

Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzymidentifizierung

III. Geographische Variation an 2 Esterase- und 2 Leucin-aminopeptidase-Loci in der schwedischen Fichtenpopulation

VON F. BERGMANN¹⁾

(Eingegangen Februar / Revision April 1973)

Einleitung

Isoenzym-Polymorphismen, deren genetische Kontrolle bekannt ist, haben schon in vielen Fällen zur Klärung populationsgenetischer wie auch evolutionsbiologischer Probleme beigetragen. Auch bei natürlichen Waldbaum-Populationen sollte die Identifizierung derartiger „Gen-Marker“ vielfache Möglichkeiten zur Analyse der genetischen Variationsmuster auf der Basis von Genhäufigkeits-Verteilungen bieten. Entsprechende Untersuchungen waren bislang recht selten und beschränkten sich meist auf einige wenige morphologische und physiologische Merkmalsalternativen, so daß bei Forstpflanzen in überwiegendermaßen quantitativ-genetische Methoden angewandt werden mußten.

In ersten Isoenzym-analytischen Untersuchungen wurden bereits für verschiedene Laub- und Nadelbaum-Arten zahlreiche elektrophoretische Enzym-Varianten beschrieben, doch dürfte dabei nur zum Teil auch eine genetische Variabilität zugrunde liegen. Während populationsgenetische Studien verschiedentlich auch schon an Hand von Enzymband-Verteilungen durchgeführt wurden (SAKAI et al. 1971, SAKAI und PARK 1971, SAKAI und MIYAZAKI 1972), gelang in einigen Fällen bereits eine genetische Charakterisierung der Isoenzym-Variation in Populationen oder Nachkommenschaften (BARTELS 1971, CONKLE 1971, FERET und STAIRS 1971, FERET 1972).

In unseren Untersuchungen über Isoenzym-Polymorphismen bei natürlichen Fichtenpopulationen (*Picea abies*) wurde als Pflanzenteil das trockene Endosperm ruhender Samen bevorzugt, da dieses Nähr- und Speicherzwecken dienende haploide Gewebe sowohl in methodisch-experimenteller Hinsicht (BERGMANN 1971) als auch wegen der relativ einfachen Gen-analytischen Verfahren einige wesentliche Vorteile bietet (BERGMANN 1973). Nachdem ein Vorkommen elektrophoretischer Enzym- und Protein-Muster bereits im Koniferen-Endosperm beobachtet werden konnte (DURZAN 1966, DURZAN und CHALUPA 1968, BERGMANN 1971), gelang es uns dann, 3 polymorphe Esterase(EST)- und 2 polymorphe Leucinaminopeptidase(LAP)-Loci im Fichten-Endosperm zu identifizieren (BERGMANN 1973).

In der folgenden Arbeit soll nun die Verteilung der Allelhäufigkeiten an 4 dieser Isoenzym-Loci bei geographisch unterschiedlich lokalisierten Populationen aufgezeigt werden, wobei die Variation innerhalb jeder Population wie auch die Differenzierung zwischen den Populationen im Vordergrund steht. Die Untersuchung umfaßte Samenproben aus 8 autochthonen Herkünften der schwedischen Fichtenpopulation, die sich in Nord-Süd-Richtung über das Verbreitungsgebiet verteilen.

Material und Methodik

Das Samen-Material dieser schwedischen Fichtenbestände (*Picea abies*) wurde uns freundlicherweise von Herrn

Dr. P. KRUTZSCH, Königl. Forstliche Hochschule zu Stockholm, zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Proben bestanden aus 2–3000 Samen und sollten von vielen Bäumen erntet sein. Die geographische Lage der einzelnen Herkünfte wird in Tab. 1 beschrieben. Von jeder Herkunft wurden 2 X 200 Samen pro Enzym-System analysiert, und die angegebenen Werte stellen jeweils das arithmetische Mittel der aus den 2 Stichproben resultierenden Daten dar.

