

GRZEGORZ KOSIŃSKI

Przyczyny powstawania pustych nasion u modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.)

Abstract

Kosiński, G. 1986. Causes of empty seed formation in European larch. Arbor. Kórnickie 31: 107 - 182.

Empty seed production was studied in clones of European larch growing in the Kórnik seed orchard.

Lack of pollination, disturbances during megasporogenesis, failure of pollen to reach and germinate on the nucellus, and embryo degeneration have been found to contribute to seed degeneration. Failure between pollination and fertilization was similar after open and self-pollination. The percentage of degenerated embryos was much higher after self-pollination, although larch seems to be relatively self-fertile. The genetic load estimated as the number of embryonic lethals is rather low. The great proportion of unsound seed after open pollination could be explain assuming that the few existing embryonic lethals occur throughout the population with a high frequency. This was confirmed by the low enzymatic polymorphism of European larch.

Additional key words: sexual reproduction, genetic load, enzymes polymorphism.

Address: G. Kosiński, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik, Poland.

WSTĘP

Zarówno naturalne zalesianie, jak i to którego dokonuje człowiek, zależą przede wszystkim od możliwości powstawania odpowiedniej ilości pełnych i żywotnych nasion. Również genetycy i hodowcy drzew leśnych są szczególnie zainteresowani produkcją nasion, a ich osiągnięcia we wprowadzaniu do praktyki leśnej nowych, wyselekcjonowanych odmian drzew zależą w dużej mierze od efektywności rozmnażania generatywnego.

Coraz częściej nasiona pozyskuje się na plantacjach nasiennych. Stwarza to nowe możliwości kontroli procesu rozmnażania i powstawania nasion. Dopiero jednak poznanie fizjologii i genetyki tego procesu pozwoli efektywnie wpływać na zwiększenie produkcji pełnych nasion.

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Macieja Giertycha, przedstawiona Wydziałowi Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu.

O obfitości obradzania decydują przede wszystkim obfitość kwitnienia, obumieranie szyszeczek, liczba nasion w szyszce oraz procent pełnych nasion. W porównaniu z innymi gatunkami drzew iglastych modrzew europejski charakteryzuje się produkcją szczególnie dużej liczby pustych nasion. Stąd też celowym wydawało się podjęcie obserwacji zmierzających do szczegółowego poznania procesu rozmnażania generatywnego i w oparciu o te obserwacje ustalenie przyczyn powstawania pustych nasion.

Przedstawione badania objęły przegląd literatury związanej z tematem, obserwacje procesu zapylania, megasporogenezy, zapłodnienia i rozwoju zarodka, a także analizę genetycznych przyczyn powstawania pustych nasion na podstawie wyników kontrolowanego krzyżowania i badań enzymatycznych.

PRZEGLĄD LITERATURY

PRZEBIEG CYKLU ROZMNAŻANIA PŁCIOWEGO MODRZEWA

Zawiązywanie i różnicowanie pędów kwiatowych

Zawiązywanie pąków u modrzewi rozpoczyna się wiosną, na rok przed kwitnieniem, a początkowe fazy rozwoju pąków kwiatowych i liściowych są anatomicznie podobne i zbiegają się w czasie z zakończeniem wydłużania długopędów (Owens i Molder 1979a). U *L. occidentalis* w Kanadzie, po wytworzeniu na przełomie lipca i sierpnia wszystkich łusek okrywowych, zaczynają się tworzyć w pąkach liściowych zawiązki igieł. Równocześnie wierzchołki wzrostu przyszłych pąków kwiatowych powiększają swe rozmiary, a aktywność mitotyczna w komórkach merystemów wierzchołkowych wzrasta kilkakrotnie. W stożkach wzrostu pąków kwiatowych męskich, bez wstępnej inicjacji zawiązków igieł, rozpoczyna się w drugiej połowie czerwca zawiązywanie pręcików, trwające do końca lipca. Na każdym pręciku tworzą się dwa woreczki pyłkowe, w których rozpoczyna się w pierwszej połowie sierpnia różnicowanie komórek macierzystych pyłku.

U podstawy stożków wzrostu pąków kwiatowych żeńskich odkładane są w końcu czerwca najpierw zawiązki igieł, podobnie jak w pąkach liściowych. Na przełomie czerwca i lipca zapoczątkowana zostaje inicjacja łusek wspierających, z których dwie trzecie tworzy się do końca lipca. Później tempo odkładania łusek słabnie, a cały proces ustaje w końcu września. Około połowy sierpnia w pachwinach łusek wspierających zaczynają się różnicować łuski nasienne. Na łuskach powstają następnie zawiązki zalążków, a w każdym z nich tworzy się pojedyncza komórka macierzysta makrospory. W takim stadium pąki kwiatowe żeńskie wchodzą w fazę spoczynku zimowego (Owens i Molder 1979a).

Niestety, brakuje podobnych szczegółowych danych dla *L. decidua*, o którym wiadomo, że jego pąki kwiatowe tworzą się w sierpniu i wrześniu (Barner i Christiansen 1960). Wyniki doświadczeń z różnymi terminami obrączkowania szczytów w Niemczech Zachodnich sugerują jednak, że zawiązywanie i różnicowanie pąków kwiatów u *L. decidua* odbywa się wcześniej, przed końcem czerwca (Melchior 1960).

Mikrosporoogeneza i rozwój pyłku

Jesienią, w roku poprzedzającym kwitnienie, w utworzonych pąkach męskich można wyróżnić pręciki składające się z dwóch woreczków pyłkowych (Owens i Molder 1979b). We wnętrzu woreczków pyłkowych znajdują się komórki macierzyste pyłku, w których zaczyna się jesienią proces mejozy. Istnieje znaczne zróżnicowanie stopnia rozwoju komórek macierzystych pyłku w obrębie poszczególnych pąków kwiatowych, między pąkami na jednej gałęzi, między gałęziami w koronie, a także między poszczególnymi szczepami jednego klonu (Eriksson 1968b). Mniej więcej na przełomie października i listopada mejoza w komórkach macierzystych pyłku osiąga stadium diplotenu (rozproszonych chromosomów), które trwa kilka miesięcy, co jest charakterystyczne dla rodzaju *Larix* (Eriksson 1968b, Hashizume 1973, Hall i Brown 1976, Owens i Molder 1979b). Zdaniem niektórych autorów mejoza w komórkach macierzystych pyłku modrzewi rozpoczyna się dopiero na przełomie lutego i marca (Barner i Christiansen 1960, Christiansen 1960, Chandler i Mavrodineanu 1965). Wydaje się jednak, że przyczyną takich twierdzeń mogą być trudności w zaobserwowaniu rozproszonych chromosomów w fazie diplotenu (Ekberg i inni 1968).

Diploten osiągnąć jest niezależnie od temperatury i związany jest raczej z fotoperiodem (Eriksson i inni 1970), a czas jego trwania zależy od gatunku i położenia geograficznego. U *L. decidua* w Polsce stadium to trwa około 1 – 2 miesięcy, w Szkocji – 3 miesiące (Hall i Brown 1976), a w Szwecji około 5 miesięcy (Eriksson 1968b).

Kolejne stadium mejozy, diakineza, rozpoczyna się, kiedy średnia temperatura dobowa osiągnie około $+5^{\circ}\text{C}$ (Eriksson 1968a). W Polsce diakinezę u *L. decidua* obserwuje się w pierwszej połowie lutego (Górska-Brylasi, dane nie publikowane), a w Szkocji i Szwecji na przełomie lutego i marca, jakkolwiek pojedyncze komórki mogą wejść w diakinezę już w grudniu (Eriksson 1968a, Hall i Brown 1976). Tworzenie tetrady mikrospor począwszy od diakinezy trwa u *L. decidua* w Polsce około półtora miesiąca (Górska-Brylasi, dane nie publikowane), w Szwecji od 10 dni do kilku tygodni (Eriksson 1968b), w Szkocji około 3 tygodnie (Hall i Brown 1976), a w Danii mniej więcej dwa tygodnie (Christiansen 1960).

Czas trwania i tempo przebiegu mejozy w komórkach macierzystych pyłku modrzewi jest zdaniem Sarvasa (1972) ściśle uzależnione od temperatury. Poszczególne stadia mejozy odznaczają się także różną wrażliwością na wahania temperatury. O ile diploten może trwać bez zakłóceń nawet w temperaturach rzędu -30°C , o tyle w późniejszych stadiach mejozy nawet temperatury około 0°C powodują liczne zakłócenia. Główne rodzaje zaburzeń to aberracje chromosomowe (zlepianie się i fragmentacja) oraz zakłócenia w podziale (nieprawidłowe formowanie wrzeciona podziałowego, polisporia, powstawanie uniwalentów). Skutkiem wszystkich tych nieprawidłowości rozwojowych może być utrata zdolności do zapłodnienia nawet przez 92% ziaren pyłku (Ekberg i Eriksson 1967, Eriksson 1968b).

Po tygodniu od zakończenia mejozy tetradą rozpada się i mikrospory otoczone dwiema błonami – egzyną i intyną – przechodzą okres intensywnego powiększa-

nia się i akumulacji skrobi (Owens i Molder 1979b). Obserwacje nad formowaniem się dojrzałego pyłku u modrzewi nie odbiegają od wzoru znanego dla rodzaju *Pinus*. Wskutek dwóch pierwszych podziałów mitotycznych mikrospory oddzielają się dwie soczewkowate komórki przedroślów, otoczone intyną. Kolejny podział prowadzi do powstania mniejszej komórki generatywnej i większej łagiewkowej. Po podziale komórki generatywnej tworzy się mniejsza komórka płona położona nad komórkami przedroślowymi i większa komórka plemnikowa. W ten sposób powstają dojrzałe, pięciokomórkowe ziarna pyłku, obserwowane w woreczkach pyłkowych *L. occidentalis* na około tydzień przed pyleniem (Owens i Molder 1979b). Taką samą budowę ziaren pyłku obserwowano u *L. leptolepis* (Kaji 1974) i *L. decidua* (Kosiński, obserwacje własne). Od przedstawionego wyżej opisu tworzenia ziaren pyłku odbiegają obserwacje Christiansena (1972). Zdaniem tego autora komórka łagiewkowa powstaje jeszcze w stadium tetrady, przed oddzieleniem się komórek przedroślowych, natomiast komórka płona nie powstaje wskutek podziału komórki generatywnej, lecz jest organem utworzonym w następstwie bliżej nie określonych zmian strukturalnych.

Makrosporoogeneza i rozwój gametofitu żeńskiego

Po zakończeniu spoczynku zimowego załążek gwałtownie powiększa się, a wokół ośrodka (nucellus) zaczyna wyodrębniać się osłonka (integumentum). Górna część osłonki wydłuża się i tworzy kanał mikropylarny, zakończony okienkiem (mikropyle), a liczne komórki na szczycie osłonki tworzą jednokomórkowe wyrostki, pełniące funkcję znamienia (Owens i Molder 1979b).

W centrum ośrodka komórka macierzysta makrospory stopniowo powiększa się i gromadzi skrobię. Na skutek podziału mejotycznego powstaje z niej tetradą haploidalnych makrospor. Często zdarza się, że z dwóch komórek powstałych po pierwszym podziale mejotycznym tylko jedna ulega następnemu podziałowi i wówczas tworzą się trzy makrospory (Yokoyama 1973). W dalszym rozwoju dwie lub trzy makrospory znajdujące się od strony mikropylarnej załążka zanikają i zostaje jedna, która daje początek gametofitowi żeńskiemu.

Podziały mejotyczne, w wyniku których powstają haploidalne makrospory, rozpoczynają się tuż przed pękaniem pąków kwiatowych, a najintensywniej przebiegają w czasie pylenia (Yokoyama 1973, Owens i Molder 1979b). W Polsce faza ta przypada w różnych sezonach wegetacyjnych na drugą połowę marca lub na kwiecień (Kosiński, obserwacje własne). Pomiedzy załążkami jednego kwiatu istnieje zróżnicowanie w stopniu zaawansowania mejozy w komórkach macierzystych makrospor (Eriksson 1968b).

Liczne podziały jądra makrospory prowadzą do powstania w ciągu około trzech tygodni wolnojądrowego, wydłużonego przedrośla żeńskiego, po czym następuje podział cytoplazmy i pojawiają się ściany komórkowe. Na mikropylarnym biegunie przedrośla kilka wyróżniających się piramidalnym kształtem komórek powiększa swoją objętość i staje się komórkami inicjalnymi rodni. Rozwijające się rodnie otoczone są warstwą drobnych komórek ściennych (Smólska 1927, Owens i Molder 1979b). Po upływie mniej więcej tygodnia komórka inicjalna rodni dzieli się nierów-

nomiernie, tworząc małą komórkę inicjalną szyjki i dużą komórkę centralną. U *L. decidua* komórka inicjalna szyjki dzieli się dwukrotnie i powstaje czterekomórkowa szyjka (Smólska 1927, Håkansson 1960), podczas gdy u *L. occidentalis* szyjka może być dwu do ośmiokomórkowa (Owens i Molder 1979b). W tym czasie komórka centralna przechodzi okres intensywnego wzrostu, charakteryzujący się silną wakuolizacją cytoplazmy, a następnie dzieli się. Nierównomierny podział powoduje powstanie małej, soczewkowatej komórki kanałowo-brzuszej, często wczesnie zanikającej, oraz dużej komórki jajowej (Smólska 1927). Jądro tej ostatniej powiększa się i przesuwają ku środkowi komórki. W tym stadium komórka jajowa zdolna jest do zapłodnienia. Przeciętnie w jednym przedroślu rozwija się pięć rodni (Favre-Duchartre 1970), a cykl rozwoju rodni od momentu wyodrębnienia się komórki inicjalnej do osiągnięcia stanu zdolności do zapłodnienia trwa u *L. decidua* około 17 dni (Smólska 1927). Rozwój przedrośla od podziału komórki macierzystej makrospory do powstania dojrzałej komórki jajowej trwa u *L. decidua* około 7 tygodni (Smólska 1927, Håkansson 1960), u *L. occidentalis* 6 - 8 tygodni (Owens i Molder 1979b) i u *L. leptolepis* około 6 tygodni (Kaji 1974). Według Smólskiej (1927) oraz Owensa i Molder (1979b) rozwój rodni we wszystkich załączkach jednego drzewa przebiega synchronicznie.

Kwitnienie

Na plantacji nasiennej w Kórniku pylenie *L. decidua* rozpoczyna się na przełomie marca i kwietnia. Pięcioletnie obserwacje kwitnienia szczepów *L. decidua* na plantacji nasiennej w Międzyzlesiu wskazują na znaczną zmienność terminów rozpoczęcia pylenia: od końca marca do pierwszej dekady maja (Korczyk 1975). W okolicach Hradec Kralove (północne Czechy) początek pylenia w różnych latach przesuwa się w zakresie miesiąca: od trzeciej dekady marca do trzeciej dekady kwietnia (Chalupa 1964). Przełom marca i kwietnia jest również porą pylenia u *L. decidua* w Eberswalde (Scamoni 1956) oraz w Wielkiej Brytanii (Matthews 1955). Nieco później zaczyna pylić *L. decidua* we wschodniej i południowej Rumunii – w połowie kwietnia (Tomescu i inni 1967) oraz na Białorusi i Ukrainie – na początku trzeciej dekady kwietnia (Misnik 1976).

Wysypywanie pyłków z woreczków pyłkowych trwa około 10 - 20 dni (Chalupa 1964, Tomescu i inni 1967, Lines 1977), a długość tej fazy uzależniona jest wprost proporcjonalnie od średniej temperatury dobowej okresu pylenia (Chalupa 1964). O ilościach wysypywanego w tym okresie pyłku mówią dane dotyczące *L. leptolepis* w Japonii. Przeciętna liczba ziaren pyłku w jednym woreczku pyłkowym wynosi 821, co przy średniej liczbie 111 woreczków pyłkowych daje $9,11 \times 10^4$ ziaren pyłku wytwarzanych przez jeden kwiat męski (Yokoyama i inni 1978). Ta wielka ilość produkowanego pyłku sprawia, że w okresie maksymalnego nasilenia pylenia w pobliżu pojedynczego kwiatu żeńskiego dociera dziennie 930 - 1670 ziaren pyłku (Yokoyama i inni 1975). Według Dyakowskiej (1936) pyłek *L. decidua* subsp. *polonica* może przemieszczać się na odległość średnio 6,7 km, natomiast Tichomirov (1950) dla *L. sibirica* podaje odległości przenoszenia pyłku sięgające kilkuset kilometrów.

Zapylenie i zapłodnienie

Przed zapyleniem kwiaty żeńskie ustawiają się pionowo, a ich łuski rozchylają się. Między rozchylonymi łuskami wspierającymi i nasiennymi pyłek przedostaje się na znamię, między pokrywające je wyrostki. Na jednym znamieniu znaleziono maksymalnie jedenaście ziaren pyłku. Wskutek intensywnego wydłużania się komórek zewnętrznej części znamienia część pokryta wyrostkami z przytwierdzonymi do nich ziarnami pyłku wepchnięta zostaje do mikropyla, które zostaje potem szczelnie zamknięte. Zamykanie mikropyla następuje niezależnie od obecności pyłku na znamieniu (Barner i Christiansen 1960). Brak płynów wciągających pyłek do mikropyla (jak to ma miejsce w rodzajach *Pinus* i *Picea*) i czysto mechaniczne uwarunkowania przebiegu tego procesu przypominają zapylenie u daglezi (Allen i Owens 1972).

Pyłek pozostaje w szczytowej części kanału mikropylarnego przez 7 - 8 tygodni, zanim przedrośle żeńskie osiągnie stan zdolności do zapłodnienia. Przed skielkowaniem pyłek zostaje przeniesiony na ośrodek dzięki wydzielaniu płynu do kanału mikropylarnego prawdopodobnie przez komórki znajdujące się na szczycie ośrodka (Barner i Christiansen 1960, Kaji 1974, Hall i Brown 1976). U *L. occidentalis* nie stwierdzono obecności płynu w kanale mikropylarnym, a pyłek osiąga szczyt ośrodka pęczniąc i wydłużając się (Owens i Molder 1979b).

Kielkujące na szczycie ośrodka ziarno pyłku wytwarza łagiewkę przerastającą ośrodek (Smólska 1927, Kaji 1974, Owens i Molder 1979b). Do wnętrza łagiewki przemieszczają się cztery jądra: jądro łagiewki, dwie gamety powstałe w wyniku podziału komórki plemnikowej oraz jądro komórki płonej. Łagiewka przechodzi przez komórki szyjki i kanałowo-brzuszną do wnętrza komórki jajowej, gdzie jej zawartość wylewa się do cytoplazmy. Jedna z gamet łączy się z jądrem komórki jajowej, podczas gdy druga wraz z pozostałymi jądrami i cytoplazmą pozostaje w szczytowej części tej komórki (Smólska 1927, Owens i Molder 1979b). Z badań cytologicznych wynika jednak, że przynajmniej część mitochondriów i wszystkie plastydy wchodzące w skład nowo powstałej cytoplazmy pochodzą z łagiewki pyłkowej (Camefort 1968a i b, Favre-Duchartre 1970). We wczesnej fazie rozwoju zygoty, tuż po syngamii, można jeszcze wyróżnić dwie grupy chromosomów: komórki jajowej i plemnikowej (Wóycicki 1923, Smólska 1927). Proces zapłodnienia kończy haploidalną fazę rozwojową, a zygota daje początek sporofitowi miodrzewia.

Rozwój zarodka

Po dwóch kolejnych podziałach mitotycznych jądra zygoty powstają cztery jądra, które przemieszczają się w kierunku podstawy komórki jajowej. Następny podział prowadzi do powstania ośmiojądrowego prazarodka, zbudowanego z dwóch pięter komórek (Schopf 1943). Cztery komórki piętra górnego pozostają otwarte do cytoplazmy komórki jajowej, a dolne tworzą piętro zarodkowe (Owens i Molder 1979b). Komórki górnego piętra dzielą się i powstaje ponownie piętro komórek otwartych do cytoplazmy komórki jajowej oraz piętro komórek rozetowych, które

z czasem zanikają (Schopf 1943, Johansen 1950). Podział komórek piętra zarodkowego prowadzi do powstania dwóch czterekomórkowych pięter: piętra suspensora pierwotnego oraz piętra komórek przyszłego zarodka. W ten sposób kończy się, trwające mniej więcej tydzień, formowanie szesnastokomórkowego prazarodka.

Wydłużanie się komórek piętra suspensora pierwotnego powoduje przesuwanie komórek prazarodka w głąb tkanek przedrośla. Kolejne podziały komórek prazarodka prowadzą do powstania systemu komórek, pełniących funkcję suspensora oraz do formowania zarodka (Schopf 1943). Około trzy tygodnie po zapłodnieniu można już zauważyć w zarodku zróżnicowane organy: widoczny staje się zawiązek pędu, a później zawiązki 4 - 7 liścieni (Johansen 1950). Po około pięciu tygodniach od zapłodnienia widoczne są już zawiązki wszystkich organów przyszłej rośliny (Schopf 1943).

Rozwojowi zarodka towarzyszą liczne zmiany w makrogametoficie i osłonkach. Krople lipoproteinowe i ziarna skrobi, obecne w tkance przedrośla przed zapłodnieniem, we wczesnej fazie rozwoju zarodka zanikają, tworząc jedynie wąskie pasmo wokół jamy zarodkowej. W dalszym rozwoju zarodka krople lipoproteinowe powiększają się, a ilość skrobi ponownie wzrasta (Håkansson 1960, Owens i Molder 1979b).

Środkowa z trzech warstw osłonki gromadzi ziarna skrobi, a ściany komórek z których jest zbudowana grubiej. W dojrzałym nasieniu warstwa ta składa się z 3 - 4 warstw grubościennych komórek „kamiennych”, podczas gdy pozostałe dwie warstwy osłonki zbudowane są z płaskich, cienkościennych komórek (Owens i Molder 1979b).

Poliembrionia

Zapłodnienie większej liczby komórek jajowych w jednym zalążku jest powszechnym zjawiskiem i prowadzi do rozwoju kilku zarodników. Jest to tzw. poliembrionia polizygotyczna (prosta). Z powstałych kilku zarodków dojrzałość osiąga tylko jeden, najczęściej uformowany w pierwszej kolejności, natomiast pozostałe obumierają we wczesnych fazach rozwoju (Schopf 1943, Håkansson 1960, Owens i Molder 1979b).

PROBLEM PUSTYCH NASION U MODRZEWIA

Modrzew europejski wraz z innymi przedstawicielami tego rodzaju należy do gatunków o małej liczbie pełnych nasion. Heikinheimo (1937) podaje, że u modrzewia europejskiego w różnych latach procent pustych nasion waha się od 55 do 94. Również Nilsson (1959) stwierdził, że liczba pustych nasion wynosiła 50%, a nawet więcej. Procent ten na tle 78 - 98-letnich drzewach wahał się od 27,8 do 81,4 (Tompa 1959). Messer (1956) zaobserwował, że procent pustych nasion jest mniejszy w szyszkach zebranych z drzew o małych koronach i zwiększa się od dołu w kierunku ku szczytowi korony. Średnio wahał się od 59,8% do 80,1%. Florescu i inni (1960) stwierdzili, że przy średniej 70,2% pustych nasion, więcej jest ich w najmniejszych szyszkach (86,8% w szyszkach do 1 cm długości), a mniej w szyszkach największych (52,3% w szyszkach długości do 4,5 cm). Šindelář

(1972) badał procent pustych nasion na plantacjach nasiennych w różnym wieku. Na plantacji 4 - 6-letniej wynosił on ponad 80%. Na tej samej plantacji 10 - 11-letniej procent pustych nasion zmalał odpowiednio do 52% i 36%, a po kolejnych dwóch latach wyniósł 57%. Dla porównania na innych plantacjach 13-letnich, w 1970 roku — 58 - 74% nasion było pustych. Na plantacji nasiennej w Kórniku w roku 1979 na ośmiu obserwowanych klonach stwierdzono średnio 58,4% pustych nasion (Kosiński 1981).

Liczba pustych nasion wzrasta znacznie (do 100%) w przypadku samozapylenia (Langner 1951, Gothe 1952, Nilsson 1959, Matthews 1960, Dieckert 1964, Kaji 1974, Katsuta i inni 1979, Kosiński 1981, Park i Fowler 1982).

Podobnie jak w przypadku innych gatunków drzew iglastych, podaje się kilka zasadniczych przyczyn, w różnym stopniu odpowiedzialnych za powstawanie pustych nasion. Pierwszą z nich mogą być zakłócenia w trakcie mejozy komórki macierzystej pyłku, powodujące utratę zdolności ziaren pyłku do zapłodnienia komórki jajowej (Christiansen 1960, Chandler i Mavrodineanu 1965, Ekberg i Eriksson 1967, Hall i Brown 1977). Kolejną z najczęściej wymienianych przyczyn powstawania pustych nasion jest brak zapylenia, nawet u ponad 50% załączków (Dieckert 1964, Kaji 1974, Šindelař 1972, Hall i Brown 1976, Owens i Molder 1979b, Dong Kwang Jo i inni 1984). W przypadku gdy zapylenie miało miejsce, liczba pustych nasion może ulec zwiększeniu wskutek braku przemieszczania pyłku z kanału mikropylarnego na szczyt ośrodka (Doyle i O'leary 1935, Hall i Brown 1977). Prawdopodobnie jest to spowodowane przesychnieniem kanału mikropylarnego wskutek niekorzystnych warunków atmosferycznych (Barner i Christiansen 1960). Wreszcie jako ostatnią z najważniejszych przyczyn powstawania pustych nasion u modrzewia, wymienia się zakłócenia objawiające się po zapłodnieniu, a powodujące śmierć prazarodka lub zarodka we wczesnych fazach rozwoju. Zakłócenia te są efektem negatywnego obciążenia genetycznego, ujawniającego się wskutek homozygotyzacji genów letalnych (Håkansson 1960, Kaji 1974, Hall i Brown 1976, Kosiński 1981). Ma to miejsce szczególnie w przypadku samozapylenia.

W większości cytowanych prac, wszystkie czynniki wpływające na powstawanie pustych nasion omawiane były pojedynczo. Tylko Hall i Brown (1977) podjęli próbę ustalenia wpływu zapylenia, kiełkowania ziaren pyłku i degeneracji zarodków, na tym samym wybranym materiale, obejmującym po jednym klonie modrzewia europejskiego i japońskiego. Uzyskany w ten sposób oczekiwany procent pustych nasion zbliżony był do obserwowanego procentu niekiełkujących nasion.

Na koniec trzeba zaznaczyć, że obok przyczyn natury fizjologicznej i genetycznej, na powstawanie pustych nasion wpływać mogą również uszkodzenia wywołane żerem owadów.

OBCIĄŻENIE GENETYCZNE

Termin obciążenie genetyczne (genetic load) wprowadzony został przez Mullera (1950) i początkowo odnosił się tylko do obciążenia negatywnego, polegającego na upośledzeniu zdolności przystosowawczych osobnika bądź populacji w stosunku

do teoretycznej wartości optymalnej. Upośledzenie to manifestowało się wskutek istnienia genów (czynników) o niekorzystnym oddziaływaniu — letalnych, semiletalnych i subletalnych. Później obciążenie genetyczne uznane zostało za jeden z najważniejszych czynników utrzymujących zmienność genetyczną zarówno u roślin, jak i u zwierząt.

Z punktu widzenia powstawania pustych nasion u drzew iglastych — w tym u modrzewia — szczególnie interesującym jest tak zwane obciążenie segregacyjne, inaczej obciążenie homozygot (segregational load = homozygote disadvantage load). Powodowane ono jest utrzymywaniem się w populacji niepożądanych genów w heterozygotach. Pojawiające się wtedy homozygoty pod względem takich genów są eliminowane.

Puste nasiona powstają u iglastych z różnych przyczyn, między innymi wskutek braku zapylenia, uszkodzeń spowodowanych przez owady bądź niekorzystne warunki atmosferyczne. Ponieważ jednak jak stwierdza Koski (1973), proporcja pustych nasion jest największa po samozapyleniu, sugeruje to, że czynniki genetyczne są najważniejszymi przyczynami ich powstawania. Działanie tych czynników ujawnia się dopiero we wczesnych etapach rozwoju zarodka. Zasadniczo na trzy sposoby interpretuje się przyczyny prowadzące do śmierci zarodków, a przez to do powstawania pustych nasion. Stern (1968) wskazuje na możliwość istnienia systemu niezgodności (incompatibility) zarodka i prabielpa. Sorensen (1971) sugeruje występowanie tak zwanych „równoważników letalności” (lethal equivalents), odpowiadających w pełni letalnemu genom bądź nagromadzeniu genów szkodliwych, których wpływ jest równy wpływowi jednego letalnego. Podczas samozapłodnienia w zygocie następuje „wzbogacenie” efektu genów szkodliwych, a ich połączone działanie powoduje śmierć osobnika. Trzecią możliwość, która nie zakłada istnienia faktycznych genów „letalnych”, wprowadził Koski (1971). Zgodnie z tą teorią, tak zwane zarodkowe czynniki letalne (embryonic lethals) mogą być lukami bądź błędami w całym kodzie koniecznym dla rozwoju zarodka. W stanie homozygotycznym błędy te powodują, że rozwój zarodka nie może być kontynuowany poza pewne stadium krytyczne i wówczas następuje śmierć tego osobnika. Hall i Brown (1977) w swoich badaniach nad *Larix decidua* i *L. leptolepis* stwierdzili, że te krytyczne stadia mają miejsce we wczesnych fazach rozwoju zarodka. Działanie czynników letalnych mogłoby wówczas negatywnie wpływać na wzrost suspensora bądź wykorzystanie syntetyzowanych w prabielpie substancji potrzebnych dla rozwoju zarodka.

Ostatnia z przedstawionych alternatyw stanowiła podstawowe założenie dla oszacowania liczby czynników letalnych w heterozygotycznym osobniku, na podstawie procentu pustych nasion powstałych po samozapyleniu. Obliczenia tych wartości dokonali niezależnie Bramlett i Popham (1971) oraz Koski (1971), a uzupełnili Lindgren (1975) oraz Bishir i Pepper (1977). Model obliczeń zakłada, że prawdopodobieństwo powstania pustych nasion zależy od liczby recesywnych czynników letalnych — n ; liczby zapłodnień w zalążku — k ; oraz od liczby czynników letalnych znajdujących się w poszczególnej żeńskiej gamecie — i , przy czym gdy $n > 1$, ma miejsce niezależna segregacja. W takim przypadku dla każdej gamety żeńskiej w zalążku

możliwe jest 2^n genetycznie różnych gamet męskich. Z tego $2^{(n-i)}$ da w rezultacie pełne nasiona po połączeniu się gamet. Ponieważ u większości drzew iglastych często występuje zapłodnienie więcej niż jednej z kilku genetycznie identycznych żeńskich gamet w jednym zalążku, można więc otrzymać k zestawów różnych kombinacji gamet. W takim przypadku, w każdym zalążku w którym doszło do zapłodnienia więcej niż jednej gamety żeńskiej, otrzymamy $(2^n - 2^{(n-i)})^k$ możliwych kombinacji gamet męskich, których efektem będzie śmierć zarodków i powstanie pustych nasion.

Jednocześnie jest $\binom{n}{i}$ możliwych kombinacji aby otrzymać zalążki, które mają gamety żeńskie z i czynnikami letalnymi. Połączenie tej ostatniej wartości z liczbą kombinacji gamet męskich, których efektem jest powstanie z zalążka pustego nasiona $(2^n - 2^{(n-i)})^k$ daje liczbę sposobów powstawania pustego nasiona z tak zapłodnionego zalążka. Przy czym i nie może równać się zero, bo w takim przypadku powstają tylko pełne nasiona. Sumując przez wszystkie pozostałe wartości i od $i=1$, $\sum_{i=1}^n \binom{n}{i} (2^n - 2^{(n-i)})^k$ daje całkowitą liczbę kombinacji, po których wystąpią puste nasiona.

W przypadku wielokrotnego zapłodnienia, będzie 2^{nk} możliwych kombinacji męskich gamet w każdym zapłodnieniu i 2^n różnych genetycznie żeńskich gamet. W ten sposób całkowita ilość genetycznie różnych zalążków po zapłodnieniu wyniesie $2^{nk} \times 2^n (= 2^{nk+n})$. Gdy liczbę zalążków, które dają puste nasiona podzielimy przez liczbę wszystkich możliwych kombinacji zalążków, otrzymamy prawdopodobieństwo powstania pustych nasion:

$$P_n(k) = \frac{\sum_{i=1}^n \binom{n}{i} (2^n - 2^{(n-i)})^k}{2^{(nk+n)}} \quad (\text{Bramlett i Popham 1971}).$$

W wyniku prostych przekształceń części przedstawionego wzoru –

$$\frac{(2^n - 2^{(n-i)})^k}{2^{(nk+n)}} = \frac{\left(2^n - \frac{2^n}{2^i}\right)^k}{2^{nk} 2^n} = \frac{\left(2^n \left(1 - \frac{1}{2^i}\right)\right)^k}{2^{nk} 2^n} = \frac{2^{nk} (1 - 2^{-i})^k}{2^{nk} 2^n} = \frac{(1 - 2^{-i})^k}{2^n} = \frac{1}{2^n} (1 - 2^{-i})^k$$

otrzymać można wzór Koskiego (1971):

$$P_n(k) = \frac{1}{2^n} \sum_{i=1}^n \binom{n}{i} (1 - 2^{-i})^k.$$

W badaniach nad rozmiarami obciążenia genetycznego mierzonego liczbą czynników letalnych, stosuje się również wzór Mortona i innych (1956):

$$2B = -4 \ln R,$$

gdzie: B – średnia liczba czynników letalnych w gamecie,
 $2B$ – średnia liczba czynników letalnych w zygocie,
 R – relatywna samopłodność.

Równanie to oparte jest na założeniu występowania w załączku jednej zygoty, może więc prowadzić do zaniżenia liczby czynników letalnych w związku z występującą powszechnie poliembrionią u drzew iglastych, w tym u modrzewia.

