

ANDRZEJ LEWANDOWSKI

Ocena wielkości samozapłodnienia u modrzewia polskiego

Lewandowski, A. 1993. Estimation of self-fertilization rate in Polish larch. *Arbor. Kórnickie*, 38: 35–41.

Abstract. Self-fertilization rates were estimated with rare isozyme markers in ten trees from a natural stand of Polish larch. Differences in the levels of selfing rates between trees were found. The average selfing rate (\pm standard deviation) over loci and trees was $9(\pm 2)\%$.

Additional key words: *Larix decidua* subsp. *polonica*, electrophoresis, rare isozyme markers.

Address: A. Lewandowski, Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik, Poland.

Accepted for publication, March 1993.

WSTĘP

Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.) wraz z jego podgatunkiem – modrzewiem polskim (*Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib.) Domin) jest jednym z cenniejszych drzew lasotwórczych w Polsce. Sugeruje się, że występowanie naturalnych populacji modrzewia w formie niewielkich grup rozproszonych drzew oraz posiadanie nietłotnego, pozbawionego komór powietrznych pyłku, może ograniczać swobodny przepływ genów między populacjami oraz sprzyjać dużej wsobności (Mejnartowicz i Bergmann, 1975).

W porównaniu do innych gatunków drzew iglastych, modrzew europejski charakteryzuje się produkcją szczególnie dużej liczby pustych nasion. Przypuszcza się, że jedną z głównych przyczyn tego zjawiska jest samozapłodnienie. Kosiński (1986) badając przyczyny powstawania pustych nasion u modrzewia europejskiego stwierdził, że po kontrolowanym samozapłodnieniu zamiera 85-100% zapłodnionych zalążków. Jednak, jak dotąd, informacje na temat poziomu naturalnego samozapłodnienia dla całego rodzaju *Larix* są bardzo skąpe (Knowles i in., 1987; Lewandowski i in., 1991).

Celem prezentowanej pracy było określenie poziomu samozapłodnienia w nasionach jednej z populacji modrzewia polskiego. Informacja ta, obok walorów poznawczych, ma ważny aspekt praktyczny. W przypadku stwierdzenia w populacji drzew z genetycznie uwarunkowanymi tendencjami do zawiązywania dużej liczby pełnych nasion po samozapłodnieniu, należy zrezygnować z pozyskiwania od nich nasion przeznaczonych do produkcji materiału szkółkarskiego. Ponadto zróżnicowanie drzew pod względem poziomu samozapłodnienia może komplikować analizę danych w testach potomstwa z wolnego zapylenia (Perry i Dancik, 1986).

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były nasiona modrzewia polskiego (*Larix decidua* subsp. *polonia* (Racib.) Domin) zebrane oddzielnie z 23 drzew rosnących na terenie oddziału 133c Leśnictwa Ciechostowice. Zbioru szyszek dokonano w roku 1987, który był dla modrzewia rokiem średniego urodzaju. Populacja, w skład której wchodzi wyżej wymienione drzewa, jest pozostałością jednej z najlepiej udokumentowanych naturalnych populacji modrzewia polskiego na terenie naszego kraju (Kulesza, 1927).

Na wstępie, w celu znalezienia drzew posiadających rzadkie allele, przeanalizowano elektroforetycznie 11 systemów enzymatycznych w ekstraktach z makrogametofitów badanych drzew. Spośród 23 drzew, dziesięć posiadało rzadkie allele w jednym z następujących loci: *gdh*, *mdh1*, *mdh2*, *mdh3*, *shdh*, *srhdh*. Wymienione loci okazały się bardzo dobrymi markerami genetycznymi dla modrzewia europejskiego (Lewandowski i Mejnartowicz, 1990) i posłużyły do wykonania prezentowanej pracy. Dla każdego z 23 drzew zbadano równocześnie makrogametofity i zarodki z 60 nasion powstałych w wyniku wolnego zapylenia.

