

GDK 181.45 : 165.3 + 176.1 *Fagus sylvatica* (L.) (497.12)

VPLIV ONESNAŽEVANJA OZRAČJA NA GENETSKO STRUKTURO BUKOVIH POPULACIJ V SLOVENIJI

Robert BRUS*

Izvleček

Raziskava je zajela osemnajst populacij bukke (*Fagus sylvatica* L.), dvanajst iz relativno čistih in šest iz onesnaženih naravnih gozdnih sestojev. Šest populacij, od tega tri čiste in tri onesnažene, je bilo mladih. Analizirali smo naslednjih dvanajst izoencimskih lokusov: GOT-B, IDH-A, LAP-A, MDH-A, MDH-B, MDH-C, MNR, PX-A, PX-B, PGM, PGI-B in SKDH. Na lokusih LAP-A in IDH-A smo odkrili značilne razlike med alelnimi frekvencami skupine čistih in skupine onesnaženih populacij. Genetske distance med starševsko populacijo in njenim potomstvom so na onesnaženi ploskvi v vseh primerih večje kot na čisti. Onesnaževanje je najverjetneje povzročilo bistveno spremembo alelnih frekvenc, kar se kaže tudi v dejstvu, da so genetske distance največje, kadar primerjamo onesnažene populacije s čistimi ali kadar primerjamo onesnažene populacije med seboj. Nekatera dejstva nakazujejo selekcijo proti določenim alelom, toda nedvoumni dokazov selekcije raziskava ni odkrila.

Ključne besede: bukev, onesnaževanje ozračja, izoencimi, genetska struktura, genetska variabilnost, genetska raznolikost, genetska diferenciacija

THE EFFECT OF AIR POLLUTION ON GENETIC STRUCTURE OF BEECH POPULATIONS IN SLOVENIA

Abstract

Eighteen European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations, twelve of which are relatively undamaged and six severely damaged, were analyzed. Six populations were young; three of them polluted and three unpolluted. The following twelve isozyme loci were used: GOT-B, IDH-A, LAP-A, MDH-A, MDH-B, MDH-C, MNR, PX-A, PX-B, PGM, PGI-B and SKDH. Significant differences of allelic frequencies between the groups of polluted and unpolluted populations on loci LAP-A and IDH-A were determined. The genetic distances between the old population and its progeny are, in all cases, higher on polluted sites than on unpolluted ones. It is very likely that pollution has caused a substantial change in allelic frequencies, which is also indicated by greater genetic distances between polluted and unpolluted populations as well as between polluted populations only. There are some indications that selection against some alleles is present, but this was not unambiguously confirmed in the study.

Key words: European beech, air pollution, genetic structure, isozymes, genetic variability, genetic diversity, genetic differentiation

* mag., dipl. inž. gozd., asistent, Biotehniška fakulteta, oddelek za gozdarstvo, Večna pot 83, 1000 Ljubljana, SLO

VSEBINA

1	UVOD	69
2	NAMEN DELA IN CILJI	70
3	RAZISKOVALNI OBJEKTI.....	70
3.1	Osnovne raziskovalne ploskve.....	71
3.2	Dopolnilne raziskovalne ploskve	74
4	PREGLED RAZISKAV	76
5	RAZISKOVALNE METODE	77
6	KVANTIFIKACIJA RAZLIK V OBREMENJENOSTI MED PLOSKVAMI	79
7	REZULTATI IN RAZPRAVA	81
7.1	Genetska variabilnost encimskih sistemov.....	81
7.2	Genetska raznolikost.....	88
7.3	Genetska diferenciacija	90
8	POVZETEK	96
	SUMMARY	98
	VIRI.....	100

1 UVOD

Propadanje gozdov v Evropi nikakor ni pojav izključno zadnjih desetletij, saj so o sušenju in hiranju jelke poročali že v 16. stoletju (LARSEN 1986). Pri nas so o pojavu v začetku tega stoletja pisali na Idrijskem (KORDIŠ 1993), leta 1926 je v Mežiški dolini oškodovani kmet Jakob Mlinar sprožil kasneje uspešen odškodninski postopek (ŠOLAR in sod. 1986). V šestdesetih letih so podobno kot gozdarji po vsej Evropi tudi slovenski gozdarji začeli snovati sistematično spremljanje poškodovanosti gozdov zaradi onesnaževanja ozračja. Leta 1976 je Inštitut za gozdno in lesno gospodarstvo Slovenije objavil prve rezultate o površini in stopnji klasično imisijsko poškodovanih gozdov v Sloveniji (PROPADANJE GOZDOV V SLOVENIJI 1985). Površina poškodovanih gozdov je v letih 1983 do 1985 dramatično narasla, že dolgo prisotnemu sušenju jelke in klasičnemu propadanju gozdov v neposredni okolici emisijskih žarišč se je pridružilo še slabšanje zdravstvenega stanja gozdov v sestojih daleč od znanih virov onesnaževanja ozračja. V inventuri zdravstvenega stanja slovenskih gozdov leta 1985 (ŠOLAR in sod. 1986), ko je bilo v splošnem stanje najslabše, so vidne znake propadanja opazili na 55% od skoraj 25.000 vzorčno pregledanih dreves. Analize zdravstvenega stanja gozdov v Sloveniji v naslednjih letih so sicer vse po vrsti pokazale rahlo izboljšanje stanja, toda tudi dolgoročno problem še vedno ostaja eden najresnejših v gozdarstvu.

Pri nas in v Evropi so predvsem v zadnjih 15 letih opravili veliko raziskav, v katerih z različnih perspektiv obravnavajo vplive onesnaževanja ozračja na gozd. V nekaterih evropskih deželah so bile pogoste tudi raziskave s področja populacijske genetike. Najbolje proučeni drevesni vrsti sta rdeči bor in navadna jelka, precej raziskav obravnava smreko in nekaj manj tudi bukev. V Sloveniji so bile genetske raziskave, kolikor jih je bilo, usmerjene samo v citogenetsko indikacijo in v ugotavljanje poškodovanosti genskega materiala smreke, s populacijskogenetskimi posledicami onesnaževanja pa se pri nas doslej niso ukvarjali. Čeprav je bukev pri nas v primerjavi z jelko, smreko in drugimi iglavci velikopovršinsko manj prizadeta, se predvsem v bližini močnih emisijskih centrov tudi pri njej pojavlja resna poškodovanost. Ker je bukev pri nas gospodarsko zelo pomembna in hkrati najpogostejša drevesna vrsta, smo se odločili populacijskogenetske posledice onesnaževanja ozračja preučiti prav na njenem primeru. Raziskave smo izvajali v letih 1992-1995 kot del raziskovalne

naloge Populacijskogenetski premiki v ogroženih gozdovih, ki je potekala v okviru projekta Stabilnost mnogonamenskega gozda v stresnih razmerah.

2 NAMEN DELA IN CILJI

Osnovni cilj raziskave je bil proučiti genetsko strukturo bukovih populacij v nekaterih imisijsko najbolj obremenjenih območjih v Sloveniji in ugotoviti vpliv onesnaževanja nanje. S tem namenom smo ugotavljali, kakšna je genetska variabilnost encimskih sistemov in v kolikšni meri so razlike v frekvencah alelov posledica onesnaževanja ozračja. S primerjanjem frekvenc alelov smo poskušali ugotoviti, ali onesnaževanje zraka deluje selektivno na izoencime. Naslednji cilj je bil ugotoviti genetsko raznolikost v onesnaženih in čistih populacijah ter pokazati morebiten vpliv emisij na različne kazalce genetske raznolikosti. Preučili smo tudi genetsko diferenciacijo in na njeni osnovi stopnjo spremenjenosti onesnaženih starševskih in hčerinskih bukovih populacij.

Ker je to prva raziskava v Sloveniji, ki s pomočjo izoencimskih genskih markerjev proučuje neko gozdno drevesno vrsto, je cilj naloge tudi kratko predstaviti začetke in razvoj uporabe omenjene metode pri proučevanju gozdnih drevesnih vrst drugje po svetu.

3 RAZISKOVALNI OBJEKTI

Raziskovalni objekti so bili odrasli bukovi sestoji. V osnovni del poskusa smo vključili pare poskusnih ploskev; v vsakem paru sta bili po ena močno onesnažena in ena manj onesnažena, pogojno rečeno, čista ploskev.

Kriteriji za izbiro ploskev v osnovnem delu poskusa so bili:

- Približna velikost ploskve od 2 do 3 ha; vsa drevesa s ploskve, ki smo jih izbrali v vzorec, smo označili.
- V vsakem paru sta ploskvi, od katerih je ena pod močnim, druga pa pod kolikor mogoče šibkim oziroma vsaj občutno manj močnim imisijskim vplivom. Stresni faktor, prisoten na vseh močno onesnaženih ploskvah, je bil SO₂, medtem ko prisotnosti fotooksidantov in nitratov nismo podrobneje obravnavali, čeprav je jasno, da se pojavljajo vsaj na nekaterih ploskvah.

- Rastiščne razmere znotraj ploskve morajo biti čimbolj homogene.
- Primerjalni ploskvi v paru geografsko ne smeta biti preveč oddaljeni, ležati morata v istem višinskem pasu in na podobni ekspoziciji, poraščati ju morata enaki ali vsaj podobni rastlinski združbi. Tako smo izločili nekatere faktorje, ki bi lahko bili tudi vzrok genetskim razlikam med populacijami na ploskvah.
- Na vsaki ploskvi mora biti prisotno naravno bukovo mladje.

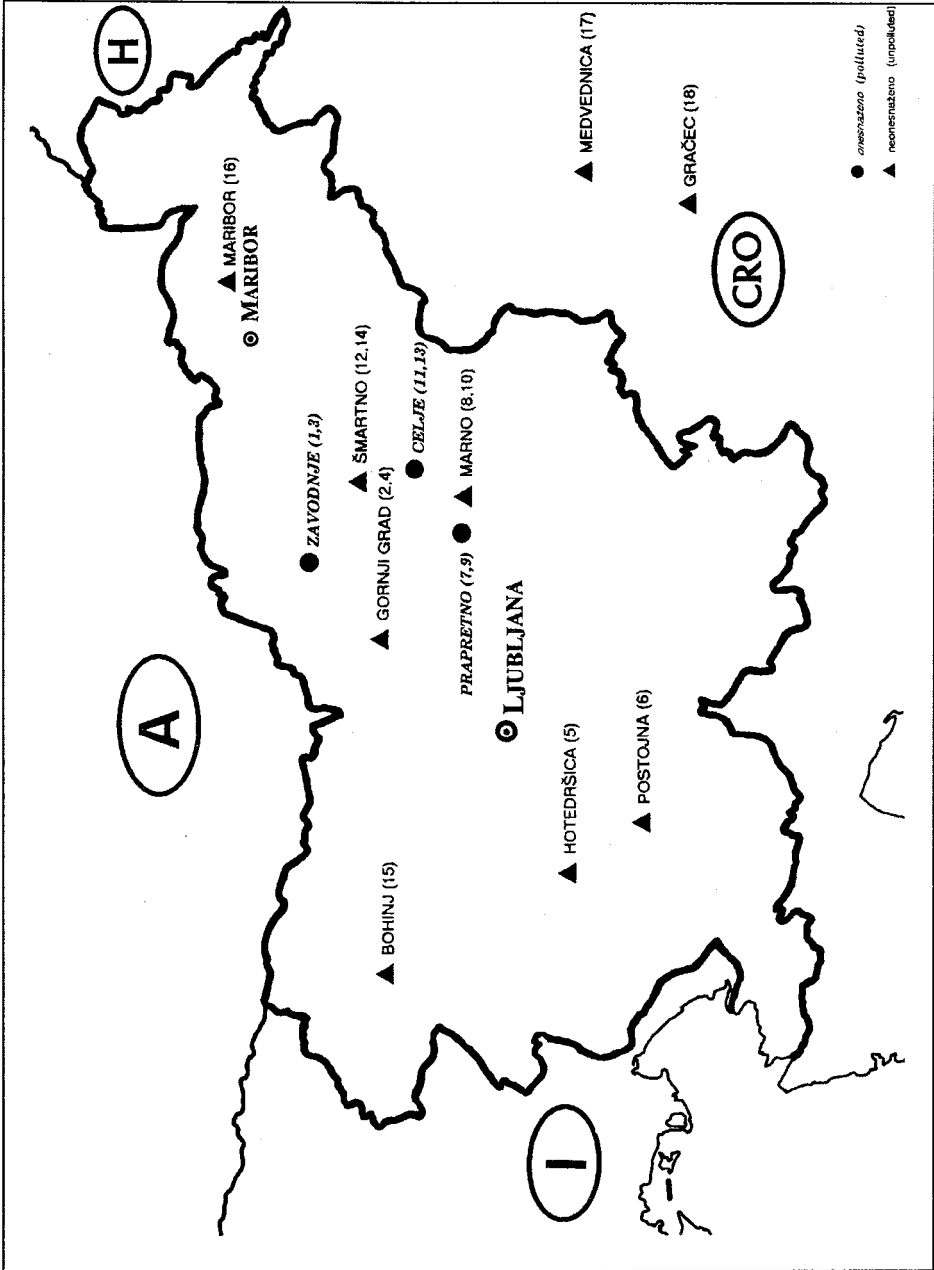
Vsem kriterijem so ustrezali trije pari ploskev. Prvi par sta predstavljali raziskovalni ploskvi Zavodnje (populaciji 1, 3) in Gornji Grad (populaciji 2, 4), drugi par ploskvi Prapretno (populaciji 7, 9) in Marno (populaciji 8, 10), tretji par pa ploskvi Celje (populaciji 11, 13) in Šmartno v Rožni dolini (populaciji 12, 14) - slika 1.

