



Andrzej Lewandowski

ENZYMATYCZNA ZMIENNOŚĆ MODRZEWIA EUROPEJSKIEGO  
(*Larix decidua* Mill.)



891-111V

Praca doktorska wykonana w  
Instytucie Dendrologii PAN  
w Kórniku pod kierownictwem  
prof. dr hab. Leona Mejnartowicza

Prace prof. dr hab.

Leonowi Mejnartowiczowi

za opiekę i okazaną pomoc w trakcie

wykonywania analiz biochemicznych

oraz przygotowaniu manuskryptu składam

serdecznie podziękowania.

KORNIK 1990

Andrzej Lewandowski

PRACOWNIA KSIĘGOWNI MUSEUM EUROPEJSKIEGO  
(Carix decidua Mill.)



VIII - 198

Praca doktorska wykonana w  
Instytucie Dendrologii PAN  
w Kórniku pod kierownictwem  
prof. dr hab. Leona Kępczowskiego

KORNIK 1990

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP.....	4
2. PRZEGLĄD LITERATURY.....	10
2.1. Dziedziczenia systemów enzymatycznych.....	10
2.2. Wielkość samozapłodnienia.....	13
2.3. Wielkość i rozkład zmienności genetycznej.....	13
3. MATERIAŁ I METODY.....	17
3.1. Materiał roślinny.....	17
3.1.1. Materiał do badań nad dziedziczeniem systemów enzymatycznych.....	17
3.1.2. Materiał do badań nad wielkością samozapłodnienia.....	17
3.1.3. Materiał do badań populacyjnych.....	18
3.2. Metody biochemiczne.....	21
3.3. Metody matematyczne.....	22
3.3.1. Dziedziczenie badanych enzymów.....	22
3.3.2. Wielkość samozapłodnienia.....	28
3.3.3. Miary zmienności genetycznej populacji.....	29
3.3.4. Zróżnicowanie genetyczne między badanymi populacjami.....	38
4. WYNIKI.....	33
4.1. Dziedziczenie badanych enzymów.....	33
4.2. Wielkość samozapłodnienia.....	42
4.3. Zmienność genetyczna.....	42
4.3.1. Częstości alleli i heterozygotyczność.....	42
4.3.2. Średni.....	42
4.3.3. Efekt.....	42
4.3.4. Proces.....	42
4.3.5. Współ.....	42
4.3.6. Wartości dystansu genetycznego.....	42

Panu prof. dr hab.  
Leonowi Mejnartowiczowi  
za opiekę i okazaną pomoc w trakcie wykonywania analiz biochemicznych oraz przygotowaniu maszynopisu składam serdeczne podziękowania.

SPIS TRESCI

1. WSTĘP.....	7
2. PRZEGLĄD LITERATURY.....	10
2.1. Dziedziczenie systemów enzymatycznych.....	10
2.2. Wielkość samozapłodnienia.....	11
2.3. Wielkość i rozkład zmienności genetycznej.....	12
3. MATERIAŁ I METODY.....	17
3.1. Materiał roślinny.....	17
3.1.1. Materiał do badań nad dziedziczeniem systemów enzymatycznych.....	17
3.1.2. Materiał do badań nad wielkością samozapłodnienia.....	17
3.1.3. Materiał do badań populacyjnych.....	18
3.2. Metody biochemiczne.....	21
3.3. Metody matematyczne.....	27
3.3.1. Dziedziczenie badanych enzymów.....	27
3.3.2. Wielkość samozapłodnienia.....	28
3.3.3. Miary zmienności genetycznej populacji.....	29
3.3.4. Zróżnicowanie genetyczne między badanymi populacjami.....	30
4. WYNIKI.....	33
4.1. Dziedziczenie badanych enzymów.....	33
4.2. Wielkość samozapłodnienia.....	49
4.3. Zmienność genetyczna.....	49
4.3.1. Częstości alleli i heterozygotyczności oczekiwane.....	49
4.3.2. Średnia liczba alleli w locus.....	61
4.3.3. Efektywna liczba alleli w locus.....	62
4.3.4. Procent loci polimorficznych.....	62
4.3.5. Współczynniki genetycznego zróżnicowania badanego gatunku według Nei.....	65
4.3.6. Wartości dystansu genetycznego.....	67

5. DYSKUSJA.....	71
5.1. Dziedziczenie enzymów.....	71
5.2. Wielkość samozapłodnienia.....	78
5.3. Wielkość oraz rozkład zmienności genetycznej.....	82
6. STRESZCZENIE.....	95
7. LITERATURA.....	99
3. MATERIAŁ I METODY..... 17	
3.1. Materiał roślinny..... 17	
3.1.1. Materiał do badań nad dalekościanymi systemami enzymatycznymi..... 17	
3.1.2. Materiał do badań nad wielkością samozapłodnienia..... 17	
3.1.3. Materiał do badań populacyjnych..... 18	
3.2. Metody biochemiczne..... 21	
3.3. Metody matematyczne..... 27	
3.3.1. Dalekościanie badań enzymów..... 27	
3.3.2. Wielkość samozapłodnienia..... 28	
3.3.3. Miary zmienności genetycznej populacji..... 29	
3.3.4. Zróżnicowanie genetyczne między badanymi populacjami..... 30	
4. WYNIKI..... 32	
4.1. Dalekościanie badań enzymów..... 33	
4.2. Wielkość samozapłodnienia..... 40	
4.3. Zmienność genetyczna..... 40	
4.3.1. Częstości alleli i heterozygotyczność jest oczekiwane..... 40	
4.3.2. Średnia liczba alleli w locus..... 61	
4.3.3. Efektywna liczba alleli w locus..... 62	
4.3.4. Procent loci polimorficznych..... 62	
4.3.5. Współczynniki genetycznego zróżnicowania badanego gatunku według Nei..... 63	
4.3.6. Wartości dystansu genetycznego..... 67	

## 1. WSTĘP.

Modrzew europejski (*Larix decidua* Mill.) jest według Rubnera (1952) jednym z najbardziej interesujących drzew w Europie z punktu widzenia leśnictwa i geografii roślin. Zainteresowanie modrzewiem jako cennym drzewem dla gospodarki leśnej wzrosło wcześniej, bo już w połowie XVIII wieku, kiedy wycięto naturalne lasy zachodniej i środkowej Europy (Barański 1970). Jednym z głównych powodów dla których wybrano modrzew jest jego szybki wzrost, dający już w młodości duży przyrost masy oraz cenne drewno. Pomimo różnych walorów o charakterze zarówno gospodarczym jak i estetycznym, znaczenie gospodarcze tego gatunku jest jednak stosunkowo niewielkie. W Polsce drzewostany modrzewia od III klasy wieku w zwyż na początku lat pięćdziesiątych zajmowały 127800 hektarów, co stanowiło około 1,8% powierzchni Lasów Państwowych (Boratyński 1986).

W Europie modrzew europejski występuje w czterech rejonach: Alpy, Sudety, Tatry i środkowa Polska oraz na kilku rozproszonych stanowiskach w południowo-wschodnich Karpatach i Górach Bihar w Rumunii. Modrzew alpejski (*Larix decidua* subsp. *decidua* Mill) zajmuje obszar od południowo-wschodnich granic Francji, poprzez centralne Alpy, dochodząc na wschodzie aż po Wiedeń. W Alpach rośnie on w różnorodnych warunkach klimatycznych, dochodząc do wysokości 2500 m.n.p.m.. Jednak najobficiej występuje w dolinach Centralnych Alp, gdzie panuje klimat kontynentalny. Z kolei na pograniczu północnych Alp modrzew rośnie w strefie wpływu klimatu oceanicznego. Występowanie modrzewia sudeckiego (*Larix decidua* subsp. *decidua* var. *sudetica* (Domin) Svoboda) ograniczone jest do północno-wschodnich Sudetów. Rośnie on tu na wysokości od 300 do 800 m.n.p.m., na przejściu klimatu oceanicznego i kontynentalnego. W Tatrach występuje lokalna rasa tego gatunku - *Larix decidua* subsp. *decidua* var. *adenocarpa*

Bobr., gdzie rośnie do górnej granicy lasu w formie pojedynczych drzew z *Picea abies* i *Pinus cembra*. Natomiast w niższych partiach spotyka się go głównie z *Pinus silvestris*. Centrum występowania modrzewia polskiego (*Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib.) Domin) leży w rejonie Gór Świętokrzyskich. Spotyka się go tu na obszarze o wzniesieniu od 150 do 600 m.n.p.m., gdzie panuje umiarkowany klimat kontynentalny.

Wielka różnorodność warunków klimatycznych i ekologicznych, w jakich bytuje modrzew europejski, sprzyjała wytworzeniu lokalnych ras oraz szeregu ekotypów na terenie Europy. Znalazło to swe odbicie w powstaniu różnic o charakterze morfologicznym jak i fizjologicznym. Do dobrych metod porównywania skali zmienności cech oraz wartości hodowlanej różnych ekotypów drzew leśnych należą doświadczenia proveniencyjne, dające możliwość obserwacji i pomiaru osobników różnych populacji w wybranych warunkach środowiskowych. Badania te potwierdzają istnienie istotnych różnic morfologicznych i fizjologicznych między wydzielonymi rasami modrzewia europejskiego (przeglądowe prace na ten temat ogłosili McComb 1955 oraz Mejnartowicz i Kosiński 1986).

Do końca lat sześćdziesiątych pomiar cech morfologicznych stanowił jedyny dostępny opis zmienności genetycznej populacji. Wyniki biometryczne uzyskane na tej drodze są jednak często niedogodnym źródłem informacji w badaniach populacyjnych, ze względu na fakt, że cechy morfologiczne zazwyczaj znajdują się pod kontrolą wielu genów. Sytuacja uległa radykalnej zmianie na początku lat siedemdziesiątych, kiedy to do opisu zmienności genetycznej populacji drzew leśnych zastosowano markery biochemiczne. Okazało się, że poszczególne formy białek enzymatycznych, zwane izoenzymami mogą być pod kontrolą pojedynczych genów (allozymy), co bardzo ułatwiło przeprowadzanie formalnej analizy genetycznej.



Prowadzone obecnie prace z zakresu genetyki biochemicznej drzew leśnych obejmują badania nad dziedziczeniem różnych systemów enzymatycznych, strukturą genetyczną oraz procesami genetycznymi zachodzącymi w populacjach drzew leśnych. Uwzględnia się również możliwości wykorzystania markerów enzymatycznych w praktyce hodowlanej. Bogaty przegląd prac dotyczących zmienności enzymatycznej drzew leśnych podaje Prus-Głowacki (1982).

Mimo bardzo znacznego postępu prac z wykorzystaniem izoenzymów oraz tego, że modrzew europejski należy do gatunków, które najwcześniej zaczęto badać tymi metodami (Mejnartowicz i Bergmann 1975), drzewo to pozostaje nadal jednym z najmniej poznanych gatunków drzew iglastych w Europie. Jedną z przyczyn jest zapewne duża trudność pozyskania nasion, które ponadto w znacznym procencie są puste.

W związku z powyższym podjęto pracę, której celem było: 1.) poznanie dziedziczenia wybranych systemów enzymatycznych, 2.) oszacowanie proporcji żywych nasion powstałych w wyniku samozapylenia, 3.) zbadanie poziomu i organizacji zmienności genetycznej naturalnych populacji modrzewia europejskiego. Tego typu informacje mogą przyczynić się zarówno do lepszego poznania procesów mikroewolucyjnych zachodzących między populacjami, jak i racjonalnego wykorzystania zasobów genetycznych badanego gatunku. W przyszłości zaś mogą być pomocne w rozwiązaniu wciąż niejasnej i kontrowersyjnej sprawy pochodzenia modrzewia polskiego.

## 2. PRZEGLĄD LITERATURY.

### 2.1. DZIEDZICZENIE SYSTEMÓW ENZYMATYCZNYCH.

Izoenzymy okazały się bardzo cennymi markerami genetycznymi w studiach nad strukturą genetyczną populacji roślin. Jednak aby poszczególne izoenzymy mogły spełnić kryterium markera biochemicznego wymagane jest dokładne poznanie sposobu ich dziedziczenia.

Drzewa iglaste są szczególnie dogodnym obiektem w tego typu badaniach, ze względu na istnienie w ich nasieniu obok tkanki diploidalnej (zarodek), również tkanki haploidalnej (makrogametofit). Ustalając wzory dziedziczenia poszczególnych izoenzymów w haploidalnej tkance makrogametofitu można łatwo określić genotyp matecznego drzewa, bez uciekania się do wykonywania uciążliwych krzyżówek.

Prace prowadzone u szeregu gatunków drzew iglastych wskazują na dziedziczenie się wielu systemów enzymatycznych zgodne z prawami Mendla (Bergmann 1973, Rudin 1977, Guries i Ledig 1978, El-Kassaby i inni 1982, Cheliak i Pitel 1985, Millar 1985).

Jak dotąd, u modrzewia europejskiego, poznano sposób dziedziczenia jedynie aminopeptydazy leucynowej, kwaśnej fosfatazy i esterazy (Mejnartowicz i Bergmann 1975 oraz Kosiński i Szmidt 1984).

W dalszej części pracy, przy omawianiu genetycznej kontroli badanych u modrzewia europejskiego systemów enzymatycznych, porównano sposób ich kodowania z wynikami dostępnymi w literaturze a otrzymanymi dla innych gatunków drzew iglastych.

## 2.2. WIELKOŚĆ SAMOZAPŁODNIENIA.

Sugeruje się, że występowanie naturalnych populacji modrzewia europejskiego w formie niewielkich grup rozproszonych drzew oraz posiadanie przez ten gatunek ciężkiego, pozbawionego worków powietrznych pyłku może sprzyjać dużej wsobności (Mejnartowicz i Bergman 1975). Jak dotąd brak jest jednak informacji na temat rozmiarów samozapłodnienia u modrzewia europejskiego.

Kosiński (1986) badając przyczyny powstawania pustych nasion u tego gatunku stwierdził, że po samozapyleniu, z powodów głównie o podłożu genetycznym, ginie od 85 do 100% zarodków. Natomiast Knowles i inni (1987) stwierdzili, że u *Larix laricina* około 27% żywych nasion powstaje w wyniku samozapłodnienia.

Prosta metoda pozwalająca na oszacowanie stopnia samozapłodnienia u drzew iglastych polega na sprawdzeniu rozprzestrzenienia rzadkiego, macecznego allelu w puli pyłku wniesionego do potomstwa (Müller 1976, Rudin i inni 1986). U drzewa homozygotycznego pod względem rzadkiego allelu, przy jednoczesnej analizie makrogametofitu i zarodka, możliwe do identyfikacji jest całe potomstwo, które powstało w wyniku samozapłodnienia. W przypadku zaś gdy maceczne drzewo jest heterozygotą, do ustalenia możliwa jest jedynie połowa tego potomstwa. Na tej podstawie Müller (1976) oszacował wielkość samozapłodnienia u jednego klonu *Picea abies* z plantacji nasiennej na 14.7 %. Wyliczona zaś wielkość samozapłodnienia dla *Pinus sylvestris* i *P. taeda* (badano po pięć klonów) wynosiła odpowiednio 16% i 1.2 % (Rudin i Ekberg 1982 oraz Adams i Joly 1980).

Tak obliczana wielkość samozapłodnienia jest jednak obarczona pewnym błędem, zwłaszcza gdy w populacji znajduje się kilka drzew z rzadkim allelem. Szczególnie istotne jest to w przypadku prac nad naturalnymi populacjami, gdzie z przyczyn technicznych i finansowych nie ma możliwości przebadania wszystkich osobników. W

związku z powyższym Rudin i inni (1986), przy obliczaniu wielkości samozapłodnienia, obserwowaną częstość rzadkiego allelu w puli pyłku wniesionego do potomstwa matecznego drzewa pomniejszają o wielkość średniej częstości tego allelu w puli pyłku z całego badanego obszaru. Wyliczona przez tych autorów wartość samozapłodnienia, na podstawie analizy pięciu klonów *Pinus sylvestris*, wynosiła 11.9 % (w naturalnym stanowisku) i 8.3 % (na plantacji nasiennej) (Rudin i inni 1986).

Inne metody oceny proporcji żywych nasion powstałych w wyniku samozapłodnienia ( $s$ ) opierają się na wyliczeniu wskaźników kojarzenia niekrewniaczego -  $t$  (outcrossing rate), wykorzystując informacje o oczekiwanej oraz obserwowanej częstości alleli u drzew matecznych i ich potomstwa (analiza zarodków). Obliczone na tej podstawie wartości  $t$  były zawsze bardzo wysokie, wskazując na niski udział samozapłodnienia ( $s = 1-t$ ) i dla kilku gatunków wynosiły: 0.90 u *Pinus radiata* i *Pseudotsuga menziesii* (Moran i inni 1980 oraz El-Kassaby i inni 1981), 0.88 i 0.93 u *Picea glauca* (King i inni 1984), 0.93-0.98 u *Pinus contorta* (Perry i Dancik 1986), 0.99 u *P. taeda* (Friedman i Adams 1985), 0.92 i 0.93 u *Picea mariana* (Boyle i Morgenstern 1986), 0.95 i 0.98 u *Pinus monticola* (El-Kassaby i inni 1987).

### 2.3. WIELKOŚĆ I ROZKŁAD ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ.

Ostatnie dziesięciolecie przyniosło bardzo istotny wzrost liczby prac dotyczących zmienności genetycznej drzew iglastych, mierzonej wielkością polimorfizmu białek enzymatycznych (Yeh i El-Kassaby 1980, Yeh i O'Malley 1980, Guries i Ledig 1982, Yeh i inni 1986, Fins i Seeb 1986, Cheliak i inni 1988, Moran i inni 1988).

Dane literaturowe mówią o wysokiej wartości zmienności genetycznej wyrażonej za pomocą heterozygotyczności oraz o

jej znacznym zróżnicowaniu między badanymi gatunkami drzew iglastych. Wyjątkiem są tu niektóre rzadkie gatunki jak *Pinus torreyana* i *Pinus resinosa* charakteryzujące się małym zasięgiem, dla których wyliczona wartość heterozygotyczności wynosi zero (Ledig i Conkle 1983, Fowler i Morris 1977).

Obserwowana u drzew iglastych wysoka wartość zmienności biochemicznej nie jest zaskakująca zważywszy na fakt, że różnice pod względem pewnych charakterystycznych cech ewolucyjnych i strategii życiowej poszczególnych grup roślin znajdują swe odbicie w poziomie zmienności genetycznej mierzonej metodami elektroforezy (Hamrick i inni 1979). Zdaniem cytowanych wyżej autorów gatunki charakteryzujące się dużym zasięgiem o długim czasie trwania pokoleń, wysokiej płodności, niekrewniaczym systemie rozmnażania, wiatropylne - wykazują ogólnie wyższy poziom zmienności genetycznej. Natomiast obserwowane między badanymi gatunkami drzew iglastych dość znaczne różnice w średnich wartościach heterozygotyczności mogą być odbiciem, bądź realnie istniejących różnic międzygatunkowych, bądź też są wynikiem stosowania różnych technik laboratoryjnych, analizowania odmiennych loci i różnym sposobem interpretacji otrzymanych na zymogramach prążków. Przy tym, czego należało oczekiwać, ze względu na ograniczony przepływ genów, populacje ze skrajnego zasięgu wykazują tendencję do zmniejszenia heterozygotyczności w stosunku do populacji centralnych (Bergmann i Gregorius 1979, Guries i Ledig 1982). Brzeżne populacje często swoje pochodzenie zawdzięczają małej liczbie osobników (efekty założyciela i "wąskiego gardła"), co sprzyja obniżeniu poziomu zmienności genetycznej.

Lewontin (1974) ocenia, że dla prawidłowej oceny stopnia heterozygotyczności potrzebna jest analiza co najmniej 100 loci. Narazie jednak, warunek ten spełniony

został tylko w badaniach genetycznych człowieka i muszki owocowej.

Jak dotąd, w literaturze brak jest doniesień na temat rozmiaru i organizacji zmienności genetycznej w naturalnych populacjach modrzewia europejskiego. Natomiast wartość heterozygotyczności oczekiwanych dla dwóch amerykańskich gatunków z rodzaju *Larix* - *L. laricina* oraz *L. occidentalis* wynoszą odpowiednio 0,22 i 0,082 (Cheliak i Pitel 1988 oraz Fins i Seeb 1986).

U drzew leśnych zdecydowana większość zmienności genetycznej, obserwowanej na poziomie izoenzymów, realizowana jest wewnątrz populacji. Jedynie mała jej część przypada na zmienność międzypopulacyjną. Poziom zmienności genetycznej między populacjami wyrażony za pomocą współczynnika  $G_{ST}$  (Nei 1975) wynosi od 1% (wskazując, że tylko 1% całkowitej zmienności gatunku przypada na różnice międzypopulacyjne) u *Pinus ponderosa* (Woods i inni 1983) do 16% u *Pinus radiata* (Moran i inni 1988). Przy tym niska wartość  $G_{ST}$  wcale nie musi świadczyć o braku istotnych różnic między populacjami w częstościach poszczególnych alleli. Boyle i Morgenstern (1987) badając 6 populacji *Picea mariana*, odległych między sobą od 1,4 do 52,1 km, stwierdzili statystycznie istotne różnice co do częstości alleli w dwóch na dwanaście analizowanych loci, przy wartości współczynnika  $G_{ST} = 0.01$ . Mała wartość  $G_{ST}$  wskazuje natomiast, że całkowita zmienność genetyczna między populacjami drzew iglastych jest niska w stosunku do zmienności wewnątrzpopulacyjnej. Obliczona wartość  $G_{ST}$  dla *L. laricina* (badano zmienność 19 loci w 36 populacjach) wynosi 0,05 (Cheliak i Pitel 1985). Natomiast Fins i Seeb (1986) u *L. occidentalis*  $G_{ST}$  oszacowali na 0,086 (badano 23 loci w 19 populacjach).

Jak dotąd nie znaleziono korelacji między zmiennością poszczególnych form allelicznych enzymów ze zmiennością cech morfologicznych. Ogólnie rzecz biorąc jakościowy obraz zmienności biochemicznej jest dość zgodny z obrazem zmienności wynikającym z pomiaru cech morfologicznych w badaniach proweniencyjnych i testowaniu potomstwa. Gatunki takie jak *Picea sitchensis* czy *Pinus contorta* charakteryzujące się dużą zmiennością cech morfologicznych i fizjologicznych (Burley 1966, Critchfield 1957 cyt. za Yeh 1988), posiadają również wysoki poziom polimorfizmu enzymatycznego (Yeh i El-Kassaby 1980, Wheeler i Guries 1982). Z kolei morfologicznie jednolite gatunki jak *Pinus resinosa* i *Thuja plicata* (Wright i inni 1972, Minore 1969 cyt. za Yeh 1988), posiadają również bardzo niski poziom polimorfizmu wykrytego metodą elektroforezy na żelu skrobiowym (Flower i Morris 1977, Yeh 1988). Natomiast rozmiar zróżnicowania genetycznego obserwowanego na poziomie izoenzymów jest jednak znacznie mniejszy od tego jaki wynika z pomiarów cech morfologicznych w doświadczeniach proweniencyjnych. Być może ma to związek z faktem, że metodami elektroforezy na żelu skrobiowym udaje się wychwycić mniej niż 30% całkowitej zmienności genetycznej (Lewontin 1974).

Wheeler i Guries (1982) porównując, dla kilkunastu populacji *Pinus contorta*, wyniki uzyskane z badań izoenzymatycznych i pomiaru cech morfologicznych stwierdzili, że populacje te pod względem podobieństwa układają się w identyczne grupy, mimo obserwowanych większych różnic między populacjami pod względem cech morfologicznych.

Ostatnio z coraz większym powodzeniem próbuje się wykorzystywać obserwacje uzyskane na drodze elektroforetycznych rozdziałów białek enzymatycznych w badaniach taksonomicznych. Średni dystans genetyczny według Nei (1975) między *P. contorta* ssp. *latifolia* a *P.*

*banksiana* (Dancik i Yeh 1983) jest 20 razy większy niż dystans między populacjami wewnątrz gatunków. Natomiast Millar i inni (1988) analizując trzy gatunki sosen z Kaliforni (*P. attenuata*, *P. muricata*, *P. radiata*), stwierdzili, że genetyczne różnice między populacjami należącymi do różnych gatunków były dwukrotnie większe niż różnice między populacjami wewnątrz poszczególnych gatunków.

Jak się wydaje, poziom zmienności genetycznej obserwowany u poszczególnych gatunków drzew iglastych jest prawdopodobnie odbiciem głównie nieselekcyjnych zdarzeń z niedawnej historii gatunku (Lewontin 1974) oraz ich systemu kojarzenia (Brown 1979).



### 3. MATERIAŁ I METODY.

#### 3.1. Materiał roślinny.

Materiał badawczy stanowiły tkanki makrogametofitów i zarodków modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.).

##### 3.1.1. Materiał do badań nad dziedziczeniem systemów enzymatycznych.

Do tego typu badań niezbędne jest posiadanie nasion pochodzących z pojedynczych drzew. Szyszki zebrano z 95 drzew, pięciu populacji modrzewia europejskiego: Babki, Ciechostowice, Mała Wieś, Skarżysko, Zwolen oraz z 25 klonów rosnących w archiwum klonów Instytutu Dendrologii w Kórniku. Do czasu analiz, wyłuszczone oddzielnie z każdego drzewa nasiona przechowywano w temp.  $-3^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2. Materiał do badań nad wielkością samozapłodnienia.

Materiałem były nasiona zebrane oddzielnie z 23 drzew rosnących na terenie oddziału 133c Leśnictwa Ciechostowice. Zbioru szyszek dokonano w roku 1987, który był dla modrzewia rokiem średniego urodzaju. Populacja w skład której wchodzi wyżej wymienione drzewa jest jedną z najlepiej udokumentowanych naturalnych populacji modrzewia polskiego na terenie naszego kraju (Kulesza 1927). Spośród 23 drzew wybrano dwanaście posiadających rzadkie allele w jednym z następujących loci: *gdh*, *mdh1*, *mdh2*, *mdh3*, *shdh*, *srhdh*. Wymienione loci okazały się bardzo dobrymi markerami genetycznymi (patrz dyskusja, rozdział 5.1). Dla każdego z 23 drzew analizowano równocześnie makrogametofity i zarodki z 60 nasion powstałych w wyniku wolnego zapylenia.