Z każdego nasiona oddzielano tkankę makrogametofitu od zarodka. Makrogametofit homogenizowano w 35 μ l, a zarodki w 15 μ l buforu homogenizacyjnego Tris-HCl pH 7,2. Do 50 ml buforu homogenizacyjnego dodawano 75 μ l 2-merkptoetanolu i 3 krople Tritonu X-100. Homogenatem nasączano paski bibuły Whatmann 3MM o wymiarach 3 \times 8 mm i наносono na żel. Na każdej płycie z żelem układano po 50 skrawków z białkowych homogenatem.

Elektroforezę ekstraktów z makrogametofitów i zarodków prowadzono w 12% żelu skrobiowym. Do rozdzielu poszczególnych białek enzymatycznych zastosowano dwa systemy buforowe. System I według Ridgeway i in. (1970). Bufor elektrodowy: 0,3 M kwas borowy, 0,06 M wodorotlenek litu, pH 8,2. Bufor żelowy: 0,03 M Tris, 1% buforu elektrodowego, odczyn wyrównany kwasem cytrynowym do wartości pH 8,5. System II według Siciliano i Shaw (1976). Bufor elektrodowy: 0,13 M Tris, 0,043 M kwas cytrynowy,

pH 7,0. Bufor żelowy przygotowywano przez rozcieńczenie buforu elektrodowego wodą destylowaną w stosunku 1:10. Rozdziały elektroforetyczne prowadzono przez 2,5 godziny, stosując prąd o natężeniu ok. 40 mA i napięciu 120 V na jedną płytę żelę dla systemu buforowego I oraz przez 2,5 godziny przy natężeniu prądu ok. 30 mA i napięciu 90 V na jedną płytę żelę dla systemu buforowego II. Do barwienia enzymów zastosowano, z pewnymi modyfikacjami, skład mieszanin barwiących podanych w zbiorczej pracy Cheliak i Pitel (1984). Po barwieniu żełe utrwalano i odczytywano, porównując otrzymane wyniki ze wzorcami. Do oznaczeń enzymów, loci i alleli przyjęto system, który zaproponowali Allendorf i in. (1977) oraz Yeh i O'Malley (1980). Locus, dla którego prążki charakteryzowały się największym tempem migracji podczas trwania elektroforezy, w kierunku anody oznaczono jako 1, następny jako 2 itd. Najczęstszy allel w locus oznaczono wartością 100. Poszczególnym allelom w danym locus przypisywano liczbę wskazującą względną szybkość wędrówki określonej frakcji w elektroforezie, w stosunku do frakcji najczęściej występującej (oznaczonej jako 100).

Liczebność nasion (s) powstałych w wyniku samozapłodnienia oszacowano na podstawie analizy puli wyłącznie żywych nasion. Tak rozumianą wielkość (s) nazwano umownie samozapłodnieniem, zdając sobie sprawę, że jest to wartość zanizona w stosunku do faktycznej wielkości samozapłodnienia. Nie uwzględnia ona między innymi puli pustych i martwych nasion powstałych w wyniku tego procesu.

Do obliczenia wielkości samozapłodnienia (s) posłużono się metodą wykorzystującą rzadkie allele (Müller, 1976; Rudin i in., (1986), gdzie:

$$s = 2(p_m - p_p)$$

p_m – częstość rzadkiego allelu wniesionego przez gamety męskie (pyłek) w zarodkach powstałych w wyniku wolnego zapylenia badanego drzewa, heterozygotycznego pod względem rzadkiego allelu;

p_p – częstość rzadkiego allelu w puli pyłku wyliczona na podstawie analizy zarodków drzew badanej populacji z wyłączeniem zarodków drzew z rzadkim allelem.

W przypadku gdy $p_p \geq p_m$ wartość samozapylenia przyjmowano za równą zero. Wartość odchylenia standardowego wielkości s obliczono według wzoru: $\sqrt{s(1-2s)/N}$ (Adams i Joly, 1980), gdzie N jest liczbą badanych nasion.

WYNIKI I DYSKUSJA

Oszacowana wielkość samozapłodnienia (s) jest różna w zależności od badanego drzewa, wynosząc od 0 dla drzew oznaczonych numerami 1, 2 oraz 23 do 18% dla drzewa 9 i 24 (dla drzewa 24 szacunek na podstawie rzadkiego allelu w locus *Shdh*) (tab. 1). Dwa drzewa, 8 i 24, posiadały rzadkie allele

jednocześnie w dwu loci, odpowiednio: Mdh3 i Shdh oraz Gdh i Shdh. Dla tych drzew możliwym było niezależne obliczenie wartości s z częstości rzadkich alleli dla dwóch różnych loci. Wartości te były identyczne dla drzewa 8 i wynosiły 14%. Natomiast dla drugiego z drzew, oznaczonego numerem 24, wartości te odbiegały od siebie, wynosząc odpowiednio 8% (na podstawie analizy locus Gdh) oraz 18% (na podstawie analizy locus Shdh). Wydaje się, że różnice w oszacowanej wielkości samozapłodnienia, na podstawie analizy locus Gdh i Shdh, dla drzewa 24 wynikają z faktu, że w pobliżu analizowanego drzewa może rosnąć drzewo z rzadkim allelem Shdh-70, co spowodowałoby znaczne zawyżenie obliczonej wielkości samozapłodnienia. Niestety, ze względów finansowych niemożliwym było przebadanie wszystkich drzew w populacji. Obliczona średnia wartość samozapłodnienia na podstawie 12 obserwacji u 10 drzew wyniosła 9% ($\pm 2\%$).

Tabela 1

Obliczone wartości samozapłodnienia: p_m – częstość rzadkiego allelu wniesionego przez pyłek w zarodkach powstałych w wyniku wolnego zapylenia analizowanego drzewa z rzadkim allelem, p_p – częstość rzadkiego allelu w puli pyłku obserwowanej na podstawie analizy zarodków drzew badanej populacji, s – wielkość samozapłodnienia (z odchyleniem standardowym w nawiasach). Estimates of selfing rates: p_m – frequency of marker allele in the pollen cloud for embryos of tree carrying the rare marker allele, p_p – frequency of marker allele in pollen clouds of investigated trees, s – selfing rate (with standard deviation in parentheses).

| Drzewo Tree | Locus | Allel | p_m | p_p | s (SE) |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 1 | Gdh | 85 | 0,00 | 0,04 | 0,00 (0) |
| 2 | Srdh | 85 | 0,00 | 0,02 | 0,00 (0) |
| 3 | Gdh | 85 | 0,05 | 0,04 | 0,02 (0,02) |
| 8 | Mdh3 | 40 | 0,13 | 0,06 | 0,14 (0,04) |
| | Shdh | 70 | 0,10 | 0,03 | 0,14 (0,04) |
| 9 | Mdh2 | 110 | 0,10 | 0,01 | 0,18 (0,04) |
| 13 | Mdh2 | 110 | 0,07 | 0,01 | 0,12 (0,04) |
| 18 | Mdh1 | 125 | 0,10 | 0,07 | 0,06 (0,03) |
| 21 | Mdh1 | 125 | 0,13 | 0,07 | 0,12 (0,04) |
| 23 | Gdh | 85 | 0,02 | 0,04 | 0,00 (0) |
| 24 | Gdh | 85 | 0,08 | 0,04 | 0,08 (0,03) |
| | Shdh | 70 | 0,12 | 0,03 | 0,18 (0,04) |
| średnio (SE): mean | | | | | 0,09 (0,02) |

