

7.2. Genetyka biochemiczna świerka pospolitego (Leon Mejnartowicz, Andrzej Lewandowski)

Obok morfologicznych, ważnym polem prac genetycznych, są również cechy biochemiczne. Można je podzielić na dwie wielkie grupy:

- A. Cechy badane w drodze bezpośredniej analizy DNA metodami PCR i RLFP. Analiza DNA metodą znaną pod skrótem (PCR = Polymerase Chain Reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy, oraz metoda RLFP lub RFLP Restriction Length Fragment Polymorphisms – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych).¹
- B. Biochemiczne cechy metabolizmu drzew, w tym:
- I. Metabolizmu pierwotnego. Znajdują się tu cechy odnoszące się do: enzymów, białek strukturalnych, inhibitorów proteinaz i lecytyn.
 - II. Metabolizmu wtórnego. W grupie tej są cechy odnoszące się do: terpenoidów, fenoli (w tym: lignin, tanin, fitoaleksyn), i związków zawierających azot.

Jedne z pierwszych prac z zakresu genetyki biochemicznej drzew zostały wykonane przez BARTELSA (1964) nad enzymami świerka pospolitego. W pracach tych wykorzystano cechę aktywności enzymu do analizy zmienności międzypopulacyjnej. Ten sam autor opublikował pionierską pracę (BARTELS 1971), niezależnie od BERGMANNA (1971), nad znaczeniem izoenzymów jako genów markerowych w genetyce i hodowli drzew leśnych. W obydwu pracach materiałem eksperymentalnym były populacje świerka pospolitego. Ogromna większość późniejszych prac z zakresu genetyki biochemicznej dotyczyć będzie właśnie analizy izoenzymów. Prace te miały szczególne znaczenie w opisie struktury genetycznej populacji drzew leśnych, a także nad wpływem zanieczyszczenia środowiska na te populacje.

Poza enzymami genetyka biochemiczna zajmuje się analizą białek innego typu (np. strukturalnych) oraz związków fenolowych, cukrowców, a szczególne zainteresowanie budzą bezpośrednie nośniki informacji genetycznej, jakimi są DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy i RNA – kwas rybonukleinowy, zawarte w jądrze komórkowym, cytoplazmie, chloroplastach i w mitochondriach. Większość badań nad kwasami nukleinowymi, dotyczyła chloroplastów, które są stosunkowo prostymi strukturalnie obiektami badawczymi.

7.2.1. Podstawowe pojęcia genetyczne

Ogromne drzewa, składające się z bilionów komórek, powstają z namnażania jednej zapłodnionej komórki posiadającej informację genetyczną – ojcowską, przekazaną przez pyłek i mateczną – zawartą w komórce jajowej. W zapłodnionej komórce (zygotie), znajduje się informacja dotycząca wzrostu, rozwoju, rozmnażania się i jak się ostatnio okazało, również śmierci organizmu. Jest to niezwykła właściwość żywej komórki – zdolność przekazywania cech dziedzicznych następnemu pokoleniu komórek.

Materiał genetyczny u organizmów eukariotycznych, to jest takich, w których komórki zawierają jądra komórkowe z błonami, ułożony jest liniowo w skomplikowane struktury zwane chromosomami, zawierającymi obok DNA i RNA, białka kwaśne i zasadowe zwane histonami.

Wszystkie drzewa należą do *Eukaryota*. Chromosomy *Eukaryota* zawierają tysiące razy więcej DNA niż *Prokaryota* (gdzie zalicza się wirusy i bakterie). Stwierdzono, że im większa komplikacja organizmu, tym więcej

¹ Metodę PCR, wynalezioną w 1983 roku przez KARY MULLISA, uważa się za jedno z największych osiągnięć naukowych ostatniego ćwierćwiecza.

DNA znajduje się w jądrze komórkowym, chociaż są liczne wyjątki od tego. U świerka i u większości sosnowatych, genom stanowi haploidalny (tj. pojedynczy) zespół 12 chromosomów jądra komórkowego gamety męskiej lub żeńskiej. Dla porównania, genom człowieka zawiera 23 chromosomy, a u słynnej muszki owocowej, jedynie 4 chromosomy. Zatem w komórkach somatycznych organizmu diploidalnego znajdują się dwa genomy – jeden zespół chromosomów pochodzący od ojca i drugi od matki (u wszystkich organizmów eukariotycznych przekazywany z komórką jajową).

Z wyjątkiem gamet i gametofitów, we wszystkich komórkach świerka pospolitego znajdujemy 24 chromosomy. Prawie wszystkie nasze drzewa leśne są diploidami. Bardzo niewiele jest poliploidów. Spotykamy je wyłącznie wśród drzew liściastych, na przykład niektóre osiki są triploidalne, a brzoza omszona jest tetraploidem ($4n = 56$ chromosomów).

Poliploidy nie zawsze wyróżniają się fenotypowo. Jeden z autorów (L. MEJNARTOWICZ) obserwował 3-letnią siewkę *Picea abies*, która była aneuploidem, to znaczy, że jej komórki zawierały jądra z genomem z 13 chromosomami. Świerk ten nie różnił się fenotypowo od diploidu. U człowieka aneuploidyzacja powoduje często powikłania mentalne, a nie zawsze somatyczne.

Zewnętrzny obraz organizmu lub cechy (pokrój, barwa, cechy fizjologiczne itp.) nazywamy fenotypem. Organizmy o tym samym składzie genetycznym mogą różnić się zewnętrznie, to znaczy mieć różne fenotypy, bowiem fenotyp jest sumą współdziałania czynników środowiskowych i genetycznych, i przeciwnie – osobniki o jednakowych fenotypach mogą mieć różne genotypy.

Cała selekcja i hodowla drzew opierała się dotychczas na ocenie wartości fenotypowej. Jedynie mały margines i to tylko na skalę badań polowych, dotyczył selekcji genotypowej. Pojęcie genotypu, jakkolwiek powszechnie używane w genetyce, jest niejednoznaczne. Ma ono co najmniej trzy znaczenia:

- 1) całkowity zespół genów posiadanych przez organizm,
- 2) zbiór alleli danego *locus* lub kilku badanych *loci*,
- 3) grupa organizmów posiadających identyczną budowę genetyczną.

Genotyp może być określony w drodze krzyżowania dwóch osobników (jak to robił twórca genetyki G. MENDEL), albo z pomocą analizy biochemicznej DNA lub jego produktów, jak to w ogromnej większości czynimy współcześnie.

Fundamentalnym pojęciem w genetyce, od którego pochodzi nazwa tej dziedziny nauki, jest gen. Jest to jednostka dziedziczenia, wyrażona liniowym układem nukleotydów w DNA lub RNA, określająca, dzięki zawartej w niej informacji genetycznej, kolejność aminokwasów w polipeptydzie lub nukleotydów w cząsteczkach RNA. Uważa się, że geny zajmują określoną pozycję w chromosomie, nazywaną *locus* genu. W wyniku działania czynników zewnętrznych, lecz także i wewnętrznych (mutagenów), może dochodzić do zmian w strukturach DNA (mutacji), w wyniku czego powstają różne formy danego genu, nazywane allelami.

Bardzo wiele zmian w DNA jest nonsensownych, to znaczy, że taki fragment DNA nie niesie informacji. Tego rodzaju DNA stanowi większość, bo około 98% całego DNA. Taki DNA albo zawiera błędy w kodzie genetycznym, albo może być nie przepisywany, pełniąc funkcje strukturalne. Niektóre geny, a jest ich bardzo wiele również u świerka pospolitego, występują w dziesiątkach, setkach tysięcy, a nawet w milionach kopii. Nie należy mylić wielu kopii jednego genu z pojęciem poligeny.

Zmienność genetyczna cech ilościowych, wywołana równoczesną segregacją wielu genów, nazwana jest zmiennością poligeniczną, a powodujące ją geny noszą wtedy nazwę poligenów (lub genów kumulatywnych). Zmianom fenotypowym wywoływanym przez mutacje zapobiegają geny supresorowe. Powodują one przywrócenie funkcji utraconej w wyniku mutacji pierwotnej.

Jeżeli chromosomy homologiczne zawierają w danym *locus* lub *loci* odmienne allele, to organizm taki nazywamy heterozygotycznym. U heterozygoty para genów pochodząca od matki i od ojca jest różna, gdy zaś są one identyczne, to organizm taki jest homozygotycznym. W genetyce biochemicznej terminu heterozygotyczność używa się powszechnie dla określenia częstości heterozygot, obserwowanej w danym momencie (Ho), lub heterozygotyczności oczekiwanej (He) w badanej populacji.

