

Prikaz sodobnih raziskovalnih metod in raziskav v gozdni populacijski genetiki

A Review on Research Methods and Studies in Forest Population Genetics

Gregor BOŽIČ*, Robert BRUS**, Andrej BREZNIKAR***, Bojka KUMP****

Izvelek:

Božič, G., Brus, R., Breznikar, A., Kump, B.: Prikaz sodobnih raziskovalnih metod in raziskav v gozdni populacijski genetiki. *Gozdarski vestnik*, št. 9/2000. V slovenščini, s povzetkom v angleščini, cit. lit. 33. Prevod v angleščino: avtorji.

V prispevku so prikazani sodobni raziskovalni postopki in navedene raziskave v gozdni populacijski genetiki, ki potekajo v Sloveniji. Podani so rezultati raziskav genetske variabilnosti zelene duglazije, jelke, črnega bora, smreke, bukve in hrastov na osnovi proučevanj s provenienčnimi poskusi ter z uporabo različnih laboratorijskih tehnik analize DNA in izoencimov.

Ključne besede: gozdna populacijska genetika, provenienčni poskusi, izoencimska analiza, molekularski markerji, Slovenija.

Abstract:

Božič, G., Brus, R., Breznikar, A., Kump, B.: A Review on Research Methods and Studies in Forest Population Genetics. *Gozdarski vestnik*, No. 9/2000. In Slovene with a summary in English, lit. quot. 33. Translated into English by the authors.

Modern research methods in forest population genetics and studies from this field of research in Slovenia are presented. The results from the population genetic studies of Douglas fir, silver fir, black pine, spruce, beech and oaks, assessed on the basis of provenance trials and isozyme and DNA analysis, are presented.

Key words: forest population genetics, provenance trials, isozyme analysis, molecular markers, Slovenia.

1 UVOD

1 INTRODUCTION

Gozdna populacijska genetika se ukvarja z analizami genetske variabilnosti v populacijah gozdnega drevja, preučuje mehanizme prenosa dedne informacije skozi generacije gozdnega drevja, odkriva razlike v posameznih znakih in lastnostih med populacijami ter skuša poiskati vzroke in smeri evolijskega prilagajanja določene gozdne drevesne vrste (VIDAKOVIČ / KRSTINIČ 1985). Sodobno gospodarjenje z gozdom mora krepiti samovarovalne mehanizme gozda in s tem zavarovati trajnost koristi iz gozda. Pomemben sestavni del samovarovalnih mehanizmov gozda je naravna genetska pestrost, njeno varovanje pa je osnovni pogoj sonaravnega

gospodarjenja z gozdom. Pri gozdnih drevesnih vrstah je preučevanje genetske variabilnosti in mehanizmov za njihovo proizvodnjo, ohranjanje ter širjenje v prostoru in času težavno zaradi dolgoživosti populacij gozdnega drevja, izredne pestrosti njihovega naravnega okolja in zapletenih povezav genotipa in fenotipa. Zunanji videz osebka je namreč rezultat vzajemnega delovanja okolja, v katerem živi, in njegove genetske konstitucije (genotipa). V testni populaciji lahko prisotnost različnih genskih variant ocenjujemo le posredno z morfološkimi in fenološkimi opažanji in se nanaša samo na specifično življenjsko okolje populacije. Primerjave ekoloških in morfoloških dejavnikov oziroma znakov, ki se pojavljajo v populaciji na določenem območju, nam nudijo informacije o povezavah okolja in fenotipa osebka, nič pa ne izvemo o genetski podlagi, ki dano povezavo kontrolira. Z analizo morfoloških znakov lahko taksonomsko določamo posamezne populacije, opredelimo rase in ekotipe določene drevesne vrste (BREZNIKAR 1997), za celovit vpogled v genetske značilnosti populacij pa moramo uporabiti tudi druge znanstvenoraziskovalne metode.

* mag. G. B., univ. dipl. inž. gozd., GIS, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, SLO

** doc. dr. R. B., BF, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive vire, Večna pot 83, 1000 Ljubljana, SLO

*** mag. A. B., univ. dipl. inž. gozd., ZGS, OE Maribor, Tyrševa 15, 2000 Maribor, SLO

**** dr. zn. B. K., BF, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, SLO

2 NAČINI RAZPOZNAVANJA GENETSKIH ZNAČILNOSTI KRAJEVNIH POPULACIJ

2 METHODS FOR IDENTIFICATION OF GENETIC CHARACTERISTICS OF LOCAL POPULATIONS

Sodobno gospodarjenje z gozdom mora danes ne samo zavarovati trajnost donosov in krepiti okoljske funkcije gozda, temveč tudi zavarovati naravno genetsko variabilnost. Prvi zelo pomemben korak je, da genetsko variabilnost jasno spoznamo in jo določimo. Genotip nekega osebka lahko določimo s tem, da ugotovljamo njegov učinek na fenotip, s preučevanjem njegovega potomstva ter z laboratorijskimi tehnikami analize DNA in njenih primarnih produktov. Poznamo le dva načina razpoznavanja genetskih značilnosti krajevni populacij, in sicer klasične provenienčne poskuse ter različne sodobne biokemijske in molekularne metode.

