

MAŁGORZATA SUŁKOWSKA, ANDRZEJ ZAŁĘSKI

Zróznicowanie genetyczne reakcji nasion rodów sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na test przyspieszonego postarzenia.

Genetic variation response of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds of different progenies to the accelerated ageing test

ABSTRACT

The aim of the study was estimation of reaction on the temperature and humidity stress factors of seeds thirty progenies of Ramucka provenance Scots Pine plus trees. The seeds of Scots Pine were treated in acceleration ageing test according to Machaniček method and germination test was performed for investigated seeds. The analyses of genetic diversity and differentiation were performed for five enzyme systems: GOT, GDH, MDH, 6PGDH, SKDH.

KEY WORDS

isoenzyme diversity, vitality of seeds

Wstęp

Opracowanie odpowiednich metod wstępnego testowania stanu biochemicznego nasion i ich żywotności, przed złożeniem do długoterminowego przechowywania, może mieć bardzo duże znaczenie dla gospodarki leśnej. Duże nadzieje upatruje się stąd między innymi w określaniu odporności nasion na stresowe warunki testów przyspieszonego postarzenia, która ma świadczyć o ich predyspozycji do przechowywania.

Jak wykazują dotychczasowe doświadczenia przeprowadzone w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych Instytutu Badawczego Leśnictwa, odporność nasion na test przyspieszonego postarzenia związana jest z wieloma różnorodnymi czynnikami jak: zawartość białek rozpuszczalnych w wodzie [Gumnicka i in. 1999] zawartość DNA, RNA i wolnych nukleotydów [Tomaszewski i in. 2000], metody pozyskania nasion [Załęski i Musiela G. 1998; Załęski 2001].

Celem badań była ocena reakcji na warunki stresowe nasion 30 rodów drzew doborowych sosny zwyczajnej proveniencji ramuckiej i ustalenie zależności między odpornością nasion na test przyspieszonego postarzenia, a poziomem zróżnicowania genetycznego drzew matecznych, określonego na podstawie analiz izoenzymatycznych.

Materiały i metody

Próbki nasion 30 rodów drzew doborowych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) proveniencji ramuckiej, do potrzeb badań pozyskano z plantacji nasiennej w Kwidzynie. Nasiona podzielono

MAŁGORZATA SUŁKOWSKA

Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych
Instytut Badawczy Leśnictwa
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3
00-973 Warszawa
e-mail: sulkowsm@ibles.waw.pl

ANDRZEJ ZAŁĘSKI

Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych
Instytut Badawczy Leśnictwa
ul. Bitwy Warszawskiej 1920 r. nr 3
00-973 Warszawa
zalensan@ibles.waw.pl

na dwie grupy, z których jedną poddano warunkom stresowym, polegającym na przetrzymywaniu ich przez 95 godzin w temperaturze podwyższonej do 40-41°C i wilgotności powietrza w granicach 90-100% [Machaniček 1981]. Na podstawie energii i zdolności kiełkowania określono żywotność nasion poddanych testowi przyspieszonego postarzenia i kontroli. Nasiona kiełkowano na kiełkownikach Jacobsena – w pełnym oświetleniu. Do określenia energii kiełkowania liczono prawidłowo skiełkowane nasiona po 7 dniach, a ich zdolności kiełkowania – po 14 dniach. Miarą odporności, na stresowe warunki testu przyspieszonego postarzenia, była różnica w zdolności kiełkowania nasion poddanych warunkom stresowym i niepostarzanym. Według kryteriów podanych przez Machanička [1981], jeśli różnice te u nasion są większe od 10%, to nie nadają się one do długookresowego przechowywania.

Analizy zmienności genetycznej wykonano przy użyciu techniki elektroforezy na żelu skrobiowym, z wykorzystaniem haploidalnej tkanki makrogametofitów nasion, po 6-10 sztuk dla drzewa. Nasiona użyte do analiz zostały podkiełkowane (przez 48 godzin), a następnie wyizolowano z nich białka i rozdzielono na frakcje, charakteryzujące się jednakowym ładunkiem elektrycznym cząsteczki. Badania prowadzono dla pięciu układów enzymatycznych, zgodnie ze standardowo stosowaną metodyką opracowaną przez: Poulik [1957] oraz Meizel i Markert [1967] za Concle i inni [1982] i przez Gonczarenko i Padutov [1988]:

- transaminazy glutaminianowo-szczawiooctanowej (GOT- EC 2.6.1.1),
- dehydrogenazy glutaminianowej (GDH – EC 1.4.1.3),
- dehydrogenazy jabłczanowej (MDH – EC 1.1.1.37),
- dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej (6PGDH – EC 4.2.1.12),
- dehydrogenazy szikimianowej (SKDH – EC 1.1.1.25).