Die Techniken der Aufbereitung und Extraktion der Endosperm-Gewebe, sowie die Methoden der Gel-elektrophoretischen Trennung und Sichtbarmachung der EST- und LAP-Isoenzyme entsprachen denen in früheren Untersuchungen (BERGMANN 1971, 1973). Durch die Verwendung des haploiden Endosperms ist für jeden Isoenzym-Phänotyp im Zymogramm eine direkte Allel-Zuordnung ermöglicht worden (BERGMANN 1973), so daß die Häufigkeiten der einzelnen Alleltypen nach jeder Analyse sofort bestimmt werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

I. Beschreibung der EST- und LAP-Polymorphismen

In einer ersten Gen-analytischen Untersuchung an Einzelbaum-Saatgut der Herkunft Westerhof konnten drei

Tab. 1. — Numerierung und geographische Beschreibung der schwedischen Herkünfte

Nr. d. Herkunft	Name d. Herkunft (Ortsbezeichnung)	Gebiet/Bezirk	Breitengrad Längengrad Höhe ü. M.
1	Kåbdalis	Norrbottens län	66° 11' 20° 03' 410 m
2	Boden	Norrbottens län	65° 53' 21° 40' 250 m
3	Sörliden	Arvidsjaur kom. Norrbottens län	65° 49' 19° 14' 450 m
4	Älvsbyn	Norrbottens län	65° 44' 20° 52' 90 m
5	Bergsjö	Hälsingland	62° 01' 16° 58' 60 m
6	Edsbyn	Hälsingland	61° 22' 15° 47' 250 m
7	Gästrikland		60° 30' 16° 34' 200 m
8	Västanfors	Västmanland	59° 57' 15° 49' 120 m

¹⁾ Lehrstuhl f. Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen, 34 Göttingen-Weende, Büsgenweg 2.

polymorphe EST-Loci (EST A, EST B, EST C) mit jeweils 2 bis 3 Allelen und ein polymorpher LAP-Locus (LAP B) mit 4 Allelen identifiziert werden, an einem weiteren LAP-Locus (LAP A) war bei diesem Westerhof-Material bislang keine Variation festzustellen (BERGMANN 1973). Die schwedische Fichtenpopulation zeichnet sich durch eine erhöhte Variation an diesen Isoenzym-Loci aus, wodurch ein schon qualitativ verändertes Allel-Muster im Vergleich zur Westerhöfer Herkunft erscheint. Neben dem Vorkommen weiterer Alleltypen an den Loci EST C und LAP B ist vor allem der LAP A-Locus im Gegensatz zu Westerhof durch eine beträchtliche Variation gekennzeichnet.

Die neu auftretenden Allele wurden an Hand von Segregationsanalysen an Einzelbaum-Saatgut aus schwedischen und finnischen Fichtenbeständen identifiziert (BERGMANN, in Vorbereitung). Während die EST- und LAP-Phänotypen bisher durchweg als Isoenzymband-Varianten in Erscheinung traten (siehe BERGMANN 1973), werden nun in 2 Fällen Phänotypen der Loci LAP A und LAP B durch das vollständige Fehlen einer Enzymaktivität charakterisiert, weshalb die entsprechenden Allele auch als sog. Nullallele bezeichnet werden. Eine Identifizierung derartiger Nullallele, die wohl den rezessiven Alleltyp repräsentieren, dürfte in diploidem Material nur nach Kreuzungsanalysen möglich sein. Die folgende Variations-analytische Untersuchung erfolgte an den EST-Loci EST A mit den Allelen (EST A₁, A₂), EST B (EST B₁, B₂, B₃) und an den LAP-Loci LAP A mit den Allelen (LAP A₁, A₂, A₃, A₄) und LAP B (LAP B₁, B₂, B₃, B₅).