Geny letalne (nazywane niekiedy czynnikami letalnymi), badane były u wielu organizmów, w tym także u drzew. Powodują one śmierć organizmu, w sytuacji gdy znajdują się w stanie homozygotycznym. Sądzi się, że drzewa mają około 4 – 7 genów letalnych. Taką, stosunkowo małą, liczbę genów letalnych zawdzięczają rośliny mechanizmowi przemiany pokoleń, kiedy to przy przejściu od haploidalnego gametofitu do diploidalnego sporofitu następuje redukcja obciążenia genetycznego (WALBOT 1996). Geny półletalne (semiletalne) obniżają żywotność organizmu. Obydwa typy genów – letalne i semiletalne stanowią obciążenie genetyczne organizmu.

Już MENDEL (1866) zauważył, że u organizmów heterozygotycznych w pierwszym pokoleniu, niektóre cechy (i odpowiadające im allele) mają charakter dominujący podczas gdy inne są przez nie maskowane. Nazywamy je genami lub cechami recesywnymi. W badaniach biochemicznych okazało się, że bardzo wiele genów nie jest ani dominującymi, ani recesywnymi, jak na przykład geny kodujące izoenzymy, które prawie wszystkie są genami kodominującymi.

Enzymy mogą występować w wariantach allelicznych, które nazywane są izoenzymami (izozymami) albo allozymami. Termin izoenzym, zalecany przez Międzynarodową Unię Biochemiczną, zaproponowali MARKERT i MØLLER (1959), dla określenia różnych form cząsteczkowych enzymu o tej samej specyficzności substratowej.

Geny sprzężone występują na tym samym chromosomie. Im bliżej siebie leżą, tym

większe jest ich sprzężenie i tym większa jest ich tendencja do wspólnego przechodzenia do następnego pokolenia komórek. Przy sprzężeniu loci w populacji panmiktycznej, to jest takiej, w której kojarzenie zachodzi losowo (a tak, teoretycznie, jest w większości populacji naszych drzew leśnych), stan równowagi osiągnąć jest tym wolniej im bardziej sprzężone są geny.

Z częstości alleli w populacji obliczany jest dystans genetyczny między populacjami – mówimy wtedy o dystansie allelicznym, lub z częstości genotypów – dystans genotypowy. Dystans genetyczny różni dwie populacje na ciągłej skali zawartej między zerem i jednością. Wartość zerową uzyskuje dystans wtedy, gdy populacje są genetycznie identyczne, a wartość 1 gdy nie mają wspólnych alleli lub genotypów. Istnieją również otwarte miary dystansu genetycznego, bez wartości granicznych.

7.2.2. Analiza genomu

7.2.2.1. Rekombinacja DNA *in vitro*

Na wstępie należy sobie uświadomić, że cała informacja genetyczna u drzew zawarta jest w DNA, choć nie tylko w DNA jądrowym, który oznaczamy często skrótem nDNA, od angielskiej nazwy nuclear DNA. Odrębny DNA znajduje się także w chloroplastach (ctDNA lub cpDNA) oraz w mitochondriach (mtDNA). Sądzi się, że DNA chloroplastowy i mitochondrialny mają pochodzenie bakteryjne.

W ciągu ostatnich 15 lat zostały wybitnie ulepszone metody analizy i sekwencjonowania DNA, tak że podjęto zbadanie całego genomu człowieka, a dzięki tam rozwiniętym technikom znacznie wzrosła również wiedza o genomie drzew.

Heliks DNA, składający się z dwóch bardzo długich łańcuchów polinukleotydowych, może zostać rozwinięty pod działaniem czynników denaturujących, jak na przykład działanie wysokiej temperatury, kwasów, czy zasad lub rozcięty przez en-

donukleazy, dla których substratem jest dwuniciowy DNA. Nić komplementarnego DNA (cDNA) można ponownie połączyć w podwójny heliks w procesie renaturacji z własną nicią lub dołączyć do fragmentu DNA innego gatunku. Uzyskuje się w ten sposób nowy, hybrydowy, rekombinacyjny DNA (rDNA), na przykład świerka, sosny, czy daglezi zielonej z DNA petunii, która jest często używana w takich badaniach (NEALE i wsp. 1988).

Komplementarność nici DNA wynika z sekwencji połączeń między parami zasad: adenina – tymina i guanina – cytozyna.

Polisacharydy związane z DNA są zanieczyszczeniami utrudniającymi dalsze reakcje z DNA. Szybką metodę izolacji czystego DNA z zawiesiny komórkowej i kalusa świerka pospolitego opracowali RETHER i współpracownicy (1993). Tak wyizolowany DNA można następnie badać z pomocą metody RLPF lub PCR.

Fragment nici DNA można namnożyć w milionach kopii i przenosić (klonować) z pomocą plazmidów bakteryjnych, znajdujących się w bakteriach patogenicznych, jak *Agrobacterium tumefaciens* czy *Agrobacterium rhizogenes*. Plazmidy są pozachromosomowymi, superzwiniętymi, kolistymi cząstkami dwuniciowego DNA. Mają one region zdolny do samopowieliania i powieliania połączonych z nim genów.

Dzięki klonowaniu genów, a następnie badaniu ich struktury wykryto na przykład, że gen może być rozproszony w kilku miejscach DNA. Szczególną uwagę zwrócono na geny związane z procesem fotosyntezy, między innymi na enzym karboksydysmutazę (karboksylazę rybulozodwufosforanu). U świerka pospolitego zbadano nukleotydy i sekwencję genu kodującego dużą podjednostkę tego enzymu dzięki odwrotnej transkrypcji – PCR całego RNA z igieł dwuletnich siewek (RELLE i wsp. 1995).

Informacja genetyczna dotycząca kodowania białek jest wysoce konserwatywna i podobna nawet pomiędzy odległymi systematycznie grupami roślin. Jak wspomniano wcześniej, eukariotyczny DNA zawiera

powtarzające się sekwencje DNA, często o nieznannej funkcji. Sekwencje takie są łatwe do wykrycia dzięki działaniu na DNA restrykcyjnych endonukleaz, to jest enzymów znalezionych u bakterii i niektórych innych *Prokaryota*.

Produkty trawienia DNA rozdziela się za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym. Technika ta ma kolosalne znaczenie we współczesnej genetyce i biotechnologii, bowiem endonukleazy są enzymami które rozcinają DNA w ściśle określonym miejscu na fragmenty złożone z 4, 5, lub 6 nukleotydów. W ten sposób można otrzymać wysoce specyficzny dla danego drzewa kompleks prążków czyli tak zwany „odcisk palca” DNA (DNA *fingerprint*).

Prostszą jest analiza pod względem długości pojedynczej, lub małej liczby kopii fragmentów DNA, technika RLPF. Metoda RLPF pozwala na wykorzystanie około 150–200 genów markerowych u drzew (u człowieka około 2000 genów), podczas gdy metoda izoenzymowa około 30–50 genów. RLPF jest metodą tak czułą, że pozwoliła na wykrycie znacznej zmienności genetycznej nawet w liniach roślin pochodzących z zapylenia wsobnego.

Najnowsza, bezpośrednia analiza DNA z jąder komórkowych *Picea abies* ujawniła dużą masę genomu, spowodowaną prawdopodobnie większą liczbą i powtórzeniami długich fragmentów replikacyjnego DNA (rDNA), które są dwa razy dłuższe, niż u większości okrytozalążkowych. Powtarzalne fragmenty DNA u świerka pospolitego są bardzo specyficzne osobniczo, co umożliwiła wykonanie „odcisku palca” DNA dla pojedynczego drzewa i odzwierciedla wielką zmienność wewnątrzgatunkową świerka pospolitego (KVARNHEDEN 1994).

Natomiast pod względem struktury intronów u wszystkich *Pinaceae* występuje ogromne podobieństwo pomimo, że czas rozdziału *Pinaceae* na rodzaje szacuje się na 60 milionów lat. Co więcej introny nagozalążkowych nie różnią się istotnie nawet od okrytozalążkowych pod względem pozycji, długości, zawartości adeniny i ty-

miny, a także miejsca rozcinania przez restryktazy.