Wyniki analiz izoenzymatycznych opracowano z zastosowaniem programu Biosys 1 [Swofford i Selander 1981] oraz standardowych testów statystycznych stosowanych w badaniach korelacji cech. Uzyskane wyniki badań zestawiono w tabeli.

Wyniki

Badania odporności nasion wybranych rodów sosny na test przyspieszonego postarzenia wykazały, że tylko cztery rody zareagowały wysoce istotnym (z prawdopodobieństwem 99%), zmniejszeniem zdolności kiełkowania po teście przyspieszonego postarzenia. Przy tym dla trzech z nich obniżenie zdolności kiełkowania nie przekraczało 10%, a tylko u jednego osiągnęło bardzo duży poziom – 43%. Znacznie większe różnice pod względem reakcji na stresowe warunki testu przyspieszonego postarzenia stwierdzono w przypadku energii kiełkowania. Istotność różnic w obniżeniu energii kiełkowania z prawdopodobieństwem 99% udowodniono bowiem w próbkach nasion z 9 rodów.

Ocena zmienności izoenzymatycznej wykazała znaczne zróżnicowanie genetyczne badanych rodów. Większość rodów charakteryzowała się wysokim poziomem zmienności genetycznej badanych układów enzymatycznych w granicach wartości heterozygotyczności od 0,273 do 0,455, zaś średnia liczba alleli na locus wynosiła zwykle od 1,3 do 1,5. Spośród wszystkich badanych rodów tylko siedem osiągnęło wyraźnie mniejsze wartości tych parametrów.

Analizy statystycznych nie wykazały istnienia zależności pomiędzy poziomem zróżnicowania genetycznego badanych rodów i spadkiem energii oraz zdolności kiełkowania ich nasion w teście przyspieszonego postarzenia. W grupie rodów, w których wyróżniono nasiona charakteryzujące się wysoką żywotnością i odpornością na stresowe warunki testu znajdowały się jednocześnie rody o wysokim, jak niższym stopniu zróżnicowania genetycznego, podobnie jak i w grupie rodów charakteryzujących się niską tolerancją na test.

Tabela

Charakterystyka żywotności oraz oceny zmienności genetycznej nasion sosny ramuckiej
 Characteristics of the vitality and evaluation of the genetic variation of scots pine seeds provenance
 Ramuki

Nr rodu	Energia kielkowania (%)	Zdolność kielkowania (%)	Zmniejszenie kielkowania po teście przyspieszonego postarzania – różnica (%)		Średnia liczba alleli dla locus	Średnia hetero- zygotyczność rzeczywista
			w energii	w zdolności		
2548/2	100	100	2	2	1,4	0,364
2548/3	98	98	11 **	6 **	1,1	0,091
2548/4	93	93	10 **	3	1,3	0,273
2571/1	91	94	7 *	5 *	1,1	0,091
2571/2	99	100	0	1	1,5	0,455
2571/3	98	98	3	2	1,5	0,455
2264/2	96	98	0	2	1,3	0,273
2567/1	96	97	-1	0	1,3	0,273
2567/2	97	97	-2	-2	1,3	0,273
2547/1	98	99	0	1	1,4	0,364
2247/1	84	89	1	-3	1,1	0,091
2247/2	97	98	0	0	1,3	0,273
2554/1	96	97	45 ***	43 ***	1,5	0,455
2554/2	64	71	-3	-9	1,3	0,273
2253/1	94	97	0	2	1,5	0,455
2253/2	98	99	-1	0	1,5	0,455
2575/1	98	99	3 **	4 *	1,4	0,364
2575/2	98	99	1	2	1,1	0,091
2576/1	98	98	8 ***	3 *	1,5	0,545
2829/1	98	98	3	2	1,4	0,364
2241/1	92	93	12 ***	6 **	1,1	0,091
2825/1	99	99	0	0	1,2	0,182
2560/1	98	99	5 **	5 **	1,2	0,182
2261/1	75	85	-8	-5	1,4	0,364
2273/1	99	99	1	1	1,3	0,273
2268/1	95	95	4	1	1,3	0,273
2572/1	99	99	0	0	1,3	0,273
2822/1	99	99	1	1	1,3	0,273
2238/1	97	97	8 **	2	1,3	0,273
2243/1	98	98	3 **	2	1,5	0,455

Różnice istotne na poziomie: * $p_{\alpha}=0,05$; ** $p_{\alpha}=0,01$; *** $p_{\alpha}=0,001$

Dyskusja

Duże zróżnicowanie odporności na stresowe warunki testu przyspieszonego postarzania nasion wykształconych w tym samym okresie wegetacyjnym i tym samym drzewostanie, ale pochodzących z różnych drzew (rodów) stwierdzono również w przypadku świerka pospolitego z Sudetów [Kantorowicz 2002].