In den Samenproben einiger Schweden-Herkünfte treten mit einer Häufigkeit von 5–10% EST-Muster auf, welche von den bisher analysierten Mustern völlig abweichen. Sie lassen keine den EST A- und EST B-Phänotypen entsprechende Isoenzym-Varianten in der jeweiligen Zymogramm-Region erkennen, stattdessen erscheint in starker Ausprägung nahe dem sonstigen EST B-Bereich eine für β -Naphthylacetat Substrat-spezifische Aktivitätszone, die möglicherweise von einer Acetylcholinesterase stammen könnte, jedoch bei den „normalen“ EST-Mustern ebenfalls vorhanden ist. Beträchtliche EST-Aktivität (speziell mit α -

Naphthylacetat reagierend) findet sich dagegen in der EST A-Zymogrammregion, doch weisen die Enzymband-Komplexe keine Ähnlichkeit mit den bisher gefundenen Isoenzym-Varianten auf. Das Zustandekommen dieser „abnormen“ EST-Muster wird z. Zt. untersucht; ein Vorkommen EST-Muster störender Faktoren im Endosperm mancher Samen muß ausgeschlossen werden, da Mischhomogenate von „normalen“ und „abnormen“ Endospermgeweben selbst im Verhältnis 1 : 2 keine Veränderung der typischen EST-Muster hervorriefen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese neuen Muster evtl. in frühen Entwicklungsstadien des Makrogametophyten auftreten und dann bei unvollständiger oder fehlender Samenreife im Endospermgewebe erhalten bleiben; eine Verbindung zu frühen Keimstadien der Samen sollte nicht in Betracht kommen, da noch 120 Std. nach Keimungsbeginn die „normalen“ EST-Muster erkennbar sind. Für die folgenden populationsgenetischen Untersuchungen wurden die „abnormen“ EST-Muster nicht berücksichtigt.

II. Geographische Verteilung der EST- und LAP-Allelhäufigkeiten

Die 4 hier untersuchten Isoenzym-Loci sind in allen 8 Schweden-Herkünften vollständig polymorph, d. h. in keiner Population erscheint auch nur ein Genlocus mit einem fixierten Alleltyp. Die Allel-Häufigkeiten der verschiedenen Loci in den 8 Herkünften zeigt Tab. 2. Es fällt sofort auf, daß die allgemein häufiger vorkommenden Alleltypen in allen Populationen vertreten sind, ein einzelnes Fehlen betrifft immer nur die selteneren Allele. Da mit nur zwei Ausnahmen (bei LAP B₁, B₂) an jedem Genlocus ein und dasselbe Allel für alle 8 Herkünfte dominierend ist, und zudem drastische Verschiebungen der Genhäufigkeiten über einen Bereich von mehr als 25% nicht beobachtet werden, erreicht die genetische Differenzierung zwischen den einzelnen Fichtenpopulationen nicht das Ausmaß, das man bei anderen Organismenarten für entsprechende Isoenzym-Loci schon wiederholt nachweisen konnte.

Betrachtet man jetzt die EST- und LAP-Loci im einzelnen, so findet man jedoch in einigen Fällen eine konti-

Tab. 2. — Allelhäufigkeiten (in %) an den Isoenzym-Loci in 8 Schweden-Herkünften

L O C I	EST A		EST B			LAP A				LAP B			
	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	B ₃	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B ₁	B ₂	B ₃	B ₅
Herkunft 1	24.3	75.7	69.4	28.7	1.9	44.8	38.9	13.3	3.0	42.9	49.3	7.8	-
Herkunft 2	15.6	84.4	67.6	29.6	2.8	43.8	35.2	16.8	4.2	52.1	40.8	7.1	-
Herkunft 3	16.3	83.7	65.0	32.9	2.1	48.1	32.1	14.1	5.7	45.0	47.8	7.2	-
Herkunft 4	10.6	89.4	65.1	34.9	-	48.5	32.5	13.9	5.1	54.6	38.1	7.3	-
Herkunft 5	5.1	94.9	62.7	37.3	-	46.9	36.1	10.4	6.6	50.5	41.6	7.9	-
Herkunft 6	3.8	96.2	57.5	39.2	3.3	45.7	39.6	8.6	6.1	51.7	37.8	9.3	1.2
Herkunft 7	3.1	96.9	57.8	42.2	-	47.3	38.0	7.9	6.8	52.8	36.9	8.8	1.5
Herkunft 8	4.3	95.7	54.4	44.0	1.6	46.7	37.1	7.4	8.8	51.5	35.8	9.1	3.6