2.1 Provenienčni poskusi

2.1 Provenance trials

Provenienčni poskusi najbolj neposredno in otipljivo pokažejo genetsko diferenciacijo. Tako lahko natančno ugotovimo, v katerih genetskih lastnostih, za nas bistvenih ali nebistvenih, se posamezne populacije med seboj razlikujejo. Kljub vsej neposrednosti in preprostosti pa terjajo provenienčni poskusi od raziskovalcev zelo veliko. Trajati morajo vsaj nekaj desetletij, da se lahko zanesemo na njihove rezultate. Pri provenienčnih poskusih je posebno pomembna primerljivost poskusnih variant, tako da razlike med njimi res lahko pripišemo različnosti genetskih zasnov. Zelo težko rešljiv problem pri provenienčnih poskusih je najprej dovolj velik obseg poskusa, z dovolj velikimi površinami, z dovolj ponavljanji na različnih rastiščih oz. v različnih geografskih prostorih.

V Sloveniji že več desetletij potekajo raziskave s provenienčnimi poskusi. Raziskave zajemajo zeleno duglazijo, črni bor, jelko, smreko in bukev. Provenienčne raziskave duglazije so bile osnovane v letih 1971 in 1972 v Brkinih in na Javornikih pri Postojni. V poskus je vključenih 26 provenienc zelene duglazije s primarnih nahajališč v Severni Ameriki in 1 provenienca s sekundarnega nahajališča v Sloveniji. Duglazija na vseh ploskvah normalno napreduje, kažejo se tako razlike med osebki znotraj provenienc kot tudi med različnimi proveniencami. Provenienčni poskus z jelko poteka od leta 1987 na Boču. Na 4 raziskovalnih ploskvah testiramo 17 jelovih provenienc iz različnih delov Evrope. Dosedanji rezultati kažejo na veliko variabilnost testiranega materiala

in na dobro prenašanje zasačenja v juvenilni fazi razvoja. Ugotovitve razvojnih posebnosti pri duglazijevih proveniencah ter genetske variabilnosti jelke se vključujejo tudi v mednarodno zastavljene provenienčne mreže in skupne raziskovalne projekte, katerih rezultati so bili že delno objavljeni (BREZNIKAR 1991, BERGMANN / HORVAT MAROLT 1995). V okviru provenienčnega poskusa s črnim borom je bilo v letih 1977 in 1988 v Halozah in na Žekancu na Krasu osnovanih več nasadov črnega bora z 9 in 8 proveniencami iz Slovenije, Avstrije, Hrvaške, Italije, Srbije in Turčije. Tudi pri črnem boru je opazna variabilnost provenienc, kaže se predvsem dobro napredovanje kalabrijske provenienc, medtem ko se po elastičnosti vej odlikuje turška. Raziskovalni objekt Hrušica zajema 10 provenienc smreke z nahajališči s 3 nadmorskih višinskih pasov in iz 3 gozdnih združb. Na objektih na Menini, Brezovi rebri, v Črmošnjicah in Šoštanju primerjamo po 2 provenienci smreke, in sicer domačo provenienco s provenienco iz Črmošnjic. Dosedanje meritve in rezultati nakazujejo, da sta vitalnost in priraščanje sadik odvisna predvsem od sorodnosti izvirmih in izbranih rastišč.

Genetske lastnosti bukve je v 60. in 70. letih raziskoval dr. Miran Brinar. Proučeval je razvojni ritem različnih bukovih provenienc oziroma ekotipov, bukove rase in diferenciacijo različkov glede nekaterih fizioloških in tehnoloških lastnosti, morfološke značilnosti bukve v odvisnosti od reliefa in genetske divergence, ekološko in dedno pogojenost razhajanja nekaterih morfoloških, fenoloških in anatomske značilnosti naše bukve ter kalivost bukovega semena in mladice v zvezi z nekaterimi značilnostmi provenienčnih rastišč in druge značilnosti (BRINAR 1965, BRINAR 1967, BRINAR 1971). Spomladi leta 1998 smo na Kamenskem hribu v OE ZGS Novo mesto osnovali tudi mednarodni provenienčni poskus z bukvijo (BOŽIČ / KRAIGHNER 1998). Poskus je vključen v mednarodni projekt *Ovrednotenje genetskih virov bukve za primernost njene uporabe pri gospodarjenju z gozdovi po načelu trajnosti*, ki ga vodi Inštitut za gozdno genetiko v Grosshansdorfu v Nemčiji. Raziskave potekajo v 5 poskusnih serijah na 62 poskusnih ploskvah v 21 državah in zajemajo skupaj 350 bukovih provenienc. Raziskave so usmerjene k ovrednotenju genetske variabilnosti bukve in združujejo: a) analizo kloroplastne DNA z metodo mikrosatelitov za določitev genetskih razlik poskusnega saditvenega materiala in pripravo geografske karte različnih cpDNA-haplotipov Evrope; b) izoencimsko analizo genetske variabilnosti bukve v reprodukcijskem materialu; c) morfološke in fiziološke študije odziv-

nosti posameznih provenienc bukve na zgodnje in pozne zmrzali, sušo, na mraz idr.; d) provenienčne teste - študije genetske in okoljske kontrole morfoloških znakov.

Poskus na Kamenskem hribu spada v novo serijo (1996/1998), ki obsega 23 mednarodnih poskusov, ki so bili poleg v Sloveniji osnovani tudi v Belgiji, Češki, Danski, Irski, Luksemburgu, Nemčiji, Nizozemski, Poljski, Romuniji, Slovaški, Španiji, Švedski, Ukrajini in Veliki Britaniji. Provenienčni poskus smo osnovali z 28 tujimi proveniencami in 3 domačimi (Idrija, Javorniki, Mašun) po enotni evropski metodologiji (1,3 ha, ograjen, 3 bloki po 31 ploskvic 10 x 10 m, v vsakem bloku po 50 sadik iste provenience). V prvih letih rasti sadik v nasadu ugotavljamo: stopnjo preživetja, fenološke in prirastne značilnosti ter zdravstveno stanje. Posebna pozornost je usmerjena k proučevanju brstenja bukve. Cilj raziskave je spoznati, kako se bukev z brstjenjem odziva na mnoge rastiščne pogoje, še zlasti na klimatske. Prvi rezultati provenienčnih poskusov z bukvijo, ki so jih osnovali v letih od 1986 do 1995, kažejo, da obstajajo med proveniencami (335) velike razlike pri spomladanskem olistanju. V splošnem velja, da potrebujejo provenience bukve iz vzhodnih in jugovzhodnih regij naravnega areala razširjenosti (Slovaška, Romunija, Bolgarija) in z višjih nadmorskih višin za brstenje manj skupne toplote in da v zahodnoevropskem nižinskem svetu, ki je pod atlantskim vplivom, prezgodaj odganjajo. (WUEHLISCH in sod. 1998). V teh poskusih je vključena tudi provenienca bukve iz Idrije, ki je pokazala, da najkasneje odganja in brsti pozneje kot druge testne provenience, in bo ostala predmet natančnejšega proučevanja.

2.2 Genski markerji

2.2 Gene markers

Tradicionalno vrednotenje genetske variabilnosti zajema opis morfoloških lastnosti. Vrsto let so bili edini primerni markerji pri drevesnih vrstah redke morfološke lastnosti, ki so bile pod kontrolo alelov na enem samem genskem lokusu. Z razvojem biokemijskih markerjev, predvsem izoencimov, v začetku 70. let so postale ocene variabilnosti genomov zanesljivejše, še večji napredek pa je pomenil razvoj molekularnih tehnik, ki omogočajo vrednotenje genetske variabilnosti na ravni DNA.

Rezultati analiz genetske variabilnosti med populacijami in znotraj njih z uporabo različnih genskih markerjev (biokemijskih, molekularnih) omogočajo:

- spoznavanje potenciala populacije za ustvarjanje osebkov različnih genotipov;

- določitev najbolj primernih tehnik pri gospodarjenju z naravnimi sestoji;
- določitev prilagoditvenih strategij, ki omogočajo preživetje v različnih razmerah okolja;
- razumevanje morebitnih migracijskih procesov po ledeni dobi, tj. enega od glavnih dejavnikov, ki so oblikovali dejansko porazdelitev genetske variabilnosti;
- genetsko karakterizacijo avtohtonih populacij različnih drevesnih vrst;
- genetsko karakterizacijo in preverjanje potrjenih semenskih sestojev različnih drevesnih vrst;
- genetsko karakterizacijo semenskih plantaž različnih drevesnih vrst;
- ugotavljanje genetske strukture semena v gozdnih semenskih bankah.

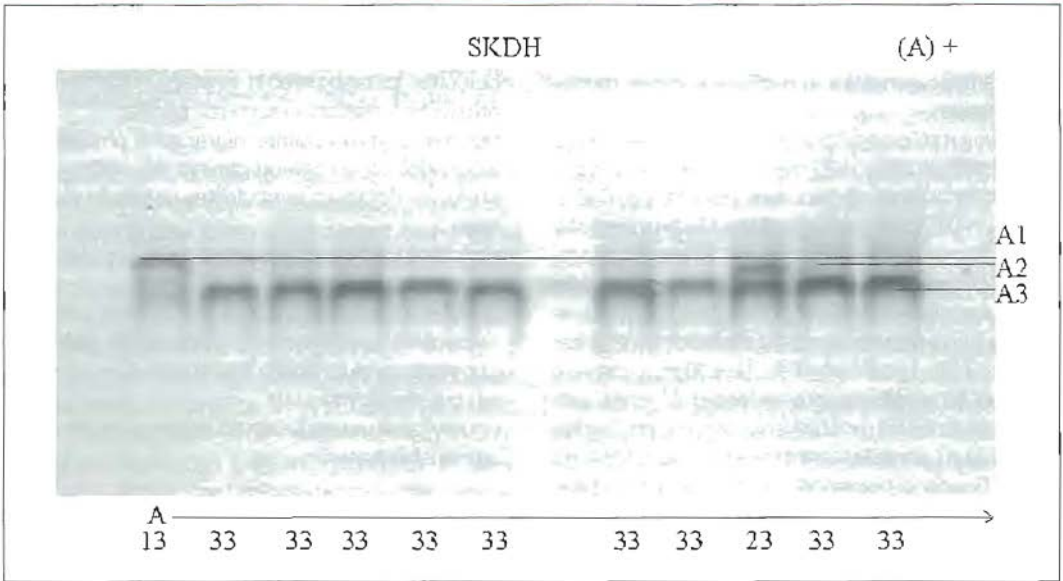
2.2.1 Izoencimska analiza

2.2.1 Isozyme analysis

Ena od najbolj uveljavljenih metod v gozdarski znanstvenoraziskovalni praksi je izoencimska analiza, pri kateri ugotavljanje genotipa osebkov za posamezne lokuse temelji na dejstvu, da se v organizmu nekateri encimi pojavljajo v različnih oblikah, ki imajo sicer podobno katalitično aktivnost, razlikujejo pa se po kemični strukturi in zato po električnem naboju. Ti različni tipi enega encima se imenujejo izoencimi. V električnem polju izoencimi v bazični raztopini ali na nekem nosilnem mediju, ki je omočen s pufrom, migrirajo od katode proti anodi, relativna stopnja migracije po določenem času pa je odvisna od električnega naboja izoencima. Najpogostejši nosilci so škrobni, poliakrilamidni ali agarozni gel, papir, celulozaacetat, silikagel ali aluminijev oksid. Rezultat postopka t. i. elektroforeze je elektroforegram, ki ga dobimo tako, da rezino gela za vsak encimski sistem prelijemo z ustrežno raztopino, v kateri je substrat, ki ga encim v gelu razgradi in tako povzroči določeno barvno reakcijo. Kadar analiziramo diploidno tkivo, na primer pri heterozigotnem monomeru, dva pasova predstavljata dva različna alela oziroma genotip za obravnavani lokus (slika 1). S ponavljanjem postopka za vse osebkov iz vzorca lahko ocenimo frekvence alelov in s tem genotipov za lokus v vsej populaciji.

Izoencimske analize so rastlinskim biologom prinesle dodatne genske markerje za študij evolucijskih procesov. Izoencimski lokusi imajo v primerjavi z morfološkimi znaki, ki so kontrolirani z enim genom, več prednosti (HAMRICK 1989):

1. dednost lastnosti, ki jih je mogoče elektroforetsko odkriti, je lahko dokazati; večina se jih deduje po Mendlovih pravilih;



Slika 1: Elektroforegram šikimat dehidrogenaze (SKDH) 11 dreves smreke, ločenih s poliakrilamidno gelsko elektroforezo iz ekstraktov iglic, s prikazom genotipov na lokusu A (BOŽIČ 1997)

Figure 1: Shikimate dehydrogenase (SKDH) electrophoregramme of 11 spruce trees, separated by polyacrilamide gel electrophoresis from needles extracts with identification of genotypes on locus A (BOŽIČ 1997)

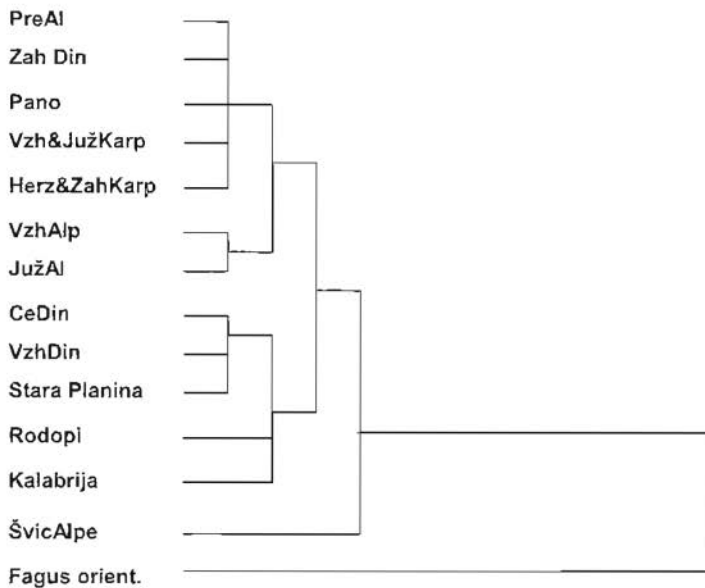
- večina lokusov je kodominantnih in alelne frekvence je mogoče neposredno izračunati;
- ocene stopenj in porazdelitev genetske variabilnosti lahko neposredno primerjamo med populacijami ali vrstami;
- za analizo lokusov potrebujemo izredno majhne količine rastlinskega materiala, običajno zadošča en list, popek ali seme;
- množi lokusi so izraženi v vseh življenjskih fazah;
- izoencime lahko preučimo pri vseh vrstah, ne glede na habitat, velikost ali dolgoživost.

Izoencimske genske markerje so za preučevanje genetske variabilnosti populacij gozdnega drevja začeli v večji meri uporabljati po letu 1970. V Evropi lahko med razmeroma že dobro raziskane drevesne vrste štejemo predvsem rdeči bor, jelko, smreko in bukev. V Sloveniji smo uveljavljene metode analize genetske variabilnosti populacij gozdnih drevesnih vrst začeli izvajati v začetku 90. let. S pomočjo izoencimskih genskih markerjev smo ugotavljali nekatere populacijskogenetske značilnosti bukve (BRUS 1995a, BRUS 1995b, BRUS 1996, BRUS in sod. 1999, BRUS 1999, BRUS / HORVAT MAROLT / PAULE 2000, GÖMÖRY in sod. 1999), jelke (BRUS / LONGAUER 1995) in smreke (BOŽIČ 1997, BOŽIČ / LEVANIČ 1999, BRUS / BOŽIČ 1997, BOŽIČ in

sod. 2000, BOŽIČ - v tisku).

