

GDK: 165.3:231:174.7 *Picea abies* (046)

Prispelo / Received: 26. 07. 2005

Sprejeto / Accepted: 19. 09. 2005

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

## GENETSKI VIDIK NARAVNE OBNOVE SMREKOVEGA SESTOJA NA STALNI RAZISKOVALNI PLOSKVI ŠIJEC NA POKLJUKI

Gregor BOŽIČ<sup>1</sup>

### Izvleček

Namen raziskave je bil preveriti sposobnost naravnega obnavljanja genetskega vira *Picea abies* (L.) Karst. na objektu stalne raziskovalne ploskve Šijec na Pokljuki, Slovenija. Genetsko strukturo zrelega sestoja smreke in genetsko strukturo naravnega mladja v različno velikih pomladitvenih jedrih smo preučili z elektroforetsko analizo 15 polimorfni izoencimskih genskih lokusov desetih encimskih sistemov (GDH, F-EST, GOT, IDH, LAP, MDH, PGI, PGM, SKDH, 6-PGDH). Pod določenimi pogoji je bila genetska struktura 101 dreves naravnega pomladka in 64 dreves sestoja, iz katerega je nastal, popolnoma primerljiva. Obnova smrekovega sestoja z naravnim pomlajevanjem zagotavlja trajno ohranjanje genskega vira smreke in je v primeru večjih pomladitvenih jeder tudi zagotovilo za neprekinjeno ohranjanje njegove prilagoditvene sposobnosti.

**Ključne besede:** *Picea abies* (L.). Karst., naravno pomlajevanje, genetska struktura, izoencimi, ohranjanje gozdnih genskih virov

### *THE GENETIC ASPECT OF THE SPRUCE STAND NATURAL REGENERATION IN THE PERMANENT FOREST RESEARCH PLOT ŠIJEC ON THE POKLJUKA PLATEAU*

### Abstract

*The aim of the research was to check the ability of natural regeneration for sustainable conservation of Picea abies (L.) Karst. genetic resource in the permanent forest research plot Šijec on the Pokljuka plateau, Slovenia. The genetic structures of spruce stand and its natural regeneration centres of different size have been studied by means of electrophoretic analysis of ten enzyme systems (GDH, F-EST, GOT, IDH, LAP, MDH, PGI, PGM, SKDH, 6-PGDH) for 15 polymorphic isozyme gene loci. Under certain conditions, the genetic structures of 64 adult mother trees of the basic stand compared to 101 young spruce trees from the regeneration centres included in the study were closely similar. The regeneration of spruce stand by natural regeneration permanently conserves the spruce genetic resource and is, in the case of bigger regeneration centres, also an assurance of its continuous adaptability.*

**Key words:** *Picea abies* (L.). Karst, natural regeneration, genetic structure, isozymes, forest gene conservation

---

<sup>1</sup> dr. G. B., univ.dipl.inž.gozd., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, SLO  
gregor.bozic@gozdis.si

**VSEBINA  
CONTENTS**

<b>1 UVOD .....</b>	<b>45</b>
INTRODUCTION	
<b>2 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>46</b>
MATERIAL AND METHODS	
<b>3 REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
RESULTS	
<b>4 RAZPRAVA.....</b>	<b>54</b>
DISCUSSION	
<b>5 SUMMARY .....</b>	<b>56</b>
POVZETEK	
<b>6 VIRI .....</b>	<b>57</b>
REFERENCES	
<b>7 ZAHVALA .....</b>	<b>60</b>
ACKNOWLEDGEMENTS	

## 1 UVOD INTRODUCTION

Zaradi dolge življenjske dobe so drevesa nenehno izpostavljena močnim večstranskim in spreminjajočim se razmeram življenjskega okolja. Velik genetski potencial je pogoj za njihovo prilagodljivost spremembam življenjskega okolja, razmnoževanju in preživetju sploh. Glede na nepredvidljive spremembe življenjskega okolja v prihodnosti je bistvenega pomena, da to genetsko variabilnost zavarujemo in jo ohranimo. Poznavanje različnih modelov in konceptov nam daje možnost za izbiro primernih metod izbora in formalnega varstva gozdnih genskih virov. Čeprav genske vire lahko varujemo s statičnimi in dinamičnimi postopki, *ex situ* ali *in situ* (KOSKI *et al.* 1997), prevladuje soglasje, da so za ohranitev prilagoditvene sposobnosti populacij dinamični postopki *in situ* primernejši od vseh drugih postopkov (FINKELDEY 1993). Učinkovito varstvo genetske prilagoditvene sposobnosti populacij pa poleg izbire ustreznih genskih virov, t.j. populacij, ki kažejo določene ali posebej za prilagajanje pomembne genetske znake, terja tudi preverjanje uresničevanja in uspeha varstvenih ukrepov (GREGORIUS 1991). To med drugim pomeni tudi preverjanje sposobnosti posameznih varovanih populacij za uspešen prenos genetskih informacij z nosilcev na bodoče generacije. Z obnovo gozda se namreč oblikujejo dednostne zasnove bodočega gozda, od katere je odvisna stabilnost bodočih sestojev. Preverjanje prilagoditvene sposobnosti populacij v primeru varstva gozdnih genskih virov *in situ* opravimo z raziskavo genetske strukture zrelega sestoja in njegovega potomstva v posameznih varovanih populacijah. Tako lahko še pravočasno odkrijemo nevarnosti in sprejmemo nadaljnje ukrepe za preprečevanje morebitne izgube genskih virov. To je še zlasti pomembno pri avtohtonih populacijah gozdnih drevesnih vrst, ki so rezultat dolgotrajne naravne selekcije in naravnega razvoja v danem okolju. Gozdni genski viri so namreč lahko ogroženi kljub naravni obnovi sestojev, saj lahko antropogeni vplivi neposredno ali posredno vplivajo na biotsko pestrost na ravni ekosistema, vrstne raznolikosti in genetske variabilnosti znotraj vrste (MUHS 1997).