U świerka pospolitego udało się, z pomocą metody PCR i klonowania, wyizolować specyficzny cDNA (tak oznacza się komplementarny DNA), odpowiedzialny za gen indukujący powstawanie korzeni po infekcji przez patogeny (SHARMA i wsp. 1993). Cytowani autorzy zastosowali oryginalną metodę sprzęgania cDNA z podłożem magnetycznym, co umożliwia używanie tego samego cDNA wielokrotnie.

7.2.2.2. Genom chloroplastowy

Jakkolwiek ogromna większość prac nad cpDNA dotyczy chloroplastów, to warto zauważyć, że ten sam DNA musi znajdować się we wszystkich plastydach, ponieważ fotosyntetyzujące, zawierające chlorofil, chloroplasty są tylko stanem rozwojowym plastydowych organelli. Wszystkie plastydy mają nie tylko DNA, lecz także RNA, mRNA i mechanizmy powielające kwasy nukleinowe oraz syntetyzujące białka. Co więcej, uzależniony od światła rozwój chloroplastów z etioplastów nie zależy od aktywacji (transkrypcji) nowych genów (KRUPIŃSKA i APEL 1989).

DNA zawarty w chloroplastach stanowi tylko małą cząstkę (1–15%) całego DNA znajdującego się w komórkach rośliny. Jego rozmiar u nagozalążkowych osiąga przeciętnie 150 kb (GUSTAFSSON i wsp. 1991). Cechą charakterystyczną cpDNA jest to, że tworzy on koliste, dwuniciowe cząsteczki, zawierające dużą liczbę powtórzonych sekwencji o identycznej budowie. Informacja genetyczna w cpDNA jest bardzo upakowana. Chloroplastowy DNA jest ewolucyjnie bardzo konserwatywny, z wyjątkiem niektórych regionów, tak zwanych „gorących miejsc” (hot spots), gdzie zmienność jego jest bardzo duża. Regiony takie znaleziono też w DNA jądrowym. Konserwatywność cpDNA i niżej omówionego mtDNA ma swoje źródło w braku rekombinacji u tych typów DNA.

Powszechnie znane mutacje chloroplastowe pozwoliły przypuszczać, że cpDNA dziedziczony jest wyłącznie przez gamety żeńskie. Okazało się jednak, że wiesiołki (*Oenothera*) i pelargonie (*Pelargonium*) dziedziczą cpDNA od obu rodziców, chociaż ogromna większość okrytozalążkowych rzeczywiście dziedziczy cpDNA po matce. Jest to tak zwany matczyzny sposób przekazywania cpDNA (SEARS 1980).

Analiza mutantów chloroplastowych sievek szydlicy japońskiej (*Cryptomeria japonica*) wykonana przez OHBĘ i współpracowników (1971), wskazywała na możliwość przenoszenia cpDNA przez pyłek, czyli dziedziczenie ojcowskie. Stosując cięcie cpDNA enzymami restrykcyjnymi, na przykład Hind – III, w miejscu A/AGCTT, można następnie metodą elektroforetyczną rozdzielić fragmenty pociętego DNA. Długość fragmentów restrykcyjnych określa się na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej (RLPF). Na tej podstawie stwierdzono, że u świerków i innych drzew z rodzajów *Pinus*, *Larix*, *Pseudotsuga*, a także u *Taxodiaceae* reguła jest ojcowskie przekazywanie cpDNA (NEALE i wsp. 1986, 1988; HOWE i wsp. 1988; OWENS i SIMPSON 1988; SZMIDT i wsp. 1988).

Wyniki analizy molekularnej w przeważającej większości potwierdzają systemy taksonomiczne opisane przez morfologów (HILLS 1987). Również analiza cpDNA metodą RLPF u 8 gatunków świerka z Ameryki Północnej dała dendrogram zgodny z klasyczną systematyką tego rodzaju (SIGURGEIRSSON i SZMIDT 1988).

7.2.2.3. Genom mitochondrialny

Mniej niż 1% całego DNA znajduje się w mitochondriach, kodując 10–20 polipeptydów potrzebnych w procesie oddychania tlenowego. U wielu roślin, w tym u świerka pospolitego, mtDNA dziedziczy się przeważnie w sposób matczyny, chociaż u *Sequoia sempervirens* i być może u innych *Taxodiaceae* występuje ojcowskie dziedziczenie mtDNA (NEALE i wsp. 1988).

W mtDNA występuje, w odróżnieniu od cpDNA, duża zmienność wyrażona szeregiem punktowych mutacji, które można badać z pomocą metody RLPF. W jednej komórce może występować kilkadziesiąt cząsteczek mtDNA

7.2.3. Izoenzymy jako markery genetyczne

Pomimo ograniczeń, metody elektroforetycznego rozdzielania enzymów na różnego rodzaju żelach, są dzisiaj jedną z najczęściej stosowanych technik w genetyce populacyjnej i ewolucyjnej. O szerokim zastosowaniu technik wykorzystujących izoenzymy jako markery genetyczne zdecydował fakt możliwości mierzenia zmienności na poziomie bliskim DNA, przy stosunkowo niskim koszcie oraz łatwości, mnogości i szybkości analiz. Jednak aby poszczególne izoenzymy mogły spełnić kryterium dobrego markera biochemicznego wymagane jest uzyskanie informacji o sposobie genetycznej kontroli danego enzymu. Drzewa iglaste okazały się szczególnie dogodnym obiektem do tego typu badań, gdyż w ich nasieniu, obok diploidalnej tkanki zarodka, znajduje się również haploidalna tkanka makrogametofitu. Co więcej, komórki makrogametofitu mają identyczny genotyp z komórką jajową, gdyż pochodzą z tej samej haploidalnej megaspory. W związku z tym tkanki makrogametofitów pochodzące z różnych nasion jednego drzewa są łatwym źródłem informacji na temat segregacji alleli podczas mejozy, a dalej do oznaczenia częstości rekombinacji pomiędzy badanymi loci izoenzymowymi. Określając zaś genotypy haploidalnych tkanek makrogametofitów można łatwo ustalić genotyp drzewa matcznego, bez uciekania się do wykonywania uciążliwych krzyżówek. Z kolei porównując genotyp izoenzymowy zarodka z genoty-

pem makrogametofitu tego samego nasienia można stwierdzić, które allele pochodzą od matki, a tym samym można wnioskować o genotypie gamety pyłkowej (MÜLLER 1977).

Prace prowadzone u szeregu gatunków drzew iglastych wskazują na dziedziczenie się wielu systemów enzymatycznych zgodnie z prawami MENDELA, chociaż czasami obserwuje się istotne odchylenia od oczekiwanej segregacji alleli w stosunku 1:1 w czasie mejozy². W tabeli 7.2 przedstawiono informacje na temat genetycznej kontroli najczęściej wykorzystywanych u świerka pospolitego markerów izoenzymowych.

Jak wynika z powyższego zestawienia, u świerka pospolitego około 40 loci izoenzymowych może być wykorzystanych jako markery genetyczne.

7.2.4. Sprzężenia pomiędzy loci izoenzymowymi

Jedną z pierwszych prac dotyczących badania sprzężeń pomiędzy loci izoenzymowymi u drzew iglastych była wykonana na świerku pospolitym (LUNDKVIST 1974). Autor stwierdził, że u badanego gatunku allele w dwóch loci kodujących leucyloaminopeptydazę (Lap1 i Lap2) oraz trzecim locus transaminazy szczawioowoocetnowej (Got3), segregują w sposób niezależny. W późniejszych badaniach LUNDKVIST (1979), analizując 11 loci izoenzymowych, znalazł sprzężenie między trzema loci: Est1, Est2 oraz Aph1. Dzięki gromadzeniu danych dotyczących rekombinacji, stało się możliwe sporządzanie genetycznych map chromosomów, na których określa się dokładne wzajemne odległości między genami oraz ich kolejność. Odległość pomiędzy genami na mapie wyraża się zazwyczaj w jednostkach, których podstawę stanowi częstość rekombinacji genów. Jeżeli częstość rekombinacji pomiędzy dwoma genami wy-

² Zjawisko to wiąże się z: 1) różną żywotnością gamet niosących różne allele 2) sprzężeniem z genem letalnym 3) międzyalleliczną interakcją 4) losową selekcją przeciw 1 albo 2 allelom, a także tym, że 5) izozym kontrolowany jest przez więcej niż 1 locus.