nuierliche Verschiebung der Allelhäufigkeiten ausgehend von der am nördlichsten gelegenen Herkunft 1 und fortlaufend bis zur südlichsten Herkunft 8 (siehe Tab. 1). Besonders ausgeprägt ist diese klinale Variation am EST A-Locus, an dem das Allel EST A₁ mit einer Häufigkeit von fast 25% in der Herkunft 1 auftritt, aber in den südlicheren Herkünften nur noch mit einer Häufigkeit von 3–4% vertreten ist (Tab. 2). Die Häufigkeit des Allels EST A₂ nimmt entsprechend in Nord-Süd-Richtung zu. Eine ähnliche klinale Veränderung ist, wenn auch in einem engeren Variationsbereich, bei dem Allelpaar EST B₁/B₂ zu beobachten, das seltene Allel EST B₃ tritt hier nur sporadisch auf. Auch in norwegischen Fichtenpopulationen wurde bei den entsprechenden Allelen schon ein ähnlicher Häufigkeitsgradient gefunden (BARTELS, persönliche Mitteilung). Beide LAP-Loci sind innerhalb der einzelnen Herkünfte hochgradig polymorph, zwischen den Populationen existiert jedoch keine sofort augenfällige Variation. Allein die beiden Nullallele LAP A₄ und LAP B₅ lassen eine graduelle Häufigkeitszunahme in fortschreitend südlicheren Herkünften erkennen, allerdings kann das Allel LAP B₃ erst ab Herkunft 6 nachgewiesen werden. Während LAP B₁ allgemein das weitaus häufigste Allel am LAP B-Locus darstellt (50–55%), erscheint in 2 Fällen das Allel LAP B₂ mit der größeren Häufigkeit. Inwieweit jedoch die relativ hohe Lage der betreffenden Herkünfte 1 (410 m) und 3 (450 m) für eine derartige Verschiebung eine Rolle spielt, kann momentan aus Ermangelung weiterer Beispiele nicht festgestellt werden. Für eine eindeutige Herkunfts-Identifizierung von Samen-Material sind die bislang gefundenen Unterschiede innerhalb der schwedischen Fichtenpopulation noch nicht völlig ausreichend, doch sollte durch die Einbeziehung weiterer Enzym-Systeme eine deutlichere Differenzierung auch in einem relativ einheitlichen Gebiet möglich sein.

Für eine vergleichbare Darstellung der genetischen Unterschiede zwischen einzelnen Populationen ist es häufig von Vorteil, alle festgestellten Daten durch eine einzige Maßzahl auszudrücken. Daher wurden an Hand der Genhäufigkeiten die Identitäts- und Distanz-Maße nach NEI (1972) zwischen allen 8 Fichten-Herkünften berechnet. Die genetische Identität (I) zwischen zwei Populationen berechnet sich zu

$$I_{xy} = \frac{\sum X_i \cdot Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \cdot \sum Y_i^2}}$$

bei Berücksichtigung eines Genlocus, wobei X_i und Y_i die

Häufigkeiten des i-ten Allels in den Populationen X und Y bezeichnen. Bei gleichzeitiger Betrachtung mehrerer Loci wird das arithmetische Mittel der Werte $\sum X_i \cdot Y_i$, $\sum X_i^2$ und $\sum Y_i^2$ über alle Loci gebildet. Die genetische Distanz (D) zwischen 2 Populationen ist definiert als

$$D = -\log_e I$$

Die unter Einbeziehung aller Isoenzym-Loci erhaltenen Werte sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Da bei identischen Populationen I = 1 ist, lassen die gefundenen Identitäts-Werte zwischen den einzelnen Herkünften insgesamt eine nur geringe genetische Differenzierung erkennen, doch nehmen die Werte in allen Fällen mit fortschreitender Entfernung zwischen den Populationen ab, wodurch ein Differenzierungsgradient parallel zur geographischen Verbreitung sichtbar wird. Ein wenig deutlicher kommt dies bei den Distanz-Werten (D = 0 bei vollständiger Identität) zum Ausdruck, die fast ein Spiegelbild zur geographischen Distanz darstellen.