Wartość ta jest stosunkowo niska i podobna do oszacowanych wielkości samozapłodnienia u innych gatunków drzew iglastych, tym bardziej, że wielkość samozapłodnienia dla poszczególnych gatunków oscyluje niekiedy w dość szerokim zakresie (Müller, 1977; Mitton i in., 1977; El-Kassaby i in., 1981; King i in., 1984; Boyle i Morgenstern, 1986; Perry i Dancik, 1986). Wielkość s obliczona dla pięciu populacji *Larix laricina*

wahała się od 9% do 46%, przy czym populacje o większym zagęszczeniu charakteryzowały się mniejszym samozapłodnieniem (K nowles i in., 1987). Różnice w oszacowaniu wartości s dla poszczególnych gatunków wynikają także z rodzaju zastosowanej metody obliczeń, a wykorzystana w pracy metoda rzadkich alleli powoduje niekiedy dość znaczne zawyżenie oceny samozapłodnienia.

Lew andowski i in. (1991) analizowali wcześniej tę samą partię nasion, wyznaczając współczynniki kojarzenia niekrewniaczego, stwierdzili 6% wartość samozapłodnienia. Oszacowania w prezentowanej pracy metodą rzadkich alleli wielkość samozapłodnienia odbiega tylko nieznacznie od wcześniejszego szacunku i jest kolejnym dowodem na istnienie u modrzewia europejskiego w puli żywych nasion, nasion będących wynikiem samozapylenia.

Zaobserwowane różnice pomiędzy poszczególnymi drzewami pod względem ilości przeżywających nasion, które powstały w rezultacie samozapłodnienia (od 0 do 18%) są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami u modrzewia europejskiego. Drzewo to uważane jest przez większość autorów za prawie samosterylne, dające bardzo mało pełnych nasion po samozapyleniu, przy jednocześnie dużym indywidualnym zróżnicowaniu pod względem tej cechy (Langner, 1951; Gothe, 1952; Kosiński, 1986). Kosiński (1986) badając przyczyny powstania pustych nasion stwierdził, że wśród modrzewi rosnących na plantacji nasiennej w Kórniku, liczba pełnych nasion po kontrolowanym samozapyleniu nie przekraczała w większości przypadków 10%. Obniżona płodność towarzysząca samozapyleniu jest przede wszystkim efektem obciążenia genetycznego, ujawniającego się wskutek homozygotyzacji tak zwanych czynników letalnych, powodujących śmierć zarodków (Kosiński 1986).

Różnice między poszczególnymi drzewami, w wielkości samozapylenia mogą być również wynikiem braku synchronizacji między początkiem pylenia a receptywnością kwiatów żeńskich. Jest prawdopodobnym, że niektóre drzewa, ze względu na różnice między czasem kwitnienia męskiego i żeńskiego, nie mają praktycznie szans na samozapłodnienie, co jest dla gatunku zjawiskiem niezmiernie korzystnym. Niestety, w badanej populacji nie prowadzono obserwacji fenologicznych. Natomiast Kosiński (1986) prowadząc obserwacje fenologiczne w archiwum klonów modrzewia europejskiego na Zwierzynicy stwierdził, że początek pylenia i receptywności kwiatów żeńskich miały miejsce tego samego dnia tylko u dwóch na 29 analizowanych szczeplów.

U modrzewia europejskiego może występować duże samozapylenie spowodowane małą lotnością, pozbawionego komórek powietrznych pyłku. Jednak z powodu braku morfologicznych systemów niezgodnościowych, zapobiegających samozapyleniu i samozapłodnieniu, wystąpienie czynników izolacyjnych o charakterze genetycznym, powoduje dużą śmiertelność zarodków powstałych po samozapłodnieniu, wynikiem czego obserwowana duża liczba pustych nasion (Kosiński, 1986). Pomimo dużej śmiertelności zarodków powstałych w wyniku samozapłodnienia, część z nich przeżywa, stanowiąc średnio w populacji z Ciechostowic 9% całej puli żywych nasion.

