

KATARZYNA ZYGMUNT, MAŁGORZATA KLIMKO

Badania nad zmiennością genetyczną w naturalnie odnawiających się populacjach daglezi zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)*

Genetic variability of naturally regenerated populations of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)

ABSTRACT

Genetic variability of Douglas fir was studied in seven naturally regenerated populations. The genetic structure of the self-sown young generation was described by means of variability of eight enzymes (Dia, G-6-pd, Got, Idh, Pgi, Pgm, Sdh and Shdh) separated electrophoretically on a starch gel. The results indicate that no substantial reduction of the genetic pool and no substantial inbreeding effect were observed in naturally regenerated Polish populations of this introduced species.

KEY WORDS

Pseudotsuga menziesii, genetic variability, isoenzymes

Wstęp

Daglezja zielona (*P. menziesii*), w światowej gospodarce leśnej zaliczana jest do ważnych gatunków drzew iglastych. Ze względu na walory dekoracyjne i odporność na czynniki środowiska, od dawna była i nadal jest stosowana do nasadzeń parkowych. Pod względem wydajności masy przewyższa prawie wszystkie rodzime gatunki drzew występujących w Polsce. W lasach europejskich jest najważniejszym drzewem obcego pochodzenia. Wyniki badań proveniencyjnych wskazują na dużą zmienność morfologiczną daglezi zielonej, ale jednocześnie dobre przystosowanie tego gatunku do warunków środowiska [Chylarecki 1976; Mejnartowicz 1997; Klimko, Zygmun 2003].

Istotnym zagadnieniem jest wyjaśnienie, jak proces introdukcji obcych dla danej flory gatunków wpływa na pule genowe introdukowanych populacji, określenie czy w stosunku do populacji rodzimych tracą one część zmienności genetycznej i na czym polegają procesy adaptacyjne naturalnych odnowień w nowych najczęściej odmiennych warunkach środowiska. Badania tego typu mają nie tylko znaczenie poznawcze, lecz także praktyczne.

Celem niniejszych badań nad enzymami jako markerami genetycznymi daglezi zielonej, jest wieloaspektowa analiza genetyczno-statystyczna umożliwiająca identyfikację alleli w loci

*) Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2003 jako projekt badawczy

KATARZYNA ZYGMUNT

Katedra Botaniki
Akademia Rolnicza
ul. Wojska Polskiego 71c
60-625 Poznań
kajka@au.poznan.pl

MAŁGORZATA KLIMKO

Katedra Botaniki
Akademia Rolnicza
ul. Wojska Polskiego 71c
60-625 Poznań
klim@au.poznan.pl

kodującej białka enzymatyczne, oszacowanie stopnia heterozygotyczności i polimorfizmu, a następnie stopnia podobieństwa i zróżnicowania genetycznego badanych populacji *P. menziesii*.

W dotychczasowych badaniach izoenzymatycznych dąglezi zielonej opierano się m.in. na enzymach:

- LAP [Bergman 1975, 1978; Copes 1975; Mejnartowicz 1976; Müller 1976],
- GOT [Copes 1975; Yang i in. 1977]; PDE [Mejnartowicz, Bergman 1977],
- GDH [Yang i in. 1977].

W niniejszych badaniach wykorzystano dodatkowo inne enzymy: Dia, G6pd, Idh, Pgi, Pgm, Sdh, Shdh dotychczas uwzględniane w badaniach genetycznych nad innymi gatunkami roślin nagozalążkowych *Pinus sylvestris*, *Abies alba*, *Picea excelsa*, *Taxus baccata* [Modrzyński, Prus-Głowacki 1998; Krzakowa, Korczyk 1998; Lewndowski i in. 1995; Lewandowski i in. 2001; Matusova 1995].

Materiał i metody

Do badań wybrano siedem populacji naturalnego odnowienia dąglezi zielonej (*P. menziesii*) z sześciu stanowisk położonych w zachodnim pasie Polski. Przy wyborze populacji kierowano się głównie fazą i postacią naturalnego odnowienia, a także położeniem geograficznym powierzchni badawczej (ryc. 1).

Wykaz powierzchni badawczych:



Ryc. 1.

Lokalizacja badanych stanowisk
Location of study sites

1. Nadleśnictwo Międzyzdroje, oddział 44 n, 5-letnie odnowienie w postaci nalu,
2. Nadleśnictwo Międzyzdroje, oddział 44 m, 15-letnie odnowienie w postaci podrostu,
3. Nadleśnictwo Karnieszewice, oddział 238 f, około 10-letnie odnowienie w formie podrostu grupowego,
4. Nadleśnictwo Drawsko, oddział 41 a, b, 25-30-letnie odnowienie w formie podrostu grupowego,
5. Nadleśnictwo Miradz, oddział 109 b, 10-letnie odnowienie w formie podrostu,
6. Nadleśnictwo Świebodzin, oddział 46 d, 20-letnie odnowienie w formie podrostu masowego,
7. Nadleśnictwo Kamienna Góra, oddział 253 c, 10-letnie odnowienie w formie podrostu grupowego.