Razen osnovnih šestih ploskev iz treh parov, na katerih smo analizirali tako odrasel sestoj kot tudi mladje, smo v poskus dodatno vključili še šest ploskev iz relativno neobremenjenih območij. Na dodatnih šestih ploskvah smo analizirali samo odrasle sestoje.

3.1 Osnovne raziskovalne ploskve

Onesnažena ploskev Zavodnje leži v vplivnem območju termoelektrarne Šoštanj, ki je objekt z največjo emisijo škodljivih snovi v Sloveniji. Količina emitiranega žveplovega dioksida (SO_2) leta 1993 je bila 104.222 ton, kar predstavlja kar 57% slovenske emisije žvepla (ONESNAŽENOST ZRAKA V SLOVENIJI V LETU 1993, 1994). Ploskev leži v nadmorski višini 750-820 metrov na južnem pobočju Petrovega vrha neposredno nad Zavodnjami. Od vira onesnaževanja je oddaljena 7 km zračne črte. Smrekovi gozdovi na tem območju so močno poškodovani (KOLAR 1989), vidno poškodovana je tudi bukev. K močni ogroženosti gozdov verjetno prispevajo specifične reliefne razmere (LEŠNJAK in sod. 1989), zaradi katerih predvsem med zimskimi inverzijami prihaja do močnih poškodb, t.i. ožigov dreves. Ti gozdovi so precej bolj ogroženi kot gozdovi bližji viru onesnaževanja. Matična podlaga je tonalit, rastlinska združba *Quercus Luzulo-Fagetum*. V sestoji je okrog 70% bukve, posamezno so primešani smreka, rdeči bor in kostanj. V zeliščni plasti je prisotno veliko borovnice. Bukovo mladje je redko, vendar enakomerno porazdeljeno po vsej ploskvi.

Slika 1: Geografski položaj obravnavanih populacij v Sloveniji
 Picture 1: Geographic position of the populations analysed in Slovenia



Manj onesnažena ploskev Gornji Grad je od termoelektrarne Šoštanj oddaljena 22 km zračne črte in ni pod njenim neposrednim vplivom. Leži severozahodno od naselja Gornji Grad nad dolino Kanolščice na zgornjem delu pobočja na nadmorski višini 650-700 metrov. Lega ploskve je jugozahodna. Matična podlaga je silikat, tla srednje globoka do plitva, združba Quercus Luzulo-Fagetum. Sestoj na ploskvi je skoraj čist bukov, primešano je le nekaj odstotkov smreke. Bukovo mladje je redko in prisotno po vsej ploskvi.

Onesnažena ploskev Prapretno leži v neposredni bližini termoelektrarne Trbovlje, ki je leta 1993 emitirala 23.380 ton SO₂ (ONESNAŽENOST ZRAKA V SLOVENIJI V LETU 1993, 1994). Emisija SO₂ iz TE I in TE II je pred sanacijo leta 1976, ko so zgradili 360 metrov visok dimnik, presejala 200 ton/dan. Višina dimnikov 100 m in 80 m ni zadoščala, da bi se dimni plini širili nad inverzijsko plast, zato so se v dolini pojavljale izredno visoke koncentracije. TET II so leta 1976 sanirali z izgradnjo 360 metrov visokega dimnika. Emisija se sicer ni zmanjšala, pomembno pa je, da novi dimnik odvaja dimne pline nad lokalno inverzijsko plast. Kadar je delovala samo TET II, se je poprečna koncentracija SO₂ po sanaciji v Prapretnem znižala kar za 90% (PARADIŽ in sod. 1981), toda kljub temu je zaradi občasnega obratovanja TET I in drugih virov onesnaževanja tudi pozneje občasno dosegala vrednosti, ki so precej presegle zgornjo dovoljeno mejo. Za našo raziskavo je predvsem pomembno onesnaževanje pred sanacijo, saj so bili analizirani mladi osebki stari vsaj 20 let in torej izvirajo iz obdobja najhujših emisij. Ploskev leži na nadmorski višini 450-490 metrov na blagem zgornjem pobočju s severno do severozahodno lego tik pod vrhom hriba Visoko (494 m) v oddaljenosti 800 m od kraja Prapretno in 1 km od TET. Meji neposredno na prostor na robu planote, kjer je bil gozd najbolj prizadet, kjer je večina odraslih dreves propadla in kjer v obdobju pred sanacijo ni bilo nikakršnega pomlajevanja. Matična podlaga je dolomit. Površje je večinoma gladko, globina tal srednja, rastišče je Hacquetio-Fagetum. Od drevesnih vrst je prisotna edino bukev, ki se slabo pomlajuje.

Manj onesnažena ploskev Marno je od termoelektrarne Trbovlje je oddaljena 7,5 km zračne črte. Do sanacije TET II lokacija ni bila prizadeta zaradi emisij, saj leži v zaščiteni legi, po letu 1976 pa je podobno kot v Rimskih toplicah tudi v Marnem mogoče zaznati občasno povečanje koncentracij SO₂, kar lahko verjetno večinoma pripišemo raznosu dimnih plinov iz povišanega dimnika daleč naokrog (PARADIŽ in sod. 1981). Kljub temu je ploskev bistveno manj

onesnažena kot je bila ploskev Prapretno pred izgradnjo novega dimnika. Koncentracije SO₂ v Marnem ne dosejajo vrednosti, ki bi škodljivo vplivale na vegetacijo. Ploskev leži desno nad cesto Hrastnik-Rimske Toplice na nadmorski višini 400-440 metrov na srednjem pobočju s severno lego. Matična podlaga so peščenjaki z glino. Površina je valovita, tla globoka, rastišče Querco-Fagetum. V sestoji je 95% bukve ter 5% smreke in drugih listavcev. Bukev se izredno dobro pomlajuje.

Onesnažena ploskev Celje leži v neposredni bližini Celja, kjer je bilo leta 1978 skupaj emitirano 5.000-6.000 ton SO₂ (PLANINŠEK in sod. 1981). Daleč največji onesnaževalec zraka v Celju je Cinkarna, ki je kljub zmanjšanju emisij v 70-ih in 80-ih letih leta 1993 še vedno emitirala 700 ton SO₂. Zaradi značilno neugodnih geografskih in meteoroloških razmer v celjski kotlini onesnaženost zraka še vedno pogosto presega dovoljene meje. Ploskev leži pri zaselku Vrhe pri Teharjah, 2,3 km zračne črte zahodno od Cinkarne. Nadmorska višina je 290-320 metrov. Leži na spodnjem pobočju, relief je valovit in gladek, lega severozahodna. Tla so kisljaka in srednje globoka, združba je Querco-Luzulo Fagetum. Sestoj na ploskvi je skoraj čist bukov, bukovno mladje je redko, a prisotno po vsej površini.

Manj onesnažena ploskev Šmartno leži blizu zaselka Rupe pri Šmartnem v Rožni dolini na nadmorski višini 420-480 metrov. Od vira onesnaževanja oziroma od Cinkarne Celje je oddaljena 10 km zračne črte in leži na zaščitenem mestu, tako da je neposredni vpliv onesnaževanja na njej kar najmanjši. Po drugi strani je na ploskvi morda prisoten vsaj občasen manjši negativen vpliv daljinskega transporta. Ploskev leži na srednjem pobočju, lega je jugozahodna, tla kisljaka in srednje globoka, teren valovit in gladek. Združba je Querco-Luzulo Fagetum. Po vsej ploskvi je prisotno bujno bukovno mladje.

3.2 Dopolnilne raziskovalne ploskve

Razen osnovnih šestih ploskev, od katerih sta bili v vsakem primerjalnem paru po ena onesnažena in ena manj onesnažena in na katerih smo analizirali po dve populaciji, staro in mlado, smo poskus dopolnili še s populacijami s šestih ploskev, štirih iz Slovenije in dveh s Hrvaške. Vse dopolnilne ploskve smo izbrali na območjih, ki so dovolj oddaljena od virov onesnaževanja in so v zaščitenih

legah. Na drevesih v sestojih na teh ploskvah nismo opazili vidnih znakov poškodovanosti, zato smo populacije, kadar smo jih vključevali v analizo, obravnavali kot neonesnažene oziroma manj onesnažene. Na vsaki ploskvi smo analizirali samo odrasel sestoj. Namen vključitve dopolnilnih ploskev v poskus je bil primerjava populacij z osnovnih šestih ploskev, ki vse ležijo na geografsko relativno majhnem prostoru, z neonesnaženimi populacijami s širšega geografskega prostora.

Ploskev Hotedršica leži na hribu Babne laze kilometer zahodno od naselja Hotedršica pri Logatcu. Nadmorska višina je 550-600 metrov, lega ploskve je južna do vzhodna. Matična podlaga je apnenec, med drevesnimi vrstami prevladuje bukev z deležem 90%. Preostali vrsti sta smreka in gorski javor. Prevladujoča gozdna združba je Hacquetio-Fagetum.

Ploskev Postojna leži na verigi Javornikov na jugozahodnem pobočju Volčjega vrha pri Postojni na nadmorski višini 800-900 metrov. Matična podlaga je kredni apnenec, gozdna združba je Abieti-Fagetum dinaricum clematidetosum. Med drevesnimi vrstami prevladuje bukev, primešani so črni gaber, mali jesen in mokovec.

Ploskev Bohinj leži v Ukancu zahodno od Bohinjskega jezera na nadmorski višini 527-610 metrov. Matična podlaga je karbonatna morena, teren je valovit in ima severo-severovzhodno lego. Združba na ploskvi je Anemone-Fagetum. Od drevesnih vrst je na ploskvi smreka zastopana s 64%, bukev s 35%, preostalo pa so javorji, jeseni, črni gabri in trepetlike.

Ploskev Maribor leži nad bolnišnico Hrastovec pri Lenartu v Slovenskih Goricah na jugovzhodnem pobočju na nadmorski višini 240-260 metrov. Teren je gladek, rastišče je Querco-Fagetum. Na ploskvi je 75% bukve, 10% smreke, 8% hrasta, preostalo so drugi listavci.

Ploskev Medvednica leži na Hrvaškem, 12 km severovzhodno od Zagreba na Markuševački gori na obronkih Medvednice. Nadmorska višina je 300 metrov, ekspozicija jugovzhodna. Matična podlaga so skrilavci, tla pa so lesivirana distrična rjava tla.

