dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH) w badanych populacjach dębowych opisuje Schroeder [1989], opierając się na analizach dębów niemieckich pochodzeń. Podobne wyniki otrzymali Löchelt [1994], Gömöry i in. [2001] oraz Finkeldey [2001a, b], który dodaje także fosfoglukomutazę (PGM) i kwaśną fosfatazę (ACP) jako systemy enzymatyczne różnicujące *Q. robur* i *Q. petraea*. Na fosfoglukomutazę, jako enzym różnicujący gatunki i populacje, wskazują Hertel i Degen [1998] oraz Siegismund i Jensen [2001].

Ogólnie, badane populacje dębowe charakteryzowały się niższym poziomem zmienności od populacji z innych rejonów Europy. W badanych populacjach stosunkowo niska była liczba alleli w locus (od 1,43 do 2,0). Jest to wartość mniejsza od podawanych w niektórych innych badaniach, gdzie średnia liczba alleli w locus dochodzi do 3,7 [Herzog, Müller-Starck 1993; Zanetto i in. 1994; Kleinschmit i in. 1995; Siegismund, Jensen 2001]. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy zbliżone są do analiz Gömöry'ego i in. [2001] i Finkeldey'a [2001a, b]. Mniejszą liczbę alleli w locus obserwowali Bacilieri i in. [1995] badający 12 systemów enzymatycznych u dębów z północno-zachodniej Francji. Znacznie mniejsza niż w Europie okazała się również heterozygotyczność obserwowana ( $H_o=0,103$ ). Podobne, niewysokie wartości tej charakterystyki otrzymał tylko Yakovlev [2000]. W badaniach większości autorów prowadzonych na europejskich populacjach *Q. robur* i *Q. petraea* wartości heterozygotyczności okazywały się dość wysokie. Herzog i Müller-Starck [1993] podają średnie wartość  $H_o$  ponad 25%. Bardzo podobnie kształtowały się wartości heterozygotyczności w badaniach Kleinschmita i in. [1995]. Nieco mniejsze wartości  $H_o$  osiągała w analizach Zanetto i in. [1994] oraz Finkeldey'a [2001a, b], ale i tak dwukrotnie przewyższa wyniki otrzymane w prezentowanej pracy. Większy poziom zmienności genetycznej drzew doborowych dębu bezszypułkowego w Nadleśnictwie Smolarz stwierdzili Lewandowski i Siwecki [1998]. Na obecnym etapie badań trudno jednoznacznie stwierdzić, czy przedstawione różnice są wynikiem realnie istniejących różnic w poziomie zmienności genetycznej dębów, czy też są wynikiem różnej liczby i odmiennych zestawów loci analizowanych przez poszczególnych autorów.

W badanych populacjach obu gatunków dębów, za wyjątkiem populacji Lutówko, indeks wsobności Wrighta przyjmował wartości dodatnie, co świadczy o przewadze homozygot. Jest to zjawisko charakterystyczne dla drzewostanów będących w młodym wieku. Bardzo często wraz ze starzeniem się populacji następuje sukcesywna eliminacja osobników homozygotycznych, w rezultacie czego powstaje nadmiar heterozygot [Rossi i in. 1996]. Niewielkie wartości współczynników wsobności obserwowali Yakovlev [2000] w Rosji, Siegismund i Jensen [2001] w Danii oraz Belletti i in. [2005] we Włoszech.

Badane populacje polskie obu gatunków dębów cechowała niewielka zmienność międzypopulacyjna (około 13%). Zmienność pomiędzy populacjami wynikać mogła w tym wypadku ze znacznych odległości między drzewostanami macierzystymi oraz różnicami gatunkowymi.

Przewagę zmienności wewnątrz badanych populacji nad zróżnicowaniem międzypopulacyjnym obserwowali również Zanetto i in. [1994]. W przypadku ich badań różnice pomiędzy proveniencjami były niewielkie, mimo iż były one bardzo odległe geograficznie. Hertel i Degen [1998] otrzymali różnice pomiędzy drzewostanami w wysokości 10%, a Yakovlev [2000] jedynie 2,5%. Siegismund i Jensen [2001] niewielkie zróżnicowanie międzypopulacyjne tłumaczą możliwym przepływem genów pomiędzy populacjami.

Stwierdzono istotne różnice pomiędzy badanymi gatunkami dębów. *Q. robur* wydaje się być gatunkiem bardziej zróżnicowanym genetycznie niż *Q. petraea*. W populacjach dębu szypułkowego zaobserwowano więcej alleli w locus (2,71) niż w populacjach dębu bezszypułkowego (2,43). Podobną zależność zaobserwowali Herzog i Müller-Starck [1993], Bacilieri i in. [1995] oraz Siegismund i Jensen [2001]. W badaniach pozostałych autorów [Löchelt 1994; Zanetto i in. 1994; Kleinschmit i in. 1995; Gömöry i in. 2001] jest odwrotnie. Tam populacje *Q. petraea* charakteryzują się większą liczbą alleli w locus. Również w polskich proveniencjach *Q. robur* heterozygotyczność obserwowana ( $H_o=0,138$ ) była większa niż u *Q. petraea* ( $H_o=0,069$ ). Większy poziom heterozygotyczności w populacjach dębów szypułkowych nad bezszypułkowymi potwierdzają Kleinschmit i in. [1995] oraz Gömöry i in. [2001]. U pozostałych badaczy [Herzog i in. 1993; Zanetto i in. 1994; Finkeldey 2001a, b; Belletti i in. 2005] to populacje dębu bezszypułkowego cechowały się większą heterozygotycznością. Polskie populacje dębu szypułkowego charakteryzowały się także większą, niż populacje *Q. petraea*, liczbą polimorficznych loci oraz większymi dystansami genetycznymi pomiędzy populacjami.

Do odróżnienia obu badanych gatunków dębów najlepsze okazały się systemy enzymatyczne IDH oraz PGM, co zgadza się z większością publikacji [Löchelt 1994; Zanetto i in. 1994; Hertel, Degen 1998; Finkeldey 2001a, b]. Niektórzy badacze wskazują na kwaśną fosfatazę. Jednak enzym ten nie był analizowany w prezentowanej pracy. Dystans genetyczny obliczony pomiędzy *Q. robur* i *Q. petraea* wynosił 0,0284 i przewyższał dystanse genetyczne pomiędzy populacjami. Jest to wartość niewielka i podobna do wyników uzyskanych przez innych autorów. Bacilieri i in. [1995] podają podobną wartość dystansu genetycznego pomiędzy dwoma gatunkami dębów – 0,034. W badaniach Kleinschmita i in. [1995] wartość ta była większa i wyniosła 0,14. Generalnie, większość autorów podkreśla niewielkie różnice pomiędzy dębami szypułkowymi i bezszypułkowymi i pewne trudności z ich odróżnianiem, także na poziomie genetycznym. Jednak zwykle, jeśli do badań użyta zostanie odpowiednio duża liczba osobników, określenie przynależności gatunkowej populacji, tak jak w przypadku tej pracy, staje się możliwe.

Pewną ciekawostką w przeprowadzonych badaniach izoenzymatycznych okazała się populacja *Q. robur* z Milicza (nr 99), która pod względem genetycznym była bardziej podobna do badanych populacji *Q. petraea* (ryc.). Jest to interesujące, gdyż przynależność gatunkową tych dębów określono jednoznacznie na podstawie analizy cech liści, które uznaje się powszechnie za najlepsze do tego celu [Kremer i in. 2002]. Najprawdopodobniej populacja z Milicza jest populacją odrębną od pozostałych pochodzeń *Q. robur*, potwierdzającą znaczne zróżnicowanie genetyczne tego gatunku. Z drugiej strony wynik ten może potwierdzać bliskie pokrewieństwo obu gatunków dębów.

## Literatura

- Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. 1995. Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of Northwest of France. *Silvae Genetica* 44 (1): 1-10.
- Barzdajn W. 2000. Proveniencyjne doświadczenie z dębami (*Quercus robur* L. i *Q. petraea* [Matt.] Liebl.) z 1993 roku w nadleśnictwach Milicz i Oborniki Śląskie. *Sylwan* 144 (12): 57-67.