STRESZCZENIE

Stosując metodę rzadkich alleli, oszacowano wielkość samozapłodnienia u dziesięciu drzew modrzewia polskiego, pochodzących z populacji Ciechostowice. Stwierdzono różnice pomiędzy drzewami pod względem liczby przeżywających nasion, które powstały w rezultacie samozapłodnienia. Obliczona średnia wartość samozapłodnienia wyniosła $9(\pm 2)\%$.

LITERATURA

- Adams W.T., Joly R.J. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *J. Hered.*, 71: 33-40.
- Allendorf F.W., Mitchell N., Ryman N., Stahl G., 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 86: 179-180.
- Boyle T.J.B., Morgenstern E.K. 1986. Estimates of outcrossing rates in six populations of Black Spruce in central New Brunswick. *Silvae Genet.*, 35: 102-106.
- Cheliak W.M., Pitel J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42 Petawawa National Forestry Institute.
- EL-Kassaby Y.A., Yeh F.C., Sziklai O. 1981. Estimation of the outcrossing rate of Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) using allozyme polymorphism. *Silvae Genet.*, 30: 182-184.
- Gothe H. 1952. Einige Kreuzungsversuch mit *Larix europea* D.C. Herkunft Schilitz und *Larix leptolepis* Gord. *Z. Forstgenetik Fortpflanzenzucht*, 1: 108-110.
- King J.N., Dancik B.P., Dhir N.K. 1984. Genetic structure and mating system of white spruce (*Picea glauca*) in seed production area. *Can. J. For. Res.*, 14: 639-643.
- Knowles P., Furnier G.R., Aleksiuik M., Perry D.J. (1987). Significant levels of self-fertilization in natural populations of tamarack. *Can. J. Bot.*, 65: 1087-1091.
- Kosiński G. 1986. Przyczyny powstawania pustych nasion u modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.). *Arbor. Kórnickie*, 31: 107-182.
- Kulesza W. 1927. Modrzew polski na Górze Chełmowej i w Majdowie pod Skarżyskiem. *Sylwan*, 4: 221-227.
- Langner D. 1951. Kreuzungsversuche mit *Larix europea* D.C. und *Larix leptolepis* Gord. *Z. Forstgenetik Fortpflanzenzucht*, 1: 2-18.
- Lewandowski A., Mejnartowicz L. 1990. Inheritance of allozymes in *Larix decidua* Mill. *Silvae Genet.*, 39: 184-188.
- Lewandowski A., Burczyk J., Mejnartowicz L. 1991. Genetic structure and the mating system in an old stand of Polish larch. *Silvae Genet.*, 40: 75-79.
- Mejnartowicz L., Bergmann F. 1975. Genetic studies on European larch (*Larix decidua* Mill.) employing isoenzyme polymorphism. *Genet. Polon.*, 16: 29-35.
- Mitton J.B., Linhart Y.B., Hamrick J.L., Beckman J.S. 1977. Observation on the genetic structure and mating system of ponderosa pine in the Colorado Front range. *Theor. Appl. Genet.*, 51: 5-13.
- Müller G. 1976. A simple method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. *Silvae Genet.*, 25: 15-17.
- Müller G. 1977. Investigation on the degree of natural self-fertilization in stands of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genet.*, 26: 207-217.

- Perry D.J., Dancik B.P. 1986. Mating system dynamics of Lodgepole Pine in Alberta, Canada. *Silvae Genet.*, 35: 190-195.
- Ridgeway G.J., Sherburne S.W., Lewis R.D. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99: 147-151.
- Rudin D., Muona O., Yazdani R. 1986. Comparison of the mating system of *Pinus sylvestris* in natural stands and seed orchards. *Hereditas*, 104: 15-19.
- Siciliano M.J., Shaw C.R. 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. *Chromatographic and electrophoretic techniques*. Heinemann, London: 185-209.
- Yeh F.Ch., O'Malley D.O. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet.*, 29: 83-92.