Ploskev Gračec leži prav tako na Hrvaškem, 7 km vzhodno od kraja Bratina pri Jastrebarskem ob vznožju Vukomeričkih gor. Nadmorska višina ploskve je 190 metrov, ekspozicija jugozahodna. Tip tal je psevdoglej.

Preglednica 1: Osnovni podatki o obravnavanih populacijah
Table 1: General characteristics of the populations analyzed

Številka Number	Lokacija Location	Starost Age	Stanje onesnaženosti Pollution status
01	Zavodnje	staro, <i>old</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
02	Gornji Grad	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
03	Zavodnje	mlado, <i>young</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
04	Gornji Grad	mlado, <i>young</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
05	Hotedršica	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
06	Postojna	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
07	Prapretno	staro, <i>old</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
08	Marno	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
09	Prapretno	mlado, <i>young</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
10	Marno	mlado, <i>young</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
11	Celje	staro, <i>old</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
12	Šmartno	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
13	Celje	mlado, <i>young</i>	onesnaženo, <i>polluted</i>
14	Šmartno	mlado, <i>young</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
15	Bohinj	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
16	Maribor	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
17	Medvednica (HR)	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>
18	Gračec (HR)	staro, <i>old</i>	neonesnaženo, <i>unpolluted</i>

Pred nadaljevanjem bi rad opozoril, da ploskve iz osnovnih parov (Gornji Grad, Marno, Šmartno) verjetno niso povsem neobremenjene, saj je danes kjerkoli težko govoriti o čistih ploskvah; primernejši izraz zanje je manj onesnažene. Kljub temu bom v nadaljevanju najpogosteje uporabljal izraza čisto in onesnaženo, razlog za to pa sta izključno večja preglednost in jasnost primerjav.

4 PREGLED RAZISKAV

Prvi poskusi proučevanja beljakovin s pomočjo elektroforetske mobilnosti skozi polporozen medij segajo v obdobje pred II. svetovno vojno. Pri proučevanju gozdnih drevesnih vrst so pred letom 1970 tehniko elektroforeze uporabljali v glavnem za analizo beljakovin in encimov iz semen in peloda (FERET, BERGMANN 1976), v nekaterih raziskavah s pomočjo encimske aktivnosti pa so

poskušali razložiti geografsko pogojeno genetsko variabilnost. BARTELS (1964) je pri analizi encimske aktivnosti embrijev in ženskih gametofitov različnih provenienc smreke odkril klinalno variabilnost. Provenience z večjih nadmorskih višin so imele večjo encimsko aktivnost kot provenience z nižjih.

Po letu 1970 se je pojavilo precej raziskav, ki so obravnavale genetsko kontrolo izoencimov. BARTELS (1971) in BERGMANN (1971, 1973) sta izolirala genske markerje pri smreki in odkrila več genskih lokusov, ki so kontrolirali izoencimske genotipe esteraze in levcin aminopeptidaze. Našla sta variabilnost znotraj in med populacijami smreke in pokazala možnost genetske potrditve izvora semena.

Izoencimska analiza je v zadnjih dvajsetih letih postala najpogosteje uporabljena tehnika pri genetskih analizah populacij gozdnega drevja, uporabljali so jo tudi za ugotavljanje vpliva onesnaževanja ozračja na genetsko strukturo populacij različnih vrst gozdnega drevja. Že od konca 70-ih let ugotavljajo, da je različna občutljivost dreves na stresne razmere tudi genetsko pogojena in ne le posledica različnih rastnih razmer (MEJNARTOWICZ in sod. 1978, MÜLLER-STARCK 1985, GEBUREK in sod. 1986, itd.). Na onesnaževanje občutljivi osebki se genetsko razlikujejo od odpornih in več raziskav je pokazalo, da onesnaževanje ozračja s svojim delovanjem lahko spremeni genetsko strukturo populacije gozdnega drevja (MEJNARTOWICZ 1983, BERGMANN, SCHOLZ 1985, GREGORIUS in sod. 1985, YAZDANI in sod. 1985, BERGMANN, SCHOLZ 1987, MEJNARTOWICZ, PALOWSKI 1989). Tako po splošnih populacijskogenetskih značilnostih kot po vplivu onesnaževanja na genetsko strukturo populacije so v Evropi najbolj proučene drevesne vrste rdeči bor, navadna jelka, smreka in v nekaj manjši meri tudi bukev.

5 RAZISKOVALNE METODE

Na vsaki ploskvi, velikosti od 2 do 3 ha, smo naključno izbrali od 50 do 70 odraslih bukovih dreves iz zgornjega sloja. Z vsakega drevesa smo kot vzorec pozimi nabrali vejice, s katerih smo za analizo uporabili 5-9 dormantnih popkov in manjše količine skorje. Da bi se čimbolj izognili sorodnosti osebkov v vzorcu, so bila izbrana drevesa vedno vsaj 15 metrov vsaksebi. Naključno smo izbirali tudi vzorce iz populacij mladja na vseh šestih osnovnih ploskvah. Razen

dormantnih popkov smo na vsaki od šestih osnovnih ploskev nabrali tudi talne vzorce za analizo vsebnosti žveplovega dioksida v tleh. Na vsaki ploskvi smo na devetih naključno izbranih mestih nabrali vzorce organskega O₁ horizonta.

Osnova za popis poškodovanosti dreves na poskusnih ploskvah so bila Navodila za izvedbo popisa poškodovanosti gozdov in stanja lesnih zalog v Sloveniji iz junija 1991, ki jih je izdal Inštitut za gozdno in lesno gospodarstvo Slovenije. Metodo popisa smo prilagodili svojim potrebam.

Bistvo raziskave je bilo ugotavljanje genetske strukture populacij z izoencimsko analizo. Genotip vsakega osebka za več genskih lokusov smo ugotavljali s horizontalno elektroforezo na škrobnem gelu. Analizirali smo 12 lokusov, ki kontrolirajo naslednje izoencime (preglednica 2): dve peroksidazi (PX-A in PX-B), levcin aminopeptidazo (LAP-A), glutamat oksalacetat transaminazo (GOT-B), menadion reduktazo (MNR), izocitrat dehidrogenazo (IDH-A), tri malat dehidrogenaze (MDH-A, MDH-B, MDH-C), fosfogluukoza izomerazo (PGI-B), fosfoglukomutazo (PGM) in šikimat dehidrogenazo (SKDH). Za vsak osebek posebej smo ugotavljali relativno frekvenco alelov po lokusih. Laboratorijski del, torej elektroforezo in odčitavanje elektroforegramov, smo izvedli v laboratoriju Gozdarske fakultete Tehniške univerze v Zvolnu na Slovaškem v okviru mojega študijskega izpopolnjevanja. Pri elektroforezi smo se držali standardnih postopkov za analizo bukovih vzorcev, ki so natančno opisani v več delih (FERET, BERGMANN 1976, KIM 1979, MÜLLER-STARCK 1985, BRUS 1995).

Osnovne podatke, torej s pomočjo elektroforeze ugotovljene genotipe osebkov za posamezne lokuse, smo obdelali s programom za analizo variabilnosti alelov v populacijski genetiki BIOSYS-1, za nadaljnje obdelave smo uporabljali statistični paket STATISTICA in za analizo glavnih koordinat program PRINCOOR.

Preglednica 2: Analizirani encimski lokusi
Table 2: Enzyme loci analyzed

Encimski sistem <i>Enzyme system</i>	E.C. koda <i>E.C. number</i>	Analizirani lokusi <i>Analyzed loci</i>
Glutamat oksalacetat transaminaza <i>Glutamate oxalacetate transaminase</i>	2.6.1.1	GOT-B
Izocitrat dehidrogenaza <i>isocitrate dehydrogenase</i>	1.1.1.42	IDH-A
Levcin aminopeptidaza <i>Leucine aminopeptidase</i>	3.4.11.1	LAP-A
Malat dehidrogenaza <i>Malate dehydrogenase</i>	1.1.1.37	MDH-A, MDH-B, MDH-C
Menadion reduktaza <i>Menadion reductase</i>	1.6.99.2	MNR
Peroksidaza <i>Peroxidase</i>	1.11.1.7	PX-A, PX-B
Fosfoglukomutaza <i>Phosphoglucmutase</i>	2.7.5.1	PGM
Fosfoglucoza izomeraza <i>Phosphoglucose isomerase</i>	5.3.1.9	PGI-B
Šikimat dehidrogenaza <i>Shikimate dehydrogenase</i>	1.1.1.25	SKDH

6 KVANTIFIKACIJA RAZLIK V OBREMENJENOSTI MED PLOSKVAMI

Razliko v onesnaženosti med obremenjeno in manj obremenjeno ploskvijo v vsakem paru smo kvantificirali z analizo vsebnosti žvepla v organskem O₁ horizontu in s popisom poškodovanosti sestoja.

Na vsaki od šestih poskusnih ploskev iz osnovnega dela poskusa smo naključno izbrali devet talnih vzorcev in za analizo po tri vzorce naključno združili. Vsebnost žvepla v vzorcih smo po standardnih postopkih določevali z aparaturo SULHOMAT 12-ADG, ki deluje po konduktometrijski metodi. Značilnosti razlik v vsebnosti žvepla v tleh med ploskvami smo ugotavljali parametričnim testom za male vzorce. Kjer sta bili oceni varianc iz vzorcev homogeni, smo uporabili t-test za preskušanje značilnosti razlik med aritmetičnima sredinama, kjer pa oceni varianc iz vzorcev nista bili homogeni, smo uporabili t'-test s Cochranovo aproksimacijo. Rezultati so vidni v preglednici 3.

Preglednica 3: Vsebnost žvepla v organskem O, horizontu po ploskvah in vrednosti iz t-testa. Onesnažene ploskve so v mastnem tisku.

Table 3: Sulphur content in the organic O, horizon by plot, and their t-test values. Polluted plots are in bold.

Ploskev Plot	Vsebnost žvepla (S) v % Sulphur (S) content in %				
	Vzorec 1 Sample 1	Vzorec 2 Sample 2	Vzorec 3 Sample 3	Poprečje Average	t-test t-test
Zavodnje	0,172	0,168	0,162	0,167	12,76***
Gornji Grad	0,125	0,118	0,119	0,121	
Prapretno	0,126	0,128	0,127	0,127	2,22
Marno	0,132	0,155	0,140	0,142	
Celje	0,161	0,170	0,170	0,167	15,54***
Šmartno	0,117	0,113	0,117	0,116	

Razlike v obremenjenosti so značilne pri dveh parih. Zelo zanesljivo ($\alpha < 0,001$) lahko trdimo, da je ploskev Zavodnje bolj obremenjena z žveplom kot ploskev Gornji Grad in da je ploskev Celje bolj obremenjena kot ploskev Šmartno. V paru Prapretno-Marno značilnih razlik v obremenjenosti z žveplom test ni odkril, koncentracija žvepla je bila celo nekoliko višja na ploskvi Marno. Podoben rezultat je bil do neke mere tudi pričakovan, saj so po izgradnji 360 metrskega dimnika TET II, ki obratuje od leta 1976, poprečne letne koncentracije SO₂ na Prapretnem tudi 10 krat nižje kot prej (PARADIŽ 1982), medtem ko na območju Rimskih Toplic in Marnega občasno celo prihaja do rahlo povečane koncentracije SO₂, ki pa ne presega dovoljenih mej (PARADIŽ in sod. 1981) in ne povzroča poškodb na vegetaciji. Spremenjene razmere, nastale z izgradnjo novega dimnika, smo upoštevali tudi pri nabiranju vzorcev mlade populacije na ploskvi Prapretno. Osebki mladja, s katerih smo nabrali vzorce, so morali biti stari vsaj dvajset let, tako da so izvirali iz obdobja, ko je bila ploskev še pod hudim pritiskom onesnaževanja.

Pri poškodovanosti sestojev smo ocenjevali osutost krošenj, prisotnost neobičajnih vej in prisotnost suhih stranskih vej na izbranih drevesih. Z z-testom za preskušanje domnev z velikimi vzorci smo v vseh primerih odkrili visoko značilno razliko ($\alpha < 0,001$) med populacijama v paru (preglednica 4) in če upoštevamo dejstvo, da so močna osutost krošnje, prisotnost neobičajnih vej in suhih stranskih vej največkrat znaki oziroma posledica onesnaževanja ozračja, potem to dodatno potrjuje razliko v obremenjenosti med populacijama v paru.