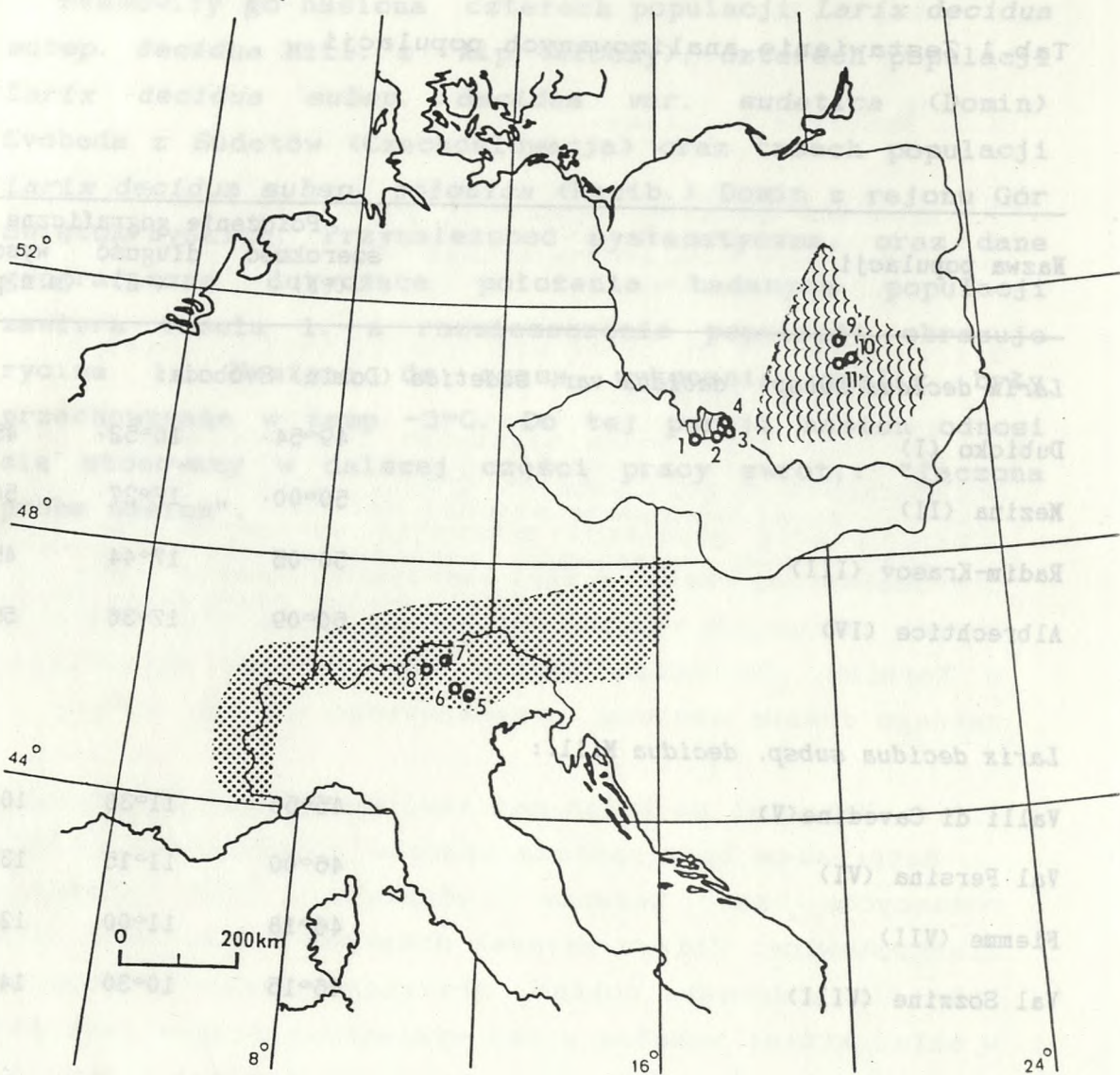
### 3.1.3. Materiał do badań populacyjnych.

Stanowiły go nasiona czterech populacji *Larix decidua* subsp. *decidua* Mill. z Alp (Włochy), czterech populacji *Larix decidua* subsp. *decidua* var. *sudetica* (Domin) Svoboda z Sudetów (Czechosłowacja) oraz trzech populacji *Larix decidua* subsp. *polonica* (Racib.) Domin z rejonu Gór Świętokrzyskich. Przynależność systematyczną, oraz dane geograficzne dotyczące położenia badanych populacji zawiera tabela 1. a rozmieszczenie populacji obrazuje rycina 1. Nasiona do czasu wykonania analiz były przechowywane w temp  $-3^{\circ}\text{C}$ . Do tej porcji nasion odnosi się stosowany w dalszej części pracy zwrot, : "łączona próba nasion".

Tab.1 Zestawienie analizowanych populacji.

Nazwa populacji	Położenie geograficzne		
	szerokość (°N)	długość (°E)	wysokość (m. n. p. m.)
<i>Larix decidua</i> subsp. <i>decidua</i> var. <i>sudetica</i> (Domin) Svoboda:			
Dubicko (I)	49°54'	16°52'	450
Mezina (II)	50°00'	17°27'	500
Radim-Krasov (III)	50°05'	17°44'	450
Albrechtice (IV)	50°09'	17°36'	550
<i>Larix decidua</i> subsp. <i>decidua</i> Mill.:			
Valli di Cavedine (V)	45°56'	11°30'	1000
Val Fersina (VI)	46°00'	11°15'	1300
Fiemme (VII)	46°18'	11°00'	1200
Val Sozzine (VIII)	46°15'	10°30'	1400
<i>Larix decidua</i> subsp. <i>polonica</i> (Racib.) Domin:			
Drzewica (IX)	51°27'	20°29'	150
Jastrzębia (X)	51°08'	20°44'	300
Odrowążek (XI)	51°07'	20°36'	300





Ryc.1 Rozmieszczenie badanych populacji: 1-4 populacje modrzewia sudeckiego, 5-8 populacje modrzewia alpejskiego, 9-11 populacje modrzewia polskiego. Zakreślone obszary oznaczają zasięgi poszczególnych ras modrzewia europejskiego.



### 3.2. Metody biochemiczne.

W przedstawionej pracy analizowano zmienność następujących enzymów: aminopeptydazy leucynowej (E.C. 3.4.1.1), dehydrogenaz - glukozy-6-fosforanowej (E.C. 1.1.1.49), glutaminianowej (E.C. 1.4.1.2), izocytrynianowej (E.C. 1.1.1.42), jabłczanowej (E.C. 1.1.1.37), mrówczanowej (E.C. 1.2.1.2), sorbitolowej (E.C. 1.1.1.14), szikimianowej (E.C. 1.1.1.25) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (E.C. 1.15.1.1), esterazy (E.C. 3.1.1.2) i reduktazy menadionowej (Tab.2).

W celu przeprowadzenia analizy genetycznej z każdego pojedynczego drzewa analizowano wstępnie po 6-9 nasion. W badaniach populacyjnych dla każdego systemu enzymatycznego, w każdej z 11 populacji, badano po 70-110 nasion. Z nasion po przecięciu oddzielano tkankę makrogametofitu od zarodka. Makrogametofit homogenizowano w 35 $\mu$ l, a zarodki w 15 $\mu$ l buforu homogenizacyjnego Tris-HCl pH 7,2. Do 50 ml buforu homogenizacyjnego dodawano 75 $\mu$ l 2-merkaptoetanolu jako antyutleniacza oraz 3 krople Tritonu X-100.

Homogenatem nasączano paski bibuły Whatmann 3MM o wymiarach 3 X 8 mm i наносzono na żel. Na każdej płycie z żelem układano po około 50 skrawków z białkowym homogenatem.

Analizę izoenzymów w ekstraktach z makrogametofitów i zarodków prowadzono w 12% żelu skrobiowym. Do rozdzielania poszczególnych białek enzymatycznych zastosowano trzy systemy buforowe (Tab.2). System I według Ridgewaya i innych (1970). Bufor elektrodowy: 0,3M kwas borowy, 0,06M wodorotlenek litu, pH 8,2. Bufor żelowy: 0,03M Tris, 1% buforu elektrodowego, odczyn wyrównany kwasem cytrynowym do wartości pH 8,5. System II według Siciliano i Shaw (1976). Bufor elektrodowy: 0,13M Tris, 0,043M kwas cytrynowy, pH 7,0. Bufor żelowy przygotowywano przez rozcieńczenie buforu elektrodowego wodą destylowaną w

stosunku 1:10. System IIa stanowił modyfikację systemu II, gdzie bufor żelowy uzyskano przez rozcieńczenie buforu elektrodowego wodą w stosunku 1:6.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 2,5 godziny, stosując prąd o natężeniu ok. 40 mA i napięciu 120 V na jedną płytę żeluz dla systemu buforowego I oraz przez 2,5 godziny przy natężeniu prądu ok. 30 mA i napięciu 90 V na jedną płytę żeluz dla systemu buforowego II, i IIa. Po rozdzieleniu płyt żeluz przecinano na 2-4 warstwy i każdą z warstw barwiono na aktywność innego enzymu.

Tabela 2. Zestawienie analizowanych enzymów, loci enzymatycznych i alleli oraz zastosowanych systemów buforowych.

Enzym	System buforowy	Locus	Allele			
			1	2	3	4
Aminopeptydaza leucynowa (EC 3.4.1.1)	I	Lap1	100	97	103*	N
		Lap2	100	96*	104	104d*
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (EC 1.1.1.49)	I	G6pd	100	85	105	
Dehydrogenaza glutaminianowa (EC 1.4.1.2)	I	Gdh	100	85	107*	
Dehydrogenaza izocytrynianowa (EC 1.1.1.42)	II	Idh	100	75*	105*	
Dehydrogenaza jabłczanowa (EC 1.1.1.37)	II	Mdh1	100	125		
		Mdh2	100	110		
		Mdh3	100	40	130*	N
		Mdh4	100			
Dehydrogenaza mrówczanowa (EC 1.2.1.2)	I	Fdh	100			
Dehydrogenaza sorbitolowa (EC 1.1.1.14)	I	Srdh	100	85		
Dehydrogenaza szikimianowa (EC 1.1.1.25)	II	Shdh	100	70	115	155
Dysmutaza ponadtlenkowa (EC 1.15.1.1)	I	Sod1	100			
		Sod2	100	75*	140*	
Esteraza (EC 3.1.1.2)	I	Est1	100	95	N	
		Est3	100	70	130	170*
Reduktaza menadionowa (EC 1.1.1.25)	IIa	Mnr2	100			
		Mnr3	100	85*	120*	130
		Mnr4	100	110		

\* rzadkie allele obserwowane tylko w mieszanej próbie nasion.

Zastosowano, z pewnymi modyfikacjami, skład mieszanin barwiących podanych w zbiorczej pracy Cheliak i Pitel (1984) oraz Tsay i Taylor (1978) dla FDH.

Aminopeptydaza leucynowa (LAP):

60 ml 0.2M buforu Tris-kwas maleinowy pH 5.5

50 mg L-leucylo- $\beta$ -naftyloamidu chlorowodorek

40 mg sól trwała K

inkubować w ciemności w temp. 37°C

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

180 mg glukozy-6-fosforanu sodu

2 ml 10% MgCl<sub>2</sub>

16 mg NADP

12 mg NBT

4 mg MTT

2 mg PMS.

inkubować w ciemności w temp. 37°C.

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

400 mg glutaminianu sodu

16 mg NAD

16 mg NBT

2 mg PMS.

inkubować w ciemności w temp. 37°C.

Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

60 mg DL-izocytrynianu sodu

2 ml 10% MgCl<sub>2</sub>

12 mg NADP

16 mg NBT

2 mg PMS

inkubować w ciemności w temp. 37°C.



Dehydrogenaza jabłczanowa (MDH):

60 ml 0.2 M buforu Tris-HCl pH 8.0

90 mg DL-jabłczanu sodu

2 ml 10%  $MgCl_2$ .

2 ml 0,1M KCN

16 mg NAD

20 mg NBT

2 mg PMS

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Dehydrogenaza mrówczanowa (FDH):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

1 g mrówczanu sodu

16 mg NAD

16 mg NBT

2 mg PMS

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Dehydrogenaza sorbitolowa (SRDH):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

1.6 g D-sorbitolu

16 mg NAD

12 mg NBT

4 mg MTT

2 mg PMS

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Dehydrogenaza szikimianowa (SHDH):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

100 mg kwasu szikimianowego

2 ml 10%  $MgCl_2$

16 mg NADP

12 mg NBT

4 mg MTT

2 mg PMS

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 8.0

4 mg ryboflawiny

130 mg EDTA-Na<sub>2</sub>

6 mg NBT

inkubować w ciemności w temp. 37 °C przez 30 minut  
a następnie naświetlać w świetle UV przez 20-30 minut.

Po tym okresie na ciemnym żelu, w miejscu aktywności  
enzymu będą widoczne jasne prążki.

Esteraza (EST):

60 ml 0.2M buforu fosforanowego pH 6.0

3 ml 1% octanu α-naftyłu\*

1 ml 1% octanu β-naftyłu\*

100 mg fast blue RR salt

\* roztwory octanu α- i β-naftyłu otrzymano przez  
rozpuszczenie tych substancji w mieszaninie acetonu i  
wody w stosunku 1:1.

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Reduktaza menadionowa (MNR):

60 ml 0.2M buforu Tris-HCl pH 7.2

40 mg menadionu

30 mg NADH

16 mg NBT

inkubować w ciemności w temp. 37 °C.

Po barwieniu żele utrwalano i odczytywano, porównując  
otrzymane wyniki ze wzorcami. Do oznaczeń enzymów, loci i  
alleli przyjęto system, który zaproponowali Allendorf i  
inni (1977) oraz Yeh i O'Malley (1980). Locus, dla  
którego prążki charakteryzowały się największym tempem  
migracji podczas trwania elektroforezy, w kierunku anody  
oznaczono jako 1, następny jako 2 itd. Najbardziej częsty  
allel w locus oznaczono wartością 100. Poszczególnym

allelom w danym locus przypisywano liczbę wskazującą względną szybkość wędrówki określonej frakcji w elektroforezie, w stosunku do frakcji najczęściej występującej (oznaczonej jako 100). Formę nieaktywną enzymu, tzw. "null allele" oznaczano literą "N". Jeżeli białka w jakimś systemie enzymatycznym kodowane były w kilku loci, to określone allele oznaczano w następujący sposób. Najpierw zapisywano symbol locus w jakim kodowany był allel a następnie, po myślniku, oznaczenie liczbowe tego allelu, np.: Lap1-96, co oznacza allel o symbolu 96 w locus 1. Używane skróty enzymów i loci enzymatycznych utworzono od angielskich nazw analizowanych enzymów.

### 3.3 Metody matematyczne.

#### 3.3.1. Dziedziczenie badanych enzymów.

Celem przeprowadzenia wstępnej analizy genetycznej, dla każdego systemu enzymatycznego, ze wszystkich pojedynczych drzew badano po 6-9 nasion. Przy zakładanej segregacji alleli w stosunku 1:1, prawdopodobieństwo wadliwego sklasyfikowania heterozygoty jako homozygoty, w poszczególnym locus, określone jest wzorem:  $(\frac{1}{2})^{k-1}$ , gdzie k jest liczbą analizowanych nasion. Analizując po 6 nasion z każdego drzewa szansa znalezienia heterozygoty w badanym locus wynosi więc 97%. Zgodność obserwowanej segregacji wykrytych form enzymatycznych z zakładanym mendlowskim dziedziczeniem w stosunku 1:1 sprawdzono testem  $\chi^2$ , u wybranych 25 drzew charakteryzujących się największą zmiennością w badanych systemach enzymatycznych. Testu  $\chi^2$  używano także do oszacowania różnorodności rezultatów dla analizowanych drzew (Mather 1963).

### 3.3.2. Wielkość samozapłodnienia.

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

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

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

$p_m$  - częstość rzadkiego allelu wniesionego przez gamety męskie (pyłek) w zarodkach powstałych w wyniku wolnego zapylenia matecznego drzewa (heterozygotycznego pod względem rzadkiego allelu).

$p_p$  - częstość rzadkiego allelu w puli pyłku obserwowanej na podstawie analizy zarodków drzew badanej populacji, wyłączając zarodki drzew matecznych mających rzadki allel.

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

### 3.3.3. Miary zmienności genetycznej populacji.

W pracy użyto następujących miar zmienności genetycznej badanych populacji.

#### 1. Heterozygotyczność oczekiwana ( $H_{exp}$ ):

Heterozygotyczność oczekiwana w danym locus liczono według wzoru Nei (1975):

$$h_{exp} = 1 - \sum p_i^2$$

gdzie  $p_i$  - częstość i-tego allelu.

Srednią heterozygotyczność dla populacji ( $H_{exp}$ ) stanowiła średnia arytmetyczna wartości  $h_{exp}$  ze wszystkich badanych loci,

#### 2. Srednia liczba alleli w locus ( $n_{m}$ ):

Dla danej populacji obliczana była jako średnia arytmetyczna ze wszystkich badanych loci.

#### 3. Efektywna liczba alleli w locus ( $n_{ef}$ ):

Efektywna liczba alleli w locus jest bardziej przydatną miarą zmienności genetycznej populacji niż średnia liczba alleli w locus, gdyż ściśle skorelowana jest z heterozygotycznością oczekiwaną. Wartość ta określona jest wzorem:

$$n_{ef} = 1 / \sum p_i^2 \quad (\text{Crow i Kimura 1970})$$

gdzie  $p_i$  - częstość i-tego allelu.

Efektywna liczba alleli osiąga maksymalną wartość przy jednakowej częstości alleli w danym locus. Srednią efektywną liczbę alleli w locus dla danej populacji liczono jako średnia geometryczna z n wartości dla indywidualnych loci (Lundkvist 1979).

#### 4. Procent loci polimorficznych:

W literaturze często spotyka się dwa kryteria oceny polimorficzności danego locus (Ayala i inni 1971, Yeh i O'Malley 1980).

Według pierwszego kryterium za polimorficzny uznaje się ten locus, w którym częstość allelu 100 jest mniejsza lub równa 0,95. Według zaś drugiego kryterium dla polimorficznego locus, częstość allelu 100 jest mniejsza lub równa 0,99.

W celu porównania wyników otrzymanych u modrzewia z wynikami literaturowymi dla innych gatunków drzew iglastych, procent loci polimorficznych liczono uwzględniając oba kryteria.

#### 3.3.4. Zróżnicowanie genetyczne między badanymi populacjami.

1. Istotność różnic w częstościach alleli między badanymi populacjami sprawdzano za pomocą testu Chi-kwadrat (Oktaba 1966).

2. W pracy wykorzystano miary genetycznego zróżnicowania według Nei (1975).

Na całkowitą różnorodność genową populacji ( $H_T$ ) składają się - różnorodność genowa wewnątrzpopulacyjna ( $H_S$ ) oraz międzypopulacyjna ( $D_{ST}$ ).

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Poszczególne wielkości można wyliczyć ze wzorów:

$$H_T = 1 - \sum x_i^2$$

gdzie  $x_i$  - średnia częstość i-tego allelu

$$H_S = 1 - \sum \sum x_{ik}^2 / s$$

gdzie  $x_{ik}$  - częstość i-tego allelu w k-tej populacji

s - liczba populacji

$$D_{ST} = \sum \sum D_{jk} / s^2$$

$$\text{gdzie } D_{jk} = \sum (x_{1k} - x_{1j})^2 / 2$$

Względną wielkość genetycznego zróżnicowania można wyrazić za pomocą współczynnika  $G_{ST}$ .

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

$G_{ST}$  obrazuje jaką część całkowitej zmienności genetycznej gatunku przypada na zmienność międzypopulacyjną.

Jakkolwiek  $G_{ST}$  jest dobrą miarą genetycznego zróżnicowania między populacjami, to jednak jest ona silnie zależna od wartości  $H_T$ . Gdy wartość  $H_T$  jest mała to  $G_{ST}$  przyjmuje dużą wartość, nawet w przypadku gdy absolutna zmienność genetyczna jest mała.

W związku z tym Nei (1975) wprowadził miarę absolutnego genetycznego zróżnicowania  $D_m$ .

$$D_m = s D_{ST} / (s-1)$$

$D_m$  pozwala oszacować minimalne różnice w kodonie między badanymi populacjami. Miara ta jest niezależna od genetycznego zróżnicowania wewnątrz badanych populacji i może być zastosowana przy porównywaniu stopnia genetycznego zróżnicowania różnych organizmów.

3. Różnice genetyczne między badanymi populacjami można wyrazić za pomocą standardowego dystansu genetycznego (D):

$$D = -\log(J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}) \quad (\text{Nei 1975}), \text{ gdzie:}$$

$J_x, J_y, J_{xy}$  - są średnimi arytmetycznymi wielkościami  $j_x, j_y$  oraz  $j_{xy}$  ze wszystkich badanych loci (włączając loci monomorficzne), gdzie:

$$j_x = \sum x_i^2$$

$$j_Y = \sum y_i^2$$

$$j_{X \times Y} = \sum x_i y_i$$

$x_i$  oraz  $y_i$  są częstościami  $i$ -tego allelu odpowiednio w populacji X i Y.

Do obliczenia dystansu genetycznego użyto programu komputerowego (Sattler i Hilburn 1985).

Program ten pozwala obliczyć dystans genetyczny wg Nei z kilkoma modyfikacjami:

1. z modyfikacją redukującą błąd powstały ze względu na małą wielkość analizowanej próby (Nei 1978).
2. przedefiniowanie genetycznego podobieństwa pozwalające zredukować błąd powstały z niejednakowego, we wszystkich loci, tempa podstawienia aminokwasów (Hills 1984).
3. "jackknife" przybliżenie redukujące błąd powstały ze względu na małą liczbę analizowanych loci (Mueller i Ayala 1982).

Na podstawie obliczonych dystansów genetycznych pomiędzy parami populacji, skonstruowano dendrogram metodą średnich arytmetycznych nieważonych - UPGMA (Sneath i Sokal 1973). W prezentowanej pracy zdecydowano się na wybór tej metody, gdyż jest ona jedną z najczęściej stosowanych w literaturze co pozwala porównać otrzymane wyniki z danymi z innych prac. Metodę tę zalecają Nei i inni (1983) jako najlepszą dla prezentacji dendrogramów konstruowanych na podstawie dystansów genetycznych liczonych według metody tego autora (Nei 1972).



#### 4. WYNIKI

##### 4.1. DZIEDZICZENIE BADANYCH ENZYMÓW:

W badanym materiale analizowano 11 systemów enzymatycznych kodowanych w 19 loci. Statystyczna analiza częstości występowania różnych fenotypów badanych loci, w próbkach nasion z pojedynczych, heterozygotycznych drzew, wykazała we wszystkich przypadkach zgodność dziedziczenia w oczekiwanym stosunku 1:1. Zestawienie analizowanych drzew pod względem liczby przebadanych makrogametofitów oraz segregację poszczególnych form allelicznych enzymów przedstawia tabela 3. W dalszej części tekstu przedstawiono sposób dziedziczenia poszczególnych enzymów.

##### Aminopeptydaza leucynowa (LAP).

Dla tego enzymu stwierdzono istnienie dwóch, niezależnie dziedziczających się stref (oznaczonych jako 1 i 2) z 5 allelami: Lap1-97, Lap1-100, Lap1-N, Lap2-100 oraz Lap2-104 (Ryc.2 i 3). W łączonej próbie nasion znaleziono dodatkowo trzy rzadkie allele: Lap1-103 oraz Lap2-96, Lap2-104d, których nie odnotowano wcześniej w próbie nasion pochodzącej z pojedynczych drzew. Różnice w tempie migracji pomiędzy prążkami, odpowiadającymi poszczególnym formom allelicznym enzymu są niewielkie. Mimo tej trudności, na zymogramach będących obrazem rozdziału ekstraktów białkowych pochodzących z heterozygotycznych zarodków, daje się wyróżnić dwa prążki świadczące o monomerycznym charakterze badanego enzymu.

Tab.3 Obserwowana segregacja allozymów z tkanki makrogametofitu heterozygotycznych drzew modrzewia europejskiego oraz wyniki testu Chi-kwadrat na zgodność segregacji w stosunku 1:1 i różnorodności rezultatów dla analizowanych drzew.