Izoencimske raziskave bukve v Sloveniji so odkrile razmeroma majhno in z drugimi deli Evrope primerljivo genetsko diferenciranost (slika 2), prav tako so pokazale rahlo naraščanje genetske variabilnosti v smeri severozahod-jugovzhod in hkrati potrdile hipotezo, da so se bukovi gozdovi na ozemlju današnje Slovenije verjetno razvili iz lokalnih populacij, ki so tu v mikrorefugijih preživele zadnje ledenitve. Raziskave kažejo, da je migracijski tok z Balkanskega polotoka močnejše kot na bukove populacije v notranjosti Slovenije vplival na populacije v slovenskem submediteranu. Pri bukvi smo odkrili tudi vpliv onesnaževanja na genetsko strukturo populacij, saj je onesnaženje z močnimi spremembami alelnih frekvenc bistveno povečalo genetske distance med starševskimi populacijami in njihovim potomstvom na vseh analiziranih ploskvah. Neposredno selektivno delovanje onesnaževanja na posamezne alele ni bilo dokazano.

Tudi preučevanje genetskih značilnosti jelke je pokazalo podobno genetsko variabilnost, kot so jo pri jelki ugotavljali v drugih delih Evrope. Ugotovili smo nekaj genetskih razlik med populacijami jelke iz vzhodnih in zahodnih delov Slovenije, raziskave pa niso potrdile pričakovanih genetskih razlik med jelko s kislih in jelko z bazičnih rastišč.



Slika 2: Primer dendrograma, ki prikazuje različne stopnje genetske podobnosti med bukovimi populacijami iz različnih geografskih območij (BRUS 1999)

Figure 2: Dendrogramme of genetic relationships between different beech populations from several geographical regions (BRUS 1999)

Pri smreki smo analizirali dve morfološko različni subpopulaciji z naravnih rastišč smreke v okolici visokega barja Šijec na Pokljuki (BOŽIČ / LEVANIČ 1998). Subpopulaciji smreke, ki se morfološko razlikujeta po višini in premeru dreves ter po dolžini in volumnu iglic, sta si genetsko podobni. Značilne razlike med alelnimi frekvencami smo ugotovili na lokusih LAP-B in MNR-A, kar nakazuje na možnost posrednega ali neposrednega vpliva razlik v rastiščnih razmerah na frekvence alelov obeh izoencimskih lokusov.

Glede na razvojno preteklost in današnje stanje smrekovih gozdov potekajo sedaj tudi obširne raziskave genetskih značilnosti domnevno avtohtonih populacij smreke iz njenega naravnega areala razširjenosti v jugovzhodnem obrobju Alp. Analiza zajema preučevanje 22 testnih populacij smreke z njenih naravnih rastišč v Sloveniji (Pokljuka, Jelovica, Karavanke, Kamniško-Savinjske Alpe, Pohorje, Trnovski gozd, Snežnik, Goteniški Snežnik) in 4 na Hrvaškem (Gorski Kotar, Velika Kapela, Velebit), ki smo

jih izbrali na osnovi fitocenoloških kriterijev. Genetsko variabilnost smreke ocenjujemo po standardnih postopkih za analizo smrekovih vzorcev (KONNERT / MAURER 1995) na 15 polimorfni izoencimskih lokusih. Cilj je ovrednotiti multilokusne genotipe smreke, spoznati genetsko variabilnost naravnih populacij smreke, ugotoviti stopnjo diferenciranosti (sorodnosti) geografsko ločenih populacij, ugotoviti stopnjo diferenciranosti populacij smreke na kisl in bazični podlagi ter testirati hipotezo o migracijski poti smreke v postglacialni dobi.

Genetska inventura odraža večjo genetsko variabilnost znotraj posameznih populacij smreke in relativno nizko variabilnost med populacijami. Rezultati genetskih raziskav smreke podpirajo hipotezo o enotnem genskem skladu naravnih populacij na jugovzhodnem obrobju Alp in na ozemlju današnje Slovenije. Prva primerjava populacij smreke iz prostora med Alpami in dinarskim gorskim masivom s populacijami smreke iz Bavarskih Alp že kaže na jasno genetsko diferenciranost med njimi.

2.2.2 Molekulski markerji

2.2.2 Molecular markers

S prihodom rekombinantne DNA-tehnologije v populacijsko genetiko v sredini 80. let se je izbor genskih markerjev, primernih za populacijskogenetske študije drevesnih vrst, izredno povečal. Molekulski marker je lahko katero koli zaporedje DNA, ki ga lahko brez težav odkrijemo in katerega dedovanje lahko spremljamo. DNA-markerji omogočajo neposredno primerjavo genetskega materiala individui. Prednosti njihove uporabe v primerjavi z morfološkim ali biokemijskim vrednotenjem populacij so v visoki stopnji določljivega polimorfizma, njihovi neodvisnosti od vplivov okolja, relativno preprosti metodi odkrivanja in visoki stopnji ponovljivosti določevanja. Za odkrivanje polimorfizmov na ravni zaporedja DNA se lahko uporabljajo različne tehnologije. Najbolj neposredna je analiza nukleotidnega zaporedja določene predela DNA, vendar je DNA-sekvenciranje v primerjavi z drugimi molekularnimi tehnikami še vedno relativno drago in tehnično zahtevno, zato je njegova uporaba omejena. Pri proučevanju rastlinskih genomov v zadnjem času prevladujejo predvsem metode, ki temeljijo na *in vitro* namnoževanju DNA, kot so RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), jedrni ali kloroplastni mikrosatelitni markerji, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) in drugi. Vsak tip markerjev združuje svoje edinstvene prednosti in slabosti, zato izbiro markerskega sistema v glavni meri narekuje specifična aplikacija.