Jak do tej pory niewiele jest prac dotyczących występowania czynników letalnych u drzew leśnych, a ich rezultaty przedstawiono w tabeli 1. Porównanie tych wyników trzeba jednak traktować z pewnym przybliżeniem ze względu na stosowane różne metody obliczania liczby czynników letalnych. Ponadto, oprócz różnic wynikających z różnych metod obliczeń, na wartość liczby czynników letalnych wpływać może pochodzenie analizowanych drzew. Jeżeli rosły one na skraju występowania gatunku, gdzie populacje są niewielkie, wsobność może prowadzić do zmniejszenia obciążenia genetycznego w stosunku do populacji centralnych tego samego gatunku (King i inni 1970).

Tabela 1

Liczba zarodkowych czynników (równoważników) letalnych obliczana wg wzoru Mortona i innych (1956) – (I) oraz Koskiego (1971) i Bramletta i Pophama (1971) – (II)
Number of embryonic lethals (lethal equivalents) estimated from formule by Morton et al. (1956) – I or Koski (1971), and Bramlett and Popham (1981) – II

Gatunek Species	Czynników letalnych Embryonic lethals		Autor References
	I	II	
<i>Abies procera</i>		1,8/3,4*	Sorensen i inni 1976
<i>Larix decidua</i>		4,8	Kosiński 1981
<i>Larix laricina</i>	10,8		Park i Fowler 1982
<i>Picea abies</i>		9,6	Koski 1973
<i>Picea glauca</i>	5,9		na podst. King i inni 1970
„	8,7		Coles i Fowler 1976
<i>Picea mariana</i>	4,7	6,6	Park i Fowler 1984
<i>Picea omorica</i>		4,7	Koski 1973
<i>Pinus banksiana</i>		5,4	Koski 1971 (na podst. wyników Fowlera 1965b)
<i>Pinus peuce</i>		3,1	Koski 1973
<i>Pinus silvestris</i>		9,4	Koski 1971
„		8,9	Koski 1973
<i>Pinus taeda</i>	8,5		Franklin 1970, 1971
<i>Pinus virginiana</i>		10,4	Bramlett i Pepper 1974
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	10,0		Sorensen 1969
„	10,4		Sorensen 1971

* – obliczone odpowiednio dla 1 i 2 zarodków w załączku

– estimated for 1 and 2 embryos/ovules respectively

Warto na koniec dodać, że system czynników letalnych zarodkowo u drzew iglastych jest prawdopodobnie funkcjonalnym substytutem dla systemu samonie-zgodności (self-incompatibility) obserwowanego u *Angiospermae* (Koski 1971). Jego znaczenie polegałoby więc na wczesnym eliminowaniu niekorzystnych konsekwencji wsobności u drzew.

POLIMORFIZM ENZYMATYCZNY MODRZEWIA

Zapoczątkowane pod koniec lat sześćdziesiątych badania wykorzystujące analizy zmienności białek enzymatycznych dla potrzeb genetyki drzew leśnych, rozwinęły się szczególnie intensywnie w ostatnich latach. Obejmują one badania nad dziedziczeniem różnych systemów enzymatycznych, strukturą genetyczną oraz pro-

cesami genetycznymi zachodzącymi w populacji drzew, a także prace uwzględniające możliwości wykorzystania markerów enzymatycznych w praktyce hodowlanej. Bogaty przegląd prac dotyczących zmienności enzymatycznej drzew leśnych przedstawił Prus-Głowacki (1982).

Metody enzymatyczne były dotychczas w niewielkim stopniu stosowane w badaniach genetycznych u modrzewi. Do tej pory znane mi są tylko trzy publikacje dotyczące zmienności peroksydazy i esterazy w igłach modrzewia japońskiego, dahurskiego i syberyjskiego (Mikami 1973, Larionova 1979, Larionova i Miljutin 1981), oraz dwie dalsze dotyczące zmienności kwaśnej fosfatazy, leucyno-amino-peptydazy i esterazy w haploidalnych tkankach megagametofitu modrzewia europejskiego (Mejnartowicz i Bergmann 1975, Kosiński i Szmidt 1984). Wykorzystanie haploidalnej tkanki megagametofitu umożliwia szczegółową genetyczną analizę zmienności wspomnianych enzymów. Stosując metodę horizontalnej elektroforezy na żelu skrobiowym, Mejnartowicz i Bergmann (1975) zaobserwowali dwie strefy (*loci*) z dwoma i trzema allelami leucyno-amino-peptydazy, oraz cztery strefy kwaśnej fosfatazy, z których jedna wykazywała cztery allele. Kosiński i Szmidt (1984) wykorzystując metodę ogniskowania w punkcie izoelektrycznym, wykazali istnienie tylko jednej monomorficznej strefy kwaśnej fosfatazy, oraz co najmniej cztery strefy esterazy, z których w trzech obserwowano pięć, cztery i trzy allele. Zmienność wymienionych enzymów u większości innych gatunków drzew iglastych była większa od prezentowanej u modrzewia. Obserwowano u nich w różnych strefach 1 - 9, a wyjątkowo nawet 15 alleli (np. Lundkvist 1975, 1977, 1979, Mejnartowicz 1979, Witter i Feret 1979, Conkle 1981).

Obserwowana u modrzewia europejskiego mała zmienność enzymatyczna, znajduje swoje odbicie w rozmiarach heterozygotyczności. Mejnartowicz i Bergmann (1975) piszą o znacznej homozygotyczności analizowanej i obserwowanej. Wyliczona przez Kosińskiego i Szmida (1984) na podstawie częstości alleli wartość heterozygotyczności oczekiwanej wyniosła 0,222, a obserwowana tylko 0,125. Obie te wartości były mniejsze niż u wielu innych gatunków drzew iglastych (między innymi Lundkvist 1979, Mejnartowicz 1979, Szmidt 1982). Trzeba tu jednak zaznaczyć, że bezpośrednie porównanie wyników uzyskanych przez różnych autorów może być obciążone błędem, wynikającym z faktu obserwowania różnych *loci* enzymatycznych i stosowania odmiennych metod rozdziału i barwienia.

Analiza genotypów tylko wyjątkowo stosowana była w odniesieniu do badań procesów kwitnienia i obradzenia u roślin. Między innymi Schaal i Levin (1976) wykazali, że kwitnące osobniki *Liatris cylindracea* były częściej heterozygotami niż osobniki niekwitnące. U drzew leśnych, tylko Linhart i inni (1979a, 1981) wykazali dla *Pinus ponderosa* istotne różnice występujące w kilku *loci* między osobnikami produkującymi dużo szyszek a tymi które produkują szyszek mniej. Również Linhart i inni (1979b) stwierdzili brak genetycznych różnic między drzewami produkującymi pyłek a tymi które nie kwitły męsko.

Nie są mi natomiast znane publikacje, nawiązujące do sugerowanego przez Koskiego (1971) związku między liczebnością genów letalnych w populacji a tendencją do utrzymywania heterozygotyczności.

MATERIAŁ I METODY

MATERIAŁ

Obserwacje oraz doświadczenia przeprowadzono na szczepach modrzewia europejskiego rosnących w Archiwum Klonów w Kórniku. Archiwum to, założone w sposób systematyczny (Giertych 1965, 1971), pomyślane było jako modelowa plantacja nasienna. Stąd też jest szczególnie dogodnym miejscem dla przeprowadzenia wszelkich doświadczeń związanych z funkcjonowaniem takich plantacji.

Tabela 2

Numery klonów modrzewia europejskiego wykorzystanych w doświadczeniach wraz z danymi o ich pochodzeniu

List of European larch clones selected for experiments together with information about origin

Nr klonu Clone no.	Kraina geograficzna Geographic region	Nadleśnictwo Forest district
K-02-09	Pojezierze Pomorskie	Mirachowo
K-02-11	„	Kartuzy
K-02-12	„	„
K-02-17	„	Jodłowno
K-02-19	Pojezierze Mazurskie	Ośno
K-08-01	Wielkopolska	Łopuchówko
K-08-02	„	„
K-08-03	„	„
K-10-01	Góry Świętokrzyskie	Bliżyn
K-10-02	„	„
K-10-03	„	„
K-10-07	„	„
K-10-16	„	„
K-10-17	„	„
K-10-25	„	„
K-10-26	„	„
K-10-27	„	„
K-15-16	Sudety	Bystrzyca Kł.
K-15-17	„	„
K-15-19	„	„
K-15-63	„	„
K-15-65	„	„
K-15-72	„	„
K-15-84	„	Pokrzywno
K-15-88	„	Szczytno Śl.

Archiwum założone zostało w roku 1964, na powierzchni 0,80 ha i rosło w nim w momencie rozpoczynania doświadczeń w 1979 roku 397 szczepów reprezentujących 58 klonów. Liczebność szczepów była różna, wahała się od 1 do 17. Stąd też w doświadczeniach wykorzystywano przede wszystkim klony reprezentowane przez większą liczbę powtórzeń. Listę klonów wykorzystanych w przedstawionych badaniach wraz z miejscem ich pochodzenia przedstawiono w tabeli 2.

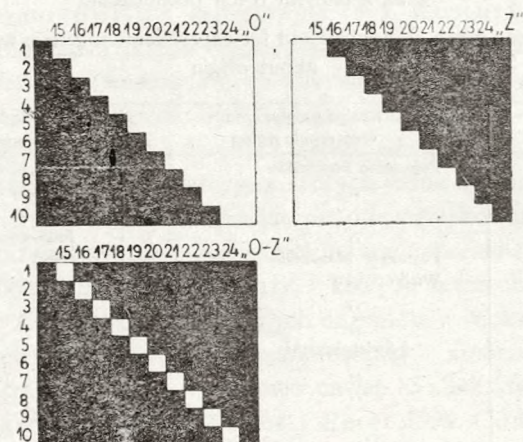
OBSERWACJE FENOLOGII KWITNIENIA

W roku 1983 przeprowadzono obserwacje fenologii kwitnienia na szczepach 11 klonów, wykorzystanych wcześniej w latach 1979 i 1980 do doświadczeń z kontrolowanym krzyżowaniem. Dla każdego z 11 klonów, obserwacje starano się przeprowadzać na 3 szczepach rosnących w różnych miejscach na plantacji nasiennej. Jednak ze względu na brak kwitnienia fenologiczne obserwacje klonów K-02-12 i K-15-63 przeprowadzono tylko na 2 szczepach, a dla klonu K-08-02 tylko na 1 szczepie. Obserwacje prowadzono codziennie przez cały okres kwitnienia. Szczegóło-

wo analizowano dwie fazy: pylenia kwiatów męskich i receptywności kwiatów żeńskich. Za receptywne (gotowe do zapylenia) określano kwiaty żeńskie, których łuski wspierające i nasienne przyjmowały pozycję poziomą. Ponieważ istnieją pewne różnice fenologiczne analizowanych faz w różnych częściach korony szczytu, dla ich uniknięcia obserwacje prowadzono na wszystkich szczytach w pd.-wsch. części korony, na wysokości 2 - 3 m.

SPOSOBY ZAPYLENIA

Wiosną 1980 roku na plantacji nasiennej wybrano po dwa szczyty z trzech obficie kwitnących klonów: K-08-02, K-10-25 i K-15-88. Doświadczenie zaplanowane zostało w trzech różnych wariantach zapylenia na każdym z drzew, a zabiegi przeprowadzono w ciągu 10 dni począwszy od pierwszego dnia pylenia na plantacji. Warianty zapylenia przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Warianty zapylenia; daty przedstawiają dni kwietnia 1980 roku kiedy żeńskie kwiaty były izolowane (zaciemnione) lub izolatory usuwane (niezaciemnione)

Fig. 1. Pollination regimes; dates illustrate the days of April 1980, when female strobili were either bagged (shaded) or not bagged (unshaded)

Warianty zapylenia:

- „O” – wszystkie kwiaty żeńskie zostały zaizolowane przed rozpoczęciem pylenia na plantacji i w kolejnych dniach pylenia na każdym szczycie zdejmowano część izolatorów,
- „Z” – wszystkie kwiaty żeńskie wystawione dla zapylenia; po pierwszym dniu, oraz każdego następnego dnia zakładano izolatory, pozostawiając je do końca okresu pylenia,
- „O - Z” – przed rozpoczęciem pylenia izolowano kwiaty żeńskie; po dwa izolatory na każdym szczycie ściągane były na jeden dzień, a następnego dnia zakładane na te same kwiaty żeńskie i pozostawiane do końca pylenia na plantacji.

W sumie doświadczenie objęło 3 klony \times 2 szczyty \times 30 wariantów zapylenia. Każdy pojedynczy zabieg polegał na założeniu lub zdjęciu dwóch izolatorów w każdym wariantcie, na każdym szczycie. W każdym izolatorze umieszczano co najmniej dwa kwiaty żeńskie, po uprzednim usunięciu kwiatów męskich. Doświadczenie w miarę możliwości przeprowadzono w górnej części korony, aby do minimum ograniczyć możliwości samozapylenia. Jako izolatory stosowano wąż dialityczny. Jesienią zebrane szyszki wysuszone w odrębnych porcjach i wyluszczone ręcznie. Pełne nasiona oddzielano od pustych w 70% etanolu, a wyniki sprawdzano tnąc kilka nasion z każdej próby. Notowano liczbę szyszek oraz liczbę nasion pustych i pełnych. Dla każdego wariantu analizowano liczbę nasion w szyszce oraz procent pełnych w próbce. Ze względu na

brak szyszek w niektórych wariantach (w sumie 28%), wyniki z dwóch szczepów każdego klonu potraktowano wspólnie. Dodatkowo z każdego klonu zebrano po kilka szyszek z wolnego zapylania jako kontrolę i analizowano jak powyżej.

SYSTEMY KONTROLOWANEGO KRZYŻOWANIA

Wiosną 1979 i 1980 roku przeprowadzono kontrolowane krzyżowanie na szczepach 11 klonów modrzewia europejskiego. W każdym roku wybierano po 8 klonów, przy czym 5 z nich krzyżowane były w obu latach. W wyborze klonów do doświadczenia kierowano się przede wszystkim obfitością żeńskiego i męskiego kwitnienia, umożliwiającą wykonanie zaplanowanych kombinacji rodzicielskich. Numery klonów i ich miejsce na plantacji przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Numery klonów modrzewia wybrane do kontrolowanego zapylania wraz z miejscami na plantacji nasiennej

List of larch clones selected for controlled pollination, together with places on seed orchard

Nr klonu Clone no.	Miejsce na plantacji Location				
K-02-11	13-X/1	13-II/11	13-VIII/15		
K-02-12	14-VII/12	13-VIII/5	13-XIII/9	11-IV/4	
K-02-19*	13-IX/12	12-VII/4	11-IV/2		
K-08-02**	14-IX/4	13-VI/2	13-II/7		
K-08-03**	14-I/13	14-V/8	13-VI/1		
K-10-01*	14-XI/9	12-II/4			
K-10-02	13-VIII/8				
K-10-25**	14-VI/11	14-X/6	13-VIII/13	13-III/9	12-II/10
K-10-27**	14-III/5	13-IX/2	13-X/11		
K-15-63*	14-VIII/12	11-V/4			
K-15-88**	14-XII/15	14-III/16			

** - klony krzyżowane w obu latach (clones crossed in both years)

* - klony krzyżowane w 1980 roku (clones crossed in 1980)

nieoznaczone (unmarked) - klony krzyżowane w 1979 roku (clones crossed in 1979)

Kwiatostany żeńskie izolowano w miarę ich rozwoju w dniach 5 - 11 kwietnia 1979 roku i 7 - 10 kwietnia 1980. Przed izolacją usuwano z gałązek wszystkie kwiatostany męskie, a następnie zakładano fliselinowy izolator. W sumie zaizolowano w obu latach 3477 kwiatostanów żeńskich (odpowiednio 1130 i 2347). Z tej liczby około 25% kwiatów uległo zniszczeniu w okresie izolacji, bądź to z powodu obtarcia o ścianki izolatorów, bądź wskutek przemarznięcia.

Pyłek zbierano 12 i 13 kwietnia w 1979 roku oraz 16 i 17 kwietnia w roku 1980, na 1 - 2 dni przed rozpoczęciem pylenia. Zebrany pyłek suszono na bibułach i po wysypaniu oczyszczano przesiewając przez sita. Zebrany do próbek pyłek przechowywano w eksykatorze aby uniknąć zawilgocenia. Kontrolowane zapylanie przeprowadzano w momencie pełnej receptywności kwiatostanów żeńskich 14 - 15 kwietnia w 1979 i 18 - 21 kwietnia w 1980 roku. Pyłek wdychiwano do izolatorów przez igłę od zastrzyków. Do zapylania kwiatów w pojedynczym izolatorze używano około 0,5 - 1 cm³ pyłku. Z mikroskopowych obserwacji wynika, że była to ilość wystarczająca do obfitego zapylania. W miarę możliwości zabieg ten powtarzano w dniach następnych.

Przyjęto system krzyżowania znany w literaturze jako częściowo dialleliczny (ryc. 2). W systemie tym każde z 8 drzew wykorzystane było jako matka i krzyżowane z 4 - 5 pozostałymi jako ojcami, a także zapylane własnym pyłkiem (samozapylanie). System ten uzupełniono o zapylanie mieszaniną pyłków, w której około 1/8 stanowił własny pyłek. Przyjęte systemy krzyżowania pozwalały na określenie roli samozapylania w powstawaniu pustych nasion u modrzewia.

♀ ♂	dialleliczny								mieszanina pyłków
	A	B	C	D	E	F	G	H	A-H
A	S	X		X	X		X	X	X
B	X	S	X		X	X		X	X
C		X	S	X		X	X		X
D	X		X	S	X		X	X	X
E	X	X		X	S	X		X	X
F		X	X		X	S	X		X
G	X		X	X		X	S	X	X
H	X	X		X	X		X	S	X

Ryc. 2. Schemat krzyżowania. S – samozapylenie

Fig. 2. Mating designs employed for controlled crossing. S – self-pollination

Zbrane jesienią szyszki (639 i 1230) uzyskane z kontrolowanego zapylenia, łuszczone ręcznie i otrzymano razem 58049 nasion. Pełne nasiona oddzielano od pustych w 70% etanolu, a wyniki sprawdzano tnąc niewielką próbkę nasion. Otrzymane rezultaty przedstawiono w postaci procentu nasion pełnych.

OBSERWACJE ANATOMICZNE

Metody zbioru, utrwalania i barwienia materiału

Materiał do badań anatomicznych zbierano w latach 1979 i 1980. W roku 1979 żeńskie kwiatostany zbierano w odstępach tygodniowych od mniej więcej połowy fazy pylenia (18.04) kiedy kwiaty były w pełni receptywne, do wykształcenia się w pełni rozwiniętych szyszek (koniec sierpnia). Do doświadczenia wybrano dwa klony K-02-09 i K-15-16. W 1980 roku kwiaty zbierano początkowo również w odstępach tygodniowych (od 25.04), a w okresie kiedy następuje zapłodnienie i wczesny rozwój zarodka, materiał zbierano co 2-3 dni. Doświadczenie rozszerzono o dwa dodatkowe klony K-08-02 i K-08-03.

Materiał zbierano w miarę możliwości z górnej części korony, od strony południowej. Aby doprowadzić do samozapylenia, część kwiatów żeńskich izolowano wraz z kwiatami męskimi, wykorzystując do tego celu wąż dialityczny. Izolatory takie usuwano po okresie pylenia.

Bepośrednio po zbiorze, materiał utrwalano w mieszaninie formalina-etanol-kwas octowy (FAA). Początkowo utrwalano całe kwiaty żeńskie, a od około czwartego tygodnia, rozwijające się szyszczki były cięte i utrwalano tylko łuski nasienne z załączkami, a później same załączki. W utrwalaczu materiał był odpowietrzany w próżni, aby umożliwić lepszą penetrację tkanki przez utrwalacz.

Utrwalony materiał odwadniano w trzeciorzędowym butanolu i zatapiano w parafinie o temp. topnienia 58°C. Przygotowane preparaty cięto na mikrotomie obrotowym, na skrawki o grubości 6-12 μ i przyklepiano do szkiełka przedmiotowego pokrytego lepikiem Haupta (Gerlach 1972). W przypadku późniejszych terminów, przed zatapianiem i cięciem z preparatów usuwano twardą lupinę nasienną, lub po zatopieniu zmiekczano w kwasie siarkowym i barwiono hematoksyliną wg Ehrlicha oraz safraniną 0 (2-24 godzin) i zielenią trwałą lub sporadycznie błękitem anilinowym, do uzyskania odpowiedniego zabarwienia skrawków (Gerlach 1972).

Tak przygotowane preparaty obserwowano w mikroskopie Amplival, a zdjęcia wykonywano wykorzystując automatyczne urządzenie do naświetlania BA 2.

Analiza skuteczności zapyłania

Obserwacje prowadzono w zalążkach od momentu zamknięcia kanału mikropylarnego do pierwszych stadiów rozwoju zarodka, tzn. do momentu kiedy możliwe było cięcie całych zalążków wraz z łupiną nasienną. Pozwalało to notować liczbę zapyłonych zalążków i liczbę pyłków w zalążku.

Rozwój żeńskiego gametofitu

Na preparatach przygotowanych z różnych terminów zbioru kwiatów żeńskich obserwowano pojawienie się kolejnych stadiów rozwoju gametofitu żeńskiego. Od momentu formowania rodni notowano ich liczbę w zalążku. Jednocześnie obserwowano występowanie oraz rozmiary zakłóceń w formowaniu i rozwoju gametofitu.

Zapłodnienie i rozwój zarodka

Obserwacje obejmowały zachowanie się pyłku w zapyłonych zalążkach, liczbę zapłodnionych komórek jajowych oraz formowanie zarodków. Były one podstawą dla określenia rozmiarów i typów poliembrionii, oraz stadiów i rozmiarów degeneracji zarodków po wolnym i samozapyleniu. Przy czym w rozwoju zarodka wyróżniono cztery stadia: prazarodka, wczesnego zarodka (4 - 16-komórkowego), stadium pośrednie (do momentu różnicowania regionów merystematycznych) i późne, obejmujące okres różnicowania regionów merystematycznych i dojrzewania zarodków. Wszystkie obserwacje uwzględniały fenologiczne zróżnicowanie procesu zapłodnienia i rozwoju zarodka dla poszczególnych klonów.

Suma obserwacji skuteczności zapyłania oraz rozmiarów zakłóceń rozwoju gametofitu żeńskiego, zapłodnienia i rozwoju zarodka, stanowiły podstawę dla wyliczenia procentu pełnych nasion, które powinny powstać uwzględniając zakres degeneracji na obserwowanych etapach.

METODY ANALIZY ZMIENNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Metoda ogniskowania w punkcie izoelektrycznym (IEF) wykorzystana została dla analizy zmienności enzymów esterazy (E. C. 3.1.1.2) i kwaśnej fosfatazy (E. C. 3.1.3.2) w nasionach z 24 klonów modrzewia rosnących na plantacji nasiennej (tab. 2). Wybrane klony reprezentowały różne pochodzenia modrzewia europejskiego z Polski, w tym tzw. modrzewia polskiego.

Zebrane nasiona przechowywano w temperaturze -3°C . Z każdego klonu analizowano 10 do 76 nasion. Zwykle 5 - 10 nasion wystarcza dla wykrycia obu alleli w przypadku heterozygotycznych loci (O'Malley i Guries 1991). Ze względu na małą aktywność enzymatyczną, przed analizami nasiona były kiełkowane na bibule do wytworzenia 1 - 3 mm korzonka. Ekstrakty uzyskano z haploidalnej tkanki megagametofitu (niesłusznie zwanej endospermem) skielkowanych nasion, a homogenizację przeprowadzano w podwójnie destylowanej wodzie zawierającej 0,06% 2-merkaptoetanolu. Homogenat nasączano na kawałki bibuły filtracyjnej Whatman 3MM. Rozdział przeprowadzano na 5% żelu akrylamidowym zawierającym 2% Ampholiny pH 3 - 10 dla esterazy i 2,5% Seryalitu pH 3 - 7 w przypadku kwaśnej fosfatazy. 1 M NaOH i 1 M H_3PO_4 służyły jako roztwory anodowe i katodowe. Rozdział przeprowadzano w ciągu 4 godzin przy następujących napięciach: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 i 500 V po 30 min. przy każdym z nich. Temperatura w czasie rozdzielania wynosiła około 12°C .

Esteraza (EST) była barwiona przez 20 min. w temp. pokojowej według metody podanej przez Shaw i Prasad (1970). Dla wybarwienia kwaśnej fosfatazy (APH), żel inkubowano przez 15 min. w 0,2 M buforze octanowym o pH 4,5 i barwiono w roztworze 70 mg kwaśnego fosforanu α -naftyłu oraz 140 mg soli Fast Garnet GBC w 100 ml buforu octanowego o pH 4,5. Wybarwione żele zanurzano w 5% kwasie octowym i utrwalano w glicerynie albo suszono na bibule filtracyjnej.

ZASTOSOWANE METODY MATEMATYCZNE

Obliczanie relatywnej samopłodności

Na podstawie procentu pełnych nasion uzyskanych w wyniku samozapylenia i krzyżowania niekrewniaczego, obliczono relatywną samopłodność, czyli zdolność do zawiązywania pełnych nasion po samozapyleniu. Obliczenia wykonano według wzoru podanego przez Sorensena (1969):

$$RSP = \frac{\text{proporcja pełnych nasion po samozapyleniu}}{\text{proporcja pełnych nasion po zapyleniu krzyżowym}}$$

Relatywną samosterylność obliczano według wzoru:

$$RSS = 1 - RSP$$

Liczba zarodkowych czynników letalnych

Liczba czynników letalnych powodujących w stanie homozygotycznym śmierć zarodka, obliczona została na podstawie wzoru podanego przez Koskiego (1971):

$$P_n(k) = \frac{1}{2^n} \sum_{i=1}^n \binom{n}{i} (1 - 2^{-i})^k,$$

gdzie: $P_n(k)$ – proporcja pustych nasion jako prawdopodobieństwo co najmniej jednego czynnika letalnego będącego w stanie homozygotycznym w każdej zygocie w załączku,

n – liczba czynników letalnych zarodkowo,

k – liczba zapłodnień w jednym załączku w związku z występowaniem poliembrionii.

Wykorzystany przez Koskiego (1971), procent pustych nasion ($P_n(k)$) powstałych w wyniku samozapylenia dla obliczenia prawdopodobieństwa śmierci zarodków wskutek homozygotyzacji co najmniej jednego loci z czynnikami letalnymi, w obliczeniach prezentowanych w tej pracy zastąpiony został relatywną samosterylnością (RSS). Spowodowane to było dużym prawdopodobieństwem powstania pustych nasion u modrzewia niezależnie od homozygotyzacji czynników letalnych. Dla porównania z danymi innych autorów, liczbę czynników letalnych obliczano także według równania Mortona i innych (1956):

$$2B = -4 \ln R,$$

gdzie: B – średnia liczba czynników letalnych w gamecie,

R – relatywna samopłodność (RSP).

Obliczenia heterozygotyczności

W badaniach enzymatycznych genotypy analizowanych drzew określano biorąc 10 nasion z każdego z nich, co zapewnia 99,9% prawdopodobieństwo wykrycia heterozygot.

Zgodność obserwowanej segregacji analizowanych enzymów w stosunku 1 : 1 oczekiwanej dla cech dziedziczących się w sposób Mendelowski sprawdzano używając testu χ^2 (Snedecor 1961). Także test χ^2 używano dla oszacowania heterogeniczności rezultatów dla analizowanych klonów (Mather 1963).

Wartości heterozygotyczności oczekiwanej obliczano na podstawie wzoru Nei i Roychoudry (1974):

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^r h_i / r, \text{ przy czym } h_i = 1 - \sum_{i=1}^a x_i^2,$$

gdzie: h_i – heterozygotyczność w loci i ,

x_i – częstość allelu i ,

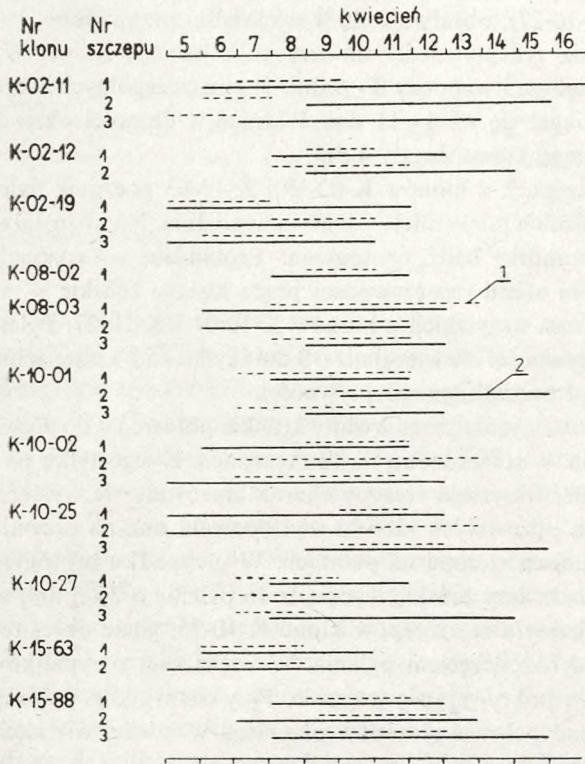
r – liczba badanych loci,

a – liczba alleli w loci i .

WYNIKI

FENOLOGIA KWITNIENIA

Wyniki fenologicznych obserwacji pylenia i receptywności kwiatów żeńskich na szczepach 11 klonów modrzewia europejskiego rosnących na plantacji nasiennej przedstawiono na ryc. 3.



Ryc. 3. Fenologia męskiego (1) i żeńskiego (2) kwitnienia: fazy pylenia i receptywności
Fig. 3. Phenology of male (1) and female (2) flowering: phases of pollination and receptivity

W roku obserwacji, pylenie na szczepach wybranych klonów rozpoczynało się 5 kwietnia. Najwcześniej, bo już w pierwszych 2 - 3 dniach, rozpoczynały pylenie szczepy klonów K-02-11, K-02-19 i K-15-63. Najpóźniej, bo w połowie okresu obserwacji (9 - 11 kwietnia), rozpoczynały pylenie szczepy klonów K-08-02 i K-10-25. W większości przypadków szczepy jednego klonu rozpoczynały pylenie jednocześnie (np. K-15-88), bądź w odstępach najwyżej 1 - 2-dniowych. Długość okresu pylenia na poszczególnych szczepach wahała się od 2 - 7 dni. Różnice w długości trwania pylenia na szczepach jednego klonu nie przekraczały z reguły 1 - 2 dni. Do najkrócej pyjących należały przede wszystkim szczepy klonu K-02-11 (2 - 3 dni). Najdłuższy okres pylenia, sięgający 7 dni, wykazywały szczepy klonu K-10-02. Ostatnie szczepy kończyły pylenie 13 kwietnia.

Podobnie jak pylenie, również początek okresu receptywności kwiatów żeńskich przypadał na 5 kwietnia, ale trwał o 3 dni dłużej – do 16 kwietnia. Gotowość do zapylenia jako pierwsze osiągały szczepy klonów K-02-19, K-10-25 (z wyjątkiem szczepu oznaczonego jako nr 3) i K-15-63, a przypadało to na pierwsze 2 dni całego okresu receptywności na plantacji. Jako ostatnie, o 3 - 4 dni później, receptywność osiągały pojedyncze szczepy z innych klonów (m. in. K-02-12, K-10-01). Obok klonów, na których szczepach kwiaty osiągały zdolność do zapylenia jednego dnia (np. K-02-19 i K-10-27), obserwuje się w większości przypadków 1 - 2-dniowe różnice rozpoczynania receptywności na szczepach jednego klonu. Wyjątkowo tylko różnice te były większe i wynosiły 3 - 4 dni. Na poszczególnych szczepach okres receptywności rozciągał się na 4 - 11 dni. Różnice w długości okresu receptywności na szczepach jednego klonu sięgały 4 dni.

Na dwóch szczepach z klonów K-02-19 i K-15-63 początek pylenia i receptywności kwiatów żeńskich miały miejsce tego samego dnia. Na pozostałych 27 szczepach występowała protandria bądź protogynia. Protandria – rozpoczynanie pylenia przed osiągnięciem stanu receptywności przez kwiaty żeńskie – wystąpiła na 11 szczepach, w tym na wszystkich z klonów K-10-01 i K-10-27. Pylenie wyprzedzało osiągnięcie receptywności nie więcej niż o 3 dni i tylko na 2 szczepach z klonu K-02-11 kończyło się przed początkiem receptywności.

Protogynię – osiąganie przez kwiaty żeńskie gotowości do zapylenia przed rozpoczęciem pylenia – stwierdzono na 16 szczepach. Z tego tylko na dwóch klonach K-10-25 i K-15-88, wszystkie szczepy charakteryzowały się wystąpieniem protogynii. Na szczepach pozostałych klonów występowała ona na przemian z protandrią niezależnie od miejsca szczepu na plantacji. W przypadku protogynii, osiąganie receptywności przez kwiaty żeńskie wyprzedzało pylenie o 2 - 3 dni, wyjątkowo tylko aż do 6 dni, na jednym ze szczepów klonu K-10-25, gdzie okres receptywności zakończył się przed rozpoczęciem pylenia. W większości przypadków, oba zjawiska w różnym stopniu pokrywają się w czasie. Przy czym okres pylenia jest najczęściej krótszy i na ponad połowie szczepów przebiega w całości w trakcie receptywności kwiatów żeńskich.

SPOSOBY ZAPYLANIA A PROCENT PEŁNYCH NASION

Początkowo doświadczenie objęło 180 odrębnych traktowań. Po zbiorze szyszek otrzymano wyniki tylko dla 130. Około 28% uległo zniszczeniu z powodu śmierci kwiatostanów względnie wskutek uszkodzeń spowodowanych w trakcie zabiegów (pęknięcie izolatorów, obłamanie kwiatostanów lub całych pędów). Straty te były mniej więcej równomiernie rozłożone na wszystkie warianty zapyłania.

Stwierdzono duże różnice w liczbie nasion w szyszce pomiędzy poszczególnymi zabiegami w obrębie różnych wariantów zapyłania na analizowanych klonach. Różnice te wahały się od 12 do 71 nasion w szyszce. Średnie wartości dla poszczególnych wariantów zapyłania nie odbiegały znacznie od średniej liczby nasion w szyszkach kontrolnych z wolnego zapylenia. Przeprowadzona analiza zmienności również nie wykazała istotnego wpływu wariantu zapyłania na liczbę nasion w szyszce (tab. 4).

Tabela 4

Analiza zmienności liczby nasion w szyszce i procentu pełnych nasion (po transformacji kątowej) po zastosowaniu różnych wariantów zapylenia (patrz materiał i metody str. 120)
 Variance analysis of seeds per cones and percentages of full seeds (after arcsine transformation) after different pollination regimes (see materials and methods – page 120)

Źródło zmienności Source of variation	Liczba nasion w szyszce Seeds per cone			% nasion pełnych % full seeds		
	St. sw. D. f.	Śr. kwadrat M.S.	F	St. sw. D. f.	Śr. kwadrat M. S.	F
Ogółem Total	11			11		
Zmienne (warianty zapylenia) Variables (pollination regime)	3	8,0	0,45	3	263,37	37,73**
Powtórzenia (klony) Replicates (clones)	2	65,4	3,69	2	44,20	6,33*
Resztowa Residual	6	17,7		6	6,98	

* – 0,05, ** – 0,01 – poziomy istotności
 significance of differences

Główny wynik doświadczenia, określenie procentu pełnych nasion po zastosowaniu różnych wariantów zapylenia przedstawiono w tab. 5 i na ryc. 4 - 6.

Wariant „O”. Wszystkie żeńskie kwiatostany izolowane były przed rozpoczęciem pylenia. Po dwa izolatory na każdym szczepie usuwano dzień po dniu w ciągu 10 dni kiedy miało miejsce pylenie. Dla klonów K-08-02 i K-10-25 stwierdzono wyraźny spadek procentu pełnych nasion w ciągu tego okresu, od ponad 20% po odizolowaniu w pierwszym dniu, do zera po usunięciu izolatorów z żeńskich kwiatostanów w ostatnich dniach (tab. 5, ryc. 4 i 5). Wykreślone proste regresji o parametrach odpowiednio $Y = 18,61 - 2,43x$ i $Y = 21,73 - 2,79x$ wskazują na kumulatywny wpływ długości wystawienia kwiatostanów żeńskich dla pyłku na zawiązywanie pełnych nasion (dla klonu K-10-25 $b = 2,79$ było istotne na poziomie 0,05). Szczególnie ważne dla powstawania dużej liczby pełnych nasion były pierwsze 4 - 5 dni pylenia. Kwiatostany żeńskie wystawione dla zapylenia na ostatnie 5 dni pylenia dawały bardzo mało około 5% lub nie dawały wcale pełnych nasion. Odmienny obraz zanotowano dla klonu K-15-88. Nie stwierdzono wyraźnej relacji między powstawaniem pełnych nasion a długością ekspozycji kwiatów żeńskich (tab. 5, ryc. 6). Najwięcej pełnych nasion w tym klonie otrzymano z szyszek, które dostępne były dla pyłku w ciągu ostatnich trzech dni pylenia.

Wariant „Z”. Wszystkie żeńskie kwiatostany były początkowo dostępne dla pyłku. Po pierwszym dniu, każdego kolejnego dnia izolowano część kwiatostanów do końca trwania doświadczenia. Wariant ten stanowił odwrócenie wariantu „O”.

W wariancie tym, procent pełnych nasion wzrastał gwałtownie od 0 - 3,4% po izolowaniu kwiatostanów po pierwszym dniu pylenia do 17 - 24% po 2 i 3 dniu pylenia i osiągał maksimum (32 - 38%) przy izolowaniu po pierwszych 6 - 7 dniach pylenia. Izolowanie kwiatostanów w trzech ostatnich dniach pylenia spowodowało niespodziewany spadek w liczbie pełnych nasion. Można to wytłumaczyć jedynie „błędem” doświadczalnym, wywołanym izolowaniem kwiatostanów w dniach kiedy pojawiły się opady deszczu i w ten sposób wywołaniem niekorzystnych warunków

ków rozwojowych w izolatorach. Wykreślone dla klonów K-08-02 i K-15-88 proste regresji wykazywały tylko nieznaczny wzrost $Y=12,40+0,61x$ i $Y=12,38+0,80x$, a dla klonu K-10-25 nawet nieznaczny spadek $Y=16,92-0,24x$. Było to przede wszystkim efektem spadku liczby pełnych nasion przy ekspozycji żeńskich kwiatostanów podczas ostatnich 3 - 4 dni pylenia (tab. 5, ryc. 5).

Wariant „O-Z”. Wszystkie kwiatostany żeńskie izolowano przed rozpoczęciem pylenia, a z części z nich zdejmowano izolatory na każdy dzień pylenia. Celem tego

Tabela 5

Liczba nasion w szyszce oraz procent nasion pełnych dla poszczególnych zabiegów w każdym z wariantów zapylenia

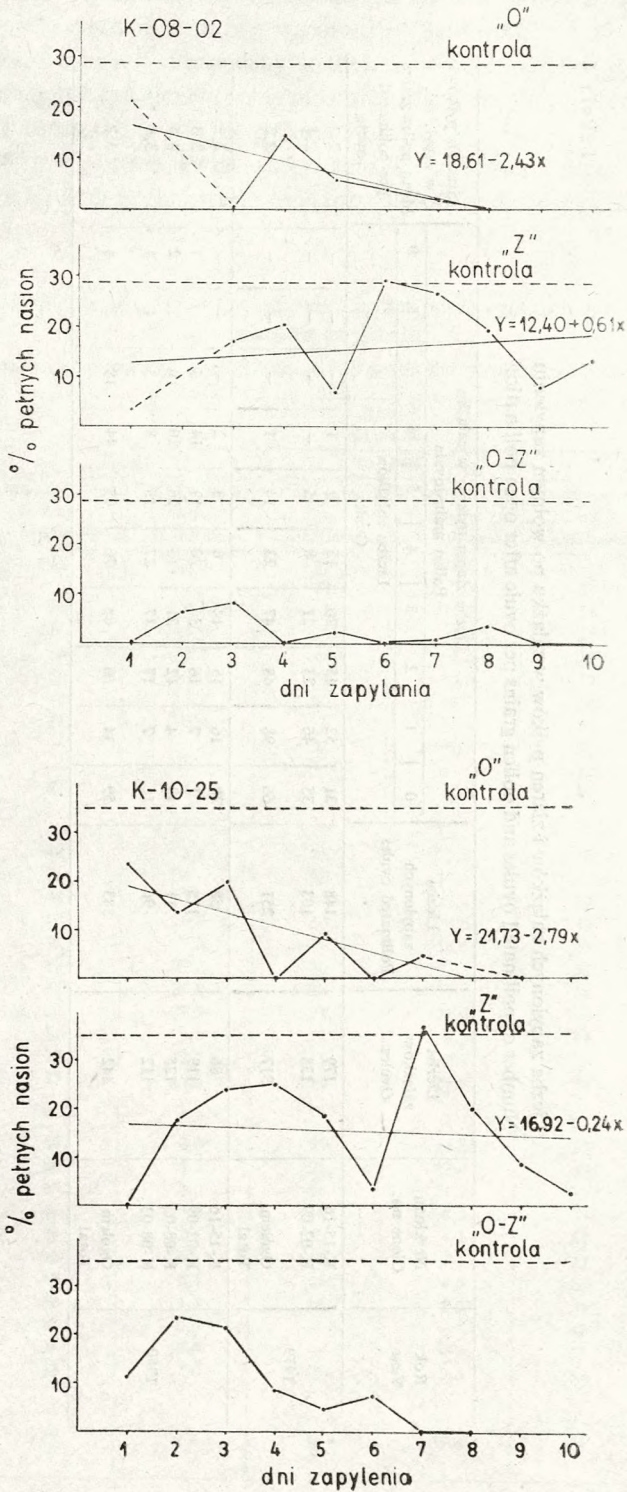
Number of seeds per cone and percentage of full seeds for various pollination regimes

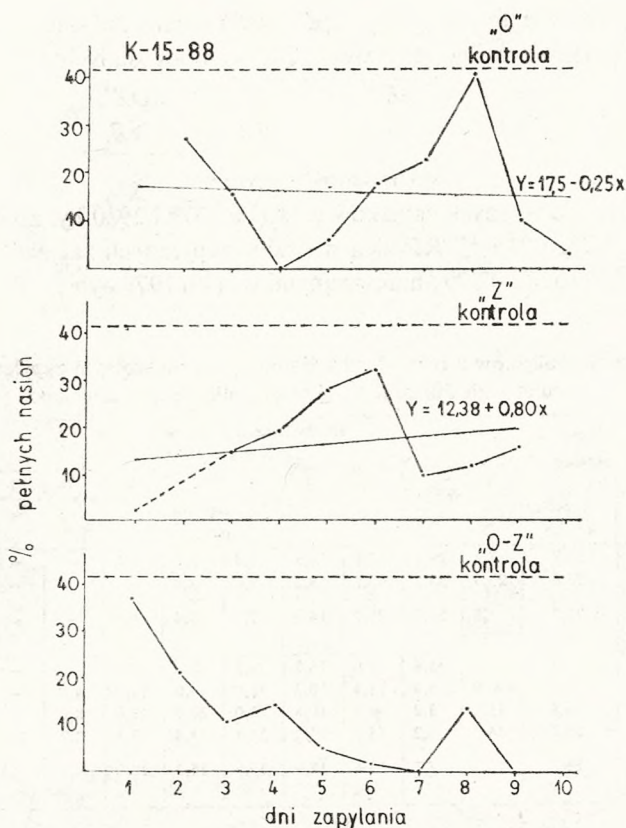
Warianty zapylenia Pollination regimes	Klony Clone no.					
	K-08-02		K-10-25		K-15-88	
	nasion w szyszce seed/cone	% pełnych nasion % full seed	nasion w szyszce seed/cone	% pełnych nasion % full seed	nasion w szyszce seed/cone	% pełnych nasion % full seed
“O” 1	55	21,1	49	23,6	—	—
2	—	—	53	13,7	28	27,3
3	34	0,0	18	20,0	51	15,7
4	48	14,6	24	0,0	35	0,0
5	56	5,8	44	9,2	39	5,8
6	27	3,8	31	0,0	39	18,1
7	42	1,9	53	4,7	59	22,9
8	71	0,0	—	—	22	40,9
9	—	—	52	0,0	30	10,0
10	—	—	—	—	32	3,1
Średnio Mean	47	6,7	40	8,9	37	14,4
“Z” 1	48	3,4	25	0,0	30	2,5
2	—	—	38	17,7	—	—
3	44	17,0	39	23,7	27	14,8
4	49	20,3	50	24,6	45	19,4
5	29	7,0	46	18,5	45	27,9
6	53	29,2	30	3,3	31	32,3
7	41	26,8	29	37,5	36	9,7
8	54	19,3	20	20,0	46	11,7
9	71	7,8	12	8,3	45	15,6
10	35	13,2	41	2,4	—	—
Średnio Mean	47	16,0	33	15,6	38	16,7
“O-Z” 1	50	0,0	52	11,2	32	37,0
2	60	6,2	52	23,4	36	21,1
3	69	8,0	44	21,3	33	10,7
4	44	0,0	48	8,3	35	14,5
5	38	2,1	52	4,8	65	5,0
6	42	0,0	33	7,1	33	1,8
7	69	0,4	47	0,0	28	0,0
8	58	3,4	34	0,0	54	13,4
9	17	0,0	—	—	42	0,0
10	34	0,0	—	—	22	0,0
Średnio Mean	48	2,0	45	9,5	37	10,4
Wolne zapylenie open-poll	42	28,6	38	35,0	44	41,6

Tabela 6

Liczba zapylnych zalążków i ziaren pyłków w zalążku po wolnym zapyleniu
 Number of pollinated ovules and pollen grains per ovule after open pollination

Rok Year	Nr klonu Clone no.	Liczba zalążków Ovules	Liczba zapylnych Pollinated ovules	Liczba ziaren pyłków w zalążku Pollen grains/ovule										Średnio pyłków w zapył. zal. Mean pollen grains per pollinated ovule
				0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
				Liczba zalążków Ovules										
1979	K-15-16	179	148	31	52	45	26	15	9	1	—	—	—	2,2
	K-02-09	138	103	35	46	23	21	8	5	—	—	—	—	2,1
	Ogółem Total	317	251	66	98	68	47	23	14	1	—	—	—	2,2
1980	K-15-16	86	58	28	16	15	14	8	3	2	—	—	—	2,5
	K-02-09	119	118	1	7	16	36	20	19	14	5	—	1	3,8
	K-08-02	125	111	14	4	12	21	15	26	20	10	1	2	4,5
	K-08-03	112	96	16	7	17	17	27	15	8	3	1	1	3,8
	Ogółem Total	442	383	59	34	60	88	70	63	44	18	2	4	3,7





Ryc. 4, 5, 6. Wpływ czasu trwania wolnego zapylania na powstawanie pełnych nasion. „O”, „Z”, „O-Z” – warianty zapylania (patrz rozdział: Sposoby zapylania)

Fig. 4, 5, 6. Mean percentage of filled seed (ordinate) as dependent on days of open pollination (abscissa). „O”, „Z”, „O-Z” – pollination regimes (see fig. 1)

wariantu doświadczenia było ustalenie efektu zapylania przez tylko jeden dzień. Uzyskane wyniki wskazują, że najwięcej pełnych nasion uzyskano przy ekspozycji kwiatostanów żeńskich podczas pierwszych dni pylenia. Procent pełnych nasion był zawsze mniejszy od kontroli z wolnego zapylania (tab. 5, ryc. 4 - 6). W późniejszych dniach procent pełnych nasion malał znacznie we wszystkich klonach, a wyjątek stanowił znaczny wzrost liczby pełnych nasion przy zapylaniu w 8 dniu na klonie K-15-88.

Porównanie wariantów zapylania. Najwięcej pełnych nasion stwierdzono w szyszkach kontrolnych z wolnego zapylania. W tym przypadku kwiatostany żeńskie były najdłużej poddane zapyleniu, a jednocześnie nie podlegały ewentualnie negatywnemu wpływowi izolowania. Wszystkie pozostałe warianty dały niższy procent pełnych nasion, przy czym najmniej było w wariantcie „OZ” (zapylane tylko przez jeden dzień). Analiza wariancji wykazała statystycznie istotny wpływ wariantu zapylania na produkcję pełnych nasion (tab. 4), chociaż test Newmana-Keulsa

wskazuje, że tylko wariant kontrolny i „Z” (kwiatostany żeńskie izolowane po kolejnych dniach pylenia) różnią się istotnie od dwóch pozostałych:

X	„Z”	„O”	„OZ”
35,1	16,2	9,8	6,7

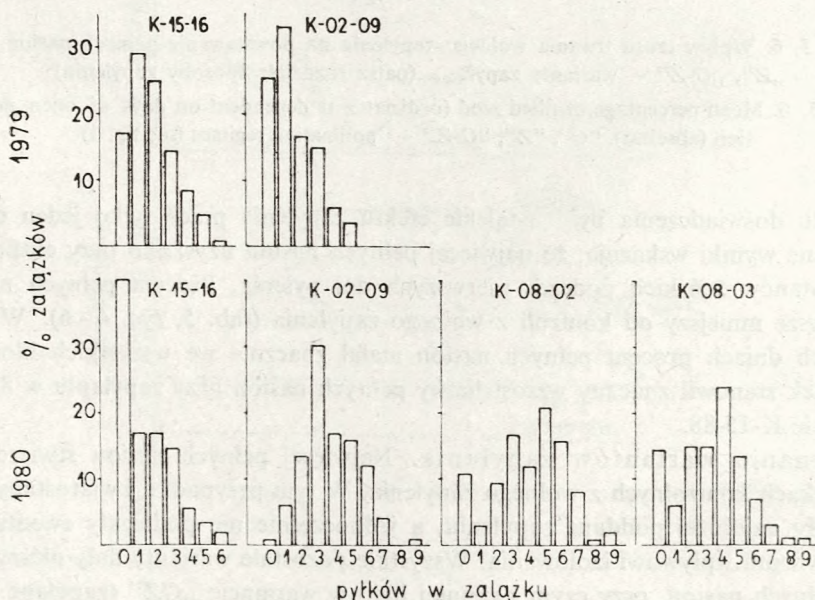
SKUTECZNOŚĆ ZAPYLANIA

Średni procent zapylonych zalążków w latach 1979 i 1980 był zbliżony i wyniósł odpowiednio 79,2% i 84,9%. Różnica w liczbie zapylonych zalążków między dwoma klonami K-15-16 i K-02-09 analizowanymi w roku 1979 była niewielka (odpowie-

Tabela 7

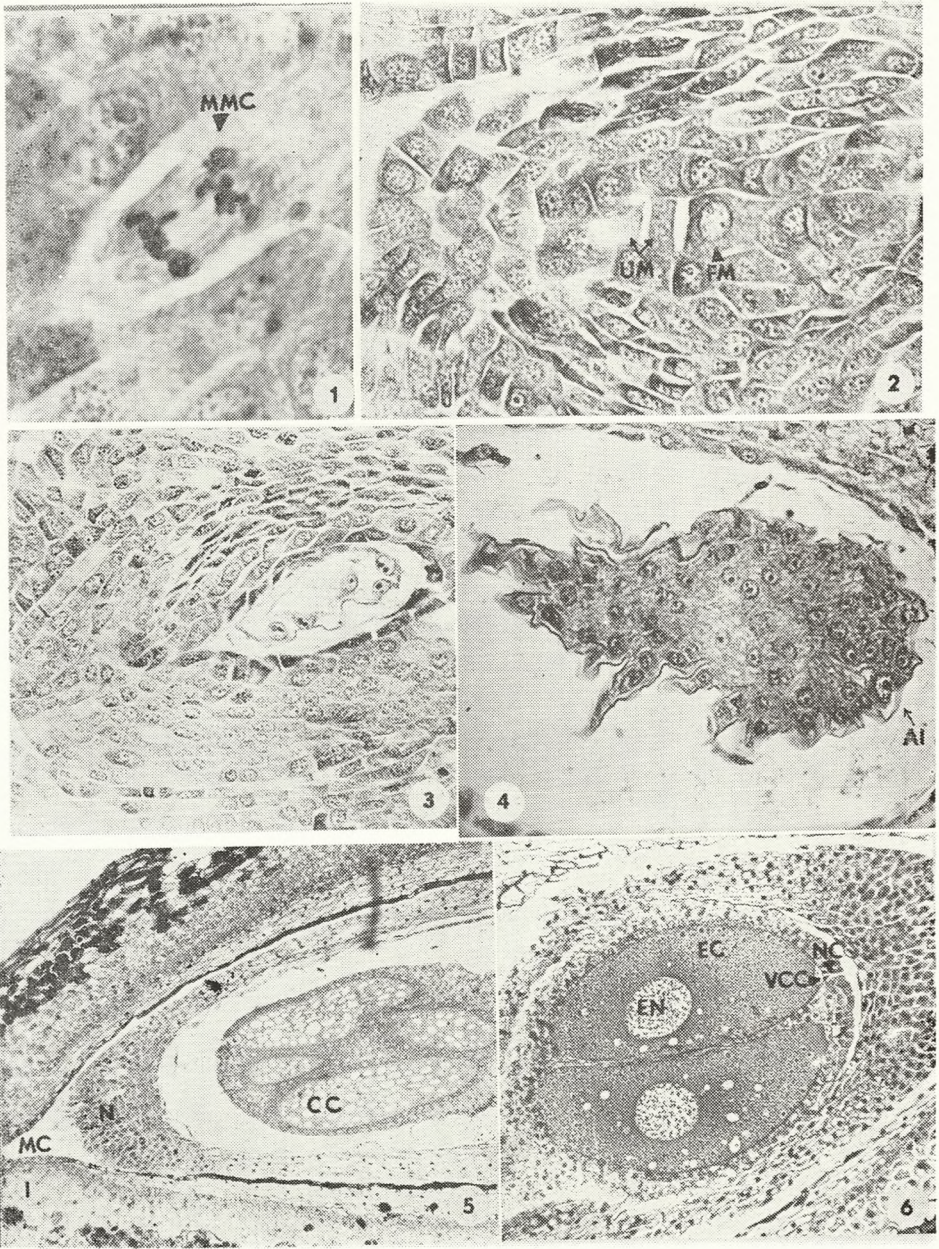
Procent zalążków z różną liczbą ziaren pyłku po wolnym zapyleniu
Percentage of ovules with different number of pollen grains after open pollination

Rok Year	Nr klonu Clone no.	% zapylnych zalążków % poll. ovules	Liczba ziaren pyłku w zalążku Pollen grain/ovule										% pełnych nasion % full seed
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
			% zalążków % ovules										
1979	K-15-16	82,7	17,3	29,1	25,1	14,5	8,4	5,0	0,6	—	—	—	10,4
	K-02-09	74,6	25,4	33,3	16,7	15,2	5,8	3,6	—	—	—	—	23,6
	Średnio	79,2	20,8	30,9	21,5	14,8	7,3	4,4	0,3	—	—	—	
	Mean												
1980	K-15-16	67,4	32,7	18,6	18,6	16,3	9,3	3,5	2,3	—	—	—	15,7
	K-02-09	99,2	0,8	5,9	13,4	30,3	16,8	16,0	11,8	4,2	—	0,8	46,3
	K-08-02	88,8	11,2	3,2	9,6	16,8	12,0	20,8	16,0	8,0	0,8	0,8	28,6
	K-08-03	85,7	14,3	6,2	15,2	15,2	24,1	13,4	7,1	2,7	0,9	0,9	31,2
	Średnio	86,7	13,3	7,7	13,6	19,9	15,8	14,3	10,0	4,1	0,5	0,9	
	Mean												



Ryc. 7. Liczba ziaren pyłku w zalążku

Fig. 7. Number of pollen grains (abscissa) in ovules (ordinate)

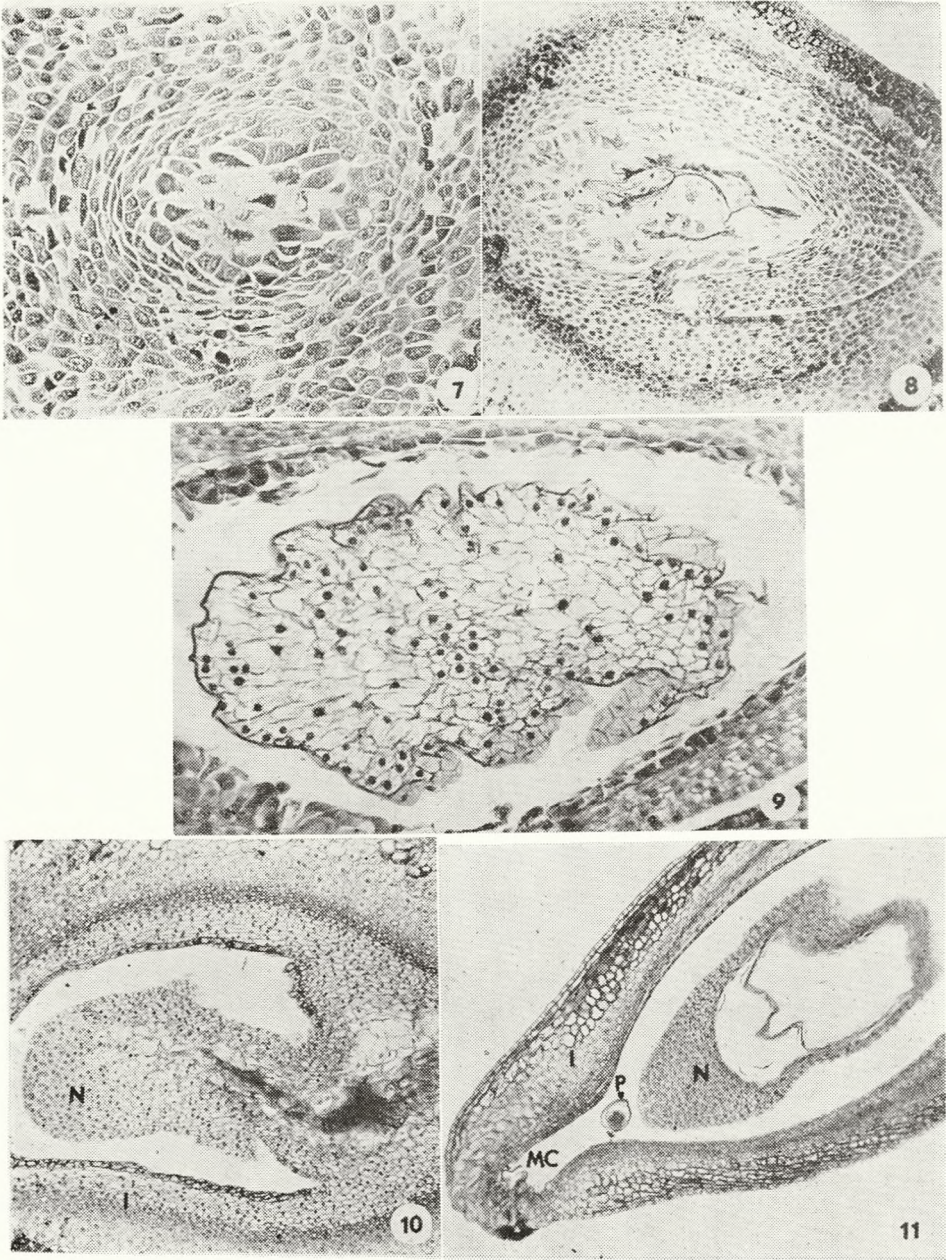


Fot. 1-6. Przekroje poprzeczne przez rozwijające się zalążki

Fot. 1. Komórka macierzysta megaspory (MMC) w anafazie pierwszego podziału mejozy. 25 IV 1980. $\times 1560$. Fot. 2. Trzy megaspory. FM – funkcjonalna megaspory, UM – niefunkcjonalne megaspory. 25 IV 1979. $\times 750$. Fot. 3. Żeński gametofit w stadium wolnojądrowym. 25 IV 1979. $\times 480$. Fot. 4. Formowanie ścian komórkowych w gametoficie żeńskim. Widoczna komórka inicjalna rodni (AI). 16 V 1979. $\times 310$. Fot. 5. Fragment zalążka. I – osłonka, MC – kanał mikropylarny, N – szczyt ośrodka. Widoczna silnie zwakuolizowana cytoplazma 5 komórek centralnych (CC), 23 V 1979. $\times 80$. Fot. 6. Fragment zalążka z dwoma komórkami jajowymi (EC). EN – jądro komórki jajowej, VCC – komórka kanałowo-brzuszna, NC – komórki szyjki. 30 V 1979. $\times 120$.

Fot. 1-6. Longitudinal sections through developing ovules

Fot. 1. Megaspore mother cell (MMC) during anaphase of meiosis. 25 IV 1980. $\times 1560$. Fot. 2. Large functional megaspore (FM) and two unfunclional megaspore (UM). 25 IV 1979. $\times 750$. Fot. 3. Free nuclear stage of female gametophyte. 25 IV 1979. $\times 480$. Fot. 4. Cell wall formation of female gametophyte. AI – archegonial initial, 16 V 1979. $\times 310$. Fot. 5. Developing ovule showing integument (I), micropylar canal (MC), nucellus tip (N) and strongly vacuolized central cells (CC). 23 V 1979. $\times 80$. Fot. 6. Ovule with two visiable egg cells (EC). EN – egg nucleus, VCC – ventral canal cell, NC – neck cells, 30 V 1979. $\times 120$.

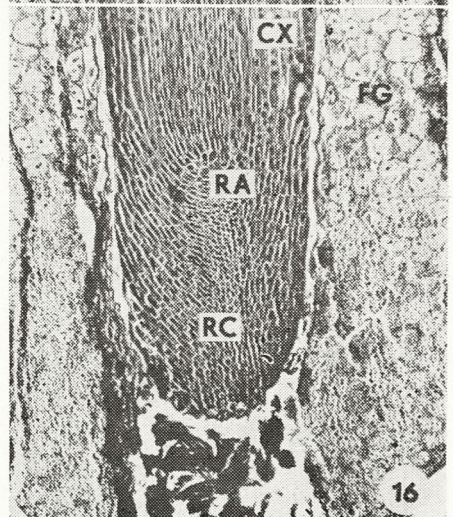
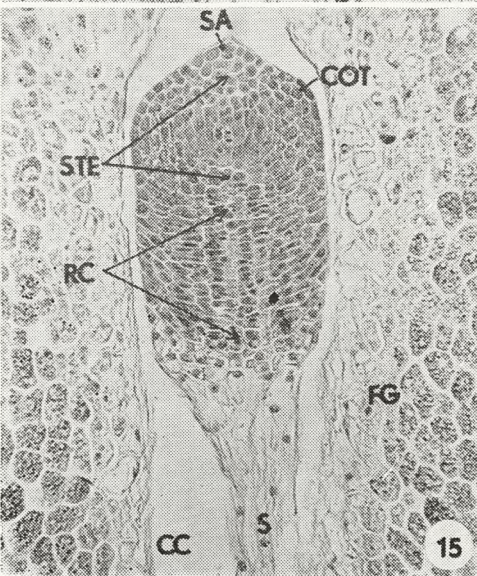
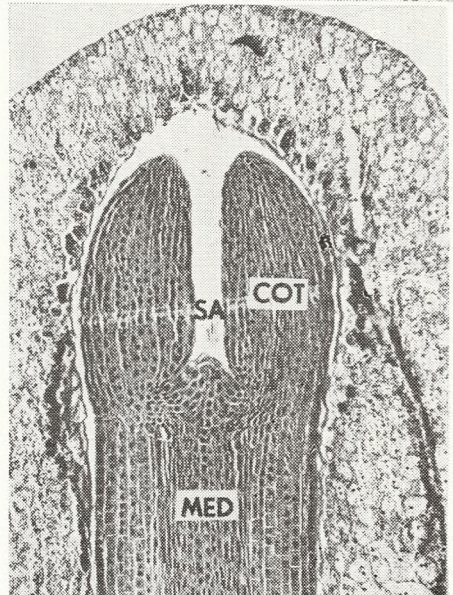
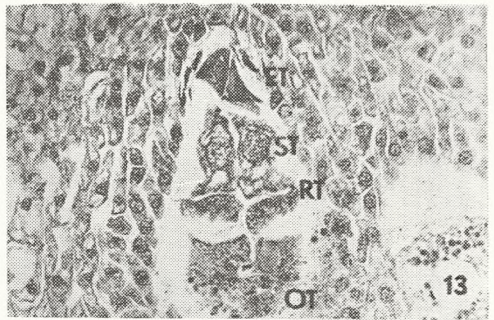
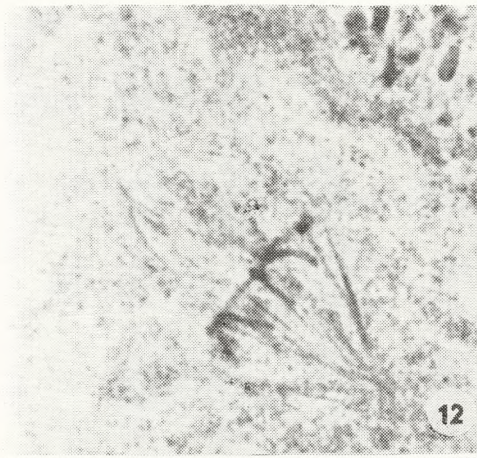


Fot. 7-11. Zakłócenia w rozwoju żeńskiego gametofitu

Fot. 7, 8. Degeneracja gametofitów w stadium wolnych jąder. 2 V 1979 i 9 V 1979. $\times 190$, $\times 120$. Fot. 9. Degeneracja gametofitu na etapie formowania ścian komórkowych. 23 V 1980. $\times 200$. Fot. 10, 11. Nierozwinięte gametofity. I – osłonka, N – ośrodek, MC – kanał mikropylarny, P – pyłek. 7 VI i 9 VI 1980. $\times 75$.

Fot. 7-11. Disturbances in female gametophyte development

Fot. 7, 8. Degeneration of female gametophytes in free nuclear stage. 2 V and 9 V 1979. $\times 190$, $\times 120$. Fot. 9. Female gametophyte degeneration during cell wall formation. 23 V 1980. $\times 200$. Fot. 10, 11. Undeveloped female gametophyte. I – integument, N – nucleus, MC – micropylar canal, P – pollen grain. 7 and 9 VI 1980. $\times 75$

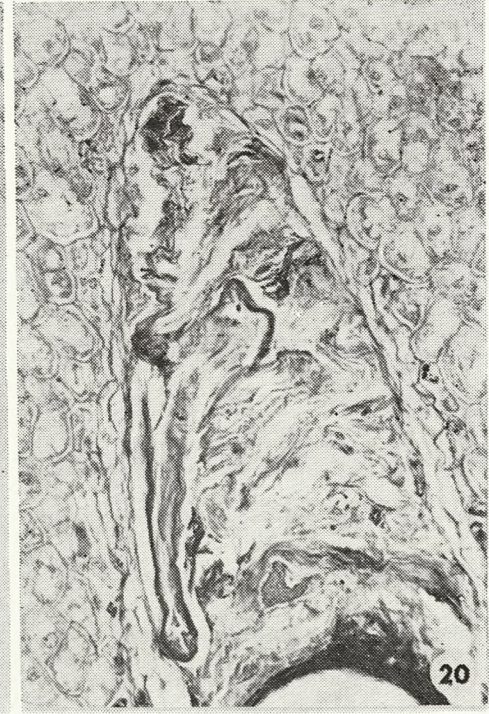
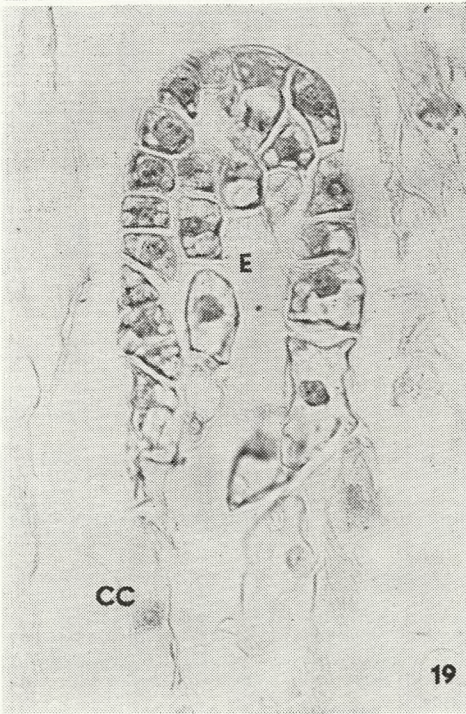
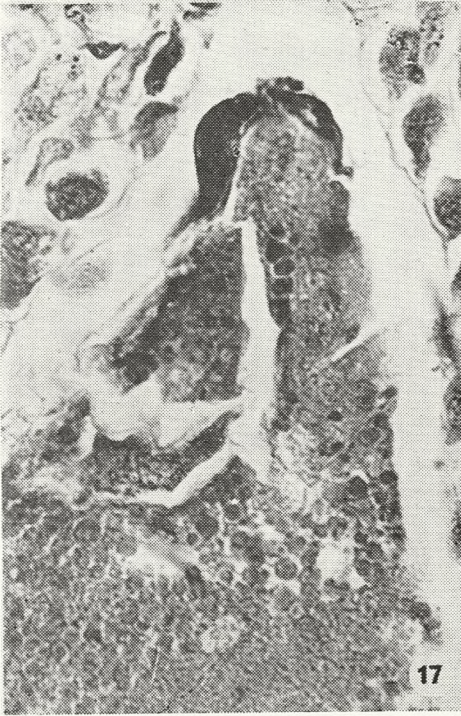


Fot. 12-16. Formowanie i rozwój zarodka

Fot. 12. Zygota w stadium metafazy. 30 V 1979. × 1450. Fot. 13. 16-komórkowy prazarodek. OT – piętro komórek otwartych do rodni, RT – piętro komórek rozetowych, ST – piętro komórek pierwotnego wieszadła, ET – piętro komórek zarodka. 16 VI 1980. × 200. Fot. 14. Zarodek w szczycie szczeliny korozyjnej. Widoczne rurki embrionalne (ET) budujące wieszadło. 13 VI 1979. × 210. Fot. 15. Zarodek w stadium różnicowania regionów merystematycznych. SA – wierzchołek pędu, COT – zaczątek liścieni, STE – walec osiowy, RC – czapeczka korzenia, S – wieszadło, CC – szczelina korozyjna, FG – prabiemo. 27 VI 1979. × 120. Fot. 16. Dojrzały zarodek dwa miesiące po zapłodnieniu. SA – wierzchołek pędu, COT – zaczątki liścieni, MED – walec osiowy, CX – kora, RC – czapeczka korzenia, RA – wierzchołek korzenia, FG – prabiemo, 25 VII 1979. × 75

Fot. 12-16. Embryo formation and development

Fot. 12. Zygote during metaphase. 30 V 1979. × 1450. Fot. 13. A 16-celled proembryo showing open tier (OT), small rosette tier (RT), suspensor tier (ST) and embryo tier (ET). 16 VI 1980. × 200. Fot. 14. Embryo (E) during corrosion-cavity penetration, showing embryonal tubes (ET). 13 VI 1979. × 210. Fot. 15. Embryo during meristematic regions differentiation. SA – shoot apex, COT – cotyledon initial, STE – stele, RC – root cap, S – suspensor system, CC – corrosion cavity, FG – female gametophyte. 27 VI 1979. × 120. Fot. 16. Mature embryo two months after fertilization SA – shoot apex, COT – cotyledon initial, MED – medulla, CX – cortex, RC – root cap, RA – root apex, FG – female gametophyte. 25 VII 1979. × 75.



Fot. 17-20. Degeneracja zarodków

Fot. 17. Degenerujący 16-komórkowy prazarodek. 6 VI 1979. × 620. Fot. 18. Zarodek (E) degenerujący u podstawy szczeliny korozyjnej (CC). A – „zwiędła” rodnia, FG – prabiemo. 6 VI 1979. × 310. Fot. 19. Zarodek degenerujący w szczeliny korozyjnej 4 tygodnie po zapłodnieniu. 27 VI 1979. × 220. Fot. 20. Degenerujący zarodek w 3 tygodnie po zapłodnieniu. 20 VI 1979. × 390

Fot. 17-20. Degenerating embryos

Fot. 17. Degenerating 16-called proembryo. 6 VI 1979. × 620. Fot. 18. Degenerating embryo at the base of the corrosion cavity (CC). A – collapsed archegonia, FG – female gametophyte. 6 VI 1979. × 310. Fot. 19. Embryo degenerating in the corrosion cavity 4 weeks after fertilization. 27 VI 1979. × 220. Fot. 20. Degenerating club embryo 3 weeks after fertilization. 20 VI 1979. × 390.

dnio 82,7% i 74,6%), a w roku 1980 uległa zwiększeniu i odwróceniu (odpowiednio 67,4% i 99,2%). Klony K-08-02 i K-08-03 obserwowane tylko w roku 1980 wykazywały pośrednie wartości procentu zapylnych zalążków (tab. 7). Średnio zapylnych zostało 83% zalążków.

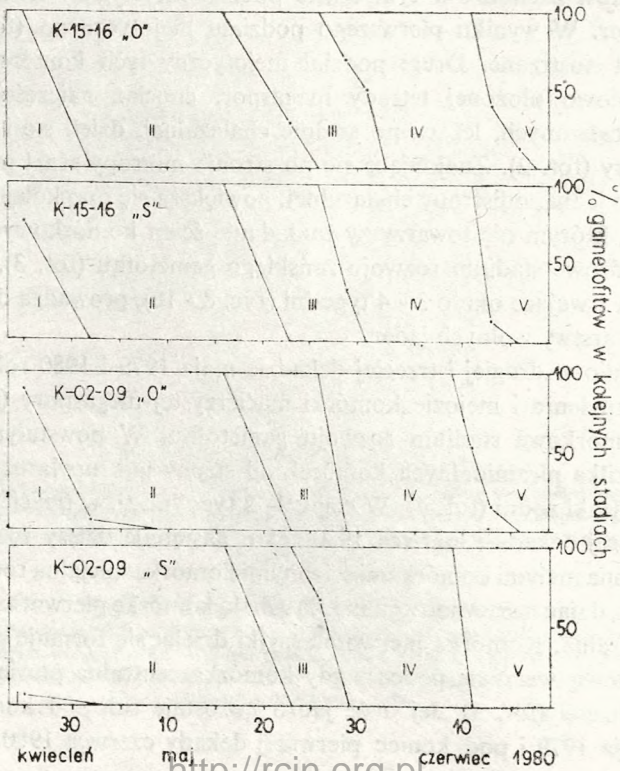
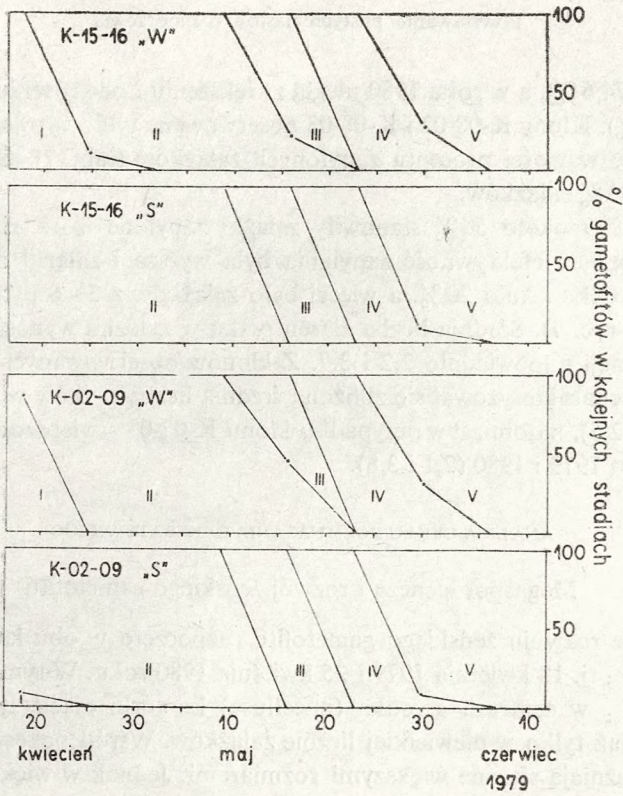
W roku 1979 około 50% stanowiły zalążki zapyłone 1-2 ziarnami pyłku. W roku następnym efektywność zapyłania była wyższa i zalążki z 1-2 pyłkami stanowiły już tylko około 20%, a więcej było zalążków z 3-6 pyłkami (najwyżej 9) (tab. 6 i 7, ryc. 7). Średnia liczba ziaren pyłku w zalążku wynosiła w kolejnych latach obserwacji odpowiednio 2,2 i 3,7. Z klonów obserwowanych w obu latach, klon K-15-16 charakteryzował się zbliżoną średnią liczbą pyłków w zalążku (odpowiednio 2,2 i 2,5), natomiast w przypadku klonu K-02-09* stwierdzono dużą różnicę między rokiem 1979 i 1980 (2,1 i 3,8).

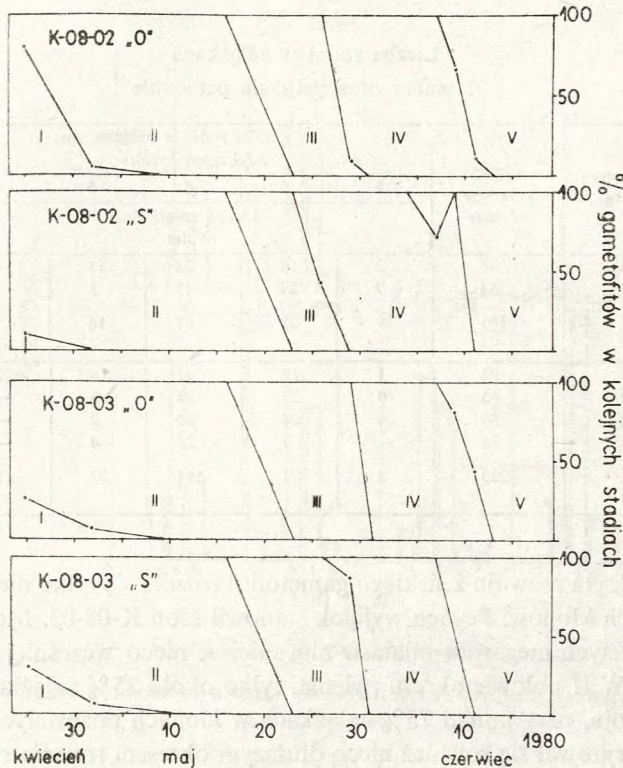
ANALIZA CYKLU ROZMNAŻANIA GENERATYWNEGO

Megasporogeneza i rozwój żeńskiego gametofitu

Obserwacje rozwoju żeńskiego gametofitu rozpoczęto w obu latach w połowie okresu pylenia, tj. 18 kwietnia 1979 i 25 kwietnia 1980 roku. W tym czasie uformowane wcześniej w centrum ośrodka (nucellusa) komórki macierzyste megaspory, widoczne są już tylko w niewielkiej liczbie zalążków. Wśród pozostałych komórek ośrodka wyróżniają się one większymi rozmiarami. Jednak w większości obserwowanych zalążków zachodzi w tym czasie podział mejotyczny komórek macierzystych megaspor. W wyniku pierwszego podziału mejotycznego (fot. 1) powstają dwie komórki siostrzane. Drugi podział mejotyczny tych komórek prowadzi do powstania liniowo ułożonej tetrazy megaspor, chociaż najczęściej tylko jedna z komórek siostrzanych, leżąca po stronie chalazalnej, dzieli się i powstają tylko trzy megaspory (fot. 2). Znajdujące się po stronie mikropylarnej megaspory degenerują, a tylko jedna, od strony chalazalnej, powiększa się i po kolejnych podziałach mitotycznych, którym nie towarzyszy zakładanie ścian komórkowych, zapoczątkowuje wolnojądrowe stadium rozwoju żeńskiego gametofitu (fot. 3). Synchroniczne podziały jąder trwające około 3-4 tygodni (ryc. 8-10), prowadzą do uformowania pojedynczej warstwy wolnych jąder.

Odpowiednio w drugiej i trzeciej dekadzie maja 1979 i 1980 roku, tj. w około miesiąc po zapyleniu i mejozie komórki macierzystej megaspory (ryc. 8-10), zaczyna się komórkowe stadium rozwoju gametofitu. W powstałym workowatym gametoficie, kilka piramidalnych komórek od strony mikropylarnej powiększa się, formując zawiązki rodni (fot. 4). W ciągu 1-2 tygodni, tj. w trzeciej dekadzie maja 1979 i pierwszej dekadzie czerwca 1980 roku, następuje dalszy rozwój rodni (ryc. 8-10). Otoczona małymi komórkami ściennymi komórka inicjalna rodni dzieli się nierównomiernie, dając na zewnątrz gametofitu małą komórkę pierwotną szyjki i większą komórkę centralną. Komórka pierwotna szyjki dzieląc się formuje pojedynczą zwykle 8-komórkową warstwę, podczas gdy komórka centralna powiększa się i ulega silnej wakuolizacji (fot. 5). Jej duże jądro pozostaje tuż pod komórkami szyjki. W końcu maja 1979 i pod koniec pierwszej dekady czerwca 1980 roku, komórka





Ryc. 8, 9, 10. Fenologia rozwoju żeńskiego gametofitu. Stadia rozwojowe I – stadia komórki macierzystej megaspory i tetrad, II – wolnojądrowe, III – formowanie ścian komórkowych, IV – inicjacja rodni i rozwój komórki centralnej, V – rozwój komórki jajowej. W – wolne zapylanie (nieizolowane kwiaty żeńskie), S – samozapylanie (kwiaty izolowane)

Fig. 8, 9, 10. Phenology of female gametophyte development. Stages of development I – megaspore mother cell and tetrad, II – free nuclear stage, III – cell wall formation, IV – archegonia initiation and central cell formation, V – egg cell formation. W – open pollination (not isolated strobiles), S – self-pollination (isolated strobiles)

centralna ulegała jeszcze jednemu nierównomiernemu podziałowi, dając małą i płaską komórkę kanałowo-brzuszną i dużą komórkę jajową. Jądro tej ostatniej powiększa się znacznie i przemieszcza się ku środkowi komórki. W ten sposób w około 7 tygodni po mejozie komórki macierzystej megaspory i okresie pylenia, powstaje w pełni uformowany gametofit żeński (fot. 6, ryc. 8 - 10). Całemu procesowi rozwoju gametofitu towarzyszy wzrost ośrodka, a jego szczyt zbliża się ku podstawie kanału mikropylarnego (fot. 5).

W około 50% gametofitów rozwijają się 4 rodnie, ale ich liczba waha się od 2 do 5, a wyjątkowo obserwowano zalążki z 6 rodniami (tab. 8 i 9, ryc. 11). Wśród 4 analizowanych klonów występowały jednak pewne różnice w liczbie rozwijających się rodni. W zalążkach klonów K-15-16 i K-08-03 najczęściej występowały 4 rodnie, a w przeważającej liczbie zalążków klonów K-02-09 i K-08-02 tylko 3 (tab. 8 i 9,

Tabela 8

Liczba rodni w zalążkach
Number of archegonia per ovule

Rok Year	Nr klonu Clone no.	Liczba zalążków Ovules	Liczba rodni w zalążku Archegonia/ovules					Średnio rodni w zalążku Mean arch./ ovule
			2	3	4	5	6	
			Liczba zalążków ovules					
1979	K-15-16	47	2	4	28	13	—	4,1
	K-02-09	54	7	24	19	3	1	3,4
	ogółem	101	9	28	47	16	1	3,7
	Total							
1980	K-15-16	82	1	13	47	18	3	4,1
	K-02-09	55	3	27	22	3	—	3,5
	K-08-02	50	4	24	20	2	—	3,4
	K-08-03	36	—	7	25	4	—	3,9
	ogółem	223	8	71	114	27	3	3,8
Total								

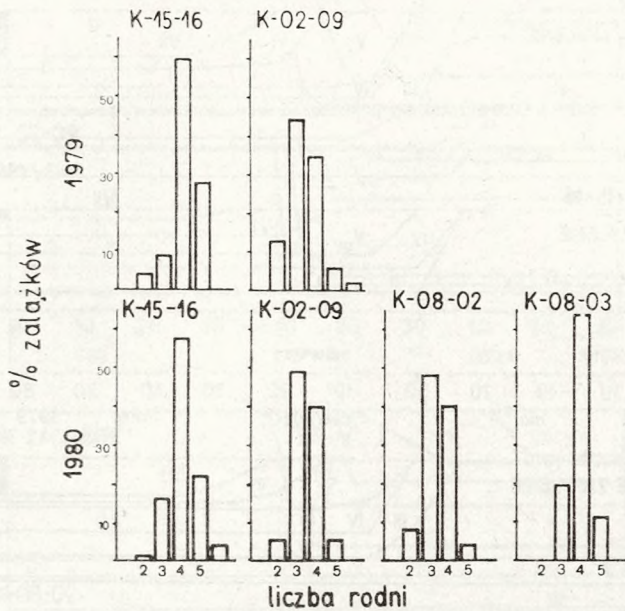
ryc. 11). Fenologia rozwoju żeńskiego gametofitu różniła się tylko nieznacznie wśród obserwowanych klonów. Pewien wyjątek stanowił klon K-08-03. Mejoza w komórkach macierzystych megaspor miała w nim miejsce nieco wcześniej niż u pozostałych klonów. W II połowie okresu pylenia, tylko około 25% zalążków wykazywało ten etap rozwoju, przy ponad 75% zalążkach w klonach pozostałych. Wymieniony klon charakteryzował się również nieco dłuższym okresem trwania stadium komórkowego gametofitu, ale jednocześnie skróconym okresem rozwoju rodni (ryc. 9 i 10).

Umieszczenie kwiatów żeńskich w izolatorach zrobionych z węża dialitycznego powodowało przyspieszenie procesu rozwoju żeńskiego gametofitu u wszystkich obserwowanych klonów (ryc. 8 - 10).

Tabela 9

Procent zalążków z różną liczbą rodni
Percentage of ovules with different number of archegonia

Rok Year	Nr klonu Clone no.	Ogółem % zalążków Total % ovules	Liczba rodni w zalążku Archegonia/ovules				
			2	3	4	5	6
			% zalążków % ovules				
1979	K-15-16	100	4,3	8,5	59,6	27,7	—
	K-02-09	100	13,0	44,4	35,2	5,6	1,9
	Średnio Mean	100	8,9	27,7	46,5	15,8	1,0
1980	K-15-16	100	1,2	15,9	57,3	22,0	3,7
	K-02-09	100	5,5	49,1	40,0	5,5	—
	K-08-02	100	8,0	48,0	40,0	4,0	—
	K-08-03	100	—	19,4	69,4	11,1	—
	Średnio Mean	100	3,6	31,8	51,1	12,1	1,3



Ryc. 11. Liczba rodni w zalążku

Fig. 11. Number of archegonia (abscissa) in ovules (ordinate)

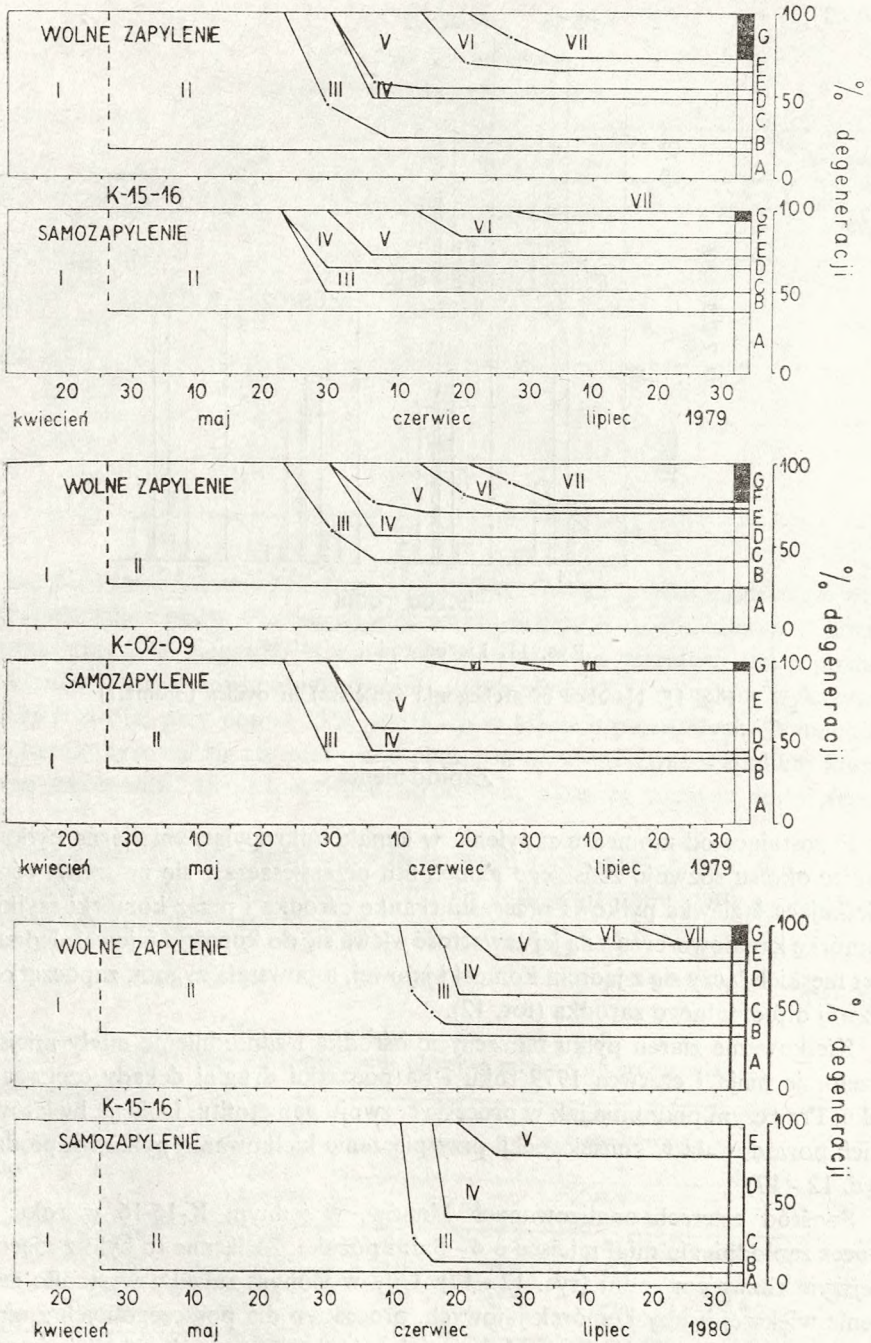
Zapłodnienie

Pozostające od momentu zapylenia w kanale mikropylarnym ziarna pyłku, pod koniec okresu rozwoju żeńskiego gametofitu przemieszczają się na szczyt ośrodka. Kiełkująca łagiewka pyłkowa przerasta tkankę ośrodka i przez komórki szyjki oraz komórkę kanałowo-brzuszną jej zawartość wlewa się do komórki jajowej. Jedna z gamet męskich łączy się z jądrem komórki jajowej, a powstała zygota, zapoczątkowuje rozwój diploidalnego zarodka (fot. 12).

Kiełkowanie ziaren pyłku na szczycie ośrodka i zapłodnienie miały miejsce na przełomie maja i czerwca 1979 roku i na początku drugiej dekady czerwca 1980 roku. Przy czym podobnie jak w procesie rozwoju gametofitu, izolacja kwiatów żeńskich powodowała w konsekwencji przyspieszenie kiełkowania pyłku i zapłodnienia (ryc. 12 - 17).

Pośród czterech analizowanych klonów, w jednym K-15-16 w roku 1980, proces zapłodnienia miał miejsce o 4 - 5 dni później. Związane to było z nieco wolniejszym rozwojem rodni (ryc. 12 - 17). Gdy w jednym zalążku wystąpiło zapłodnienie większej liczby komórek jajowych, proces ten dla poszczególnych z nich był często niesynchronizowany (podobnie jak późniejszy rozwój zarodków w takim zalążku).

W obu latach średnia liczba zapłodnionych komórek jajowych w jednym zalążku wynosiła nieco poniżej 2, przy zachowaniu niewielkich różnic między rodzajami zapylenia, między klonami i w obrębie tych samych klonów w obu latach doświad-



Ryc. 12, 13, 14, 15, 16, 17. Fenologia rozwoju żeńskiego gametofitu, zapłodnienia i rozwoju zarodka po wolnym i samozapyleniu, wraz z procentami degeneracji w różnych fazach rozwoju I - pylenie, II - rozwój gametofitu żeńskiego, III - formowanie komórki jajowej, IV - zapłodnienie i rozwój prazarodka, V - zarodek 4 - 16-komórkowy, VI - stadium pośrednie rozwoju zarodka, VII - późne stadia rozwoju zarodka. A - brak zapyleńia, B - degeneracja żeńskiego gametofitu, C - brak zapłodnienia, D - degeneracja prazarodka, E - degeneracja wczesnego zarodka, F - degeneracja zarodka w stadium pośrednim, G - w pełni rozwinięte zarodki

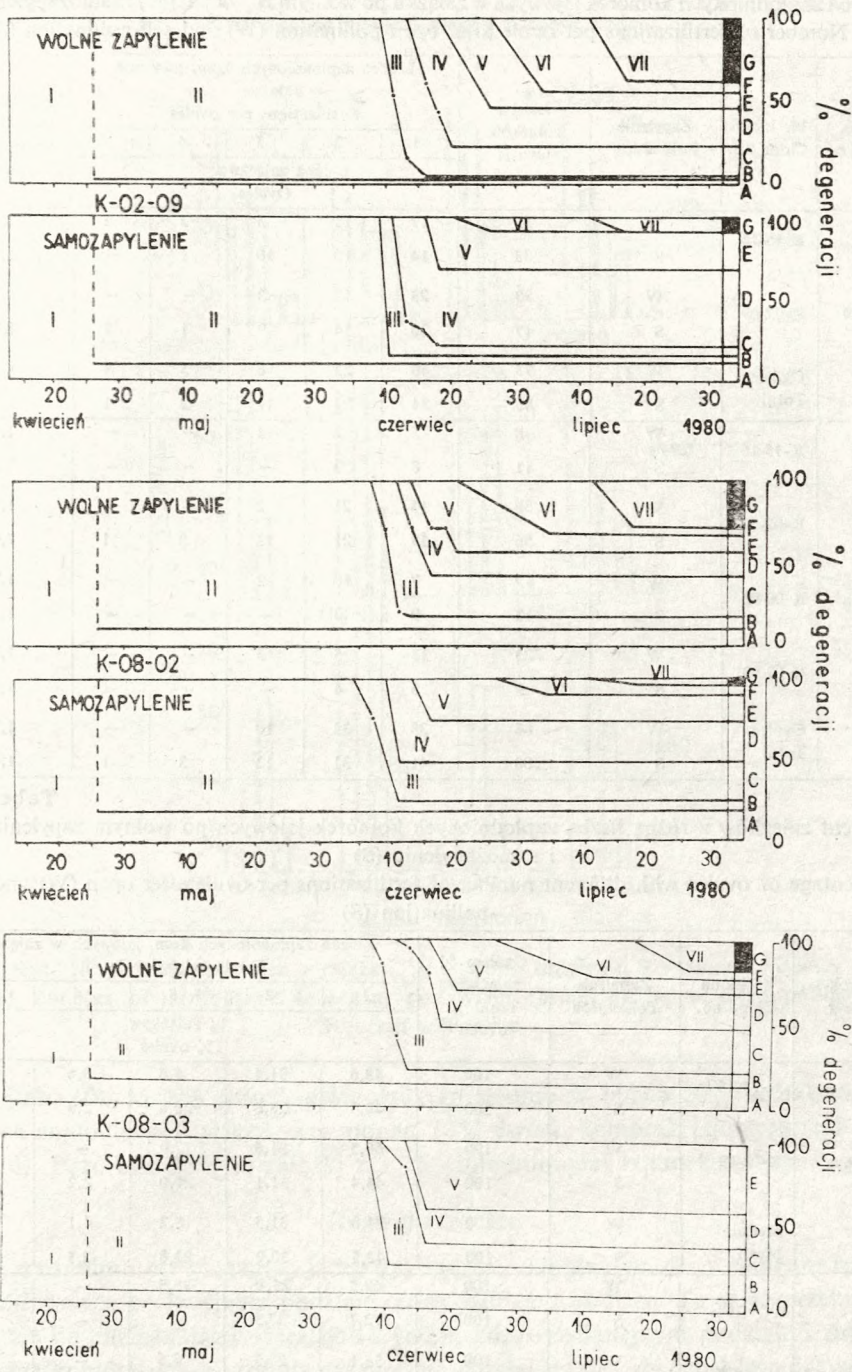


Fig. 12, 13, 14, 15, 16, 17. Phenology of reproductive development after open (top) and self-pollination (bottom), together with percentage of degeneration during different developmental stages

I – pollination, II – female gametophyte development, III – egg cell formation, IV – fertilization and proembryo, V – 4-16 celled embryo, VI – club embryo, VII – embryo during meristematic zones differentiation. A – lack of pollination, B – female gametophyte degeneration, C – lack of fertilization, D – degenerating proembryo, E – degenerating early embryo, F – degenerating club embryo, G – fully developed embryos

Tabela 10

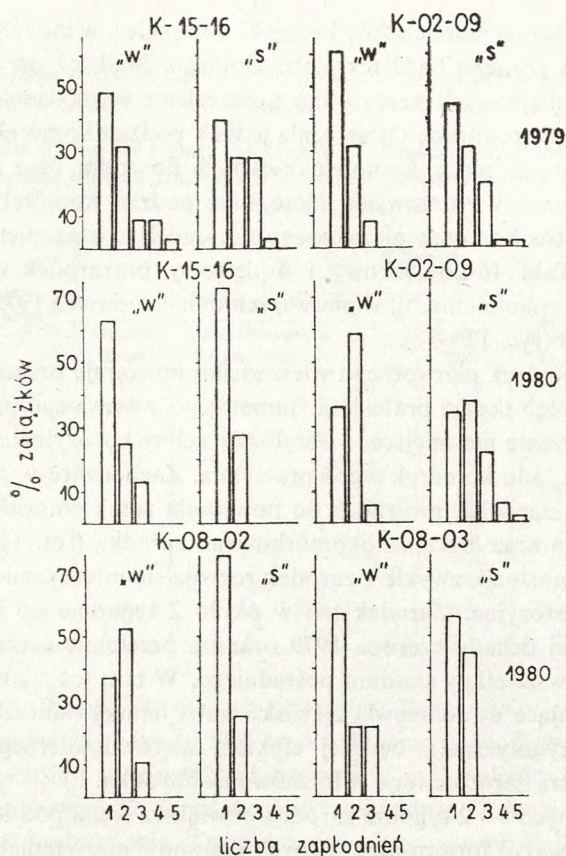
Liczba zapłodnionych komórek jajowych w załączku po wolnym zapyleniu (W) i samozapyleniu (S)
 Number of fertilizations per ovule after open pollination (W) and self-pollination (S)

Rok Year	Nr klonu Clone no.	Zapylenie Pollination	Liczba załączków Ovules	Liczba zapłodnionych kom. jajowych w załączku fertilizations per ovules					Średnio zapłod. kom. jajowych Mean fertili- zations
				1	2	3	4	5	
				Liczba załączków Ovules					
1979	K-15-16	W	35	17	11	3	3	1	1,9
		S	35	14	10	10	1	-	1,9
	K-02-09	W	38	23	12	3	-	-	1,5
		S	45	20	14	9	1	1	1,9
	Ogółem Total	W	73	40	23	6	3	1	1,7
		S	80	34	24	19	2	1	1,9
1980	K-15-16	W	8	5	2	1	-	-	1,5
		S	11	8	3	-	-	-	1,3
	K-02-09	W	36	13	21	2	-	-	1,7
		S	56	19	21	12	3	1	2,0
	K-08-02	W	19	7	10	2	-	-	1,7
		S	12	9	3	-	-	-	1,3
	K-08-03	W	23	13	5	5	-	-	1,7
		S	9	5	4	-	-	-	1,7
	Ogółem Total	W	86	38	38	10	-	-	1,7
		S	88	41	31	12	3	1	1,8

Tabela 11

Procent załączków z różną liczbą zapłodnionych komórek jajowych po wolnym zapyleniu (W) i samozapyleniu (S)
 Percentage of ovules with different number of fertilizations per ovule after open (W) and self-pollination (S)

Rok Year	Nr klonu Clone no.	Zapylenie Pollination	Ogółem % załączków Total % ovules	Liczba zapłodnionych kom. jajowych w załączku Fertilizations/ovule				
				1	2	3	4	5
				% załączków % ovules				
1979	K-15-16	W	100	48,6	31,4	8,6	8,6	2,9
		S	100	40,8	28,6	28,6	2,9	-
	K-02-09	W	100	60,5	31,6	7,9	-	-
		S	100	44,4	31,1	20,0	2,2	2,2
	Średnio Mean	W	100	54,8	31,5	8,2	4,1	1,4
		S	100	42,5	30,0	23,8	2,5	1,3
1980	K-15-16	W	100	62,5	25,0	12,5	-	-
		S	100	72,7	27,3	-	-	-
	K-02-09	W	100	36,1	58,3	5,6	-	-
		S	100	33,9	37,5	21,4	5,4	1,8
	K-08-02	W	100	36,8	52,6	10,5	-	-
		S	100	75,0	25,0	-	-	-
	K-08-03	W	100	56,5	21,7	21,7	-	-
		S	100	55,6	44,4	-	-	-
	Średnio Mean	W	100	44,2	44,2	11,6	-	-
		S	100	46,6	35,2	13,6	3,4	1,1



Ryc. 18. Liczba zapłodnień w zalążku. W – wolne zapylenie, S – samozapylenie
 Fig. 18. Number of fertilizations (abscissa) per ovules (ordinate). W – open pollination, S – self-pollination

czeń (tab. 10). Można jednak stwierdzić, że średnio w blisko 50% zalążków ma miejsce zapłodnienie tylko 1, a w ponad 30% dwóch komórek jajowych (tab. 11, ryc. 18). Pozostałe 20% to zalążki z 3 - 5 zapłodnionymi komórkami jajowymi.

Rozwój zarodka

Bezpośrednio po syngamii, jądro zygoty (fot. 12) dzieląc się w centrum rodni, formuje dwa, a po kolejnym podziale cztery jądra prazarodka. Te jądra przemieszczają się do chalazalnego wierzchołka rodni, gdzie po kolejnym podziale i założeniu ścian komórkowych formują prazarodek składający się z dwóch 4-komórkowych pięter. Przy czym komórki piętra górnego* pozostają otwarte do cytoplazmy komórki jajowej. Trudno jest ustalić sekwencję dalszych podziałów. Obok prazarodków,

* Podobnie jak u jodeł, górne piętro komórek prazarodka modrzewia jest faktycznie piętrem dolnym, wskutek utrzymania wzrostu szyszki ku górze – przeciwnie niż to ma miejsce u sosen, świerków i daglezi, gdzie po zapyleniu szyszczki zwieszają się ku dołowi.

gdzie podziałowi ulegają jednocześnie komórki obu pięter, w innych najpierw dzielą się komórki piętra górnego bądź też piętra dolnego. Stąd też przy obserwacji 12-komórkowych i 3-piętrowych prazarodków, określenie pochodzenia piętra środkowego może sprawiać trudności. Ostatecznie jednak podział komórek piętra górnego prowadzi do powstania piętra komórek otwartych do rodni oraz piętra stosunkowo mniejszych komórek rozetowych. Natomiast podział komórek piętra dolnego daje w efekcie piętro komórek pierwotnego wieszadełka oraz piętro komórek zarodka (fot. 13). Taki 16-komórkowy i 4-piętrowy prazarodek uformowany był w około 5 dni po zapłodnieniu, tj. w pierwszych dniach czerwca 1979 i około połowy czerwca 1980 roku (ryc. 12 - 17).

Wydłużanie komórek pierwotnego wieszadełka powoduje przesuwanie komórek piętra zarodka w głąb tkanki prabielpa, powstałego z żeńskiego przedrośla (gametofitu). Przemieszczenie ma miejsce w obrębie szczeliny korozyjnej, powstałej wskutek hydrolizy i rozpadu komórek tegoż prabielpa. Zachodzące w tym czasie dalsze podziały komórek zarodka, prowadzą do powstania rurek embrionalnych tworząc system wieszadełka oraz kilkunastokomórkowego zarodka (fot. 14). W przypadku wystąpienia poliembrionii, zwykle 1 zarodek rozwija się intensywniej i szybciej wstąpiła w szczelinę korozyjną. Zarodek ten w około 2 tygodnie po zapłodnieniu, tj. pod koniec drugiej dekady czerwca 1979 oraz na przełomie czerwca i lipca 1980 roku, osiągał pierwsze etapy stadium pośredniego. W tym też stadium można było zauważyć występujące u modrzewia zjawisko wstrzymanej poliembrionii rozszczepieniowej (monozygotycznej), będącej efektem nierównomiernego udziału czterech komórek piętra zarodkowego w formowaniu zarodka.

W ciągu kolejnych 1 - 2 tygodni zarodek powiększa się, a pod koniec tego okresu można już zauważyć formowanie różnych regionów merystematycznych: pramerystemu walca osiowego i czapeczki korzenia.

W około 4 - 5-tygodniowym zarodku pojawiają się najpierw wierzchołek pędu i zaczątki liścieni, a potem wierzchołek korzenia (fot. 15). Zarodek kontynuuje powiększanie jeszcze przez około miesiąc, by na przełomie lipca i sierpnia osiągnąć pełną dojrzałość (fot. 16).

Zakłócenia w rozwoju żeńskiego gametofitu

Już na pierwszych obserwowanych stadiach można było zauważyć zakłócenia w rozwoju żeńskiego gametofitu.

Zakłócenia w formowaniu megaspori (fot. 7) oraz na wczesnych etapach powstawania wolnych jąder (fot. 8) powodują, że w zalążku takim rozwijał się tylko ośrodek (fot. 10, 11). Przy czym można było zaobserwować, że w dwóch zalążkach na tej samej łusce nasiennej, w jednym rozwija się normalny gametofit, a w drugim następuje degeneracja. Część zalążków degeneruje wskutek zaburzeń w trakcie formowania ścian komórkowych rozwijającego się gametofitu (fot. 9). Również degeneracja jąder komórek centralnych wstrzymuje dalszy rozwój rodni.

Zakłóceniom rozwoju żeńskiego gametofitu towarzyszyły w niektórych przypadkach zaburzenia w lokalizacji rodni. Chociaż te ostatnie występowały również przy normalnym rozwoju gametofitu, a skrajnym tego przypadkiem był rozwój rodni

Tabela 12

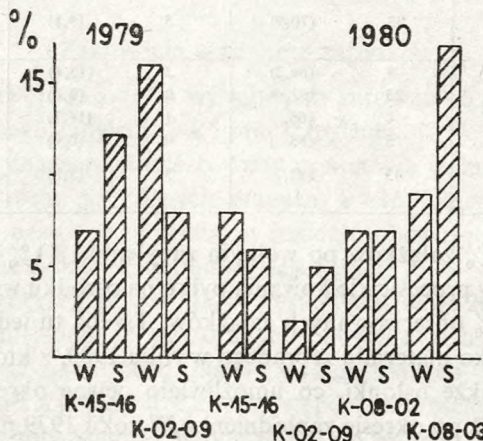
Rozmiary degeneracji zalążków w trakcie formowania i rozwoju gametofitu żeńskiego. W – wolne zapylenie (kwiaty nieizolowane), S – samozapylenie (kwiaty izolowane w okresie pylenia)

Degeneration of ovules during the female gametophyte formation and development. W – open pollination (female flowers without isolation), S – self-pollination (female flowers isolated during pollination period)

Nr klonu Clone no.	Zapylenie Pollination	Zalążków Ovules					
		1979			1980		
		Ogółem Total	Degenerujących Degenerating	%	Ogółem Total	Degenerujących Degenerating	%
K-15-16	W	147	10	7	145	12	8
	S	161	20	12	162	9	6
K-02-09	W	153	24	16	183	3	2
	S	143	11	8	200	9	5
K-08-02	W	–	–	–	227	17	7
	S	–	–	–	195	14	7
K-08-03	W	–	–	–	200	17	9
	S	–	–	–	199	34	17
Ogółem Total		604	65	11	1511	115	8

w chalazalnej, miast mikropylarnej części gametofitu. Przy czym w jednym przypadku stwierdzono uformowanie rodni na obu krańcach gametofitu. Rozwój rodni w chalazalnej części gametofitu uniemożliwiał oczywiście zapłodnienie. Również podział nienormalnie zlokalizowanego jądra komórki centralnej może być przyczyną zakłóceń w procesie zapłodnienia. Sporadycznie obserwowano zalążki, w których tylko część rodni degenerowała, podczas gdy pozostałe rozwijały się normalnie.

Wszystkie obserwowane objawy zakłóceń w rozwoju żeńskiego gametofitu oraz samej rodni były przyczyną degeneracji średnio 11% zalążków w roku 1979 i 7%.



Ryc. 19. Procent degenerujących żeńskich gametofitów po wolnym (W) i samozapyleniu (S)
Fig. 19. Percentage of female gametophyte degeneration after open (W) and self-pollination (S)

w 1980 (tab. 12). Stwierdzono znaczne, chociaż nieregularne różnice w liczbie zdegenerujących zalążków wśród obserwowanych klonów (tab. 12, ryc. 19). Nie stwierdzono aby fakt izolacji kwiatów żeńskich wpływał istotnie na zakłócenia w rozwoju gametofitu, z wyjątkiem może klonu K-08-03 w roku 1980, gdzie izolacja spowodowała znaczny wzrost % zdegenerowanych gametofitów w stosunku do kwiatów niez izolowanych w tym klonie oraz we wszystkich pozostałych klonach.

Brak zapłodnienia

Na preparatach sporządzonych z materiału zebranego w okresie, gdy zapłodnienie ma miejsce, można było zaobserwować, czy w zapyłonych zalążkach zapłodnienie zachodzi i czy w jego trakcie występują jakieś zakłócenia.

Brak zapłodnienia w zapyłonych zalążkach spowodowany był dwoma przyczynami: brakiem przemieszczania się pyłku z mikropyle na ośrodek oraz zahamowaniem procesu kiełkowania pyłków, które osiągnęły szczyt ośrodka. Liczby i proporcje zalążków, w których nie doszło do zapłodnienia mimo obecności pyłku, przedstawiono w tabeli 13 i na rycinie 20. Brak przemieszczania się pyłku na ośrodek zaobser-

Tabela 13

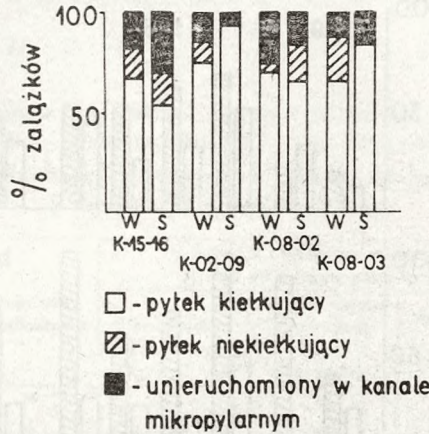
Zachowanie się pyłku w zalążkach po wolnym zapyleniu i kontrolowanym samozapyleniu w roku 1980

Pollen performance in ovules after open and controlled self-pollination in 1980

	Nr klonu Clone no.	Liczba zalążków z pyłkiem Ovules with pollen that					
		kiełkujących na ośrodku germinates on nucellus		niekiełkujących na lub nad ośrodkiem does not germinate on nor above the nucellus		unieruchomionym w kanale mikropylarnym immobilized in micro-pylar canal	
		N	%	N	%	N	%
Wolne zapylenie Open pollination	K-15-16	4	(66,7)	1	(16,7)	1	(16,7)
	K-02-09	15	(75,0)	2	(10,0)	3	(15,0)
	K-08-02	16	(70,0)	1	(4,3)	6	(26,1)
	K-08-03	4	(66,7)	1	(26,7)	1	(13,3)
	Ogółem Total	39	(70,9)	5	(9,1)	11	(20,0)
Samozapylenie Self-pollination	K-15-16	9	(69,2)	2	(15,4)	2	(15,4)
	K-02-09	25	(92,6)	0	(0,0)	2	(7,4)
	K-08-02	4	(66,7)	1	(16,7)	1	(16,7)
	K-08-03	5	(83,3)	0	(0,0)	1	(16,7)
	Ogółem Total	43	(82,7)	3	(5,8)	6	(11,5)

wowano w średnio 20% zalążków po wolnym zapyleniu i 11% zalążków samozapylnych. Zakłócenia w procesie kiełkowania pyłku na ośrodku wystąpiły odpowiednio średnio w 9% i 6% obserwowanych zalążków. Trzeba tu jednak dodać, że obserwacje te dotyczą tylko materiału zebranego w roku 1980, z którego wykonywane preparaty zawierały także osłonki, co umożliwiło pewne określenie zachowania się pyłku w trakcie i tuż po okresie zapłodnienia. W roku 1979 preparaty przygotowywano po uprzednim usunięciu osłonek, co nie pozwalało na odróżnienie zalążków niezapylnych od tych, w których brak było przemieszczania pyłku na ośrodek.

Natomiast w obu latach, na wszystkich klonach i niezależnie od sposobu zapylania, nie obserwowano wyraźnych objawów zaburzeń w procesie zapłodnienia od momentu skielkowania pyłku aż do uformowania komórek prazarodka. W pojedynczych przypadkach obserwowano zalążki, w których występowały wyraźne ślady przerastania łagiewek pyłkowych przez tkanki ośrodka i wnikania do rodni, przy



Ryc. 20. Skuteczność zapłodnienia po wolnym (W) i samozapyleniu (S)

Fig. 20. Effectiveness of ovule (ordinate) fertilization after open (W) and self-pollination (S). Open – germinating pollen grains, hatched – lack of germination, and black – pollen immobilized in micropyle

występującej kompletnej degeneracji komórek jajowych. Trudno jest w takim przypadku ustalić czy degeneracja nastąpiła przed, w trakcie syngamii gamety męskiej i jądra komórki jajowej, czy też już w trakcie formowania prazarodka. Pojedyncze takie zalążki zaliczano do degenerujących, wskutek zaburzeń na etapie rozwoju prazarodka.

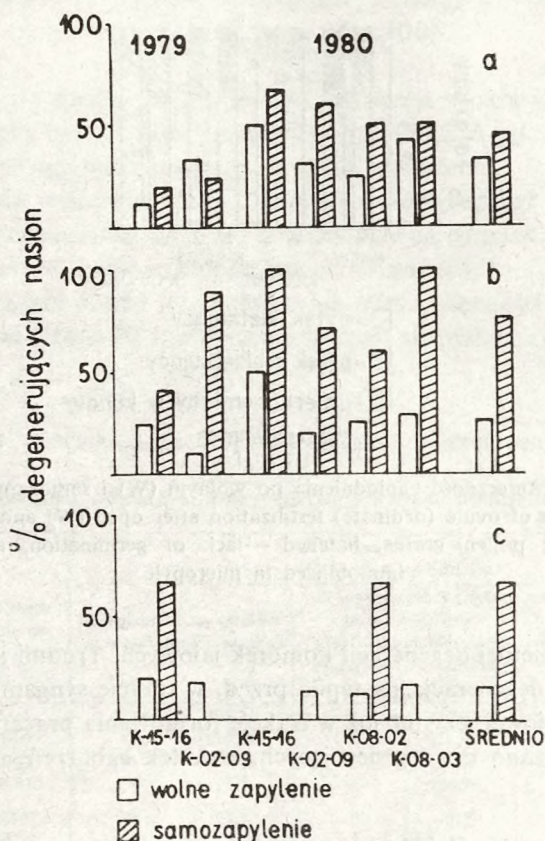
Zakłócenia w rozwoju zarodków

Zakłócenia w rozwoju zarodków występowały zarówno po zapłodnieniu pyłkiem pochodzącym z wolnego zapylenia jak i samozapylenia.

Pierwsze objawy degeneracji obserwowano na etapie wolnych jąder powstałych po podziale zygoty oraz na różnych etapach 8 - 16-komórkowego prazarodka (fot. 17). Przy czym często w tym samym nasieniu obok normalnie rozwijających się prazarodków, inne wykazywały objawy degeneracji.

W 1979 roku degeneracja prazarodków wystąpiła w około 20% nasion, w których doszło do zapłodnienia, podczas gdy dla tych samych dwóch klonów w 1980 roku średnia ta wyniosła aż około 50%. Na wszystkich klonach, z wyjątkiem K-02-09 w 1979 roku, degeneracja prazarodków występowała częściej po samozapyleniu, niż po wolnym zapyleniu. Średnio, w obu latach po wolnym zapyleniu i samozapyleniu degeneracja wszystkich prazarodków miała miejsce odpowiednio w 32% i 45% nasion, w których doszło do zapłodnienia (ryc. 21a).

Kolejnym okresem, kiedy degeneruje wiele zapłodnionych nasion, jest okres wydłużania się suspensora i wnikania 4 - 16-komórkowych wczesnych zarodków do szczeliny korozyjnej. Degeneracja następowała wtedy zasadniczo na dwa sposoby. Pierwszy to zakłócenia we wrastaniu zarodków do szczeliny korozyjnej i ich degeneracja w miejscu już częściowo strawionej, bądź zdegenerowanej rodni (fot. 18).



Ryc. 21. Procent degenerujących nasion wskutek zaburzeń na różnych etapach rozwoju zarodków; a – prazarodki, b – 4 - 16-komórkowy zarodek, c – zarodki w stadium pośrednim

Fig. 21. Percentage of degenerating seeds as an effect of embryo degeneration at different developmental stages after open (open) and self-pollination (hatched): a – proembryo, b – early embryo, c – club embryo

Drugi to degeneracja zarodków po osiągnięciu szczytu szczeliny korozyjnej (fot. 20). Na klonach objętych doświadczeniem, podobnie jak w przypadku prazarodków, również na etapie wczesnego zarodka degeneracja występowała częściej w 1980 roku niż w 1979. Wyjątek stanowi tu samozapylenie w klonie K-02-09. Jednocześnie w obu latach i na wszystkich klonach degeneracja zarodków wystąpiła obficie po samozapyleniu niż po wolnym zapyleniu. Średnio po samozapyleniu degenerowało 77% nasion, których zarodki osiągnęły omawiane stadium rozwojowe, a tylko średnio 26% nasion po wolnym zapyleniu (ryc. 21b).

Ostatnim stadium rozwoju zarodków, w którym następowała ich degeneracja, były wczesne etapy stadium pośredniego (tzw. stadium torpedy). Degeneracja zarodków w tym stadium wykazywała duże zróżnicowanie międzyklonalne (ryc. 21c). W 1980 roku, w klonach K-15-16 i K-08-03 po samozapyleniu 100% zarodków degenerowało w dwóch wcześniejszych stadiach i dlatego w ogóle nie obserwowano zarodków pośrednich. W nasionach klonów K-15-16 w roku 1979 i K-08-02 w roku

Tabela 14

Procent pustych nasion powstałych wskutek zaburzeń na różnych etapach rozwoju zarodka.

W – wolne zapylenie, S – samozapylenie

Percentage of empty seeds due to embryo mortality at different developmental stages. W – open pollination, S – self-pollination

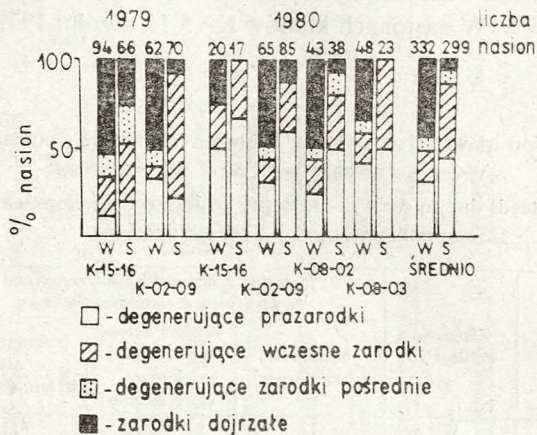
Rok Year	Nr klonu Clone no.	Zapylenie Pollination	% nasion z degenerującymi zarodkami % seed with degenerating embryos			% nasion z dojrzałymi zarodkami % seed with mature embryos
			prazarodek proembryo	wczesny zarodek 4 - 16-komórkowy early embryo	pośredni zarodek club embryo	
1979	K-15-16	W	12	22	13	53
		S	20	33	32	15
	K-02-09	W	33	7	10	50
		S	23	69	—	8
1980	K-15-16	W	50	25	—	25
		S	67	33	—	—
	K-02-09	W	31	13	8	48
		S	60	28	—	12
	K-08-02	W	25	19	7	49
		S	50	30	13	7
	K-08-03	W	42	17	7	34
		S	50	50	—	—
	Średnio Mean	W	32	17	8	43
		S	45	41	8	6

1980 po samozapyleniu degenerowało aż 70% zarodków, które osiągnęły pośrednie stadium rozwoju. Natomiast po wolnym zapyleniu degenerowało średnio 14% nasion, w których zarodki osiągnęły omawiane stadium rozwoju (ryc. 21c).

Nie obserwowano degeneracji zarodków, które osiągnęły późniejsze stadia rozwojowe.

Jak wynika z przeprowadzonych obserwacji, degeneracja zarodków na różnych etapach rozwoju prowadzi do powstawania wielu pustych nasion u modrzewia. Podjęto więc próbę ustalenia, jaki procent pustych nasion powstaje wskutek sumowania się degeneracji zarodków w kolejnych stadiach rozwojowych. W tym celu od wyjściowych 100% nasion, w których doszło do zapłodnienia, odliczano procenty degenerujących nasion w kolejnych etapach rozwoju zarodków. Przy czym w każ-

dym z kolejnych etapów, procent degeneracji przeliczano w stosunku do procentu pozostałych normalnych nasion po degeneracji na etapach wcześniejszych. Ten sposób potraktowania danych wskazuje, że średnio po wolnym zapyleniu 32% pustych nasion powstaje wskutek degeneracji prazarodków, 17% jako efekt zakłóceń w roz-



Ryc. 22. Podsumowanie procentu pustych nasion powstałych wskutek zaburzeń w rozwoju zarodka oraz procent nasion pełnych z rozwiniętymi zarodkami. W – wolne zapylenie, S – samozapylenie

Fig. 22. Summary of empty seeds as a result of embryo degeneration and expected percentage of seed with fully developed embryos (black). Degenerating proembryos (open), early (hatched) and club embryos (dotted). W – open pollination, S – self-pollination

woju 4 - 16-komórkowego wczesnego zarodka i tylko około 8% po degeneracji zarodków w stadium pośrednim. Po samozapyleniu procenty te wyniosły odpowiednio 45, 41 i 8 (tab. 14 i ryc. 22). Wynika z tego, że szczególnie wysoki procent pustych nasion po samozapyleniu jest głównie efektem intensywnych zaburzeń w rozwoju wczesnego zarodka.

Oczekiwany procent pełnych nasion po uwzględnieniu rozmiarów degeneracji na różnych etapach rozwoju nasion

Podobną próbę jak opisana powyżej dla degeneracji zarodków, podjęto dla ustalenia oczekiwanego procentu pełnych nasion powstałych po uwzględnieniu rozmiarów degeneracji na wszystkich etapach rozwoju (począwszy od braku zapylenia po zakłócenia w rozwoju zarodków). Od wspomnianej metody liczenia odstąpiono tylko w przypadku degeneracji gametofitów, a jej procentową wartość dodano do procentu niezapylnych załączków. Postąpiono tak ponieważ przyczyny te mogą występować jednocześnie, nie chciano więc powiększyć i tak już nieco zawyżonego wspólnego wpływu tych czynników. Ponieważ nie obserwowano w 1979 roku skuteczności zapłodnienia dla obliczeń strat w tym roku, wykorzystano procent załączków, w których nie doszło do zapłodnienia, uzyskany na podstawie obserwacji na analogicznych klonach w roku 1980. Wyniki tych obliczeń przedstawiono w tabeli 15 i w słupkach przy rycinie 12 - 17.

Tabela 15

Porównanie obserwowanego i oczekiwanego procentu pełnych nasion po uwzględnieniu strat na poszczególnych etapach rozwoju (W – wolne zapylenie, S – samozapylenie)

Comparison of observed and expected percentages of full seed after losses in different developmental stages (W – open pollination, S – self-pollination)

Przyczyny powstawania pustych nasion Causes of empty seed formation	% nasion dla poszczególnych klonów % of seeds for clones											
	1979						1980					
	K-15-16		K-02-09		K-15-16		K-02-09		K-08-02		K-08-03	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
Ogółem nasion Total seed	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Brak zapylenia Lack of pollination	17	38	25	33	33	8	1	11	11	18	14	8
Degeneracja gametofitów żeńskich Female gametophyte degeneration	7	12	16	8	7	6	3	4	7	6	8	17
Oczekiwanym pełnym nasion z zapylnych i dobrze rozwiniętych zalążków Expected full seed from pollinated and well developed ovules	76	50	59	59	60	86	96	85	82	76	78	75
Brak zapłodnienia w zalążkach Lack of fertilization	25	15	15	4	18	27	18	6	25	25	26	13
Oczekiwanym pełnym nasion z zapłodnionych zalążków Expected full seed from fertilized ovules	51	35	44	55	42	59	78	79	57	51	52	62
Degeneracja zarodków Embryo degeneration	24	30	22	50	31	59	40	70	29	47	35	62
Oczekiwanym pełnym nasion z rozwiniętymi zarodkami Expected full seed with mature embryos	27	5	22	5	11	0	38	9	28	4	17	0
Obserwowanych pełnych nasion Observed full seed	10	5	24	4	16	0	46	5	29	6	31	2

Opisany już wcześniej brak zapylenia był przyczyną powstawania w zależności od klonu od 1 do 38 procent pustych nasion.

Kolejnym czynnikiem były zaburzenia w rozwoju żeńskiego gametofitu. Powodowały one degenerację dalszych 3 - 17% nasion.

Brak przemieszczania się pyłku z kanału mikropylarnego na szczyt ośrodka oraz brak kiełkowania pyłku na ośrodku i w konsekwencji brak zapłodnienia w 7 - 40% zapylnych zalążków, był przyczyną degeneracji dalszych 4 - 27% ogólnej liczby nasion.

Wymienione przyczyny w jednakowym stopniu wpływały na powstawanie pustych nasion niezależnie od sposobu zapylenia. Po ich odjęciu można oczekiwać powstania 35 - 79% pełnych nasion.

Ostatnią z obserwowanych przyczyn zmniejszenia liczby pełnych nasion była degeneracja prazarodków i wczesnych zarodków. Po wolnym zapyleniu zakłócenia w rozwoju zarodków u 47 - 75% nasion, w których doszło do zapłodnienia, zwiększały ogólną sumę pustych nasion o kolejne 22 - 40%. Znacznie więcej bo 85 - 100%

nasion degenerowało wskutek zakłóceń rozwoju zarodków po samozapłodnieniu, co przyczyniało się do aborcji 30 - 70% wyjściowej liczby nasion.

W ten sposób uzyskany procent pozostałych pełnych nasion po wolnym zapyleniu wahał się od 11 - 38% w zależności od klonu (średnio 24%), a po samozapyleniu od 0 - 9% (średnio 4%).

Prawidłowość tego typu przeliczeń potwierdza porównanie oczekiwanego i obserwowanego procentu pełnych nasion dla analizowanych klonów i sposobów zapylenia. Współczynnik korelacji był wysoki ($r=0,87$) i statystycznie bardzo istotny na poziomie ufności 0,01.

OBCIĄŻENIE GENETYCZNE

Wpływ systemów kojarzenia na powstawanie pełnych nasion

Na podstawie rezultatów 2-letnich doświadczeń można stwierdzić, że u modrzewia europejskiego liczba pełnych nasion jest stosunkowo niewielka i średnio nie przekracza 40%. Wykazano jednocześnie, że różni się ona w zależności od klonu i sposobu zapylenia (tab. 16). Analiza wariancji wykazała, że różnice te w obu latach były statystycznie istotne (tab. 17).

Tabela 16

Procent pełnych nasion w efekcie różnych metod zapylenia
Percentage full seed setting after different kinds of pollination

Klon Clone no.	Samozapylenie Self-poll.		Mieszana pyłków Mix-poll.		Krzyżowe zapylenie Cross-poll.		Wolne zapylenie Open-poll.	
	1979	1980	1979	1980	1979	1980	1979	1980
K-02-11	4,8	—	12,7	—	22,7	—	29,1	—
K-02-12	4,8	—	23,0	—	17,2	—	27,0	—
K-02-19	—	10,6	—	28,4	—	23,8	—	36,3
K-08-02	42,6	5,8	57,1	32,9	59,4	11,9	78,1	28,6
K-08-03	3,2	1,5	5,1	6,1	13,6	5,8	34,0	31,2
K-10-01	—	3,9	—	19,7	—	17,8	—	32,4
K-10-02	7,4	—	5,3	—	15,5	—	27,0	—
K-10-25	5,8	2,7	7,8	5,5	12,7	7,8	32,2	35,0
K-10-27	11,1	10,2	24,6	6,7	18,4	12,6	43,9	40,0
K-15-63	—	10,3	—	17,4	—	14,1	—	28,4
K-15-88	10,4	6,4	5,0	24,5	39,2	32,6	61,4	41,6
Średnio Mean	11,3	6,4	18,1	17,7	24,0	15,8	41,6	34,2

Średni procent pełnych nasion był nieco wyższy w pierwszym roku doświadczeń i w zależności od sposobu zapylenia wahał się średnio od 11,3% (samozapylenie) do 41,6% (wolne zapylenie). W drugim roku wartości te wahały się odpowiednio od 6,4% do 34,2%. W obu latach najlepsze klony produkowały ponad 40% pełnych nasion.

Istotny wpływ sposobu zapylenia na liczbę pełnych nasion zaznaczył się w obu latach spadkiem procentu pełnych nasion w wyniku kontrolowanego zapylenia w stosunku do wolnego zapylenia.

Najwięcej pełnych nasion powstawało w wyniku wolnego zapylenia, a ich liczba wahała się od 27% do 78,1%. Średnie w obu latach były zbliżone i wynosiły 41,6% w 1979 oraz 34,2% w 1980 roku.

Tabela 17

Analiza zmienności powstawania pełnych nasion w efekcie różnych systemów zapylania (po transformacji kątowej)

Analysis of variance for the full seed yield different pollination regimes (after arcsine transformation)

Źródło zmienności Source of variation	1979			1980	
	St. swobody D.f.	Śr. kwadrat M.S.	F	Śr. kwadrat M.S.	F
Ogółem – Total	31				
Zmienne (wariant zapylania) Variables (pollination regime)	3	722,33	26,80**	732,33	23,33**
Powtórzenia (klony) Replicates (clones)	7	401,81	14,91**	79,10	2,51**
Resztowa – Residual	21	26,95		31,52	

** 0,01, * 0,05 – Poziom istotności
Significance of differences

W warunkach kontrolowanego zapylania mieszaniną pyłków oraz krzyżowania osobników niespokrewnionych następował około 50% spadek liczby pełnych nasion w stosunku do wolnego zapylania. Po kontrolowanym zapylaniu mieszaniną pyłków, w której około 1/8 stanowił własny pyłek drzew matecznych, liczba pełnych nasion wahała się w zależności od klonu od 5,0% do 57,1%, a średnie w obu latach wyniosły 18,1% i 17,7% (tab. 16). Podobnie liczba pełnych nasion uzyskanych w wyniku kontrolowanego krzyżowania klonów niespokrewnionych wahała się od 5,8% do 59,4% i średnio wyniosła w obu latach odpowiednio 24,0% i 15,8% (tab. 16).

Największy spadek liczby pełnych nasion towarzyszył samozapyleń i z reguły nie więcej niż 10% nasion było pełnych. Wyjątek stanowił tutaj klon K-08-02, który w roku 1979 zawiązał 42,6% pełnych nasion. Ale klon ten i w pozostałych systemach zapylania okazał się w tym roku wyjątkowo obficie zawiązującym pełne nasiona (tab. 16). Nie stwierdzono drzew w pełni samosterylnych. Średnio depresja wsobna wywołana samozapyleń sięgała 60% w stosunku do krzyżowania niekrewniaczego. W 1979 roku negatywny wpływ własnego pyłku na zawiązywanie pełnych nasion zaznaczył się również w zapylaniu mieszaniną pyłków, powodując 25% obniżenie liczby pełnych nasion w stosunku do krzyżowania niekrewniaczego (tab. 16).

Statystyczną istotność wszystkich różnic związanych z systemami zapylania przedstawiają zamieszczone poniżej wyniki testu Newmana-Keulsa (średnie podkreślone nie różnią się istotnie):

rok	samozapyleń	mieszanina pyłków	zapyleń krzyżowe	wolne zapyleń
1979	11,3	18,1	24,0	41,6
1980	6,4	17,7	15,8	34,2

Relatywna samopłodność i liczba zarodkowych czynników letalnych

Proporcja pełnych nasion uzyskanych w wyniku samozapyleń i krzyżowania niekrewniaczego stanowiła podstawę dla obliczenia relatywnej samopłodności (RSP) modrzewia, jako miary zdolności do rozwoju pełnych nasion przy uwzglę-

Tabela 18

Relatywna samopłodność i samosterylność (*RSF* i *RSS*) oraz liczba czynników letalnych zarodkowo (*EL*)
 Relative self-fertility (*RSF*), relative self-sterility (*RSS*) and number of embryonic lethals (*EL*)

Nr klonu Clone no.	<i>RSF</i>		<i>RSS</i>		<i>EL</i> (Koski 1971)			<i>EL</i> (Morton i inni 1956)		
	1979	1980	1979	1980	1979	1980	\bar{x}	1979	1980	\bar{x}
K-02-11	0,211	—	0,789	—	7	—	7	6,2	—	6,2
K-02-12	0,279	—	0,721	—	6	—	6	5,1	—	5,1
K-02-19	—	0,445	—	0,555	—	4	4	—	3,2	3,2
K-08-02	0,717	0,487	0,283	0,513	2	4	3	1,3	2,9	2,1
K-08-03	0,235	0,259	0,765	0,741	6	6	6	5,8	5,4	5,6
K-10-01	—	0,219	—	0,781	—	7	7	—	6,1	6,1
K-10-02	0,477	—	0,523	—	4	—	4	3,0	—	3,0
K-10-25	0,457	0,346	0,543	0,654	4	5	4,5	3,1	4,2	3,7
K-10-27	0,603	0,810	0,397	0,190	3	1	2	2,0	0,8	1,4
K-15-63	—	0,730	—	0,270	—	2	2	—	1,3	1,3
K-15-88	0,265	0,196	0,735	0,804	6	7	6,5	5,3	6,3	5,9
Średnio Mean	0,406	0,437			4,8	4,5	4,7	4,0	3,8	4,0

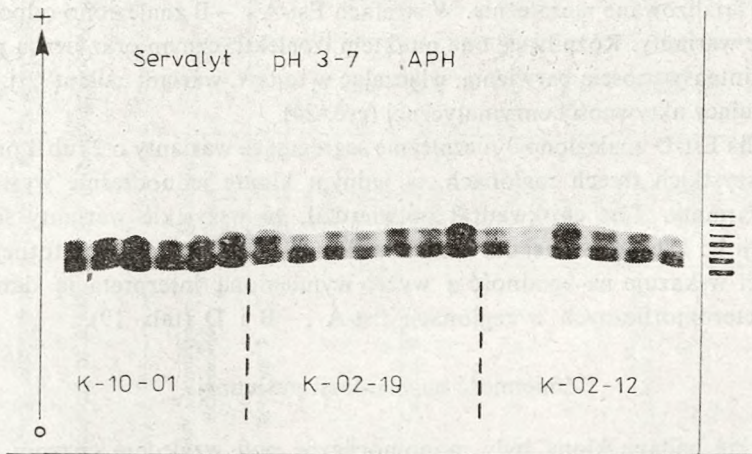
dnieniu działania obciążenia genetycznego. Jej wartości wahały się w zależności od klonu od 0,20 do 0,81 (tab. 18), a średnie w obu latach były zbliżone i wynosiły 0,41 w 1979 i 0,44 w 1980 roku. Klony analizowane w obu latach wykazywały zbliżone wartości relatywnej samopłodności (tab. 18).

Na podstawie relatywnej samosterylności ($RSS=1-RSP$), oszacowano dla każdego klonu liczbę czynników letalnych wywołujących śmierć zarodka (embryonic lethals). Wartości te obliczone na podstawie wzoru Koskiego (1971), przy założeniu obecności średnio 1,7 zarodków w zalążku (co wynikało z obserwacji mikroskopowych), wskazują na występowanie 2 do 7 czynników letalnych w zależności od klonu. Średnie szacunki dla dwóch lat doświadczeń wynosiły 4,8 i 4,5. Natomiast szacunek liczby czynników letalnych wyliczany na podstawie wzoru Mortona i innych (1956), przy założeniu tylko 1 zarodka w zalążku, był nieco niższy i wahał się od 1,3 do 6,2, a średnie dla obu lat wyniosły odpowiednio 4,0 i 3,8 (tab. 18). Podobnie jak w przypadku relatywnej samopłodności szacunek liczby czynników letalnych dla klonów badanych w obu latach był zbliżony.

BADANIA ENZYMATYCZNE

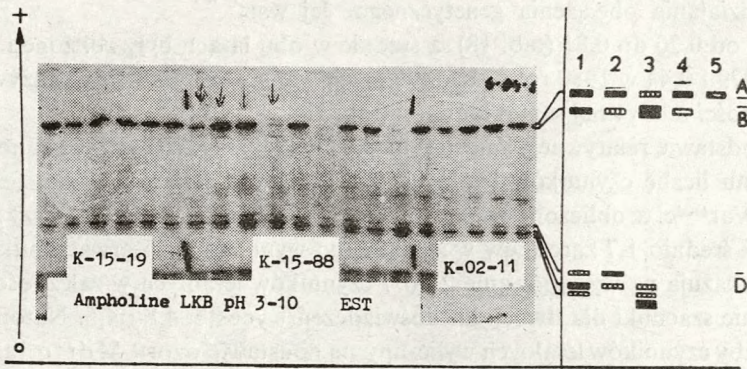
Kwaśna fosfataza (APH)

W przypadku tego systemu enzymatycznego stwierdzono 7 blisko siebie leżących, lecz wyraźnie rozdzielonych prążków (ryc. 23). Prążki oznaczone jako 1, 2 i 3 były czasami bardzo słabo wybarwione lub nawet niewidoczne szczególnie kiedy analizowano homogenaty z suchych nasion. Wśród analizowanych klonów modrzewia europejskiego nie znaleziono zmienności w występowaniu prążków kwaśnej fosfatazy.



Ryc. 23. Elektroforetyczny obraz kwaśnej fosfatazy

Fig. 23. Electrophoretic patterns of acid phosphatase



Ryc. 24. Elektroforetyczny obraz trzech stref esterazy

Fig. 24. Electrophoretic patterns of three esterase zones

Esteraza (EST)

W badanym materiale stwierdzono 13 do 15 prążków esterazy. Różniły się one zarówno aktywnością, jak i punktem izoelektrycznym. Jednak w związku z bardzo słabym wybarwieniem, prążki występujące w środkowej części żelu (region C – ryc. 24) nie zostały włączone do dalszych analiz. Pozostałe intensywnie barwiące się prążki występujące w anodalnej i katodalnej części żelu, charakteryzowały się dobrą powtarzalnością, co pozwalało na ich interpretację. Zostały one pogrupowane w 3 strefy oznaczone jako Est-A, –B i –D. Strefy Est-A i –B znajdują się bardzo blisko siebie na żelu, co sprawiało początkowo kłopoty w ich odróżnieniu. Jakkolwiek dwa z badanych klonów (K-10-16 i K-15-88, tab. 19) posiadały niezależnie segregujące warianty w każdej z tych stref, co wskazuje, że obie strefy A i B powinny być analizowane niezależnie. W strefach Est-A i –B znaleziono odpowiednio 5 i 4 różne warianty. Różniły się one punktem izoelektrycznym oraz liczbą prążków (1 lub 2) i intensywnością barwienia, włączając w to tzw. wariant „silent”, tj. wariant nie wykazujący aktywności enzymatycznej (ryc. 24).

W strefie Est-D znaleziono 3 niezależnie segregujące warianty o 2 lub 3 prążkach.

We wszystkich trzech regionach, w jednym klonie jednocześnie występowały 1 lub 2 warianty. Test chi-kwadrat potwierdził, że wszystkie warianty segregują w proporcji 1 : 1, oczekiwanej dla cech mendlowskich (tab. 19). Brak istotnej heterogeniczności wskazuje na zgodność z wyżej wymienioną interpretacją danych dla klonów heteromorficznych w regionach Est-A, –B i D (tab. 19).

Zmienność na plantacji nasiennej

Wszystkie badane klony były monomorficzne pod względem enzymu kwaśnej fosfatazy. Te same klony okazały się zmienne pod względem enzymu esterazy, chociaż w każdym z regionów jeden wariant występował z przeważającą częstością (tab. 20). Oczekiwana i obserwowana wartość heterozygotyczności wynosiła 0,000 dla

Tabela 19

Segregacja allozymów z tkanki makrogametofitu heterozygotycznych klonów, test Chi-kwadrat zgodności segregowania i heterogeniczności
 Segregation of allozymes from macrogametophytes of heterozygous clones, Chi-square test for goodness-of-fit and heterogeneity over clones

Strefy enzymatyczne Enzyme loci	Nr klonu Clone no.	Wzór segregacji Segregation pattern					Odchylenie Deviation		Heterogeniczność Heterogeneity	
		1	2	3	4	5	χ^2	prawdopodob. probability	χ^2	prawdopodob. probability
Esteraza A	02-12	15	—	13	—	—	0,143	0,50 - 0,75	—	—
	10-16	38	—	38	—	—	0,000	0,995	—	—
	suma joint	53	—	51	—	—	0,038	0,75 - 0,90	0,105	0,50 - 0,75
	15-88	35	—	—	—	26	1,328	0,10 - 0,25	—	—
	02-17	—	—	16	—	21	0,676	0,25 - 0,50	—	—
Esteraza B	10-26	23	—	—	27	—	0,320	0,50 - 0,75	—	—
	15-88	26	—	—	35	—	1,328	0,10 - 0,25	—	—
	suma joint	49	—	—	62	—	1,523	0,10 - 0,25	0,125	0,50 - 0,75
	10-16	—	41	35	—	—	0,474	0,25 - 0,50	—	—
	02-11	—	14	—	13	—	0,037	0,75 - 0,90	—	—
	10-27	—	15	—	13	—	0,143	0,50 - 0,75	—	—
	suma joint	—	29	—	26	—	0,164	0,50 - 0,75	0,016	0,90 - 0,95
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Esteraza D	15-17	17	13	—	—	—	0,800	0,25 - 0,50	—	—
	15-65	10	14	—	—	—	0,667	0,25 - 0,50	—	—
	suma joint	27	27	—	—	—	0,000	0,995	1,467	0,10 - 0,25
	10-01	14	—	19	—	—	0,758	0,25 - 0,50	—	—

monomorficznego wariantu kwaśnej fosfatazy. Dla trzech stref esterazy wartości oczekiwanej heterozygotyczności wahały się od 0,118 do 0,444, a heterozygotyczność obserwowana była średnio o 50% niższa (tab. 20).

Tabela 20

Obserwowana proporcja heterozygot, częstość alleli i średnia oczekiwana heterozygotyczności
Observed proportion of heterozygotes and allele frequencies, average expected heterozygosity and effective number of alleles

Strefa enzyma- tyczna Enzyme loci	h_{obs}	Częstość alleli Allele frequencies					h_{exp}
		1	2	3	4	5	
Esteraza A	0,167	0,813	0,083	0,063	0,021	0,021	0,327
B	0,208	0,042	0,229	0,021	0,708	—	0,444
D	0,125	0,938	0,042	0,021	—	—	0,118
ACPH	0,000	1,000	—	—	—	—	0,000
średnia average	$\bar{H}_0 = 0,125$						$\bar{H}_e = 0,222$

DYSKUSJA

Celem przedstawionych wyników badań było: poznanie przebiegu procesu zapylania, megasporogenezy, zapłodnienia i rozwoju zarodka w związku z powstaniem pustych nasion u modrzewia oraz ustalenie genetycznych przyczyn tego zjawiska na podstawie wyników kontrolowanego krzyżowania i badań enzymatycznych. Poniżej omówiono je w tej właśnie kolejności.

ZAPYLANIE

Wśród czynników związanych z pyleniem, a wpływających na produkcję pełnych nasion, analizowano trzy: synchronizację pylenia i receptywności kwiatów żeńskich, wpływ obfitości zapylania (mierzonej procentem pełnych nasion przy różnej długości trwania zapylania kwiatów żeńskich) oraz skuteczności zapylania. Pierwszy z nich, synchronizacja procesu pylenia i receptywności kwiatów żeńskich, decyduje nie tylko o skuteczności zapylania, ale może mieć również znaczenie w związku z występowaniem naturalnego samozapylania.

Z obserwacji przeprowadzonych w 1983 roku wynika, że w warunkach plantacji nasiennej, początek pylenia i początek receptywności kwiatów żeńskich modrzewia europejskiego różnych pochodzeń mogą przypadać na ten sam dzień. W omawianym roku było to 5 kwietnia. Zarówno cały okres pylenia na plantacji, jak i okres pylenia na poszczególnych osobnikach były krótsze od długości trwania receptywności kwiatów żeńskich. Stwierdzone międzyklonalne różnice w rozpoczynaniu i długości trwania obu tych stadiów są efektem normalnej zmienności międzyosobniczej, obserwowanej także przez innych autorów na modrzewiu (np. Šindelař i Musil 1970) i innych gatunkach drzew iglastych (np. Jonsson i inni 1976, Wesoły 1982). Natomiast różnice wewnątrzklonalne wydają się efektem czynników zewnętrznych, głównie mikroklimatycznych różnic między miejscami wzrostu szczyków na

plantacji. W sumie przytoczone obserwacje fenologiczne pozostają w zgodzie z wynikami innych autorów (Šindelař i Musil 1970, Šindelař 1972, Barner i Christiansen 1960, Leven 1951). Nieco krótszy w stosunku do nich okres pylenia i receptywności oraz mniejsze międzyosobnicze różnice mogą być efektem różnego zestawu badanych osobników (np. różne proveniencje), bądź też wynikiem różnic między aktualnymi warunkami klimatycznymi na wybranych powierzchniach doświadczalnych (Sarvas 1962, Jonsson i inni 1976). Ponieważ jednak okres pylenia pokrywa się z okresem receptywności kwiatów żeńskich, wydaje się, że obserwowane między- i wewnątrzklonalne różnice fenologiczne nie wpływają na skuteczność zapyłania – a przez to na powstanie pełnych nasion.

Jak wynika z licznych obserwacji, w tym na modrzewiu europejskim, negatywny wpływ na powstawanie pełnych nasion ma samozapylenie i samozapłodnienie. W tym kontekście pewien problem będzie stanowiła synchronizacja pylenia i receptywności kwiatów żeńskich u pojedynczych osobników. U sosen, gdzie kropelkowy mechanizm zapyłania faworyzuje pyłek wcześniej osiagający mikropyle (Sarvas 1962, Franklin 1974) synchronizacja taka może wpływać na zwiększenie samozapylenia i tą drogą redukować liczbę pełnych nasion. Według niektórych autorów samozapyleniu sprzyja szczególnie protandria (Nilsson 1981). U modrzewia częściej obserwowano jednak protogynię (Langner 1951, Laing 1944, Syrach Larsen 1956, Šindelař i Musil 1970). Na plantacji w Kórniku protogynia obserwowana była na 16 szczepach, a protandria na 11. Na 2 osobnikach pylenie i receptywność rozpoczynały się tego samego dnia. Tylko na dwóch szczepach pylenie kończyło się przed rozpoczęciem receptywności i tylko na tych szczepach samozapylenie ograniczone było do minimum (ryc. 3). W pozostałych przypadkach samozapylenie jest możliwe, tym bardziej że przeciwnie niż u sosen pewna asynchronizacja pylenia i receptywności nie ma u modrzewia tak wielkiego znaczenia. Wynika to z odmiennego mechanizmu receptywności, dostosowanego do długotrwałego zbierania pyłku. Tak więc duży procent pustych nasion może być również w części efektem degeneracji zarodków powstałych wskutek samozapłodnienia, a wcześniej samozapylenia. Przedstawione wyniki obserwacji fenologii zapyłania i receptywności kwiatów żeńskich nasuwają pytanie, jaki jest bezpośredni wpływ długości trwania zapyłania na powstawanie pełnych nasion.

Zgodnie z oczekiwaniami, długość okresu zapyłania nie wpłynęła na ogólną liczbę nasion w szyszce, jak to ma miejsce np. u sosen (McWilliam 1959, Sarvas 1962, Bramlett 1974, Plym Forshell 1974). Jest to związane z faktem, że u modrzewia puste nasiona rozwijają się do normalnych rozmiarów nawet w braku zapyłania (Barner i Christiansen 1960, Hall i Brown 1977, Owens i Molder 1979b).

Natomiast zaznaczył się wpływ długości zapyłania kwiatów żeńskich na liczbę pełnych nasion u wszystkich obserwowanych klonów. Im dłuższy był okres ekspozycji kwiatów żeńskich dla zapyłania, tym większy był procent pełnych nasion. Średni procent pełnych nasion uzyskanych w obu wariantach zapyłania przez 1 - 10 dni był wyższy od średniej przy zapyłaniu przez jeden dzień w omawianym okresie (tab. 5). Większy wpływ zapyłania w pierwszej połowie analizowanego okresu mógł być związany z korzystniejszymi warunkami atmosferycznymi dla rozprzestrzeniania

pyłku (brak opadów i wyższe temperatury powietrza) lub efektem istniejącej naturalnej zmienności intensywności pylenia w całym okresie kwitnienia, jak to wykazał dla modrzewia syberyjskiego Sarvas (1955). Odchylenia od tego ogólnego obrazu, szczególnie w przypadku jednego z klonów K-15-88 mogą wynikać z faktu, że efektywność wolnego zapylenia zależy nie tylko od podaży pyłku, ale także od synchronizacji pylenia i receptywności kwiatów żeńskich (Barner i Christiansen 1960, Yokoyama i inni 1973). Można jednak powiedzieć, że mechanizm zapylenia u modrzewia podobnie jak u daglezi, dostosowany jest do akumulacji stosunkowo dużej liczby pyłków w ciągu kilku dni pylenia (Barner i Christiansen 1960, Owens i inni 1981).

Zarówno wyniki obserwacji fenologicznych, jak i omówiony wyżej wyraźny kumulujący się w ciągu kilku dni wpływ zapylenia na powstawanie pełnych nasion, pozostają w sprzeczności z obserwacjami Villara i innych (1984). Stwierdzili oni, że u modrzewia japońskiego okres efektywności zapylenia jest bardzo krótki i trwa nie więcej niż jeden dzień. Jest to związane z krótkim okresem receptywności kwiatów żeńskich, a szczególnie z zachowaniem się włosków pokrywających szczyt osłonki. Do włosków tych przytwierdzają się spadające między łuski nasienne ziarna pyłku. Ich zaginanie się do wnętrza kanału mikropylarnego już w ciągu jednego dnia od momentu rozchylenia, zahamowuje dalsze możliwości wnikania pyłku do kanału mikropylarnego. Wyniki te dotyczą jednak doświadczenia przeprowadzonego w warunkach kontrolowanych, co nie musi znajdować potwierdzenia w warunkach naturalnych.

Wreszcie trzecim analizowanym czynnikiem związanym z pyleniem, a wpływającym na produkcję pełnych nasion, jest skuteczność zapylenia. Jak wynika z obserwacji przeprowadzonych na plantacji nasiennej, liczba zapylnych zalążków w zależności od roku i klonu wahała się od 60 do 99% (tab.7). Średnio więc zakłócenia w zapyleniu redukują potencjalną liczbę pełnych nasion o blisko 20%. Dane te wskazują na nieco tylko większą skuteczność wolnego zapylenia niż to wykazali Barner i Christiansen (1960) i Kaji (1974) dla modrzewia japońskiego. Natomiast znacznie większą skuteczność zapylenia u tego ostatniego gatunku obserwowali Yokoyama i inni (1975). Według nich 98 - 100% zalążków zapylnych zostaje już w ciągu jednego dnia, kiedy ma miejsce maksymalne pylenie. Jednocześnie warto zaznaczyć, że skuteczność kontrolowanego zapylenia jest z reguły mniejsza i w badaniach różnych autorów wahała się od 7% do wyjątkowo 80% zalążków (Barner i Christiansen 1960, Hall i Brown 1977, Yokoyama i Kaneko 1979). Może to być jedną z przyczyn mniejszej produkcji pełnych nasion w wyniku kontrolowanego zapylenia w porównaniu z wolnym zapyleniem (Kosiński 1981).

Skuteczność zapylenia w dwóch kolejnych latach ulegała zmianie (tab. 7). Mogło to być związane zarówno z obfitością kwitnienia męskiego, jak i warunkami atmosferycznymi w okresie pylenia w obu tych latach. Podobną zmienną skuteczność zapylenia w różnych latach wykazywano również dla innych gatunków, między innymi dla modrzewia japońskiego (Kaji 1974), sosny zwyczajnej i świerka pospolitego (Sarvas 1955, 1962, 1968). Natomiast brak istotnych różnic w zapyleniu daglezi wykazał Ho (1980).

Tabela 21

Macierz współczynników korelacji procentów pełnych nasion, między ocenami skuteczności zapylenia, liczby rodni w zalążku oraz skuteczności zapłodnienia

Correlation coefficients for full seed percentage, between efficiency of pollination, number of archegonias per ovules and efficiency of fertilization

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	% zapylnych zalążków (OP) % pollinated ovules	—	0,1411	0,7018	−0,4470	0,5683	0,3435	0,7727	0,5956
2	% zapylnych zalążków (SP) % pollinated ovules			0,5926	0,0614	−0,3302	0,5689	0,5277	−0,5681
3	ziaren pyłku w zalążku (OP) pollen grains per ovules				−0,4271	0,1974	−0,4050	0,6906	0,2401
4	rodni w zalążku archegonia per ovules					0,2615	−0,2249	−0,6268	−0,6603
5	zapłodnień w zalążku (OP) fertilization per ovules						0,2662	−0,0616	0,4515
6	zapłodnień w zalążku (SP) fertilization per ovules							0,1898	0,4920
7	% pełnych nasion (OP) % full seed								0,8370 ^{0,01}
8	% pełnych nasion (SP) % full seed								—

OP — wolne zapylenie (open pollination)

SP — samozapylenie (self-pollination)

Istnienie bezpośrednich zależności między skutecznością zapylenia a liczbą pełnych nasion wykazał dla sosny zwyczajnej i świerka pospolitego Sarvas (1962, 1968). Podobną, choć statystycznie nieistotną zależność, stwierdzono u modrzewia europejskiego, gdzie w przypadku wolnego zapylenia ze wzrostem zapylnych załączków wzrastała liczba pełnych nasion ($r=0,77$, tab. 21). Brak takiej korelacji w warunkach samozapylenia ($r=-0,57$) świadczyłby, że również inne, prawdopodobnie genetyczne czynniki są podstawową przyczyną redukcji liczby pełnych nasion.

Oprócz efektywności zapylenia mierzonej liczbą zapylnych załączków, na zawiązywanie pełnych nasion pewien wpływ wywiera również liczba pyłków w załączku. Relacja ta w przedstawionych badaniach nie była tak jednoznaczna ($r=0,69$, tab. 21). Wynika to z faktu, że obserwowane różnice międzyklonalne w liczbie ziaren pyłku w załączku były stosunkowo małe. Natomiast duże różnice zanotowano w obu latach obserwacji. W 1979 roku liczba ziaren pyłku w załączku wyniosła średnio 2,2, ale aż 3,7 w 1980 roku (tab. 6). Większa liczba ziaren pyłku dostępnych w procesie zapłodnienia umożliwia redukcję negatywnego wpływu nieżywotnego pyłku oraz dzięki powszechnie występującej u modrzewia poliembrionii, neutralizuje efekt negatywnego obciążenia genetycznego.

Z przedstawionych dotychczas rezultatów wynika praktyczny wniosek o możliwości zastosowania masowego dodatkowego zapylenia uprzednio wyselekcjonowanym i zebrany pyłkiem dla zwiększenia produkcji pełnych nasion na plantacjach nasiennych. Pozytywne efekty takiego zabiegu były już wielokrotnie przedstawiane (m.in. Van der Sijde 1971, Denison i Franklin 1975, Hadders 1977, Daniels 1978). Stosowanie dodatkowego masowego zapylenia na plantacjach modrzewia japońskiego zwiększyło liczbę pełnych nasion około dwukrotnie w stosunku do samego wolnego zapylenia (Yokoyama i inni 1973). Zapylenie takie mogłoby mieć szczególne znaczenie w latach kiedy niekorzystne warunki pogodowe i brak obfitego męskiego kwitnienia zmniejszają efektywność zapylenia.

MEGASPOROGENEZA, ZAPŁODNIENIE I ROZWÓJ ZARODKA

Obserwacje rozwoju żeńskiego gametofitu, zapłodnienia oraz rozwoju zarodka pozwoliły na ustalenie kolejnych po braku zapylenia, etapów powstawania pustych nasion. Ponieważ cały proces rozmnażania generatywnego wydaje się niezwykle ważnym z punktu widzenia rozwoju nasion, a dane literaturowe są często fragmentaryczne, postanowiono przedyskutować, obok zakłóceń rozwojowych, również niektóre obserwacje fenologiczne i anatomiczne rozwijających się gametofitów i zarodków.

Fenologia rozwoju żeńskiego gametofitu różniła się w dwóch latach obserwacji. W roku 1979 rozwój zaczynał się około tydzień wcześniej i trwał o około 5 dni krócej niż w roku 1980. Świadczy to, że nie tylko fotoperiod – jak sugerują Owens i Molder (1979b) – ale również temperatura może być czynnikiem regulującym rozwój gametofitu. Potwierdzałyby to również fakt przyspieszenia rozwoju przez stosowanie izolatorów, zmieniających temperaturę wokół izolowanych kwiatów (Kosiński 1981). W warunkach naturalnych pierwsze obserwowane stadia rozwoju – mejoza

komórek macierzystych megaspory – towarzyszą procesowi pylenia, tak jak to ma miejsce u *Larix occidentalis* i *L. leptolepis* (Owens i Molder 1979b, Yokoyama 1973). Po około 3 - 4 tygodnie trwającym stadium wolnych jąder, tygodniowym stadium formowania ścian komórkowych oraz 1 - 2-tygodniowym formowaniu i rozwoju rodni, gametofit osiąga pełną dojrzałość, a komórka jajowa rodni staje się zdolną do zapłodnienia (Fot. 1 - 6, Ryc. 8 - 10). Podobne obserwacje fenologii rozwoju przedstawiła dla modrzewia europejskiego Buczkowska (1976) i częściowo Smólska (1927), oraz dla *L. occidentalis* i *L. leptolepis* Owens i Molder (1979b) i Yokoyama (1973). We wszystkich stadiach rozwojowych występowały niewielkie różnice wewnątrz- i międzyklonalne, a cały rozwój przyspieszało izolowanie kwiatów żeńskich w okresie przed i w trakcie mejozy komórek macierzystych megaspory. Obserwacje te pozostają w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez Erikssona (1968a), świadczącymi o zróżnicowanym zaawansowaniu mejozy komórek macierzystych megaspor w jednym kwiatostanie u modrzewia europejskiego.

Obserwacje fenologiczne nabierają ważności w kontekście ewentualnego wpływu różnic w tempie rozwoju żeńskiego gametofitu na zapłodnienie, a przez to na zawiązywanie pełnych nasion. Uważa się, że zarówno w niedojrzałych, jak i w przejrzalnych rodniach, komórki jajowe są niezdolne do przyjęcia męskiej gamety (Rodkiewicz 1984). Z przedstawionych obserwacji na analizowanych klonach modrzewia europejskiego wynika, że proces kiełkowania pyłku i osiągnięcia pełni rozwoju przez komórki jajowe jest u tego gatunku dobrze zsynchronizowany. Ma to miejsce pomimo tego, że rozwój rodni jak i zapłodnienie nie przebiegają we wszystkich nasionach jednocześnie, jak to sugeruje Smólska (1927).

Fenologiczne różnice w rozwoju zarodków są konsekwencją różnic w rozwoju gametofitu i czasie zapłodnienia, a częściowo również w długości trwania poszczególnych stadiów. Wydaje się jednak, że pozostają one bez związku z powstawaniem pełnych nasion.

Chociaż ogólny obraz rozwoju żeńskiego gametofitu, zapłodnienia i rozwoju zarodka pozostają w zgodzie z mniej czy bardziej dokładnymi obserwacjami przeprowadzonymi głównie na *L. decidua*, *L. occidentalis* i *L. leptolepis*, to w niektórych szczepach stwierdzono istotne różnice.

W wyniku mejozy komórki macierzystej megaspory bardzo często powstają tylko 3 megaspory, jako efekt braku podziału w jednej z dwóch komórek siostrzanych powstałych po pierwszym podziale mejotycznym. Podobny rozwój tylko trzech megaspor obserwował dla *L. leptolepis* Yokoyama (1973). W dalszym rozwoju funkcjonalną megasporą pozostaje tylko jedna, znajdująca się od strony chalazalnej załączka (fot. 2), jak to również podają Rohr i Bonga (1984), a nie od strony bieguna mikrocylnego (Buczkowska 1976).

Stadium wolnojądrowe oraz formowanie ścian komórkowych nie różni się zasadniczo od szczegółowego opisu dla *L. occidentalis* (Owens i Molder 1979b). Natomiast powstała po podziale komórki inicjalnej rodni komórka szyjki, wskutek dalszych podziałów prowadzi do uformowania nawet 8-komórkowej szyjki, a nie tylko 4-komórkowej, jak to podają dla *L. decidua* Smólska (1927) i Håkansson (1960).

W zależności od klonu, liczba rodni w załączku wynosi najczęściej 3 lub 4, chociaż sporadycznie stwierdzono obecność nawet 6 rodni w załączku. Z dwuletnich obserwacji wynika, że cecha ta jest stabilną na analizowanych klonach (tab. 9, ryc. 11).

Kiełkowanie pyłku ma miejsce na szczycie ośrodka, a proces zapłodnienia nie odbiega od opisów przedstawionych dla modrzewi przez innych autorów. Często więcej niż jeden pyłek kiełkuje na ośrodku i 1-5 komórek jajowych jest zapładnianych (tab. 11, ryc. 18). Zależy to od skuteczności zapylenia i żywotności pyłku, gdyż jak podaje Kaji (1974) dla *L. leptolepis*, w normalnym roku zwykle wszystkie komórki jajowe są zapładniane.

Również rozwój zarodków nie odbiega od szczegółowych opisów podawanych dla *L. decidua* przez Wójcickiego (1923), Schopfa (1943), Håkanssona (1960) i Halla i Browna (1977) oraz dla *L. occidentalis* (Owens i Molder 1979b). Nie stwierdzono występowania zarodków rozetowych oraz poliembrionii monozygotycznej. Obserwowano natomiast tzw. wstrzymaną poliembrionię monozygotyczną, będącą skutkiem nierównomiernego udziału komórek piętra zarodkowego w formowaniu zarodka (Schopf 1943). Zapłodnienie większej liczby komórek jajowych w jednym załączku prowadzi do rozwoju kilku zarodków, czyli tzw. poliembrionii polizygotycznej. W takich przypadkach tylko jeden zarodek osiąga dojrzałość, a pozostałe degenerują we wczesnych fazach rozwoju.

Szczególnie interesujące z punktu widzenia produkcji pełnych nasion są niektóre obserwacje związane z liczbą uformowanych rodni, zapłodnionych komórek jajowych oraz występowaniem poliembrionii.

Większa liczba rodni w załączku wydaje się korzystna dla zapłodnienia większej liczby komórek jajowych i w ten sposób zwiększania prawdopodobieństwa uformowania dojrzałego zarodka. Przy średniej liczbie zapłodnień w zapyłonym załączku poniżej 2 (tab. 10), większa liczba rodni (średnio ok. 4) nie miała tu szczególnego znaczenia dla powstania większej liczby zarodków. Potwierdzają to niskie współczynniki korelacji liczby rodni w załączku i liczby zapłodnień w zapyłonych załączkach zarówno po wolnym zapyleniu ($r=0,26$) i kontrolowanym samozapyleniu ($r=-0,22$). Również ujemne współczynniki korelacji liczby rodni w załączkach z procentem pełnych nasion po wolnym i samozapyleniu ($r=-0,63$ i $r=-0,66$) wydają się potwierdzać, że liczba rodni w badanych klonach nie wpływa pozytywnie na produkcję pełnych nasion (tab. 21).

Nieco inaczej przedstawia się natomiast wpływ poliembrionii na powstawanie pełnych nasion. W przypadku wolnego zapylenia większa liczba zapłodnień w załączku i w konsekwencji poliembrionia nie wpływały na zwiększenie procentu pełnych nasion ($r=-0,06$). Należałoby oczekiwać, że poliembrionia pozwalałaby na zneutralizowanie negatywnego wpływu naturalnego samozapylenia oraz ujawnianie negatywnego obciążenia genetycznego przy krzyżowaniu niekrewniaczym. Zjawisko to jednak nie występuje. Natomiast gdy mamy do czynienia z kontrolowanym samozapyleniem, poliembrionia stwarza większe prawdopodobieństwo, że co najmniej 1 zarodek osiągnie dojrzałość. W jakimś stopniu potwierdza to stosunkowo wyższy niż przy wolnym zapyleniu, chociaż również statystycznie nieistotny współczynnik korelacji liczby zapłodnień w załączku i procentu pełnych nasion ($r=0,49$, tab. 21).

Korelacja ta mogłaby być wyraźniejsza, gdyby różnice w liczbie zapłodnień w załączku między badanymi klonami były wyższe od tych, które uzyskano w przeprowadzonych doświadczeniach.

Jednak głównym celem mikroskopowych obserwacji procesu rozmnażania było ustalenie, na których etapach i w jakich rozmiarach występują zakłócenia rozwojowe prowadzące do powstawania pustych nasion, zarówno po wolnym jak i samozapyleniu. Podobną próbę podjęli Hall i Brown (1977) dla ustalenia czynników wpływających na powstawanie pustych nasion w intra- i interspecyficznym krzyżówkach *L. decidua* i *L. leptolepis*. Doświadczenie to obejmowało tylko po jednym klonie z każdego gatunku. Nie uwzględniono również obserwacji samozapylenia, które wydaje się decydujące dla ustalenia ściśle genetycznych przyczyn powstawania pustych nasion.

Dyskutowana już wcześniej nieskuteczność zapylenia jest pierwszym etapem redukcji liczby pełnych nasion, średnio o ok. 20% (tab. 15).

Drugim w kolejności jest degeneracja żeńskich gametofitów (fot. 7 - 11), jak dotychczas nie rozpatrywana szczegółowo w badaniach nad modrzewiem, z wyjątkiem wzmianki Owensa i Molder (1979b) dla *L. occidentalis* i Kaji (1974) dla *L. leptolepis*. Sarvas (1962) w swoich badaniach nad sosną zwyczajną podkreśla, że duża część (nawet do 3/4) łusek nasiennych, szczególnie u nasady szyszki, pozostaje sterylna. Towarzyszy temu jednak zahamowanie rozwoju całego załączka. Natomiast u modrzewia można było zauważyć degenerację żeńskich gametofitów na różnych etapach rozwoju, bez jednoczesnych zaburzeń w rozwoju całego załączka. Bardzo często degeneracja zachodziła w jednym załączku, podczas gdy w drugim z tej samej łuski nasiennej rozwój przebiegał bez zakłóceń. Co więcej miało to miejsce w środkowej części szyszki, co wskazuje na inne niż u sosny przyczyny tego zjawiska. Wydaje się, że wchodzi tu w grę przede wszystkim czynniki klimatyczne. Mogą nimi być przymrozki, powodujące przemarzanie części załączków w trakcie mejozy komórki macierzystej megaspory. W takim przypadku degeneracja gametofitu może nastąpić natychmiast, bądź zakłócenia występują na dalszych etapach rozwoju gametofitu, nie wstrzymując rozwoju ośrodka i osłonek, bądź samych osłonek. Inną przyczyną zakłóceń w rozwoju żeńskiego gametofitu może być niewystarczające dostarczanie substancji pokarmowych do rozwijających się załączków. Średnio degeneracja w rozwoju gametofitów u badanych klonów zwiększała o około 10% liczbę pustych nasion (tab. 15).

Następnym obserwowanym czynnikiem znacznie zwiększającym liczbę pustych nasion okazał się brak zapłodnienia, stwierdzony w zależności od klonu i sposobu zapylenia u 7 - 33% zapylnych załączków. Powodował on redukcję pełnych nasion o kolejne 4 - 27% (tab. 15). Brak zapłodnienia miał dwie przyczyny: zakłócenia w procesie przemieszczania się pyłku z kanału mikropylarnego na szczyt ośrodka oraz brak kielkowania części pyłków na ośrodku. Pierwsza z nich — zakłócenia w przemieszczaniu pyłku na ośrodek — była u modrzewi wielokrotnie obserwowana (Doyle i O'leary 1935, Barner i Christiansen 1960, Hall i Brown 1977). Biorąc pod uwagę mechanizm przemieszczania się pyłku na ośrodek, polegający na wydzielaniu płynu przez komórki szczytu ośrodka (Barner i Christiansen 1960,

Kaji 1974, Hall i Brown 1977), prawdopodobnym wydaje się, że skuteczność tego transportu może być związana z warunkami pogodowymi panującymi w tym okresie. Wystąpienie suszy może powodować przesuszanie kanału mikropylarnego w części zalążków i zahamowanie transportu pyłku na ośrodek, uniemożliwiając przez to zapłodnienie (Barner i Christiansen 1960). Wpływ warunków pogodowych na przenoszenie pyłku na ośrodek sugerują również obserwacje Sarvasa (1962, 1968) nad sosną zwyczajną i świerkiem pospolitym.

Natomiast zakłócenia w kiełkowaniu pyłku na ośrodku były jak dotąd podawane tylko przez Halla i Browna (1977), w procesie wewnątrz- i międzygatunkowego krzyżowania modrzewia japońskiego i europejskiego. Brak kiełkowania mógłby być interpretowany jako wyraz swego rodzaju niezgodności, zbliżonej do tej, która występuje powszechnie u *Angiospermae*. Jednak niezgodność ta powinna się ujawniać szczególnie w przypadku samozapylenia. Natomiast z moich obserwacji wynika, że brak kiełkowania miał miejsce częściej po wolnym niż po samozapyleniu (tab. 13). Wydaje się, że u modrzewia nie istnieją mechanizmy niezgodnościowe zapobiegające kiełkowaniu pyłku. Brak kiełkowania był więc, jak to sugerują również Hall i Brown (1977), raczej spowodowany często występującą u modrzewi nieżywotnością pyłku (m.in. Eriksson 1968 a, Chandler i Mavrodineanu 1965). Warto tu jeszcze zaznaczyć, że podobny brak mechanizmów niezgodnościowych na etapie przed zapłodnieniem stwierdzono również u innych gatunków drzew iglastych (Bingham i Squillace 1955, Orr-Ewing 1957, Barnes i inni 1962, Sarvas 1962, 1968, Hagman i Mikkola 1963, Mergen i inni 1965, Plym Forshell 1974). Istnienie, czy też raczej brak mechanizmów niezgodnościowych, jest szczególnie ważne z punktu widzenia konkurencji własnego i obcego pyłku w procesie naturalnego zapylenia i powstawania pełnych nasion oraz wsobnego potomstwa (Matheson 1980).

Ostatnim z obserwowanych etapów powstawania pustych nasion jest degeneracja zarodków. Ma ona miejsce we wczesnych fazach rozwoju zarodka, od stadium prazarodka do wrastania zarodków do szczytu szczeliny korozyjnej (fot. 17 - 20). Przy czym degeneracja występuje znacznie częściej po samozapyleniu (85 - 100% nasion z zarodkami) niż po wolnym zapyleniu (47 - 75%). W niektórych przypadkach prowadziła do kompletnej sterylności nasion (tab. 14 i 15). Obserwacje te pozostają w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami na modrzewiach (Håkansson 1960, Kaji 1974, Hall i Brown 1977, Owens i Mølder 1979b) i innych gatunków drzew iglastych (m. innymi Sarvas 1962, 1968, Hagman i Mikkola 1963, Mergen i inni 1965, Plym-Forshell 1974, Yokoyama 1977).

Wydaje się, że istnieją zasadniczo dwa powody degeneracji zarodków. Pierwszy z nich wynika z przyczyn fizjologicznych. Możliwe jest, że część szyszek na drzewie i część nasion w szyszce może rozwijać się w pozycji nie zapewniającej prawidłowego odżywiania, a wskutek tego przyhamowany zostaje rozwój zarodka. Może to być przyczyną stwierdzonej różnicy w procencie degenerujących zarodków na tych samych klonach w różnych latach.

Drugim powodem degeneracji zarodków są z pewnością przyczyny genetyczne. Powszechnie uważa się, że degeneracja jest efektem ujawniania się negatywnego obciążenia genetycznego wskutek homozygotyzacji letalnych i subletalnych recesyw-

nych genów — opisywanych w literaturze jako zarodkowe czynniki letalne (embryonic lethals). Na istnienie tych genów/czynników jako przyczyn sterility nasion u modrzewia zwracają uwagę m.in. Håkansson (1960) oraz Hall i Brown (1977). Ich działanie wyrażałoby się szczególnie w momencie, gdy rozwijający się zarodek zmuszony jest czerpać substancje pokarmowe z haploidalnej tkanki prabielpa. Hall i Brown (1977) sugerują, że w tym okresie geny (czynniki) letalne mogą wpływać hamująco na wzrost suspensora albo powodować niezgodność uruchomienia substancji pokarmowych z prabielpa. Obserwowana w moich badaniach intensywna degeneracja zarodków w tym właśnie okresie, wydaje się potwierdzać powyższą hipotezę.

O ile homozygotyzacją czynników letalnych łatwo jest wytłumaczyć dużą degenerację zarodków w wyniku samozapylenia, o tyle trudniej jest to zrobić dla wolnego zapylenia. W tym ostatnim przypadku mogą istnieć dwie zasadnicze przyczyny. Po pierwsze znaczne rozmiary naturalnego samozapylenia. W jakimś stopniu usiłowane tego uniknąć, przez zbiór materiału do analiz ze szczytowych części korony, gdzie samozapylenie osiąga mniejsze rozmiary (Fowler 1965a, Franklin 1971, Hadders i Koski 1975). Drugą przyczyną może być homozygotyzacja genów letalnych, nawet podczas krzyżowania osobników niespokrewnionych. Mogłoby to mieć miejsce w przypadku, gdy w populacji występuje duża liczba różnych genów letalnych, lub też jest ich mniej, ale występują z dużą częstością.

Prawidłowość oceny znaczenia wszystkich omawianych czynników, począwszy od skuteczności zapylenia, przez degenerację żeńskich gametofitów, brak zapłodnienia aż po degenerację zarodków, na powstawanie pustych nasion, potwierdziła bezpośrednia obserwacja na ciętych w pełni rozwiniętych nasionach. Procent pełnych nasion uzyskany po odjęciu oszacowanych rozmiarów degeneracji na różnych etapach rozwoju korelował bardzo istotnie ($r=0,87$) z obserwowanym procentem pełnych nasion (tab. 15).

Obserwacje anatomiczne miały na celu ustalenie rozmiarów degeneracji nasion na różnych etapach rozwoju, a szczególnie wskutek zakłóceń w rozwoju zarodków. Natomiast dla ustalenia rozmiarów negatywnego obciążenia genetycznego, manifestującego się właśnie w trakcie rozwoju zarodków, szczególnie wskutek homozygotyzacji czynników letalnych po samozapyleniu, przeprowadzono w latach 1979 i 1980 doświadczenia z kontrolowanym krzyżowaniem.

OBCIĄŻENIE GENETYCZNE

Wyniki doświadczeń nad zawiązywaniem pełnych nasion po kontrolowanym i wolnym zapyleniu wskazują na duże międzyklonalne zróżnicowanie tej cechy. Ma ono podstawy zarówno fizjologiczne, jak i genetyczne. Te pierwsze są prawdopodobnie związane głównie z różnicami fizjologicznymi w procesie kwitnienia i zapylenia u modrzewia. Moment zapylenia może być bardziej lub mniej korzystny dla różnych klonów, co znajduje potwierdzenie w przedstawionych już wynikach doświadczeń nad wpływem zapylenia na zawiązywanie pełnych nasion. Czynniki te nabierają szczególnego znaczenia w warunkach zapylenia kontrolowanego, jak to

wykazali dla modrzewia europejskiego i japońskiego Barner i Christiansen (1960).

Obok przyczyn zewnętrznych i fizjologicznych, na plon pełnych nasion u drzew iglastych znaczny wpływ mają przyczyny genetyczne, znajdując szczególny wyraz podczas samozapylenia. Powoduje ono u większości z nich znaczny spadek liczby pełnych nasion (między innymi Sarvas 1962, Sorensen 1970, 1971, Koski 1971, 1973, Bramlett i Pepper 1974, Coles i Fowler 1976).

Modrzew europejski uważany jest przez większość autorów za gatunek prawie samosterylny, dający bardzo mało pełnych nasion po samozapyleniu, chociaż wskazuje się jednocześnie na duże indywidualne zróżnicowanie pod względem tej cechy (Langner 1951, Gothe 1952, Nilsson 1959, Dieckert 1964). Tylko Pjatnitzkij (1933) podaje, że z czterech samozapylanych modrzewi europejskich, tylko jeden dał mniej kiełkujących nasion w porównaniu z kontrolą z wolnego zapylenia.

Wśród modrzewi rosnących na plantacji nasiennej w Kórniku, liczba pełnych nasion po samozapyleniu nie przekraczała w większości przypadków 10% (tab. 16). Na tej podstawie można by zaliczyć modrzewia do gatunków prawie samosterylnych. Jednak właściwy obraz samosterylności, czy też samopłodności, daje dopiero porównanie liczby pełnych nasion po samozapyleniu i krzyżowaniu niekrewniaczym. Pozwala to w znacznym stopniu wyeliminować z rozważań wpływ czynników zewnętrznych, nie wynikających z obciążenia genetycznego. Ten sposób traktowania wyników wskazuje, że modrzew jest gatunkiem samopłodnym o stosunkowo znacznej zdolności do zawiązywania pełnych nasion nawet po samozapyleniu, a wyliczona relatywna samopłodność wyniosła w dwóch latach średnio 0,406 i 0,437 (tab. 18). Zbliżone wartości samopłodności wyliczono na podstawie danych liczbowych dla 4 drzew modrzewia japońskiego, podanych w publikacji Kaji (1974) – średnio 0,305 (0,000 - 0,854). Znacznie mniejszą samopłodność wynoszącą średnio 0,07 podaje dla tego gatunku Katsuta i inni (1979), oraz dla *Larix laricina* Park i Fowler (1982) – średnio 0,068.

Obniżona płodność towarzysząca samozapyleniu jest efektem negatywnego obciążenia genetycznego, ujawniającego się wskutek homozygotyzacji tak zwanych czynników letalnych powodujących śmierć zarodka. Do homozygotyzacji czynników letalnych może jednak dochodzić również w wyniku kojarzenia osobników niespokrewnionych. Interesującym jest więc porównanie stopnia płodności po samozapyleniu w stosunku do płodności towarzyszącej krzyżowemu i wolnemu zapyleniu. Mogłoby to pozwolić na ujawnienie wpływu obciążenia genetycznego na zmniejszenie plonu nasion w całej populacji. Z obserwacji nad *Picea glauca* (King i inni 1970), *Pinus sylvestris* (Sarvas 1962), *Picea abies*, a szczególnie *Larix decidua* (Dieckert 1964) wynika, że istnieje podobieństwo w liczbie pełnych nasion po samozapyleniu i zapyleniu krzyżowym. W ten sposób określona wysoka samopłodność koreluje z wysoką płodnością po zapyleniu krzyżowym. Stanowiło to podstawę dla wysunięcia wniosku, że także po zapyleniu krzyżowym, liczba pełnych nasion będzie proporcjonalna do liczby czynników letalnych (Plym Forshell 1974). Korelacje te wydają się jednak zależne od sposobu obliczania samopłodności i liczby czynników letalnych.

Przedstawione w tej pracy wyniki doświadczeń nad modrzewiem europejskim,

wskazują również na istnienie pozytywnej korelacji między procentem pełnych nasion po samozapyleniu oraz po krzyżowym i wolnym zapyleniu (odpowiednio $r=0,83$ i $r=0,83$, tab. 22). Jednak gdy jako miarę samopłodności przyjąć relatywną samopłodność (*RSP*), to jej korelacja z procentem pełnych nasion po krzyżowym i wolnym zapyleniu zanika (odpowiednio $r=0,11$ i $r=0,27$, tab. 22). Tak więc przy założeniu, że właściwą miarą samopłodności jest relatywna samopłodność, to omawiane kore-

Tabela 22

Macierz współczynników korelacji dla procentów pełnych nasion przy różnych systemach krzyżowania

Correlation coefficients of percentage of full seed after different kinds of controlled pollination

		1	2	3	4	5
1	RSP	—	0,5650	0,2100	0,1105	0,2715
2	% pełnych nasion (SP) % full seed			0,7562	0,8258 ^{0,01}	0,8337 ^{0,01}
3	% pełnych nasion (MIX) % full seed				0,6514	0,5118
4	% pełnych nasion (CC) % full seed					0,8767 ^{0,01}
5	% pełnych nasion (OP) % full seed					—

RSP – relatywna samopłodność (relative self-fertility)

MIX – mieszanina pyłków (mix-pollination)

OP – wolne zapylenie (open pollination)

SP – samozapylenie (self-pollination)

CC – krzyżowe zapylenie (cross-pollination)

lacje procentu pełnych nasion po różnych systemach zapylenia byłyby efektem wpływu czynników fizjologicznych, a w mniejszym stopniu genetycznych. Potwierdzałyby to obserwacje występowania różnic w procencie pełnych nasion na tych samych klonach w dwóch kolejnych latach, niezależnie od systemów zapylenia. W tym samym czasie i na tych samych klonach wartości relatywnej samopłodności ulegają tylko stosunkowo nieznacznym zmianom (tab. 16 i 18).

Z obserwacji tych wynika również wniosek, że dla obliczania obciążenia genetycznego, przynajmniej u modrzewia, właściwą podstawę stanowić będzie relatywna samopłodność (*RSP*) bądź relatywna samosterylność ($RSS = 1 - RSP$), a nie procent pustych nasion powstałych w wyniku samozapylenia. Taki sposób obliczania obciążenia genetycznego może prowadzić do jego zaniżenia w stosunku do wartości rzeczywistych, ale pozwala jednak wyeliminować wpływ czynników niegenetycznych.

Obliczanie liczby czynników letalnych na podstawie relatywnej samopłodności, według wzoru podanego przez Mortona i innych (1956) i stosowanego między innymi w genetyce człowieka, nie uwzględnia jednak faktu występowania u drzew iglastych zjawiska poliembrii, ograniczającej w pewnym stopniu ujawnianie się obciążenia genetycznego. Stąd też zaadaptowano dla tych celów wzór Koskiego (1971), zamieniając jednak podstawę dla obliczania liczby czynników letalnych z procentu pustych nasion po samozapyleniu na relatywną samosterylność (Kosiński 1981). Zastosowanie tego wzoru pozwala uwzględnić występowanie również u modrzewia poliembrii.

Obliczona w ten ostatni sposób liczba czynników letalnych powodujących śmierć zarodka u modrzewia europejskiego, wyniosła wśród badanych osobników od 2 do 7, a średnio 4,7 (tab. 18). W związku z niewielką średnią liczbą zarodków w załączku, wynoszącą tylko 1,7 — rezultaty otrzymane przy zastosowaniu przedstawionej metody obliczania niewiele odbiegają od wyliczonych na podstawie wzoru Mortona i innych (1956). Liczba czynników letalnych wahała się wtedy od 1,3 do 6,2 i średnio wyniosła 4,0. Przedstawione wyniki stawiają modrzew europejski wśród gatunków charakteryzujących się stosunkowo małym obciążeniem genetycznym na etapie powstawania nasion (patrz przegląd literatury), o prawie 50% mniejszym niż inne krajowe gatunki drzew iglastych.

Powstaje więc pytanie, w jaki sposób tak stosunkowo niskie obciążenie genetyczne wpływa na powstawanie dużej liczby pustych nasion po krzyżowaniu niekrewniaczym i wolnym zapyleniu. Brak korelacji między liczbą czynników letalnych oraz procentem pełnych nasion po obu tych systemach zapylenia (odpowiednio $r=0,098$ i $r=-0,175$) wskazuje, że ich liczba nie jest decydującą genetyczną przyczyną eliminacji zarodków poza samozapyleniem. Chociaż teoretycznie większa liczba czynników letalnych powiększa prawdopodobieństwo ich homozygotyzacji.

Natomiast ich liczba może być istotna podczas wolnego zapylenia przy dużych rozmiarach naturalnego samozapylenia. Może ono obejmować znaczny procent załączków, gdy uwzględni się fakt małej lotności ciężkiego pyłku modrzewiowego, nie posiadającego komór powietrznych, oraz brak systemów niezgodnościowych zapobiegających samozapyleniu i samozapłodnieniu. Następowaloby w ten sposób redukcja około 60% samozapylnych zarodków. Brak jest jednak do tej pory informacji na temat rozmiarów naturalnego samozapylenia u modrzewia europejskiego.

Także w przypadku krzyżowania niekrewniaczego, znaczna część nasion może być pustych wskutek śmierci homozygotycznych zarodków. Byłoby to możliwe przy założeniu, że ta niewielka liczba czynników letalnych jest jednak rozpowszechniona w całej populacji. Innymi słowy czynniki (geny) letalne wykazywały dużą częstość i małą zmienność w badanej populacji. W przypadku plantacji nasiennej, z której pobierano materiał do analiz obciążenia genetycznego, wydawało się to mało prawdopodobne, ponieważ obserwowane osobniki pochodziły z wyselekcjonowanych drzew doborowych rosnących w różnych miejscach występowania modrzewia europejskiego w Polsce. Uzasadnienia jednak dla możliwości małej zmienności czynników letalnych można było szukać na zasadzie analogii z polimorfizmem białek enzymatycznych badanych osobników (Sarvas 1962).

Dlatego też podjęto badania nad zmiennością genetyczną dwóch systemów enzymatycznych — kwaśnej fosfatazy i esterazy — w populacji modrzewia europejskiego, rosnącego na plantacji nasiennej.

BADANIA ENZYMATYCZNE

Polimorfizm genetyczny kwaśnej fosfatazy był przedmiotem wielu badań w ostatnich latach i w większości przypadków enzym ten uznawany był za bardzo polimorficzny (Lundkwist 1975, Mejnartowicz 1979, Witter i Feret 1979, Conkle

1981, Szmidt 1982). Tylko w odniesieniu do *Pinus resinosa* i *Thuja plicata* nie stwierdzono zmienności we wzorcu elektroforetycznym kwaśnej fosfatazy (Fowler i Morris 1977, Copes 1981). U modrzewia europejskiego rozdział tego enzymu z tkanki megagametofitu metodami elektroforetycznymi wykazał 4 strefy aktywności, z których jedna analizowana przez Mejnartowicza i Bergmanna (1975) kodowana jest przez jedno loci. Jednak w moich badaniach, wszystkie 24 klony charakteryzowały się brakiem zmienności we wzorze kwaśnej fosfatazy. Obserwowane różnice aktywności były prawdopodobnie rezultatem różnic w stadium rozwoju poszczególnych nasion. To przypuszczenie oparte jest na fakcie, że rozdział elektroforetyczny homogenatów uzyskanych z megagametofitów suchych nasion bez uprzedniego namoczenia i skielkowania dawał bardzo niewyraźny wzorec kwaśnej fosfatazy, a najbardziej anodowe prążki były całkowicie niewidoczne. Z drugiej strony próby uzyskane z nasion poddanych kiełkowaniu wykazywały najintensywniejsze barwienie. Podobne zmiany w intensywności barwienia w różnym stopniu kiełkowania nasion wykazał Conkle (1971).

Biorąc pod uwagę ograniczoną liczbę badanych klonów, obserwowany monomorfizm wzoru izoelektrycznego kwaśnej fosfatazy nie musi być reprezentatywny dla naturalnych populacji modrzewia europejskiego. Rozdział tego enzymu polegający na ogniskowaniu w punkcie izoelektrycznym, przeprowadzony na innych gatunkach drzew iglastych, dawał w rezultacie wysoce polimorficzne wzory (Szmidt 1982, Szmidt — niepublikowane). Natomiast kwaśna fosfataza w nasionach modrzewia europejskiego analizowana na podstawie elektroforezy skrobiowej wykazywała raczej małą zmienność (Majnartowicz i Bergmann 1975).

O ile mi wiadomo, do tej pory nie analizowano polimorfizmu esterazy u modrzewia europejskiego. U innych drzew iglastych enzym ten charakteryzował się dużym polimorfizmem zarówno przy wykorzystaniu metody elektroforezy, jak i ogniskowania w punkcie izoelektrycznym (między innymi Lundkvist 1977, Rudin i Ekberg 1978, Szmidt 1982, Witter i Feret 1979, Conkle 1981). Obecne badania wykazały, że również w przypadku modrzewia europejskiego, esteraza może być rozdzielona na szereg prążków różniących się punktem izoelektrycznym i aktywnością. Niestety niektóre prążki na żelu były zbyt słabo wybarwione i nie nadawały się do analizy. Na podobne kłopoty z barwieniem esterazy natrafili Rudin i Rasmuson (1973) w badaniach nad sosną zwyczajną. Stwierdzili oni, że niektóre prążki wybarwiały się słabo, gdy jako substratu używano α -naphtyl octanu. Użycie innych alternatywnych substratów znacznie polepszało intensywność barwienia prążków. Stąd możliwym jest pełniejszy obraz wzoru esterazy modrzewia europejskiego po zastosowaniu innych metod barwienia. Wzór segregacji wariantów esterazy występujących w strefach Est-A, -B i -D wykazuje dobrą zgodność ze stosunkiem 1 : 1 oczekiwanym dla heterozygoty (jeden locus/dwa allele). Jakkolwiek biorąc pod uwagę wieloprążkową naturę pewnych wariantów, to ostatnie stwierdzenie wydaje się nie najważniejsze w analizowanym przypadku. Podobną segregację kompleksowych wariantów esterazy stwierdzono u dwóch innych gatunków drzew iglastych (Witter i Feret 1979, Szmidt — niepublikowane). Jak zauważyli powyżsi autorzy, takie kompleksowe wzory enzymatyczne trudno jest wyjaśniać jako produkty pojedyn-

czego genu. Stąd też konieczne są bardziej dokładne biochemiczne analizy dla lepszego zrozumienia cząsteczkowej natury obserwowanych wariantów esterazy. Mimo to dobra powtarzalność otrzymanych rezultatów, a także mendlowska segregacja wariantów Est-A, -B i -D wskazuje na ich użyteczność jako genetycznych markerów dla modrzewia europejskiego.

Analiza zmienności genetycznej na badanej plantacji nasiennej potwierdza sugestie Mejnartowicza i Bergmanna (1975) o znacznej homozygotyczności modrzewia europejskiego. Średnie wartości obserwowanej i oczekiwanej heterozygotyczności były znacznie mniejsze niż wartości podawane dla innych gatunków drzew iglastych (Lundkvist 1979, Mejnartowicz 1979, Szmidt 1982). Podstawowym jednak celem badań enzymatycznych była próba analizy zmienności genetycznej modrzewia w kontekście obserwacji obciążenia genetycznego. Można oczekiwać, że rozmiary obciążenia genetycznego populacji mierzone obecnością czynników letalnych w stadium zarodka są w tym samym stopniu konsekwencją historii i biologii gatunku, co zmienność elektroforetyczna białek enzymatycznych. Koski (1973) sugeruje, że obecność genów letalnych w populacji jest związana z tendencją do utrzymania heterozygotyczności, a co za tym idzie większej zmienności.

Tabela 23

Heterozygotyczność oraz liczba zarodkowych czynników letalnych u niektórych gatunków drzew iglastych

Heterozygosity and the number of embryonic lethals in some species of conifers

Gatunek Species	Średnia oczekiwana heterozygotyczność Mean expected heterozygosity	Czynników letalnych Embryonic lethals	Autorzy References
<i>Pinus virginiana</i>	0,320 - 0,445 ¹	10,4	Witter i Foret (1979)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,331	10,0	Bramlett i Pepper (1974) Conkle (1979)
<i>Picea abies</i>	0,350	9,6	Sorensen (1969) Lundkvist (1979)
<i>Pinus silvestris</i>	0,313	9,4	Koski (1973) Mejnartowicz (1979)
<i>Pinus taeda</i>	0,282 - 0,362	8,5	Koski (1971) Conkle (1979)
<i>Pinus banksiana</i>	0,083 ²	5,4	Franklin (1970) Hamrick i inni (1979)
<i>Larix decidua</i>	0,222 0,125 ¹	4,6	Koski (1971) Kosiński i Szmidt (1984)
<i>Pinus resinosa</i>	0,0	0 (?)	Fowler i Morris (1977)

¹ – heterozygotyczność obserwowana (observed heterozygosity)

² – indeks polimorfizmu (index of polymorphism)

Jak wynika z opracowań Hamricka i innych (1979, 1981), gatunki charakteryzujące się dużym zasięgiem, wysoką płodnością, niekrewniaczym systemem rozmnażania, wiatropylne, o długim czasie trwania pokoleń i reprezentujące późne stadia sukcesji, wykazują wyższą zmienność genetyczną mierzoną stopniem polimorfizmu lub stopniem heterozygotyczności białek enzymatycznych. Modrzew euro-

pejski nie spełnia tych wszystkich warunków, kiedy porównywać go z niektórymi innymi gatunkami drzew iglastych, w tym np. sosną zwyczajną czy świerkiem pospolitym. Charakteryzuje się on mniejszym zasięgiem w porównaniu z tymi gatunkami. Mimo że jest gatunkiem wiatropylnym to fakt, że naturalne populacje modrzewia europejskiego zwykle tworzą niewielkie grupy rozproszonych drzew sprzyja wsobności. Również stosunkowo ciężki pyłek pozbawiony komór powietrznych zwiększa prawdopodobieństwo samozapylenia (Mejnartowicz i Bergmann 1975). Jest też modrzew gatunkiem reprezentującym wczesne stadia sukcesji. Wszystkie te czynniki sprzyjają więc mniejszej heterozygotyczności modrzewia europejskiego w porównaniu z wymienionymi wcześniej gatunkami.

Jeżeli więc, jak to sugeruje Koski (1973), obecność genów letalnych w populacji jest związana z tendencją do utrzymywania heterozygotyczności, to spodziewać się należy mniejszej liczby czynników letalnych w stadium zarodka u gatunków charakteryzujących się mniejszą heterozygotycznością. Niestety porównania takiego można dokonać tylko na ograniczonej liczbie gatunków drzew iglastych ze względu na brak danych o zmienności enzymatycznej wśród nielicznych gatunków przebadanych pod kątem wielkości obciążenia genetycznego. Zestawienie takie przedstawiono w tabeli 23.

Tabelę tę warto uzupełnić o obserwacje dokonane na *Pinus resinosa*. Gatunek ten charakteryzuje się wysoką samopłodnością i nie wykazuje wyraźnej depresji wsobnej, a więc jest prawdopodobnie w minimalnym stopniu obciążony genetycznie. Jednocześnie okazał się kompletnie homozygotyczny pod względem 9 analizowanych loci enzymatycznych (Fowler i Morris 1977).

Mimo więc skąpości materiału, można sugerować istnienie pozytywnej korelacji między stopniem heterozygotyczności na poziomie zmienności enzymatycznej a wielkością obciążenia genetycznego mierzonego liczbą czynników letalnych w stadium zarodkowym. Gatunki charakteryzujące się stosunkowo wysokim stopniem heterozygotyczności – *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies*, *Pinus silvestris*, *Pinus virginiana* czy *Pinus taeda* – wykazują też większą średnią liczbę czynników letalnych zarodkowo niż mniej heterozygotyczne *Larix decidua* i *Pinus banksiana*.

Ciekawe jest również porównanie średniej liczby czynników letalnych u modrzewi heterozygotycznych w co najmniej jednej z badanych stref enzymatycznych oraz całkowicie homozygotycznych. Spośród 11 klonów analizowanych w badaniach nad obciążeniem genetycznym, średnia liczba czynników letalnych u osobników heterozygotycznych wyniosła 5,7 w porównaniu z 3,8 u drzew kompletnie homozygotycznych.

Przytoczone rezultaty obserwacji zmienności enzymatycznej modrzewia europejskiego pozostają więc w dobrej zgodności z rezultatami badań obciążenia genetycznego. Jednocześnie potwierdzają one zasadność przypuszczenia, że duża liczba pustych nasion u modrzewia, mimo małej liczby czynników letalnych, może być jednak efektem obciążenia genetycznego. Jest to możliwe przy założeniu, że czynniki letalne występując u pojedynczych osobników w małej liczbie są jednak rozprzestrzenione w całej populacji. W takim przypadku eliminacja zarodków mogłaby następować również w wyniku krzyżowania niekrewniaczego. Założenie to zostało wcześniej

podane w wątpliwość (Kosiński 1981), ponieważ badane osobniki pochodziły ze sztucznie założonej populacji z wyselekcjonowanych drzew. Przedstawione wyniki badań enzymatycznych wskazują jednak, że nawet taka populacja może charakteryzować się małym polimorfizmem.

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki wskazują, że istnieją cztery główne czynniki wpływające na powstawanie pustych nasion u modrzewia. Pierwszym jest brak obfitego zapylenia, redukujący średnio o prawie 20% potencjalną liczbę pełnych nasion. Jego wpływ zneutralizować można stosując dodatkowe masowe zapylenie lub zabiegi mające na celu zwiększenie liczby męskich kwiatów. Są to głównie obrączkowanie, strangulacja i zaginanie pędów bądź wierzchołków drzew. Wszystkie one są stosunkowo łatwe do przeprowadzenia na plantacjach nasiennych. Następne dwa czynniki wpływające na produkcję pustych nasion działają między zapyleniem i zapłodnieniem. Są to zakłócenia w rozwoju gametofitu żeńskiego oraz brak zapłodnienia spowodowany unieruchomieniem pyłku w kanale mikropylarnym lub brakiem jego kiełkowania na osrodku. Zakłócenia w rozwoju gametofitu zwiększały liczbę pustych nasion średnio o blisko 10%. Wydaje się, że ich przyczyną mogą być zarówno niekorzystne warunki atmosferyczne (głównie przymrozki), jak i konkurencja pokarmowa między rozwijającymi się zalążkami a organami wegetatywnymi. Stąd też ten negatywny efekt można by zredukować przez wybieranie właściwych miejsc dla zakładania plantacji nasiennych oraz stosowanie właściwej uprawy, ewentualnie nawożenia. Brak kiełkowania pyłku w zapyłonych zalążkach, zwiększający liczbę pustych nasion nawet o średnio 20%, związany jest prawdopodobnie głównie z nieżywością pyłku. Jest ona spowodowana zakłóceniami w procesie mejozy komórek macierzystych pyłku, wywołanymi niskimi temperaturami. Unikać tego można również przez wybór stanowisk o korzystnych warunkach atmosferycznych dla zakładania plantacji nasiennych. I wreszcie ostatnim z wymienionych czynników zwiększających liczbę pustych nasion u modrzewia o średnio 30% jest degeneracja zarodków, spowodowana przyczynami genetycznymi. Szczególny wyraz znajdują one w przypadku samozapylenia, wywołując degenerację nawet 100% zarodków, jako efekt homozygotyzacji czynników (genów) letalnych. Duża liczba czynników letalnych w warunkach naturalnych prowadzi do eliminacji nasion powstałych wskutek wolnego samozapylenia. Biologicznym sensem tego zjawiska jest eliminacja wsobnego potomstwa. Z drugiej strony przy dużej liczbie czynników letalnych wzrasta prawdopodobieństwo ich homozygotyzacji podczas krzyżowania osobników niespokrewnionych, co też wpływa na zwiększenie liczby pustych nasion. Z tego punktu widzenia korzystną wydaje się selekcja klonów z małą liczbą czynników letalnych. Natomiast unikaniu samozapylenia, tak niekorzystnie wpływającego na produkcję pełnych nasion i jakość potomstwa, sprzyjać będzie (1) kontrolowane krzyżowe zapylenie, (2) dodatkowe masowe zapylenie wyselekcjonowanym pyłkiem, (3) zakładanie dwuklonowych plantacji nasiennych, na których jeden klon obficie kwitnący męsko służy głównie jako dostarczyiciel pyłku, a drugi wykorzystywany jest jako drzewo mat-

czyne, oraz (4) maksymalne rozdzielanie szczepów jednego klonu na plantacjach wieloklonowych, zakładanych w sposób systematyczny.

Dr. Marc Bonnet-Masimbertowi, Station d'Amélioration des Arbres Forestiers INRA, Francja, składam serdeczne podziękowania za dostarczenie odczynników niezbędnych do wykonania niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Przedstawione badania miały na celu poznanie rozmiarów oraz przyczyn powstawania pustych nasion u modrzewia europejskiego. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na wyselekcjonowanych klonach tego gatunku, rosnących na plantacji nasiennej w Kórniku.

Obserwacje procesu zapylenia, megasporogenezy, zapłodnienia i rozwoju zarodka pozwoliły ustalić rozmiary degeneracji nasion na różnych etapach ich rozwoju. Doświadczenia z kontrolowanym zapyleniem podjęto dla ustalenia genetycznych przyczyn powstawania pustych nasion, a badania enzymatyczne miały na celu próbę wyjaśnienia tego zjawiska w nawiązaniu do rozmiarów polimorfizmu genetycznego tego gatunku.

Przedstawione analizy nasuwają następujące wnioski:

1. Synchronizacja pylenia i receptywności kwiatów żeńskich sprzyja skutecznemu zapyleniu na plantacji nasiennej.

2. Im dłuższy jest okres zapylenia kwiatów żeńskich, tym większy jest procent pełnych nasion.

3. W warunkach wolnego zapylenia, jego skuteczność wahała się od 60% do 99%. Średnio brak zapylenia redukował potencjalną liczbę pełnych nasion o około 17%.

4. Na produkcję pełnych nasion pozytywny wpływ ma również zwiększanie liczby pyłków w załączku, redukując negatywny efekt nieżywotnego pyłku oraz dzięki istnieniu poliembrionii, neutralizując efekt negatywnego obciążenia genetycznego. Nie stwierdzono jednak istotnej korelacji między rozmiarami poliembrionii i produkcją pełnych nasion.

5. Zakłócenia w rozwoju żeńskiego gametofitu, spowodowane przyczynami fizjologicznymi, zwiększały średnio o 9% liczbę pustych nasion.

6. Spowodowane tymi samymi przyczynami zakłócenia w przemieszczaniu pyłku z kanału mikropylarnego na szczyt ośrodka oraz brak kiełkowania pyłku na ośrodku, zwiększały liczbę pustych nasion średnio o około 17%.

7. W warunkach wolnego zapylenia u 47 - 75% załączków degenerują zarodki zwiększając liczbę pustych nasion o średnio 30%. Degeneracja zarodków spowodowana jest przede wszystkim przyczynami genetycznymi.

8. W sumie po wolnym zapyleniu zaledwie 27% nasion jest pełnych.

9. Negatywny wpływ samozapylenia na produkcję pełnych nasion ujawniał się dopiero po zapłodnieniu, we wczesnych etapach rozwoju zarodka. W warunkach kontrolowanego samozapylenia degenerowały zarodki w 85 - 100% załączków.

10. Z 29 obserwowanych szczepów, tylko u 2 pylenie kończyło się przed rozpoczęciem receptywności kwiatów żeńskich, co ogranicza do minimum możliwość samozapylenia.

11. Pomimo dużej śmiertelności zarodków, wartości relatywnej samopłodności wskazują, że modrzew jest gatunkiem o stosunkowo dużej zdolności do zawiązywania pełnych nasion po samozapyleniu, w porównaniu z innymi gatunkami drzew iglastych.

12. Negatywne obciążenie genetyczne, mierzone liczbą czynników letalnych w stadium zarodka, jest stosunkowo niskie.

13. Duża liczba pustych nasion, przy małej liczbie czynników letalnych może być jednak efektem negatywnego obciążenia genetycznego, przy założeniu, że czynniki letalne mają dużą częstotliwość występowania i są rozprzestrzenione w całej populacji. Tak więc ich homozygotyzacja następuje nawet przy kojarzeniu osobników niespokrewnionych. Pozostaje to w zgodzie z obserwowaną małą zmiennością enzymatyczną modrzewia.

14. Zwiększeniu produkcji pełnych nasion sprzyjać będzie zakładanie plantacji w miejscach o korzystnych warunkach siedliskowych i atmosferycznych, stosowanie zabiegów zwiększających obfitość zapylenia, selekcja klonów o małym obciążeniu genetycznym oraz eliminacja samozapylenia przez zakładanie dwuklonowych plantacji nasiennych lub maksymalne rozdzielanie szczepów jednego klonu na plantacjach wieloklonowych.

Przekazano do druku w 1986 r.

LITERATURA

1. Allen G. S., Owens J. N., 1972. The life history of Douglas — fir. Can. Dep. Environ., Can. For. Serv., Ottawa, Ont.
2. Barner H., Christiansen H., 1960. The formation of pollen, the pollination mechanism, and the determination of the most favourable time for controlled pollinations in *Larix*. *Silvae Genet.* 9: 1 - 11.
3. Barnes B. V., Bingham R. T., Squillace A. E., 1962. Selective fertilization in *Pinus monticola* Dougl. II. Results of additional tests. *Silvae Genet.* 11 (4): 103 - 111.
4. Bingham R. T., Squillace A. E., 1955. Self-compatibility and effects of self-fertility in western white pine. *Forest Sci.* 1: 121 - 129.
5. Bishir J., Pepper W. D., 1977. Estimation of number of embryonic lethal alleles in conifers: I. Self-pollinated seed. *Silvae Genet.* 26 (1): 50 - 54.
6. Bramlett D. L., 1974. Seed potential and seed efficiency. Proc. of a Colloquium seed yield from southern pine seed orchards. Macon, Georgia, April 2 - 3, 1974: 1 - 7.
7. Bramlett D. L., Popham T. W., 1971. Model relating unsound seed and embryonic lethal alleles in self-pollinated pines. *Silvae Genet.* 20 (5 - 6): 192 - 193.
8. Bramlett D. L., Pepper W. D., 1974. Seed yield from a diallel cross in virginia pine. Proc. of Colloquium seed yield from southern pine seed orchards. Macon, Georgia, April, 2 - 3: 1974: 49 - 55.
9. Buczkowska B., 1976. Badania nad rozwojem gametofitu żeńskiego u *Larix europea* D. C. Praca magisterska wyk. w Zakł. Cytologii Roślin i Genetyki Uniwersytetu w Toruniu.
10. Camefort H., 1968a. Cytologie de la fécondation et de la proembryogenese chez quelques Gymnospermes. *Bull. Soc. Bot. Fran.* 115: 137 - 165.
11. Camefort H., 1968b. Sur l'organisation du neocytoplasme dans les proembryons bé-

- tranuclées du *Larix decidua* Mill. (*Larix europea* D. C.) et l'origine des mitochondries et des plastes de l'embryon chez cette espèce. Compt. Rendu. Acad. Sci. Paris 266: 88 - 91.
12. Chalupa V., 1964. Dynamika kvetení lesních dřevin. Práce Vyzkum. Ust. Lesn. ČSSR, 28: 139 - 173.
 13. Chandler C., Mavrodineanu S., 1965. Meiosis in *Larix laricina* Koch. Contr. Boyce Thompson Inst. 23 (4): 67 - 75.
 14. Christiansen H., 1960. On the effect of low temperature on meiosis and pollen fertility in *Larix decidua* Mill. Silvae Genet. 9 (3): 72 - 78.
 15. Christiansen H., 1972. On the development of pollen and the fertilization mechanism of *Larix* and *Pseudotsuga menziesii*. Silvae Genet. 21 (5): 166 - 174.
 16. Coles J. F., Fowler D. P., 1976. Inbreeding in Neighboring Trees in Two White Spruce Populations. Silvae Genet. 25 (1): 29 - 36.
 17. Conkle M. T., 1971. Isozyme aspecificity during germination and early growth of knobcone pine. — Forest Sci. 17: 494 - 498.
 18. Conkle M. T., 1981. Isozyme variation and linkage in six conifer species. Proc. of the Symp. on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects, July 27, 1979, Berkeley, California: 11 - 17.
 19. Copes D. L., 1981. Isoenzyme uniformity in western red cedar seedlings from Oregon and Washington. Can. J. For. Res. 11 (2): 451 - 453.
 20. Daniels J. D., 1978. Efficacy of supplemental mass-pollination in a Douglas-fir seed orchard. Silvae Genet. 27 (2): 52 - 58.
 21. Denison N. P., Franklin E. C., 1975. Pollen management. In: Seed orchards. Ed. by R. Faulkner. Forest Comm. Bull. 54: 92 - 100.
 22. Dieckert H., 1964. Einige Untersuchungen zur Selbsterilität und Inzucht bei Fichte und Lärche. Silvae Genet. 13 (3): 77 - 86.
 23. Dong Kwang Jo., Hyuk Min Kwon., Sun Ki Choi., Jong Han Kim., 1984. Pollen dispersal and effect of pollen density on seed production in *Larix leptolepis* seed orchard. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea 20: 58 - 64.
 24. Doyle J., O'leary M., 1935. Pollination in *Tsuga*, *Cedrus*, *Pseudotsuga* and *Larix*. Sc. Proc. Royal Dublin Soc. 21.
 25. Dyakowska J., 1936. Research on the rapidity of the falling down of pollen of some trees. Bull. Intern. Acad. Polon. Sci. Lett. Ser. Sci. Natur., Cracovie: 155 - 168.
 26. Ekberg I., Eriksson G., 1967. Development and fertility of pollen in three species of *Larix*. Hereditas 57: 303 - 311.
 27. Ekberg I., Eriksson G., Šulikova Z. I., 1968. Meiosis and pollen formation in *Larix*. Hereditas 59: 427 - 438.
 28. Eriksson G., 1968a. Meiosis and pollen formation in *Larix*. Thesis, 18pp. Stockholm.
 29. Eriksson G., 1968b. Temperature response of pollen mother cells in *Larix*, and its importance for pollen formation. Stud. For. Suec. 63.
 30. Eriksson G., Ekberg I., Jonsson A., 1970. Further studies on meiosis and pollen formation in *Larix*. Stud. For. Suec. 87.
 31. Fauvre-Duchartre M., 1970. Des ovules aux graines. Monographie 8. Masson et Cie, Paris.
 32. Florescu I., Balan I., Carabela S., 1960. Contributii la studiul fructificatiei la rîcelui (*Larix decidua* Mill.) din masivul Bucegi. Rev. Padurilor 75 (5): 264 - 268.
 33. Fowler D. P., 1965a. Effects of inbreeding in red pine. III. Factors affecting natural selfing. Silvae Genet. 14 (2): 37 - 46.
 34. Fowler D. P., 1965b. Effects of inbreeding in red pine, *Pinus resinosa* Ait. IV. Comparison with other Northeastern *Pinus* species. Silvae Genet. 14 (3): 76 - 81.
 35. Fowler D. P., Morris R. W., 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genic heterozygosity. Can. J. For. Res. 7 (2): 343 - 347.
 36. Franklin E. C., 1970. Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family *Pinaceae*. USDA Forest Service Res. Paper SE-61: 1 - 21.

37. Franklin E. C., 1971. Estimates of frequency of natural selfing and on inbreeding coefficient in Loblolly pine. *Silvae Genet.* 20: 194 - 195.
38. Franklin E. C., 1974. Pollination in Slash Pine: First Come, First Served. Proc. of a Colloquium Seed Yield from Southern pine seed orchards. Macon, Georgia, April 2 - 3, 1974: 15 - 20.
39. Gerlach D., 1972. Zarys mikrotechniki botanicznej. W-wa PWRiL.
40. Giertych M., 1965. Systematic lay-outs for seed orchards. *Silvae Genet.* 14: 91 - 94.
41. Giertych M., 1971. Systematic lay-outs for seed orchards. *Silvae Genet.* 20: 137 - 138.
42. Gothe H., 1952. Einige Kreuzungsversuch mit *Larix europea* D. C. Herkunft Schlitz und *Larix leptolepis* Gord. *Z. Forstgenetik Fortpflanzzücht.* 1 (4): 108 - 110.
43. Hadders G., 1977. Experiments with supplemental mass pollination in seed orchards of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Third World Cons. on Forest Tree Breeding, Canberra 1977*, 1 - 12.
44. Hadders G., Koski V., 1975. Probability of inbreeding in seed orchards. In: *Seed orchards*. Ed. by R. Faulkner. *Forest Comm. Bull.* 54: 108 - 117.
45. Hagman M., Mikola L., 1963. Observations on cross-, self-, and interspecific pollinations in *Pinus peuce* Griseb. *Silvae Genet.* 12 (3): 73 - 79.
46. Håkansson A. 1960. Seed development in *Larix*. *Bot. Not.* 113 (1): 29 - 40.
47. Hall J. P., Brown I. R., 1976. Microsporogenesis, pollination and potential yield of seed of *Larix* in NE Scotland. *Silvae Genet.* 25 (3 - 4): 132 - 137.
48. Hall J. P., Brown I. R., 1977. Embryo development and yield of seed in *Larix*. *Silvae Genet.* 26 (2 - 3): 77 - 84.
49. Hamrick J. L., Linhart Y. B., Mitton J. B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically - detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173 - 200.
50. Hamrick J. L., Mitton J. B., Linhart Y. B., 1981. Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. *Proc. Symp. on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects*. July 27, 1979, Berkeley, California. 35 - 41.
51. Hashizume H., 1973. Studies on flower bud formation, flower sex differentiation and their control in conifers. *Bull. Tottori Univ. Forests* 7.
52. Heikinheimo O., 1937. Über die Besamungsfähigkeit der Waldbaume, II. *Comm. Inst. Forest. Fenn.* 24.
53. Ho R. H., 1980. Pollination mechanism and seed production potential in Douglas - fir. *Forest Sci.* 26 (4): 522 - 528.
54. Johansen D. A. 1950. *Plant embryology*. Chronica Botanica Co., Waltham, Ma., USA.
55. Jonsson A., Ekberg I., Eriksson G., 1976. Flowering in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. *Stud. For. Suec.* 135: 1 - 38.
56. Kaji K., 1974. On the pollination and development of ovules and on the sterility of seeds in Japanese larch (*Larix leptolepis* Gord.). *Bull. Hokkaido For. Exp. Sta.* 12: 1 - 12.
57. Katsuta M., Yamamoto Ch., Saito M., Fukuhara N., Aoyagi S., Kaneko T., 1979. Cone and Seed yield in controlled crossing of *Larix leptolepis* Gord. *Bull. For. and For. Prod. Res. Inst.* No. 307: 25 - 38.
58. King J. P., Jeffers R. M., Nienstaedt H., 1970. Effects of varying proportions of self - pollen on seed yield, seed quality and seedling development in *Picea glauca*. IURFO, Section 22, Working Group Meeting on the Sexual Reproduction of Forest Trees, Varparanta, Finland 28.5 - 5.06.1970.
59. Korczyk A., 1975. Rozwój i obrządzanie szczepów modrzewia (*Larix decidua* Mill.) na plantacji nasiennej w nadleśnictwie Międzylesie. *Sylvan* 4: 37 - 46.
60. Kosiński G., 1981. Genetic load in empty seeds of European larch (*Larix decidua* Mill.). *Arb. Kórn.* 26: 231 - 236.
61. Kosiński G., Szmidt A. E., 1984. Isoelectric focusing of acid phosphatase and esterase from European larch (*Larix decidua*). *Arb. Kórn.* 29: 73 - 80.

62. Koski V., 1971. Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. Comm. Inst. For. Fenn. 75 (3): 1 - 30.
63. Koski V., 1973. On self-pollination, genetic load, and subsequent inbreeding in some conifers. Comm. Inst. For. Fenn. 78 (10): 1 - 42.
64. Laing E. V., 1944. Studies on the genus *Larix* with particular reference to Hybrid Larch (*L. eurolepis* A. Henry). Scott. For. J. 58: 6 - 32.
65. Langner 1951. Kreuzungsversuche mit *Larix europea* D. C. und *Larix leptolepis* Gord. Z. Fortgenetik Forstpflanzenzücht. 1: 2 - 18, 40 - 56.
66. Larionova A. Ja., 1979. Dinamika elektroforetičeskich spektrov fermentov chvoji listvennicy. Izvestija Sibirskogo Otdelenija Akademii Nauk SSSR, Serija Biologičeskich Nauk 2 (10): 97 - 100.
67. Larionova A. Y., Miljutin L. I., 1981. Investigation of the intraspecific differentiation of siberian larch with the aid of isozyme spectra. Lesovedenie 2: 3 - 11.
68. Leven J. K., 1951. Flowering times of Japanese larch (*L. leptolepis* Murray) and European larch (*L. europea* D. C.) Scot. For. 5 (1).
69. Lindgren D., 1975. The relationship between self - fertilization empty seeds and seeds originating from selfing as a consequence of polyembryony. Stud. For. Suec. 126: 1 - 24.
70. Lines R., 1977. Variation in flowering in forest trees. Quat. J. For. 71 (1): 7 - 15.
71. Linhart Y. B., Mitton J. B., Sturgeon K. B., Davis M. L., 1981. An analysis of genetic architecture in populations of ponderosa pine. Proc. Symp. on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. July 27, 1979, Berkeley, California, 53 - 59.
72. Linhart Y. B., Mitton J. B., Bowman D. M., Sturgeon K. B., Hamrick J. L., 1979a. Genetic aspects of fertility differentials in ponderosa pine. Genet. Res. 33: 237 - 242.
73. Linhart Y. B., Mitton J. B., Bowman D. M., Sturgeon K. B., Hamrick J. L., 1979b. Some genetic consequences of differential reproduction in populations of forest trees. In IUFRO, Flowering and seed development in forest trees. F. T. Bonner, ed. p. 41 - 50, Southern Forest Exp. Stu. Starkville, Miss. 380 p.
74. Lundkvist K., 1975. Inheritance of acid phosphate isozymes in *Picea abies*. Hereditas 79: 221 - 226.
75. Lundkvist K., 1977. Inheritance of esterase in needles and endosperms of Norway spruce (*Picea abies* L.). Hereditas 87: 27 - 32.
76. Lundkvist K., 1979. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.). I. Estimations of genetic variation within and among populations, genetic linkage and a mating system parameter. Hereditas 90: 127 - 143.
77. Mather K., 1963. The measurement of linkage in heredity. Methuen and Co. Ltd., London.
78. Matheson A. C., 1980. Unexpectedly high frequencies of outcrossed seedlings among offspring from mixtures of self and cross pollen in *Pinus radiata* D. Don. Austr. For. Res. 10 (1): 21 - 27.
79. Matthews J. D., 1955. Production of seed by forest trees in Britain. Rep. For. Res. For. Comm. for the year ending March 1954: 64.
80. Matthews J. D., 1960. The analysis of a diallel cross in Larch. Proc. 5th World For. Congr., Seattle. SP(158) II - U. K.: 1 - 12.
81. McWilliam J. R., 1959. Effect of temperature on pollen germination of *Pinus* and its bearing on controlled pollination. Forest Sci. 4: 10 - 17.
82. Mejnartowicz L., 1979. Genetic variation in some isoenzyme loci in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations. Arboretum Kórnickie. 24: 91 - 104.
83. Mejnartowicz L., Bergmann F., 1975. Genetic studies on European larch (*Larix decidua* Mill.) employing isoenzyme polymorphisms. Genet. Polonica 16 (1): 29 - 35.
84. Melchior G. 1960. Erhöhung der Blühwilligkeit an Pflöpfingen der Japanlärche (*Larix leptolepis*) Sieb. et Zucc. (Ford.). Naturwissenschaften 47 (21): 502. För. Abs. 1961, Nr 4373.
85. Mergen F., Burley J., Furnival G. M., 1965. Embryo and seedling development in *Picea glauca* (Moench) Voss. after self-, cross-, and wind-pollination. Silvae Genet. 14 (6): 188 - 194.

86. Messer H., 1956. Untersuchungen über das Fruchten der europäischen Lärche (*Larix decidua* Mill.). Allgem. Forst- und Jagd-Zeitung. 127: 8 - 16.
87. Mikami S., 1973. Variation in the isozyme among the provenances of Japanese larch (in Jap.). Trans. 83rd Meet. Jap. For. Soc.: 195 - 197.
88. Misnik G. E., 1976. Sroki i charakter cvetenija derev'ev i kustarnikov. Naukova dumka, Kiev.
89. Morton N. E., Crow J. F., Muller J. H., 1956. An estimate of the mutational damage in man from data on consanguineous marriages. Nat. Acad. Sci. Proc. 42: 855 - 863.
90. Muller H. J., 1950. Our load of mutations. Amer. J. hum. Genet. 2, III.
91. Nei M., Roychoudhury A. K., 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics 76: 379 - 390.
92. Nilsson B., 1959. Om lärkfrö och lärkhybrider för mellansverige. Svenska Skogsvårdsfören. Tidskr. 57: 309 - 324.
93. Nilsson J. E., 1981. Flowering in *Pinus contorta*. Institutionen för skoglig genetik och växtfysiologi. Rapport 2: 1 - 128.
94. O'Malley D. M., Guries R. P., 1981. Defecting linkage from conifer genotypic survey data. Isozyme Bull. 14: 13 - 18.
95. Orr - Ewing A. L., 1957. A cytological study of the effects of self - pollination on *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Silvae Genet. 6: 179 - 185.
96. Owens J., Molder M., 1979a. Bud development in *Larix occidentalis* II. Cone differentiation and early development. Can. J. Bot. 57: 1557 - 1572.
97. Owens J. N., Molder M., 1979b. Sexual reproduction of *Larix occidentalis*. Can. J. Bot. 57 (23): 2673 - 2690.
98. Owens J. N., Simpson S. J., Molder M., 1981. The pollination mechanism and the optimal time of pollination in Douglas - fir (*Pseudotsuga menziesii*). Can. J. For. Res. 11 (1): 36 - 50.
99. Park Y. S., Fowler D. P., 1982. Effects of inbreeding and genetic variances in a natural population of tamarack (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) in Eastern Canada. Silvae Genet. 31 (1): 21 - 26.
100. Park Y. S., Fowler D. P., 1984. Inbreeding in black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B. S. P.): self-fertility, genetic load, and performance. Can. J. For. Res. 14: 17 - 21.
101. Pjatnitzkij S. S., 1933. Opyty samopylenia u *Larix*, *Acer* i *Quercus*. Akad. Nauk USSR. Exp. Bot. 1: 297 - 318.
102. Plym Forshell C., 1974. Seed development after self - pollination and cross - pollination of Scots pine, *Pinus sylvestris* L. Stud. For. Suec. 118: 1 - 37.
103. Prus-Głowacki W., 1982. Badania nad zmiennością genetyczną w klasach wiekowych naturalnie odnawiającej się populacji sosny (*Pinus sylvestris* L.). UAM w Poznaniu. Ser. Biol. 24: 1 - 88.
104. Rodkiewicz B., 1984. Embriologia roślin nagozalążkowych. PWN. Warszawa.
105. Rohr R., Bonga J. M., 1984. A method to isolate the female sexual cells of *Larix decidua* for cytological studies. Can. J. Bot. 62: 1651 - 1658.
106. Rudin D., Rasmuson B., 1973. Genetic variation in esterases from needles of *Pinus silvestris* L. Hereditas 73: 89 - 98.
107. Rudin D., Ekberg I., 1978. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. using macrogametophyte allozymes. Silvae Genet. 27: 1 - 12.
108. Sarvas R., 1955. Investigations into the flowering and seed quality of forest trees. Comm. Inst. For. Fenn. 45 (7): 1 - 37.
109. Sarvas R., 1962. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus silvestris*. Comm. Inst. Forest Fenn. 53 (4): 1 - 198.
110. Sarvas R., 1968. Investigations on the flowering and seed crop of *Picea abies*. Comm. Inst. For. Fenn. 67 (5): 1 - 84.
111. Sarvas R., 1972. Investigations on the annual cycle of development of forest trees. Active period. Comm. Inst. For. Fenn. 76. 3.

112. Scamoni A., 1956. Beobachtungen über den Pollenflug der Waldbäume in Eberwalde. Z. Forstgenet. 4 (4 - 5): 113 - 122.
113. Schaal B. A., Levin D. A., 1976. The demographic genetics of *Liatris cylindracea* Michx. American Naturalist 110: 191 - 206.
114. Schopf J. M., 1943. The embryology of *Larix*. Ill. Biol. Monogr. 19 (4): 1 - 97.
115. Shaw C. R., Prasad R., 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes. Bioch. Genet. 4: 297 - 320.
116. Šindelář J., 1972. Některé zkušenosti se semennými modřinovými plantážemi v ČSR. Lesnictví 18: 537 - 549.
117. Šindelář J., Musil J., 1970. Některé předběžné výsledky fenologických pozorování v semenné plantáži modřinu Šternberk. Časopis Slezského Muzea — Acta Musei Silesiae Series Dendrologia, 1—1970, Opava, CSSR: 23 - 28.
118. Smólska A., 1927. Die Entwicklung des Archegoniums und der Befruchtungsprozess bei *Larix europaea* D. C. Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. B, Sci. Nat. 993 - 1028.
119. Snedecor G. W., 1961. Statistical methods. The Iowa State University Press.
120. Sorensen F., 1969. Embryonic genetic load in coastal Douglas — fir, *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*. Amer. Nat. 103: 389 - 398.
121. Sorensen F., 1970. Self — fertility of a central Oregon source of ponderosa pine. USDA Forest Serv. Res. Rep. PNW-109. 9pp PNFRES, Portland, Oreg.
122. Sorensen F., 1971. Estimate of self — fertility in coastal Douglas — fir from inbreeding studies. Silvae Genet. 20 (4): 115 - 120.
123. Sorensen F. C., Franklin J. F., Woollard R., 1976. Self — pollination effects on seed and seedling traits in Noble fir. Forest Sci. 22 (2): 155 - 159.
124. Stern K., 1968. Die Bedeutung genetischer Polymorphismen für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung. Allg. Forst. und Jagd-Zeitung. 139: 199 - 204.
125. Syrach Larsen C., 1956. Genetic in Silviculture. Oliver and Boyd, Edinburgh.
126. Szmídt A. E., 1980. Genetic variation among eleven populations of Scots pine (*Pinus sylvestris*) as determined by catalase polymorphism. Arboretum Kórnickie 25: 181 - 187.
127. Szmídt A. E., 1982. Genetic variation in isolated populations of stone pine (*Pinus cembra*). Silva Fennica 16 (2): 196 - 200.
128. Tichomirov B. A., 1950. Dánnje o zanose pyl'cy drevesnych porod k severu ot lesnoj granicy. Dokl. AN SSSR 71 (4): 753 - 755.
129. Tomescu A., Florescu I., Michalache A., Strimbei M., Avramescu C., 1967. Cercetari fenologice la principalele specii forestiere autohtone din Republica Socialista Romania. Sinteza pentru perioada 1956 - 1965. Centrul de Documentare Technica pentru Economia Forestera, Bucuresti.
130. Tompa K., 1959. Egy Soproni vöröfenyves 1956. Evi magtermése s az állomány kezelese. Erdészttud. Közl., Sopron 1: 3 - 33.
131. Van der Sijde H. A., 1971. Some aspects of hand pollination in seed orchards in South Africa. For. in S. A. 12: 67 - 73.
132. Villar M., Knox R. B., Dumas C., 1984. Effective pollination period and nature of pollen — collecting apparatus in the gymnosperm, *Larix leptolepis*. Annals of Botany 53: 279 - 284.
133. Wesoły W., 1982. Analiza fenologii kwitnienia szczepów sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris* L.) na plantacji nasiennej w Siemianicach. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu — CXL: 149 - 159.
134. Witter M. S., Feret P. P., 1979. Inheritance of esterase and acid phosphatase isozymes in Virginia pine and the application of the isozyme technique to a seed orchard population. Silvae Genet. 28: 213 - 220.
135. Woycicki Z., 1923. Einige Beobachtungen über Prothalien und Archegonien bei *Larix dahurica* Turcz. und *L. europaea* D. C. Acta Soc. Bot. Polon 1: 149 - 164.
136. Yokoyama T., 1973. The time of meiosis of megaspore mother cell in *Larix leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Gordon. Bull. Gor. For. Exp. Sta. No. 255: 23 - 30.

137. Yokoyama T., 1977. The cause of self-sterility in *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jap. For. Soc. 59: 389 - 390.
138. Yokoyama T., Kaneko T., 1979. Some problems on the estimate of self - fertility in *Larix leptolepis*. J. Jap. For. Soc. 61 (2): 58 - 62.
139. Yokoyama T., Kaneko T., Itoo M., 1975. The percentage of pollinated ovules in the female strobili subjected to one day natural pollination in the seed orchard of *Larix leptolepis*. J. Jap. For. Soc. 57 (6): 194 - 196.
140. Yokoyama T., Kaneko T., Itoo M., 1978. The number of pollen grains produced from a male strobilus in *Larix leptolepis* Gord. J. Jap. For. Soc. 60: 71 - 73.
141. Yokoyama T., Kaneko T., Itoo M., Yamazaki S., Asakawa S., 1973. The most favourable time and frequency for controlled pollination in *Larix leptolepis* (Sieb. et Zucc.) Gord. Bull. Gor. For. Exp. Sta. No 253: 39 - 53.

Causes of empty seed formation in European larch (Larix decidua Mill.)

Summary

In the reported studies, an attempt has been made to determine the proportions and causes of empty seed production in European larch. All experiment were carried out on 25 clones growing in the Kórnik seed orchard. Observations on pollination, megasporogenesis, fertilization and embryo development have shown the amount of seed degeneration at different stages of development. The aim of the controlled pollination experiments has been to discover the genetic reasons of empty seed production.

Investigations of the enzymatic systems were an attempt to explain the genetic load in relation to genetic polymorphism. It was established that:

1. Synchronization of pollen dispersal and female flowers receptivity was sufficient for adequate pollination of female strobili on the observed clones.
2. The longer was the period of female flowers pollination, the greater was the full seed production.
3. Efficiency of open pollination varied from 60% to 99%. Lack of pollination reduced the potential number of filled seeds on average by 17%.
4. An increase in the number of pollen grains per ovule favourably influence full seed production by reducing the negative effect of genetic load. However there was no significant correlation between the amount of polyembryony and the proportion of filled seed.
5. Physiological disturbances in female gametophyte development increased empty production by about 9%.
6. Pollen remaining in the micropylar canal and lack of pollen germination on the nucellus, due mainly to inviability of pollen, increased the proportion of unsound seed on average by 17%.
7. After open pollination, embryos degenerated in 47 - 75% of fertilized ovules, which increased the amount of empty seed on average by 30%. Embryo degeneration has mainly genetic reasons.
8. In general, the average yield of full seed after open pollination becomes about 27%.
9. The negative effect of self-pollination on filled seed yield have been found to operate after fertilization, during the early stages of embryo development. After controlled self-pollination embryo degeneration took place in 85 - 100% of the pollinated ovules.
10. Out of 29 observed clones, on 2 only the pollen dispersal has been finished before the onset of female strobili receptivity, thus limiting the possibility of self-pollination to a minimum.
11. In spite of the great amount of embryo degeneration, the estimated relative self-fertility indicates, that in relation to other conifer species larch has a proportionally high possibility of full seed production after self-pollination.
12. Negative genetic load estimated as the number of embryonic lethals is rather low.

13. The great number of unsound seed coupled with the low number of embryonic lethals may be caused by the negative genetic load, only if one assumes that the few embryonic lethals exist throughout the population with a high frequency. In such a case their homozygotization can take place even after mating of unrelated individuals. This is in good agreement with the observed low genetic polymorphism in the studied enzyme systems.

14. Increase in full seed yield may be promoted by establishing seed orchards on good site conditions favouring abundance of pollination, by selection of clones with a small genetic load and by elimination of self-pollination through the establishment of two clonal seed orchard or by maximal separation of the grafts of one clone in multiclonal seed orchard.

ГЖЕГОЖ КОСИНЬСКИ

*Причины возникновения пустых семян у лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.)*

Резюме

Целью представленных опытов являлось исследование размеров и причин возникновения пустых семян у лиственницы европейской. Все опыты проводили на отобранных клонах этого вида, растущих на лесосеменной плантации в Курнике.

Наблюдения за процессом опыления, макроспорогенеза, оплодотворения и развития зародыша позволили установить размеры дегенерации семян на различных этапах их развития. Исследования с контролируемым опылением предприняли для определения генетических причин возникновения пустых семян, а целью энзиматических исследований была попытка выяснения этого явления в связи с размерами генетического полиморфизма у этого вида.

На основании проведенных анализов можно сделать следующие заключения:

1. Синхронизация пыления и способности к оплодотворению у женских цветков способствует успешному опылению на лесосеменной плантации.

2. Чем длиннее период опыления женских цветков, тем большим является процент полных семян.

3. В условиях свободного опыления его эффективность колеблется от 60 до 99%. В среднем отсутствие опыления редуцировало потенциальное число полных семян на приблизительно 17%.

4. На продукцию полных семян положительное влияние оказывает также увеличение числа пыльцы в зародыше, редуцируя отрицательный эффект нежизнеспособной пыльцы, а также благодаря полиэмбриогенезу, нейтрализуя негативный эффект генетической нагрузки. Не найдено однако, существенной корреляции между размерами полиэмбриогенеза и продукцией полных семян.

5. Нарушения в развитии женского гаметофита вызванные физиологическими причинами, увеличивали в среднем на 9% количество пустых семян.

6. Вызванное этими же причинами нарушение перемещения пыльцы с микропыле на вершину нуцеллуса, а также отсутствие прорастания пыльцы в нуцеллусе, увеличило число пустых семян в среднем на около 17%.

7. В условиях свободного опыления у 47 - 75% завязей зародыши дегенерируют увеличивая в среднем число пустых семян на 30%. Дегенерация зародышей вызвана прежде всего генетическими причинами.

8. В общей сложности после свободного опыления полных является лишь 27% семян.

9. Отрицательное влияние самоопыления на выход полных семян проявилось лишь после оплодотворения, на ранних стадиях развития зародыша. В условиях контролируемого самоопыления зародыши дегенерировали в 85 - 100% завязей.

10. Среди 29 особей, за которыми велось наблюдение, лишь у 2 пыление кончалось перед началом способности к оплодотворению у женских цветков, что ограничивает до минимума, возможность самоопыления.

11. Несмотря на большую гибель зародышей, величины относительной автогамии указывают на то, что лиственница является видом с относительно большой способностью к образованию полных семян после самоопыления по сравнению с другими видами хвойных.

12. Отрицательные генетические нагрузки, измеряемые числом летальных факторов на стадии зародыша являются относительно небольшими.

13. Большое число пустых семян, при малом количестве летальных факторов может являться, однако, эффектом негативной генетической нагрузки, при условии, что летальные факторы характеризуются большой частотой встречаемости и являются распространенными во всей популяции. Таким образом их гомозиготность имеет место даже при скрещивании неродственных особей. Это согласуется с наблюдаемой незначительной энзиматической изменчивостью лиственницы.

14. Увеличению числа полных семян будет способствовать закладывание семенных плантаций в местах с благоприятными условиями местопроизрастания и климатическими условиями, применение мероприятий направленных на увеличение обильности пыления, селекция клонов с малой генетической нагрузкой, а также выключение самоопыления путем закладки семенных плантаций состоящих из 2 клонов или при максимальном разделении особей с одного клона на поликлоновых плантациях.