Materiałem użytym do badań były pąki spoczynkowe z 30 drzew w każdej populacji, zbierane wraz z 3-5 cm fragmentem pędu. Pąki przechowywano w temperaturze -200°C do

czasu wykonania cyklu analiz. Badania ekstraktów przeprowadzono metodą elektroforetycznego rozdziału białek, w której funkcję molekularnego sita spełniał żel skrobiowy.

W badaniach wykorzystano następujące markery enzymatyczne: diaforaza (DIA E.C.1.6.4.3), dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD, E.C.1.1.1.49), transaminaza glutaminianowo-szczawianooctowa (GOT, E.C.2.6.1.1), dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH, E.C.1.1.1.40), fosfoglucoizomeraza (PGI, E.C.5.3.1.9), fosfoglucomutaza (PGM, E.C.5.4.2.2), dehydrogenaza sorbitolowa (SDH E.C.1.1.1.14), dehydrogenaza szikimowa (SHDH, E.C.1.1.1.25).

Analizę biochemiczną wykonano zgodnie z metodami podanymi przez Muona [1987]. Barwienie systemów enzymatycznych i ich genetyczną interpretację przeprowadzono wg Rudina i Ekberga [1978], Szmida i Yazdanego [1984], Muona i Szmida [1985] w Zakładzie Genetyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

Metody statystyczne

Szczegółową analizę wyników badań przeprowadzono na podstawie następujących parametrów: frekwencji alleli i genotypów, heterozygotyczności oczekiwanej (H_e), heterozygotyczności obserwowanej (H_o), współczynnika polimorfizmu zmienności genotypowej (P_g), współczynnika wsobności Wrighta (F), podobieństwa genetycznego wg Nei'a, odległości genetycznych według Nei'a i Hedrick'a. Na podstawie obliczonych odległości genetycznych pomiędzy populacjami skonstruowano dendrogramy metodą UPGMA (cluster analysis). Analizę statystyczną wykonano wykorzystując program „GEN” [Bzowy, Bzowy-Nowak, niepubl.].

Wyniki

ANALIZA CZĘSTOŚCI ALLELI. W analizowanych populacjach w dziesięciu badanych loci enzymatycznych stwierdzono ogółem występowanie 30 alleli (tab. 1).

- Frekwencja alleli diaforazy Dia. W tym systemie enzymatycznym brano pod uwagę jeden locus. Wyróżniono w nim trzy allele. Allel Dia-1 z dużą frekwencją 100% występował w pięciu populacjach i nieco mniejszą (97%) w dwóch populacjach. Allel Dia-2 z frekwencją 3,0% obserwowano w populacji z Międzyzdrojów 1, podobnie jak allel Dia-3 w populacji Karnieszewice (tab. 1).
- Frekwencja alleli dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. W tym systemie enzymatycznym stwierdzono w jednym locus trzy allele: G6pd 1, G6pd 2 i G6pd 3. Dwa pierwsze allele obserwowano we wszystkich populacjach, a ich częstość w pięciu populacjach była wyrównana i wynosiła dla G6pd 1 od 47% do 57% i 42% do 52% dla G6pd 2. Największą odrębność wykazywała populacja z Międzyzdrojów 1. Częstość allelu G6pd 1 wynosiła 95% a G6pd 2 zaledwie 2%. Częstość allelu G6pd 3 była niska od 2 do 5% w populacjach 3, 7, 4. W populacjach z Miradza i Międzyzdrojów (tab. 1) nie stwierdzono występowania tego allelu.
- System enzymatyczny Got reprezentowały dwa loci Got A i Got C, składające się z trzech alleli każde. Najczęstszym był allel Got A1, natomiast Got A2 i Got A3 stwierdzono jedynie w populacji ze Świebodzina (tab. 1). W locus Got C allel Got C1 obserwowano we wszystkich populacjach z wysoką częstością od 83 do 100%. Frekwencja alleli Got C2 i Got C3 była niska i wynosiła odpowiednio od 2% do 17% oraz 2%-5%. W populacji Kamiennej Góry nie stwierdzono występowania allelu Got C2, a w populacjach z Karnieszewic i Świebodzina i Międzyzdrojów 2 allelu Got C3.

Tabela 1.

Częstość alleli 10 analizowanych loci w 7 badanych populacjach *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco
 Allele frequencies of ten analysed loci in seven studied *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco populations