Tabela 7.2. Najczęściej analizowane systemy enzymatyczne u świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) KARST.). W nawiasach podano skróty nazw enzymów oraz ich numer systematyczny E.C.

Enzym	Liczba loci	Liczba alleli	Źródło kontroli genetycznej danego enzymu
Akonitaza (ACO, E.C. 4.2.1.3)	1	3	MUONA i wsp.1987
Aminopeptydaza leucynowa (LAP, E.C. 3.4.11.1)	2	7;8	BERGMANN 1973b; LUNDKVIST 1974
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD, E.C. 1.1.1.49)	1	4	ALTUCHOV i wsp. 1986
Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH, E.C. 1.4.1.2)	1	3	LUNDKVIST 1979
Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH, E.C. 1.1.1.42)	2	4;2	ALTUCHOV i wsp. 1986; MUONA i wsp.1987
Dehydrogenaza jablczanowa (MDH, E.C. 1.1.1.37)	2 4	1;3 1;2;2;2	LUNDKVIST 1979; POULSEN i wsp.1983
Dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa (6-PGD, E.C. 4.2.1.12)	3	2;4;3	POULSEN i wsp. 1983; MORGANTE i wsp. 1989
Dehydrogenaza mrówczanowa (FDH, E.C. 1.2.1.2)	1	4*	KRUTOVSKII i BERGMANN 1995
Dehydrogenaza sorbitolowa (SDH, E.C. 1.1.1.14)	1	3	GONČARENKO i wsp. 1995
Dehydrogenaza szikimianowa (SHDH, E.C. 1.1.1.25)	1 2	3 4;3	MUONA i wsp.1987; MORGANTE i wsp. 1989
Diaforaza (Reduktaza menadionowa MNR), (DIA, E.C. 1.6.4.3)	2 4	1;3 1;2;N;4	MUONA i wsp.1987; GONČARENKO i wsp. 1995
Esteraza (EST, E.C. 3.1.1.1)	1	2	BARTELS 1971; BERGMANN 1971
Esteraza fluorescencyjna (FLE, E.C. 3.1.1.2)	1	3	MUONA i wsp.1987
Fosfataza kwaśna (APH, ACP, E.C. 3.1.3.2)	1 2	3 2;4	TIGERSTEDT 1973; BERGMANN 1974b
Fosfodwuesteraza I (PDasa, E.C. 3.1.4.1)	1	2	MEJNARTOWICZ i BERGMANN 1977
Fosfoglukomutaza (PGM, E.C. 2.7.5.1)	2	3;3	POULSEN i wsp.1983
Fosfoglukonianowa izomeraza (PGI, E.C. 5.3.1.9)	2	2;5	MUONA i wsp.1987
Karboksylaza fosfoenolopirogronianowa (PEPCA, E.C. 4.1.1.31)	1	4*	KRUTOVSKII i BERGMANN 1995
Rybonukleaza II (RNasa, E.C. 3.1.4.23)	2	2;N	MEJNARTOWICZ i BERGMANN 1977
Transaminaza glutaminianowoszczawiooctanowa (GOT, E.C. 2.6.1.1)	3	4;3;3	LUNDKVIST 1979; ALTUCHOV i wsp. 1986

N – liczby alleli nie podano

* – liczba alleli podana łącznie dla *Picea abies* i *P. obovata*

nosi, na przykład 10%, to mówimy, że na mapie odległość między nimi wynosi 10 jednostek. W wyniku przeprowadzonych do tej pory prac udało się ustalić u świerka pospolitego, obok wcześniej odkrytej przez LUNDKVISTA, cztery dalsze, poniżej przedstawione grupy sprzężeniowe:

1. Got1, Pgi2, Dia4, Adh
2. Fle, Lap1, Me
3. G6pd, Idh2, Gdh
4. Pgm2, Mdh3

Spśród wymienionych loci, najsilniej sprzężone są dwie pary loci Got1/Pgi2 oraz Gdh/Idh2, między którymi częstość rekombinacji wynosi odpowiednio 6,2% i 7,8% (MUONA i wsp. 1987; LEWANDOWSKI i MEJNARTOWICZ 1994). Powyższe grupy sprzężeniowe zostały utworzone na podstawie danych z prac ALTUCHOVA i współpracowników (1986) MUONY i współpracowników (1987), GEBURKA i WUEHLISCHA (1989), GONČARENKI i współpracowników (1994). Jednak, jak dotąd, brak markerów chromosomowych uniemożliwia ustalenie, na ilu i jakich chromosomach powyższe grupy sprzężeniowe są ulokowane.

Wykryte u świerka pospolitego grupy sprzężeniowe są bardzo podobne nie tylko do tych, które znajduje się w obrębie rodzaju *Picea*, ale i u gatunków reprezentujących inne rodzaje drzew należących do rzędu iglastych (CONKLE 1981; KING i DANCİK 1983; CHELIAK i PITEL 1985; GONČARENKO i wsp. 1994). Powyższe rezultaty świadczą o tym, że genom drzew iglastych jest bardzo konserwatywny i w trakcie ewolucji nie zaszły istotne zmiany w ich chromosomach, przynajmniej wewnątrz oraz między analizowanymi do tej pory blokami genów.

Poznanie sprzężeń pomiędzy stosowanymi markerami genetycznymi (do których należą izoenzymy) ma również wymiar praktyczny. Otóż informacje na temat istniejących sprzężeń są istotne dla właściwej interpretacji wyników uzyskiwanych z analizy wielu loci, a przy obliczaniu niektórych parametrów genetycznych jest wręcz wskazane unikanie jednoczesnej analizy loci

ściśle ze sobą sprzężonych (NEI 1975; SHAW i wsp. 1981).

7.2.5. Polimorfizm świerka pospolitego w badaniach izoenzymowych

Enzymy, będące bezpośrednim produktem aktywności genów, znalazły bardzo szerokie zastosowanie w analizie populacji świerka pospolitego. Klasyczne już prace z wykorzystaniem polimorfizmu izoenzymów zostały wykonane na świerku pospolitym w 1971 roku (BARTELS i BERGMANN). Enzymy kodujące te same reakcje mogą różnić się między sobą w obrazie elektroforetycznym. Źródłem zmienności elektroforegramu może być przykładowo:

- 1 – Obecność genetycznie niezależnych protein, jak to ma miejsce w przypadku dehydrogenazy jabłczanowej czy aminotransferazy asparaginianowej (frakcje mitochondrialne i cytozolowe).
- 2 – Warianty genetyczne tego samego enzymu (allozymy).
- 3 – Proteiny połączone z innymi grupami (fosforylaza A i B).
- 4 – Polimery pojedynczej podjednostki (GDH)
- 5 – Przestrzennie różne formy.

Zmienność enzymów wykrywa się zwykle metodami elektroforezy na żelu akryloamidowym, skrobiowym lub innym. Wybarwione prążki na żelu nazywane są zymogramem. W ten sposób można dostrzec różnice w ruchliwości elektroforetycznej różnych wariantów enzymu, wykrywając około 30% zmienności genomu (LEWONTIN 1974)

Zmienność enzymów może mieć charakter neutralny – niezależny od środowiska (KIMURA i OHTA 1971) lub może wynikać z selekcji określonych genotypów, szczególnie faworyzującej heterozygoty (MARSHALL i ALLARD 1970). Na korzyść ostatniej teorii można przytoczyć zwykle większą heterozygotyczność w starych drzewostanach świerkowych, sosnowych, dąglęzjowych i u innych drzew nagonasiennych.

W specyficznych warunkach wysokogórskich, na granicy lasu, powstają szpalery świerkowe w drodze wegetatywnego i generatywnego rozmnażania. Porównanie genotypów poszczególnych drzew założycieli w szpalerach ujawniło, że znaczna ich większość była heterozygotami B1B2 w locus 6PGDH (STIMM i BERGMANN 1994).