Locus	Symbol	Wzór segregacji	Obserwowana segregacja	Odchlenie		Różnorodność	
				$\chi^2(1)$	P	$\chi^2(df)$	P
Est1	10-01	95/100	35; 47	1,756	,10 - ,25	-	-
	MW 7	95/N	31; 33	,063	,75 - ,90	-	-
	ST 1	100/N	30; 39	1,174	,25 - ,50	-	-
	MW 15	100/N	28; 31	,153	,50 - ,75	-	-
	ST 8	100/N	23; 23	,000	>,99	-	-
	razem	100/N	81; 93	,828	,25 - ,50	,499(2)	,75 - ,90
Est3	10-01	70/100	42; 40	,049	,75 - ,90	-	-
	10-20	100/130	30; 26	,286	,50 - ,75	-	-
Gdh	CI 1	85/100	40; 38	,051	,75 - ,90	-	-
	CI 3	85/100	34; 26	1,067	,25 - ,50	-	-
	CI 23	85/100	36; 24	2,400	,10 - ,25	-	-
	CI 24	85/100	32; 28	,267	,50 - ,75	-	-
	razem	85/100	142; 116	2,620	,10 - ,25	1,164(3)	,50 - ,75
G6pd	10-09	85/100	29; 25	,296	,50 - ,75	-	-
	10-06	85/105	24; 34	1,724	,10 - ,25	-	-
	SK 5	100/105	31; 28	,153	,50 - ,75	-	-
Lap1	ST 6	97/100	22; 21	,023	,75 - ,90	-	-
	SK 5	100/N	32; 37	,362	,50 - ,75	-	-
	SK 7	100/N	33; 27	,600	,25 - ,50	-	-
	razem	100/N	65; 64	,008	,90 - ,95	,954(1)	,25 - ,50
Lap2	SK 7	100/104	31; 29	,067	,75 - ,90	-	-
	ST 6	100/104	20; 23	,209	,50 - ,75	-	-
	razem	100/104	51; 52	,010	,90 - ,95	,266(1)	,50 - ,75
Mdh1	MW 3	100/125	29; 28	,018	,90 - ,95	-	-
	MW 7	100/125	36; 37	,014	,90 - ,95	-	-
	razem	100/125	65; 65	,000	>,99	,032(1)	,75 - ,90
Mdh2	10-01	100/110	24; 29	,472	,25 - ,50	-	-
	CI 9	100/110	38; 28	1,515	,10 - ,25	-	-
	CI 13	100/110	47; 37	1,190	,25 - ,50	-	-
	razem	100/110	109; 94	1,108	,25 - ,50	2,069(2)	,25 - ,50

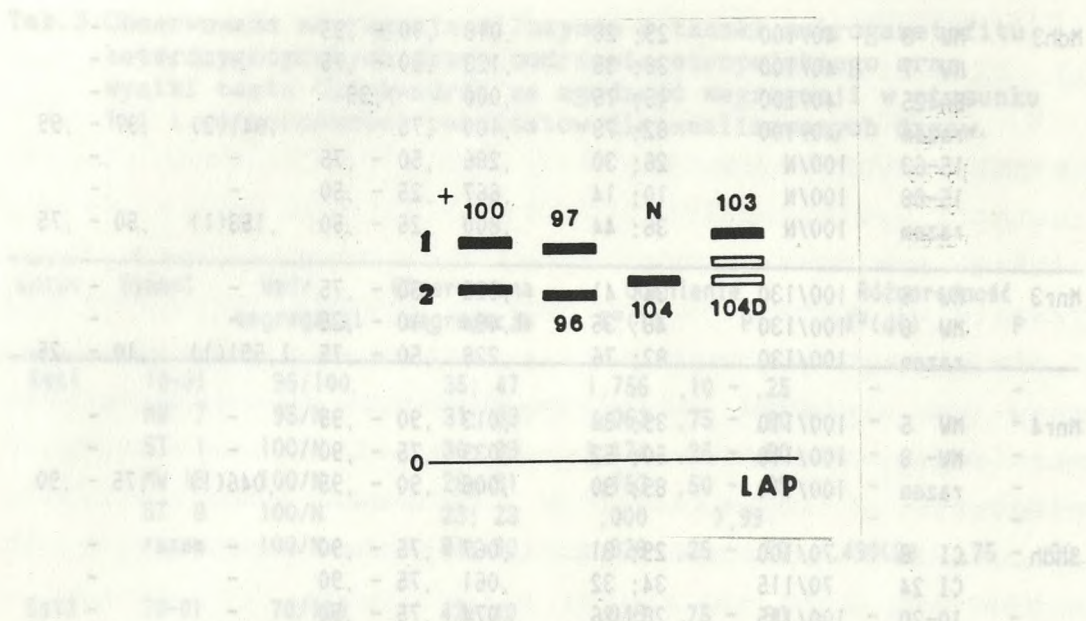
kontynuacja tabeli z poprzedniej strony:

Mdh3	MW 3	40/100	29; 28	,018	,90 - ,95	-	-
	MW 7	40/100	38; 35	,123	,50 - ,75	-	-
	BA425	40/100	15; 15	,000	>,99	-	-
	razem	40/100	82; 78	,100	,75	,041(2)	,97 - ,99
	15-63	100/N	26; 30	,286	,50 - ,75	-	-
	15-88	100/N	10; 14	,667	,25 - ,50	-	-
	razem	100/N	36; 44	,800	,25 - ,50	,153(1)	,50 - ,75
Mnr3	MW 5	100/130	36; 41	,325	,50 - ,75	-	-
	MW 8	100/130	46; 35	1,494	,10 - ,25	-	-
	razem	100/130	82; 76	,228	,50 - ,75	1,591(1)	,10 - ,25
Mnr4	MW 5	100/110	39; 38	,013	,90 - ,95	-	-
	MW- 8	100/110	50; 52	,039	,75 - ,90	-	-
	razem	100/110	89; 90	,006	,90 - ,95	,046(1)	,75 - ,90
Shdh	CI 8	70/100	29; 31	,067	,75 - ,90	-	-
	CI 24	70/115	34; 32	,061	,75 - ,90	-	-
	10-20	100/115	28; 26	,074	,75 - ,90	-	-
	CI 2	100/115	37; 41	,205	,50 - ,75	-	-
	razem	100/115	65; 67	,030	,75 - ,90	,249(1)	,50 - ,75
	10-25	100/155	37; 41	,205	,50 - ,75	-	-
Srdh	CI 2	85/100	69; 57	1,143	,25 - ,50	-	-

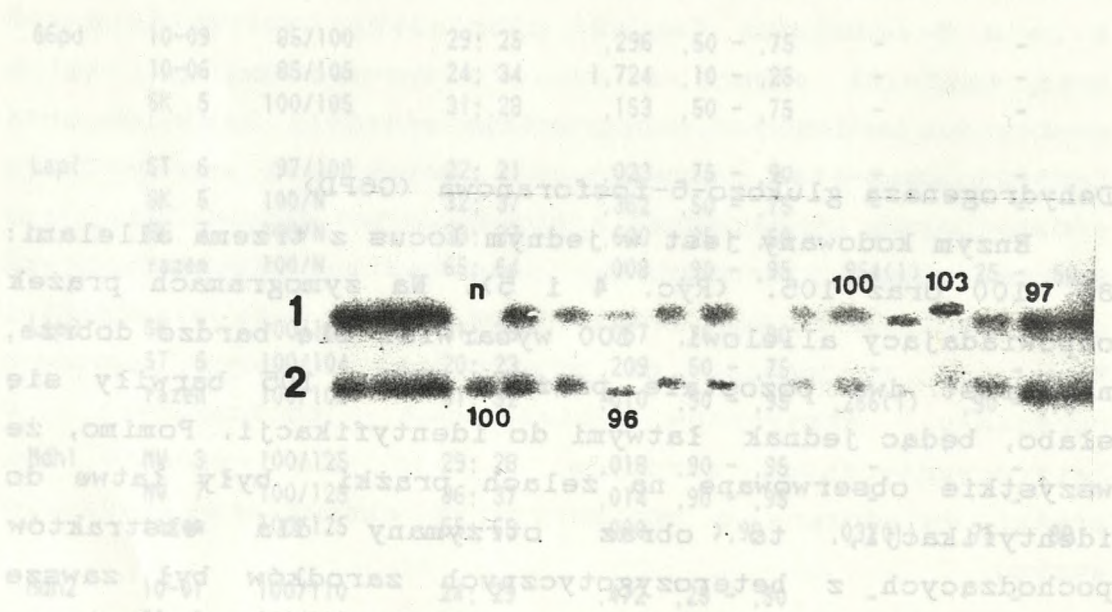
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD).

Enzym kodowany jest w jednym locus z trzema allelami: 85, 100 oraz 105. (Ryc. 4 i 5). Na zymogramach prążek odpowiadający allelowi 100 wybarwiał się bardzo dobrze, natomiast dwa pozostałe prążki: 85 i 105 barwiły się słabo, będąc jednak łatwymi do identyfikacji. Pomimo, że wszystkie obserwowane na żelach prążki były łatwe do identyfikacji, to obraz otrzymany dla ekstraktów pochodzących z heterozygotycznych zarodków był zawsze rozmyty. W związku z tym niemożliwe było określenie struktury czwartorzędowej tego enzymu.

kontynuacja tabeli z poprzedniej strony



Ryc.2 Schemat obrazu rozdziálu elektroforetycznego uzyskanego dla aminopeptydazy leucynowej (LAP). Liczbami 1 i 2 oznaczono odpowiednie loci, pozostałe liczby wskazują odpowiednie allele. Literą N oznaczono formę nieaktywna enzymu (null allele).



Ryc.3 Obraz elektroforetycznego rozdziálu LAP. 1 oraz 2 - odpowiednie loci. Poszczególne allele oznaczono wartościami: 96, 97, 100, 103 oraz literą N.

Dehydrogenaza izocyttrynianowa (IDH):  
Badany kodowany test w jednym locus. Osiem alleli 100, 105 i 110. W analizie dwa trzaski alleli 85 i 105 (Ryc. 4).  
Zmiany genetyczne w locus IDH: 100, 85, 105

Dehydrogenaza izocyttrynianowa (IDH):  
Badany kodowany test w jednym locus. Osiem alleli 100, 105 i 110. W analizie dwa trzaski alleli 85 i 105 (Ryc. 4).  
Zmiany genetyczne w locus IDH: 100, 85, 105

Ryc. 4 Schemat obrazu rozdzału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD). Liczbami oznaczono odpowiednie allele.

Dehydrogenaza izocyttrynianowa (IDH):  
Badany kodowany test w jednym locus. Osiem alleli 100, 105 i 110. W analizie dwa trzaski alleli 85 i 105 (Ryc. 4).  
Zmiany genetyczne w locus IDH: 100, 85, 105

Dehydrogenaza izocyttrynianowa (IDH):  
Badany kodowany test w jednym locus. Osiem alleli 100, 105 i 110. W analizie dwa trzaski alleli 85 i 105 (Ryc. 4).  
Zmiany genetyczne w locus IDH: 100, 85, 105

Ryc. 5 Obraz rozdzału elektroforetycznego G6PD. Liczbami: 85, 100 oraz 105 oznaczono odpowiednie allele.

Dehydrogenaza izocyttrynianowa (IDH):  
Badany kodowany test w jednym locus. Osiem alleli 100, 105 i 110. W analizie dwa trzaski alleli 85 i 105 (Ryc. 4).  
Zmiany genetyczne w locus IDH: 100, 85, 105

#### Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH):

Enzym kodowany jest w jednym locus. Obok allelu 100, znaleziono dwa rzadkie allele 85 i 107. (Ryc.6 i 7). W materiale pochodzącym z pojedynczych drzew natrafiono na cztery heterozygotyczne drzewa z rzadkim allelelem 85. Zymogramy otrzymane podczas rozdzielów elektroforetycznych heterozygotycznych zarodków 85/100 dawały obraz charakterystyczny dla białek będących multimerami (Ryc.7).

#### Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH).

Stwierdzono istnienie jednej strefy aktywności enzymu z allelelem 100 oraz dwoma rzadkimi allelami 75 i 105 znalezionymi jedynie w łączonej próbie nasion. (Ryc.8). W związku z tym, że nie udało się znaleźć zmienności w nasionach pochodzących z pojedynczego drzewa, niemożliwe było przeprowadzenie analizy dziedziczenia alleli oraz jednoznacznie określić strukturę czwartorzędową badanego enzymu.

#### Dehydrogenaza jabłczanowa (MDH).

Na żelach, które barwiono na aktywność dehydrogenazy jabłczanowej obserwowano pięć stref aktywności enzymatycznej (Ryc.11). Cztery z tych stref kodowane są przez 4 loci i zostały oznaczone odpowiednio: Mdh1, Mdh2, Mdh3, Mdh4. Natomiast prążki piątej strefy, leżące między Mdh2 i Mdh3 są heterodimerem - produktem tych dwóch loci. Zmienność w tempie wędrówki prążków regionu Mdh2 lub Mdh3 wpływa na zmianę położenia prążka heterodimerowego, jednak w ten sposób, że jest on obecny zawsze pośrodku prążków regionu Mdh2 i Mdh3. (Ryc.11, 12A). Stwierdzono, że u modrzewia europejskiego locus Mdh4 jest monomorficzny. Po dwa allele: Mdh1-100, Mdh1-125 oraz Mdh2-100, Mdh2-110 odnotowano odpowiednio w locus pierwszym i drugim. Natomiast w locus Mdh3 znaleziono cztery allele: Mdh3-40, Mdh3-100, Mdh3-130

oraz formę nieaktywną enzymu tzw "null allele" (N). Na zymogramach homogenaty pochodzące z heterozygotycznych w loci Mdh1, Mdh2 oraz Mdh3 zarodków dają obraz trzech prążków świadczących o dimerycznej budowie dehydrogenazy jabłczanowej u modrzewia (Ryc.12)

Dehydrogenaza mrówczanowa (FDH):

Prążki na żelach barwionych na aktywność dehydrogenazy mrówczanowej występowały w jednej strefie. W badanym materiale nie natrafiono na jakąkolwiek zmienność badanego enzymu (Ryc.9).

Dehydrogenaza sorbitolowa (SRDH).

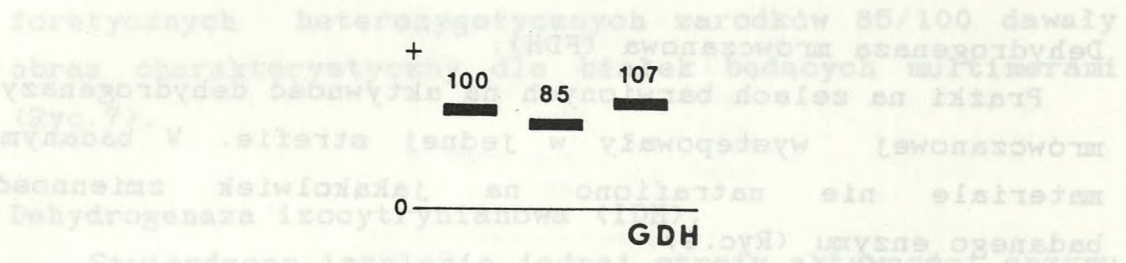
U modrzewia enzym ten kodowany jest przez jeden locus (Ryc.13 i 14). W próbie nasion pochodzących z pojedynczych drzew znaleziono jedno drzewo (oznaczone jako CI 2) z rzadkim allelem 85. Obserwowane na zymogramach czytelne obrazy homogenatów pochodzących z heterozygotycznych zarodków pozwalają na stwierdzenie, że dehydrogenaza ta jest u modrzewia multimerem (Ryc.14).

Dehydrogenaza szikimianowa (SHDH).

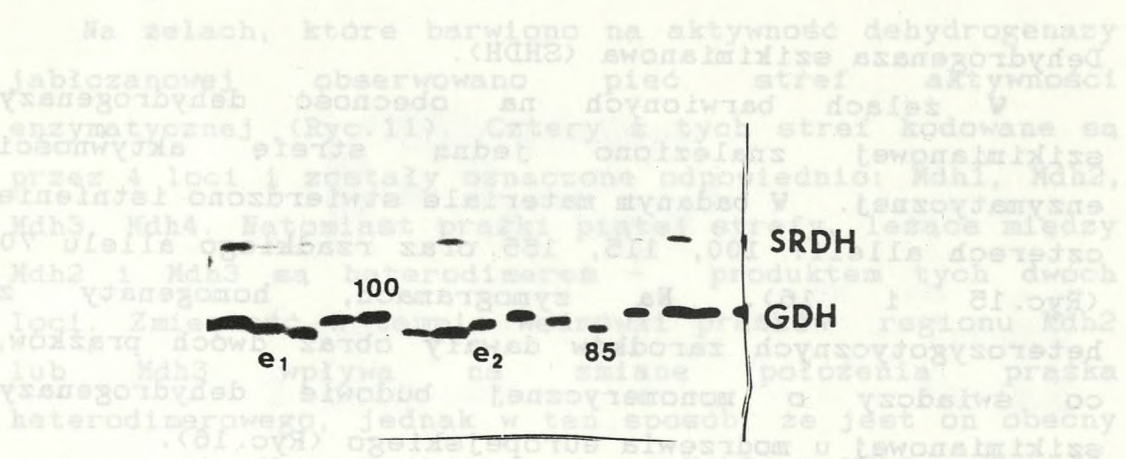
W żelach barwionych na obecność dehydrogenazy szikimianowej znaleziono jedną strefę aktywności enzymatycznej. W badanym materiale stwierdzono istnienie czterech alleli: 100, 115, 155 oraz rzadkiego allelu 70 (Ryc.15 i 16). Na zymogramach, homogenaty z heterozygotycznych zarodków dawały obraz dwóch prążków, co świadczy o monomerycznej budowie dehydrogenazy szikimianowej u modrzewia europejskiego (Ryc.16).

Ryc.10 Schemat obrazu rozdzielu elektroforetycznego uzyskanego dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Liczbami 1 oraz 2 oznaczono odpowiednie loci. Wartości: 75, 100 oraz 140 odpowiadają poszczególnym allelom.

Ryc.7 Obraz rozdzielu elektroforetycznego GDH. Liczbami 100 oraz 85 oznaczono odpowiednie allele. Wartości 100 oraz 85 odpowiadają poszczególnym allelom. Liczba 100 odpowiada allelowi 100/85 (SRDH - dehydrogenaza sorbitolowa).

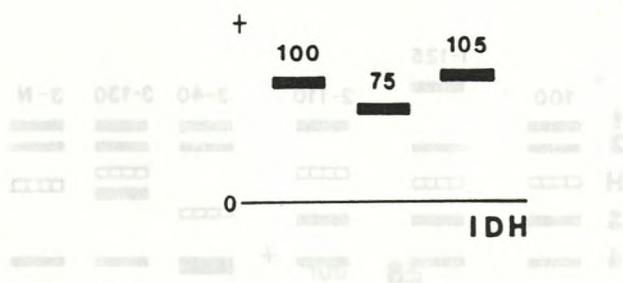


Ryc.6 Schemat obrazu rozdziału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy glutaminianowej (GDH). Liczbami oznaczono odpowiednie allele.

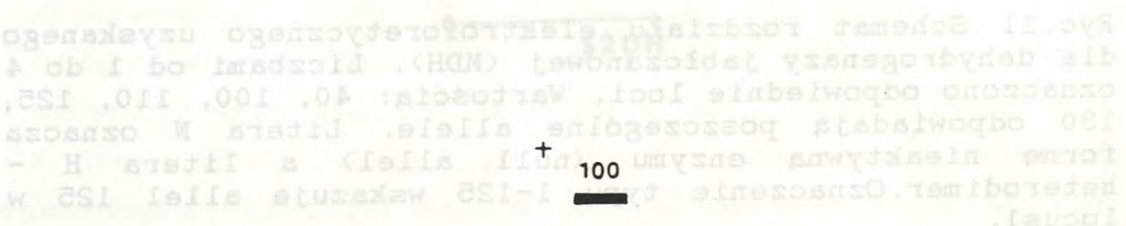


Ryc. 7 Obraz rozdziału elektroforetycznego GDH. Liczbami 100 oraz 85 oznaczono odpowiednie allele. Natomiast literą e oznaczono heterozygotyczne zarodki : e<sub>1</sub> - 85/100 oraz e<sub>2</sub> - 100/85. (SRDH - dehydrogenaza sorbitolowa).



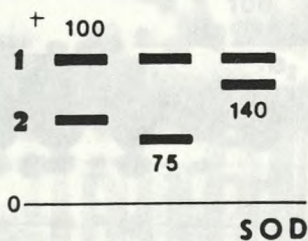


Ryc.8 Schemat obrazu rozdzału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH). Liczbami: 75, 100 oraz 105 oznaczono odpowiednie allele.

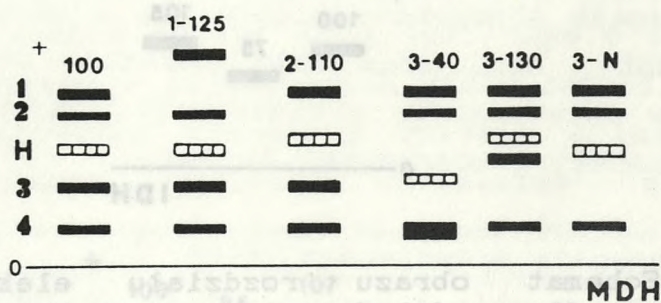


Ryc.13 Schemat rozdzału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy jablczanowej (FDH). Liczbami oznaczono odpowiednie allele.

Ryc. 9 Schemat obrazu rozdzału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy mrówczanowej (FDH).

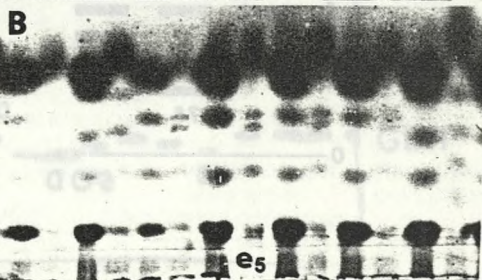
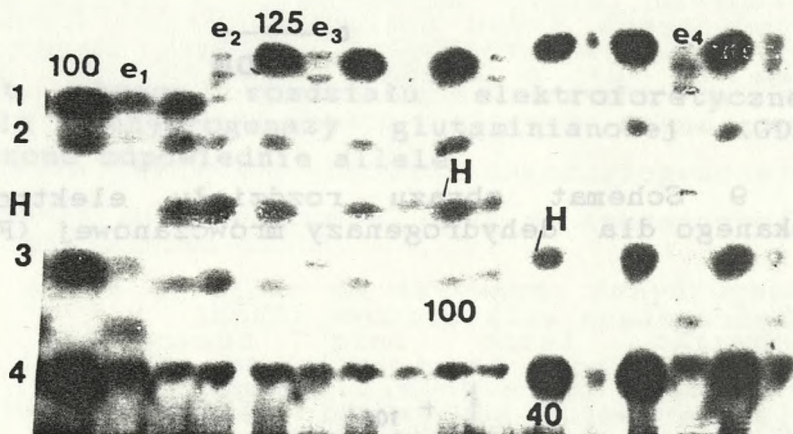


Ryc.10 Schemat obrazu rozdzału elektroforetycznego uzyskanego dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Liczbami 1 oraz 2 oznaczono odpowiednie loci. Wartości: 75, 100 oraz 140 odpowiadają poszczególnym allelom.



Ryc.11 Schemat rozdziálu elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy jabliczanowej (MDH). Liczbami od 1 do 4 oznaczono odpowiednie loci. Wartościami: 40, 100, 110, 125, 130 odpowiadaj¹ poszczególne allele. Litera N oznacza formê nieaktywn¹ enzymu (null allele) a litera H - heterodimer. Oznaczenie typu 1-125 wskazuje allele 125 w locus 1.

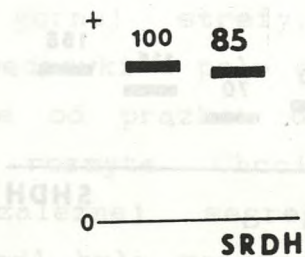
A



Ryc.12 Obrazy rozdzi³ów elektroforetycznych uzyskanych dla MDH. Liczbami od 1 do 4 oznaczono odpowiednie loci. Wartościami: 40, 100, 125 odpowiadaj¹ allele. Litera H oznacza heterodimer. Natomiast literami e oznaczono heterozygotyczne zarodki: e<sub>1</sub> - Mdh3-40/Mdh3-100, e<sub>2</sub> - Mdh1-100/Mdh1-125, e<sub>3</sub> - Mdh1-125/Mdh1-100, Mdh3-100/Mdh3-40, e<sub>4</sub> - Mdh1-125/Mdh1-100, Mdh3-40/Mdh3-100, e<sub>5</sub> - Mdh2-110/Mdh2-100.

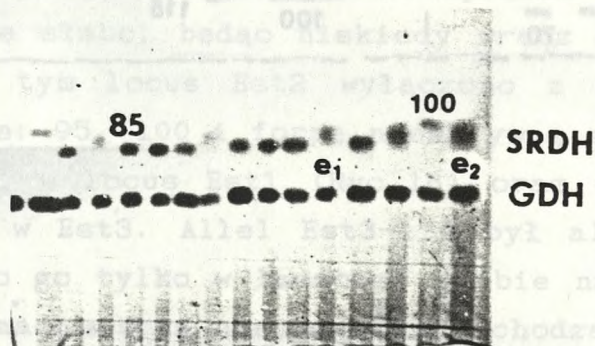
Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)

Na ciemnym tle zymografu widać w skrywaniu dysmutazy ponadtlenkowej widoczne są trzy strefy. W modrzewia prąki roziskowane są w dwóch strefach (Ryc. 10). Prąki górnej strefy charakteryzują się szybszym tempem wędrowania niż prąki strefy dolnej, bardziej widoczne od prąków strefy górnej. Strefy są szersze i nieco rozmyte. Widać, że nie obserwowano niezależnej aktywności prąków (strefa oznaczona jako Sod1 była monomorficzna), to jednak pola strefy wydają się być kodowanymi przez dwa allele loci. W locus Sod2, obok allelu 100, znalazł się również dwa



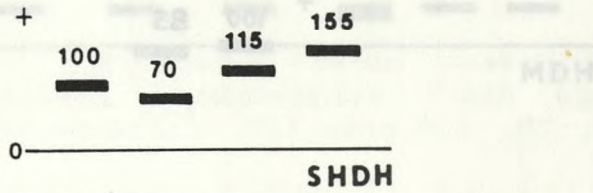
Ryc.13 Schemat rozdziálu elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy sorbitolowej (SRDH). Liczbami oznaczono odpowiednie allele.

Stwierdzono istnienie conajmniej trzech stref aktywności enzymu (Ryc.17). W badanych materiale prąki odpowiadające genomom z loci Est1 oraz Est3 wybarwiały się bardzo słabo, natomiast prąki w strefie Est2 barwiły się silnie. Badania mikroskopowe wykazały, że w związku z tym locus Est2 był o z innych analiz. Trzy allele - 85, 100 i 130 - zostały wykryte z dalszych analiz. Stwierdzono cztery allele: 70, 100, 130 i 170 w Est3. Allel Est1 był allelem rzadkim i obserwowano go tylko w jednej próbce nasion. Otrzymany na zymografie obraz zymograficzny pochodzących z zarodków był zawsze rowny, co nie pozwoliło na jednoznaczne określenie struktury cząsteczkowej esterazy.



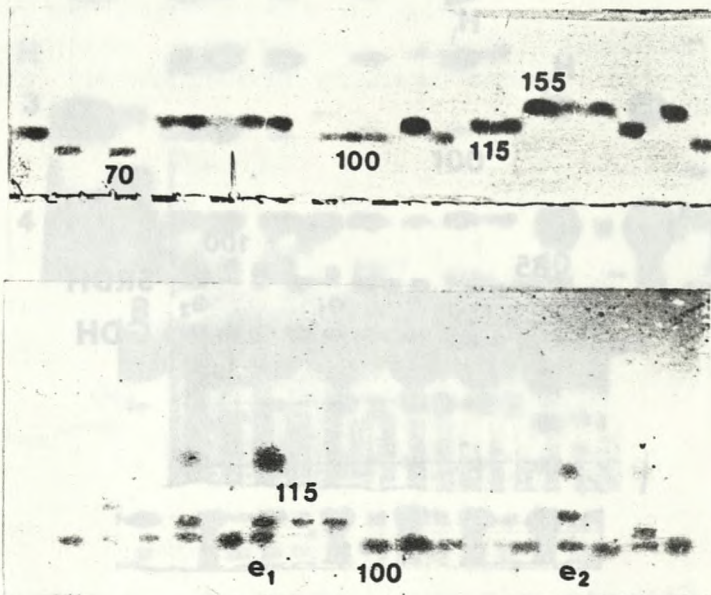
Ryc. 14 Obraz elektroforetycznego rozdziálu SRDH. Liczbami 100 oraz 85 oznaczono odpowiednie allele. Literą e oznaczono heterozygotyczne zarodki: e<sub>1</sub> - 85/100 oraz e<sub>2</sub> - 100/85.

(Ryc.19). Prąki w strefie Murl wybarwiały się dość słabo i bezbłędne odczytanie ich położenia na zymogramie nie



Ryc. 11 Schemat rozdziału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy jabłczanowej (MDH). Liczbami od 1 do 4 oznaczono odpowiednie loci. Wartości: 40, 100, 110, 125, 130 odpowiadają poszczególnym allelom. Litera H oznacza formę nieaktywną enzymu (null allele).