Preglednica 4: Razlike med populacijama v paru glede na povprečno osutost, delež dreves s prisotnimi neobičajnimi vejami in delež dreves s suhimi stranskimi vejami

Table 4: Differences between populations in pairs in: average defoliation, presence of unusual branches, and presence of dead branches.

Ploskev Plot	Povprečna osutost (%) Average defoliation (%)	z-test z-test	Neobičajne veje (%) Unusual branches (%)	z-test z-test	Suhe str. veje (%) Dead branches (%)	z-test z-test
01 Zavodnje	43	11,2***	74	12,4***	49	7,2***
02 Gor. Grad	15		3		3	
07 Prapretno	35	5,9***	60	5,0***	62	7,9***
08 Marno	20		17		4	
11 Celje	40	8,5***	69	8,0***	83	13,6***
12 Šmartno	18		9		4	

7 REZULTATI IN RAZPRAVA

7.1 Genetska variabilnost encimskih sistemov

Relativne frekvence alelov po analiziranih lokusih kažejo precej izrazit polimorfizem (preglednica 5), saj je od 12 analiziranih lokusov 11 polimorfnihs vsaj v nekaj populacijah. Visoko stopnjo polimorfnosti v vseh 18 analiziranih populacijah smo odkrili na 8 lokusih: PX-A, PX-B, LAP-A, GOT-B, MNR, IDH-A, MDH-B in MDH-C.

Za večino alelov smo odkrili dobro ujemanje relativnih frekvenc z njihovo geografsko distribucijo po Evropi. Zlasti zanimivi so nekateri redki aleli, ki smo jih odkrili v slovenskih populacijah. Takšen je na primer alel MDH-B5, ki smo ga v heterozigotu 3-5 našli v populaciji Celje-mlado (13). Alel se v zahodni Evropi praktično ne pojavlja in tudi v vzhodni Evropi ga redko odkrijejo, le včasih se pojavi na Balkanu, na primer v Bolgariji. V kar 11 slovenskih populacijah smo odkrili tudi izredno redek alel LAP-A1. Če ga že najdemo, se običajno pojavi v heterozigotu 1-3, tokrat pa smo odkrili tudi heterozigote 1-2, ki so v Evropi še redkejši.

Pri lokusu MNR je nadvse zanimiva populacija Bohinj, kjer se kaže izredno visoka stopnja polimorfizma. Bohinj je razen populacije Zavodnje-mlado edina slovenska populacija, v kateri se na lokusu MNR pojavljajo vsi štirje aleli (1, 2, 3, 4). Heterozigoti 2-4, ki so drugod po Evropi redki, so v slovenskih populacijah

precej pogosti, še večja redkost pa je homozigot 4-4, ki se je v Bohinju pojavil kar trikrat.

V šestih populacijah se je z zelo nizko frekvenco (od 0,010 do 0,036) pojavil tudi alel IDH-A3, ki se sicer v Evropi prav tako zelo redko pojavlja. Odkrili so ga tudi v Sredozemlju na rastiščih v nizkih legah (COMPS in sod. 1991), niso pa ga odkrili na primer v Franciji (GÖMÖRY in sod. 1992) ali v Nemčiji (MÜLLER-STARCK 1985).

S stališča populacijske genetike je pri proučevanju vpliva onesnaževanja na rastline bistveno ugotoviti, če le-to lahko, posredno ali neposredno, povzroča selektivni pritisk na populacije gozdnega drevja. S proučevanjem različnih vrst žit so v 70-ih letih dobili rezultate, ki so nakazovali, ne pa tudi dokazovali, delovanje selekcije na izoencimske lokuse. Domneve o selektivnem pritisku pri populacijah gozdnega drevja izhajajo iz dejstev, da v prav vseh močno poškodovanih sestojih na onesnaženih območjih najdemo tudi osebke brez vidnih poškodb. Domneva, da je njihova odpornost tudi posledica genetskih danosti, torej odvisna od genotipa, je logična in večkrat potrjena (KARNOSKY, HOUSTON 1978, MEJNARTOWICZ 1984, itd.). Precej raziskav je pokazalo tudi značilne genetske razlike med občutljivimi in odpornimi drevesi, kar je seveda pogoj za poznejše selekcijske procese (BERGMANN, SCHOLZ 1985).

Značilnosti razlik v povprečnih frekvencah alelov med skupinami populacij in med posameznimi populacijami smo testirali z G-testom za testiranje homogenosti frekvenc v 2 x 2 kontingenčni tabeli oziroma R x C kontingenčni tabeli pri lokusih z več kot dvema aleloma. Rezultati so vidni v preglednici 6. Primerjava skupin vseh osnovnih onesnaženih populacij in vseh osnovnih čistih populacij je odkrila značilno razliko med skupinama na lokusih LAP-A ($\alpha < 0,05$) in IDH-A ($\alpha < 0,01$). Značilne razlike v relativnih frekvencah alelov na istih dveh lokusih smo odkrili tudi, ko smo osnovnim populacijam dodali še dopolnilne in torej primerjali skupini vseh onesnaženih populacij in vseh čistih populacij. Pri obeh primerjavah zbudi pozornost alel IDH-A3, ki se pojavlja v šestih populacijah sicer z nizko frekvenco, vendar vedno samo v populacijah, ki niso pod pritiskom onesnaževanja. Značilne razlike na lokusih LAP-A in MNR smo dobili tudi pri primerjavi skupine onesnaženih starih populacij s skupino vseh čistih starih populacij. Na lokusu MNR očitno k razliki največ prispeva alel MNR3, ki se pojavlja v dveh od treh tukaj analiziranih onesnaženih populacij in

Preglednica 5: Relativne alelne frekvence na analiziranih lokusih
Table 5: Relative allelic frequencies of the loci analyzed

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Populacija																		
LAJETA																		
LAJETA (N)	69	59	64	54	38	50	50	50	60	60	50	49	46	50	50	49	48	
1	41	42	53	40	36	40	54	33	45	52	31	51	25	31	50	37	44	39
2	52	57	49	43	43	60	45	87	52	68	60	48	75	69	50	55	51	60
PX-B																		
PX-B (N)	57	58	64	57	47	50	50	60	60	60	50	50	50	50	50	50	50	47
1	35	35	42	34	18	27	30	44	50	50	34	36	22	35	40	20	20	20
2	84	66	60	74	74	70	60	67	70	70	83	66	70	70	70	68	74	77
3	18	18	18	15	14	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
LAF-A																		
LAF-A (N)	68	58	67	55	45	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	40	40	47	37	30	40	40	40	40	40	30	30	24	40	40	40	40	40
2	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
3	30	23	24	34	34	26	33	40	34	34	26	34	24	24	26	26	26	26
4	21	24	23	18	20	30	25	16	24	24	18	17	17	15	22	24	20	20
GOT-B																		
GOT-B (N)	55	59	53	52	46	50	49	60	60	60	50	50	46	60	46	49	50	49
1	30	27	41	43	37	40	37	33	35	40	40	30	20	30	30	30	30	30
2	70	73	59	57	60	50	50	57	55	50	50	50	50	50	50	50	50	50
MIR																		
MIR (N)	70	58	60	55	50	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	00	00	04	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
2	94	94	94	95	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
3	04	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
4	04	00	02	04	00	02	00	10	02	02	00	00	00	00	00	00	00	00
MDH-A																		
MDH-A (N)	69	68	55	50	50	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	28	27	34	24	36	34	34	28	22	23	19	20	14	11	10	10	10	10
2	71	74	54	74	50	50	72	70	76	76	80	76	85	82	67	70	80	74
3	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
MDH-B																		
MDH-B (N)	69	58	69	55	48	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	07	03	04	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
2	94	94	94	95	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
3	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
4	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
5	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
PGH																		
PGH (N)	76	59	70	57	50	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
2	100	93	100	100	94	93	94	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93
3	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
SKDH																		
SKDH (N)	70	67	66	55	50	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
2	93	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94	94
3	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
4	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
MDH-C																		
MDH-C (N)	68	59	69	53	46	50	50	60	60	60	50	50	46	60	50	50	49	49
1	42	48	27	37	34	30	30	36	40	35	44	25	42	33	40	28	26	28
2	83	78	78	72	56	50	70	84	52	74	36	70	58	87	60	70	75	77

samo v eni od devetih analiziranih čistih populacij. Tudi sicer je očitno, da se alel MNR3 pogosteje pojavlja v onesnaženih populacijah, saj ga najdemo kar v štirih od skupaj šestih onesnaženih populacij, v čistih populacijah pa le v eni od dvanajstih. Po drugi strani je na istem lokusu

Preglednica 6: Z G-testom ugotovljene značilne razlike v frekvencah alelov med različnimi skupinami populacij

Table 6: Significant differences of allelic frequencies between different groups of populations determined by using G-test

Št. No.	Primerjane populacije <i>Compared populations</i>	Razlika v lokusih <i>Difference on locus</i>	Tveganje (α) Significance (α)
1	vse osnovne onesnažene : vse osnovne čiste <i>main polluted : all main unpolluted</i> 1,3,7,9,11,13 : 2,4,8,10,12,14	LAP-A IDH-A	0,045* 0,007**
2	vse onesnažene : vse čiste <i>all polluted : all unpolluted</i> 1,3,7,9,11,13 : 2,4,5,6,8,10,12,14,15,16,17,18	LAP-A IDH-A	0,008** 0,030*
3	onesnažene stare : vse čiste stare <i>old polluted : all old unpolluted</i> 1,7,11 : 2,5,6,8,12,15,16,17,18	LAP-A MNR	0,047* 0,008**
4	onesnažene mlade : čiste mlade <i>young polluted : young unpolluted</i> 3,9,13 : 4,10,14	IDH-A	0,012*

Zanimiv je alel MNR1 - ta se pojavi v eni od šestih onesnaženih in v petih od dvanajstih neonesnaženih populacijah.

Smiselna je tudi primerjava razlik v alelnih frekvencah med posameznimi starimi in mladimi populacijami. Po Hardy-Weinbergovem zakonu ravnotežja je pri naključnem spolnem razmnoževanju frekvenca genov (alelov) in genotipov iz generacije v generacijo konstantna, če so izpolnjeni pogoji, da ni migracij, da ni mutacij in da ni selekcije (VIDAKOVIĆ, KRSTINIĆ 1985). V naravnih populacijah ti pogoji seveda niso nikoli izpolnjeni in mnoge neodvisne raziskave so pokazale, da se tudi pri bukvi genetska struktura populacije semen razlikuje od starševske generacije (HATTEMER in sod. 1993), da se semena, proizvedena v dveh zaporednih letih, med seboj genetsko razlikujejo (GREGORIUS in sod. 1986) in da na seme tudi pozneje med klitjem in razvojem mladja še deluje preživetvena selekcija.

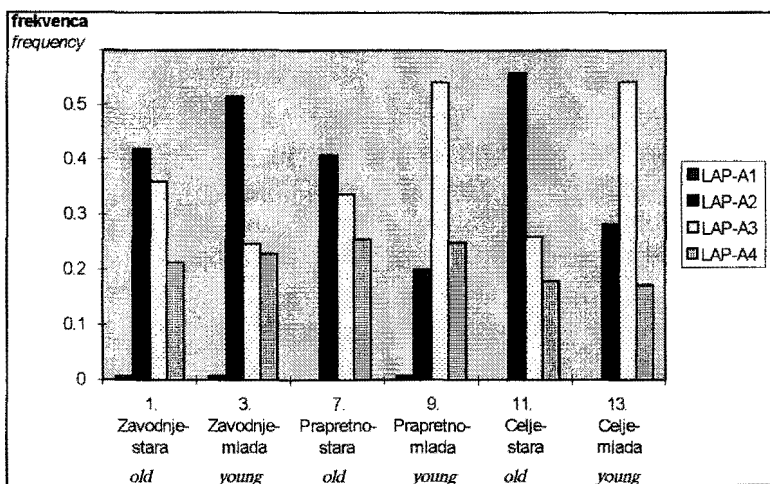
Pri primerjavi smo izhajali iz dejstva, da se mlade bukove populacije od starševskih praviloma vedno razlikujejo, da pa je razlika odvisna od intenzivnosti migracij, mutacij in selekcije. Ob domnevah, da je intenzivnost migracij v vseh naših populacijah, tako v čistih kot v onesnaženih, približno enaka in da je morebitno povečano število mutacij v onesnaženih populacijah še vedno izredno nizko, sklepamo, da je glavni dejavnik, ki povzroča različne odklone starih populacij od mladih, verjetno prav selekcija. Naša hipoteza je, da so razlike v genetski strukturi med posameznimi starševskimi in hčerinskimi populacijami na onesnaženih ploskvah večje kot na čistih ploskvah.