Z našo raziskavo želimo predvsem osvetliti genetski vidik postopne obnove zrelega sestoja z naravnim pomlajevanjem in pri tem spoznati določene lastnosti populacije, ki so pomembne za izdelavo strokovnih izhodišč za ohranjanje obstoječe naravne genetske variabilnosti smreke *in situ*. Raziskava je specifično usmerjena v analizo uspešnosti prenosa genetskih informacij z nosilcev v zrelem sestoju na potomce z naravnim

pomlajevanjem. Hipoteza, ki jo preverjamo, je, da naravni pomladek v primernem obsegu lahko zagotavlja ohranitev genetske pestrosti sestoja v pomlajevanju. Hkrati pa množičnost mlade generacije v pomladitvenih jedrih še ne pomeni pojavljanja novih kombinacij genetskih zasnov in s tem tudi ne prispeva k večji variabilnosti v populaciji mladja. Cilj raziskave je ugotoviti genetsko strukturo naravnega pomladka, ki je nastajal postopno z večanjem pomladitvenih jeder, in jo primerjati z genetsko strukturo zrelega sestoja na tem rastišču. Ugotoviti želimo, ali so razlike v genetskih strukturah med zrelim sestojem in naravnim mladjem ter ali so razlike tudi med pomladitvenimi jedri. Zanima nas tudi, ali se frekvence genotipov na posameznih genskih lokusih vzorčene populacije oziroma njihovih delnih populacij ujemajo s frekvencami genotipov, pričakovanih s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem, ki nastanejo s pomočjo panmiktične reprodukcije.

## **2 MATERIAL IN METODE** **MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 RAZISKOVALNI OBJEKT** **RESEARCH OBJECT**

Genetski vidik postopne obnove sestoja smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) smo preučevali na objektu stalne raziskovalne ploskve Gozdarskega inštituta Slovenije pri visokem barju Šijec na Pokljuki (N 46° 20' 06" / E 13° 59' 42", 1170 m n.m.). Objekt gradijo zrela drevesa, stara od 130 do 200 let (BOŽIČ / LEVANIČ 1998), in pomladek, v katerem smo izbrali 2 različno veliki pomladitveni jedri (D in E), ki sta bili tudi predmet dosedanjih detajlnih inštitutskih raziskav v okviru projekta Rizosfera, L4-7402 (primerjaj SMOLEJ *et al.* 2000, DIACI / SMOLEJ / RUPEL 2000, KRAIGHER *et al.* 2000). Starost pomladka v manjšem jedru D je bila ocenjena na najmanj 15 let, v večjem jedru E na najmanj 20 let.

### **2.2 VZORČENJE** **SAMPLING METHODOLOGY**

V vzorcu zrelega sestoja smo na površini 1 ha zajeli 64 naključno izbranih vitalnih, nadraslih oziroma sorastlih dreves različne starosti. Z vsakega od poskusnih dreves smo v zimskem obdobju odvzeli vejo s spečimi popki, ki smo jih uporabili za ekstrakcijo

encimov. V vzorcu naravnega mladja pa smo zajeli dve pomladitveni jedri (manjše pomladitveno jedro »D« in večje pomladitveno jedro »E«). Glede na posamezno pomladitveno jedro smo enakomerno zajeli drevesa iz treh višinskih razredov, tj. nizka, srednje visoka in visoka. Z vsakega drevesa smo iz spodnjih vej in stranskih poganjkov odvzeli 5 spečih popkov. Velikost vzorca je bila okoli 50 dreves na pomladitveno jedro.

### **2.3 GENETSKE ANALIZE** GENETIC ANALYSES

Vzorčene subpopulacije smreke smo analizirali z metodo izoencimske horizontalne elektroforeze na škrobnem gelu. Ekstrakcijski pufer smo pripravili po RHODES (1977) (modif. KONNERT / MAURER 1995). Elektroforezo, barvanje gelov in odčitavanje elektroforegramov smo opravljali po standardnih metodoloških postopkih za analizo smrekovih vzorcev (KONNERT / MAURER 1995). Analizirali smo 10 encimskih sistemov, ki so kodirani s 15 v analizi polimorfnimi genskimi lokusi, in sicer: glutamat dehidrogenaza (GDH, EC 1.4.1.2, GDH-A), fluorescenčne esteraze (FEST, EC 3.1.1.1, FEST-B), glutamat oksalacetat transaminaza (GOT oziroma AAT, EC 2.6.1.1, GOT-A, GOT-B, GOT-C), izocitrat dehidrogenaza (IDH, EC 1.1.1.42, IDH-A, IDH-B), levcin aminopeptidaza (LAP, EC 3.4.11.1, LAP-B), malat dehidrogenaza (MDH, EC 1.1.1.37, MDH-B, MDH-C), fosfoglukoza izomeraza (PGI, EC 5.3.1.9, PGI-B), fosfoglukomutaza (PGM, EC 2.7.5.1, PGM-A), šikimat dehidrogenaza (SKDH, EC 1.1.1.25, SKDH-A), 6-fosfoglukonat dehidrogenaza (6-PGDH, EC 1.1.1.44, 6-PGDH-B, 6-PGDH-C). V oklepajih so podane okrajšave za encimske sisteme, kode E.C. ter analizirane genske lokuse. Kot polimorfen lokus smo upoštevali vsak genski lokus, na katerem smo ugotovili vsaj še en alel, ne glede na njegovo relativno pogostnost v preučevani populaciji. Izoencimske analize smo opravili v genetskem laboratoriju na Bayerische Amt fuer forstliche Saat- und Pflanzenzucht v Teisendorfu, Nemčija, pod vodstvom dr. Monike Konnert.