Ryc. 15 Schemat rozdziału elektroforetycznego uzyskanego dla dehydrogenazy szikimianowej (SHDH). Liczbami oznaczono odpowiednie allele.



Ryc. 12 Obrazy rozdziałów elektroforetycznych uzyskanych dla MDH. Liczbami od 1 do 4 oznaczono odpowiednie loci.

Ryc. 16 Obrazy rozdziału elektroforetycznego SHDH. Liczbami oznaczono odpowiednie allele. Litera e oznaczono heterozygotyczne zarodki: e<sub>1</sub> - 100/115, e<sub>2</sub> - 100/155.

Mdh1-100/Mdh1-125, e<sub>3</sub> - Mdh1-125/Mdh1-100, e<sub>4</sub> - Mdh1-125/Mdh1-40, e<sub>5</sub> - Mdh1-125/Mdh1-100, Mdh3-40/Mdh3-100, e<sub>6</sub> - Mdh2-110/Mdh2-100.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).

Na ciemnym tle zymogramów, w miejscu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej widoczne są jasne prążki. U modrzewia prążki rozlokowane są w dwóch strefach (Ryc.10). Prążki górnej strefy, charakteryzujące się szybszym tempem wędrówki w polu elektrycznym, są wąskie i bardziej widoczne od prążków dolnej strefy, które są szersze i nieco rozmyte. Chociaż dla obu stref, nie obserwowano niezależnej segregacji prążków (strefa oznaczona jako Sod1 była monomorficzna), to jednak obie strefy wydają się być kodowanymi przez dwa odrębne loci. W locus Sod2, obok allelu 100, znaleziono jedynie dwa rzadkie allele 75 i 140. Obydwa rzadkie allele znaleziono jedynie w łączonej próbie nasion.

Esteraza (EST).

Stwierdzono istnienie conajmniej trzech stref aktywności enzymu (Ryc.17). W badanym materiale prążki odpowiadające allelom z loci Est1 oraz Est3 wybarwiały się bardzo wyraźnie, natomiast prążki w strefie Est2 barwiły się słabo, będąc niekiedy wręcz niewidocznymi. W związku z tym locus Est2 wyłączono z dalszych analiz. Trzy allele: 95, 100 i formę nieaktywną enzymu - allel N, stwierdzono w locus Est1 (Ryc.18) oraz cztery: 70, 100, 130 i 170 w Est3. Allel Est3-170 był allelem rzadkim i obserwowano go tylko w łączonej próbie nasion. Otrzymany na zymogramach obraz homogenatów pochodzących z zarodków był zawsze rozmyty, co nie pozwoliło na jednoznaczne określenie struktury czwartorzędowej esterazy.

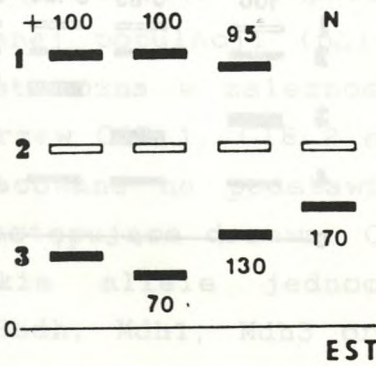
Reduktaza menadionowa (MNR).

U modrzewia żele barwione na obecność reduktazy menadionowej dają cztery strefy aktywności enzymatycznej. (Ryc.19). Prążki w strefie Mnr1 wybarwiały się dość słabo i bezbłędne odczytanie ich położenia na zymogramie nie

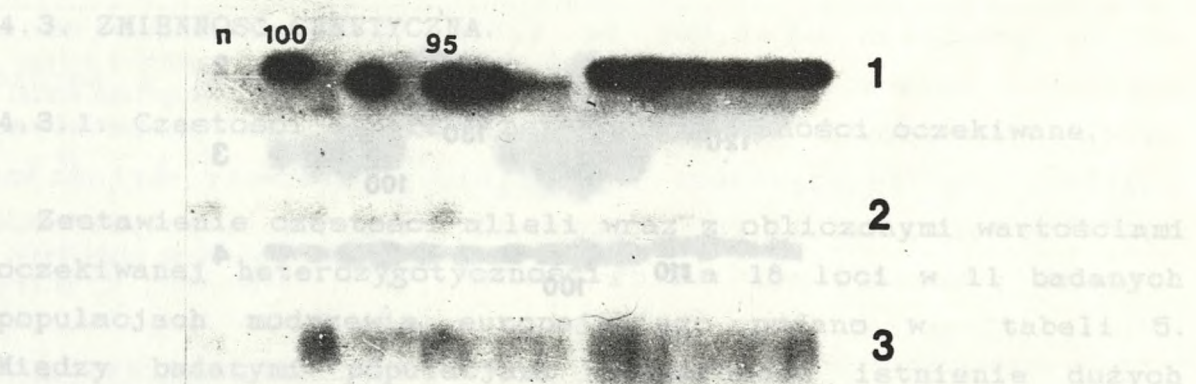
zawsze było możliwe. W związku z powyższym strefę tę wyłączono z dalszych analiz. W badanym materiale locus Mnr2 był monomorficzny. W locus Mnr3 znaleziono cztery allele. Dwa z nich - 100 i 130 występowały w badanych populacjach z dużymi częstościami. Natomiast dwa dalsze - 85 i 120 były allelami rzadko występującymi, znalezionymi jedynie w łączonej próbie nasion. Dwa allele 100 i 110 były obecne w strefie Mnr4 (Ryc.20). Na zymogramach obrazy uzyskane dla homogenatów pochodzących z heterozygotycznych w locus Mnr3 i Mnr4 zarodków były rozmyte, co na razie uniemożliwiło określenie struktury czwartorzędowej tego enzymu.

#### 4.2. WIELKOŚĆ SAMOZAPLODNIENIA

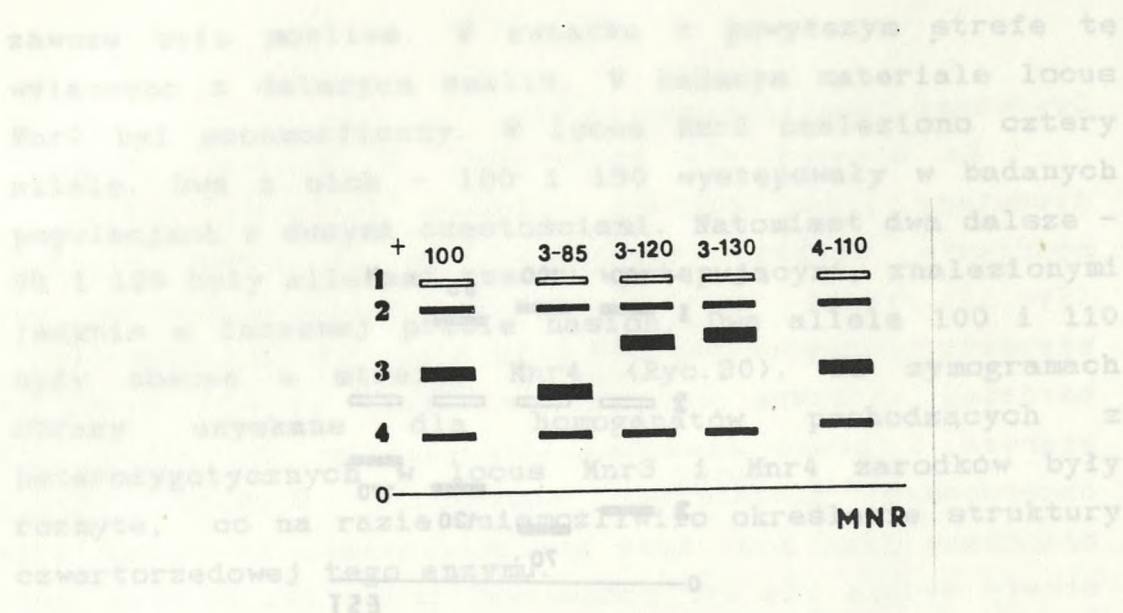
W tabeli 4 zebrano obliczone wartości samozapłodnienia ( $\sigma$ ) wraz z liczbami określonych typów genotypów oraz częstościami rzadkich alleli dla trzech loci. Liczby 1, 2, 3 odpowiadają odpowiednio locom Mdh3, Mar3, Shdh. Liczby 95, 100, 130, 170 odpowiadają różnym allelom. Litera N oznacza formę nieaktywną enzymu (null allele). Obliczona średnia wartość samozapłodnienia na podstawie 15 obserwacji w 13 drzew wynosi 11,5% ( $\pm 3,3\%$ ).



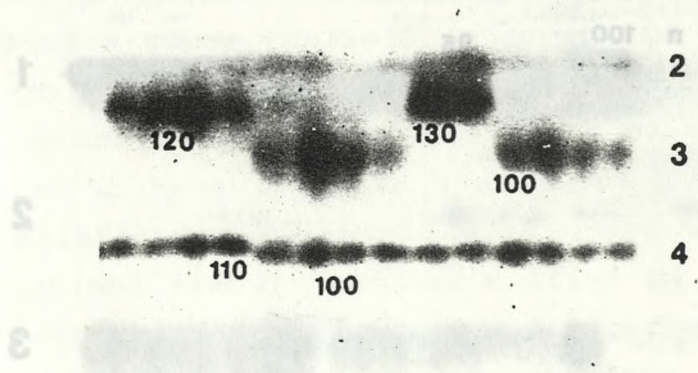
Ryc.17 Schemat obrazu elektroforetycznego uzyskanego dla esterazy (EST). Liczbami od 1 do 3 oznaczono odpowiednie loci. Pozostałymi liczbami oznaczono poszczególne allele. Litera N odpowiada formie nieaktywnej enzymu (null allele).



Ryc.18 Obraz elektroforetycznego rozdziaku EST. Liczbami: 1, 2, 3 oznaczono odpowiednie loci. Pozostałe liczby -95 i 100 oraz litera N odpowiadają poszczególnym allelom w locus 1.



Ryc.19 Schemat rozdziału elektroforetycznego uzyskanego dla reduktazy menadionowej (MNR). Cyframi od 1 do 4 oznaczono odpowiednie loci. Liczby: 85, 100, 110, 120, 130 odpowiadają kolejnym allelom. Oznaczenie typu 3-85 wskazuje allel 85 w 3 locus.



Ryc.20 Obraz rozdziału elektroforetycznego uzyskanego dla MNR. Cyfry 2, 3 i 4 wskazują odpowiednie loci. Liczby 100, 110, 120 oraz 130 oznaczają poszczególne allele.



#### 4.2. WIELKOŚĆ SAMOZAPŁODNIENIA

W tabeli 4 zebrano obliczone wartości samozapłodnienia ( $s$ ) wraz z liczebnościami określonych typów genotypowych oraz częstościami rzadkiego allelu w puli pyłkowej matecznego drzewa ( $p_m$ ) i badanej populacji ( $p_p$ ). Stwierdzona wielkość samozapłodnienia jest różna w zależności od badanego drzewa wynosząc od 0 dla drzew CIE 1, CIE 2 oraz CIE 23 do 50% dla drzewa CIE 16 (oszacowane na podstawie rzadkiego allelu w locus *Mdh1*). Trzy następujące drzewa: CIE 8, CIE 16 oraz CIE 24 posiadały rzadkie allele jednocześnie w dwu loci, odpowiednio: *Mdh3*, *Shdh*; *Mdh1*, *Mdh3* oraz *Gdh*, *Shdh*. Dla tych drzew możliwym było niezależne obliczenie wartości  $s$  z częstości rzadkich alleli dla dwóch różnych loci. O ile dla drzew CIE 8 i CIE 24 obliczone tak wartości  $s$  są dość zgodne, wynosząc odpowiednio 14 i 13,4% oraz 8,8, i 16,8%, to wartości te u drzewa CIE 16 są zdecydowanie różne, wynosząc 0 i 50%. Obliczona średnia wartość samozapłodnienia na podstawie 15 obserwacji u 12 drzew wynosi 11,5% ( $\pm 3,3\%$ ).

#### 4.3. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA.

##### 4.3.1. Częstości alleli i heterozygotyczności oczekiwane.

Zestawienie częstości alleli wraz z obliczonymi wartościami oczekiwanej heterozygotyczności dla 18 loci w 11 badanych populacjach modrzewia europejskiego podano w tabeli 5. Między badanymi populacjami stwierdzono istnienie dużych różnic pod względem częstości alleli w poszczególnych loci enzymatycznych. Różnice te były statystycznie istotne dla dziewięciu następujących loci: *Est3*, *G6pd*, *Lap1*, *Lap2*, *Mdh2*, *Mdh3*, *Mnr3*, *Shdh* (przy poziomie istotności 0.01) oraz *Mnr4* (przy poziomie istotności 0.05). Stanowi to 50% analizowanych loci. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w częstościach alleli pomiędzy badanymi trzema grupami

populacji. Nie zidentyfikowano również rzadkich alleli, charakterystycznych wyłącznie dla jednej z badanych grup populacji. Natomiast wartości średniej heterozygotyczności oczekiwanej, mimo istnienia znacznych różnic między populacjami w poszczególnych loci, są podobne u wszystkich jedenastu badanych populacji, wynosząc od  $0,144 \pm 0,054$  w populacji alpejskiej Fiemme (VII) do  $0,166 \pm 0,054$  w populacji sudeckiej Radim-Krasov (III) (Tab.5). Brak jest również istotnych różnic pod względem średniej wartości  $H_{exp}$  między grupami populacji. Wartości te wynoszą  $0,160 \pm 0,052$  dla populacji sudeckich oraz  $0,155 \pm 0,052$  dla populacji alpejskich i polskich.

Loci ze średnią heterozygotycznością ponad 45%.

Cztery loci: G6pd, Mnr3, Mnr4 oraz Shdh charakteryzuje się ponad 45% heterozygotycznością.

Allel 100 w locus G6pd we wszystkich, poza dwoma populacjami (jedną sudecką III i jedną alpejską VIII), występował z częstościami powyżej 0,5. Częstości te zawierały się w granicach od 0,505 do 0,698. Z kolei allel 85 w populacji sudeckiej Radim-Krasov (III) występował z bardzo wysoką częstością (0,565) w porównaniu do pozostałych populacji, gdzie częstości tego allelu przyjmowały wartość od 0,054 do 0,203. Allel 105 występował z częstością powyżej 0,4 w dwóch populacji alpejskich Fiemme (VII) oraz Val Sozzine (VIII). Częstość tego allelu w pozostałych populacjach wynosiła od 0,172 do 0,319. Wartości oczekiwanej heterozygotyczności były podobne we wszystkich badanych populacjach. Heterozygotyczność niższą od 0,5 stwierdzono jedynie w populacji sudeckiej Albrehtice (IV) a wyższą od 0,6 w populacji polskiej Jastrzębia (X).

Tab.4 Ocena liczby żywych nasion powstałych w wyniku samozapłodnienia u modrzewia europejskiego.

Drzewo locus	liczba analizowanych nasion z drzewa		liczba makrogametofitów o określonym genotypie		Częstość rzadkiego allelu w puli pyłkowej; (na podstawie analizy zarodków) mатеcznego drzewa badanej populacji		Wielkość samozapylecia (odch, stand.)	
	♀ 85	♀ 100	♀ 85	♀ 100	( $p_m$ )	( $p_p$ )		
CIE1/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa		liczba makrogametofitów o określonym genotypie		Częstość rzadkiego allelu w puli pyłkowej; (na podstawie analizy zarodków) mатеcznego drzewa badanej populacji		Wielkość samozapylecia (odch, stand.)	
	60		30 30		0,000		0,039	
			$\chi^2$ 0				0,000	
	liczba zarodków określonego genotypu						(0,)	
	♀ 85/85 ♂	♀ 100/85 ♂	0	0				
♀ 85/100 ♂	♀ 100/100 ♂	30	30					
CIE2/ Srdh	liczba analizowanych nasion z drzewa		liczba makrogametofitów o określonym genotypie		Częstość rzadkiego allelu w puli pyłkowej; (na podstawie analizy zarodków) mатеcznego drzewa badanej populacji		Wielkość samozapylecia (odch, stand.)	
	60		35 25		0,000		0,023	
			$\chi^2$ 1,66 NS				0,000	
	liczba zarodków określonego genotypu						(0,)	
	♀ 85/85 ♂	♀ 100/85 ♂	0	0				
♀ 85/100 ♂	♀ 100/100 ♂	35	25					
CIE3/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa		liczba makrogametofitów o określonym genotypie		Częstość rzadkiego allelu w puli pyłkowej; (na podstawie analizy zarodków) mатеcznego drzewa badanej populacji		Wielkość samozapylecia (odch, stand.)	
	60		34 26		0,050		0,039	
			$\chi^2$ 1,07 NS				0,022	
	liczba zarodków określonego genotypu						(0,019)	
	♀ 85/85 ♂	♀ 100/85 ♂	1	2				
♀ 85/100 ♂	♀ 100/100 ♂	33	24					
CIE8/ Mdh3	liczba analizowanych nasion z drzewa		liczba makrogametofitów o określonym genotypie		Częstość rzadkiego allelu w puli pyłkowej; (na podstawie analizy zarodków) mатеcznego drzewa badanej populacji		Wielkość samozapylecia (odch, stand.)	
	60		31 29		0,133		0,063	
			$\chi^2$ 0,07 NS				0,140	
	liczba zarodków określonego genotypu						(0,041)	
	♀ 40/40 ♂	♀ 100/40 ♂	5	3				
♀ 40/100 ♂	♀ 100/100 ♂	26	26					

kontynuacja tabeli z poprzedniej strony:

CIE8/ Shdh	liczba analizowanych						
	nasion z drzewa	60					
	liczba makrogametofitów						
	o określonym genotypie						
	♀ 70	♀ 100	29	31			
	$\chi^2$		0,07	NS	0,100	0,033	0,134
	liczba zarodków						(0,040)
	określonego genotypu						
♀	♀ 70/70 ♂	♀ 100/70 ♂	5	1			
	♀ 70/100 ♂	♀ 100/100 ♂	17	19			
	♀ 70/115 ♂	♀ 100/115 ♂	5	8			
	♀ 70/155 ♂	♀ 100/155 ♂	2	3			
	♀	♀					
CIE9/ Mdh2	liczba analizowanych						
	nasion z drzewa	60					
	liczba makrogametofitów						
	o określonym genotypie						
	♀ 110	♀ 100	25	35			
	$\chi^2$		1,66	NS	0,100	0,008	0,184
	liczba zarodków						(0,044)
	określonego genotypu						
♀	♀ 110/110 ♂	♀ 100/110 ♂	4	2			
	♀ 110/100 ♂	♀ 100/100 ♂	21	33			
	♀	♀					
CIE13/ Mdh2	liczba analizowanych						
	nasion z drzewa	60					
	liczba makrogametofitów						
	o określonym genotypie						
	♀ 110	♀ 100	25	35			
	$\chi^2$		1,66	NS	0,067	0,008	0,118
	liczba zarodków						(0,039)
	określonego genotypu						
♀	♀ 110/110 ♂	♀ 100/110 ♂	1	3			
	♀ 110/100 ♂	♀ 100/100 ♂	24	32			
	♀	♀					
CIE16/ Mdh1	liczba analizowanych						
	nasion z drzewa	60					
	liczba makrogametofitów						
	o określonym genotypie						
	♀ 125	♀ 100	26	34			
	$\chi^2$		1,07	NS	0,317	0,067	0,500
	liczba zarodków						(0,000)
	określonego genotypu						
♀	♀ 125/125 ♂	♀ 100/125 ♂	8	11			
	♀ 125/100 ♂	♀ 100/100 ♂	18	23			
	♀	♀					

kontynuacja tabeli z poprzedniej strony;

CIE16/ Mdh3	liczba analizowanych nasion z drzewa		60		0,033	0,063	0,000 (0,)
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie						
	♀ 40	♀ 100	31	29			
	$\chi^2$		0,07 NS				
	liczba zarodków określonego genotypu						
	♀ 40/40 ♂	♀ 100/40 ♂	0	2			
CIE18/ Mdh1	liczba analizowanych nasion z drzewa		60		0,100	0,067	0,066 (0,031)
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie						
	♀ 125	♀ 100	32	28			
	$\chi^2$		0,27 NS				
	liczba zarodków określonego genotypu						
	♀ 125/125 ♂	♀ 100/125 ♂	2	4			
CIE21/ Mdh1	liczba analizowanych nasion z drzewa		60		0,133	0,067	0,132 (0,040)
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie						
	♀ 125	♀ 100	28	32			
	$\chi^2$		0,27 NS				
	liczba zarodków określonego genotypu						
	♀ 125/125 ♂	♀ 100/125 ♂	4	4			
CIE23/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa		60		0,017	0,039	0,000 (0,)
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie						
	♀ 85	♀ 100	36	24			
	$\chi^2$		2,40 NS				
	liczba zarodków określonego genotypu						
	♀ 85/85 ♂	♀ 100/85 ♂	1	0			
	♀ 85/100 ♂	35	24				

kontynuacja tabeli z poprzedniej strony:

CIE24/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	♀ 85      ♀ 100	32	28		
	$\chi^2$	0,27	NS	0,083	0,039
	liczba zarodków określonego genotypu				
	♀ 85/85 ♂      ♀ 100/85 ♂	4	1		
♀ 85/100 ♂      ♀ 100/100 ♂	28	27			
CIE24/ Shdh	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	♀ 70      ♀ 115	30	30		
	$\chi^2$	0		0,117	0,033
	liczba zarodków określonego genotypu				
	♀ 70/70 ♂      ♀ 115/70 ♂	2	5		
♀ 70/100 ♂      ♀ 115/100 ♂	15	7			
♀ 70/115 ♂      ♀ 115/115 ♂	11	16			
♀ 70/155 ♂      ♀ 115/155 ♂	2	2			
Shdh/ CIE25	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	homozygota 70/70			0,117	0,033
	liczba zarodków określonego genotypu				
♀ 70/70 ♂      ♀ 70/100 ♂	7	24			
♀ 70/115 ♂      ♀ 70/125 ♂	23	6			
CIE16/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	♀ 125      ♀ 100	26	34		
	$\chi^2$	1,07	NS	0,317	0,033
CIE23/ Gdh	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	♀ 85      ♀ 100	11	11		
	$\chi^2$	0,00	NS	0,017	0,033
CIE23/ Shdh	liczba analizowanych nasion z drzewa	60			
	liczba makrogametofitów o określonym genotypie				
	♀ 85      ♀ 100	11	11		
	$\chi^2$	0,00	NS	0,017	0,033
średnia anal. 0,115					
błąd stand. 0,033					

Tab.5 Częstości alleli oraz heterozygotyczności oczekiwane (He) dla 18 loci u 11 badanych populacji modrzewia europejskiego.

Locus	Allele	Populacje										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Est3	70	.000	.000	.000	.000	.016	.000	.011	.000	.000	.000	.000
	100	.962	.884	.974	.962	.929	.973	.956	.920	.987	.850	.952
	130	.038	.013	.026	.038	.055	.027	.022	.067	.000	.050	.000
	170	.000	.103	.000	.000	.000	.000	.011	.013	.013	.100	.048
	He	.073	.208	.051	.073	.134	.053	.085	.149	.026	.265	.091
Fdh	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	He	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Gdh	85	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.011	.000	.010
	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.978	.978	.989	.978	.990
	107	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.022	.022	.000	.022	.000
	He	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.043	.043	.022	.043	.020
G6pd	85	.203	.185	.565	.130	.138	.192	.054	.063	.172	.190	.198
	100	.574	.609	.250	.698	.543	.585	.511	.453	.596	.505	.549
	105	.223	.206	.185	.172	.319	.223	.435	.484	.232	.305	.253
	He	.580	.552	.584	.466	.584	.571	.547	.557	.561	.616	.595
Idh	75	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.012	.000	.000
	100	1.000	1.000	.990	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.988	1.000	1.000
	105	.000	.000	.010	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	He	.000	.000	.020	.000	.000	.000	.000	.000	.024	.000	.000
Lap1	97	.000	.007	.000	.072	.054	.013	.015	.043	.000	.013	.000
	100	.958	.979	1.000	.914	.912	.936	.985	.957	.987	.987	.952
	100N	.028	.000	.000	.000	.027	.051	.000	.000	.013	.000	.012
	103	.014	.014	.000	.014	.007	.000	.000	.000	.000	.000	.036
	He	.081	.041	.000	.159	.165	.121	.030	.082	.026	.026	.092
Lap2	96	.007	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.013	.024
	100	.944	.882	.962	.950	.845	.782	.896	.848	.869	.961	.916
	104	.042	.076	.038	.043	.155	.218	.104	.152	.131	.026	.036
	104D	.007	.042	.000	.007	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.024
	He	.107	.215	.073	.096	.262	.341	.186	.258	.228	.076	.158
Mdh1	100	.857	.978	.756	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.967	.967	.958
	125	.143	.022	.244	.000	.000	.000	.000	.000	.033	.033	.042
	He	.245	.043	.369	.000	.000	.000	.000	.000	.064	.064	.080
Mdh2	100	.989	.989	.989	.979	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	110	.011	.011	.011	.021	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	He	.022	.022	.022	.041	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

0.631 ± 0.003 przy średnich dla populacji alpejskich H = 0.587 ± 0.029 i polskich H = 0.545 ± 0.012.

kontynuacja tabeli z poprzedniej strony:

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Mdh3	40	.022	.044	.178	.073	.000	.000	.000	.011	.044	.033	.105
	100	.934	.900	.800	.863	.933	.900	.980	.889	.912	.867	.875
	100N	.033	.056	.000	.053	.067	.100	.020	.100	.044	.100	.010
	130	.011	.000	.022	.011	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.010
	He	.126	.185	.328	.247	.125	.180	.039	.200	.164	.237	.223
Mdh4	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	He	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Mnr2	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	He	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Mnr3	85	.027	.000	.000	.000	.014	.000	.000	.000	.023	.000	.076
	100	.575	.432	.337	.618	.573	.520	.419	.671	.404	.416	.506
	120	.014	.000	.000	.000	.000	.027	.025	.000	.000	.000	.013
	130	.384	.568	.663	.382	.413	.453	.556	.329	.573	.584	.405
	He	.521	.491	.447	.472	.501	.524	.515	.442	.508	.486	.574
Mnr4	100	.705	.624	.647	.588	.649	.554	.538	.585	.516	.538	.713
	110	.295	.376	.353	.412	.351	.446	.462	.415	.484	.462	.287
	He	.416	.469	.457	.485	.456	.494	.497	.486	.499	.497	.409
Shdh	70	.053	.000	.018	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.029
	100	.263	.454	.464	.512	.533	.650	.455	.514	.645	.600	.614
	115	.175	.205	.161	.244	.178	.100	.250	.143	.161	.243	.200
	155	.509	.341	.357	.244	.289	.250	.295	.343	.194	.157	.157
	He	.638	.636	.631	.619	.601	.505	.643	.598	.520	.556	.558
Sod1	100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	He	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Sod2	75	.030	.010	.000	.025	.000	.000	.000	.000	.025	.010	.000
	100	.970	.990	1.000	.975	1.000	.980	1.000	.992	.967	.990	1.000
	140	.000	.000	.000	.000	.000	.020	.000	.008	.008	.000	.000
	He	.058	.020	.000	.049	.000	.039	.000	.016	.064	.020	.000
Srdh	85	.024	.000	.000	.009	.017	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	100	.976	1.000	1.000	.991	.983	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	He	.047	.000	.000	.018	.033	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	He	.162	.160	.166	.151	.159	.157	.144	.158	.150	.160	.156
	(SE)*	±.052	±.052	±.054	±.050	±.052	±.052	±.054	±.051	±.050	±.053	±.052

\*-odchylenie standardowe



Spółród czterech alleli locus Mnr3, dwa: 100 i 130 występowały z podobnie wysokimi częstościami, odpowiednio od 0,337 do 0,671 i od 0,329 do 0,663. Natomiast allele 85 i 120 były allelami rzadko występującymi. Allel 85 znaleziono w populacji sudeckiej Dubicko (I), alpejskiej Valli di Cavedine (V) oraz dwóch populacjach modrzewia polskiego - Drzewica (IX) i Odrowążek (XI) - z częstościami od 0,014 do 0,076. Natomiast allel 120 zidentyfikowano tylko w populacji Dubicko (I), dwóch populacjach alpejskich - Val Fersina (VI) oraz Fiemme (VII) a także polskiej Odrowążek (XI) - z częstościami od 0,014 do 0,027. Heterozygotyczność oczekiwana zawierała się w granicach od 0,442 do 0,574.

