

MAŁGORZATA SUŁKOWSKA

Analiza izoenzymatyczna wybranych proweniencji buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) na powierzchni doświadczalnej w Bystrzycy Kłodzkiej*

Isoenzyme analysis chosen provenances of beech (*Fagus sylvatica* L.)
on the provenance trial in Bystrzyca Kłodzka

Abstract: Aim of the study was estimation of genetic variation of beech (*Fagus sylvatica* L.) on the beech provenance trial representing chosen Polish provenances of selected seed stands of beech. Variation of seven enzyme systems was analysed, using two buffer solutions: Ashton pH 8.1 – Lithium-Borate electrode buffer, gel buffer Tris-Citric for enzyme systems: LAP, GOT and MNR and Tris-Citric pH 7.3 for enzyme systems: MDH, SKDH, PGM and PGI.

Key words: *Fagus sylvatica*, provenances, analysis of isoenzymes

Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań jest ocena zmienności genetycznej buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.), na powierzchni proweniencyjnej reprezentującej wybrane polskie pochodzenia. Badane proweniencje reprezentują głównie wyłączone drzewostany nasienne naturalnego zasięgu występowania tego gatunku w Polsce.

Wykonane analizy przyczynią się do oceny poprawności zebrania materiału do założenia proweniencyjnych powierzchni doświadczalnych.

*Praca została sfinansowana ze środków grantu Nr 5660594 C/2234 Komitetu Badań Naukowych i Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych.
Wyniki referowano na konferencji "Zmienność buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)", Poznań–Siemianice, 8-10 czerwca 1999 r.

Metodyka

Na podstawie analiz izoenzymatycznych siedmiu układów enzymatycznych określono zmienność genetyczną 23 pochodzeń buka (głównie wyłączonych drzewostanów nasien-nych), w naturalnym zasięgu występowania tego gatunku w Polsce (tab. 1). Analizy prowadzono na pąkach wegetatywnych pozyskanych z sadzonek buka, znajdujących się w stanie spoczynku zimowego. Materiał do analiz zebrano na powierzchni doświadczalnej w Bystrzycy Kłodzkiej (RDLP Wrocław). Powierzchnia doświadczalna w Bystrzycy Kłodzkiej stanowi jedną z sześciu powierzchni doświadczalnych założonych w ramach doświadczenia proweniencyjnego buka serii GC 2234 1993/1995 (AR Poznań). Sadzonki buka, z których pozyskano pąki do analiz wyhodowane zostały z nasion zebranych w 1992r.

TABELA 1
Lokalizacja badanych proweniencji buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)

Nadleśnictwo	Leśnictwo	Oddział	Wysokość n.p.m.	Położenie geograficzne	
Gryfino	Glinna	213b	80	14°43'	53°18'
Bierzwnik	Radochowo	405	193	15°54'	53°05'
Drawieński PN		402a	193	16°55'	53°05'
Karnieszewice	Kamionka	37f	20	16°22'	54°1'7
Wejherowo	Rybno	216b	60	17°06'	54°10'
Wejherowo	Gniewino	201h	115	18°18'	54°37'
Szczecinek	Jelenino	222n	130	16°40'	53°40'
Gdańsk	Marianowo	112a	70	18°31'	54°23'
Kwidzyn	Polno	228a	30	19°06'	53°39'
Kwidzyn	Mikołajki	81c	40	19°10'	53°51'
Młynary	Strużyna	44a	148	19°56'	54°01'
Świebodzin	Łagów	300f	100	15°30'	52°30'
Grodzisk	Chraplewo	57b	95	16°16'	52°23'
Milicz	Dziewiętlin	161a,b	230	17°16'	51°27'
Lipinki	Zielony Las	306f	200	15°18'	51°37'
Brzeziny	Janinów	181a2	200-250	19°36'	51°50'
Łagów	Jeleniów	44a,c	350	20°5'9	50°50'
Tomaszów	Werechanie	239g	180-300	23°00'	50°50'
Zdroje	Zdrój	296b, 297a	740-840	16°30'	50°17'
Ustroń	Bukowa	65b	550	18°54'	49°39'
Lesko	Tarnawa	81c	520	22°16'	49°28'
Bieszczadzki PN	Moczarne	159Aa	700-920	22°29'	49°07'
Bieszczadzki PN	Moczarne	160a	740-980	22°29'	49°07'