Dosedanji rezultati tovrstnih študij pri gozdnem drevju so pokazali precej višjo raven intraspecifične genetske variabilnosti v primerjavi s pred tem uporabljanimi izoenzimskimi analizami (NEWTON in sod. 1999).

V Sloveniji je uporaba molekulskih markerjev za študije gozdnih drevesnih vrst še v začetni fazi. V letu 1999 smo pričeli z analizo variabilnosti kloroplastnega genoma (cpDNA) pri treh vrstah hrastov (*Q. robur*, *Q. petraea* in *Q. pubescens*) z metodo PCR-RFLP (BREZNIKAR in sod. 2000, KUMP in sod. 2000). Kot celota je kloroplastni genom evlucijsko zelo ohranjen, zato velja za zelo primerne za filogenetske študije nad ravnijo vrst. Študije bolj variabil-

nih intergenskih sekvenc kloroplastnega genoma in analize kloroplastnih mikrosatelitov pa so dokazale veliko uporabnost analiz cpDNA tudi za ugotavljanje genetske variabilnosti med zelo sorodnimi vrstami in med populacijami znotraj vrste (VENDRAMIN in sod. 1996, POWELL in sod. 1995). Vrednotenje variabilnosti cpDNA je temelj večine filogenetskih oz. filogeografskih študij pri rastlinah. Rezultati analiz cpDNA pri številnih gozdnih drevesnih vrstah, tudi pri hrastu, so pokazali, da je geografska razporeditev cpDNA-haplotipov močno povezana z glacialnimi refugiji in migracijskimi procesi po ledeni dobi (PETIT in sod. 1997). Slovenija leži na križišču različnih migracijskih poti, zato je variabilnost genetskih tipov pričakovana. Od rezultatov analiz pričakujemo podrobnejše poznavanje genetske strukture populacij hrasta v Sloveniji, nova spoznanja o postglacialni migraciji na našem prostoru in tudi možnost odkritja mikrorefugijev.

3 ZAKLJUČEK

3 CONCLUSION

Gozdna populacijska genetika ima na področju gospodarjenja z gozdom odgovorno nalogo pri spoznavanju genetske variabilnosti in različnosti populacij, pri preverjanju zvez med genetskimi in ekološko pomembnimi značilnostmi populacij na ravni posameznih gozdnih drevesnih vrst in pri ohranjanju naravne genetske dediščine gozda. Gozdni genski viri so, kljub naravni obnovi sestojev ogroženi, saj lahko antropogeni vplivi neposredno ali posredno vplivajo na biološko pestrost na ravni ekosistema, vrstne raznolikosti in genetske variabilnosti znotraj vrste (MUHS 1997). Celo dobro mišljeni negovalni ukrepi, s katerimi izločamo drevesne osebe iz populacij (npr. redčenja), utegnejo pomeniti sicer nenamerno, toda škodljivo umetno selekcijo in siromašenje genetske variabilnosti (HOSIUS 1993). Ugotovitve populacijskogenetskih raziskav s klasičnimi provenienčnimi poskusi in s sodobnimi laboratorijskimi tehnikami analize genskih markerjev omogočajo razširitev in poglobitev spoznanj o gozdnih genskih virih drevesnih vrst. Ta spoznanja nadalje prispevajo k zanesljivejši izbiri in ohranjanju semenskih objektov.

A Review on Research Methods and Studies in Forest Population Genetics

Summary

The modern forest management contributes to a sustainable effectiveness of the many functions of forests and to conservation of the natural genetic variability. The genetic variability is evaluated with provenance trials and with different methods of DNA analysis. Different provenance trials in Slovenia that were established in the last decades include studies of different provenances of Douglas fir, silver fir, black pine, spruce, and beech. Since 1998, Slovenia has participated in the International Network for Research of Beech (*Fagus sylvatica* L.). A part of that project is the beech provenance trial on Kamenski Hrib (GGO Novo Mesto), which has been established on the basis of a Common European Methodology. The trial includes 28 foreign and three domestic provenances of beech. The development of biochemical markers and molecular techniques has contributed a great deal to the evaluation of genetic variability in forest tree populations. The most common research method is isozyme analysis. The method is based mainly on the studies of Scots pine, silver fir, Norway spruce and beech populations in Europe. In Slovenia, the analyses of genetic variability of forest tree populations had started in the nineties. The isozyme analysis has shown small genetic differentiation, which can be compared with the results of other European countries. The present beech forests in Slovenia are presumably developed from local populations, which have survived the last glaciation in microrefugia. The migration routes of the beech from the Balkan Peninsula has influenced the beech populations in the Mediterranean Region more than in the inner parts of Slovenia. The influence of pollution on genetic structure of beech populations can be seen in differentiated allelic frequencies, which increase the genetic distance between the parental population and its progeny. The direct selective influence of pollution on different alleles has not been confirmed. In the studies of genetic variation in silver fir populations the genetic differences between the populations from soils of different pH reactions have not been found. The first results of spruce genetic studies confirm the hypothesis of common gene source of natural populations in SE part of the Alps and in Slovenia. Molecular markers have also been employed for studies of ecological and evolutionary processes in the forest tree species. The first studies in Slovenia deal with analysis of cpDNA in three oak species (*Q. robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*). The results from population genetic studies present an important contribution to the knowledge of forest tree species and their adaptation strategies, which are so important for survival of populations in different surroundings.

VIRI / REFERENCES

- BERGMANN, F. / HORVAT MAROLT, S., 1995. Beziehungen zwischen physiologischer Anpassung und genetischer Variation der Weisstanne (*Abies alba*). - V: Publikacija IUFRA - posvetovanja WP S 1.01-08 Ekologija in gojenje jelke, s. 127-131.
- BOŽIČ, G., 1997. Genetska variabilnost dveh subpopulacij domnevno avtohtone smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) na Pokljuki.- Magistrsko delo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 83 s.
- BOŽIČ, G. / KRAIGHER, H., 1998. Status Information about International Beech Provenance Trial 1996/98 (Bu20_12): Slovenia: posterska predstavitev na strokovnem posvetovanju Delovne skupine za mednarodne provenienčne poskuse z bukvi (*Fagus sylvatica* L.), 7.-11. november 1998, Graupa, Nemčija.
- 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, Jurij (ur.). Gorski gozd: zbornik referatov. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana s. 243-254, ilustr.
- BOŽIČ, G. / LEVANIČ, T., 1999. Autochtonity of Norway Spruce on Pokljuka Plateau.- V: Root - Soil Interactions in Trees: Abstracts. Slovenian Forestry Institute, Ljubljana, s. 77.
- BOŽIČ, G., 2000. Genetic Characterisation of Norway Spruce in Slovenia.- 24. Internationale Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft fuer Forstgenetik und Forstpflanzenzuechtung: Nachhaltige Nutzung forstgenetischer Ressourcen, 14-16 Maerz 2000, Pirna, Deutschland (v tisku).
- BOŽIČ, G. / KOTAR, M. / PAVLE, M. / SMOLEJ, I. / ŽITNIK, S. / KRAIGHER, H., 2000. Genetic Resources of Norway Spruce (*Picea abies* Karst.) in Slovenia.- V: EUFORGEN Networks: Proceeding of the International Conference on *Picea Abies* (Karst.). [2000 ed.]. Roma, Italy: IPGRI, 2000, datoteka na internetu, URL naslov: <http://www.cgiar.org/ipgr...%20abies/Country%20updates/paupSLO.htm>.
- BREZNIKAR, A., 1991. Mednarodno provenienčno preučevanje duglazije (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) v Sloveniji.- Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo, Ljubljana, 62 s., 17 pril.