Frekvenčne porazdelitve alelov na polimorfnih genskih lokusih smo opisali s 3 alelnimi profili, ki smo jih določili po FINKELDEY (1993) kot: i) nizko stopnjo polimorfizma, če smo na posameznem genskem lokusu zasledili pogosti alel (alelna frekvenca > 80 %) in enega ali več redkih alelov, ii) visoko stopnjo polimorfizma, če sta na posameznem genskem lokusu lahko opažena najmanj dva alela kot prevladujoča (alelna

frekvenca > 20 %), iii) netipični profil, če alelno strukturo na posameznem genskem lokusu ne moremo uvrstiti v 1. ali 2. profil.

Alelno pestrost subpopulacij smo ocenili s povprečnim številom alelov na lokus ( $A/L$ ). Za opis genetske variabilnosti smo uporabili merila alelne raznolikosti ( $v$ ; GREGORIUS 1978, 1987) in heterozigotnosti ( $H_a$ ,  $H_c$ ; GREGORIUS / KRAUHAUSEN / MUELLER-STARCK 1986). Stopnjo dejansko opažene heterozigotnosti ( $H_a$ ) smo izračunali z relativnim deležem genskih lokusov, na katerih je osebek v populaciji heterozigoten. Pogojeno heterozigotnost ( $H_c$ ) pa smo izračunali z razmerjem med ugotovljeno heterozigotnostjo ( $H_a$ ) in glede na ugotovljene frekvence največjo možno heterozigotnostjo ( $H_{max}$ ). Stopnjo genetske diferenciranosti med njimi smo podali z merilom genetske razdalje ( $d_0$ ; GREGORIUS 1974). Statistično primerjavo genetskih struktur med subpopulacijami pomladitvenih jeder oziroma zrelega sestoja z njegovim pomladkom smo napravili z G-testom homogenosti alelnih frekvenc po lokusih. Ničelno hipotezo homogenosti alelnih porazdelitev med subpopulacijami zavračamo na nivoju tveganja  $\alpha = 0,05$ . Za izračun posameznih parametrov genetske variabilnosti in statističnih primerjav smo uporabili program GSED (GILLET 1998).

Za preverjanje, kako se v sestoji ali mladju ugotovljene frekvence genotipov pri posameznih lokusih ujemajo s frekvencami genotipov, pričakovanimi po Hardy-Weinbergovem ravnotežju, smo uporabili natančni Hardy-Weinbergov verjetnostni test (HALDANE 1954, GUO / THOMPSON 1992) v programu GENEPOP 3.1d (RAYMOND / ROUSSET 1995). Ničelna hipoteza, ki jo testiramo, je, da je zveza gamet naključna. Ocena verjetnosti ( $p$ ) je izračunana z metodo polnega preštevanja po LOUIS / DEMPSTER (1987), ob prisotnosti več kot 5 alelov na lokus pa z metodo markovske verige po GUO / THOMPSON (1992). Za tvorbo markovskih verig smo uporabili naslednje vhodne vrednosti: vhodno število (1000), število serij (100), število ponovitev na serijo (1000). Pričakovano število homozigotov oziroma heterozigotov smo izračunali s korekcijo za male vzorce po LEVENE (1949).

Hardy-Weibergovo strukturo preverjamo po lokusih ločeno za vsako testno subpopulacijo posebej. Pri tem se ocena verjetnosti ( $p$ ) nanaša izključno na ničelno hipotezo ( $H_0$ ), ki je definirana kot naključno združevanje gamet;  $F_{is} = 0$  (testiramo, ali vrednost  $F_{is}$  ponazarja značilni odklon od panmiksije). Ob zavrnitvi ničelne hipoteze smo za sprejem alternativne

hipoteze ( $H_1$ ), ki je definirana kot primankljaj ali presežek števila heterozigotov ( $F_{is} > 0$  ali  $F_{is} < 0$ ) v subpopulaciji, uporabili strožji U-test. Koeficiente inbridinga ( $F_{is}$ ) smo ocenjevali ob pomoči Wrightove F- statistike s cenilko po WEIR / COCKERHAM (1984) in s cenilko po ROBERTSON / HILL (1984), ki ima pri ničelni hipotezi najmanjšo varianco in je tudi v zelo tesni povezavi z U-testom (ROUSSET / RAYMOND 1995). Ocena koeficienta inbridinga  $F_{is}$  po Wrightovi F-statistiki nakazuje, v kakšnem obsegu se dejanski heterozigotni deleži populacije razlikujejo od pričakovanih heterozigotnih deležev, ki nastanejo pri panmiksični oplodnji (Hardy – Weinbergovo ravnotežje).

### 3 REZULTATI RESULTS

Relativne alelne frekvence po posameznih lokusih za sestoj in mladje ter za posamični pomladitveni jedri so navedene v preglednici 1. Od 15 v analizi polimorfni genskih lokusov 10 lokusov kaže nizko stopnjo alelnega polimorfizma. Ti so GDH-A, FEST-B, GOT-A, GOT-B, IDH-A, IDH-B, MDH-B, MDH-C, PGM-A in SKDH-A. Frekvenca glavnega alela vedno presega 80 %. Visoko stopnjo alelnega polimorfizma odsevajo 4 lokusi, in sicer: GOT-C, PGI-B, 6-PGDH-B in 6-PGDH-C. Lokus LAP-B ima netipičen profil. Frekvenca glavnega alela je v razponu od 64,4 % do 72,4 %. Frekvence nad 10 % lahko dosegata še 2 alela, medtem ko se drugi aleli pojavljajo v nizkih frekvencah.