Hipotezo smo potrdili samo delno, saj smo na lokusu LAP-A na dveh onesnaženih ploskvah odkrili med staro in mlado populacijo visoko značilno razliko v genetski strukturi, na eni ploskvi pa je razlika tudi precejšnja, vendar ne statistično značilna. K heterogenosti očitno največ prispeva alel LAP-A2, katerega relativna frekvenca v Prapretnem in v Celju v mladi generaciji občutno pade (za 0,208 oz. za 0,277), v Zavodnjah pa, kar je pravzaprav nenavadno, občutno naraste (za 0,096). Na čistih ploskvah so razlike med starim in mladim sestojem občutno manjše, v enem primeru pa vendarle celo statistično značilne.

Primerjava onesnaženih populacij s čistimi kaže, da onesnaževanje verjetno posredno ali neposredno vpliva na frekvence alelov na nekaterih lokusih, na primer na lokusu LAP-A. Po eni strani lahko sklepamo, da razlike med onesnaženimi in čistimi populacijami povzročajo dejstvo, da so v sestojih, ki so že dolgo pod vplivom onesnaževanja, prisotna le še odporna ali vsaj do neke mere odporna drevesa, medtem ko so se občutljiva drevesa že posušila in bila odstranjena. To je najverjetneje posledica dejstva, da se podpopulacije občutljivih dreves v genetski strukturi, torej v frekvencah alelov, razlikujejo od podpopulacij odpornih dreves (BERGMANN, SCHOLZ 1985, BERGMANN, SCHOLZ 1987, GEBUREK, SCHOLZ 1985, MEJNARTOWICZ 1983, MÜLLER-STARCK 1985, MÜLLER-STARCK, HATTEMER 1989).

Pri bukvi je prav na lokusu LAP-A selekcijsko delovanje odkrilo več raziskovalcev. MÜLLER-STARCK in HATTEMER (1989) sta na onesnaženih ploskvah ugotovila značilne razlike v genetski strukturi med populacijo kalečega semenja in tremi dveletnimi populacijami. KIM (1985) je ugotovil izrazito prednost alela LAP-A3 v ontogenetskem razvoju od faze semena do mladja. Homozigoti 3-3 in v večini primerov tudi heterozigoti, v katerih je nastopal alel 3,

so po njegovem mnenju kazali izrazito selekcijsko prednost. V našem primeru je pri LAP-A frekvenca alela 3 v dveh od treh primerov močno narasla, in sicer za 0,205 in za 0,187, kar je celo precej več kot v raziskavi Kima, kjer se vrednosti povečajo za 0,044 do 0,105.



Grafikon 1: Relativne frekvence alelov na lokusu LAP-A v onesnaženih starih in onesnaženih mladih populacijah

Graph 1: Allelic frequencies on the LAP-A locus in old and young populations in air polluted areas

Znižanje v dveh in zvišanje v enem primeru pri alelu LAP-A2 je nenavadno, toda na podoben pojav so naleteli tudi drugi raziskovalci (BERGMANN in SCHOLZ 1987, MEJNARTOWICZ 1983, MEJNARTOWICZ in PALOWSKI 1989), ki so pri smreki in rdečem boru ugotavljali morebitno selektivno delovanje onesnaževanja na izoenzime. Če bi bila razlika pri nas v vseh treh primerih enosmerna, bi selektivno delovanje onesnaževanja na alel LAP-A2 ne bilo več vprašljivo.

Pojava na znamo razložiti, ena od možnih, čeprav seveda zaenkrat popolnoma nepreverljivih razlag pa je, da je to povzročil takoimenovani hitchhiking effect, ki lahko povzroči, da na nekem lokusu, ki je selekcijsko povsem nevtralen, pride do spremembe alelnih frekvenc zaradi sprememb, ki jih je selekcija povzročila na nekem drugem lokusu.

Mogoče je tudi, da je na vseh treh onesnaženih poskusnih ploskvah selekcija delovala na redek alel IDH-A3. Čeprav se mnenja o primernosti redko

pojavnjajočih se alelov za primerjanje populacij razlikujejo, menim, da obstaja možnost, da pojavljanje alela IDH-A3 samo v čistih populacijah ni povsem naključno. Od skupaj 18 populacij ga namreč najdemo v šestih populacijah, ki pa so vse čiste. Če bi se alel pojavljal povsem neodvisno, bi bila verjetnost, da je tako razporejen po naključju, zelo majhna. Upravičenost takšnih zaključkov dokazujemo tudi z dejstvom, da sta BERGMANN in SCHOLZ (1987) pri smreki ugotovila, da so nekateri redki aleli, na primer MDH-C3, mnogo pogostejši v skupinah občutljivih kot v skupinah odpornih dreves. V onesnaženih bukovih populacijah, ki smo jih proučevali, pa je gotovo že precejšen delež občutljivih dreves odstranjen. Zaključimo lahko, da že v nekaj generacijah onesnaževanje lahko pripelje do znatnih genetskih sprememb in do tega, da se bo frekvenca nekaterih redkih alelov zmanjševala ali pa bodo celo izginili, če se občutljiva drevesa posušijo še pred fruktifikacijo, ali če se njihova reprodukcijska sposobnost zmanjša. BERGMANN in SCHOLZ (1985) sta s pomočjo računalniške simulacije ugotovila, da bo alel G6PDH-A1, ki se je v občutljivem delu onesnažene smrekove populacije Sonnenberg pojavljal s frekvenco 0,10, v njenem odpornem delu pa s frekvenco 0,04, iz sestoja izginil že po štirih generacijah. Posledica izgube genov je zmanjševanje genetske raznolikosti, katere posledica je lahko tudi zmanjšana prilagodljivost naslednje generacije. Odvisnost intenzivnosti propadanja od genetske raznolikosti so jasno pokazale mnoge raziskave, pri jelki so to na primer ugotovili BERGMANN in sod. (1990). Po drugi strani se moramo zavedati, da smo proučili majhen del bukovih genov in da jih je v mehanizmu selekcije, ki jo morda povzroča onesnaževanje, verjetno udeleženih mnogo več. Zato je treba tudi pri bukvi izvajati vse možne načine ohranjanja genofonda, dokler večina populacij še ni genetsko osiromašenih.

V naši raziskavi smo torej odkrili nekaj dejstev, ki nakazujejo selektivno delovanje onesnaževanja na posamezne alele, dejstvo pa je, da nismo uspeli nedvoumno potrditi rezultatov tistih raziskav, s katerimi so v zadnjih 12 letih dokazovali razločno selekcijsko delovanje onesnaževanja na izoencimske lokuse oziroma posamezne alele na njih.

7.2 Genetska raznolikost

Za ocenitev genetske raznolikosti smo najprej za vse populacije izračunali povprečno število alelov na lokus (preglednica 8) in ugotovili zelo majhne razlike med populacijami. Vrednost 2,2 za vse populacije skupaj je nekoliko nižja od običajnih povprečnih vrednosti iz srednje in vzhodne Evrope. Povprečno število alelov na lokus je v prvi vrsti odvisno od tega, katere lokuse analiziramo, zato bi morali za korektno primerjavo v vseh primerih analizirati popolnoma isto kombinacijo lokusov - to pa se le redko zgodi, ker v skladu z možnostmi skoraj v vsakem laboratoriju analizirajo drugačno kombinacijo. V naši raziskavi v nobeni kombinaciji nismo odkrili razlik v številu alelov na lokus med čistimi in onesnaženimi populacijami in prav tako ne med starimi in mladimi populacijami. Tudi razlik, ki bi nakazovale geografsko pogojenost, nismo našli.

Od 12 lokusov smo na 11 odkrili polimorfizem, za vse populacije skupaj je torej 91,7% lokusov polimorfni. Niti pri primerjavi čistih in vseh onesnaženih populacij niti pri katerikoli drugačni primerjavi med čistimi in onesnaženimi populacijami niso odkrili nobene razlike v odstotku polimorfni lokusov.

Splošna značilnost je, da je povprečna opazovana heterozigotnost H_o , ki smo jo izračunali kot aritmetično sredino deležev heterozigotov po posameznih analiziranih lokusih, skoraj v vseh populacijah nižja od povprečne pričakovane heterozigotnosti H_e , kakršno naj bi imela populacija v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, kar kaže na splošen primanjkljaj heterozigotov. Razlike so majhne, največja je razlika v populaciji Celje-stara, in sicer 0,021. Primerjava skupine onesnaženih ploskev s skupino čistih v nobenem primeru ni odkrila kakšne značilne razlike v povprečni opazovani (H_o) ali povprečni pričakovani (H_e) heterozigotnosti. Povprečna opazovana heterozigotnost H_o za vse čiste populacije skupaj je tako 0,245, za vse onesnažene pa 0,249.

Dejstvo, da nismo odkrili nobenih razlik v povprečnem številu alelov na lokus med skupinama čistih in onesnaženih ploskev, je nekoliko presenetljivo in se razlikuje od ugotovitev MÜLLER-STARCKA (1985), ki je med skupinama občutljivih in odpornih dreves odkril zelo razločno razliko, saj so imela odporna drevesa povprečno 3,1, občutljiva pa le 2,4 alela na lokus. Glede na to bi tudi v našem primeru pričakovali, da bo povprečno število alelov na lokus v onesnaženih populacijah, kjer je delež odpornih dreves večji kot v

neonesnaženih, ustrezno večje. Podobno smo predvidevali tudi za mlade onesnažene sestoje, v katere se občutljivi genotipi iz starševske populacije ali sploh ne bi uspeli prenesti ali pa bi propadli med selekcijo v procesu razvoja mladega sestoj. Toda med drevesi v onesnaženih populacijah je verjetno tudi precej dreves, ki so po svojih genetskih lastnostih med odpornimi in občutljivimi in ki so morda razlog, da so razlike zabrisane in ne tako izrazite kot v raziskavi Müller-Starcka. Pozabiti ne smemo niti na selekcijo, ki morda po drugi strani deluje proti nekaterim alelom (na primer PGI-B3) v onesnaženih populacijah in tako povprečno število alelov na lokus v njih zmanjšuje.

Preglednica 7: Povprečno število alelov na lokus, odstotek polimorfnih lokusov ter povprečna opazovana (H_o) in povprečna pričakovana (H_e) heterozigotnost po populacijah in za vse populacije skupaj

Table 7: Mean number of alleles per locus, percentage of polymorphic loci, average observed heterozygosity (H_o) and average expected heterozygosity (H_e) in each population and for all populations together.