Białka ekstrahowano przy pomocy buforu 0,15M Tris-HCL, o pH 7,3, a następnie rozdzielano metodą elektroforezy na żelu skrobiowym. W rozdziale wykorzystano dwa układy buforowe:

- Ashton o pH = 8.1 – bufor żelowy litowo-boranowy (0,191M kwas borny, 0,050M wodorotlenek litowy) i bufor elektrodowy tris-cytrynowy (0,051M tris-HCL, 0,008M kwas cytrynowy), dla enzymów: L-leucyloaminopeptydazy (LAP1), transaminazy glutaminianowo-szczawiooctanowej (GOT2) i reduktazy menadionu (MNR),
- Tris-cytrynowy o pH = 7,0 – bufor żelowy to 10-krotnie rozcieńczony bufor elektrodowy (0,135M tris-HCL, 0,043M kwas cytrynowy), dla enzymów: dehydrogenazy jabłczanowej (MDH1, MDH2, MDH3), dehydrogenazy szikimianowej (SKDH), fosfoglukomutazy (PGM) i fosfoglucoizomerazy (PGI2).

Podczas rozdziału białek stosowano następujące parametry prądu: Ashton 280V, 90 mA i bufor tris-cytrynowy 150V, 90 mA. Po zakończeniu rozdziału białek poszczególne układy enzymatyczne wybarwiano, a następnie interpretowano uzyskane obrazy zymogramów zgodnie z procedurami (5, 7, 12). Częstości alleli i heterozygotyczność obserwowana wyliczone zostały na podstawie diploidalnych genotypów, poszczególnych analizowanych osobników dla każdej populacji. Wartości heterozygotyczności oczekiwanej wyliczono zgodnie z Nei 1974 (11). Zróznicowanie genetyczne badanych proveniencji oceniono na podstawie analizy skupień (cluster analysis). Do opracowania otrzymanych wyników zmienności genetycznej buka używano programu komputerowego BIOSYS 1 (11).

Wyniki

Najwyższą średnią liczbę alleli dla lokus zaobserwowano dla proveniencji Młynary (18) i wynosiła ona średnio 2, najniższą zaś dla proveniencji Łągów (34) – średnio 1,2 allele na lokus (średnia dla badanych proveniencji wynosi 1,57) – tabela 2.

Największy procent loci polimorficznych zaobserwowano dla proveniencji Tomaszów (35) – 77,8% lokus (średnia dla badanych proveniencji wynosi 48,79%) – tabela 2. Część proveniencji (Milicz, Lipinki i Łągów) wykazała niezwykle niski stopień polimorficzności – 22% (tab. 2). Przyczyną tego zjawiska może być zebranie nasion do założenia doświadczenia ze zbyt małej liczby drzew w drzewostanie matecznym lub sztuczne pochodzenie proveniencji – drzewostan mateczny sadzony, a liczba drzew, z których pozyskano nasiona niewielka.

Największą wartość heterozygotyczności obserwowanej, to jest liczonej bezpośrednio na podstawie próby stwierdzono dla proveniencji Wejherowo (7) – 0,253 (heterozygotyczność oczekiwana 0,142), zaś najniższą dla proveniencji Łągów (34) – 0,056 (heterozygotyczność oczekiwana 0,088). Proveniencja ta wyróżnia się równocześnie najniższymi wartościami średniej liczby alleli na lokus i procentem loci polimorficznych. Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej dla badanych proveniencji wynosi 0,166. Duże różnice między wartościami heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej świadczą o procesach selekcji zachodzących w tych drzewostanach (tab. 2).

TABELA 2
Ocena zmienności genetycznej badanych proveniencji buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.)

Proveniencja	Nr	N	A	SE	P	Ho	SE	He	SE
Gryfino	1	10,9	1,6	0,2	55,6	0,102	0,072	0,106	0,058
Bierzwnik	3	36	1,6	0,2	44,4	0,148	0,109	0,091	0,057
Drawieński	4	9,8	1	0,2	55,6	0,185	0,097	0,157	0,068
Karniszewice	5	24	1,6	0,2	44,4	0,231	0,142	0,131	0,076
Wejherowo	6	11	1,7	0,2	66,7	0,142	0,094	0,154	0,056
Wejherowo	7	22	1,4	0,2	44,4	0,253	0,143	0,142	0,072
Szczecinek	8	11,1	1,6	0,2	55,6	0,083	0,054	0,09	0,043
Gdańsk	11	24	1,7	0,3	44,4	0,241	0,144	0,148	0,079
Kwidzyn	16	24	1,3	0,2	33,3	0,227	0,146	0,118	0,074
Kwidzyn	17	32,4	1,6	0,2	44,4	0,118	0,091	0,079	0,053
Młynary	18	30,7	2	0,4	55,6	0,116	0,072	0,108	0,055
Świebodzin	25	24	1,3	0,2	33,3	0,231	0,146	0,123	0,074
Grodzisk	26	10,7	1,7	0,2	55,6	0,106	0,068	0,142	0,066
Milicz	29	24	1,4	0,3	22,2	0,218	0,144	0,124	0,082
Lipinki	30	24	1,3	0,2	22,2	0,222	0,147	0,116	0,077
Brzeziny	32	12	1,6	0,2	44,4	0,241	0,144	0,139	0,077
Łągów	34	11,1	1,2	0,1	22,2	0,056	0,056	0,088	0,061
Tomaszów	35	32,3	1,8	0,1	77,8	0,119	0,098	0,081	0,053
Zdroje	38	10,8	1,7	0,2	55,6	0,146	0,093	0,153	0,07
Ustroń	39	24	1,7	0,2	55,6	0,241	0,144	0,142	0,073
Lesko	41	32,1	1,7	0,2	55,6	0,153	0,107	0,104	0,056
Bieszczadzki PN	42	11,1	1,8	0,2	66,7	0,144	0,065	0,161	0,066
Bieszczadzki PN	43	32,4	1,8	0,2	66,7	0,091	0,037	0,098	0,045

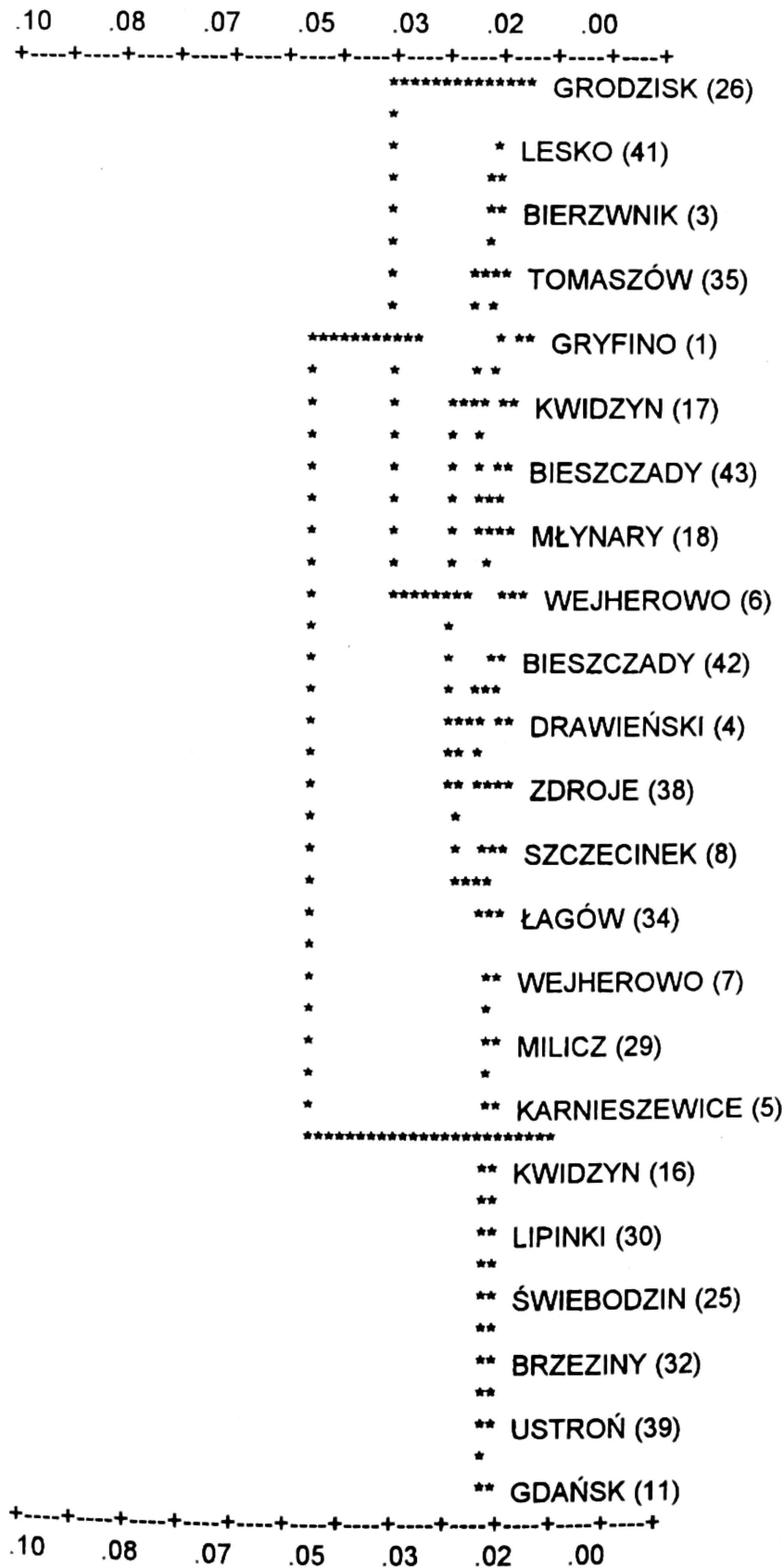
Nr – numer proveniencji, N – średnia liczba osobników, A – średnia liczba alleli,
P – procent loci polimorficznych, Ho – heterozygotyczność oczekiwana,
SE – błąd standardowy

Farris (1972) "f" = .894

Prager and Wilson (1976) "F" = 15.479

Procent odchylenia standardowego (Fitch and Margoliash, 1967) = 35.235

Dystanse



RYC. Diagram różnicowania genetycznego badanych proveniencji na podstawie dystansów genetycznych Farris (1972) "f" = 894, Prager and Wilson (1976) "F" = 15,479 Procent odchylenia standardowego (Fitch and Margoliash 1967) = 35,235

Dendrogram sporządzony na podstawie dystansów genetycznych średnich częstości alleli dzieli analizowane populacje na kilka grup. W jednej grupie znajdują się zarówno proveniencje górskie jak i pomorskie i zachodnie. Znajdujemy też dwie proveniencje z tego samego regionu w dwóch różnych grupach – Wejherowo (6) i Wejherowo (7). Największe zróżnicowanie genetyczne (dystans genetyczny występuje między populacjami Grodzisk (26) i Gdańsk (11) – przedstawiono na rycinie. Wyraźnie inna wśród nich w stosunku do pozostałych populacji jest populacja Grodzisk. Przyczyną tego zjawiska może być sztuczne pochodzenie tej populacji i/lub występowanie jej na granicy zasięgu buka w Polsce.

Uzyskany obraz zmienności analizowanych proveniencji na podstawie dystansów genetycznych nie umożliwia rozróżnienia proveniencji na podstawie tej cechy. Procent loci polimorficznych oraz średnia heterozygotyczność również nie pozwalają wyróżnić regionów o podobnym poziomie zmienności genetycznej.

Wykonane analizy wskazują na istnienie dużego zróżnicowania genetycznego proveniencji. Na poziom tego zróżnicowania ma nie mały wpływ położenie geograficzne i klimatyczne oraz historia migracji buka na terenie Polski (9, 10).

Dyskusja

Zmienność badanych cech charakteryzująca proveniencje buka na podstawie analiz izoenzymatycznych wskazuje na istnienie większej zmienności wewnątrzpopulacyjnej niż międzypopulacyjnej proveniencji, co potwierdza istnienie dużej plastyczności ekologicznej tego gatunku (4). Okazuje się, że trudno jest znaleźć specyficzne markery dla tego gatunku, ze względu na obserwowaną małą zmienność genetyczną, przy porównaniach nawet bardzo odległych od siebie proveniencji.

Jedne z pierwszych badań nad zmiennością genetyczną izoenzymów buka zwyczajnego - *Fagus sylvatica* L. wykonano we Francji. Znalezione znaczącą korelację polimorficznych loci peroksydazy oraz dehydrogenazy jabłczanowej, odnośnie warunków klimatycznych. Zauważono inne charakterystyki izoenzymatyczne dla populacji śródziemnomorskich oraz klimatu kontynentalnego (2).

Prób znalezienia specyficznych markerów enzymatycznych dla tego gatunku podejmowano więcej. Analizowano zmienność genetyczną buka w obrębie 6 loci enzymatycznych, dla 130 populacji Europy południowej i zachodniej. Zauważono zależność pomiędzy częstością występowania alleli genów kodujących peroksydazy (co potwierdza wyniki wcześniejszych analiz), a położeniem geograficznym analizowanej populacji i klimatem (1).

Na szerszą skalę badania wykonano dla 110 populacji buka reprezentujących naturalny zasięg buka w Europie i 12 loci enzymatycznych. Nie stwierdzono zasadniczych różnic genetycznych analizowanych populacji, zauważono zdecydowane zróżnicowanie populacji bułgarskich w stosunku do pozostałych, co tłumaczy się możliwością mieszania się populacji buka wschodniego i zwyczajnego (8). Badania wskazują na podobieństwo genetyczne proveniencji buka polskiego i słowackiego oraz czeskiego.

Wykorzystując badania izoenzymatyczne próbowano szukać różnic pozwalających odróżnić buka zwyczajnego od innego gatunku, buka wschodnioeuropejskiego (*Fagus orienta-*

lis Lypsky), w strefie współwystępowania obu gatunków. Analizy izoenzymatyczne umożliwiły rozróżnienie tych gatunków na podstawie zymogramów 6 loci genowych (3).

Dziedziczenie 16 enzymów buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.), analizowano w Niemczech (7). Analizy prowadzono na materiale scharakteryzowanym uprzednio pod względem zmienności genetycznej, a kwiaty żeńskie poddawano sztucznemu zapłodnieniu. Badano także ekspresję genów dla różnych typów tkanek: liści, pąków i pyłku. Niektóre z genów odznaczały się różną aktywnością, zależnie od typu tkanki.

Badania (6) nad zmiennością genetyczną drzew buka, bardziej lub mniej odpornych na skażenia przemysłowe. Wyniki wskazują na większą odporność drzew o dużym udziale heterozygot w populacji.

Wnioski

- Zmienność genetyczna buka w Polsce jest bardzo ściśle związana ze zróżnicowaniem środowiskowym. Stąd trudno jest wyróżnić określone ekotypy buka, posługując się niewielką ilością genów markerowych. Gatunek ten wykazuje dużą plastyczność ekologiczną.
- Wyniki wskazują na duże zróżnicowanie genetyczne analizowanych proveniencji.
- W celu uzyskania pełniejszego obrazu zmienności buka w Polsce korzystne byłoby przeanalizowanie większej liczby populacji i zwiększenie liczby analizowanych loci.

*Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych
Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Las
05-973 Warszawa, ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3
Tel: (0-22) 846 46 60, w. 485,486; fax: (0-22)8462016
e-mail: sulkowsm@ibles.waw.pl*

Literatura

- Comps, B., Paule, L., Sugar, I., Thiebaut, B., Trinajstić, I. Genetic variability in beechwoods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe, allozymic variations in six enzyme systems: spatial differentiation among and within populations. Proceedings IUFRO – Buchensymposium zusammengestellt von Stefan Korpel – Ladislav Paule. Zvolen 3-6. 6. 1988; 1988: 5-21.
- Cuguen, J., Thiebaut, B., Ntsiba, F., Barriere, G. Enzymatic Variability of Beechstands (*Fagus sylvatica* L.) on three Scales in Europe: Evolutionary Mechanisms, w P. Jacquard (ed): genetic differentiation and dispersal in plants. NATO ASI Series. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg. Vol G5. 1985: 17-39.

- Gomöry, D., Paule, L. Vysny, J.** Isozyme polymorphism of beech populations in the transition zone between *Fagus sylvatica* and *Fagus orientalis*. Proceedings of an EC Workshop on the Evaluation of Genetic Resources of Beech. Ahrensburg, July 1-2, 1993: 171-180.
- Giertych M.:** Genetyka w: Buk zwyczajny *Fagus sylvatica*. Warszawa – Poznań: PWN 1990: 193-237.
- Merzeau, D., Di Giusto, F., Comps, B., Thiébaud, B., Letouzey, J., Cougen, J.** The allozyme variants of beech (*Fagus sylvatica* L.): inheritance and application to a study of the mating system. *Silvae Genetica*, vol. 38, 1989: 195-201.
- Müller-Starck, G.** Genetic Differences between "Tolerant" and Sensitive" Beeches (*Fagus sylvatica* L.) in Environmentally Stressed Adult Forest Stand. *Silvae Genetica* 34, 6: 1985: 241-248.
- Müller-Starck, G., Starke, R.** Inheritance of Isoenzymes in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *The journal of Heredity* 84, 4: 1993: 291-296.
- Paule, L., Gömory, D., Vysny, J.,** Genetic diversity and differentiation of beech populations in Eastern Europe. *Genetics and Silviculture of Beech. Proceedings from 5th Beech Symposium of the IUFRO Project Group P1. 10-00, 19-24 September 1994, Mogenstrup, Denmark. Forskningsserien Nr. 11: 1995: 159-167.*
- Ralska-Jasiewiczowa, M.,** Isopollen maps for Poland: 0-11000 years b.p. *New Phytol.* 94: 1983: 133-175.
- Szafer, W.,** The significance of isopollen lines for the investigation of the geographical distribution of trees in the Post-Glacial period. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences et des Lettres, Serie B, 1, 1935: 235-239.*
- Swofford, DL., Selander, R.B.,** Biosys-1. User Manual. University of Illinois, 1981; 65 str.
- Thiébaud, B., Lumaret, R., Vernet, P.** The buds enzymes of beech (*Fagus sylvatica* L.)-genetic distinction and analysis of polymorphism in several French populations. *Silvae Genetica*, vol. 31, 1982: 51-60.

Summary

Isoenzyme analysis chosen provenances of beech (*Fagus sylvatica* L.) on the provenance trial in Bystrzyca Kłodzka

Aim of the study was estimation of genetic variation of beech (*Fagus sylvatica* L.) on the beech provenance trial representing chosen Polish provenances of selected seed stands of beech. Enzymes were extracted from beech buds (buffer Tris-HCL pH 7.3), and next separated during starch gel electrophoresis. Variation of seven enzyme systems was analysed, using two buffer solutions: Ashton pH 8.1 – Lithium-Borate electrode buffer, gel buffer Tris-Citric for enzyme systems: LAP, GOT and MNR and Tris-Citric pH 7.3 for enzyme systems: MDH, SKDH, PGM and PGI.

Parameters characterise genetic diversity and variation were computed using program BIOSYS 1.

In Poland genetic variation of beech is rigorous related to ecological variation of stands. It is difficult distinguish specified beech ecotypes, using small amount of gene markers. This species shows high ecological plasticity.

Obtained results point at high genetic diversity. It was found, that for analysed provenances intra-population diversity is higher then inter-population. For better recognition of genetic diversity of beech in Poland more populations should be analysed and increased number of analysed *loci*.