Preglednica 1: Alelne frekvence v subpopulacijah zrelega sestoja smreke, njegovega mladja ter pomladitvenih jedrih, s prikazom za 15 polimorfni genskih lokusov

Table 1: Allelic frequencies in subpopulations of adult spruce stand, its young component and regeneration centres, by 15 polymorphic gene loci

Lokus <i>Locus</i>	Alel <i>Allele</i>	Sestoj <i>Stand</i> n = 64	Jedro D <i>Regeneration centre D</i> n = 49	Jedro E <i>Regeneration centre E</i> n = 52	Mladje (D+E) <i>Young component</i> n = 101
IDH-A	2	0,016	0,000	0,000	0,000
	3	0,984	1,000	1,000	1,000
IDH-B	2	1,000	0,990	1,000	0,995
	3	0,000	0,010	0,000	0,005
MDH-B	1	0,008	0,000	0,000	0,000
	2	0,984	1,000	1,000	1,000
	3	0,008	0,000	0,000	0,000

(se nadaljuje ...)

Lokus <i>Locus</i>	Alel <i>Allele</i>	Sestoj <i>Stand</i> n = 64	Jedro D <i>Regeneration centre D</i> n = 49	Jedro E <i>Regeneration centre E</i> n = 52	Mladje (D+E) <i>Young component</i> n = 101
MDH-C	2	0,000	0,000	0,010	0,005
	4	1,000	1,000	0,990	0,995
LAP-B	1	0,055	0,010	0,048	0,030
	2	0,023	0,010	0,010	0,010
	3	0,141	0,122	0,096	0,109
	4	0,680	0,724	0,644	0,683
	5	0,000	0,000	0,038	0,020
	6	0,102	0,122	0,163	0,144
GOT-A	1	0,008	0,000	0,000	0,000
	2	0,992	1,000	1,000	1,000
GOT-B	1	0,008	0,010	0,000	0,005
	2	0,992	0,990	1,000	0,995
GOT-C	2	0,344	0,408	0,404	0,406
	3	0,008	0,000	0,000	0,000
	4	0,633	0,561	0,587	0,574
	5	0,016	0,031	0,010	0,020
PGM-A	2	0,953	0,949	0,942	0,946
	3	0,047	0,051	0,058	0,054
PGI-B	2	0,312	0,224	0,394	0,312
	3	0,688	0,776	0,606	0,688
GDH-A	1	0,008	0,000	0,000	0,000
	2	0,992	1,000	1,000	1,000
SKDH-A	1	0,023	0,051	0,029	0,040
	2	0,047	0,010	0,010	0,010
	3	0,883	0,929	0,942	0,936
	5	0,016	0,010	0,010	0,010
	6	0,008	0,000	0,010	0,005
	7	0,023	0,000	0,000	0,000
6PGDH-B	1	0,000	0,031	0,000	0,015
	2	0,633	0,714	0,654	0,683
	3	0,008	0,000	0,000	0,000
	5	0,359	0,255	0,346	0,302
6PGDH-C	1	0,008	0,000	0,000	0,000
	2	0,602	0,429	0,577	0,505
	4	0,000	0,020	0,000	0,010
	5	0,391	0,551	0,423	0,485
FEST-B	1	0,047	0,031	0,087	0,059
	2	0,953	0,969	0,913	0,941

n - število dreves v vzorcu / *number of trees sampled*

V sestoju smo na 15 polimorfnih genskih lokusih odkrili 40 alelov, v mladju pa skupaj 37 različnih alelov. Razlika v vrednosti parametra A/L za genski sklad izhaja iz števila



odkritih oziroma neodkritih redkih alelov (preglednica 2). V vzorcu “mladje” nismo odkrili 9 redkih alelov, ki smo jih sicer dobili v vzorcu “sestoj” (IDH-A<sub>2</sub>, MDH-B<sub>1</sub>, MDH-B<sub>3</sub>, GOT-A<sub>1</sub>, GOT-C<sub>3</sub>, GDH-A<sub>1</sub>, SKDH-A<sub>7</sub>, 6-PGDH-B<sub>3</sub>, 6-PGDH-C<sub>1</sub>). Po drugi strani pa v vzorcu “sestoj” nismo odkrili 6 redkih alelov, ki smo jih dobili v vzorcu “mladje” (IDH-B<sub>3</sub>, MDH-C<sub>2</sub>, LAP-B<sub>5</sub>, LAP-B<sub>7</sub>, 6-PGDH-B<sub>1</sub>, 6-PGDH-C<sub>4</sub>). Ker vse navedene alele uvrščamo med redke (s frekvenco < 0,050) in večinoma splošne alele v preučevanih populacijah smreke v Sloveniji (BOŽIČ 2002), menimo, da jih nismo odkrili zaradi velikosti vzorca.

Preglednica 2: Primerjava kazalnikov genetske variabilnosti zrelega sestoja smreke (ZR) z njegovim pomladkom (ML): število alelov na lokus (A/L), alelna raznolikost ( $v$ ), povprečna heterozigotnost ( $H_a$ ,  $H_c$ ), genetska razdalja ( $d_0$ ) in vrednost G testa homogenosti genetskih struktur po lokusih, z nivojem značilnosti  $\alpha = 0,05$  (\*)

Table 2: Comparison of genetic variability parameters between the adult (ZR) and young component of the stand (ML): number of alleles per locus (A/L), allelic diversity ( $v$ ), average heterozygosity ( $H_a$ ,  $H_c$ ), genetic distance ( $d_0$ ) and the value of G-test of the homogeneity of genetic structures by loci; significance level  $\alpha = 0,05$  (\*)

Lokus Locus	A/L		$v$		$H_a$ (%)		$H_c$ (%)		$d_0$ (%)	G vrednost G value
	ZR	ML	ZR	ML	ZR	ML	ZR	ML		
IDH-A	2	1	1,03	1,00	3,1	0,0	100,0	-	1,6	3,807 nz
IDH-B	1	2	1,00	1,01	0,0	1,0	-	100,0	0,5	0,984 nz
MDH-B	3	1	1,03	1,00	3,1	0,0	100,0	-	1,6	3,807 nz
MDH-C	1	2	1,00	1,01	0,0	1,0	-	100,0	0,5	0,984 nz
LAP-B	5	7	2,02	2,00	50,0	49,5	78,0	78,1	7,0	8,788 nz
GOT-A	2	1	1,02	1,00	1,6	0,0	100,0	-	0,8	1,899 nz
GOT-B	2	2	1,02	1,01	1,6	1,0	100,0	100,0	0,3	0,104 nz
GOT-C	4	3	1,93	2,02	51,6	60,4	70,2	70,9	6,6	3,222 nz
PGM-A	2	2	1,10	1,12	6,2	10,9	66,7	100,0	0,8	0,093 nz
PGI-B	2	2	1,75	1,75	46,9	40,6	75,0	65,1	0,1	0,000 nz
GDH-A	2	1	1,02	1,00	1,6	0,0	100,0	-	0,8	1,899 nz
SKDH-A	6	5	1,28	1,14	23,4	8,9	100,0	69,2	6,9	11,207 *
6PGDH-B	3	3	1,89	1,79	46,9	43,6	63,8	68,7	6,5	5,927 nz
6PGDH-C	3	3	1,94	2,04	37,5	49,5	47,1	50,0	10,4	6,779 nz
FEST-B	2	2	1,10	1,13	9,4	9,9	100,0	83,3	1,3	0,243 nz
Genski sklad Gene pool	2,67	2,47	1,24	1,23	18,9	18,4	77,9	76,1	3,0	

nz – ni značilno / non significant

Alelna raznolikost osebkov v mladju se kljub določenim razlikam na posameznih lokusih v povprečju bistveno ne razlikuje od alelni raznolikosti osebkov v zrelem sestoju. Enako velja tudi za stopnjo povprečne dejanske in pogojene heterozigotnosti. Največja možna stopnja pogojene heterozigotnosti je v subpopulaciji zrelega sestoja realizirana 77,9 %, v mladju pa 76,1 %. Da imata sestoj in njegovo mladje zelo podobni, skoraj identični alelni strukturi, nakazuje tudi podatek o povprečni alelni razdalji med njima ( $d_0 = 3$  %). Vzorčni populaciji se ločita le v 3 % alelnem deležu preučevanega genskega sklada. Največjo genetsko diferenciacijo smo dobili na lokusih 6-PGDH-C (10,4 %), LAP-B (7,0 %), SKDH-A (6,9 %), GOT-C (6,6 %) in 6-PGDH-B (6,5 %). Na enem od preučevanih lokusov je razlika v alelnih strukturah celo značilna, s stopnjo tveganja  $\alpha = 0,05$ .

Preglednica 3: Primerjava kazalnikov genetske variabilnosti v mladju na osnovi analize manjšega (ML-D) in večjega (ML-E) pomladitvenega jedra: število alelov na lokus (A/L), alelna raznolikost ( $v$ ), povprečna heterozigotnost ( $H_a$ ,  $H_c$ ), genetska razdalja ( $d_0$ ) in vrednost G testa homogenosti genetskih struktur po lokusih, z nivojem značilnosti  $\alpha = 0,05$  (\*);  $\alpha = 0,01$  (\*\*);

Table 3: Comparison of genetic variability parameters in young components of the stand according to smaller (ML-D) and bigger (ML-E) regeneration centres: number of alleles per locus (A/L), allelic diversity ( $v$ ), average heterozygosity ( $H_a$ ,  $H_c$ ), genetic distance ( $d_0$ ) and the value of G-test of the homogeneity of genetic structures by loci; significance level  $\alpha = 0,05$  (\*);  $\alpha = 0,01$  (\*\*);

Lokus Locus	A/L		v		$H_a$ (%)		$H_c$ (%)		$d_0$ (%)	G vrednost G value
	ML-D	ML-E	ML-D	ML-E	ML-D	ML-E	ML-D	ML-E		
IDH-A	1	1	1,00	1,00	0,0	0,0	-	-	-	-
IDH-B	2	1	1,02	1,00	2,0	0,0	100,0	-	1,0	1,452 nz
MDH-B	1	1	1,00	1,00	0,0	0,0	-	-	-	-
MDH-C	1	2	1,00	1,02	0,0	1,9	-	100,0	1,0	1,332 nz
LAP-B	6	6	1,80	2,20	42,9	55,8	77,8	78,4	11,7	10,829 nz
GOT-A	1	1	1,00	1,00	0,0	0,0	-	-	-	-
GOT-B	2	1	1,02	1,00	2,0	0,0	100,0	-	1,0	1,452 nz
GOT-C	3	3	2,07	1,97	63,3	57,7	72,1	69,8	2,5	1,228 nz
PGM-A	2	2	1,11	1,12	10,2	11,5	100,0	100,0	0,7	0,044 nz
PGI-B	2	2	1,53	1,91	36,7	44,2	81,8	56,1	17,0	6,860 **
GDH-A	1	1	1,00	1,00	0,0	0,0	-	-	-	-
SKDH-A	4	5	1,16	1,13	6,1	11,5	42,9	100,0	2,3	1,973 nz
6PGDH-B	3	2	1,74	1,83	36,7	50,0	64,3	72,2	9,1	6,004 *
6PGDH-C	3	2	2,05	1,95	36,7	61,5	40,9	72,7	14,8	6,810 *
FEST-B	2	2	1,06	1,19	6,1	13,5	100,0	77,8	5,6	2,961 nz
Genski sklad Gene pool	2,27	2,13	1,21	1,24	16,2	20,5	72,5	78,4	4,5	

nz – ni statistično značilno / not statistically significant

Vrednosti v preglednici 2 dovoljujejo ugotovitev, da se sestoj in naravni pomladek v genetski strukturi komaj razlikujeta, to velja za srednje vrednosti genetskih parametrov in tudi za večino genskih lokusov. Hipoteze, da množičnost mlade generacije v pomladitvenih jedrih pomeni tudi pojavljanje novih kombinacij genetskih zasnov in prispeva k večji genetski variabilnosti v populaciji, v tem primeru ne moremo potrditi.

Preglednica 4: Koeficient inbridinga  $F_{is}$  zrelega sestoja, pomladitvenih jeder in mladja po lokusih; krepki tisk označuje značilni odmik ( $p < 0,05$ ) frekvenc genotipov od Hardy-Weinbergovega ravnotežja, podčrtane vrednosti označujejo značilni deficit heterozigotov.

Table 4: Inbreeding coefficient  $F_{is}$  of adult stand, its young component of the stand and regeneration centres by loci. Bold values present the significant deviations ( $p < 0,05$ ) of genotype frequencies from the Hardy-Weinberg equilibrium. Underlined values present the significance heterozygote deficiency.

Lokus Locus	Sestoj Stand		Jedro D Regeneration centre D		Jedro E Regeneration centre E		Mladje (D+E) Young components of the stand (D+E)	
	$F_{is} (W\&C)$	$F_{is} (R\&H)$	$F_{is} (W\&C)$	$F_{is} (R\&H)$	$F_{is} (W\&C)$	$F_{is} (R\&H)$	$F_{is} (W\&C)$	$F_{is} (R\&H)$
IDH-A	-0,008	-0,008	-	-	-	-	-	-
IDH-B	-	-	-	-	-	-	-	-
MDH-B	-0,004	-0,000	-	-	-	-	-	-
MDH-C	-	-	-	-	-	-	-	-
LAP-B	+0,017	+0,063	+0,047	+0,052	-0,013	-0,018	+0,014	+0,007
GOT-A	-	-	-	-	-	-	-	-
GOT-B	-	-	-	-	-	-	-	-
GOT-C	-0,064	-0,029	-0,213	-0,130	-0,161	-0,086	-0,191	-0,111
PGM-A	+0,308	+0,311	-0,043	-0,040	-0,052	-0,052	-0,053	-0,053
PGI-B	-0,083	-0,084	-0,045	-0,045	+0,084	+0,084	+0,059	+0,060
GDH-A	-	-	-	-	-	-	-	-
SKDH-A	-0,078	-0,019	+0,553	<u>+0,269</u>	-0,030	-0,006	+0,279	<u>+0,119</u>
6PGDH-B	+0,011	+0,003	+0,143	+0,083	-0,095	-0,096	+0,019	+0,010
6PGDH-C	+0,235	<u>+0,119</u>	+0,292	<u>+0,636</u>	-0,252	-0,253	+0,033	<u>+0,507</u>
FEST-B	-0,041	-0,042	-0,021	-0,021	+0,158	+0,160	+0,119	+0,120

Črtica (-) pomeni, da bodisi ni podatka ali da je bil zabeležen samo en alel ali pa da sta bila zabeležena dva alela, vendar je bil eden od obeh zabeležen le v enem primerku.

$F_{is} (W\&C)$ : ocena koeficienta inbridinga po WEIR / COCKERHAM (1984).

$F_{is} (R\&H)$ : ocena koeficienta inbridinga po ROBERTSON / HILL (1984).

»-» Means no data or one allele or two alleles presented with single occurrence only

$F_{is} (W\&C)$ : inbreeding coefficient estimation after WEIR / COCKERHAM (1984).

$F_{is} (R\&H)$ : inbreeding coefficient estimation after ROBERTSON / HILL (1984).

Razlike med pomladitvenima jedroma so opazne na posameznih genskih lokusih in pri srednjih vrednostih. Te, z izjemo parametra genetske pestrosti A/L, vedno dosegajo večje vrednosti v pomladitvenem jedru iz večje sestojne vrzeli, ki se od sestoja tudi bistveno ne razlikuje. Pomladitveni jedri imata večjo stopnjo genetske diferenciranosti, kot če primerjamo zreli sestoj z vzorčenim mladjem v celoti.

V zrelem sestoju in pomladku se opažene frekvence genotipov pri večini lokusov ujemajo s frekvencami genotipov, pričakovanimi po Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Značilne odmike frekvenc genotipov od Hardy-Weinbergove strukture smo v sestoju ugotovili le na lokusu 6-PGDH-C, v mladju pa poleg lokusa 6-PGDH-C še na lokusu SKDH-A. Na istih lokusih se pojavlja tudi značilni primanjkljaj heterozigotov. Značilni primanjkljaj heterozigotov v mladju je nastal izključno zaradi vključitve manjšega pomladitvenega jedra (D) v vzorec, saj pri analizi večjega pomladitvenega jedra (E) teh odmikov nismo več dobili. Pojava značilnih presežkov heterozigotov nismo ugotovili.

#### **4 RAZPRAVA DISCUSSION**

Genetski vidik naravne obnove zrelega sestoja smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) *in situ* smo preučevali na stalnem raziskovalnem objektu Gozdarskega inštituta Slovenije v Triglavskem narodnem parku na Pokljuki.

Raziskave genetskih struktur naravnega pomladka je težko pojasniti, ker zajemajo selekcijo fertlnosti (reproduktivni sistem) in tudi različne oblike preživetvenih selekcij sejank (GREGORIUS *et al.* 1985). Če obstaja selekcija, potem z neposredno primerjavo genetskih struktur zrelih sestojev z njihovim pomladkom ni mogoče ločiti fertlnostne od preživetvene selekcije (SCHOLZ 1989). To dejstvo ne zmanjšuje pomena takih raziskav. Le z njimi lahko namreč ugotovimo, ali in v kakšnem obsegu naravni pomladek zagotavlja ohranitev genetske pestrosti sestoja v pomlajevanju.

Genetska primerjava zrelega sestoja z njegovim naravnim potomstvom v dveh različno velikih pomladitvenih jedrih in starostjo osebkov od najmanj 15 in 20 let je pokazala, da je pod določenimi pogoji genetska struktura naravnega pomladka in sestoja, iz katerega je

ta nastal, popolnoma primerljiva. Za obe subpopulaciji je v povprečju nakazano tudi podobno pomanjkanje heterozigotov. Redke razlike se nanašajo predvsem na alele, ki se v populacijah smreke na Pokljuki (BOŽIČ 2002) pojavljajo v zelo nizkih frekvencah. Značilne razlike v alelnih frekvenčnih porazdelitvah med subpopulacijama smo dobili samo na 1 od 15 lokusov. Hipoteze, da množičnost mlade generacije v pomladitvenih jedrih pomeni tudi pojavljanje novih kombinacij genetskih zasnov in prispeva k večji variabilnosti v populaciji mladja, v našem primeru ne moremo potrditi. Rezultati tudi ne dovoljujejo nobenih jasnih zaključkov glede genetske selekcije. Ni nobenih alelov, katerih nosilci bi bili v prvih življenjskih letih v vladajočem okolju oškodovani ali obogateni.

Značilne odmike od Hardy-Weinbergove strukture smo opazili v zrelem sestoju in v njegovem mladju. Pri zrelem sestoju smo dobili statistično značilni odmik od Hardy-Weinbergovega ravnotežja samo na lokusu 6-PGDH-C, v mladju pa tudi na lokusu SKDH-A. Na obeh lokusih je prišlo do odmika od Hardy-Weinbergove strukture izključno zaradi primanjkljaja heterozigotov. Pojava značilnih presežkov heterozigotov nismo ugotovili.

Rezultati primerjave dveh različno velikih pomladitvenih jeder so pokazali, da obstajajo med njima večje razlike, kot so med mladjem in zrelim sestojem. Med pomladitvenima jedroma so bile razlike v alelnih porazdelitvah alelov statistično značilne na 3 od 11 v mladju polimorfni lokusih. Za večje pomladitveno jedro ugotavljamo večjo alelno raznolikost in večjo heterozigotno stopnjo pomladka ter nekoliko manjši presežek homozigotnih osebkov kot v manjšem pomladitvenem jedru. Značilne odmike od Hardy-Weinbergovega ravnotežja smo v mladju dobili le v manjšem, ne pa tudi v večjem pomladitvenem jedru. Vidni homozigotni presežek (oziroma primanjkljaj heterozigotov) v majhnem jedru pojasnujemo z njegovim nastankom. Homozigoti bi lahko nastali s samoopraševanjem. Kaže se tendenca nenaključnega združevanja gamet in s tem odmik od panmiktične reprodukcije.

Glede na preučevane izoencimske genske lokuse menimo, da genetska struktura zrelega sestoja in njegovega pomladka lahko zagotavlja trajno ohranitev genskih virov na rastišču smrekovega sestoja Šijec na Pokljuki. Naravno pomlajevanje zagotavlja celostno, naravno dano genetsko pestrost populacije in je le v primeru v večjih pomladitvenih

jedrih tudi zagotovilo za njihovo neprekinjeno prilagoditveno sposobnost na spreminjajoče se razmere njihovega življenjskega okolja. Na osnovi rezultatov naše raziskave bi lahko pri varstvu gozdnih genskih virov smreke *in situ* upoštevali izhodišče, da mora biti varstvena enota izbrana tako, da lahko zagotavlja možnosti trajnega prenosa genskih virov na naslednjo generacijo z naravnim pomlajevanjem.

## 5 SUMMARY POVZETEK

The genetic aspects of the natural regeneration of a spruce stand by the means of isoenzyme gene markers were studied. The aim of the research was to check the ability of stand natural regeneration for sustainable conservation of forest genetic resources. The studies were carried out at a permanent forest research plot Šijec on the Pokljuka plateau (N 46° 20' 06" / E 13° 59' 42", 1170 m a.s.l.).

The genetic structures of the adult stand and its natural regeneration in two regeneration centres of different size, which have already been included in a detailed study of natural regeneration processes in this plot (DIACI / SMOLEJ / RUPEL 2000, KRAIGHNER *et al.* 2000), were analysed.

Isoenzyme analysis was performed by means of horizontal starch gel electrophoresis on dormant buds extracts of sampled trees. Ten enzyme systems coded by 15 in our analysis of polymorphic gene loci, were utilised: GDH-A, FEST-B, GOT-A, GOT-B, GOT-C, IDH-A, IDH-B, LAP-B, MDH-B, MDH-C, PGI-B, PGM-A, SKDH-A, 6-PGDH-B, 6-PGDH-C. Spruce sub-populations were compared with respect to the average number of alleles per locus ( $A/L$ ), the heterozygosity ( $H_a$ ,  $H_c$ ) and allele diversity ( $v$ ), and the genetic distance ( $d_0$ ) between them estimated. The statistical comparison of allele structures was made by a G-test of the homogeneity of frequencies by loci. In order to check the hypothesis that in the stand and its natural regeneration the frequencies of genotypes for different loci correspond to the frequencies of the genotypes in the Hardy-Weinberg equilibrium, the exact probability test was used. For the study of a potential over- or under-quantification of heterozygotes in the sub-population, the U-test was applied. The inbreeding coefficients ( $F_{is}$ ) were estimated with Wright's F- statistics with

the evaluator after WEIR / COCKERHAM (1984) and with the evaluator after ROBERTSON / HILL (1984). All calculations were made with the programmes GSED (GILLET 1998) and GENEPOP 3.1d (RAYMOND / ROUSSET 1995).

Results of genetic studies of natural regeneration of native spruce stand at the site of the permanent research plot Šijec on the Pokljuka plateau has shown that natural regeneration enables a sustainable conservation of gene resources. Under certain conditions, the genetic structures of the spruce regeneration and of the basic stand are closely similar. The regeneration of the stand by natural regeneration is, in the case of bigger regeneration centres, also an assurance of their continuous adaptability in the changing environmental conditions.

## **6 VIRI REFERENCES**

- BOŽIČ, G., 2002. Genetske raziskave naravnih populacij smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji: doktorska disertacija. - Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, 136 s.
- BOŽIČ, G. / LEVANIČ, T., 1998. Starost in morfološke značilnosti domnevno avtohtone smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) na območju visokega barja Šijec na Pokljuki. V: Diaci, J. (ur.). Gorski gozd. Zbornik referatov. XIX. Gozdarski študijski dnevi, Logarska dolina, 26.-27. marec 1998. - Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, s. 243-254.
- DIACI, J. / SMOLEJ, I. / RUPEL, M., 2000. Raziskave svetlobnih razmer in zakonitosti pomlajevanja smreke na trajni raziskovalni ploskvi Šijec. V: Kraigher, H. (ur.), Smolej, I. (ur.). Rizosfera: raziskave gozdnih tal in rizosfere ter njihov vpliv na nekatere fiziološke parametre gozdnega drevja v izbranih gozdnih ekosistemih, sestojnih tipih in razvojnih fazah gozda. - Strokovna in znanstvena dela, 118, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 222-243.
- FINKELDEY, R., 1993. Die Bedeutung allelischer Profile fuer die Konservierung genetischer Ressourcen bei Waldbaeumen. - Goett. Forstgenet. Bericht, 14, 176 s.

- GILLET E. M., 1998. GSED – Genetic Structures from Electrophoresis Data. Version 1.1, - Institut fuer Forstgenetik und Forstpflanzenzuechtung, Universitaet Goettingen, 48 s.
- GREGORIUS H. R., 1974. Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. - *Silvae Genetica*, 23, s. 22-27.
- GREGORIUS, H. R., 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. - *Math. Biosc.*, 41, s. 253-271.
- GREGORIUS, H. R. 1987. The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. - *Teor. Appl. Genet.*, 74, s. 397-401.
- GREGORIUS, H. R. 1991. Gene conservation and the preservation of adaptability. V: Seitz, A. / Loeschke, V. (ur.). *Species Conservation. - A Population Biological Approach*, s. 31- 47.
- GREGORIUS, H.R. / HATTEMER, H.H. / BERGMANN, F. / MUELLER-STARCK, G., 1985. Umwelbelastung und Anpassungsfähigkeit von Baumpopulationen. - *Silvae Genetica*, 34, 6, s. 230-241.
- GREGORIUS, H. R. / KRAUHAUSEN, J. / MUELLER-STARCK, G., 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seed in stand of *Fagus sylvatica* L. - *Heredity*, 57, s. 255-262.
- GUO, W. / THOMPSON, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. - *Biometrics*, 43, s. 805-811.
- HALDAN, J.B.S., 1954. An exact test for randomness of mating. - *Journal of Genetics*, 52, s. 631-635.
- KONNERT, M. / MAURER, W., 1995. Isozymic Investigations on Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European Silver Fir (*Abies alba* Mill.). A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation, 79 s.
- KOSKI, V. / SKROPPA, T. / PAULE, L. / WOLF, H. / TUROK, J. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). - Rome, EUFORGEN, IPGRI, 42 s.
- KRAIGHER, H. / SIMONČIČ, P. / SMOLEJ, I. / DIACI, J., 2000. Zaključki, aplikacije in perspektive raziskav. V: Kraigher, H. / Smolej, I. (ur.). *Rizosfera: raziskave gozdnih tal in rizosfere ter njihov vpliv na nekatere fiziološke parametre gozdnega drevja v izbranih gozdnih ekosistemih, sestojnih tipih in razvojnih fazah gozda.* - Strokovna in znanstvena dela, 118, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 246-262.



- LEVENE, H., 1949. On a matching problem arising in genetics. - *Ann. Math. Stat.*, 20, s. 91-94.
- LOUIS, E. J. / DEMPSTER, E. R., 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. - *Biometrics*, 48, s. 361-372.
- MUHS, H. J., 1997. Characterisation, testing and use of forest genetic resources. V: Jurc, M. / Hočevar, M. (ur.). *Znanje za gozd. Zbornik ob 50. obletnici obstoja in delovanja Gozdarskega inštituta Slovenije*. – Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 331-340.
- RAYMOND, M. / ROUSSET, F., 1995. GENEPOP (Version1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. - *Journal of Heredity*, 86, s. 248-249.
- ROBERTSON, A. / HILL, W. G., 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. - *Genetics*, 107, s. 713-718.
- RHODES, M. J. C., 1977. The extraction and purification of enzymes from plant tissues. - *Proceedings of the Biochemical Society*, 14, s. 254-248.
- ROUSSET, F. / RAYMOND, M., 1995. Testing hetrozygote excess and deficiency. - *Genetics*, 140, s. 1413-1419.
- SCHOLZ, F., 1989. Impotrance of the genetic structure in tree species for forest ecosystems under the influence of air pollutants. V: Urlich B. (ur.). *Internationaler Kongress Waldschadensforschung: Wiessenstand und Perspektiven*. Friedrichshafen, s. 478-497.
- SMOLEJ, I. / ČATER, M. / URBANČIČ, M. / SIMONČIČ, P. / KUTNAR, L., 2000. Naravne razmere, preteklo gospodarjenje in stanje gozda na raziskovalnih ploskvah. V: Kraigher, H. / Smolej, I. (ur.). *Rizosfera: raziskave gozdnih tal in rizosfere ter njihov vpliv na nekatere fiziološke parametre gozdnega drevja v izbranih gozdnih ekosistemih, sestojnih tipih in razvojnih fazah gozda*. - *Strokovna in znanstvena dela*, 118, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 11-32.
- WEIR, B. S. / COCKERHAM, C. C., 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. - *Evolution*, 38, s. 1358-1370.

## **7 ZAHVALA ACKNOWLEDGEMENTS**

Prispevek je nastal v okviru Raziskovalne in Programske skupine za gozdno biologijo, ekologijo in tehnologijo (RS/PS0404-003) in raziskovalnega projekta »Razvoj molekularnih in biokemijskih baz podatkov v gozdarstvu« (L4-4450-0404), ki sta ga financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.