Mimo że metodami elektroforetycznymi można wykryć tylko fragment całkowitej zmienności genomu, to poziom zmienności genetycznej, stwierdzonej do tej pory, u drzew leśnych okazał się bardzo wysoki (LEDIG 1986; MÜLLER-STARCK i wsp. 1992). Obserwowana, zwłaszcza u drzew iglastych, wysoka wartość zmienności genetycznej nie jest zaskakująca, zważywszy na fakt, że różnice wynikające z historii gatunku oraz strategii życiowej poszczególnych grup roślin, znajdują swe odbicie w poziomie ich zmienności genetycznej, mierzonej metodami elektroforezy białek enzymatycznych (HAMRICK i wsp. 1979). Zdaniem cytowanych autorów gatunki charakteryzujące się dużym zasięgiem geograficznym, o długim czasie trwania pokoleń, wysokiej płodności, krzyżowym sposobie rozmnażania oraz wiatropylne, wykazują generalnie wyższy poziom zmienności genetycznej. Poziom zmienności genetycznej zmierzonej u świerka pospolitego jest podobny do tego, jaki podaje się dla innych gatunków drzew iglastych o szerokich zasięgach występowania (LEDIG 1986; MÜLLER-STARCK i wsp. 1992).

Najpełniejszy obraz zmienności genetycznej u świerka pospolitego możemy znaleźć w pracy LAGERCRANTZA i RYMANA (1990). Autorzy ci badali 22 loci izoenzymowe w 70 populacjach świerka z całego zasięgu występowania (w tym 15 populacji z Polski). W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzili, że w badanym materiale 73% loci było polimorficznych, średnia liczba alleli w locus wyniosła 2,6, a średnia heterozygotyczność osiągnęła wartość 0,115. Zdaniem cytowanych wyżej autorów, obecny rozkład zmienności izoenzymowej świerka w Europie jest odwzorowaniem rozprzestrzenienia się gatunku z ostoi

po ostatnim zlodowaczeniu (patrz rozdz 1.1). Czas, jaki upłynął od ostatniego zlodowaczenia, był zbyt krótki, aby pomiędzy populacjami mogły powstać większe różnice genetyczne. Innymi słowami, obserwujemy w Europie ciągle różnicowanie się świerka w procesie adaptacji.

Prowadzone do tej pory w Polsce badania izoenzymowe nad świerkiem są skąpe. KRZAKOWA i KORCZYK (1995), uwzględniając wyłącznie 11 polimorficznych loci, stwierdzili bardzo wysoki średni poziom heterozygotyczności ($H_e = 0,253$ i $H_o = 0,237$) w populacji świerka z Puszczy Białowieskiej. Znaczna różnica w oszacowanej heterozygotyczności pomiędzy pracami LAGERCRANTZA i RYMANA (1990) oraz KRZAKOWEJ i KORCZYKA (1995) wynika głównie z uwzględnienia w drugiej z wymienianych prac małej liczby wyłącznie polimorficznych loci. LEWANDOWSKI i współpracownicy (1997) analizowali zmienność w 24 loci izoenzymowych u ponad 80 drzew, z trzech rejonów naturalnego występowania świerka. Okazało się, że tylko 53% loci było polimorficzne. Średnia liczba alleli w locus wyniosła 1,8 a średnia heterozygotyczność 0,134.

Według LAGERCRANTZA i RYMANA (1990) w środkowoeuropejskich populacjach świerka istnieje niższy poziom zmienności izoenzymowej, którego przyczyną mogła być utrata zmienności genetycznej podczas ostatniego zlodowaczenia w wyniku radykalnego zmniejszenia wielkości populacji w refugiach karpaccich. Obecnie działalność człowieka może również wpływać w sposób istotny na obniżenie poziomu zmienności genetycznej w populacjach drzew leśnych. GÖMÖRY (1992) porównując na Słowacji naturalne populacje świerka oraz populacje, które powstały w wyniku naturalnego odnowienia z populacjami sztucznie założonymi, stwierdził w tych ostatnich istotne obniżenie zmienności izoenzymowej. Zdaniem autora przyczyną tego zjawiska może być dryf genetyczny, wywołany zbyt małą liczbą drzew, których nasiona wykorzystano do zalesień.

Zbadany rozkład zmienności genetycznej u świerka jest zgodny z tym, jaki obserwuje się u większości gatunków drzew iglastych (LOVELLES i HAMRICK 1984). 95% całkowitej zmienności gatunku występuje wewnątrz populacji, a tylko 5% przypada na zmienność między populacjami (LAGERCANTZ i RYMANN 1990). Uważa się, że najważniejsze przyczyny małych różnic genetycznych obserwowanych między populacjami większości drzew iglastych, w tym także świerka pospolitego, to rozległe i ciągłe obszary występowania, duże zagęszczenie osobników w populacji, potencjalne zdolności do dalekiego transportu pyłku i nasion oraz dominujący krzyżowy sposób zapylania (HAMRICK i wsp. 1979).

Małe genetyczne zróżnicowanie świerka ma swoje odbicie w niskich wartościach dystansów genetycznych NEI'EGO (D) między populacjami tego gatunku. LAGERCRANTZ i RYMANN (1990) stwierdzili, że obliczone przez nich wartości dystansów genetycznych między badanymi 70 populacjami nie przekroczyły w żadnym przypadku wartości 0,04. Podobne wartości dystansów genetycznych znajdowane są również między populacjami innych iglastych gatunków drzew leśnych (YEH i EL-KASSABY 1980; GURIES i LEDIG 1982; WHEELER i GURIES 1982; LEWANDOWSKI i MEJNARTOWICZ 1991).

LEWANDOWSKI i współpracownicy (1997) stwierdzili niskie wartości dystansów genetycznych pomiędzy trzema grupami populacji z Polski (Sudety, Beskidy, północno-wschodnia Polska). Najmniejszy dystans ($D=0,005$) dzielił grupę populacji beskidzkich od grupy populacji z północno-wschodniej Polski, nieco większy ($D=0,006$) grupę populacji sudeckich od beskidzkich i największy ($D=0,008$) grupę populacji sudeckich od populacji z północno-wschodniej Polski. Również średnia wartość współczynnika zróżnicowania genetycznego była niska, wskazując, że tylko niecałe 3% całkowitej zmienności genetycznej przypada na zmienność między populacyjną. Dla porównania, wyliczony średni dystans genetyczny pomiędzy pięcioma popu-

lacjami modrzewia polskiego w rejonie Gór Świętokrzyskich wynosi 0,008 (LEWANDOWSKI 1995). O tym, na ile zróżnicowanie genetyczne pomiędzy polskimi populacjami świerka jest małe można się przekonać porównując dystanse genetyczne populacji z Polski, z wartościami dystansów genetycznych z innych obszarów. I tak, wartości dystansów genetycznych pomiędzy populacjami z różnych rejonów Polski są mniejsze, niż na przykład dystanse genetyczne wśród populacjami świerka z Łotwy, gdzie D zawiera się w zakresie od 0,005 do 0,012 (GONČARENKO i wsp. 1995). Również dystanse genetyczne w obrębie populacji włoskich są znacznie większe wynosząc od 0,002 do 0,042 (GIANNINI i wsp. 1991). Bardzo niska wartość dystansów genetycznych pomiędzy populacjami świerka z południa i północnego wschodu Polski jest dość zaskakująca. Jednak nie oznacza to braku możliwości wystąpienia istotnych różnic pomiędzy populacjami, nawet w obrębie jednego regionu geograficznego. Z pomocą unikalnych alleli można na przykład odróżnić populację świerka z Gołdapi od populacji Borki, pomimo że obie składają się głównie z fenotypów późnopędzących (ROTHE 1990).

Zgodnie z ogólnie przyjmowanym poglądem (ŚRODOŃ 1967; HUNTLEY i BRINGS 1983), świerk przywędrował do Polski z dwóch różnych refugium: południowy z Karpat, a północno-wschodni z rejonów dzisiejszej Moskwy. Według LEWANDOWSKIEGO i współpracowników (1997), za zanik genetycznego zróżnicowania między populacjami z północy i południa Polski mogą być odpowiedzialne co najmniej dwa czynniki. Pierwszy z nich, to zgodna z hipotezą LAGERCRANTZA i RYMANNA (1990) oraz SZAFERA (1935) naturalna, przebiegająca bez większych przeszkód wymiana materiału genetycznego między populacjami w okresie inwazji świerka po ostatnim zlodowaceniu. W związku z tym należy założyć, że obecny tak zwany pas bezświerkowy, czy pas o obniżonej częstości występowania świerka (patrz rozdz. 1.1 i 3.3) jest strefą stosunkowo

młoda, będąca wynikiem działalności człowieka lub stosunkowo niedawnych zmian klimatycznych (patrz rozdz. 3.3). Drugą możliwością, której nie można wykluczyć jest, zgodnie z twierdzeniem ŚRODONIA (1967), wpływ gospodarki człowieka związany z wymianą nasion między różnymi regionami. Wydaje się, że podjęcie intensywnych badań z dużą liczbą populacji z różnych rejonów Polski może w przyszłości pomóc w ostatecznym wyjaśnieniu tej kwestii.