Badania zróżnicowania genetycznego populacji sosny, w aspekcie ich tolerancji na niekorzystne warunki wzrostu spowodowane zanieczyszczeniami przemysłowymi metali ciężkich [Prus-Głowacki i Nowak-Bzowy 1989, 1992] wykazały, że strategia adaptacyjna populacji związana jest ze wzrostem ich poziomu zróżnicowania genetycznego – większą średnią liczbą alleli

dla locus. Obserwowano przy tym w grupie drzew odpornych na skażenie większy udział homozygot, względem heterozygot. Podobne badania prowadzono także nad zmiennością genetyczną drzew buka, bardziej lub mniej odpornych na skażenia przemysłowe [Müller-Starck 1985]. Wyniki wskazują na większą odporność drzew o dużym udziale heterozygot w populacji.

Wnioski

Nasiona sosny zwyczajnej wykształcone w tym samym okresie wegetacyjnym i w jednej plantacji, ale na szczepach różnych klonów różnią się znacznie pod względem odporności na stresowe warunki testu przyspieszonego postarzania. Nie udało się jednak udowodnić istotnej różnicy pomiędzy nasionami odpornymi i nieodpornymi na stresowe warunki testu a poziomem zróżnicowania genetycznego, ocenionego na podstawie średniej liczby alleli na locus oraz heterozygotyczności badanych układów enzymatycznych. Uzyskane wyniki badań skłaniają do poszukiwania, nowych innych narzędzi oceny zmienności genetycznej, umożliwiających równocześnie ocenę ich żywotności, np. z wykorzystaniem markerów DNA.

Literatura

- Concle, M.T., Paul, D.H., Nunnally, L.B., Hunter, S.C. 1982. Starch Gel Electroforesis of Conifer Seeds: a laboratory manual. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station.
- Gonczenko G.G., Padutov B.E. 1988. Rukowodstvo po issledovanii dreviesnykh widow metodom elektroforeticeskowo analiza izofermentow. Bieloruskij Nauczno-issledowatielnyj Institut Lesnowo Hozijajstwa, Gomel.
- Gumnicka O., Janson L., Załęski A. 1999. Zawartość białek rozpuszczalnych w wodzie w nasionach świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst.) o różnej odporności na test przyspieszonego postarzania. Prace IBL 883: 95-104.
- Kantorowicz W. 2002. Wpływ temperatury w pierwszym 5-letnim okresie przechowywania na żywotność nasion świerka pospolitego (*Picea abies* L. Karst.) z różnych drzew. Prace IBL, Seria 3(938): 19-41.
- Machaniček J. 1981. Vyzkum kritérii určujících vhodnost lesního osiva pro dlouhodobé skladování. Práce VÚLHM 59.
- Prus-Głowański W., Nowak-Bzowy R. 1989. Demographic processes in *Pinus sylvestris* populations from regions under strong and weak anthropogenous pressure. *Silvae Genetica* 38, 2: 55-62.
- Prus-Głowański W., Nowak-Bzowy R. 1992. Genetic structure of naturally regenerating Scots pine population tolerant for high pollution near a zinc smelter. *Water Air & Soil Pollution*, 62: 249-259.
- Swofford D.L., Selander R. 1981. Biosys 1. Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics. User Manual.
- Müller-Starck, G. 1985. Genetic Differences between „Tolerant” and „Sensitive” Beeches (*Fagus sylvatica* L.) in Environmentally Stressed Adult Forest Stand. *Silvae Genetica* 34, 6: 241-248.
- Tomaszewski M., Janson L., Załęski A. 2000. Zawartość DNA, RNA oraz wolnych nukleotydów w nasionach świerka pospolitego i sosny zwyczajnej o różnej odporności na test przyspieszonego postarzania. Prace IBL 900: 5-15.
- Załęski A., Musiała G. 1998. Zalety odskrzydlenia nasion w środowisku wodnym. *Las Pol.* 13/14: 20-22.
- Załęski A. 2001. Przyczyny obniżonej żywotności nasion sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z północno-wschodniej Polski z zimy 1997/98. Prace IBL 919: 27-46.

SUMMARY

Genetic variation response of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds of different progenies to the accelerated ageing test

The aim of the study was estimation of reaction on the temperature and humidity stress factors of seeds thirty progenies of Ramucka provenance Scots Pine plus trees, collected in seed orchard in Kwidzyn, in connection with the genetic variability. The samples of Scots Pine seeds were treated in acceleration ageing test according to Machaniček method and next germination test was performed simultaneously for treated and not submitted to stress factors seeds. The analyses of genetic diversity and differentiation were performed using starch gel electrophore-

sis methods for following enzyme systems: Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT – EC 2.6.1.1), Glutamate dehydrogenase (GDH – EC 1.4.1.3), Malate dehydrogenase (MDH – EC 1.1.1.37), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH – EC 4.2.1.12) and Shikimate dehydrogenase (SKDH – EC 1.1.1.25). The progenies were characterised different level of genetic diversity not correlated to differences in energies of seeds germination after the accelerated ageing test.