- Belletti P., Leonardi S., Monteleone I., Piovani P. 2005. Allozyme variation in different species of deciduous oaks from northwestern Italy. *Silvae Genetica* 54 (1): 9-16.
- Cheliak W. M., Pitel J. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42 Petawawa National Forestry Institute, Canada.
- Chmura D. J. 2002. Fenologia wiosennego rozwoju polskich proveniencji dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowego (*Q. petraea* [Matt.] Liebl.). *Sylvan* 146 (4): 97-103.
- Finkeldey R. 2001a. Genetic variation of oaks (*Quercus spp.*) in Switzerland. 1. Allelic diversity and differentiation at isozyme gene loci. *Forest Genetics* 8 (3): 185-195.
- Finkeldey R. 2001b. Genetic variation of oaks (*Quercus spp.*) in Switzerland. 2. Genetic structures in „pure” and „mixed” forests of pedunculate oak (*Q. robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica* 50 (1): 22-30.
- Fober H. 1999. Przegląd doświadczeń proveniencyjnych dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowego (*Q. petraea* Liebl.). *Sylvan* 138 (1): 89-97.
- Gömöry D., Yakovlev I., Zhelev P., Jedináková J., Paule L. 2001. Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe. *Heredity* 86 (5): 557-563.
- Hertel H., Degen B. 1998. Stieleiche von Traubeneiche mit Hilfe von Isoenzymanalysen unterscheiden. *AFZ Der Wald* 53 (5): 246-247.
- Herzog S., Müller-Starck G. 1993. Untersuchungen zur genetischen Differenzierung bei Stieleiche (*Quercus robur* L.) und Traubeneiche (*Quercus petraea* Liebl.): Konsequenzen für die Erhaltung genetischer Ressourcen. *Forstarchiv* 64: 88-92.
- Kleinschmit J. R. G., Bacilieri R., Kremer A., Roloff A. 1995. Comparison of morphological and genetic traits of pedunculate oak (*Q. robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica* 44 (5-6): 256-269.
- Krahl-Urban J. 1959. Die Eichen. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Kremer A., Dupouey J. L., Deans J. D., Cottrell J., Csaikl U., Finkelday R., Espinel S., Kleinschmit J., Van Dam B., Ducouso A., Forrest I., Lopez de Heredia U., Lowe A. J., Tutkova M., Munro R. C., Steinhoff S., Badeau V. 2002. Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Ann. For. Sci.* 59: 777-787.
- Lewandowski A., Siwecki R. 1998. Analiza zmienności izoenzymowej drzew doborowych dębu bezszypułkowego [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] z Nadleśnictwa Smolarz. *Sylvan* 142 (11): 101-108.
- Löchelt S. 1994. Bestimmung der genetischen Konstitution heimischer Eichen mittels Isoenzymanalysen. *Forst und Holz* 49 (4): 98-100.
- Müller-Starck G., Baradat P., Bergmann F. 1990. Genetic variation within European trees species. *New Forests* 6: 23-47.
- Müller-Starck G., Herzog S., Hattemer H. H. 1993. Intra and interpopulational genetic variation in juvenile populations of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. *Annales des sciences forestières* 50: 233-244.
- Müller-Starck G., Zanetto A., Kremer A., Herzog S. 1996. Inheritance of isoenzymes in sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) and offspring from interspecific crosses. *Forest Genetics* 3(1):1-12.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ridgeway G. J., Sherburne, Lewis R. D. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Transactions of the American Fisheries Society* 99: 147-151.
- Rossi P., Vendramin G. G., Giannini R. 1996. Estimation of mating system parameters in two Italian natural populations of *Fagus sylvatica*. *Canadian Journal of Forest Research* 26: 1187-1192.
- Schroeder S. 1989. Artunterscheidung bei Eiche aufgrund von Isoenzym-Markern. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung* 160 (5): 104-106.
- Siciliano M. J., Shaw C. R. 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Heinemann, London: 185-209.
- Siegismund H. R., Jensen J. S. 2001. Intrapopulation and interpopulation genetic variation of *Quercus* in Denmark. *Scandinavian Journal of Forest Research* 16 (2): 103-116.
- Sneath H. A., Sokal R. R. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman and Company.
- Yakovlev I. 2000. Genetic diversity of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in the middle near Volga Region of Russia. *Glasnik za šumske pokuse* 37: 453-468.
- Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. 1999. POPGENE, Version 1.3.1: Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis.
- Zanetto A., Kremer A. 1995. Geographical structure of gene diversity in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. I. Monocult patterns of variation. *Heredity* 75: 506-517.
- Zanetto A., Roussel G., Kremer A. 1994. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics* 1: 111-123.



## SUMMARY

## Preliminary research on isoenzyme variability of oaks in the provenance experiment in the Milicz Forest District

The pedunculate oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* [Matt.] Liebl.) are species of great economic importance in Poland. Nevertheless, only a few studies on their genetic variation have been conducted so far. The objective of this paper was to determine the level of the genetic variation and genetic variability among a number of the selected pedunculate and sessile oak populations growing at the experimental site in the territory of the Milicz Forest District.

The studies were conducted on the material collected from the provenance experimental site established in 1995 in the territory of the Milicz Forest District where 78 pedunculate and sessile oak provenances from all over the country were planted in 5 replications. The isoenzyme analyses took in dormant buds from 300 trees of randomly selected 5 pedunculate oak and 5 sessile oak provenances.

Six enzyme systems were taken for analysis: Glutamate Oxaloacetic Acid Transaminase (GOT), Isocitrate Dehydrogenase (IDH), Phosphoglucosomerase (PGI), Phosphoglucomutase (PGM), Superoxide Dismutase (SOD) and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (6-PDH).

In total, 7 loci were analysed of which 6 were polymorphic ones. Locus SOD appeared to be monomorphic. The greatest differences in allele frequency between the analysed oak species were found in loci IDH and PGM. The examined oak populations were characterised by a lower level of genetic variation in comparison with the populations from other regions of Europe. *Q. robur* seems to be more genetically varied species than *Q. petraea*.

The level of variation among analysed oak populations ( $F_{st}=0.132$ ) means that the interpopulation variation accounts for only 13% of the total genetic variation. The calculated genetic distance between *Q. robur* and *Q. petraea* was 0.0284 and it exceeded genetic distances among the populations within the species.

It is interesting that the *Q. robur* population from Milicz (nr 99) showed higher genetic similarity to the analysed *Q. petraea* populations. It is likely that the Milicz population is a different population than the remaining provenances of *Q. robur*, which confirms a significant genetic variability of this species. On the other hand, this finding can prove a high level of genetic similarity of both species.