Locus	Allel	Międzydroje 1	Międzydroje 2	Karmieszewice	Drawsko	Miradz	Swiebodzin	Kamienna Góra
Dia	1	0,97	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00
Dia	2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia	3	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
G6pd	1	0,95	0,56	0,47	0,50	0,53	0,47	0,57
G6pd	2	0,02	0,44	0,52	0,45	0,47	0,50	0,42
G6pd	3	0,03	0,00	0,02	0,05	0,00	0,03	0,02
GotA	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00
Got A	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
Got A	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
Got C	1	0,95	0,84	0,83	0,90	0,97	0,98	1,00
Got C	2	0,03	0,16	0,17	0,05	0,02	0,02	0,00
Got C	3	0,02	0,00	0,00	0,05	0,02	0,00	0,00
Idh	1	0,92	0,82	0,82	0,78	0,78	0,93	0,88
Idh	2	0,08	0,18	0,18	0,18	0,22	0,07	0,07
Idh	3	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,05
Pgi	1	0,65	0,93	0,93	0,93	0,86	0,90	0,90
Pgi	2	0,32	0,00	0,07	0,05	0,10	0,10	0,07
Pgi	3	0,03	0,07	0,00	0,02	0,03	0,00	0,03
Pgm A	1	0,75	0,82	0,90	0,70	0,93	0,77	0,83
Pgm A	2	0,12	0,07	0,08	0,08	0,05	0,10	0,08
Pgm A	3	0,13	0,12	0,02	0,22	0,02	0,05	0,07
Pgm A	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,02
Pgm B	1	0,92	0,90	0,62	0,60	0,62	0,75	0,55
Pgm B	2	0,08	0,10	0,38	0,40	0,36	0,25	0,42
Pgm B	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03
Sdh	1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Shdh	1	0,87	0,95	0,69	0,77	0,91	0,95	0,64
Shdh	2	0,10	0,05	0,29	0,12	0,07	0,02	0,26
Shdh	3	0,03	0,00	0,02	0,05	0,02	0,03	0,07
Shdh	4	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,03

- Frekwencja alleli dehydrogenazy izocytrynianowej. W opisywanym locus tego systemu wystąpiły trzy allele. Allele Idh 1 i Idh 2 stwierdzono we wszystkich populacjach naturalnego odnowienia ze zróżnicowaną częstością (tab.1). Allel Idh 3 stwierdzono w próbach z Drawska i Kamiennej Góry z niską częstością odpowiednio 3% i 5%.
- Frekwencja alleli fosfoglucoizomerazy. W tym locus zaobserwowano występowanie trzech alleli (Pgi 1, Pgi 2, Pgi 3). Najczęstszym allelem był Pgi 1, który występował we wszystkich populacjach, a największą frekwencję (93%) stwierdzono w populacjach z Drawska, Karnieszewic i Międzyzdrojów 2. Allelu Pgi 2 nie stwierdzono w populacji z Międzyzdrojów 2, a Pgi 3 w populacjach Karnieszewice i Świebodzin (tab. 1).
- Frekwencja alleli fosfoglukomutazy. System enzymatyczny Pgm był kodowany przez dwa loci oznaczone jako Pgm A i Pgm B. W pierwszym z nich wyróżniono cztery allele. Pierwsze trzy (Pgm A1, Pgm A2, Pgm A3) występowały we wszystkich populacjach ze zróżnicowaną częstością (tab. 1). Allel Pgm A4 stwierdzono tylko w populacjach: Kamienna Góra i Świebodzin (z odpowiednią częstością 2 i 8%). Locus Pgm B reprezentowały trzy allele. Allele Pgm B1 i Pgm B2 obserwowano w siedmiu populacjach. Na uwagę zasługują dwie populacje z Międzyzdrojów 1, odrębne pod względem częstości Pgm B1 (92% i 90%), Pgm B2 (8% i 10%). Trzeci allel Pgm B3 z niską częstością 3% i 2% obserwowano w dwóch populacjach: Kamienna Góra i Miradz (tab. 1).
- W locus dehydrogenazy sorbitolowej zaobserwowano występowanie jednego allele, którego frekwencja wynosiła 100% (tab. 1).
- Frekwencja alleli dehydrogenazy szikimowej. W locus Shdh zaobserwowano występowanie czterech alleli enzymatycznych (tab. 1). Najczęściej występującym był allel Shdh 1 (95%) w populacjach ze Świebodzina i Międzyzdrojów 2, a najrzadziej Shdh 2 w populacji ze Świebodzina oraz Shdh 3 w populacjach z Karnieszewic i Miradza z 2% częstością (tab. 1).

ANALIZA CZĘSTOŚCI GENOTYPÓW. Po analizie różnic we frekwencji alleli sprawdzono czy częstość genotypów enzymatycznych podlega wahaniom ilościowym w badanych populacjach.

- Najczęstszym genotypem w locus Dia była homozygota 1/1, której częstość wynosiła od 93 – 100% w pięciu populacjach, a w dwóch pozostałych: Międzyzdroje 1 i Karnieszewice występowały heterozygoty Dia 1/2 oraz Dia 1/3, której częstość wynosiła 7% (tab. 2, ryc. 2).
- Frekwencja genotypów homozygotycznych G6pd 1/1 i G6pd 2/2 była bardzo zróżnicowana, zwłaszcza w locus G6pd 1/1 w populacjach z Miradza i Świebodzina 7%, Drawska 13% oraz 23% Karnieszewice i Kamienna Góra, 30% w populacji Międzyzdroje 1 i 90% Międzyzdroje 2 (tab. 2). Również zróżnicowana była częstość występowania heterozygot genotypu G6pd 1/2 3% w populacji Międzyzdroje 1, 47% w populacji Karnieszewice i 93% w populacji z Miradza (tab. 2, ryc. 2).
- Frekwencja genotypów Got – w locus Got A częstość homozygoty Got A1/1 w pięciu populacjach wynosiła 100%, a w próbie ze Świebodzina 87%. Równocześnie w populacji ze Świebodzina stwierdzono występowanie heterozygot Got A1/2 i Got A1/3 z częstością 10% i 3%. Locus Got C charakteryzował się zbliżonym rozkładem częstości homozygot Got C1/1. W siedmiu populacjach jej częstość wynosiła od 68 do 100%. W populacji Karnieszewice stwierdzono występowanie drugiej homozygoty Got C2/2 z 13% częstością. Udział heterozygot Got C1/2 i Got C1/3 był mniejszy, a częstość ich występowania wynosiła odpowiednio 3%-10% (tab. 2, ryc. 2).