St.	Populacija	Povprečno število alelov na lokus	Odstotek polimorfnih lokusov	Povprečna heterozigotnost Average heterozygosity	
No.	Population	Mean number of alleles per locus	Percentage of polymorphic loci	Opazovana (H_o) Observed (H_o)	Pričakovana (H_e) Expected (H_e)
01	Zavodnje-stara (old)	2,2	83,3	0,255	0,260
02	Gor.Grad-stara (old)	2,2	83,3	0,253	0,259
03	Zavodnje-mlada (young)	2,2	75,0	0,254	0,265
04	Gor.Grad-mlada (young)	2,0	75,0	0,257	0,256
05	Hotedršica	2,3	83,3	0,267	0,272
06	Postojna	2,1	83,3	0,260	0,270
07	Prapretno-stara (old)	2,0	83,3	0,240	0,247
08	Marno-stara (old)	2,1	83,3	0,242	0,252
09	Prapretno-mlada (young)	2,2	83,3	0,251	0,269
10	Marno-mlada (young)	2,0	75,0	0,232	0,249
11	Celje-stara (old)	2,1	83,3	0,240	0,261
12	Šmartno-stara (old)	2,3	83,3	0,233	0,252
13	Celje-mlada (young)	2,2	83,3	0,247	0,245
14	Šmartno-mlada (young)	2,2	75,0	0,215	0,227
15	Bohinj	2,3	75,0	0,273	0,279
16	Maribor	2,2	83,3	0,247	0,262
17	Medvednica	2,2	83,3	0,215	0,234
18	Gračec-Lučelnica	2,2	91,7	0,275	0,263
	skupaj/Total	2,2	91,7	0,247	0,254

Pozornost zbuja dejstvo, da med onesnaženimi in čistimi populacijami nismo odkrili razlik niti v povprečni opazovani (H_o) niti v povprečni pričakovani (H_e) heterozigotnosti. MÜLLER-STARCK (1985) je v primerjavi s skupino občutljivih dreves na primer ugotovil kar za 15% višjo povprečno heterozigotnost v skupini odpornih dreves in s tem podprl hipotezo, da je povečana heterozigotnost eden od dejavnikov, ki drevesom zagotavljajo večjo možnost preživetja. MEJNARTOWICZ (1983) po drugi strani pri rdečem boru ni odkril nobenih značilnih razlik v povprečni heterozigotnosti med občutljivo in odporno skupino. V dveh analiziranih populacijah rdečega bora, ki sta 25 let rasli v močno onesnaženem okolju, MEJNARTOWICZ IN PALOWSKI (1989) na analiziranih lokusih nista našla nikakršne selekcije proti homozigotom, zato je bila heterozigotnost v onesnaženih populacijah celo nižja kot v neonesnaženih. Nobeden od kazalcev genetske raznolikosti v naši raziskavi torej ni jasno pokazal razlik med populacijami, ki bi jih lahko pripisali onesnaževanju ozračja.

7.3 Genetska diferenciacija

Genetsko diferenciranost populacij običajno ocenjujemo z genetsko distanco ali genetsko identiteto. Med številnimi genetskimi distancami je med najpogosteje uporabljanimi popravljena genetska distanca D (NEI 1978). Iz preglednice 9 je razvidno, da so genetske distance med populacijami relativno majhne, kar je za tako majhen geografski prostor razumljivo. Parov populacij, znotraj katerih nismo odkrili nobene genetske diferenciacije, je več, največja genetska distanca pa je med populacijama Celje-mlado in Zavodnje-mlado, torej med dvema onesnaženima mladima populacijama. Tudi vse druge največje genetske distance so distance med onesnaženima ali med čisto in onesnaženo populacijo.

Ena od naših osnovnih hipotez je bila tudi, da onesnaževanje ozračja povzroča povečan odklon mladja od starševske populacije, zato smo pričakovali, da bodo genetske distance med staro in mlado populacijo znotraj osnovnih parov na onesnaženih ploskvah večje kot na čistih. Rezultati so hipotezo potrdili, razlika je največja in zelo očitna v paru Prapretno-Marno, saj je v onesnaženem Prapretnem genetska distanca med mlado in staro populacijo 0,007, v manj onesnaženem Marnem pa je genetska distanca med mlado in staro populacijo 0. Tudi v paru Zavodnje-Gornji Grad je razlika precejšnja (0,004 in 0,001), medtem ko je razlika v paru Celje-Šmartno majhna (0,008 in 0,007), vendar še vedno

istosmerna kot v drugih dveh primerih. Razlik se sicer ne da testirati, o njihovi statistični značilnosti je težko govoriti in tudi niso v vseh primerih zelo velike. Vendar podpirajo domnevo, da onesnaževanje povzroča povečevanje odklonov mladja od starševske populacije v genetski strukturi. Izračunali smo tudi povprečne genetske distance med populacijami znotraj onesnažene in znotraj čiste skupine populacij. Povprečna genetska distanca \bar{D} med onesnaženimi populacijami je razmeroma zelo velika in znaša 0,012, povprečna genetska distanca \bar{D} med čistimi populacijami pa je majhna in znaša le 0,003. Povprečna genetska distanca \bar{D} za pare, v katerih smo primerjali po eno čisto in eno onesnaženo populacijo, je 0,006.

Ker porazdelitve genetskih distanc ne poznamo, tudi značilnosti razlik med njimi ne moremo statistično testirati. Kljub temu je očitno, da so razlike najverjetneje rezultat delovanja onesnaževanja na obravnavane populacije.

Z namenom, da bi ugotovili, kateri lokusi najbolj prispevajo k vrednosti skupnih genetskih distanc, smo nepristranske genetske distance D (NEI 1978), ki so na posameznih lokusih seveda lahko precej večje kot skupne genetske distance, izračunali tudi za vseh 12 lokusov. Na lokusu LAP-A (preglednice 10 do 12) je genetska distanca med staro in mlado populacijo pri vseh treh parih ploskev bistveno večja na onesnaženi ploskvi.

Preglednica 8: Popravljenе genetske distance D (NEI 1978) med vsemi 18 analiziranimi bukovimi populacijami. V osenčenih poljih so največje genetske distance z vrednostjo 0,015 ali več. Onesnažene populacije so natisnjene krepko.

Table 8: Unbiased genetic distances D (NEI 1978) between all 18 beech populations. Fields with distances of 0,015 or higher are shaded. Polluted populations are in bold.

Populacija	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Zavodnje - staro	***								
2 Gor. Grad - staro	0,001	***							
3 Zavodnje - mlado	0,004	0,005	***						
4 Gor. Grad - mlado	0,003	0,001	0,002	***					
5 Hotedršica	0,004	0,002	0,006	0,005	***				
6 Postojna	0,005	0,001	0,004	0,005	0,001	***			
7 Prapretno - staro	0,003	0,002	0,007	0,001	0,002	0,004	***		
8 Marno - staro	0,006	0,003	0,011	0,007	0,000	0,003	0,003	***	
9 Prapretno - mlado	0,011	0,013	0,017	0,013	0,005	0,006	0,007	0,007	***
10 Marno - mlado	0,003	0,002	0,005	0,003	0,000	0,002	0,005	0,000	0,010
11 Celje - staro	0,016	0,007	0,012	0,010	0,009	0,004	0,016	0,008	0,015
12 Šmartno - staro	0,004	0,002	0,007	0,000	0,004	0,005	0,000	0,004	0,009
13 Celje - mlado	0,016	0,013	0,024	0,016	0,008	0,009	0,015	0,005	0,006
14 Šmartno - mlado	0,012	0,011	0,019	0,010	0,007	0,010	0,010	0,004	0,007
15 Bohinj	0,007	0,006	0,009	0,005	0,000	0,003	0,001	0,002	0,001
16 Maribor	0,004	0,001	0,003	0,002	0,001	0,000	0,004	0,002	0,009
17 Medvednica	0,005	0,005	0,009	0,002	0,006	0,005	0,003	0,004	0,007
18 Gračec - Lučelnica	0,001	0,002	0,008	0,004	0,000	0,004	0,001	0,000	0,008
Populacija	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Zavodnje - staro									
2 Gor. Grad - staro									
3 Zavodnje - mlado									
4 Gor. Grad - mlado									
5 Hotedršica									
6 Postojna									
7 Prapretno - staro									
8 Marno - staro									
9 Prapretno - mlado									
10 Marno - mlado	***								
11 Celje - staro	0,004	***							
12 Šmartno - staro	0,004	0,011	***						
13 Celje - mlado	0,006	0,008	0,013	***					
14 Šmartno - mlado	0,004	0,009	0,007	0,000	***				
15 Bohinj	0,005	0,012	0,004	0,010	0,008	***			
16 Maribor	0,000	0,002	0,003	0,006	0,004	0,005	***		
17 Medvednica	0,002	0,009	0,001	0,005	0,001	0,006	0,000	***	
18 Gračec - Lučelnica	0,000	0,011	0,002	0,010	0,006	0,003	0,002	0,003	***

Preglednica 9: Genetske distance D za lokus LAP-A v paru Zavodnje-Gornji Grad. Onesnaženi populaciji sta v krepkem tisku.

Table 9: Genetic distance D for the LAP-A locus in the pair Zavodnje-Gornji Grad. Polluted populations are in bold.

Populacija/Population	1	2	3	4
1 Zavodnje-staro/old	***			
2 Gor. Grad-staro/old	0,022	***		
3 Zavodnje-mlado/young	0,017	0,000	***	
4 Gor. Grad-mlado/young	0,007	0,001	0,000	***

Preglednica 10: Genetske distance D za lokus LAP-A v paru Prapretno-Marno. Onesnaženi populaciji sta v krepkem tisku.

Table 10: Genetic distance D for the LAP-A locus in the pair Prapretno-Marno. Polluted populations are in bold.

Populacija/Population	7	8	9	10
7 Prapretno-staro/old	***			
8 Marno-staro/old	0,000	***		
9 Prapretno-mlado/young	0,104	0,085	***	
10 Marno-mlado/young	0,009	0,000	0,163	***

Preglednica 11: Genetske distance D za lokus LAP-A v paru Celje-Šmartno. Onesnaženi populaciji sta v krepkem tisku.

Table 11: Genetic distance D for the LAP-A locus in the pair Celje-Šmartno. Polluted populations are in bold.

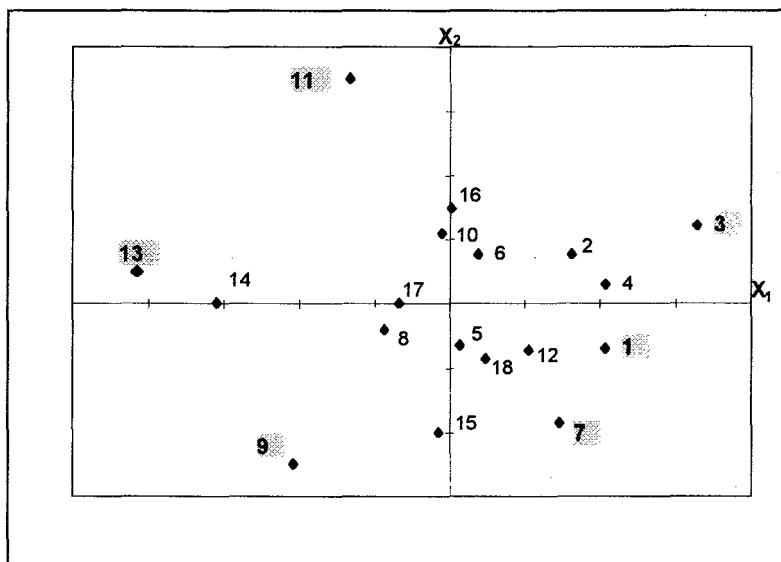
Populacija/Population	11	12	13	14
11 Celje-staro/old	***			
12 Šmartno-staro/old	0,006	***		
13 Celje-mlado/young	0,198	0,078	***	
14 Šmartno-mlado/young	0,161	0,056	0,000	***

Z multivariatno analizo - analizo glavnih koordinat (PCO) smo interpretirali matriko genetskih distanc D . Bistvo analize je grafična predstavitev točk oziroma populacij v dvodimenzionalnem prostoru. Prikazovanje genetske diferenciacije v grafikonu je zelo pogost način ugotavljanja prostorske diferenciranosti populacij ali obstoja geografskih ras. Tudi na geografsko tako majhnem prostoru kot je Slovenija, so pri drevesnih vrstah že možne geografsko pogojene kinalne spremembe v genetski strukturi, takšne spremembe so bile na primer odkrite pri jelki v smeri vzhod-zahod (BRUS, LONGAUER 1995). V grafikonu se to pokaže kot bolj ali manj izrazito združevanje točk v dve ali več skupin.