Obydwa allele; 100 i 110 znalezione w locus Mnr4 występowały z wysokimi częstościami. Jedynie w populacji sudeckiej Dubicko (I) i polskiej Odrowążek (XI) allel 100 występował z częstością powyżej 0,7. Również w tym locus heterozygotyczności oczekiwane były bardzo podobne dla wszystkich badanych populacji wynosząc od 0,409 do 0,499.

W locus Shdh allel 100 posiadał częstość od 0,454 do 0,650. Jedynie w populacji sudeckiej Dubicko (I) częstość allelu 100 była bardzo niska (0,263). Z kolei populacja ta charakteryzowała się bardzo wysoką częstością allelu 155 (0,509). Częstość allelu 155 w pozostałych populacjach wynosiła od 0,157 do 0,357. Natomiast allel 115 występował we wszystkich 11 badanych populacjach z podobnymi częstościami od 0,100 w populacji Val Fersina (VI) do 0,250 w populacji Fiemme (VII). Allel 70 był allelem rzadkim. Stwierdzono go jedynie w populacji polskiej Odrowążek (XI) i w dwóch populacjach sudeckich Dubicko (I) i Radim-Krasov (III). Ponadto wszystkie populacje sudeckie charakteryzowały się w tym locus wyższym poziomem heterozygotyczności oczekiwanej. Średnia heterozygotyczność populacji sudeckich wynosiła  $H = 0.631 \pm 0.003$  przy średnich dla populacji alpejskich  $H = 0.587 \pm 0.029$  i polskich  $H = 0.545 \pm 0.012$ .

Loci ze średnią heterozygotycznością od 10% do 25%.

Heterozygotyczność na tym poziomie posiadają trzy loci: Est3, Lap2, Mdh3. W każdym z tych loci allel 100 występował z wysoką częstością ( $>0,80$ ) we wszystkich badanych populacjach.

W locus Est3 obok allelu 100 zidentyfikowano dalsze trzy allele: 70, 130 i 170. Allel 70 znaleziono tylko w populacjach alpejskich Valli di Cavedine (V) i Fiemme (VII). Mimo, że allelu tego nie stwierdzono w żadnej z trzech badanych populacji modrzewia polskiego, to jednak udało się go znaleźć w klonie K-10-01 rosnącym na plantacji na Zwierzyńcu a pochodzącym z rejonu naturalnego występowania modrzewia polskiego w rejonie Bliżyna (Tab. 3). Tak więc allel ten nie jest allelem charakterystycznym jedynie dla modrzewia alpejskiego. Allelu 130 nie znaleziono u dwóch populacji polskich Drzewica (IX) i Odrowążek (XI). W pozostałych populacjach występował on z częstościami od 0,013 do 0,067. Z kolei allel 170 występował dość często w populacji sudeckiej Mezina (II) - 0,103 i polskiej Jastrzębia (X) - 0,100, przy jego zupełnym braku w pięciu populacjach (I, III, IV, V i VI). W pozostałych populacjach (dwóch alpejskich i dwóch polskich) allel ten występował z częstościami od 0,011 do 0,048. W locus tym dało się zauważyć znaczne zróżnicowanie między badanymi populacjami pod względem stopnia heterozygotyczności (od 0,026 dla populacji Drzewica do 0,265 dla populacji Jastrzębia).

Wszystkie cztery populacje alpejskie oraz populacja modrzewia polskiego Drzewica (IX) posiadały stosunkowo wysoką częstość allelu Lap2-104 (od 0,104 do 0,218). W pozostałych sześciu populacjach allel ten występował rzadko (od 0,026 do 0,076). W populacjach alpejskich nie stwierdzono dwóch innych rzadkich alleli: Lap2-96 i Lap2-104d. Między badanymi populacjami istnieje duże zróżnicowanie heterozygotyczności oczekiwanej w locus Lap2 (od 0,073 do 0,341). Średnia heterozygotyczność populacji

alpejskich ( $H = 0,262 \pm 0,032$ ) była wyższa od średniej heterozygotyczności populacji sudeckich ( $H = 0,123 \pm 0,032$ ) i polskich ( $H = 0,154 \pm 0,076$ ). Średnia heterozygotyczność oczekiwana dla wszystkich jedenastu badanych populacji wynosiła  $0,182 \pm 0,026$ .

W trzech populacjach alpejskich: Valli di Cavedine (V), Val Fersina (VI) i Fiemme (VII) nie znaleziono allelu Mdh3-40. Natomiast w populacji sudeckiej Radim-Krasov (III) i polskiej Odrowążek (XI) częstość tego allelu osiągnęła wartości, odpowiednio  $0,178$  i  $0,105$ . W sześciu pozostałych populacjach występował on z częstością od  $0,011$  do  $0,073$ . Allelu 100N nie stwierdzono w populacji Radim-Krasov (III) a w trzech populacjach: Val Fersina (VI), Val Sozzine (VIII) oraz Jastrzębia (X) częstość jego wynosiła  $0,100$ ; u reszty populacji częstość tego allelu zawierała się w granicach od  $0,010$  do  $0,067$ . Allel 130 został zidentyfikowany tylko w czterech populacjach: -trzech sudeckich Dubicko (I), Radim-Krasov (III) i Albrechtice (IV) oraz polskiej Odrowążek (XI), z częstością od  $0,010$  do  $0,022$ . W omawianym locus zaobserwowano duże zróżnicowanie w heterozygotyczności oczekiwanej między badanymi populacjami, która wynosiła od  $0,039$  w populacji alpejskiej Fiemme (VII) do  $0,328$  w populacji sudeckiej Radim -Krasov (III). Ogólnie średnia heterozygotyczność badanych populacji alpejskich ( $H = 0,132 \pm 0,034$ ) była niższa od średniej heterozygotyczności populacji sudeckich ( $H = 0,222 \pm 0,043$ ) i polskich ( $H = 0,208 \pm 0,022$ ). Średnia heterozygotyczność dla wszystkich 11 populacji w locus Mdh3 wynosiła  $0,185 \pm 0,023$ .

Loci ze średnią heterozygotycznością od 5% do 10%.

Średnią heterozygotycznością na tym poziomie posiadają dwa loci: Lap1 i Mdh1. W każdym z tych loci allel 100 występował z bardzo wysoką częstością we wszystkich analizowanych populacjach: w populacji alpejskiej Val Fersina (VI) do  $2,22 \pm 0,32$  w populacji sudeckiej Dubicko (I), przy średniej  $1,90 \pm 0,22$ .

populacjach. W locus *Lap1* częstość allelu 100 była większa od wartości 0,900, natomiast w locus *Mdh1* większa od 0,850.

Trzy rzadko występujące allele: *Lap1-97*, *Lap1-100N* oraz *Lap1-103* występowały we wszystkich trzech grupach populacji (alpejskie, polskie i sudeckie). Populacja sudecka Radim-Krasov (III), jako jedyna nie posiadała zmienności w locus *Lap1*. Heterozygotyczność pozostałych populacji wynosiła od 0,026 do 0,165.

W locus *Mdh1* allelu *Mdh1-125* nie stwierdzono w żadnej z czterech populacji alpejskich, a jego częstość w populacjach sudeckich Dubicko (I) i Radim-Krasov (III) wynosiła odpowiednio 0,143 i aż 0,245. W omawianym locus wszystkie populacje alpejskie i jedna sudecka Albrechtice (IV) były monomorficzne. Natomiast heterozygotyczność dwóch wymienionych wcześniej populacji sudeckich I i III wynosiła odpowiednio 0,244 i 0,369. W pozostałych czterech populacjach (jednej sudeckiej Mezina i trzech polskich) heterozygotyczność wynosiła od 0,043 do 0,080.

Loci ze średnią heterozygotycznością poniżej 5%.

Średnią heterozygotyczność na tym poziomie posiada pięć loci: *Gdh*, *Idh*, *Mdh2*, *Sod2* i *Srdh*. We wszystkich badanych 11 populacjach częstość allelu 100 przybierała wartość  $\geq 0.960$ . W każdym locus, obok allelu 100, występowały jedynie rzadkie allele, identyfikowane niekiedy tylko w pojedynczych populacjach.

W locus *Gdh* allel 85 znaleziono w dwóch polskich populacjach Drzewica (IX) i Odrowążek (XI), zaś allel 107 - w dwóch populacjach alpejskich Fiemme (VII) i Val Sozzine (VIII) oraz jednej polskiej z Jastrzębiej (X).

Z dwóch rzadkich alleli w locus Idh, jeden (75) znaleziono w populacji polskiej Drzewica (IX), drugi zaś (105) - jedynie w populacji sudeckiej Radim-Krasov (III).

Allel Mdh2-110 wykryto we wszystkich czterech badanych populacjach sudeckich. Allel ten znaleziono także u klonu K-10-01 rosnącego na Zwierzyńcu a pochodzącego z rejonu występowania modrzewia polskiego oraz u dwóch drzew w populacji Ciechostowice (Tab.3).

W locus Sod2 allel 75 zidentyfikowano w populacjach sudeckich Dubicko (I), Mezina (II) i Albrechtice (IV) oraz polskich Drzewica (IX) i Jastrzębia (X). Drugi rzadki allel tego locus - allel 140 znaleziono w populacjach alpejskich Val Fersina (VI) i Val Sozzine (VIII) oraz polskiej Drzewica (IX).

Jedynym i to rzadko występującym allelem w locus Srdh był allel 85. Stwierdzono go w dwóch populacjach sudeckich Dubicko (I) i Albrechtice (IV) oraz włoskiej Valli di Cavedine (V). Allel ten znaleziono także u jednego drzewa w populacji modrzewia polskiego z Ciechostowic (Tab. 3).

#### Loci monomorficzne

Spośród 18 zbadanych loci, cztery loci: Fdh, Mdh4, Mnr2 oraz Sod1 były monomorficzne we wszystkich 11 badanych populacjach.

#### 4.3.2 Średnia liczba alleli w locus.

Między populacjami nie ma większych różnic pod względem średniej liczby alleli w locus (Tab.6). Wynosi ona od  $1,72 \pm 0,19$  w populacji alpejskiej Val Fersina (VI) do  $2,22 \pm 0,32$  w populacji sudeckiej Dubicko (I), przy średniej  $1,90 \pm 0,22$

dla jedenastu badanych populacji. Również między grupami populacji nie stwierdzono istotnych różnic w średniej liczbie alleli w locus. Wielkość ta wynosiła  $1,98 \pm 0,23$  dla populacji modrzewia polskiego,  $1,97 \pm 0,24$  dla populacji modrzewia sudeckiego i  $1,78 \pm 0,21$  dla populacji modrzewia alpejskiego.

#### 4.3.3 Efektywna liczba alleli w locus.

Wartości efektywnej liczby alleli dla wszystkich loci jedenastu badanych populacji zestawiono w tabeli 7. Wynoszą one od 1 dla loci monomorficznych do 2,80 dla Shdh w populacji alpejskiej Fiemme (VII). Tabela 6 przedstawia średnie geometryczne efektywnej liczby alleli w locus dla poszczególnych populacji. Wartości te są bardzo podobne dla wszystkich jedenastu badanych populacji i wynoszą od 1,17 w populacji alpejskiej Fiemme (VII) do 1,20 w populacji sudeckiej Radim-Krasov (III).

#### 4.3.4 Procent loci polimorficznych.

W zależności od przyjętego kryterium oceny, procent loci polimorficznych przybiera różne wartości (Tab.6). Według pierwszego kryterium, gdzie za polimorficzny uznano ten locus dla którego częstość allela 100 posiada wartość  $\leq 0,95$ , procent loci polimorficznych wynosi od 27,78 do 44,44 przy średniej dla 11 badanych populacji =  $36,36 \pm 1,37$ . Według drugiego kryterium (polimorficznym jest ten locus dla którego częstość allela 100  $\leq 0,99$ ) - od 50,00 do 66,67 przy średniej równej  $56,57 \pm 1,96$ . Przyjęcie odpowiedniego kryterium oceny stopnia polimorfizmu, znajduje także swe odbicie w relacjach między średnim procentem loci polimorficznych dla trzech badanych grup populacji: alpejskich, polskich i sudeckich. Stosując pierwsze kryterium, średni procent loci polimorficznych dla populacji polskich równy 33,33 odbiega

Tab.6 Zestawienie miar zmienności genetycznej modrzewia europejskiego.

Populacje	Procent loci polimorficznych (ocena według:)*		Srednia liczba alleli/locus	Efektywna liczba alleli/locus
	Kryterium 1	Kryterium 2		
Dubicko (I)	38,89	66,67	2,22 ± 0,32	1,19
Mezina (II)	38,89	61,11	1,94 ± 0,21	1,19
Radim-Krasov(III)	33,33	55,56	1,78 ± 0,21	1,20
Albrechtice (IV)	38,89	55,56	1,94 ± 0,22	1,18
V. di Cavedine(U)	44,44	50,00	1,83 ± 0,23	1,19
Val Fersina (VI)	38,89	50,00	1,72 ± 0,19	1,19
Fiemme (VII)	27,78	50,00	1,78 ± 0,22	1,17
Val Sozzine(VIII)	38,89	50,00	1,79 ± 0,19	1,19
Drzewica (IX)	33,33	66,67	1,94 ± 0,19	1,18
Jastrzębia (X)	33,33	61,11	1,89 ± 0,20	1,19
Odrowążek (XI)	33,33	55,56	2,11 ± 0,29	1,18
średnie:	36,36 ± 1,37	56,57 ± 1,96	1,90 ± 0,22	1,19

\* - Kryterium 1: częstość allela  $100 \leq .95$

Kryterium 2: częstość allela  $100 \leq .99$

Tab.7 Efektywna liczba alleli dla poszczególnych loci w 11 badanych populacjach.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Est3	1.08	1.26	1.05	1.08	1.15	1.06	1.09	1.18	1.03	1.36	1.10
Fdh	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gdh	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.04	1.04	1.09	1.04	1.02
G6pd	2.38	2.47	2.40	1.87	2.41	2.33	2.21	2.26	2.28	2.60	2.47
Idh	1.00	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.02	1.00	1.00
Lap1	1.09	1.04	1.00	1.19	1.20	1.14	1.03	1.09	1.03	1.03	1.10
Lap2	1.12	1.27	1.08	1.11	1.35	1.52	1.23	1.35	1.29	1.08	1.19
Mdh1	1.32	1.04	1.58	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.07	1.07	1.09
Mdh2	1.02	1.02	1.02	1.04	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mdh3	1.14	1.23	1.49	1.33	1.14	1.22	1.04	1.25	1.20	1.31	1.28
Mdh4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mnr2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mnr3	2.09	1.96	1.81	1.89	2.00	2.10	2.06	1.79	2.03	1.94	2.35
Mnr4	1.71	1.88	1.84	1.94	1.84	1.98	1.99	1.94	2.00	1.99	1.69
Shdh	2.76	2.74	2.71	2.62	2.50	2.02	2.80	2.49	2.09	2.25	2.26
Sod1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sod2	1.06	1.02	1.00	1.05	1.00	1.04	1.00	1.02	1.07	1.02	1.00
Srdh	1.05	1.00	1.00	1.02	1.03	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00



nieco od dwóch pozostałych grup. Średnie dla populacji alpejskich i sudeckich wynoszą odpowiednio:  $37,5 \pm 3,49$  i  $37,5 \pm 1,39$ . Natomiast przyjmując drugie kryterium oceny, średni procent loci polimorficznych dla populacji alpejskich równy 50,00 odbiega z kolei dość znacznie od średniej dla populacji sudeckich ( $59,73 \pm 2,66$ ) i polskich ( $61,11 \pm 3,21$ ).

#### 4.3.5. Współczynniki genetycznego zróżnicowania badanego gatunku według Nei.

Obliczone wartości całkowitej różnorodności genowej ( $H_T$ ), wewnątrzpopulacyjnej różnorodności genowej ( $H_S$ ), międzypopulacyjnej różnorodności genowej ( $D_{ST}$ ), absolutnego genetycznego zróżnicowania ( $D_m$ ) oraz współczynnika względnej wielkości genetycznego zróżnicowania ( $G_{ST}$ ) dla każdego locus zebrano w tabeli 8. W zależności od badanego locus wielkość całkowitej różnorodności genowej ( $H_T$ ) jest bardzo zmienna, przyjmując wartości od zera dla loci monomorficznych (Fdh, Mdh4, Mnr2, Sod1) do 0.6147 dla dehydrogenazy szikimianowej. Średnia wartość  $H_T$  dla 18 badanych loci wynosi  $0.1632 \pm 0.0589$ . Podobny jest rozkład wartości  $H_S$  dla poszczególnych loci z tym, że wartość ta, dla kolejnych loci, była zawsze mniejsza od  $H_T$ , osiągając średnią =  $0.1565 \pm 0.0508$ . Różnorodność genowa między populacjami ( $D_{ST}$ ) w poszczególnych loci wynosiła od zera dla loci monomorficznych do około 4% dla G6p, średnio wynosząc około 1%. Minimalne różnice w kodonie między badanymi populacjami oszacowano na około 1% (średnie  $D_m = 0.0074 \pm 0.0027$ ). Wyliczona dla *Larix decidua* zmienność międzypopulacyjna stanowi tylko 4% całkowitej zmienności genetycznej gatunku ( $G_{ST} = 0.0411$ ).

skład poszczególnych podgrup wchodzi zarówno populacje polskie, alpejskie oraz sudeckie (II, VII, IX, X oraz IV, V, VI, XI). Natomiast od całości odbiegają dwie populacje sudeckie Dubicko (I) i Radim-Krasov (III), oraz populacja alpejska Val-Sorzina (VIII). O ile różnice wyrażone dystansem genetycznym między populacją alpejską Val Sorzina (VIII) a

Tab.8 Ocena genetycznego zróżnicowania wg Nei dla 18 loci  
11 populacji modrzewia europejskiego.

Locus	H <sub>T</sub>	H <sub>S</sub>	D <sub>ST</sub>	D <sub>m</sub>	G <sub>ST</sub>
Est3	0.1132	0.1097	0.0035	0.0038	0.0308
Fdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	--
Gdh	0.0157	0.0155	0.0002	0.0002	0.0129
G6pd	0.6026	0.5649	0.0377	0.0415	0.0626
Idh	0.0040	0.0040	0.0000	0.0000	0.0096
Lap1	0.0766	0.0748	0.0018	0.0020	0.0232
Lap2	0.1887	0.1817	0.0069	0.0076	0.0367
Mdh1	0.0896	0.0787	0.0109	0.0120	0.1220
Mdh2	0.0098	0.0097	0.0001	0.0001	0.0100
Mdh3	0.1927	0.1867	0.0059	0.0065	0.0308
Mdh4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	--
Mnr2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	--
Mnr3	0.5194	0.4981	0.0213	0.0234	0.0410
Mnr4	0.4779	0.4695	0.0083	0.0092	0.0175
Shdh	0.6147	0.5913	0.0233	0.0257	0.0380
Sod1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	--
Sod2	0.0245	0.0242	0.0003	0.0003	0.0128
Srdh	0.0090	0.0089	0.0001	0.0001	0.0144
średnie	0.1632	0.1565	0.0067	0.0074	0.0411
(SE)*	±0.0589	±0.0508	±0.0025	±0.0027	

\* odchylenie standardowe

#### 4.3.6. Wartości dystansu genetycznego.

Dystans genetyczny (D) przybiera wartości od 0,0008, między populacjami modrzewi polskich Drzewica (IX) a Jastrzębia (X), do 0,0402, między populacją sudecką Radim-Krasov (III) a alpejską Val Sozzine (VIII). Obliczone wartości dystansów genetycznych między badanymi populacjami wraz z odchyleniem standardowym podano w tabeli 10. Dająca się zauważyć bardzo duża wartość odchylenia standardowego (nawet ponad 100% obliczonej wartości D) wynika z faktu włączenia do obliczeń monomorficznych loci, dla których dystans genetyczny między populacjami wynosi zero. Różnice w wielkości dystansów genetycznych w poszczególnych grupach populacji są najmniejsze w zbiorze populacji modrzewi polskich (od 0,0008 do 0,0056). Średni dystans genetyczny między populacjami tej grupy wynosi 0,0035. Nieco większe różnice występują wewnątrz grupy populacji modrzewi alpejskich (od 0,0018 do 0,0088), przy średniej wartości  $D = 0,0055$ . Natomiast między populacjami modrzewi sudeckich dają się zauważyć znaczne różnice genetyczne. Wartości dystansów genetycznych zawierają się w granicach od 0,0044 do 0,0350. Średni dystans genetyczny między populacjami sudeckimi wynosi 0,0183. Jest on ponad trzykrotnie wyższy od średnich dystansów wewnątrz grup populacji modrzewi alpejskich i polskich. Średni dystans genetyczny między grupą populacji polskich a alpejskich wynosi 0,0070. Natomiast średnie dystanse genetyczne między populacjami polskimi i alpejskimi a sudeckimi są dwukrotnie większe przyjmując wartości odpowiednio 0,0142 i 0,0152. Na sporządzonym dendrogramie (Ryc. 21) żadna z trzech badanych grup populacji nie tworzy odrębnej, jednolitej całości. W skład poszczególnych podgrup wchodzi zarówno populacje polskie, alpejskie oraz sudeckie (II, VII, IX, X oraz IV, V, VI, XI). Natomiast od całości odbiegają dwie populacje sudeckie Dubicko (I) i Radim-Krasov (III) oraz populacja alpejska Val-Sozzine (VIII). O ile różnice wyrażone dystansem genetycznym między populacją alpejską Val Sozzine (VIII) a

pozostałymi populacjami alpejskimi nie są tak duże jakby to wynikało z dendrogramu, to dla populacji sudeckich Dubicko (I) i Radim-Krasov (III) różnice te są znaczne zarówno w odniesieniu do pozostałych dwóch populacji sudeckich Mezina (II) i Albrechtice (IV) jak i całej reszty badanych populacji (Tab.10).

Nie stwierdzono istotności korelacji między dystansem genetycznym (D) a dystansem geograficznym ( $r=0,058$ ).

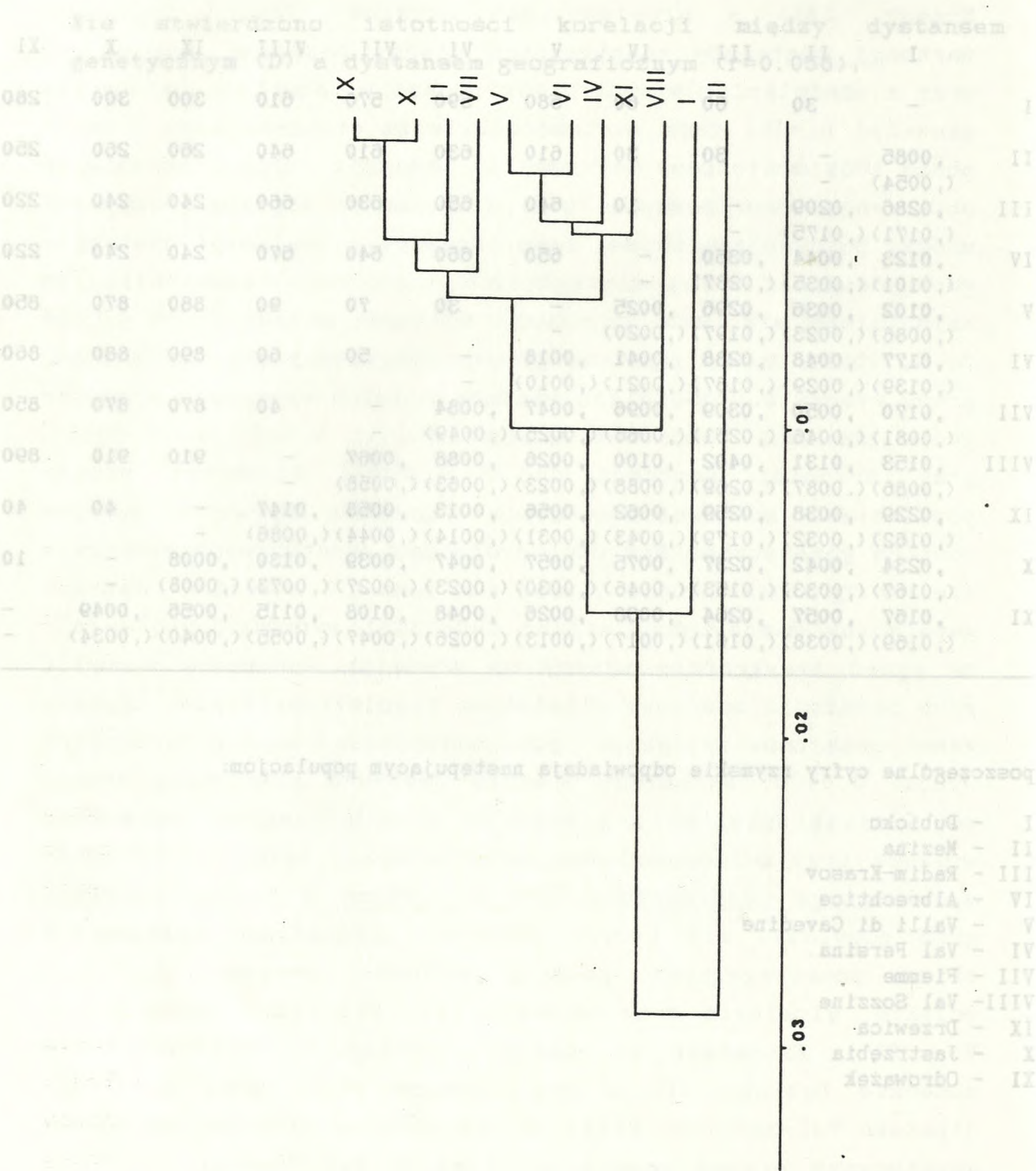
Tab.10 Wartości dystansów między 11 badanymi populacjami *Larix decidua*.  
 Dystans genetyczny wraz z (odchyleniem standardowym)- poniżej przekątnej.  
 Przybliżona wartość dystansu geograficznego w km- powyżej przekątnej

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
I	-	30	60	60	580	590	570	610	300	300	280
II	,0085 (,0054)	-	30	30	610	630	610	640	260	260	250
III	,0286 (,0171)	,0209 (,0175)	-	10	640	650	630	660	240	240	220
IV	,0123 (,0101)	,0044 (,0035)	,0350 (,0237)	-	650	660	640	670	240	240	220
V	,0102 (,0086)	,0036 (,0023)	,0296 (,0197)	,0025 (,0020)	-	30	70	90	880	870	850
VI	,0177 (,0139)	,0048 (,0029)	,0288 (,0167)	,0041 (,0021)	,0018 (,0010)	-	50	60	890	880	860
VII	,0170 (,0081)	,0050 (,0046)	,0309 (,0251)	,0096 (,0066)	,0047 (,0025)	,0084 (,0049)	-	40	870	870	850
VIII	,0153 (,0086)	,0131 (,0087)	,0402 (,0269)	,0100 (,0088)	,0026 (,0023)	,0088 (,0063)	,0067 (,0058)	-	910	910	890
IX	,0229 (,0162)	,0038 (,0032)	,0259 (,0179)	,0062 (,0043)	,0056 (,0031)	,0013 (,0014)	,0058 (,0044)	,0147 (,0086)	-	40	40
X	,0234 (,0167)	,0042 (,0033)	,0237 (,0153)	,0075 (,0046)	,0057 (,0030)	,0047 (,0023)	,0039 (,0027)	,0130 (,0073)	,0008 (,0008)	-	10
XI	,0167 (,0169)	,0057 (,0038)	,0264 (,0161)	,0038 (,0017)	,0026 (,0013)	,0048 (,0026)	,0108 (,0047)	,0115 (,0055)	,0056 (,0040)	,0049 (,0034)	-

poszczególne cyfry rzymskie odpowiadają następującym populacjom:

- I - Dubicko
- II - Mezina
- III - Radim-Krasov
- IV - Albrechtice
- V - Valli di Cavedine
- VI - Val Fersina
- VII - Fiemme
- VIII - Val Sozzine
- IX - Drzewica
- X - Jastrzębia
- XI - Odrowążek

Ryc. 21 Dendrogram (UPGMA) obrazujący podobieństwa między badanymi populacjami modrzewia europejskiego.



## 5. Dyskusja

### 5.1. Dziedziczenie enzymów.

W prezentowanej pracy sprawdzono zgodność segregacji poszczególnych form elektroforetycznych białek enzymatycznych z mendlowskim modelem dziedziczenia dla cech jednogenowych u trzynastu loci enzymatycznych: Est1, Est3, Gdh, G6p, Lap1, Lap2, Mdh1, Mdh2, Mdh3, Mnr3, Mnr4, Shdh, Srdh. Dla sześciu pozostałych loci przeprowadzenie takich analiz było niemożliwe. Cztery z tych loci: Fdh, Mdh4, Mnr2 oraz Sod1 były monomorficzne. Natomiast u dwu dalszych - Idh oraz Sod2 stwierdzono rzadkie allele jedynie w puli nasion pochodzących od nieznannej liczby osobników. Stwierdzona dla trzynastu loci modrzewia europejskiego zgodność dziedziczenia form elektroforetycznych białek enzymatycznych w stosunku 1:1 jest typowym zjawiskiem dla drzew nagozalążkowych (Bergmann 1973, Rudin 1977, Guries i Ledig 1978, El-Kassaby i inni 1982, Cheliak i Pitel 1985). Choć niekiedy obserwuje się drzewa czy grupy drzew ze statystycznie istotnymi odchyleniami od tej reguły. Obszerne wyliczenie gatunków oraz loci enzymatycznych, dla których odnotowano sporadyczne odstępstwa od powyższego modelu podaje Millar (1985).

Liczba doniesień na temat sposobu dziedziczenia systemów enzymatycznych u modrzewia europejskiego jest niewielka. W dalszej części dyskusji omówiono sposób dziedziczenia poszczególnych enzymów u tego gatunku na tle wyników z literatury, które wcześniej uzyskano dla modrzewia europejskiego oraz innych gatunków drzew iglastych.

Aminopeptydaza leucynowa (LAP).

LAP była jednym z pierwszych systemów enzymatycznych badanych u drzew iglastych (Bergmann 1973, Tigersted 1973). Otrzymany w prezentowanej pracy obraz rozdziału elektroforetycznego dla LAP jest zgodny z tym jaki wcześniej

przedstawili u modrzewia europejskiego Mejnartowicz i Bergmann (1975) oraz Lewandowski i Mejnartowicz (1986), chociaż w obszerniej badanym materiale udało się znaleźć trzy, dotąd nienotowane rzadkie allele. Genetyczną kontrolę tego enzymu przez dwa niezależne loci opisywało wielu autorów u szeregu gatunków drzew iglastych (Bergmann 1973, Nicolici i Bergmann 1974, Mejnartowicz 1976, Rudin 1977, Guries i Ledig 1978, Cheliak i Pitel 1985). Natomiast u trzech gatunków z rodzaju *Pinus*, a mianowicie u *P. attenuata* (Conkle 1971), *P. strobus* (Eckert i inni 1981) oraz u *P. torreyana* (Ledig i Conkle 1983), znaleziono trzy niezależnie dziedziczące się strefy aminopeptydazy leucynowej.

Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD)  
Kodowanie G6PD u modrzewia europejskiego w jednym locus jest zgodne z obserwacjami poczynionymi dla dwóch amerykańskich gatunków z rodzaju *Larix*: *L. laricina* (Cheliak i Pitel 1985), oraz *L. occidentalis* (Fins i Seeb 1986). Enzym ten kodowany jest w jednym locus także u *Pinus banksiana* (Cheliak i inni 1984) i *Picea abies* (Muona i inni 1987). Natomiast u niektórych innych gatunków drzew iglastych znaleziono dwie niezależnie dziedziczące się strefy aktywności tego enzymu (O'Malley i inni 1979, Ledig i Conkle 1983, Strauss i Conkle 1986).

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH)  
Dotychczas, podobnie jak u modrzewia europejskiego, także i u wielu innych gatunków drzew iglastych stwierdzono kodowanie GDH w jednym locus. Jako przykład można podać: *Pseudotsuga menziesii* (Yeh i O'Malley 1980), *Picea glauca* (King i Dancik 1983), *Pinus muricata* (Millar 1985), *Larix occidentalis* (Fins i Seeb 1986) czy *Picea abies* (Muona i inni 1987). Natomiast Krzakowa (1982) opisała trzy loci GDH u *Pinus sylvestris*. Wydaje się jednak, że taki stan rzeczy może być wynikiem błędnej interpretacji otrzymanych zymogramów.



Jak zauważyli wcześniej Mejnartowicz i Bergmann (1984), stosując przy rozdziale bufor TRIS-kwas cytrynowy, faktycznie na zymogramach otrzymuje się trzy strefy aktywności enzymatycznej. Jednak dwie z nich można otrzymać bez dodatku jakiegokolwiek substratu do mieszaniny barwiącej. Powyższe dwie strefy można więc przypisać innym dehydrogenazom, jak np. dehydrogenazie izocytrynianowej (IDH), która u sosny kodowana jest w 2 loci (Mejnartowicz i Bergmann 1984). IDH może prawdopodobnie wykorzystywać, jako substrat kwas cytrynowy użyty do sporządzenia buforu żelowego. Stwierdzona u modrzewia europejskiego budowa czwartorzędowa dehydrogenazy glutaminianowej jest zgodna z obserwacjami przeprowadzonymi u innych gatunków drzew iglastych, jak: *Pinus taeda* (Adams i Joly 1980) i *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby i inni 1982).

Dehydrogenaza izocytrynianowa (IDH).

Podobnie jak u modrzewia europejskiego IDH jest kodowana w jednym locus także u *Larix occidentalis* (Fins i Seeb 1986) oraz wielu innych gatunków drzew iglastych, jak: *Pinus rigida* (Guries i Ledig 1978), *Pinus ponderosa* (O'Malley i inni 1979), *Pseudotsuga menziesii* (Yeh i O'Malley 1980). Natomiast Mejnartowicz i Bergmann (1984) u *Pinus sylvestris*, Cheliak i Pitel (1984) u *Picea glauca* oraz Muona i inni (1987) u *Picea abies* donoszą o kodowaniu IDH przez dwa loci.

Dehydrogenaza jabłczanowa (MDH).

Zymogramy MDH, według których enzym ten kodowany jest w czterech loci, interpretują podobnie u innych gatunków drzew iglastych O'Malley i inni (1979), EL-Kassaby (1981), Cheliak i Pitel (1985). Prawidłowość takiej a nie innej interpretacji pięciu stref aktywności dehydrogenazy jabłczanowej na zymogramach u modrzewia europejskiego potwierdzają następujące fakty:

a) niezależna segregacja prążków w strefach Mdh1, Mdh2 oraz Mdh3,

b) zmienność w tempie wędrówki prążków strefy Mdh2 lub Mdh3 wpływa na zmianę położenia prążka heterodimerowego, jednak w ten sposób, że jest on obecny zawsze pośrodku prążków strefy Mdh2 i Mdh3,

c) heterozygotyczne w locus Mdh2 lub Mdh3 zarodki, dają na zymogramach obraz dwóch prążków heterodimerowych. Gdyby domniemany heterodimer kodowany był przez odrębny locus, w takim przypadku, uwzględniając fakt że MDH jest dimerem, powinny być obecne nie dwa a trzy prążki. Bardzo dobrze uwidacznia się to zwłaszcza w materiale z heterozygotycznych zarodków Mdh2-100/Mdh2-110 (Ryc. 12B).

Określenie budowy czwartorzędowej MDH u modrzewia europejskiego jako dimerycznej jest zgodne z obserwacjami dla innych gatunków drzew iglastych, jak: *Pinus ponderosa* (O'Malley i inni 1979), *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby i inni 1982), *Pinus rigida* (Guries i Ledig 1978), *Pinus muricata* (Millar 1985).

Dehydrogenaza mrówczanowa (FDH).

Enzym ten jest bardzo rzadko wykorzystywanym w badaniach nad zmiennością genetyczną w populacjach drzew leśnych. U modrzewia FDH jest enzymem monomorficznym, kodowanym w jednym locus. Aktywności tego enzymu w jednej strefie obserwowali także Mejnartowicz i Bergmann (1984) u *Pinus sylvestris*. W związku z brakiem jakiegokolwiek zmienności, nic nie można powiedzieć o strukturze czwartorzędowej tego enzymu.

Dehydrogenaza sorbitolowa (SRDH).

Dehydrogenaza sorbitolowa, podobnie jak FDH, jest rzadko wykorzystywana w pracach nad zmiennością genetyczną populacji drzew leśnych. Podobnie jak u modrzewia europejskiego jedną, monomorficzną strefę SRDH opisali O'Malley i inni (1979) u *Pinus ponderosa* oraz Millar (1985) u *Pinus muricata*.

Dehydrogenaza szikimianowa (SHDH).

Stwierdzenie, że dehydrogenaza szikimianowa u modrzewia europejskiego kodowana jest w jednym locus znajduje potwierdzenie we wcześniejszych obserwacjach Bergmanna i Ruetza (1987). Jednak autorzy ci ze względu na niewielką liczbę analizowanych drzew nie stwierdzili żadnej zmienności dla tego enzymu. W rzeczywistości zaś dehydrogenaza ta u badanego gatunku okazała się być bardzo zmienną, znaleziono cztery allele, a wyliczona średnia wartość heterozygotyczności oczekiwanej wynosiła powyżej 60%. Identyczną budowę czwartorzędową jak u modrzewia europejskiego stwierdzono dla SHDH u *Pinus ponderosa* (Linhart i inni, 1981), *P. sylvestris* (Szmidt i Yazdani, 1984) i *P. muricata* (Millar, 1985).

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD).

Prace dotyczące sposobu dziedziczenia dysmutazy ponadtlenkowej u poszczególnych gatunków drzew iglastych, podają różne liczby loci. Podobnie jak w prezentowanej pracy dwa loci SOD znaleźli Schiller i inni (1986) u *Pinus halepensis*. Natomiast o kodowaniu SOD w jednym locus donoszą Cheliak i Pitel (1985) u *Larix laricina*, EL-Kassaby i inni (1982) u *Pseudotsuga menziesii*, King i Dancik (1983) u *Picea glauca*, Millar (1985) u *Pinus muricata*, Strauss i Conkle (1986) u *Pinus attenuata*. Natomiast aż cztery loci SOD opisali Ledig i Conkle (1983) u *Pinus torreyana*. Wydaje się, że aż tak znaczne różnice dotyczące liczby loci kodujących dysmutazę ponadtlenkową u różnych gatunków drzew iglastych, wynikają głównie ze stosowania odmiennych technik rozdziałów elektroforetycznych i barwienia omawianych białek enzymatycznych.

Esteraza (EST).

Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami u modrzewia europejskiego (Lewandowski i Mejnartowicz 1986) stwierdzono istnienie co najmniej trzech stref aktywności enzymu.

Natomiast wcześniej u tego gatunku Kosiński i Szmidt (1984) stwierdzili istnienie conajmniej czterech stref aktywności enzymatycznej, chociaż analizie poddawali tylko trzy z tych stref. Otrzymanie na zymogramach innego obrazu jest w tym wypadku dość oczywiste zważywszy na fakt zastosowania przez autorów odmiennej techniki rozdzału. Natomiast ciekawym jest stwierdzenie, że drzewo K-10-01 analizowane zarówno przy użyciu rozdzału elektroforetycznego na żelu skrobiowym (prezentowana praca) jak i przy metodzie ogniskowania w punkcie izoelektrycznym na żelu poliakrylamidowym (Kosiński i Szmidt 1984) jest w obu przypadkach podwójną heterozygotą - w strefach o najwyższej i najniższej ruchliwości elektroforetycznej. U innych gatunków drzew iglastych opisywano od 1 do 5 loci esterazy. U *Pinus attenuata* obserwowano jeden locus (Strauss i Conkle 1986), dwa loci znaleziono u *Pseudotsuga menziesii*, *Picea glauca* i *Pinus nigra* (EL-Kassaby i inni 1982, King i Dancik 1983, Nicolici i Tucić 1983). Trzy loci analizował Bergmann (1973) u *Picea abies*. Natomiast Lundkvist (1977) opisał dla tego gatunku 4 loci esterazy. Pięć loci występuje u *Pinus torreyana* (Ledig i Conkle 1983).

Reduktaza menadionowa (MNR).

Mimo, że białka enzymatyczne wybarwione z użyciem jako substratu menadionu przypisano reduktazie menadionowej, to należy jednak zaznaczyć, że identyczny wzór enzymatycznej aktywności otrzymuje się także na żelach stosując 2,6-dwuchlorofenol indofenol, będący substratem dla diaforazy (DIA). Podobnie, po zastosowaniu obu tych substratów (menadionu i 2,6-dwuchlorofenol indofenolu) takie same zymogramy otrzymuje się u niektórych innych gatunków drzew iglastych (Lewandowski niepublikowane). Na równoważność loci Dia3 i Mnr3 już wcześniej zwrócili uwagę Strauss i Conkle (1986) u *Pinus attenuata*. Wydaje się jednak, że jest to zjawisko szersze i o wiele bardziej złożone. Enzymy z grupy EC. 1.6.99. są enzymami o małej specyficzności substratowej,

dlatego z menadionem jak i 2,6-dwuchlorofenolem indofenolu, w obecności NADPH, może reagować kilka różnych enzymów. W związku z tym niezbędne jest przeprowadzenie szczegółowych badań z użyciem specyficznych inhibitorów, które pozwolą na jednoznaczne przypisanie odpowiednich stref, obserwowanych na zymogramach, odpowiednim enzymom. Do czasu pełnego wyjaśnienia zagadnienia, dla wszystkich czterech obserwowanych u modrzewia stref aktywności enzymatycznej, pozostawiono umowną nazwę "reduktazy menadionowej".

Podsumowując otrzymane wyniki należy stwierdzić, że dla kilku systemów enzymatycznych, takich jak: GDH, G6P, LAP, MDH stwierdzone liczby loci kodujących poszczególne enzymy u modrzewia europejskiego są identyczne z tymi jakie podają Cheliak i Pitel (1985) dla amerykańskiego gatunku modrzewia *L. laricina*. Z dających się porównać enzymów, jedynie dla SOD istnieją różnice. U *L. decidua* dysmutaza ponadtlenkowa kodowana jest w dwu loci, natomiast u *L. laricina* stwierdzono tylko jeden locus. Jak się wydaje rozbieżności te wynikają wyłącznie z zastosowania różnych metod barwienia. Spotykane w literaturze opisy rozdziałów elektroforetycznych poszczególnych systemów enzymatycznych w nasionach różnych gatunków drzew iglastych są często zasadniczo odmienne. Dotyczy to głównie liczby loci, w których kodowany jest dany enzym. Prawdopodobnie rozbieżności te wynikają bardzo często ze stosowania przez różnych autorów odmiennych metod rozdziału i barwienia białek enzymatycznych. Nie jest jednak wykluczone, że obserwowane niezgodności są wynikiem realnie istniejących międzyrodzajowych i międzygatunkowych różnic. Prowadzenie więc głębszych porównań między rodzajami czy gatunkami co do liczby loci w jakich kodowany jest dany locus jest niemożliwe do czasu ujednoczenia metod, bądź analizowania identycznych systemów enzymatycznych równocześnie dla kilku gatunków przez grupę tych samych badaczy.

Czytelne i jednoznaczne obrazy elektroforetyczne uzyskane zarówno w materiale z makrogametofitów jak i zarodków czynią cztery systemy enzymatyczne: GDH, MDH, SRDH oraz SHDH szczególnie cennymi genetycznymi markerami w dalszych pracach nad zmiennością genetyczną oraz systemem kojarzenia u prezentowanego gatunku.

## 5.2. WIELKOŚĆ SAMOZAPŁODNIENIA.

W celu pełniejszego poznania i zrozumienia mechanizmów zachodzących w naturalnych populacjach modrzewia europejskiego, obok obliczenia wielkości oraz rozkładu zmienności genetycznej, zajęto się również oceną proporcji żywych nasion powstałych w wyniku samozapłodnienia w stosunku do całej puli żywych nasion. Jak dotąd w literaturze brak jest doniesień na ten temat u prezentowanego gatunku. Sugeruje się, że występowanie naturalnych populacji modrzewia europejskiego w formie niewielkich grup rozproszonych drzew oraz posiadanie ciężkiego, bez worków powietrznych pyłku, może sprzyjać dużej wsobności (Mejnartowicz i Bergmann 1975). Jeżeli powyższe założenia są zgodne z rzeczywistością to w badanych populacjach należałoby oczekiwać stosunkowo małego poziomu zmienności genetycznej oraz istnienia znacznych różnic genetycznych między tymi populacjami. Wyliczona, w pracy, na podstawie rzadkich alleli, średnia wartość samozapłodnienia ( $s$ ) dla dwunastu drzew jest stosunkowo niska wynosząc około 12%. Oszacowane  $s$  dla poszczególnych analizowanych drzew było bardzo zróżnicowane wynosząc od 0 do 0,25 (Tab.4). Chociaż wydaje się, że podana dla drzewa Ciechostowice 16, wartość  $s = 0,25$ , jest zapewne znacznie zawyżona. Jest ona średnią z wartości 0,5 oraz 0 wyliczonych niezależnie dla dwóch loci, odpowiednio Mdh1 oraz Mdh3. Tak znaczne różnice w ocenie wynikają zapewne z faktu iż w sąsiedztwie badanego drzewa prawdopodobnie rośnie nieanalizowane drzewo z rzadkim allelem Mdh1-125, powodując

znaczące zawyżenie obliczonej wartości samozapłodnienia na podstawie analizy locus Mdh1. Natomiast zaobserwowane różnice pod względem ilości przeżywających nasion, które powstały w wyniku samozapłodnienia są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami.

Modrzew europejski uważany jest przez większość autorów za gatunek prawie samosterylny, dając bardzo mało pełnych nasion po samozapyleniu, chociaż wskazuje się jednocześnie na duże indywidualne zróżnicowanie pod względem tej cechy (Langner 1951, Gothe 1952, Kosiński 1986). Kosiński (1986) badając przyczyny powstawania pustych nasion stwierdził, że wśród modrzewi rosnących na plantacji nasiennej w Kórniku, liczba pełnych nasion po samozapyleniu nie przekraczała w większości przypadków 10%. Bardzo dobrze zgadza się to z oszacowaną w tej pracy średnią wielkością samozapłodnienia dla naturalnej populacji modrzewia z Ciechołowic. W przypadku samozapylenia, szczególny wyraz znajdują przyczyny genetyczne, wywołując degenerację nawet 100% zarodków, jako efekt homozygotyzacji genów letalnych. Pomimo, że oszacowana dla modrzewia europejskiego średnia liczba czynników letalnych na 4,8 (Kosiński 1986) jest niższa niż dla innych gatunków naszych drzew iglastych, to i tak jest ona znacznie wyższa niż u np. roślin zielnych. Duża liczba czynników letalnych w warunkach naturalnych prowadzi do eliminacji nasion powstałych w wyniku samozapylenia. Biologicznym sensem tego zjawiska jest eliminacja niekorzystnego pod wieloma względami wsobnego potomstwa. Różnice między poszczególnymi drzewami, w wyliczonej wartości samozapylenia mogą być również wynikiem braku synchronizacji dla danych drzew między początkiem pylenia a receptywnością kwiatów żeńskich. Być może niektóre drzewa, ze względu na różnice między czasem kwitnienia męskiego i żeńskiego, nie mają praktycznie szans na samozapłodnienie co jest przecież dla gatunku zjawiskiem niezmiernie korzystnym. Niestety w prezentowanej pracy ze względu na trudności obserwacji, wysokość badanych drzew ponad 30 m oraz osłonięcie koron badanych drzew przed

obserwatorem z ziemi przez znacznie niższe jodły, obserwacje fenologiczne nie były prowadzone. Natomiast Kosiński (1986) prowadząc obserwacje fenologiczne w archiwum klonów modrzewia europejskiego na Zwierzyńcu, stwierdził tylko u dwóch szczepów na 29 analizowanych aby początek pylenia i receptywności kwiatów żeńskich miały miejsce tego samego dnia.

Jak się wydaje podana w pracy wielkość samozapylenia dobrze oddaje rzeczywisty rozmiar tego zjawiska u modrzewia, gdyż analizowana populacja z Ciechostowic jest populacją reprezentatywną dla badanego gatunku. Na obszarze ok 4 ha znajduje się kilkadziesiąt okazałych, rosnących w rozproszeniu modrzewi w wieku 200 do 300 lat. Odległość między drzewami z których zbierano szyszki wynosiła od 10 do 300 metrów. Badana populacja jest szczątkową pozostałością większej populacji. Jeszcze w roku 1927 można było w tym rejonie naliczyć do 1000 sztuk modrzewi o obwodzie pnia ok. trzech metrów (Kulesza 1927).

W tabeli 11 podano za Muoną (1989) zestawienie oszacowanych wartości współczynnika kojarzenia niekrewniaczego -  $t$  (gdzie  $t=1-s$ ) dla kilkunastu gatunków drzew iglastych. Jak wynika z powyższej tabeli poszczególne gatunki charakteryzują się niekrewniaczym sposobem rozmnażania a  $t$  przyjmuje wartość od 0,73 u *Larix laricina* do 0,99 u *Pinus contorta*. Wyliczona wysoka średnia wartość współczynnika kojarzenia niekrewniaczego  $t = 0,885$  (1 - 0,115) dla modrzewia europejskiego nie odbiega od wartości  $t$  dla innych gatunków drzew iglastych tym bardziej, że wielkość ta dla poszczególnych gatunków oscyluje niekiedy w dość szerokim zakresie (Tab.11). Wielkość  $t$  obliczona dla pięciu populacji *Larix laricina* waha się od 0,537 do 0,908 przy czym populacje o większym zagęszczeniu charakteryzują się mniejszym samozapłodnieniem (Knowles i inni 1987). Różnice w oszacowaniu wartości  $t$  dla poszczególnych gatunków wynikają także z rodzaju zastosowanej metody obliczeń.



Tab.11 Zestawienie obliczonych wartości współczynników kojarzenia niekrewniaczego (t) dla naturalnych populacji kilu gat. drzew iglastych, t obliczono następującymi metodami: R - rzadkimi allelami, S - "metodą pojedynczych loci", M - "metodą jednoczesnej analizy wielu loci". Cyt. za Muona (1989) - zmienione.