Tabela 2.

Częstość genotypów 10 loci enzymatycznych 7 badanych populacji *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco
 Genotype frequencies of ten enzymatic loci in seven *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco populations

Locus	Genotyp	Międzydroje 1	Międzydroje 2	Karnieszewice	Drawsko	Miradz	Swiebodzin	Kamienna Góra
Dia	1/1	0,93	1,00	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00
Dia	1/2	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia	1/3	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
G6pd	1/1	0,90	0,30	0,23	0,13	0,07	0,07	0,23
G6pd	1/2	0,03	0,52	0,47	0,70	0,93	0,80	0,63
G6pd	1/3	0,07	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,03
G6pd	2/2	0,00	0,19	0,27	0,07	0,00	0,07	0,10
G6pd	2/3	0,00	0,00	0,03	0,07	0,00	0,07	0,00
Gor A	1/1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,87	1,00
Gor A	1/2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
Gor A	1/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
Gor C	1/1	0,90	0,68	0,80	0,80	0,93	0,97	1,00
Gor C	1/2	0,07	0,32	0,07	0,10	0,03	0,03	0,00
Gor C	1/3	0,03	0,00	0,00	0,10	0,03	0,00	0,00
Gor C	2/2	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
Idh	1/1	0,83	0,70	0,63	0,57	0,66	0,87	0,77
Idh	1/2	0,17	0,23	0,37	0,37	0,24	0,13	0,13
Idh	1/3	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,10
Idh	2/2	0,00	0,07	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
Pgi	1/1	0,40	0,87	0,87	0,87	0,79	0,80	0,83
Pgi	1/2	0,43	0,00	0,13	0,10	0,10	0,20	0,07
Pgi	1/3	0,07	0,13	0,00	0,03	0,03	0,00	0,07
Pgi	2/2	0,10	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,03
Pgi	2/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
Pgm A	1/1	0,57	0,67	0,80	0,47	0,86	0,60	0,70
Pgm A	1/2	0,23	0,10	0,17	0,10	0,10	0,13	0,13
Pgm A	1/3	0,13	0,20	0,03	0,37	0,03	0,03	0,13
Pgm A	1/4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00
Pgm A	2/2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
Pgm A	2/3	0,00	0,03	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00

Pgm A	2/4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
Pgm A	3/3	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pgm B	1/1	0,83	0,87	0,45	0,27	0,41	0,41	0,50	0,50	0,13
Pgm B	1/2	0,17	0,07	0,34	0,67	0,41	0,00	0,50	0,00	0,77
Pgm B	1/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
Pgm B	2/2	0,00	0,07	0,21	0,07	0,14	0,00	0,00	0,00	0,03
Pgm B	2/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
Sdh	1/1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sdh	1/1	0,73	0,90	0,48	0,63	0,83	0,90	0,90	0,90	0,48
Sdh	1/2	0,20	0,10	0,38	0,03	0,14	0,03	0,03	0,03	0,24
Sdh	1/3	0,07	0,00	0,03	0,10	0,03	0,00	0,07	0,00	0,00
Sdh	1/4	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
Sdh	2/2	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
Sdh	2/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
Sdh	3/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03