7.2.6. Struktura genetyczna populacji oraz system kojarzenia

Poznanie struktury genetycznej ma fundamentalne znaczenie dla zrozumienia procesów genetycznych zachodzących w populacjach. Natomiast system kojarzenia, określając sposoby przekazywania informacji genetycznej z generacji rodzicielskiej do potomnej jest ważnym czynnikiem determinującym strukturę genetyczną populacji (STERN i ROCHE 1974; CLEGG 1980). Drzewa leśne znaczenie różnią się między sobą sposobem reprodukcji. Gatunki należące do rzędu iglastych są roślinami wiatropylnymi, charakteryzującymi się wysokim stopniem obcopenności, a ich pyłek i nasiona są przystosowane do przeniesienia przez wiatr, nawet na znaczne odległości.

System kojarzenia w populacjach iglastych drzew leśnych zgodny jest z modelem kojarzenia mieszanego (ang. *mixed-mating model*). Model ten zakłada, że część nasion zawiązanych przez roślinę powstaje w wyniku samozapłodnienia (s), a reszta po zapłodnieniu krzyżowym (t), gdzie $t = 1-s$ (SHAW i wsp. 1981; RITLAND i EL-KASSABY 1985). Zastosowanie izoenzymów jako markerów genetycznych bardzo ułatwiło analizę systemów kojarzenia u drzew leśnych. W ostatnich latach intensywnymi badaniami objęto szereg gatunków, zarówno w naturalnych populacjach, jak i na plantacjach

nasiennej. Badanie systemów kojarzenia, oprócz walorów poznawczych, ma pewne znaczenie praktyczne, gdyż pozwala z wysokim prawdopodobieństwem oszacować w puli badanych nasion, liczbę nasion, które powstały w wyniku samozapłodnienia. Uzyskanie tego rodzaju informacji o posiadanych nasionach jest cenne, gdyż wiele gatunków iglastych drzew leśnych charakteryzuje się silną depresją wsobną, która w następstwie samozapłodnienia czy kojarzenia krewniaczego prowadzi często do redukcji liczby wytworzonych pełnych nasion oraz zmniejszenia żywotności i wigoru potomstwa (KOSKI 1973; SORESENSEN i MILES 1982; FOWLER 1982; KOSIŃSKI 1986).

Świerk pospolity, obok sosny zwyczajnej, był pierwszym gatunkiem, dla którego określono wielkość samozapłodnienia. MÜLLER (1977) oraz LUNDKVIST (1979), na podstawie analizy unikalnych dla danych populacji alleli, oszacowali wielkość samozapłodnienia w nasionach pojedynczych drzew. Pomimo, że populacje pochodziły z różnych rejonów, autorzy ci stwierdzili podobne średnie wartości samozapłodnienia. W populacji niemieckiej samozapłodnienie wyniosło średnio 12%, wahając się w granicach od 7% do 18% (MÜLLER 1977). Z kolei w Szwecji średnia wartość samozapłodnienia wyniosła 11% w zakresie od 0% aż do 26%, w zależności od badanego drzewa (LUNDKVIST 1979).

Jednak korzystanie z metody unikalnych alleli niesie za sobą pewne niedogodności. Po pierwsze, należy najpierw znaleźć takie allele dla danej populacji, co nie zawsze się udaje. Po drugie, zastosowanie tej metody w naturalnych drzewostanach nie daje pewności, czy przypadkiem unikalny allel migrujący z pyłkiem nie pochodzi od innych, nie zbadanych w populacji drzew. Udoskonalenie metod statystycznych na początku lat osiemdziesiątych, pozwoliło na zastosowanie bardziej wyrafinowanych analiz, z możliwością wykorzystania jednoczesnej analizy wielu loci, niekoniecznie z unikalnymi allelami (SHAW i wsp. 1981; RITLAND i EL-KASSABY 1985).

Korzystając z tych metod MUONA i współpracownicy (1990) porównywali system kojarzenia w dwóch naturalnych populacjach, pochodzących z Finlandii i słowackich Tatr. Autorzy stwierdzili stosunkowo niskie wartości współczynników kojarzenia obcego odpowiednio $t = 0,83$ oraz $t = 0,74$, co wskazuje na możliwość istnienia w badanych populacjach kilkunastoprocentowego samozapłodnienia. Stosunkowo dużą wartość samozapłodnienia tłumaczy się redukcją efektywnej wielkości populacji, wywołaną słabym i nieregularnym kwitnieniem oraz zbiorem szyszek z dolnych rejonów korony. U drzew iglastych wielkość samozapłodnienia jest zazwyczaj większa w dolnej partii korony, co wiąże się z większą ilością gromadzącego się tu własnego pyłku (SHEN i wsp. 1981; SHAW i ALLARD 1982; BURCZYK i wsp. 1991). Znacznie wyższe wartości współczynników kojarzenia obcego (t) stwierdzili u świerka MORGANTE i współpracownicy (1991). Autorzy ci porównywali wielkość współczynników (t) w dwóch blisko leżących populacjach, różniących się jedynie zagęszczeniem osobników. Jedna z populacji posiadała średnio 25 drzew na hektar, druga zaś aż 315. Ku zaskoczeniu autorów, w obu populacjach stwierdzono identyczne wartości współczynników kojarzenia obcego ($t = 0,96$). Pozytywny wpływ wzrostu zagęszczenia populacji na wzrost wielkości współczynników kojarzenia obcego obserwowano u kilku innych gatunków iglastych drzew leśnych (FARRIS i MITTON 1984; KNOWLES i wsp. 1987; SHEA 1987). MORGANTE i współpracownicy (1991) próbują wytłumaczyć brak wpływu zagęszczenia populacji na wielkość (t) tym, że z jednej strony populacja o małym zagęszczeniu osobników nie przekroczyła jeszcze progu, poniżej którego efekt ten mógłby zaistnieć. Z drugiej zaś strony, istnienie czynników letalnych (KOSKI 1971) i poliembrii (SORENSEN 1982), może w skuteczny sposób eliminować przed dojrzaniem nasion większość zarodków powstałych w wyniku samozapłodnienia. W wyniku tych procesów, w bardzo podobnych pod

względem genetycznym populacjach, zaobserwowano te same wartości współczynników kojarzenia obcego.

Rezultatem wsobności w populacjach drzew leśnych jest obserwowany w pokoleniu potomnym nadmiar homozygot w stosunku do populacji będącej w równowadze HARDY'EGO-WEINBERGA. Wyraża się to dodatnią wartością współczynnika wsobności WRIGHTA (F). W przeciwieństwie do tego, u drzew matecznych stwierdza się zazwyczaj ujemne wartości współczynnika F . Jest to zjawisko typowe, zarówno w populacjach naturalnych, jak i populacjach sztucznie tworzonych przez człowieka (np. plantacje nasienne). Jak się wydaje, ujemna wartość współczynnika F dla populacji drzew matecznych powstaje głównie w wyniku naturalnej selekcji faworyzującej heterozygoty, eliminującej z wiekiem osobniki pochodzące z zapylenia wsobnego (BROWN 1979; YAZDANI i wsp. 1985; BUSH i SMOUSE 1992).

Z punktu widzenia gospodarki leśnej, bardzo ważnym zagadnieniem jest ocena jakości genetycznej nasion, jakie pozyskuje się z plantacji nasiennych. Dotychczasowe analizy systemów kojarzenia prowadzone z wykorzystaniem markerów izoenzymowych wskazują bowiem, że może dochodzić do znacznego obniżenia jakości wytwarzanych nasion, pod wpływem zwiększonego samozapłodnienia, nierównomiernego udziału poszczególnych klonów w produkcji potomstwa, czy zanieczyszczenia pyłkiem spoza plantacji (WHEELER i JECH 1992). PAULE i współpracownicy (1993), porównując dwie plantacje nasienne świerka w Szwecji, stwierdzili genetyczne zróżnicowanie pomiędzy pulami pyłku, który doprowadził do powstania badanych przez nich nasion. Chociaż w analizowanych populacjach poziom samozapłodnienia był niski, odpowiednio 2% i 5%, to bardzo niepokojącym zjawiskiem było stwierdzenie znacznego udziału pyłku spoza plantacji w tworzeniu zarodków. Mimo że plantacje były stosunkowo dobrze izolowane, to autorzy ci stwierdzili, że odpowiednio 10% i 17% gamet ojcowskich pochodziło spoza plantacji. Wydaje się jednak, że

rzeczywista wielkość zanieczyszczenia obcym pyłkiem badanych plantacji była znacznie większa, ponieważ zastosowane metody umożliwiły identyfikację jedynie około 25% obcych gamet.