Die Vorstellung, daß ein großer Teil der genetischen Varianten an Isoenzym-Loci keiner funktionellen Adaptation unterliegt und somit als selektiv neutrale Allele aufzufassen ist, wird durch unsere Resultate jedenfalls nicht gestützt. Die auf dieser Hypothese basierende Driftwirkung würde zu zufallsmäßigen Differenzierungs-Mustern führen. Eine klinale Variation an einzelnen Loci, wie auch ein Differenzierungsgradient parallel zur geographischen Verbreitung lassen demgegenüber aber einen spezifischen Selektionseffekt in kontinuierlich veränderter Umwelt erkennen. Die Kausalbeziehung zwischen den untersuchten Isoenzym-Polymorphismen und ihrem adaptiven Vorteil konnte bisher aber noch nicht sichergestellt werden.

Anmerkung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für eine Sachbeihilfe, Herrn Dr. P. KRUTZSCH und der Königl. Forstl. Hochschule zu Stockholm für die Bereitstellung des Samen-Materials gedankt.

Zusammenfassung

Die geographische Variation zwischen 8 schwedischen Fichten-Herkünften wurde an 2 EST- und 2 LAP-Loci untersucht. Die betreffenden Allelhäufigkeits-Verteilungen lassen insgesamt keine stark ausgeprägte genetische Differenzierung erkennen, doch wird in mehreren Fällen eine klinale Variation in Nord-Süd-Richtung sichtbar.

Die zur vergleichenden Darstellung berechneten genetischen Identitäts- und Distanz-Werte zwischen allen Populationen zeigen eine mit fortschreitender Entfernung zu-

Tab. 3. — Genetische Identitäts-Werte (oben) und Distanz-Werte (unten) zwischen allen 8 Herkünften

Herkunft	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.993	0.994	0.983	0.977	0.970	0.966	0.962
2	0.007		0.995	0.994	0.991	0.987	0.985	0.981
3	0.006	0.005		0.994	0.992	0.987	0.983	0.981
4	0.017	0.006	0.006		0.996	0.994	0.993	0.992
5	0.023	0.009	0.008	0.004		0.997	0.997	0.995
6	0.030	0.013	0.013	0.006	0.003		0.998	0.996
7	0.035	0.015	0.017	0.007	0.003	0.002		0.999
8	0.039	0.019	0.019	0.008	0.005	0.004	0.001	

nehmende Differenzierung an, so daß die für Isoenzym-Allele diskutierte Neutralitäts-Hypothese durch unsere Resultate nicht gestützt werden kann.

Schlagworte: Fichtenherkünfte, geographische Variation, Isoenzym-Gene, genetische Identitätswerte.

Summary

Geographical variation among 8 provenances of the Swedish spruce population (*Picea abies*) was approached by the analysis of genetic polymorphisms at 2 EST and 2 LAP loci in the endosperm of dormant seeds. The resulting gene frequency distributions indicate highly polymorphic patterns within populations but only a minor differentiation between individual populations. Clinal variations from north to south, however, were observed in several cases.

Genetic identity and genetic distance values between all pairs of the 8 provenances calculated for better comparisons of the obtained data show an increasing degree of genetic differentiation in parallelism to increasing distance between populations. All results obtained are not in accord with the neutrality hypothesis concerning most isozyme variants.