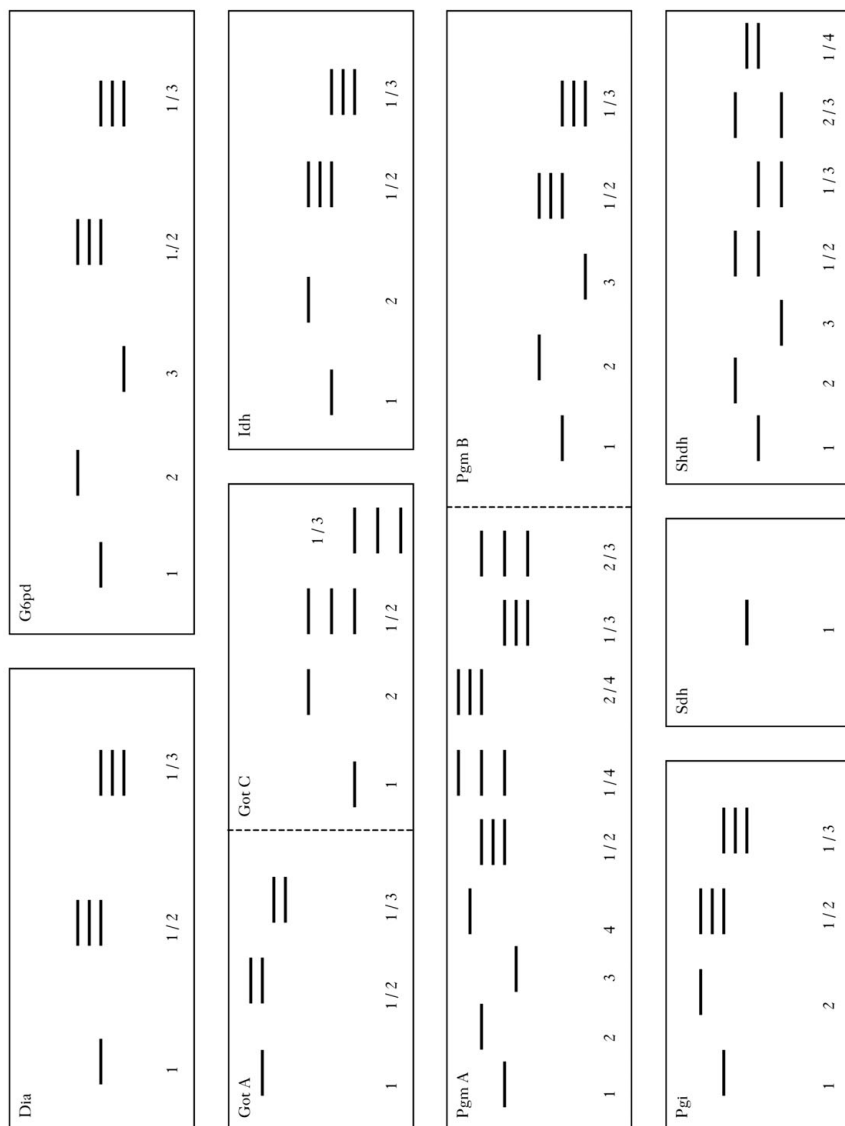
– Frekwencja genotypów Idh. Najczęstszym genotypem w locus Idh była homozygota Idh 1/1, której częstość w analizowanych populacjach wynosiła od 40% do 87%, częstość drugiej homozygoty Idh 2/2, wynosiła od 7% do 10% (Międzyzdroje 2 i Karnieszewice). Heterozygota Idh 1/2 występowała z częstością od 13% do 37% a Idh 1/3 od 7% do 10% (tab. 2, ryc. 2).

– Frekwencja genotypów Pgi. W locus Pgi najczęstszym genotypem w sześciu populacjach była homozygota Pgi 1/1 (79-87%). W populacji z Międzyzdrojów jej frekwencja wynosiła 40%. Druga homozygota Pgi 2/2 występowała tylko w trzech populacjach (tab. 2, ryc. 2), a jej częstość wynosiła 3-10%. W szerokich granicach wahały się także frekwencje heterozygoty Pgi 1/2 (7-43%) i heterozygoty Pgi 1/3 (3-13%).

– Frekwencja genotypów Pgm. W locus Pgm stwierdzono występowanie ośmiu genotypów. Najczęstszym genotypem była homozygota Pgm A1/1, której częstość wynosiła 47-86%. Homozygota Pgm A2/2 występowała z niską częstością 3% (tylko w populacji ze Świebodzina), a Pgm A3/3 w dwóch populacjach z częstością 7% (Międzyzdroje) i 3% Świebodzin. Najczęstszym genotypem heterozygotycznym występującym we wszystkich populacjach były heterozygoty Pgm A1/2 z częstością 10-23% i Pgm A1/3, która występowała z częstością 3-37% (tab. 2, ryc. 2). W locus Pgm B najczęstszym genotypem występującym z częstością 13-83% była homozygota Pgm B1/1. W szerokich granicach wahały się także heterozygoty Pgm B1/2. W badanych populacjach częstość tego genotypu wyniosła 7-77%. Częstość heterozygot Pgm B1/3 i Pgm B2/3 wyniosły zaledwie 3% (tab. 2, ryc. 2).

– Frekwencja genotypów Sdh. W locus Sdh genotypem była homozygota Sdh 1/1, której częstość wynosiła 100%.

– Frekwencja genotypów Shdh. W analizowanych loci Shdh najczęstszym genotypem była homozygota Shdh 1/1, której częstość wynosiła 48-90%. Pozostałe homozygoty Shdh 2/2 i Shdh 3/3 występowały sporadycznie z częstością 10% i 3%. Częstość heterozygoty Shdh 1/2 wynosiła 3-38%, a pozostałych heterozygot frekwencja wahała się od 3% do 13% (tab. 2, ryc. 2).