- BREZNIKAR, A., 1997. Morfološka in fenološka variabilnost doba (*Quercus robur* L.) in gradna (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) na robnih območjih rjnih naravnih habitatov v severovzhodni Sloveniji.- Magistrsko delo, Ljubljana: [s. n.], XII, 121 s., ilustr., graf. prikazi.
- BREZNIKAR, A. / KUMP, B. / CSAIKL, U. / BATIČ, F. / KRAIGHER, H., 2000. Taxonomy and Genetics of Chosen Oak Populations in Slovenia.- Glas. šumske pokuse, 2000, 37, s. 361-373.
- BRINAR, M., 1965. Bukove rase in diferenciacija različkov glede nekaterih fizioloških in tehnoloških lastnosti. - GozdV, 23, s. 257-288.
- BRINAR, M., 1967. Nekatere morfološke značilnosti bukve in njihova odvisnost od reliefa in genetske divergence. - Zbornik gozdarstva in lesarstva, 5, s. 7-50.
- BRINAR, M., 1971. O ekološki in dedni pogojenosti razhajanja nekaterih morfoloških, fenoloških in anatomskih značilnosti naše bukve.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 10, s. 5-64.
- BRUS, R., 1995a. Vpliv onesnaževanja ozračja na genetsko strukturo bukovih populacij v Sloveniji.- Magistrsko delo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 87 s.
- BRUS, R., 1995b. Genetic Structure of Beech Populations in some Air Polluted Areas in Slovenia.- V: Program & Abstracts. Ljv: [s. n.], s. 17.
- BRUS, R. / LONGAUER, R., 1995. Nekatere genetske značilnosti jelke (*Abies alba* Mill.) v Sloveniji.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 46, s. 45-74.
- BRUS, R., 1996. Vpliv onesnaževanja ozračja na genetsko strukturo bukovih populacij v Sloveniji.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 49, s. 67-103.
- BRUS, R. / BOŽIČ, G., 1997. Populacijskogenetske raziskave gozdnih drevesnih vrst v Sloveniji.- V: JURC, M. (ur.), HOČEVAR, M. (ur.). Znanje za gozd: zbornik ob 50. obletnici obstoja in delovanja Gozdarskega inštituta Slovenije, Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, s. 321-330.
- BRUS, R. / HORVAT-MAROLT, S. / PAULE, L. / GÖMÖRY, D., 1999. Genetska variabilnost bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 60, s. 85-106.
- BRUS, R., 1999. Genetska variabilnost bukve (*Fagus sylvatica* L.) v Sloveniji in primerjava z njeno variabilnostjo v srednji in jugovzhodni Evropi.- Doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 130 s.
- BRUS, R. / HORVAT MAROLT, S. / PAULE, L., 2000. Nova spoznanja o obstoju ledenodobnih zatočišč bukve (*Fagus sylvatica* L.) na ozemlju današnje Slovenije.- V: POTOČNIK, I. (ur.). Nova znanja v gozdarstvu - prispevek visokega šolstva: zbornik referatov študijskih dni, Kranjska Gora, 11.-12. 5. 2000. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana s. 77-88.
- GÖMÖRY, D. / PAULE, L. / BRUS, R. / ZHELEV, P. / TOMOVIČ, Z. / GRAČAN, J., 1999. Genetic Differentiation and Phylogeny of Beech on the Balkan Peninsula.- J. evol. biol. (Print. ed.), 12, s. 746-754.
- HAMRICK, J. L., 1989. Isozymes and the Analysis of Genetic Structure in Plant Populations.- V: SOLTIS, D. E. (ur.), SOLTIS, O. S. (ur.). Isoenzymes in Plant Biology, Advances in Plant Sciences Series 4, s.87-105.
- HOSIUS, B., 1993. Wird die genetische Struktur eines Fichtenbestandes von Durchforstungseingriffen beeinflusst?- Forst und Holz, 48, 11, s. 306-308.
- 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.
- KUMP, B. / BREZNIKAR, A. / CSAIKL, U. / KRAIGHER, H., 2000. Chloroplast DNA Diversity of Slovenian Oak Populations.- V: Proceedings of the 2nd Congress of Genetic Society of Slovenia, Bied, Sep. 13-17, 2000, s. 316-317.
- MUHS, H. J., 1997. Characterisation, Testing and Use of Forest Genetic Resources.- V: JURC, M. (ur.), HOČEVAR, M. (ur.). Znanje za gozd: zbornik ob 50. obletnici obstoja in delovanja Gozdarskega inštituta Slovenije, Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, s. 331-340.
- NEWTON, A. C. / ALLNUTT, T. R. / GILLIES, A. C. M. / LOWE, A. J. / ENNOS, R. A., 1999. Molecular Phylogeography and the Conservation of Tree Species.- Trends in Ecology and Evolution, 14, s. 140-145.
- PETIT, R. J. / PINEAU, E. / DEMESURE, B. / BACILIERI, R. / DUCOUSSO, A. / KREMER, A., 1997. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 94, s. 9996-10001.
- POWELL, W. / MORGANTE, M. / MCDEVITT, R. / VENDRAMIN, G. G. / RAFALSKI, J. A., 1995. Polymorphic Simple Sequence Repeat Regions in Chloroplast Genomes: Applications to the Population Genetics of Pines.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, s. 7759-7763.
- VENDRAMIN, G. G. / LELLI, L. / ROSSI, P. / MORGANTE, M., 1996. A Set of Primers for the Amplification of 20 Chloroplast Microsatellites in Pinaceae.- Molecular Ecology, 5, s. 595-598.
- VIDAKOVIĆ, M. / KRSTINIĆ, A., 1985. Genetika i oplemijvanje šumskog drveća.- Sveučilište u Zagrebu, 505 s.
- WUEHLISCH, G. / LIESEBACH, M. / MUHS, H. J. / STEPHAN, R., 1998. A Network of International Beech Provenance Trials.- V: TUROK, J. (ur.), KREMER, A. (ur.), VRIES, S. de. (ur.). First EUFORGEN Meeting on Social Broadleaves: 23-25 October 1997, Bordeaux, France. [Rome]: International Plant Genetic Resources Institute, s. 164-172.



Stopnja 1: speči brst
Stage 1: dormant bud



Stopnja 2: brsti nabrekli in podaljšani
Stage 2: buds swollen and elongated



Stopnja 3: brsti brstijo, prvič opazna zelena barva, srebrno siv odsev
Stage 3: buds begin to burst, first green is visible, silver gray shining



Stopnja 4: začetek pojavljanja zaviti in dlakavih listov
Stage 4: folded and hairy leaves begin to appear



Stopnja 5: vidni posamezni zaviti in dlakavi listi
Stage 5: individually visible folded and hairy leaves



Stopnja 6: listi razviti, vendar še mladostne oblike z bledeimi dlačicami
Stage 6: leaves unfolded, still fan-shaped, pale scales present



Stopnja 7: listi popolnoma odprti, gladki in svelli
Stage 7: leaves unfolded, smooth and bright



Slika 3: *Fagus sylvatica* L. - Ocena stopnje olistanja buke po standardizirani 7 stopenjski lestvici Inštituta za gozdno genetiko in žlahtenje, Grosshansdorf, Nemčija (delovno gradivo, Graupa)

Figure 3: *Fagus sylvatica* L. - Assessment of flushing according to standardized 7-step scale as proposed by Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Grosshansdorf, Germany