V našem primeru (grafikon 2) izrazite geografsko pogojene diferenciranosti nismo odkrili, saj so populacije v grafikonu razporejene precej brez reda in na videz povsem naključno. Izredno zanimiv pa je položaj vseh onesnaženih populacij v grafikonu, saj prav vse ležijo na samem robu in so precej oddaljene od drugih, čistih populacij; poleg tega so precej oddaljene druga od druge. Pri tem opazimo, da so mlade onesnažene populacije (3, 9, 13) od drugih še bolj izrazito oddaljene kot stare onesnažene (1, 7, 11). Pojav je izredno zanimiv, saj onesnažene populacije v primerjavi z neonesnaženimi izvirajo iz geografsko precej manjšega prostora.

V raziskavo smo vendarle vključili populacije z relativno majhnega geografskega prostora, zato so v skladu s pričakovanji tudi genetske distance razmeroma nizke. Rezultati na prvi pogled sicer kažejo precejšnjo genetsko diferenciranost bukve v primerjavi z jelko, pri kateri je bila največja genetska distanca med dvema slovenskima populacijama 0,007 (BRUS, LONGAUER 1995), to pa je precej manj od 0,024, kolikor ta znaša pri bukvi, toda natančnejši pogled hitro pokaže, da so genetske distance pri bukvi največje v primerih, ko primerjamo dve onesnaženi populaciji. Če gledamo samo čiste populacije, vidimo, da največja genetska distanca 0,011 ni več tako bistveno večja od najvišje distance 0,007 pri jelki. Iz tega sklepam, da se po stopnji genetske diferenciranosti bukev in jelka v Sloveniji bistveno ne razlikujeta.

Dejstvo, da so genetske distance največje v primeru parov onesnaženih populacij, je težko zanesljivo razložiti. Ker nismo na nobenem lokusu, razen morda na lokusih LAP-A in IDH, kjer je to delno nakazano, odkrili razločnega delovanja selekcije proti kateremu alelu ali genotipu, je po eni strani upravičeno pričakovati, da so glavni vzrok za tako povečane distance prav spremembe na teh dveh lokusih. Toda po drugi strani je možno, da je odklone povzročil tudi mehanizem, ki ga ne poznamo. Morda je to pojav kumulativnosti, ko se sicer majhne razlike v končni fazi nakopičijo in pokažejo v obliki povečanih genetskih distanc.



Grafikon 2: Genetska diferenciacija analiziranih bukovih populacij. Analiza glavnih kordinat je bila izvedena na osnovi Neievih popravljenih genetskih distanc D . Prvi dve osi prikazujeta 63,97% skupne variabilnosti. Posebno pozornost zbuja robni položaj onesnaženih populacij (1, 3, 7, 9, 11, 13).

Graph 2: Genetic differentiation of beech populations. Principal coordinate analysis was based on Nei's (1978) unbiased genetic distances. The first two axes display 63.97% of total variation. Of special interest is the peripheral position of polluted populations (1, 3, 7, 9, 11, 13).

Poleg že naštetih dejstev spremembe v genetski strukturi populacij kažejo prek vseh lokusov izračunane genetske distance med staro in mlado populacijo. Sicer ne velike razlike postanejo mnogo večje, če računamo genetske distance za posamezne lokuse, na primer za lokus LAP. Nizka povprečna genetska distanca \bar{D} znotraj skupine čistih populacij pomeni, da so si čiste populacije genetsko relativno podobne, čeprav prihajajo z geografsko precej večjega področja (premer 180 km) kot onesnažene (premer 40 km). Sorazmerno visoka povprečna genetska distanca \bar{D} znotraj skupine onesnaženih ploskev je po drugi strani očiten dokaz, da onesnaževanje povzroča povečevanje odklonov. Podobno sta ugotovila MEJNARTOWICZ in PALOWSKI (1989) pri rdečem boru. Dejstvo, da so naše onesnažene bukove populacije med seboj zelo različne in hkrati različne tudi od čistih bukovih populacij, bi morda lahko razložili z različnim selekcijskim vplivom na različnih ploskvah. Gotovo je namreč, da so deleži različnih škodljivih snovi na vseh treh ploskvah do neke mere različni, razen tega pa so bili v času in prostoru sestoji onesnaženju izpostavljeni različno

intenzivno. Zato tudi ne moremo v vseh treh primerih pričakovati uniformnega učinka.

Iz grafikona 2 je prav tako razvidno, da je genetska struktura vseh šestih onesnaženih populacij bistveno spremenjena, saj so na grafikonu prav vse v robnem prostoru. To je gotovo najzanimivejše odkritje naše raziskave. V robnih oziroma onesnaženih populacijah je očitno prišlo do zelo nepredvidljivih in v vse smeri potekajočih sprememb alelnih frekvenc. Podoben pojav je odkril GÖMÖRY (1992), ki je pri primerjavi smrekovih pragozdnih sestojev, z naravno regeneracijo nastalih gospodarjenih sestojev in umetno osnovanih sestojev na Slovaškem našel velike in popolnoma nepredvidljive spremembe v genetski strukturi umetno osnovanih smrekovih sestojev. Avtor meni, da je takšne odklone povzročilo premajhno število različnih starševskih dreves, s katerih so nabrali seme za osnovanje sestojev in iz tega izvirajoč genetski drift. V našem primeru takšna razlaga ni verjetna, ker so sestoji, ki smo jih proučevali, vsi naravnega nastanka, toda dejstvo je, da tako osnovanje umetnega sestoja kot onesnaževanje ozračja predstavljata neke vrste selekcijo, ki v različnih primerih deluje v različnih smereh. V odraslih onesnaženih populacijah je selekcija delovala prek sušenja in izločanja najbolj občutljivih dreves, ki niso bila sposobna prenesti obremenitve.

8 POVZETEK

Osnovni cilj raziskave je bil preučiti genetsko strukturo bukovih populacij v nekaterih imisijsko najbolj obremenjenih področjih v Sloveniji in ugotoviti vpliv onesnaževanja ozračja nanjo. Cilj dela je bil tudi predstaviti zgodovino in razvoj proučevanja izoencimov na osnovi njihove elektroforetske mobilnosti in dosedanje uporabo omenjene metode pri proučevanju gozdnih drevesnih vrst v svetu.

Analizirali smo osemnajst populacij bukve (*Fagus sylvatica* L.), dvanajst iz relativno čistih in šest iz onesnaženih naravnih gozdnih sestojev. Šest populacij je bilo mladih, tri od njih so bile čiste in tri onesnažene. V osnovni del poskusa smo vključili tri pare poskusnih ploskev; v vsakem paru sta bili po ena močno onesnažena in ena manj onesnažena, pogojno rečeno čista ploskev, ki sta si bili po osnovnih rastiščnih razmerah čimbolj podobni. Na vsaki ploskvi smo ločeno

analizirali staro in mlado, torej starševsko in hčerinsko populacijo. Osnovni pari ploskev so bili Zavodnje-Gornji Grad, Prapretno-Marno in Celje-Šmartno. Razen osnovnih dvanajstih populacij iz treh parov ploskev smo v poskus dodatno vključili še šest ploskev z relativno neobremenjenih območij. Na dodatnih šestih ploskvah smo nabrali in analizirali samo vzorce iz odraslih sestojev.

Razliko v onesnaženosti med ploskvama v vsakem paru smo kvantificirali z analizo vsebnosti žvepla v tleh in z analizo poškodovanosti dreves. V dveh od treh primerov smo med ploskvama v paru odkrili značilno razliko v vsebnosti žvepla v tleh, v vseh treh primerih pa smo odkrili visoko značilno razliko v povprečni osutosti krošenj, v prisotnosti neobičajnih vej in v prisotnosti suhih stranskih vej.

Iz vsake populacije smo naključno izbrali od 50 do 70 dreves. Z vsakega osebka smo kot vzorec za nadaljnjo analizo v zimah 1992/93 in 1993/94 nabrali vejice, s katerih smo za analizo uporabili 5-9 dormantnih popkov in manjše količine skorje. S horizontalno elektroforezo na škrobnem gelu smo analizirali naslednjih dvanajst izoencimskih lokusov: GOT-B, IDH-A, LAP-A, MDH-A, MDH-B, MDH-C, MNR, PX-A, PX-B, PGM, PGI-B in SKDH. Pri elektroforezi smo se držali standardnih postopkov, ki so podrobno opisani v literaturi.

Večina alelov se dobro ujema z geografsko distribucijo v Evropi. Zanimivi so nekateri redki aleli, ki smo jih odkrili v slovenskih populacijah. Takšni so na primer aleli MDH-B5, LAP-A1 in IDH-A3. Odkrili smo nekaj redkih heterozigotov 1-2 na lokusu LAP-A in heterozigotov 2-4 na lokusu MNR, na istem lokusu smo v dveh populacijah odkrili tudi redek homozigot 4-4.

Pri analizi genetske variabilnosti smo na lokusih LAP-A in IDH-A v različnih primerjavah odkrili značilne razlike med alelnimi frekvencami skupine čistih in onesnaženih populacij. Nekatera dejstva nakazujejo selektivno delovanje onesnaževanja zraka na izoencimske lokuse. Selekcijo delno nakazuje alel LAP-A2, katerega relativna frekvenca v dveh primerih v mladi onesnaženi populaciji značilno pade, v enem primeru pa naraste. Čeprav se mnenja o primernosti redkih alelov za primerjanje populacij med seboj razlikujejo, možno selektivno delovanje onesnaževanja ozračja na izoencimske lokuse nakazuje tudi odsotnost redkega alela IDH-A3 v vseh šestih onesnaženih populacijah, medtem ko se alel z nizko frekvenco od 0,010 do 0,036 pojavlja kar v šestih

neonesnaženih populacijah. Selekcije, ki bi razločno delovala proti kateremu alelu ali genotipu, raziskava kljub temu ni nedvoumno potrdila.

Očiten je vpliv onesnaževanja ozračja na genetsko diferenciacijo. Genetske distance (NEI 1978) so največje, kadar med seboj primerjamo onesnaženi populaciji, distanca je še zlasti velika, kadar je vsaj ena od populacij mlada. Povprečna genetska distanca \bar{D} med onesnaženimi populacijami je razmeroma velika in znaša 0,012, povprečna genetska distanca \bar{D} med neonesnaženimi populacijami pa je majhna in znaša samo 0,003, čeprav te populacije pokrivajo geografsko bistveno večji prostor kot onesnažene. Genetske distance med starševsko populacijo in njenim potomstvom so v vseh primerih večje na onesnaženi kot na čisti ploskvi. Najzanimivejše odkritje naše raziskave se razločno izraža v robnem položaju tako mladih kot starih onesnaženih populacij na grafikonu, ki ponazarja rezultate na genetskih distancah temelječe analize glavnih koordinat. Čeprav natančnih mehanizmov ne poznamo, saj so spremembe očitno zelo nepredvidljive in so potekale v vseh smereh, je najverjetneje onesnaževanje povzročilo bistveno spremembo alelnih frekvenc.

Raziskva je odkrila le majhne razlike v genetski raznolikosti med onesnaženimi in čistimi populacijami, saj razlike niso značilne ne pri povprečnem številu alelov na lokus in pri odstotku polimorfnih lokusov ne pri povprečni opazovani (H_o) ali povprečni pričakovani (H_e) heterozigotnosti.

SUMMARY

The objective of this research was to determine the effect of air pollution on genetic structure of European beech (*Fagus sylvatica* L.). To accomplish this, the genetic structure of beech populations in polluted and unpolluted areas of Slovenia was analysed. Another objective was to review the history and development of isozyme studies based on their electrophoretic mobility, as well as the use of these techniques in the research on characteristics of forest tree species.

Eighteen European beech populations, twelve of which are relatively undamaged and six severely damaged, were analyzed. Six populations were young, three polluted and three unpolluted. From every research plot one old

and one young, i.e. parental and progeny population were analyzed. In the most important part of the research, three pairs of research plots were included; each pair included one plot with a severely damaged population and one plot with an undamaged population. Plots were as similar as possible concerning their general site conditions. Pairs chosen were Zavodnje-Gornji Grad, Prapretno-Marno, and Celje-Šmartno. Besides the primary twelve populations from these three paired plots, an additional six populations from different undamaged areas were included. On these plots only older populations were analyzed.

In each pair, the difference in pollution level between the plots was quantified using analyses of soil sulphur content and tree damage level. The difference in sulphur content between plots was highly significant in two cases. The difference in average defoliation and the, presence of unusual branches and dead branches were significant in all three cases. These background analyses confirmed the propriety of further comparisons.

From each population 50 to 70 trees were selected at random. From each tree a branchlet with 5-9 dormant buds was sampled in the winters of 1992/93 and 1993/94. Using horizontal starch gel electrophoresis (FERET 1976, KIM 1979, MÜLLER-STARCK 1985), the following 12 isozyme loci were analyzed: GOT-B, IDH-A, LAP-A, MDH-A, MDH-B, MDH-C, MNR, PX-A, PX-B, PGM, PGI-B and SKDH.

An agreement with geographical distribution, typical for Europe, was discovered for most alleles. In Slovenian populations, some rare alleles (MDH-B5, LAP-A1 and IDH-A3) and some rare heterozygotes and homozygotes (LAP-A 1-2, MNR 2-4, MNR 4-4) were also discovered.

There were significant differences of allelic frequencies between polluted and unpolluted populations on the loci LAP-A and IDH-A. Selection may be indicated by the relative frequencies of the LAP-A2 allele which are, on polluted plots, in two cases, significantly lower in the young population than the old one. The views on suitability of rare alleles for population comparisons are not in agreement; however, the possibility of the selective action of air pollution against isozyme loci is also indicated by the absence of the rare allele IDH-A3 from all six polluted populations and by their presence, though with low frequency (0.010-0.036), in the six unpolluted populations. These findings indicate the possibility

of selection, caused by air pollution, acting against certain alleles. However, selection against any of the alleles or genotypes is not unambiguously confirmed.

The influence of air pollution on genetic differentiation is more obvious. Genetic distances (NEI 1978) are the largest when two polluted populations are compared and especially large when at least one of the compared populations is young. Average genetic distance \bar{D} between polluted populations is relatively large (0.012) whereas average genetic distance \bar{D} between unpolluted populations is much smaller (0.003), in spite of the fact that these populations cover a much larger geographic area. Genetic distances between parental and progeny populations are always larger on polluted plots in comparison to unpolluted ones. Most interesting is the peripheral position of the polluted populations on the scatterdiagram showing the results of Principal Coordinate Analysis. This indicates that it is likely that pollution caused a substantial change in allelic frequencies.

This research revealed only small differences in genetic diversity between the groups of polluted and unpolluted populations. There is no significant difference in the number of alleles per locus or in the percentage of polymorphic loci or observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities.

VIRI

- BARTELS, H., 1964. Über die Charakterisierung von Fichtensaatgut aus verschiedenen Höhenlagen durch Enzymaktivitäten. V: Forstsamengewinnung und Pflanzenanzucht für das Hochgebirge (ur. H. Schmidt-Vogt). s. 83-92.
- BARTELS, H., 1971. Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta (Berl.)* 99, s. 283-289.
- BERGMANN, F., 1971. Genetische untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung, I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsamtgut. *Allg. Forst u. J. Ztg.*, 142, s. 278-280.
- BERGMANN, F., 1973. Genetische untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. II. Genetische Kontrolle von Esterase- und Leucinaminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen. *Theoret. Appl. Genet.*, 43, s. 222-225.

- BERGMANN, F./SCHOLZ, F., 1985. Effects of Selection Pressure by SO₂ Pollution on Genetic Structure of Norway Spruce (*Picea abies*). V: Population Genetics in Forestry, Lecture Notes in Biomathematics. Berlin, Springer Verlag, s. 267-275.
- BERGMANN, F./SCHOLZ, F., 1987. The Impact of Air Pollution on the Genetic Structure of Norway Spruce. *Silvae Genetica*, 36, 2, s. 80-83.
- BERGMANN, F./GREGORIUS, H.-R./LARSEN, J.B., 1990. Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*). Are they related to the species decline? *Genetica*, 82, s. 1-10.
- BRUS, R., 1995. Vpliv onesnaževanja ozračja na genetsko strukturo bukovih populacij v Sloveniji. Magistrsko delo, BF, Oddelek za gozdarstvo, Ljubljana, 87 s.
- BRUS, R./LONGAUER, R., 1995. Nekateri genetske značilnosti jelke (*Abies alba* Mill.) v Sloveniji. Zbornik gozdarstva in lesarstva, Ljubljana, 46, s. 45-74.
- COMPS, B./THIEBAUT, B./SUGAR, I./TRINAJSTIĆ, I./PLAZIBAT, M., 1991. Genetic variation of the Croatian beech stands (*Fagus sylvatica* L): spatial differentiation in connection with the environment. *Ann.Sci.For.*, 48, s. 15-28.
- FERET, P.P./BERGMANN, F., 1976. Gel Electrophoresis of Proteins and Enzymes. V: Modern Methods in Forest Genetics. Hamburg, Springer Verlag, s. 49-77.
- FOWLER, J./COHEN, L., 1992. Practical Statistics for Field Biology. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, 227 s.
- GEBUREK, T./SCHOLZ, F., 1985. Über Selektionswirkungen bei Forstpflanzenpopulationen infolge von Luftverunreinigungen. *Forstarchiv*, 56, 6, s. 234-238.
- GEBUREK, T./SCHOLZ, F./BERGMANN, F., 1986. Variation in Aluminium-Sensitivity Among *Picea abies* (L.) Karst. Seedlings and Genetic Differences Between their Mother Trees as Studied by Isozyme-Gene-Markers. *Angev. Botanik* 60, s. 451-460.
- GÖMÖRY, D., 1992. Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology and Management*, 54, s. 215-223.
- GÖMÖRY, D./VYŠNÝ, J./COMPS, B./THIEBAUT, B., 1992. Geographical patterns of genetic differentiation and diversity in european beech (*Fagus sylvatica* L.) populations in France. *Biologia*, Bratislava, 47, 4, s. 571-579.
- GREGORIUS, H.R./HATTEMER, H.H./BERGMANN, F./MÜLLER-STARCK, G., 1985. Umweltbelastung und Anpassungsfähigkeit von Baumpopulationen. *Silvae Genetica*, 34, 6, s. 230-241.

- GREGORIUS, H.R./KRAUHAUSEN, J./MÜLLER-STARCK, G., 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seed of *Fagus sylvatica* L. *Heredity* 57, s. 255-262.
- HATTEMER, H.H./STARKE, R./ZIEHE, M., 1993. Changes of genetic structures in beech populations. V: The Scientific Basis for the Evaluation of the Genetic Resources of Beech, Ur.: H.J. Muhs, Proceedings of an EC workshop. Ahrensberg, 1-2 July 1993, s. 233-248.
- KARNOSKY, D.F./HOUSTON, D.B., 1978. Genetics of air pollution tolerance of trees in the northeastern United States. V: Proc. 26th Northeastern Forest Tree Improv. Conf.. Pensylv. State Univ., s. 161-171.
- KIM, Z.S., 1979. Inheritance of leucine aminopeptidase and acid phosphatase isozymes in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica*, 28, 2-3, s. 68-71.
- KIM, Z.S., 1985. Viability Selection at an Allozyme Locus During Development in European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica*, 34, 4-5, s. 181-186.
- KOLAR, I., 1989. Umiranje gozdov v Šaleški dolini. Magistrsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za gozdarstvo.
- KORDIŠ, F., 1993. Dinarski jelovo bukovi gozdovi v Sloveniji. Strokovna in znanstvena dela, Ljubljana, 112, 139 s.
- LARSEN, J.B., 1986. Das Tannensterben: Eine Neue Hypotese zur Klärung des Hintergrundes dieser rätselhaften Komplexkrankheit der Weißtanne (*Abies alba* Mill.). *Forstw.Cbl.*, 105, s. 381-396.
- LEŠNJAK, M./HRČEK, D./BATIČ, F./ŠOLAR, M./KOLAR, I./FERLIN, F., 1989. Air pollution and damage on vegetation near TE Šoštanj thermal power plant in Slovenia. V: Man and his Ecosystem, ur. Brassler & Milder, Proceedings of the 8th World Clean Air Congress 1989. The Hague, Vol. 2, s. 125-130.
- MEJNARTOWICZ, L.E., 1983. Changes in genetic structure of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) population affected by industrial emission of fluoride and sulphur dioxide. *Genetica Polonica*, 24, 1, s. 41-50.
- MEJNARTOWICZ, L.E., 1984. Enzymatic investigations on tolerance in forest trees. V: Gaseous air pollutants and plant metabolism. Butterworths London, s. 381-398.
- MEJNARTOWICZ, L.E./BIALBOK, S./KAROLEWSKI, P., 1978. Genetic characteristics of Scots pine specimens resistant and susceptible to SO₂ action. *Arboretum Kornickie*, 23, s. 233-238.
- MEJNARTOWICZ, L.E./PALOWSKI, B., 1989. Studies of Scots pine populations in polluted and clean areas. V: Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag, s. 115-125.

- MÜLLER-STARCK, G., 1985. Genetic Differences between "Tolerant" and "Sensitive" Beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an Environmentally Stressed Adult Forest Stand. *Silvae Genetica*, 34, 6, s. 241-247.
- MÜLLER-STARCK, G./HATTEMER, H.H., 1989. Genetische Auswirkungen von Umweltstreß auf Altbestände der Buche (*Fagus sylvatica* L.). *Forstarchiv*, 60, s. 17-22.
- NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numbers of individuals. *Genetics*, 89, s. 583-590.
- ONESNAŽENOST ZRAKA V SLOVENIJI V LETU 1993. 1994. Ljubljana, Hidrometeorološki zavod Republike Slovenije, 76 s.
- PARADIŽ, B., 1982. Onesnaževanje termoelektarn z SO₂ v primerjavi z drugimi onesnaževalci zraka v SR Sloveniji. HMZ RS, EL-143, 13 s.
- PARADIŽ, B./BONAČ, M./HRČEK, D./PLANINŠEK, T./ŠEGULA, A./ŠTEFELJ, I./VEDENIK, M./ZUPANČIČ, T./ZUŽIČ, D., 1981. Zboljšanje kakovosti zraka v Zasavju s sanacijo TE Trbovlje II in izgradnjo termoelektrarne - toplarne Trbovlje. HMZ RS, 66 s.
- PLANINŠEK, A./MEDVED, M./MLINAR, A./BONAČ, M./DREV, J./BRUMEN, S./STERGAR, A., 1981. Določitev škodljivih snovi v zraku Celja. Zdravstveni center Celje, TOZD Center socialna medicina in higiena Celje. 47 s.
- PROPADANJE (UMIRANJE) GOZDOV V SLOVENIJI, 1985. *Gozdarski vestnik*, 10, s. 356-362.
- ROLOFF, A., 1986. Morphologie der Kronenentwicklung von *Fagus sylvatica* L. (Rotbuche) unter besonderer Berücksichtigung möglicherweise neuartiger Veränderungen. Göttingen, Institut für Forstbotanik der Universität Göttingen, 177 s.
- SCHOLZ, F., 1986. Genetic effects of air pollutants. *Proceedings of the 18th IUFRO Congress, Div. 2, vol. 1.*, Ljubljana, s. 286-294.
- ŠOLAR, M., in sodelavci, 1986. Onesnaževanje zraka in propadanje gozdov v Sloveniji. V: *Gozd in okolje - FOREN 86*, Ljubljana, s. 57-84.
- VIDAKOVIĆ, M./KRSTINIĆ, A., 1985. Genetika i oplemenjivanje šumskog drveća. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 505 s.
- YAZDANI, R./MUONA, O./RUDIN, D./SZMIDT, A.E., 1985. Genetic structure of a *Pinus sylvestris* L. Seed-Tree Stand and Naturally Regenerated Understory. *Forest Sci.*, 31, 2, s. 430-436.