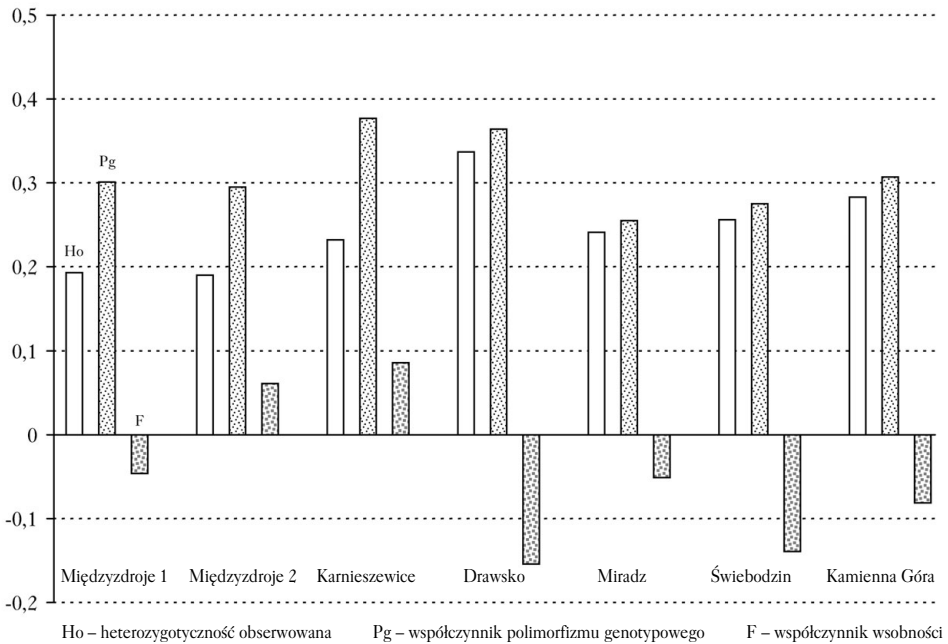


Ryc. 2.

Zymogramy 8 enzymów
Zymogrammes of eight enzymes

MIARY ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ. Heterozygotyczność obserwowaną H_o , współczynnik polimorfizmu genotypowego P_g oraz współczynnik wsobności Wright'a (F) dla 9 loci przedstawiono na rycinie 3. Z analiz wyłączono monomorficzny we wszystkich populacjach locus.

Heterozygotyczność (H_o) analizowanych 9 loci w poszczególnych populacjach była bardzo zmienna, od 0,33 do 0,93%. H_o (0,067) dla loci *Dla* obserwowano w dwóch populacjach z Karnieszewic i Międzyzdrojów 1, natomiast dla loci *G6pd* największą wartość H_o odnotowano w próbie z Miradza (0,931), a najmniejszą w populacji z Karnieszewic (0,100). H_o w systemie *Got* miała różny rozkład. Heterozygotyczność H_o w locus *Got A* obserwowano tylko w populacji ze Świebodzina, natomiast *Got C* w populacjach: Drawsko, Karnieszewice, Miradz, Międzyzdroje 1 i 2 oraz Świebodzin. Bardzo wysokim współczynnikiem ($H_o=0,433$) odznaczała się populacja z Drawska, dla systemu enzymatycznego *Idh*. Ta sama populacja oraz populacje z Karnieszewic, Kamiennej



Ryc 3.

Miary zmienności genetycznej: heterozygotyczność obserwowana (Ho), polimorfizm genotypowy (Pg) i indeks Wrighta (F) w 7 populacjach *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco

Genetic variability measures: observed heterozygosity (Ho), genotypic polymorphism (Pg) and Wright index (F) in seven *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco populations

Góry, Międzyzdrojów 2 cechowały się najmniejszą heterozygotycznością (Ho) dla locus Pgi. Locus Pgm A charakteryzuje się wartością Ho od 0,138 (Miradz) do 0,533 (Drawsko), natomiast Pgm B osiąga wartości Ho od 0,067 (Międzyzdroje 2) do 0,833 (Kamienna Góra). W locus Shdh najwyższą wartość Ho (0,414) miała populacja z Karnieszewic, najniższą Ho (0,100) obserwowano w populacjach ze Świebodzina i Międzyzdrojów 2.

Nie obserwowano heterozygotyczności trzech loci: Dia w populacjach: Międzyzdroje 2, Drawsko, Miradz, Świebodzin, Kamienna Góra; Got A w populacjach: Międzyzdroje 1 i 2, Karnieszewice, Drawsko, Miradz, Kamienna Góra; Got C w populacjach z Karnieszewic.

Duży polimorfizm Pg przekraczający 0,5 stwierdzono w loci G6pd, Idh, Pgi, Pgm A, Pgm B i Shdh. W pozostałych loci wartość Pg nie przekroczyła 5%.

Największe zróżnicowanie polimorfizmu zaobserwowano w locus G6pd w próbie z Miradza (Pg=0,13) i Karnieszewic (Pg=0,66). W locus Shdh Pg=0,18 w próbach ze Świebodzina i Międzyzdrojów 2, a w Kamiennej Górze Pg wynosiło 0,68. Locus Sdh był monomorficzny.

Współczynnik wsobności Wrighta (F) został użyty jako względna miara odchylenia od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga. Średnie wartości F (dla 10 loci enzymatycznych) przedstawia rycina 3. Spośród 7 populacji, dwie z nich: Międzyzdroje 1 i Miradz, znajdują się w stanie zbliżonym do równowagi Hardego-Weinberga.

Najwięcej heterozygot obserwowano w locus G6pd w populacjach z Miradza, Świebodzina oraz w locus Pgm B w populacji z Kamiennej Góry; nadmiar homozygot w loci Got C i Pgm B, w populacjach z Karnieszewic i Międzyzdrojów 2.

ZRÓŻNICOWANIE GENETYCZNE POMIĘDZY BADANYMI POPULACJAMI. Obliczanie wartości całkowitej (H_T), wewnątrzpopulacyjnej (H_S) i międzypopulacyjnej (D_{ST}) różnorodności genowej oraz współczynnik względnej wielkości genetycznego zróżnicowania (G_{ST}) dla każdego locus przedstawiono w tabeli 3.