Gatunek	t	Liczba populacji	Metoda	Zródło
<i>Abies balsamea</i>	0,89	4	M	Neale i Adams 1985b
<i>Abies lasiocarpa</i>	0,89	1	M	Shea 1987
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,90	8	M	Shaw i Allard 1982
	0,90	3		El-Kassaby i inni 1982
	0,98	2	M	Neale i Adams 1985
	0,95	2	M	Neale i Adams 1985
<i>Picea abies</i>	0,88	1	R	Muller 1977
	0,88		R	Lundkvist 1977
	0,83	1	M	Muona i inni (nie pub.)
<i>Picea glauca</i>	0,98	1		Cheliak i inni 1985
	0,91	1		King i inni 1984
<i>Picea engelmannii</i>	0,87	1	M	Shea 1987
<i>Larix laricina</i>	0,73	5	M	Knowles i inni 1987
<i>Pinus monticola</i>	0,98	1	M	El-Kassaby i inni 1987
<i>Pinus sylvestris</i>	0,94	1	R	Muller 1977
	0,81	1	R	Rudin i inni 1977
	0,89	1	R	Rudin i inni 1986
	0,94	1	S	Muona i inni 1987
	0,95	3	M	Muona i Harju (w druku)
<i>Pinus ponderosa</i>	0,96	1	S	Mitton i inni 1977
	0,96	1	S	Mitton i inni 1981
<i>Pinus jeffreyi</i>	0,93	5	M	Furnier i Adams 1986
<i>Pinus rigida</i>	0,95			Guries i Ledig 1982
<i>Pinus banksiana</i>	0,88	1	M	Cheliak i inni 1985
	0,88	1	M	Snyder i inni 1985
<i>Pinus contorta</i>	0,99	2	M	Epperson i Allard 1984
	0,95	3	M	Perry i Dancik 1986
<i>Pinus radiata</i>	0,74	18	M	Moran i inni (nie pub.)

Wykorzystana w pracy metoda rzadkich alleli powoduje niekiedy dość znaczne zawyżenie oceny samozapłodnienia.

Podsumowując, należy stwierdzić, że u omawianego gatunku może występować duża wartość rzeczywistego samozapylenia spowodowana obecnością ciężkiego, pozbawionego worków powietrznych pyłku. Jednak z powodu braku mechanizmów izolacyjnych o charakterze morfologicznym, redukujących wielkość samozapylenia, wystąpienie czynników izolacyjnych o charakterze genetycznym (znaczna liczba czynników letalnych), powoduje dużą śmiertelność zarodków powstałych po samozapłodnieniu. Wynikiem tego procesu jest obserwowana duża liczba pustych nasion. Pomimo dużej śmiertelności zarodków powstałych w wyniku samozapłodnienia część z nich przeżywa, stanowiąc średnio ok. 12% (w populacji Ciechostowice) całej puli żywych nasion.

### 5.3. WIELKOŚĆ ORAZ ROZKŁAD ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ.

Szacuje się, że metodami elektroforetycznymi możliwym jest do wykrycia tylko 25 do 30% całkowitej zmienności genomu (Lewontin 1974). Wynika z tego, że uzyskane w prezentowanej pracy rezultaty (Tab. 5 i 6) wskazują na bardzo duży poziom zmienności genetycznej modrzewia europejskiego. Skala zmienności genetycznej jaką rozporządza ten gatunek jest olbrzymia w związku z czym obserwowana duża zmienność morfologiczna między populacjami a także między drzewami wewnątrz populacji (przeglądowa praca Mejnartowicz i Kosiński 1986).

Zmierzony u *Larix decidua* poziom zmienności genetycznej jest podobny do tego jaki podaje się w literaturze dla innych gatunków drzew iglastych o szerokim zasięgu występowania, dla których analizowano większą liczbę loci enzymatycznych. W tabeli 12 zebrano wyniki uzyskane dla kilku wybranych gatunków drzew iglastych, dla których analizowano co najmniej 19 loci enzymatycznych.

Tab.12 Zestawienie wybranych miar zmienności genetycznej u kilku gatunków drzew iglastych.

Gatunek	ilość badanych loci	N <sub>a</sub>	procent loci polimorficznych		H <sub>e</sub>	H <sub>T</sub>	H <sub>s</sub>	G <sub>ST</sub>	Autor, rok publikacji
			1 kryt.	2 kryt*					
Larix laricina	19	1,80	-	62,0	,220	,250	,240	,050	Cheliak i inni 1988
Larix occidentalis	23	1,50	-	30,4	,082	-	-	,086	Fins i Seeb, 1986
Picea mariana	23	1,44	-	38,0	,107	-	-	,059	Yeh i inni, 1986
Picea sitchensis	24	-	-	51,0	,154	,159	,147	,079	Yeh i EL Kassaby, 1980
Pinus banksiana	20	2,00	53,3	-	,207	-	-	-	Ros i Hawkins, 1986
Pinus contorta	42	1,86	-	69,0	,188	,125	,121	,032	Wheeler i Guries, 1982
Pinus halepensis	30	1,10	15,0	-	,054	-	-	-	Shiller i inni, 1985
Pinus muricata	26	1,42	-	30,8	-	,085	-	,141	Millar, 1983
Pinus ponderosa	23	1,99	-	56,5	,126	,126	,124	,014	Woods i inni 1983
Pinus radiata	31	1,46	-	35,5	,089	,135	,113	,162	Moran i inni 1988
Pinus rigida	21	3,10	76,2	-	,146	,152	,147	,023	Guries i Ledig 1982
Pseudotsuga menziessi	21	2,19	51,5	68,8	,155	,159	,155	,026	Yeh i O'Malley, 1980
Larix decidua	18	1,90	36,4	56,6	,157	,163	,157	,041	prezentowana praca

\* 1 kryt. - częstość allele 100 € ,99  
 2 kryt. - częstość allele 100 € ,95

Jak wynika z przytoczonej tabeli Cheliak i inni (1988) u amerykańskiego gatunku modrzewia *L. laricina* stwierdzili 62% loci polimorficznych, przy średniej liczbie alleli w locus ( $n_m$ ) równej 1,8. Wyniki te są podobne do obserwacji uzyskanych dla *L. decidua*, u którego średnia liczba alleli w locus wynosi 1,9 przy 57% loci polimorficznych, mimo że dla obu gatunków nie wszystkie analizowane systemy enzymatyczne były takie same. Obliczona wartość heterozygotyczności oczekiwanej dla badanych populacji modrzewia europejskiego zawierała się w granicach od 0,144 do 0,166 przy średniej dla 11 populacji = 0,157. Podany poziom heterozygotyczności jest bardzo zbliżony do tego jaki stwierdzono u innych gatunków drzew iglastych, gdy analizie poddano większą liczbę loci (Tab.12). W porównaniu do gatunków z rodzaju *Larix* jest on nieco niższy od tego jaki podają Cheliak i inni (1988) dla *L. laricina*, gdzie  $H_{em} = 0,220$  oraz prawie dwukrotnie wyższy od heterozygotyczności u *L. occidentalis*, gdzie  $H_{em} = 0,082$  (Fins i Seeb 1986). W chwili obecnej trudno powiedzieć czy różnice w poziomie heterozygotyczności między trzema wymienionymi gatunkami z rodzaju *Larix* są wynikiem analizowania nie tych samych systemów enzymatycznych, czy też oddają realnie istniejące różnice wynikające z innej biologii oraz odmiennej historii gatunków.

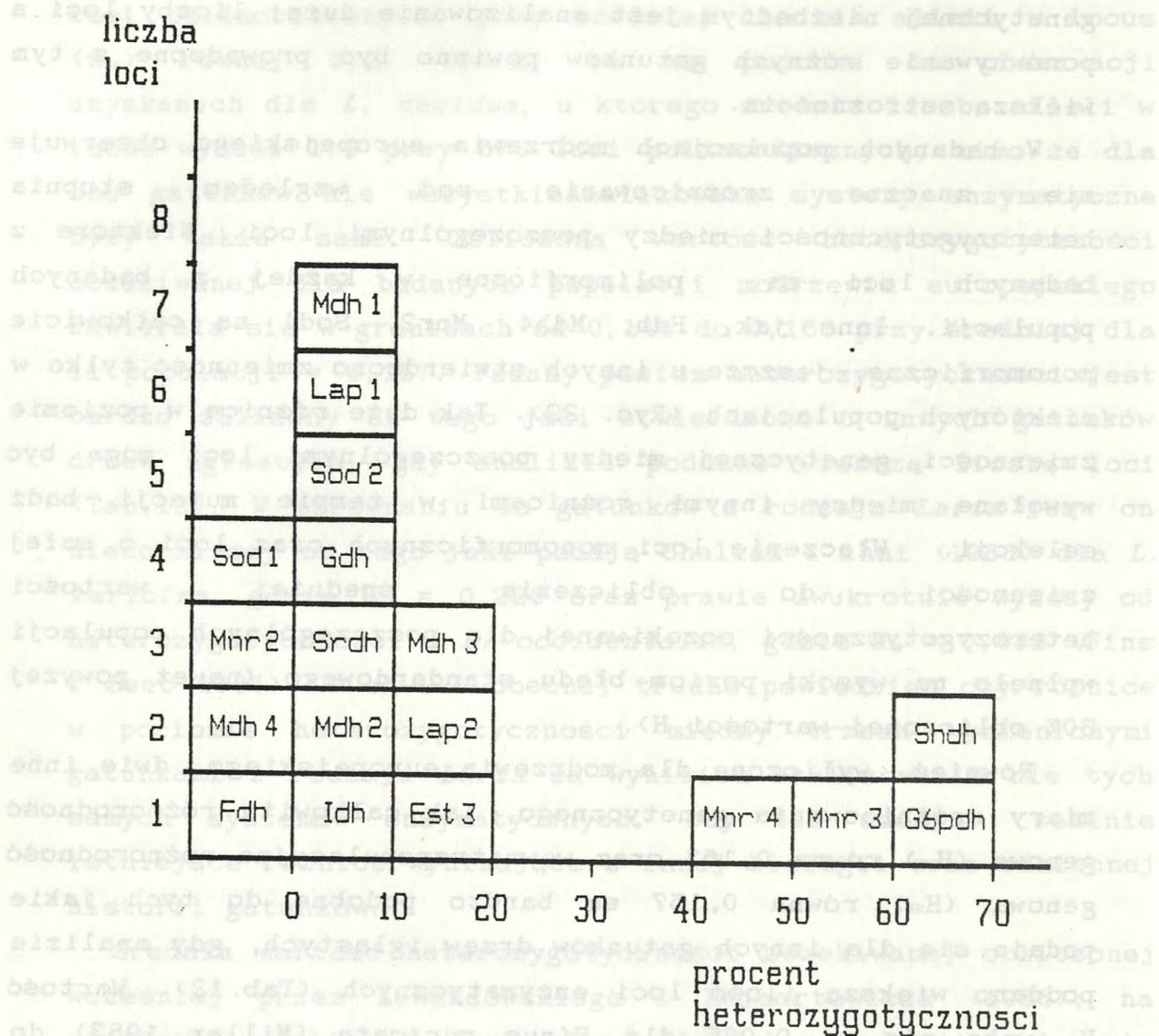
Średnia wartość heterozygotyczności oczekiwanej obliczonej wcześniej przez Lewandowskiego i Mejnartowicza (1986), na podstawie analizy 6 loci, dla polskich populacji modrzewia europejskiego była wyższa i zawierała się w granicach od 0,260 do 0,360. Znaczna różnica w wartości średniego poziomu heterozygotyczności oszacowanej w prezentowanej pracy a wcześniejszymi obserwacjami, wynikała głównie z faktu, że obecnie analizowano większą liczbę loci. W dodatku we wcześniejszej pracy analizowano loci bardzo zmienne, jak kwaśną fosfatazę i esterazę. Także Yeh i O'Malley (1980) zauważają, że niższy poziom oszacowanej przez nich heterozygotyczności u daglezi zielonej niż to podawano we wcześniejszych opracowaniach wynika głównie z analizowania

większej liczby loci enzymatycznych. Nasuwa to wniosek, że w celu solidnej oceny poziomu oraz obrazu zmienności genetycznej niezbędnym jest analizowanie dużej liczby loci a porównywanie różnych gatunków powinno być prowadzone z tym większą ostrożnością.

W badanych populacjach modrzewia europejskiego obserwuje się znaczne zróżnicowanie pod względem stopnia heterozygotyczności między poszczególnymi loci. Niektóre z badanych loci są polimorficzne w każdej z badanych populacji. Inne jak, *Fdh*, *Mdh4*, *Mnr2*, *Sod1* są całkowicie monomorficzne, jeszcze u innych stwierdzono zmienność tylko w niektórych populacjach (Ryc. 22). Tak duże różnice w poziomie zmienności genetycznej między poszczególnymi loci mogą być wywołane między innymi różnicami w tempie mutacji bądź selekcji. Włączenie loci monomorficznych oraz loci o małej zmienności do obliczenia średniej wartości heterozygotyczności oczekiwanej dla poszczególnych populacji wpłynęło na wysoki poziom błędu standardowego (nawet powyżej 30% obliczonej wartości  $H$ ).

Również, wyliczone dla modrzewia europejskiego, dwie inne miary zróżnicowania genetycznego, jak całkowita różnorodność genowa ( $H_T$ ) równa 0,163 oraz wewnątrzpopulacyjna różnorodność genowa ( $H_S$ ) równa 0,157 są bardzo podobne do tych jakie podaje się dla innych gatunków drzew iglastych, gdy analizie poddano większą ilość loci enzymatycznych (Tab.12). Wartość  $H_T$  waha się od 0,085 dla *Pinus muricata* (Millar 1983) do 0,250 dla *Larix laricina* (Cheliak i inni 1988). Natomiast wartość  $H_S$  zawiera się w granicach od 0,113 dla *Pinus radiata* (Moran i inni 1988) do 0,240 dla *Larix laricina* (Cheliak i inni 1988).

Między 11 badanymi populacjami modrzewia europejskiego istnieją duże różnice co do częstości alleli w poszczególnych loci. Różnice te były statystycznie istotne u połowy analizowanych loci. Różnorodność warunków środowiskowych w jakich bytuje modrzew europejski może sprzyjać takiemu zróżnicowaniu.



Ryc.22 Rozkład loci pod względem średniej wartości heterozygotyczności oczekiwanej dla 11 badanych populacji modrzewia europejskiego.

Być może, że obserwowane różnice w częstościach alleli są obrazem dopasowania populacji do lokalnych warunków, wobec których identyczne allele mogą posiadać różną wartość adaptacyjną. Statystycznie istotne różnice w częstościach alleli między poszczególnymi populacjami znajduje się już między populacjami leżącymi w bliskim sąsiedztwie. Boyle i Morgenstern (1987) stwierdzili istnienie takich różnic w dwu na jedenaście badanych loci między sześcioma populacjami *Picea mariana* położonymi w odległości do 50 km. Natomiast Yeh i inni (1986) analizując 21 populacji tego samego gatunku z Nowej Funlandii stwierdzili statystycznie istotne różnice już w siedmiu na trzynaście polimorficznych loci, z czego pięć było istotnie skorelowanych z położeniem geograficznym. Podobne obserwacje poczyniono i dla innych północnoamerykańskich gatunków drzew iglastych (Yeh i O'Malley 1980, Guries i Ledig 1982, Cheliak i inni 1988). Autorzy ci sugerują, że za taki a nie inny rozkład alleli między badanymi populacjami, chociaż po części, mogą być odpowiedzialne różnice środowiskowe.

W prezentowanej pracy, na 14 analizowanych polimorficznych loci stwierdzono statystycznie istotną korelację między częstością allelu 100 a położeniem geograficznym jedynie dla Lap2 ( $r = 642$ ,  $P < 0,05$ ), chociaż stwierdzenie takiej korelacji jeszcze wcale nie przesądza o istotnym wpływie selekcji na rozkład alleli w tym locus. Nie można również zapominać, że decydujący wpływ na układ alleli w poszczególnych loci mogą mieć także zdarzenia z niedawnej historii gatunku, jak: zmiany w wielkości populacji i tempie kolonizacji wyrażające się efektem "wąskiego gardła" i efektem założyciela (Lewontin 1974).

Zbadany rozkład zmienności genetycznej u modrzewia europejskiego jest zgodny z tym jaki obserwuje się u większości gatunków drzew iglastych (Loveles i Hamrick 1984). Dziewięćdziesiąt siedem procent całkowitej zmienności genetycznej gatunku realizowana jest wewnątrz populacji a tylko 4% ( $G_{ST} = 0,041$ ) przypada na zmienność

międzypopulacyjną. Jest kilka przyczyn dla których należy oczekiwać małego genetycznego zróżnicowania między populacjami drzew iglastych. Niektóre z nich to: obszerny zasięg występowania, duże zagęszczenie osobników w populacji, potencjalne zdolności do dalekiego transportu pyłku i nasion czy niekrewniaczy system rozmnażania. Mając na uwadze obraz obecnego rozprzestrzenienia modrzewia europejskiego na terenie Europy, nie wszystkie powyżej wymienione warunki, sprzyjające swobodnemu przepływowi genów między populacjami, są spełnione. Występowanie naturalnych populacji modrzewia europejskiego w formie niewielkich grup rozproszonych drzew oraz posiadanie przez ten gatunek ciężkiego pyłku powinno sprzyjać pogłębianiu zróżnicowania międzypopulacyjnego, czemu jednak zaprzeczają otrzymane wyniki. Możliwość wyjaśnienia tej sprzeczności jest kilka. Być może przepływ genów między poszczególnymi populacjami jest większy niż sądzimy. Dyakowska (1936) stwierdziła, że choć pyłek modrzewia polskiego w deszczu pyłkowym opada dwa razy szybciej niż pyłek świerka to i tak może przemieszczać się na odległość średnio 6,7 km. Natomiast Tichomirov (1950 cyt. za Kosińskim 1986) dla *L. sibirica* podaje odległości przenoszenia pyłku sięgające nawet kilkuset kilometrów. Wydaje się również wysoce prawdopodobnym, że obecnie obserwowane małe zróżnicowanie między populacjami jest odbiciem dawnego obrazu występowania gatunku w populacjach o ciągłym zasięgu i o dużym zagęszczeniu osobników. Po części przypuszczenia te potwierdzają badania paleontologiczne. W Karpatach i na ich północnym przedpolu w leśnych interstadiałach Vistulianu (późny pleistocen) występowały bory limbowo-modrzewiowe z domieszką sosny i świerka. W czasie trwania schyłkowej części późnego Vistulianu modrzew spontanicznie rozprzestrzenił się z południa, obejmując swym zasięgiem całe terytorium Polski (Srodoń 1986). Należy przypuszczać, że refugia w których modrzew przetrwał okres zlodowaceń musiały być dość rozległe, zapewniając utrzymanie wysokiego poziomu zmienności genetycznej, co po ustąpieniu lądolodu pozwoliło na szybką



rekolonizację rozległych obszarów. W późniejszym okresie aż do czasów dzisiejszych, wraz z dokonującą się zmianą klimatu, jego udział w zbiorowiskach leśnych stopniowo malał (Srodoń 1986). Można sądzić, że na zaistnienie większych różnic genetycznych między powstałymi w późniejszych okresach, izolowanymi populacjami mogło "zabraknąć czasu" ze względu na stosunkowo niską liczbę pokoleń od okresu bezpośrednio po ostatnim zlodowaceniu po dzień dzisiejszy. Natomiast pogłębianiu się tych różnic nie sprzyjała między innymi mała wsobność oraz ewentualna możliwość dalekiego transportu pyłku. Potwierdzeniem niskiej wsobności w populacjach modrzewia europejskiego jest stwierdzony w tej pracy niski poziom samozapłodnienia oraz utrzymujący się wysoki poziom polimorfizmu enzymatycznego.

Porównanie dystansów genetycznych, stwierdzonych między badanymi populacjami modrzewia europejskiego, powinno być prowadzone z ostrożnością ponieważ na ogólną wartość dystansu znaczny wpływ wywiera liczba analizowanych monomorficznych loci. W dodatku jak zaznacza Nei (1972), metoda obliczania dystansu nie jest w pełni wiarygodna dla wartości bliskich zera a wysoka wartość błędu standardowego wskazuje, że wiele dystansów nie jest statystycznie istotnie różne od zera. Na obecny obraz zróżnicowania genetycznego modrzewia europejskiego znaczny wpływ może mieć działalność człowieka. Wcześniej, bo już na początku XIX w na terenie Królestwa Polskiego, na szeroką skalę zorganizowano akcję wprowadzania modrzewia do upraw leśnych. Powstałe w ten sposób drzewostany modrzewiowe lub z udziałem modrzewia osiągnęły obecnie wiek 130 - 140 lat i o ile istnieją, są bardzo trudne do odróżnienia od drzewostanów powstałych w naturalny sposób (Barański 1970, 1974). Mimo tych zastrzeżeń, na podstawie otrzymanych wartości dystansów genetycznych, można dokonać pewnych uogólnień.

Sredni dystans genetyczny (D) wyznaczony między wszystkimi parami populacji modrzewia europejskiego dla 18 loci jest

stosunkowo niski, wynosząc 0,012, co świadczy o bardzo małych różnicach genetycznych między badanymi populacjami oraz rasami modrzewia europejskiego. Jest to w zgodzie z obserwowaną niską wartością współczynnika  $G_{ST} = 0,041$  oraz oszacowaną niską wartość minimalnych różnic w kodonie między badanymi populacjami ( $D_m = 0,007$ ). Potwierdzeniem istnienia stosunkowo słabo ugruntowanych różnic genetycznych pomiędzy poszczególnymi rasami badanego gatunku jest również stwierdzony w tej pracy brak rzadkich alleli, które byłyby charakterystyczne wyłącznie dla jednej z trzech badanych grup populacji. Szimak (1962) porównując budowę morfologiczną chromosomów, nie stwierdził żadnych różnic pod względem długości chromosomów, położeniem centromerów oraz obecności przewężeń wtórnych u osobników reprezentujących osiem różnych pochodzeń modrzewia europejskiego (od zachodnich Alp, poprzez Sudety, Karpaty, Polskę po Rumunię). Obliczona średnia wartość dystansu genetycznego między badanymi populacjami modrzewia europejskiego jest podobna do tej jaką podaje się dla innych gatunków drzew iglastych o szerokim i ciągłym zasięgu (Guries i Ledig 1982, Wheeler i Guries 1982, Yeh i inni 1986, Moran i inni 1988). Jeżeli przyrównać go do innych gatunków z rodzaju *Larix*, to jest on podobny do tego jaki stwierdzono między populacjami *L. occidentalis*, gdzie  $D = 0,009$  (Fins i Seeb 1986) lecz prawie trzykrotnie mniejszy niż u *L. laricina*, gdzie  $D = 0,032$  (Cheliak i inni 1988). Dla 11 badanych populacji modrzewia europejskiego nie stwierdzono, aby wraz ze wzrostem dystansu geograficznego wzrastał dystans genetyczny. Bliski zeru współczynnik korelacji ( $r = 0,058$ ) między dystansem geograficznym a genetycznym wskazuje, że izolacja geograficzna nie jest odpowiedzialna za aktualny obraz zróżnicowania genetycznego między populacjami badanego gatunku. Może to być dodatkowym potwierdzeniem hipotezy, że obserwowane obecnie małe zróżnicowanie między populacjami modrzewia europejskiego jest głównie odbiciem dawnego obrazu występowania gatunku w populacjach o ciągłym zasięgu i dużym zagęszczeniu osobników. Również Cheliak i inni (1988)

badając 36 populacji *Larix laricina* z niemal całego zasięgu występowania stwierdzili brak korelacji między dystansem genetycznym a geograficznym. Silną korelację między tymi dystansami stwierdzili natomiast między innymi Yeh i O'Malley (1980) u daglezi zielonej.

Dla badanych populacji modrzewia europejskiego nie stwierdzono istotnych różnic regionalnych. Wyłączając dwie populacje sudeckie Dubicko (I) i Radim-Krasow (III), można powiedzieć, że dana populacja wewnątrz regionu, średnio podobna jest do dowolnie wybranej populacji z innego regionu. Brak istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi rasami modrzewia europejskiego decyduje, w chwili obecnej, o nieprzydatności prezentowanych w pracy metod do ewentualnej identyfikacji nasion nieznanego pochodzenia.

Średni dystans genetyczny między populacjami sudeckimi a polskimi oraz alpejskimi jest od trzech do pięciu razy większy niż dystans wewnątrz populacji polskich i alpejskich. (Tab.13). Różnice te są podobne do tych, które stwierdzili Wheeler i Guries (1982) pomiędzy poszczególnymi podgatunkami *Pinus contorta*, gdzie średni dystans genetyczny między poszczególnymi podgatunkami był od dwu do pięciu razy większy niż dystans pomiędzy populacjami wewnątrz podgatunku.

Tab.13 Średni dystans genetyczny między oraz wewnątrz badanych grup populacji.

porównywane populacje:	sudeckie	alpejskie	polskie
sudeckie	0,0183	-	-
alpejskie	0,0152	0,0055	-
polskie	0,0142	0,0070	0,0038

Trzeba tu jednak zaznaczyć, że badana grupa populacji sudeckich jest bardzo niejednorodna a średni dystans genetyczny między tymi populacjami jest duży i wynosi 0,0183, to jest więcej niż średni dystans między sudeckimi a polskimi oraz alpejskimi ( $D =$  odpowiednio 0,0142 oraz 0,0152 - Tab.13).

Jeżeli z porównań wyłączyć, znacznie odbiegające od całości, dwie populacje sudeckie Dubicko (I) oraz Radim-Krasov (III), to obraz średnich dystansów genetycznych między poszczególnymi grupami populacjami przedstawia się jak w tabeli 14.

Tab.14 Średni dystans genetyczny między oraz wewnątrz badanych grup populacji (z porównań wyłączono dwie populacje sudeckie I i III).

porównywane populacje:	sudeckie	alpejskie	polskie
sudeckie	0,0044	-	-
alpejskie	0,0066	0,0055	-
polskie	0,0052	0,0070	0,0038

Jak wynika z danych zebranych w tabeli 14 różnice między poszczególnymi grupami populacji są jeszcze mniejsze, nieznacznie tylko przewyższając różnice istniejące między populacjami wewnątrz grup. Bardzo dobrze relacje te oddaje dendrogram (Ryc. 21), gdzie żadna z badanych trzech grup populacji nie tworzy odrębnej całości.

Przytoczone rezultaty pozostają w zgodzie z obserwacjami morfologicznymi, odróżnienie poszczególnych taksonów modrzewia europejskiego przysparza wiele trudności a jeżeli

do dyspozycji ma się jedynie pojedyncze drzewa - jest wręcz niemożliwe.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie małej różnicy genetycznej między modrzewiem polskim a modrzewiem sudeckim i alpejskim. W świetle przytoczonych badań, wydzielenie modrzewia polskiego jako nowego taksonu i to w randze gatunku, co miało miejsce w przeszłości, zwłaszcza w literaturze polskiej było raczej nieuzasadnione. Zbyt mała liczba badanych populacji nie pozwala na wyciągnięcie daleko idących wniosków, lecz na podstawie przeprowadzonych badań można przypuszczać, że nawet ranga podgatunku jest zbyt wysoka dla określenia statusu systematycznego modrzewia polskiego.

Wymagającym wyjaśnienia jest również fakt znacznej odmienności genetycznej dwóch populacji sudeckich Dubicko (I) i Radim-Krasov (III). W prezentowanej pracy nasiona, których używano do analiz, z poszczególnych populacji pochodziły z dużej lecz dokładnie nieznannej liczby drzew. Być może stwierdzone różnice wewnątrz grupy populacji sudeckich wynikały z tej przyczyny. Wydaje się jednak, że zaistnienia aż tak dużych różnic, nie można przypisać jedynie niejednakowej liczbie drzew analizowanych w poszczególnych populacjach. Możliwym jest natomiast, że stwierdzone tu znaczne zróżnicowanie genetyczne w grupie populacji modrzewi sudeckich jest wynikiem niejednorodnego pochodzenia tej rasy. W czasie ustępowania zlodowacenia, modrzew mógł na regiony dzisiejszego występowania modrzewia sudeckiego powracać z różnych refugium. Niejednorodne pochodzenie modrzewia sudeckiego dobrze tłumaczyłoby, obserwowany w wielu doświadczeniach proveniencyjnych (Genys 1960, Giertych 1979, Mejnartowicz i Kosiński 1986) jego szybki, lepszy niż innych pokrewnych modrzewi wzrost. W tym względzie wydaje się być celowym podjęcie szczegółowych badań nad modrzewiem sudeckim, przy użyciu nasiona zebranych z pojedynczych drzew, reprezentujących większą liczbę naturalnych populacji.

Wymagającym wyłączenia jest również fakt znaczącej odmienności w wykształceniu i doświadczeniach (np. w przypadku Radwani i Radwianki, w których w przeszłości wykonywano do analizy z powodzeniem metody, które obecnie nie są już stosowane). Być może stwierdzone różnice wewnątrz grupy populacji w niektórych wyznacznikach nie należy ze względu na to, że tak duża różnica nie została przypisana jedynie (niebadanym) liściom drzew analizowanym w poszczególnych populacjach. Kolejnym - jest natomiast stwierdzenie znacznej różnorodności genetycznej w grupie populacji w niektórych testach, testach różnorodności pochodzenia. W czasie ustępowania zlodowacenia, modrzew mógł na regiony dzisiejszego występowania modrzewia sudeckiego przynieść różnorodność genetyczną pochodzenia modrzewia sudeckiego, która została przetrwona w niektórych populacjach. Wskazuje to na to, że modrzew sudecki nie jest wynikiem kolonizacji z południa, ale raczej jest wynikiem kolonizacji z północy. W czasie ustępowania zlodowacenia, modrzew mógł na regiony dzisiejszego występowania modrzewia sudeckiego przynieść różnorodność genetyczną pochodzenia modrzewia sudeckiego, która została przetrwona w niektórych populacjach.

Wskazuje to na to, że modrzew sudecki nie jest wynikiem kolonizacji z południa, ale raczej jest wynikiem kolonizacji z północy. W czasie ustępowania zlodowacenia, modrzew mógł na regiony dzisiejszego występowania modrzewia sudeckiego przynieść różnorodność genetyczną pochodzenia modrzewia sudeckiego, która została przetrwona w niektórych populacjach. Wskazuje to na to, że modrzew sudecki nie jest wynikiem kolonizacji z południa, ale raczej jest wynikiem kolonizacji z północy. W czasie ustępowania zlodowacenia, modrzew mógł na regiony dzisiejszego występowania modrzewia sudeckiego przynieść różnorodność genetyczną pochodzenia modrzewia sudeckiego, która została przetrwona w niektórych populacjach.

## 6. STRESZCZENIE

Przedstawione w pracy badania miały na celu poznanie sposobu dziedziczenia jedenastu wybranych systemów enzymatycznych u modrzewia europejskiego, oszacowanie wielkości naturalnego samozapłodnienia oraz zbadanie poziomu oraz organizacji zmienności genetycznej w naturalnych populacjach tego gatunku.

Badania nad sposobem dziedziczenia systemów enzymatycznych wykonano na nasionach zebranych z 95 pojedynczych drzew, pięciu następujących populacjach: Babki, Ciechostowice, Mała Wieś, Skarżysko, Zwolen oraz 25 klonów rosnących w archiwum klonów na Zwierzyńcu koło Kórnik. Wielkość samozapłodnienia określono dla naturalnej populacji modrzewia polskiego z Ciechostowic. Poziom i organizację zmienności genetycznej poznano na podstawie analizy nasion pochodzących z czterech populacji modrzewia alpejskiego z Włoch, czterech populacji modrzewia sudeckiego z Czechosłowacji oraz trzech populacji modrzewia polskiego z rejonu Gór Świętokrzyskich.

Uzyskane wyniki można ująć w następujących punktach:

1. Poznano sposób dziedziczenia 11 systemów enzymatycznych. W jednym locus kodowane były: FDH, GDH, G6P, IDH, SHDH, SRDH. Dwa loci stwierdzono dla LAP oraz SOD. EST kodowana była conajmniej w trzech loci a MDH oraz MNR w czterech.
2. Segregacja poszczególnych alleli w heterozygotycznych loci, badana w próbach nasion z pojedynczych drzew, przebiegała w oczekiwanym stosunku 1:1.
3. Stwierdzono duże zróżnicowanie między poszczególnymi loci enzymatycznymi co do wielkości średniej heterozygotyczności oczekiwanej ( $H_m$ ). Cztery loci : Fdh, Mdh4, Mnr2, Sod1 były monomorficzne. Heterozygotyczność na poziomie do 10% posiadało siedem loci: Gdh, Idh, Lap1, Mdh1, Mdh2, Sod2, Srdh.  $H_m$  na poziomie od 10 do 20% posiadały Est3, Lap2, Mdh3 a od 40 do 50% Mnr4. Natomiast średnia heterozygotyczność powyżej 50% posiadały: G6p, Shdh oraz Mnr3.

4. Ustalono strukturę czwartorzędową dla pięciu białek enzymatycznych. LAP oraz SHDH są monomerami, dimerem jest MDH a multimerem GDH i SRDH.
5. Czytelne i jednoznaczne obrazy rozdziałów elektroforetycznych uzyskanych zarówno dla makrogametofitów i zarodków czynią cztery systemy enzymatyczne: GDH, MDH, SRDH oraz SHDH szczególnie cennymi markerami genetycznymi w dalszych pracach nad zmiennością genetyczną oraz systemem kojarzenia u badanego gatunku.
6. Wielkość naturalnego samozapłodnienia oszacowano na  $11,5 \pm 3\%$ . Wyliczona dla poszczególnych drzew wartość samozapłodnienia była bardzo zróżnicowana, wynosząc od 0 do 25%.
7. U modrzewia europejskiego stwierdzono wysoki poziom zmienności genetycznej, porównywalny do tego jaki obserwowano u innych gatunków drzew iglastych, dla których analizowano większą liczbę loci. Średnia heterozygotyczność oczekiwana wyliczona na podstawie analizy 18 loci wynosi 0,157. Efektywna liczba alleli w locus wynosi 1,19, natomiast średnią liczbę alleli w locus ustalono na  $1,90 \pm 0,22$  a 57% loci było polimorficzne (przyjmując za polimorficzny ten locus, dla którego częstość allelu  $100 < 0,99$ ).
8. Między populacjami stwierdzono statystycznie istotne różnice co do częstości alleli w 50% badanych loci enzymatycznych.
9. Zmienność między populacyjna stanowi tylko 4% ( $G_{ST} = 0,041$ ) całkowitej zmienności genetycznej gatunku.
10. Między badanymi grupami populacji (alpejskie, sudeckie, polskie) nie stwierdzono istotnych różnic co do wartości średniej heterozygotyczności oczekiwanej oraz efektywnej i średniej liczby alleli w locus.
11. Średni dystans genetyczny, obliczony według Nei, między badanymi populacjami jest stosunkowo niski, wynosząc 0,0118. Świadczy to o istnieniu małych różnic genetycznych pomiędzy badanymi populacjami oraz rasami modrzewia europejskiego. Nie



## 7. LITERATURA

stwierdzono korelacji pomiędzy dystansami genetycznym a geograficznym.

13. Dystans genetyczny między populacjami modrzewia polskiego a pozostałymi populacjami jest nieznaczny.

Allendorf F. W., Mitchell S., Syme W. and Franck J. 1977. Isozymy loci in brown trout (*Salmo trutta* L.). Detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 84, 179-180.

Ayala F. J., Powell J. R., Tracey M. L., Mourao C. A. and Perez-Salas S. 1971. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni*. IV. Genetic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70, 113-150.

Barański S. 1970. Występowanie i uprawy modrzewia rodzimego pochodzenia w świętokrzyskich lasach rządowych w pierwszej połowie XIX wieku. *Acta Agr. et Silv. Ser. Silv.* 10, 5-35

Barański S. 1974. Nasiennictwo lasne w świętokrzyskich lasach rządowych w pierwszej połowie XIX w ze szczególnym uwzględnieniem modrzewia. *Sylvan* 118, 3, 1-20

Bergmann F. 1973. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. II. Genetische Kontrolle von Esterase und Leucin-aminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen. *Theor. Appl. Genet.*, 43, 223-225.

Bergmann F., Gregorius H. R. 1979. Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*). In: Proc. Conf. Biochem. Genet. Forest Trees, D. Rudin (ed.), Umeå, Sweden, 99-107.

4. Ustalono strukturę czwartorzędową dla pięciu białek enzymatycznych: GDH, MDH, SRDH, SMDH i SLDH. Wykazano, że białka te są produktami genów z rodziny genów GDH i SRDH.

5. W badanej populacji stwierdzono cztery systemy enzymatyczne: GDH, MDH, SRDH oraz SMDH szczególnie cennymi markerami genetycznymi w dalszych pracach nad zmiennością genetyczną oraz systemem kojarzenia u badanego gatunku.

6. Wielkość naturalnego samozapłodnienia oszacowano na  $11,5 \pm 3\%$ . Wyliczona dla poszczególnych drzew wartość samozapłodnienia była bardzo zróżnicowana, wynosząc od 0 do 25%.

7. U modrzewia europejskiego stwierdzono wysoki poziom zmienności genetycznej, porównywalny do tego jaki obserwowano u innych gatunków drzew iglastych, dla których analizowano większą liczbę loci. Średnia heterozygotyczność oczekiwana wyliczona na podstawie analizy 18 loci wynosi 0,157. Efektywna liczba alleli w locus wynosi 1,19, natomiast średnia liczba alleli w locus ustalono na  $1,90 \pm 0,22$  a 57% loci było polimorficzne (przyjmując za polimorficzny ten locus, dla którego częstość allelu  $100 \pm 0,99$ ).

8. Między populacjami stwierdzono statystycznie istotne różnice co do częstości alleli w 50% badanych loci enzymatycznych.

9. Zmienność między populacyjna stanowi tylko 4% ( $G_{ST} = 0,041$ ) całkowitej zmienności genetycznej gatunku.

10. Między badanymi grupami populacji (alpejskie, sudeckie, polskie) nie stwierdzono istotnych różnic co do wartości średniej heterozygotyczności oczekiwanej oraz efektywnej i średniej liczby alleli w locus.

11. Średni dystans genetyczny, obliczony według Nei, między badanymi populacjami jest stosunkowo niski, wynosząc 0,0118. Świadczy to o istnieniu małych różnic genetycznych pomiędzy badanymi populacjami oraz rasami modrzewia europejskiego. Nie

## 7. LITERATURA

- Adams W. T., Joly R. J. 1980. Genetics of allozyme variants in loblolly pine. *J. Hered.* 71, 33-40
- Allendorf F. W., Mitchell N., Ryman N. and Stahl G. 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.): detection and interpretation from population data. *Hereditas*, 86, 179-180.
- Ayala F. J., Powell J. R., Tracey M. L., Mourao C. A. and Perez-Salas S. 1971. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni*. IV. Genetic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*. 70, 113-130.
- Barański S. 1970. Występowanie i uprawy modrzewia rodzimego pochodzenia w świętokrzyskich lasach rządowych w pierwszej połowie XIX wieku. *Acta Agr. et Silv. Ser. Silv.* 10, 5-38
- Barański S. 1974. Nasiennictwo leśne w świętokrzyskich lasach rządowych w pierwszej połowie XIX w ze szczególnym uwzględnieniem modrzewia. *Sylvan* 118, 3, 1-20
- Bergmann F. 1973. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung II. Genetische Kontrolle von Esterase und Leucin-aminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen. *Theor. Appl. Genet.*, 43, 222-225.
- Bergmann F., Gregorius H. R. 1979. Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*). In: *Proc. Conf. Biochem. Genet. Forest Trees*. D. Rudin (ed.), Umea, Sweden, 99-107.

- Bergmann F., Ruetz W. 1987. Identifizierung von Hybridlarchensaatgut aus Samenplantagen mit Hilfe eines Isoenzym-Markers. *Silvae Genet.*, 36, 102-105.
- Boratyński A. 1986. Systematyka i geograficzne rozmieszczenie, rozdział w Modrzewie. PWN Warszawa-Poznań, 63-108
- Boyle T. J. B. and Morgenstern E. K. 1986. Estimates of outcrossing rates in six populations of Black Spruce in central New Brunswick. *Silvae Genet.*, 35, 102-106.
- Boyle T. J. B. and Morgenstern E. K. 1987. Some aspects of the population structure of black spruce in central New Brunswick. *Silvae Genet.*, 36, 53-60.
- Brown A. D. H. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15, 1-42.
- Cheliak W. M., Morgan K., Dancik B.P., Strobeck C., Yeh F.C.H. 1984. Segregation of allozymes in megagametophytes of viable seed from a natural population of jack pine, *Pinus banksiana* Lamb. *Theor. Appl. Genet.*, 69, 145-151.
- Cheliak W. M., Pitel J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42 Petawawa National Forestry Institute.
- Cheliak W. M., Pitel J. A. 1985. Inheritance and linkage of allozymes in *Larix laricina*. *Silvae Genet.*, 34, 142-148.
- Cheliak W. M., Wang J., Pitel J. A. 1988. Population structure and genetic diversity in tamarack, *Larix laricina* (Du Roi) Koch. *Can. J. For. Res.*, 18, 1318-1324

- Conkle M. T. 1971. Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. For. Sci., 17, 190-194.
- Crow J. F., Kimura M. 1970. An introduction to population genetic theory. Harper and Row, New York.
- Dancik B. P., Yeh F. C. 1983. Allozyme variability and evolution of logepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* and jack pine (*P. banksiana*) in Alberta. Can. J. Genet. Cytol., 25, 57-64
- Dyakowska J. 1936. Research on the rapidity of the falling down of pollen of some trees. Bull. l'Acad. Polon. Sc. et Lett. 155-168
- Eckert R. T., Joly R. J., Neale D. B. 1981. Genetics of isozyme variants and linkage relationships among allozyme loci in 35 eastern white pine clones. Can. J. For. Res., 11, 573-579.
- El-Kassaby Y. A. 1981. Genetic interpretation of malate dehydrogenase isozymes in some conifer species. J. Hered., 72, 451-452.
- EL-Kassaby Y. A., Yeh F. C., Sziklai O. 1981. Estimation of the outcrossing rate of Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) using allozyme polymorphism. Silvae Genet., 30, 182-184.
- EL-Kassaby Y. A., Yeh F. C., Sziklai O. 1982. Inheritance of allozyme variants in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). Can. J. Gen. Cytol., 24, 325-335.

- El-Kassaby Y. A., Meagher M. D., Parkinson J., Portlock F. T. 1987. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. *Heredity*, 58, 173-181.
- Fins L., Seeb L. W. 1986. Genetic variation in allozymes of western larch. *Can. J. For. Res.*, 16, 1013-1018.
- Fowler D. P., Morris R. W. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Can. J. For. Res.*, 7, 343-347
- Friedman S. T., Adams W. T. 1985. Levels of outcrossing in two Lobolly Pine seed orchards. *Silvae Genet.*, 34, 157-162.
- Genys J. B. 1960. Geographic variation in european larch. New Hampshire Forestry and Recreation Commission. Bulletin no. 13 Concord, New Hampshire.
- Giertych M. 1979. Summary of results of European larch. (*Larix decidua* Mill.) height growth in the IUFRO 1944 provenance experiment. *Silvae Genet.* 29: 244-256
- Gothé H. 1952. Einige Kreuzungsversuch mit *Larix europea* D.C. Herkunft Schilitz und *Larix leptolepis* Gord. *Z. Forstgenetic Fortpflanzenzucht.* 1, 108-110.
- Guries R. P., Ledig F. T. 1978. Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity*, 40, 27-32.
- Guries R. P., Ledig F. T. 1982. Genetic diversity and population structure in Pitch Pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evol.*, 36, 387-402.

- Hamrick J. L., Linhart, Y. B., and Mitton J. B. 1979. Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetics variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10, 173-200.
- Hills D. M. 1984. Misuse and modification of Nei's genetic distance. *Syst. Zool.* 33, 238-240.
- King J. N., Dancik B. P. 1983. Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (*Picea glauca*) *Can. J. Genet. Cytol.*, 25, 430-436.
- King J. N., Dancik B. P., and Dhir N. K. 1984. Genetic structure and mating system of white spruce (*Picea glauca*) in seed production area. *Can. J. For. Res.*, 14, 639-643.
- Knowles P., Furnier G. R., Aleksiuik M and Perry D. J. (1987). Significant levels of self-fertilization in natural populations of tamarack. *Can. J. Bot.*, 65: 1087-1091.
- Kosiński G., Szmidt A. E. 1984. Isoelectric focusing of acid phosphatase and esterase from European larch (*Larix decidua*). *Arbor. Kórnickie*, 29, 73-80.
- Kosiński G. 1986. Przyczyny powstawania pustych nasion u modrzewia europejskiego (*Larix laricina* Mill.). *Arbor. Kórnickie*, 31, 107-182.
- Krzakowa M. 1982. Genetic differentiation of scots pine populations. 1. Genotypes. *Silva Fennica*, 16, 200-205.
- Kulesza W. 1927. Modrzew polski na Górze Chełmowej i w Majdowie pod Skarżyskiem. *Sylwan*, 4, 221-227.

- Langner D. 1951. Kreuzungsversuche mit *Larix europea* D. C. und *Larix leptolepis* Gord. Z. Forstgenetik Forstpflanzenzucht, 1, 2-18.
- Ledig F. T., Conkle M. T. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution*, 37, 79-85.
- Lewandowski A. and Mejnartowicz L. 1986. Isozyme polymorphism in 5 populations of larch from Poland. In: Genepool of forest woody species, its conservation and utilization. Nitra, July 1-3, 83-92.
- Lewontin R. C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York, NY.
- Linhart Y. B., Davis M. L., Mitton, J. B. 1981. Genetic control of allozymes of shikimate dehydrogenase in ponderosa pine. *Biochem. Genet.*, 19, 641- 646.
- Loveless M. D., Hamrick J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15, 65-95.
- Lundkvist K. 1977. Inheritance of esterases in needles and endosperms of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Hereditas*, 87, 27-32.
- Lundkvist K. 1979. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.). I. Estimations of genetic variations within and among populations, genetic linkage and a mating system parametr. *Hereditas*, 90, 127-143



- Mather K. 1963. The measurement of linkage in heredity. Chapter 2 : 13-25. Methuen and Co. Ltd., London.
- McComb A. L. 1955. The European larch: its races, site, requirements and characteristics. For. Sci., 1, 298-318.
- Mejnartowicz L., Bergmann F. 1975. Genetic studies on European larch (*Larix decidua* Mill.) employing isoenzyme polymorphism. Genet. Polon., 16, 29-35.
- Mejnartowicz L. 1976. Genetic investigations on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) populations. Arbor. Kórnickie, 21, 124-187.
- Mejnartowicz L., Bergmann F. 1984. Genetic differentiation among Scots pine populations from the lowlands and the mountains in Poland. In: Lectures notes in biomathematics. Population genetics in forestry. Proc. of the Meeting of the IUFRO working party. "Ecological and population genetics", Gottingen, August 21-24, 1984, 253-266.
- Mejnartowicz L., Kosiński G. 1986. Genetyka, rozdział w Modrzewie. PWN Warszawa-Poznań, 441-495.
- Millar C. 1983. A steep cline in *Pinus muricata*. Evol., 37, 311-319.
- Millar C. I. 1985. Inheritance of allozyme variants in bishop pine (*Pinus muricata* D. Don). Biochem. Genet., 23, 933-946.
- Millar C. I., Strauss S. H., Conkle M. T., and Westfall R. D. 1988. Allozyme differentiation and biosystematics of the Californian closed-cone Pines (*Pinus subsect. Oocarpae*). Syst. Bot., 13, 351-370.

- Mitton J. B., Linhart Y. B., Hamrick J. L., and J. S. Beckman. 1977. Observation on the genetic structure and mating system of ponderosa pine in the Colorado Front range. *Theoret. Appl. Genet.* 51, 5-13.
- Moran G. F., Bell J. C., Matheson A. C. 1980. The genetic structure and levels of inbreeding in a *Pinus radiata* D. Don seed orchard. *Silvae Genet.*, 29, 190-193.
- Moran G. F., Bell J. C., Eldridge K. G. 1988. The genetic structure and the conservation of the five natural populations of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.*, 18, 506-514.
- Mueller L. D., Ayala F. J. 1982. Estimation and interpretation of genetic distance in empirical studies. *Genet. Res.* 40, 127-137.
- Muller G. 1976. A simple method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. *Silvae Genet.*, 25, 15-17.
- Muona O., Yazdani R., Lundqvist G. 1987. Analysis of linkage in *Picea abies*. *Hereditas*, 106. 31-36.
- Muona O. 1989. Population genetics in forest tree improvement. In: A. H. D. Brown - M. T. Clegg - A. L. Kahler - B. S. Weir (eds.): *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Assoc. Sunderland, Mass., 285-301.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106, 283-292
- Nei M. 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland Publ., Amsterdam-Oxford.

- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nei M., Tajima F. and Tateno Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Molec. Evol.* 19: 153-170.
- Nicolić D., Bergmann F. 1974. Genetic variation of leucine aminopeptidase isoenzyme in seeds of *Pinus nigra* Arn.. *Genetica*, 6, 361-365.
- Nicolić D., Tucić N. 1983. Isoenzyme variation within and among populations of european black pine (*Pinus nigra* Arnold). *Silvae Genet.*, 32, 80-89.
- Oktaba W. 1966. Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa. PWN Warszawa.
- O'Malley D. M., Allendorf F. W., Blake G. M. 1979. Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa*. *Biochem. Genet.*, 17, 233-250.
- Perry D. J., Dancik B. P. 1986. Mating system dynamics of Lodgepole Pine in Alberta, Canada. *Silvae Genet.*, 35, 190-195.
- 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.
- Ridgeway G. J., Sherburne S. W., Lewis R. D. 1970. Polymorphism in the esterases of Atlantic herring. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99, 147-151.

- Ross H. A., Hawkins J. L. 1986. Genetic variation among local populations of jack pine (*Pinus banksiana*). Can. J. Genet. Cytol., 28, 453-458.
- Rubner K. 1952. Verbreitung und Rassen der Larche. Allg. Forstzeitschr., 7, 329-331.
- Rudin D. 1977. Leucine-amino-peptidases (LAP) from needles and macrogametophytes of *Pinus sylvestris*. Hereditas, 85, 219-226.
- Rudin D., Ekberg I. 1982. Genetic structure of open-pollinated progenies from a seed orchard of *Pinus sylvestris*. Silva Fennica, 16, 87-93.
- Rudin D., Muona O., Yazdani R. 1986. Comparison of the mating system of *Pinus sylvestris* in natural stands and seed orchards. Hereditas, 104, 15-19.
- Sattler P. W., Hilburn L. R. 1985. A program for calculating genetic distance, and its use in determining significant differences in genetic similarity between two groups of populations. J. Hered. 76, 400
- Schiller G., Conkle M. T., Grunwald C. 1986. Local differentiation among Mediterranean populations of Aleppo pine in their isoenzymes. Silvae Genet., 35, 11-19.
- Siciliano M. J., Shaw C. R. 1976. Separation and visualization of enzymes on gels. Chromatographic and electrophoretic techniques. Heinemann, London, 185-209.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco. W. H. Freeman and Co.

- Strauss S. H., Conkle M. T. 1986. Segregation, linkage and diversity of allozymes in knobcone pine. *Theor. Appl. Genet.*, 72, 483-493.
- Szimak M. 1962. Karyotype analysis of *Larix decidua* Mill. from different provenances. *Medd. Stat. Skogsforskningsinst.*, 51, 1-22.
- Szmidt A. E., Yazdani, R. 1984. Electrophoretic studies of genetic polymorphism of shikimate and 6-phosphogluconate dehydrogenases in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Arbor. Kórnickie*, 29, 63-72.
- Srodoń A. 1986. Modrzew w czwartorzędzie Polski na tle zarysu historii jego występowania w Europie, rozdział w *Modrzewie*. PWN Warszawa-Poznań, 11-61
- Tigerstedt P. M. A. 1973. Studies on isosyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas*, 75, 47-60.
- Tsay R. C., Taylor I. E. P. 1978. Isoenzyme complexes as indicators of genetic diversity in white spruce. *Picea glauca*, in southern Ontario and the Yukon Territory. Formic, glutamic and lactic dehydrogenases, and cationic peroxidases. *Can. J. Bot.*, 56, 80-90.
- Wheeler N. C., Guries R. P. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.*, 12, 595-606.
- Woods J. H., Blake G. M., Allendorf F. W. 1983. Amount and distribution of isozyme variation in Ponderosa pine from eastern Montana. *Silvae Genet.*, 32, 151-156.

- Yeh F., El-Kassaby Y. 1980. Enzyme variation in natural populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). 1. Genetic variation patterns among trees from 10 IUFRO provenances. Can. J. For. Res., 10, 415-422.
- Yeh F. Ch., O'Malley D. O. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. Silvae Genet., 29, 83-92.
- Yeh F. C., Khalil M. A K., El-Kassaby Y. A., Trust D. C. 1986- Allozyme variation in *Picea mariana* from Newfoundland: genetic diversity, population structure, and analysis of differentiation. Can. J. For. Res., 16, 713-720.
- Yeh F. C. H. 1988. Isozyme analysis for revealing population structure for use in breeding strategies. International Union of Forest Research Organization-Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry, Nov 3-Dec 28, 1988, Pattaya, Thailand.
- Schillinger, J. P. 1988. Genetic diversity of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1989. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1990. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1991. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1992. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1993. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1994. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1995. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1996. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1997. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1998. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 1999. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2000. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2001. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2002. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2003. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2004. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2005. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2006. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2007. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2008. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2009. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2010. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2011. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2012. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2013. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2014. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2015. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2016. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2017. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2018. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2019. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2020. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2021. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2022. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2023. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2024. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.
- Yeh F. C. H. 2025. Genetic diversity and population structure of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) in the Pacific Northwest. Ph.D. Thesis, Oregon State University.

24904

Biblioteka Instytutu  
Dendrologii - Kórnik

VIII 198