Literatur

BARTELS, H.: Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta* (Berl.) 99, 283—289

(1971). — BERGMANN, F.: Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 142, 278—280 (1971). — BERGMANN, F.: 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. Genetics* 43, Heft 5 (1973). — CONKLE, M. T.: Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. *Forest Sci.* 17, 190—194 (1971). — DURZAN, D. J.: Disc electrophoresis of soluble protein in the female gametophyte and embryo of conifer seed. *Can. J. Botany* 44, 359—361 (1966). — DURZAN, D. J., and CHALUPA, V.: Free sugars, amino acids, and soluble proteins in the embryo and female gametophyte of jack pine as related to climate at the seed source. *Canad. J. Bot.* 46, 417—428 (1968). — FERET, P. P.: Peroxidase isozyme variation in interspecific elm hybrids. *Can. J. Forest Res.* 2, 264—270 (1972). — FERET, P. P., and G. R. STAIRS: Enzyme electrophoresis-application of molecular biology to forest-genetics research. *Proc. 18. N.-E. Forest Improv. Conf.* 72—80 (1971). — NEI, M.: Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist* 106, 283—292 (1972). — SAKAI, K. I., and Y. G. PARK: Genetic studies in natural populations of forest trees. III. Genetic differentiation within a forest of *Cryptomeria japonica*. *Theoret. Appl. Genetics* 41, 13—17 (1971). — SAKAI, K. I., and Y. MIYAZAKI: Genetic studies in natural populations of forest trees. II. Family analysis: a new method for quantitative genetic studies. *Silvae Genetica* 21, 149—154 (1972). — SAKAI, K. I., Y. MIYAZAKI, and T. MATSUURA: Genetic studies in natural populations of forest trees. I. Genetic variability on the enzymatic level in natural forests of *Thujaopsis dolabrata*. *Silvae Genetica* 20, 168—173 (1971).

Cytology of some Himalayan trees

Thalamiflorae

By P. N. MEHRA and T. S. SAREEN

Department of Botany
Panjab University, Chandigarh-14 (India)

(Received February / March 1973)

Introduction

The Himalayas are exceedingly rich in woody species which inhabit varied types of forests. About 180 species of this region are exploited as commercial timbers. Cytological studies on these forest trees which are a prerequisite to the employment of cytogenetical techniques for their improvement, have remained almost completely neglected in the past. Chromosomal constitution of even some of the most appreciated timber species was unknown. The senior author and his associates undertook cytomorphological exploration of the Himalayan hardwoods in 1962. Some parts of this work have already been published or communicated (MEHRA *et al.*, 1962—1972). The present investigations pertain to tree species of ten families falling under the *Thalamiflorae* of BENTHAM and HOOKER (1862), a group of taxa of immense evolutionary significance. These include three timbers of great value, *Shorea robusta*, *Michelia champaca* and *Bombax ceiba*, in addition to five less important woods.

Material and Methods

The material was obtained chiefly from forests of Nainital and Simla Hills in the Western and Darjeeling Hills in

the Eastern Himalayas. Flower buds were fixed in Carnoy's fluid. Anther squashes were made in 1% acetocarmine for obtaining meiotic preparations. Somatic number was determined from tapetal cells or squashes of leaf-tips made in acetolacmoid, following their pretreatment with 0.003 M solution of 8-hydroxyquinoline. The photomicrographs and camera lucida drawings are at a uniform magnification of $\times 1360$. The voucher specimens have been deposited in the Panjab University Herbarium.

Results

Cytological data on 21 species have been summarised in *Table 1*. The meiosis was normal in all the taxa excepting the one mentioned in the body of the paper. Regular pairing and disjunction of chromosomes was observed, followed by wall formation, which resulted in normal tetrads with well filled stainable pollen grains.

MAGNOLIACEAE: The family is very important in Indian forestry as it contains valuable tall timber trees with fine straight bole. The four species of *Michelia* studied here, like others of this genus, are all diploid. *M. kisopa* and *M. montana* are worked out for the first time. *M. Champaca* is a high class constructional timber. Magnoliaceae is a