Wartości H_T zmieniały się w zależności od badanego locus. Małe wielkości H_T obserwowano w loci: Dia i Got A, natomiast największe dla G6pd (H_T 0,50), średnia wartości całkowitej różnorodności wynosiła 0,25. Wielkości wewnątrzpopulacyjnej różnorodności genowej (H_S) mają podobny rozkład jak wartości H_T i nieco mniejszą średnią 0,23. Wartości współczynnika względnego zróżnicowania genetycznego G_{ST} dla analizowanych populacji przedstawia tabela 3.

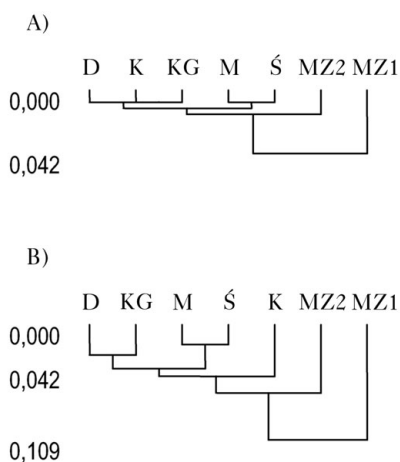
Średni współczynnik G_{ST} dla 9 loci enzymatycznych wynosi 6,1%, całkowitej zmienności genetycznej gatunku, zaś największy z G_{ST} obliczonych dla poszczególnych loci wynosi 10,2% (G6pd).

W celu ustalenia podobieństw genetycznych między badanymi populacjami obliczono indeksy podobieństwa genetycznego Nei'a [Nei 1972], które opierają się na frekwencji alleli i genotypów oraz odległości genetyczne Nei'a i Hedrick'a [Hedrick 1974].

Odległość genetyczna (DN) 10 loci enzymatycznych osiąga wartości 0,008 pomiędzy populacjami: Drawsko, Karnieszewice i Kamienna Góra do 0,04 pomiędzy populacjami Międzyzdroje 1 i 2. W dendrogramie (ryc. 4A) badane populacje tworzą jedną grupę złożoną z populacji, która zróżnicowana jest na dwie podgrupy. Izolowane położenie zajmują populacja Międzyzdroje 2, a największą odrębność wykazuje populacja Międzyzdroje 1.

Najmniejszą wartość (D_h) zanotowano pomiędzy populacjami Miradza i Świebodzina – 0,019, największą była odległość Hedricka między populacjami z Międzyzdrojów 1 i Międzyzdrojów 2 – 0,089.

Dendrogram utworzony na podstawie odległości genetycznych Hedrick'a (ryc. 4B) grupuje analizowane populacje podobnie jak poprzedni dendrogram utworzony dla odległości Nei'a (ryc. 4A). Jedyne różnice dotyczą odległości między populacjami w obrębie wyróżnionych podgrup.



Ryc 4.

Dendrogram oparty na odległościach genetycznych według Nei'a (A), według Hedrick'a (B) A dendrogram based on genetic distance according to Nei (A), Hedrick (B)

Podsumowanie i wnioski

Po raz pierwszy w Polsce wykonano badania nad zmiennością genetyczną naturalnie odnawiających się populacji *Pseudotsuga menziesii* na ośmiu systemach enzymatycznych (Dia, G6pd, Got, Idh, Pgi, Pgm, Sdh, Shdh).

W niniejszej pracy spośród ośmiu badanych loci enzymatycznych dla dwóch: fosfoglukomutazy i transaminazy szczawiooctanowej, zidentyfikowano allele dwóch loci. Sześć loci enzymatycznych charakteryzowało się polimorfizmem genetycznym, co świadczy o trafności w ich doborze.

✱ W populacjach polskich naturalnego odnowienia introdukowanej daglezi nie obserwuje się znaczącego zubożenia puli genowej, kiedy porównamy to ze średnią liczbą alleli na locus odkrywanych w introdukowanych populacjach tego gatunku w Europie.

- ✦ W pięciu polskich populacjach stwierdzono podwyższoną heterozygotyczność (z wyjątkiem populacji: Międzyzdroje 2, Karnieszewice). Dotychczas w europejskich badaniach większość populacji wykazywała przewagę liczebną homozygot.
- ✦ Średnia loci polimorficznych w Europie [Forest i in. 2001] jest zbliżona do wyników uzyskanych w niniejszych badaniach i wynosi 69,4%.
- ✦ Notuje się wysoki poziom heterozygotyczności w naturalnych odnowieniach i nie obserwuje się znaczącego efektu chowu wsobnego, sądząc z wartości współczynnika F w większości badanych odnowień.
- ✦ Największe podobieństwo pod względem struktury genetycznej wykazują populacje z Miradza i Świebodzina, należące do dwóch odrębnych typów [Coastal, Interior].
- ✦ Największą odrębność genetyczną stwierdzono w młodym, 5-letnim odnowieniu populacji Międzyzdroje 1.

Literatura

- Bergman F. 1975. Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24, 5/6: 175-177.
- Bergmann F. 1978. The allelic distribution at an acid phosphatase locus in Norway spruce (*Picea abies*) along climatic gradients. *Theor. Appl. Gen.* 52: 57-64.
- Bzowy P., Nowak-Bzowy R. 1996. Program komputerowy Gen – niepublikowane.
- Chylarecki H. 1976. Badania nad daglezją w Polsce w różnych warunkach ekologicznych. *Arboretum Kórnickie. Rocznik XXI*: 15-117.
- Copes L., D. 1975. Isoenzymic study of dwarf and normal douglas-fir trees. *Bot. Gaz.* 136 (4): 347-352
- Forrest I., Tabbener H., Cottrell J., Connolly T. 2001. The genetic structures of a range of Douglas-fir provenance collections after planting in different European countries, assessed with two biochemical marker systems. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 769-792.
- Hedrick P. W. 1974. Genetic similarity and distance: comments and comparisons. *Evolution* 29, 2: 362-366
- Klimko M., Zygmunt K. 2003. Zróżnicowanie morfologiczne szyszek daglezji zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) w Polsce. *Sylwan* 9: 54-65.
- Krzakowa M., Korczyk A. F. 1995. Enzymatic diversity of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. from the Białowieża Forest. Protection of forest ecosystems biodiversity of Białowieża Primeval Forest. Fundacja Rozwoju SGGW, Warszawa. 67-80.
- Lewandowski A., Filipiak M., Burezyk J. 2001. Genetic variation of *Abies alba* Mill. in polish part of Sudety Mts. *Acta Soc. Bot.* 70:3: 215-219.
- Lewandowski A., Mejnartowicz L., Burezyk J. 1995. Genetic structure of English yew (*Taxus baccata* L.) in the Wierchlas Reserve: implications for genetic conservation. *Forest Ecology and Management* 73: 221-227.
- Matusowa R. 1995. Genetic variation in five populations of silver fir (*Abies alba* Mill.) in Slovakia. *Biologia* 50: 53-59.
- Mejnartowicz L. 1976. Genetic investigations on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) populations. *Arboretum Kórnickie* 21: 125-187.
- Mejnartowicz L. 1979. Genetic variation in some isoenzyme loci in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations. *Arboretum Kórnickie* 24: 91-104.
- Mejnartowicz L., Bergman F. 1977. Variation and genetics of ribonucleases and phosphodiesterases in conifer seeds. *Can. J. Bot.* 55: 711-717.
- Mejnartowicz L. 1997. Rozmnażanie generatywne daglezji zielonej (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Sylwan* 12: 33-45.
- Müller G. 1976. A simple method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. *Silvae Genetica* 25, 1: 15-17.
- Muona O., Szmidt A. E. 1985. A multilocus study of natural populations of *Pinus sylvestris* L. *Notes Biomatch.* 60: 226-240.
- Muona O., Yazdani R., Lindquist G. 1987. Analysis of linkage in *Picea abies*. *Hereditas* 106: 31-36.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-292.
- Nei M. 1975. *Molecular population genetics and evolution*. Elsevier, N. Y.
- Rudin D., Ekberg I. 1978. Linkage studies in *Pinus sylvestris* using macrogametophyte allozymes. *Silvae Genetica* 27: 1-12.
- Szmidt A. E., Yazdani R. 1984. Elektrophoretic studies of genetic polymorphism of shikimate and 6-phosphoglukonate dehydrogenases in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in genetic studies of Scots pine domestication by means of isoenzyme analysis. *Phd Dissertation SUAS, Umea, Sweden*, 6-13.

54 Katarzyna Zygmunt, Małgorzata Klimko

Szmidt A. E., Muona O. 1985. Genetic effects of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) domestication. Lect. Notes Biomath. 60:241-252.

Yang J.-Ch., Ching T. M., Ching K. K. 1977. Isoenzyme variation of coastal Douglas fir I. Astudy if geographic variation in tree enzyme systems. *Silvae Genetica* 26, 1: 10-18.

SUMMARY

Genetic variability of naturally regenerated populations of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco)

The paper presents results of research on genetic variability of 7 naturally regenerated populations of Douglas fir (Międzyzdroje1, 2, Karnieszewice, Drawsko, Miradz, Świebodzin and Kamienna Góra). The study material consisted of winter buds of 30 self-sown seedlings from each population. The variability of 8 enzymes (Dia, G-6-pd, Got, Idh, Pgi, Pgm, Sdh and Shdh) was assessed by starch gel electrophoresis.

The statistical analysis of collected data included allele and genotype frequencies, observed and expected heterozygosity, Wright's inbreeding coefficient, and index of genotype polymorphism.

Genetic differences between the studied populations were analysed by Nei's measure of genetic differentiation as well as Nei's and Hendrick's genetic distances. On the basis of the distances, dendrograms were constructed by means of cluster analysis (UPGMA method).

The results show that in Polish naturally regenerated populations of this introduced species no reduction of the gene pool is observed in comparison with the mean number of alleles per locus in other introduced populations of this species in Europe. A high level of heterozygosity was observed in the self-sown young generation and no substantial inbreeding effect was recorded, considering the F value in most of the studied populations. The young generations in populations originating from south-western Canada (British Columbia), assigned to the coastal (Miradz) or interior (Świebodzin) types, were highly similar to each other in terms of genetic structure. The most distinct was the youngest generation (5 years old), at Międzyzdroje.