Innym zagadnieniem związanym z plantacjami nasiennymi oraz małymi izolowanymi populacjami jest nierównomierny udział poszczególnych drzew w produkcji potomstwa. Może to być istotnym problemem na plantacjach nasiennej, które tworzone są z klonów pochodzących z różnych regionów, a więc mogących różnić się istotnie fenologią. XIE i KNOWLES (1992) obserwowali w małej, dobrze izolowanej plantacji świerka pospolitego w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, że większość drzew, z których badano nasiona, była zapylana przez stosunkowo niewielką liczbę drzew, a udział pyłku poszczególnych drzew ojcowskich był bardzo zróżnicowany w zależności od badanej matki. Natomiast tego rodzaju różnic nie zaobserwowano w dużych populacjach świerka w naturalnym obszarze jego występowania (FINKELDEY 1995). Zdaniem tego autora duże zagęszczenie osobników, znaczna produkcja pyłku przez większość osobników oraz synchronizacja okresów pylenia i receptywności kwiatów żeńskich przyczyniają się do wzmocnienia efektywności przepływu pyłku, zmniejszając tym samym możliwość nierównomiernego udziału poszczególnych drzew w procesie reprodukcji. Prezentowane badania wykazały również, że efektywny przepływ genów za pośrednictwem pyłku uniemożliwia powstanie genetycznego zróżnicowania na subpopulację w obrębie ciągłych kompleksów świerkowych, oczywiście w ograniczonej skali geograficznej.

7.2.7. Genetyczna analiza populacji z terenów zanieczyszczonych przez emisje przemysłowe

Przegląd prac z tego zakresu znajdzie Czytelnik w opracowaniach książkowych (BERGMANN i wsp. 1989; GIANNINI 1990; MEJ-

NARTOWICZ 1984, 1989). Pierwsze na świecie biochemiczne badania genetyczne nad zmianami w strukturze populacji drzew leśnych, wywołanymi przez zanieczyszczenie środowiska zostały wykonane w Polsce (MEJNARTOWICZ 1978; 1983). Z pomocą izoenzymów, jako genów markerowych udowodniono w tych pracach zmiany w częstości genów i genotypów, wyrażające się zaburzeniem obydwu tych cech populacji.

Źródłem tego typu zmian strukturalnych w populacji może być szereg czynników, jak na przykład zwiększona lub zmniejszona aktywność enzymów, czy substancji wzrostowych (MEJNARTOWICZ i OKONIEWSKA 1982; MEJNARTOWICZ i wsp. 1983) i najważniejsze – bezpośrednie uszkodzenia DNA wywołane przez ozon, dwutlenek siarki i węgla, fluorki, promieniowanie radioaktywne i inne źródła zanieczyszczenia.

Analiza chromosomów świerka pospolitego poddanego działaniu ozonu i dwutlenku węgla pojedynczo i łącznie, ujawniła liczne aberracje chromosomowe, jak mostki, zwiększoną lepkość chromosomów i inne objawy nienormalności, zarówno w chromosomach z merystemów wierzchołkowych korzeni, jak i z chloroplastów roślin rosnących w środowisku zatrutym gazami, w porównaniu do drzew kontrolnych (MÜLLER i wsp. 1994, 1995; TAUCH i wsp. 1994). Po zaprzestaniu działania ozonu i dwutlenku węgla na 5-letnie świerki, w populacji długo jeszcze pozostaje „efekt pamięciowy” w postaci nagromadzonych aberracji chromosomowych w merystemach korzeniowych (MÜLLER i wsp. 1995). W igłach świerków znajdujących się pod wpływem ozonu stwierdzono podwyższony poziom antyoksydantów – kwasu askorbinowego i glutationu oraz pigmentów chloroplastowych (TAUSCH WSP. 1994).

Specyficzny typ zanieczyszczenia środowiska pyłami o podwyższonej radioaktywności, wywołał w lasach świerkowych z okolic Czarnobyli zidentyfikowane mutacje w aktywności dehydrogenazy alkoholowej z nieaktywną formą tego enzymu (tzw. allel zerowy) i zmiany w ruchliwości ele-

ktroforetycznej dehydrogenazy glutaminianowej (GONČARENKO i wsp. 1991).

Analiza izoenzymowa populacji podzielonych na subpopulacje drzew wrażliwych i bardziej tolerancyjnych na zanieczyszczenie środowiska, opisana w wielu pracach, nie daje jednoznacznych odpowiedzi na typ zmian w strukturze populacji. Być może wiąże się to z różnicami w strategii adaptacyjnej poszczególnych gatunków drzew i z wielkością zanieczyszczenia. W większości badań stwierdza się istnienie różnic genetycznych między populacjami z terenów zanieczyszczonych i kontrolnych oraz między subpopulacjami drzew wrażliwych i bardziej tolerancyjnych (BERGMANN i SCHOLZ 1986, 1987, 1989; MEJNARTOWICZ 1983, 1986; MEJNARTOWICZ i PALOWSKI 1989; PRUS-GŁOWACKI i NOWAK-BZOWY 1992).

U sosny zwyczajnej z terenów zanieczyszczonych obserwujemy zwykle redukcję heterozygotyczności (MEJNARTOWICZ 1983, 1986; MEJNARTOWICZ i PALOWSKI 1989; PRUS-GŁOWACKI i NOWAK-BZOWY 1992). U świerka pospolitego i sosny zwyczajnej z obszarów zanieczyszczonych solami cynku, zaobserwowano zmiany w częstości genów kodowanych w loci LAP-A i LAP-B w porównaniu z drzewostanami kontrolnymi (HOSIUS 1994), podobnie jak to stwierdzono również i u sosny zwyczajnej (MEJNARTOWICZ 1978; MEJNARTOWICZ i PALOWSKI 1989).

Stres zanieczyszczeniowy wpływa w różny sposób na geny cyklu pentozofosforanów u świerka pospolitego. Przy porównaniu potomstwa z matkami niekiedy obserwuje się przysrost częstości heterozygot w loci kodujących niektóre enzymy tego cyklu (PRUS-GŁOWACKI i GODZIK 1995). W szczególności zaobserwowano znaczny przysrost heterozygot (o 10%) w locus 6-PGDH-C, podczas gdy w locus B stwierdzono nieistotny przysrost frekwencji heterozygot. Jednak w locus G-6-PDH-A zaobserwowano zwiększenie liczby homozygot w stosunku do heterozygot u potomstwa świerków z terenów silnie zanieczyszczonych odpadami z hut metali ciężkich, w porównaniu z materiałem kontrolnym (HOSIUS 1994).

Większą zmienność genetyczną świerka pospolitego w grupie drzew bardziej tolerancyjnych na zanieczyszczenie środowiska przypisuje się mechanizmowi selekcji faworyzującej heterozygoty oraz introgresji (BERGMANN i SCHOLZ 1987). Ostatnio opublikowane wyniki analiz izoenzymowych bardzo dużej populacji (ponad 1500 drzew) z 24 powierzchni obserwacyjnych w Niemczech potwierdzają wcześniejsze hipotezy, że interakcja różnorodnych warunków środowiskowych z kompleksem czynników antropogenicznych daje różne reakcje, nie zawsze o jednakowych trendach. Okazało się też, tak jak już w pierwszych publikacjach z tego zakresu, że pomiędzy grupą drzew tolerancyjnych i wrażliwych istnieje istotne zróżnicowanie w zakresie struktury genetycznej tych subpopulacji (MEJNARTOWICZ 1984, LOCHELET 1994).

7.2.8. Wpływ zabiegów gospodarczych na strukturę genetyczną populacji

Biochemiczna analiza efektów zabiegów hodowlanych wykazała, że wywierają one duży wpływ na kompozycję genetyczną populacji. HATTEMER już w 1978 roku zwrócił uwagę na konieczność utrzymania dużej różnorodności genetycznej w drzewostanach świerkowych i na możliwość jej monitorowania z pomocą izoenzymowych genów markerowych.

W pracach hodowlanych ważnym jest zachowanie odrębności populacyjnej drzewostanów przystosowanych do lokalnych warunków. Badania izoenzymowe, wykonane przez KONNERT (1994) na dużej populacji siewek świerka pospolitego, pochodzących z tej samej puli nasion, a wyhodowanych w trzech różnych szkółkach, wykazały istotne różnice w strukturze genetycznej, które powstały albo w drodze selekcji siewek wyrosłych w różnych warunkach, albo przez domieszkę obcego materiału siewnego.

Szeroko stosowana technika różnych upraw plantacyjnych świerka również przyczynia się do zmian w strukturze populacji. Na plantacjach nasiennych stwierdza się duże zachwianie w uczestnictwie poszczególnych klonów męskich w zapłodnieniu kwiatów i w produkcji nasion przez poszczególne klony. Według XIE i KNOWLES (1992; 1994) ponad 50% nasion było potomstwem jedynie 23% klonów męskich, w wyniku czego dochodzi do bardzo dużego samozapylenia drzew, co dało w efekcie 9% nasion z samozapłodnienia. SKRØPPA i LINDGREN (1994) sądzą, że tak wielkie różnice międzyklonalne w ojcostwie u świerka zwyczajnego wskazują na istnienie selekcji już na etapie pyłku. Autorzy ci stwierdzili, że ponad 50% gamet ojcowskich u zbadanych zygot miało zaburzenia w segregacji. Zjawisko to przypisują występowaniu postzygotycznej selekcji przeżyciowej lub wybiórczemu zapłodnieniu. Teoretyczne rozważania nad preferencjami zachodzącymi w trakcie zapładniania u drzew, na przykładach izoenzymowych genów markerowych przedstawił GREGORIUS (1991).

Wiele obaw wiąże się z wegetatywnym mnożeniem świerka przez ukorzenianie pędów. Metoda ta, mająca wielu zwolenników w krajach skandynawskich, może prowadzić do zwiększenia wsobności w populacji. SKOV i WELLENDOF (1994) stwierdzili wprawdzie, że ten typ mnożenia nie wpłynął na zmniejszenie genetycznej różnorodności dziesięcioletnich klonów świerkowych, w porównaniu z populacją mateczną, lecz w dwóch z 13 badanych loci stwierdzono zmiany w częstości alleli oraz wzrost indeksu wsobności od wartości zerowej w populacji matecznej do wartości +0,21 wśród klonów.

Tak zwane sztuczne drzewostany świerkowe, pochodzące z sadzenia lub siewu, mają niższą heterozygotyczność niż drzewostany z naturalnego odnowienia i dzieli je duży dystans genetyczny do populacji naturalnych (GÖMÖRY 1992). Może to być źródłem małej odporności tych drzewostanów na szkodniki gryzbowe i owadzie oraz

na działanie czynników natury nieożywionej. Powyższe dane wskazują na wysoką wartość zabiegów hodowlanych prowadzących do naturalnego odnowienia.

7.2.9. Izoenzymowa identyfikacja populacji autochtonicznych

Struktura populacji świerka pospolitego z różnych regionów różni się niekiedy obecnością rzadkich alleli. Z pomocą takich alleli wyróżniono na przykład świerki z Lasu Bawarskiego, późno rozpoczynające wegetację populacje świerka z Borek i Gołdapi, a także wyróżniono świerki z Alp Zachodnich od świerków z Alp Wschodnich (GIANNINI i wsp. 1994; KONNERT 1994; ROTHE 1990). Niektóre szczątkowe populacje świerków wysokogórskich z Alp Bawarskich posiadały specyficzny allel z APH, co pozwala sądzić o ich autochtoniczności (RUETZ i BERGMANN 1989). Izoenzymowa analiza drzewostanów świerkowych w Schwarzwaldzie wykazała brak istotnych różnic pod względem dystansu genetycznego pomiędzy drzewostanami, niezależnie od ich wzajemnej odległości geograficznej, czy od wysokości nad poziom morza, na której znajduje się drzewostan. Można zatem przypuszczać, że przynajmniej większość drzewostanów świerkowych tego ważnego regionu dla historii świerka w Środkowej Europie, pochodzi z jednego obszaru rozprzestrzeniania (KONNERT i FRANKE 1991).

7.2.10. Biochemiczna analiza podobieństwa genetycznego świerka pospolitego i świerka syberyjskiego

Świerk syberyjski (*Picea obovata* LEDEB.) uważany niekiedy za odrębny gatunek, według „Flora Europaea” traktowany jest jedynie jako podgatunek (patrz rozdz. 3.1). Stanowisko takie potwierdzają wyniki badań 27 loci izoenzymowych w 5 populacjach świerka pospolitego i dwóch świerka sybe-

ryjskiego, wykonane przez GONČARENKĘ i POTENKO (1991) oraz obszerne badania KRUTOVSKIEGO i BERGMANNA (1995), obejmujące szereg czystych i mieszańcowych populacji wspomnianych podgatunków. Analiza 22 loci izoenzymowych wykazała bardzo duże podobieństwo genetyczne obydwu taksonów. Porównanie wyników dla świerka pospolitego i świerka syberyjskiego

(dane w nawiasie) przedstawia się następująco: średnia liczba alleli w locus: 2,8 (2,4), procent loci polimorficznych przy 95% kryterium: 61,5 (61,5), średnia oczekiwana heterozygotyczność: 0,25 (0,21). Cytowani autorzy nie znaleźli ani jednego utrwalonego allelu wśród 22 badanych, który pozwoliłby na odróżnienie świerka syberyjskiego od pospolitego (KRUTOVSKIJ i BERGMANN 1995).

7.3. Ochrona zasobów genowych (Jan Matras, Lucjan Janson)

Do czasów historycznych drzewa i krzewy rozwijały się w naturalnych warunkach środowiska, bez znacznej ingerencji człowieka. Ich zróżnicowanie genetyczne było wynikiem ewolucji, która przez zmienność roślin tworzyła biologiczne podstawy dostosowywania się do zmieniających się warunków środowiska i dawała szanse przeżycia tylko najlepiej przystosowanym osobnikom. Obecnie tempo zmian globalnych warunków środowiskowych (ocieplanie się klimatu, efekt szklarniowy), łącznie z czynnikami działającymi lokalnie, jak między innymi emisje przemysłowe czy wylesienia oraz zabiegi hodowlane są przyczyną ograniczenia zmienności genetycznej. Szkodliwe wpływy wymienionych czynników powodują wypadanie początkowo pojedynczych, najmniej plastycznych genotypów, następnie populacji, a w krańcowych przypadkach nawet całych gatunków.

Chociaż w poszczególnych przypadkach lokalne czynniki powodujące ograniczenie zróżnicowania genetycznego mogą być bardzo niebezpieczne, jak na przykład w Sudetach, to prawdopodobnie największe znaczenie będzie miał w najbliższym czasie wpływ globalnych zmian klimatycznych. Według prognoz w najbliższych 100-letniach mogą z tego powodu nastąpić radykalne zmiany naturalnych zasięgów gatunków drzew, szczególnie iglastych, w strefie lasów iglastych i mieszanych.

Równie ważnym czynnikiem powodującym zmniejszanie zróżnicowania genetycznego, chociaż działającym lokalnie, są emisje przemysłowe. Powodują one zamieranie początkowo najbardziej podatnych genotypów, a następnie całych populacji występujących na obszarze oddziaływania tych czynników. Działanie emisji jest szczególnie niebezpieczne ze względu na kumulowanie się zanieczyszczeń w glebie.

Jedynym sposobem przeciwdziałania tym zagrożeniom jest podjęcie działań mających na celu zachowanie w długim okresie czasu istniejącego zróżnicowania genetycznego, również ze względów ekonomicznych, ponieważ istnieje wiele dotąd nierozpoznanych właściwości drzew, które w przyszłości będzie można wykorzystać.

7.3.1. Przepisy i uregulowania prawne dotyczące ochrony zróżnicowania genetycznego

Działania z zakresu szeroko rozumianej ochrony zasobów genowych wynikają z istniejących przepisów prawnych oraz porozumień międzynarodowych.

Ustawa z dnia 28 września 1991 roku o lasach w rozdziale 2, Art. 7 p. 1 zaleca prowadzenie gospodarki leśnej z uwzględnieniem: