

Zmienność genetyczna naturalnego odnowienia i drzewostanu macierzystego sosny (*Pinus sylvestris* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.)

Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands

Justyna Anna Nowakowska*, Tadeusz Zachara, Agata Konecka

Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Sękocin Stary, Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn

* Tel. +48227150467; email j.nowakowska@ibles.waw.pl

Abstract. The genetic variability and biodiversity of tree populations ensures the stability and sustainability of forest ecosystems. New research tools based on molecular DNA markers enable precise characterization of forest genetic resources, i.e. detection of different allele frequencies in mature trees and progeny populations. The paper describes the genetic structure of mature stands of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Oława Forest District, and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) in Jawor Forest District and stands of their respective progeny.

In the Scots pine stand, there was a slight increase (0.6%) in heterozygosity level and a larger increase (4.9%) in the inbreeding coefficient of progeny trees. In the Norway spruce stand, despite a small reduction (0.9%) in heterozygosity, a similar increase (4.6%) in the inbreeding coefficient of progeny was revealed. In both stands, allele richness and the partition probability of basic clustering were high. Both pine and spruce adults and progeny trees were characterized by high levels of genetic similarity (96% and 79% respectively). Gene flow between the mature and progeny populations was high ($N_m > 1$) for both Scots pine and Norway spruce.

Conservation of the gene pool within forest tree stands requires an increase in the proportion of natural regeneration. To estimate the extent to which genes are transmitted between adult trees and their progeny more studies are needed, especially taking into account the influence of silviculture measures, like selective tree cutting, on the genetic variability of the younger generation.

These results confirm that the gene pool was conserved when transmitted between the stands studied, as well as highlighting the usefulness of such a study for the silvicultural purposes.

Key words: nSSR markers, gene flow, genetic differentiation

1. Wstęp

Badanie puli genowej gatunku dostarcza cennych informacji na temat struktury genetycznej drzew leśnych, począwszy od sekwencji genomów poszczególnych gatunków, do poziomu zmienności genetycznej drzewostanów macierzystych i odnowienia. Bogactwo puli genowej poszczególnych populacji określane jest na podstawie częstości występowania w genomie różnych form alleli DNA. Poza zjawiskiem depresji outbredowej (z ang. *outbreeding depression*), czyli nagłego obniżenia kondycji spowodowanego kojarzeniem się osobników

pochodzących z odległych, izolowanych stanowisk, można przypuszczać, że bardziej zróżnicowana pula genowa gatunku daje większe prawdopodobieństwo wystąpienia korzystnej kombinacji alleli, gwarantujących przeżywalność i przystosowanie do zmiennych warunków środowiska (Reed, Frankham 2003).

Precyzyjna identyfikacja puli genowej drzewostanu na poziomie informacji genetycznej zawartej w DNA jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym oraz poznanie procesów dziedziczenia korzystnych cech hodowlanych i wpływu czynników zewnętrznych (antro-

pologicznych i środowiskowych) na zmiany w strukturze genetycznej populacji leżą u podstaw wielu badań (Hamrick, Nason 2000; Sperisen et al. 2001; Avise 2004; Kremer, Reviron 2004; Neale, Ingvarsson 2008). Również w Polsce prowadzono analizy zróżnicowania genetycznego sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego, m.in. RAPD, STS, PCR-RFLP i SSR (Csaikl et al. 2002; Dering, Lewandowski 2009; Nowakowska 2009, 2010). Wyniki tych badań potwierdzają kierunek głównych dróg rekolonizacji w Polsce np. świerka pospolitego z różnych refugium polodowcowych, o odrębnej puli genowej populacji świerków z refugium nordycko-bałtyckiego i populacji z południa, z refugium karpacko-hercyńskiego (Dering, Lewandowski 2009).

Powierzchnia lasów pochodzących z odnowienia naturalnego wzrosła w Polsce w ostatnich dziesięcioleciach z 3% do około 10% (Raport o stanie lasów 2012), ale pozostaje niższa w porównaniu do średniej europejskiej wynoszącej 67% (State of Europe's Forests 2011). Niezależnie od przyczyn takiego stanu rzeczy, istotnym zagadnieniem badawczym pozostaje kwestia możliwości i celowości zwiększania udziału tej powierzchni, przy wzięciu pod uwagę ekologicznych, produkcyjnych i społecznych funkcji lasu. Postulat trwałej i zrównoważonej gospodarki leśnej implikuje wzrost zainteresowania metodami naturalnego odnawiania lasu także gatunków światłożądnych, takich jak sosna (Dobrowolska 2010). W kompleksowych badaniach nad tym zagadnieniem nie można pomijać aspektu genetycznego. Przedstawiona tematyka badawcza wpisuje się w nurt badań struktury genetycznej na poziomie drzewostanu macierzystego i naturalnego odnowienia u sosny (*Pinus sylvestris* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.).

Hipotezą wyjściową było stwierdzenie, że lokalna pula genetyczna drzewostanu jest na podobnym poziomie zarówno u drzew dojrzałych, jak i w młodym pokoleniu podrostu, powstałego z naturalnego odnowienia (samosiewu). Badania miały na celu określenie puli genowej w obu grupach drzew każdego gatunku, określonej na podstawie poziomu zmienności genetycznej jądrowych *loci* DNA w odnowieniu naturalnym w odniesieniu do poziomu zmienności drzewostanu macierzystego.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny do badań genetycznych zebrano z 60 drzew każdego z analizowanych gatunków w następujących obiektach:

– sosna zwyczajna – Nadleśnictwo Oława, leśnictwo Karwiniec, oddz. 98c, 114-letni lity drzewostan sosnowy, rosnący na siedlisku lasu mieszanego świeżego,

będący w klasie odnowienia, z 7-letnim nalotem o pokryciu 10%.

– świerk pospolity – Nadl. Jawor, leśn. Muchów, oddz. 155h, 105-letni lity drzewostan świerkowy o zwarciu umiarkowanym, na siedlisku lasu mieszanego wyżynnego świeżego, z 7-letnim nalotem o pokryciu 30%.

DNA genomowe izolowano z 30–35 próbek drewna każdego gatunku, z losowo wybranych osobników z drzewostanu macierzystego, znajdujących się w odległości nie mniejszej niż 10 m od siebie, oraz z 30 próbek igieł z odnowienia. Do izolacji zastosowano zestawy DNeasy 250 Plant Mini Kit (QIAGEN), a otrzymane ilości DNA analizowano spektrofotometrycznie za pomocą aparatu NanoDrop ND-1000 (TK-Biotech). W celu scharakteryzowania struktury genetycznej osobników dorosłych i odnowienia sosny zwyczajnej, analizy przeprowadzono za pomocą trzech *loci* mikrosatelitarnego DNA jądrowego: SPAG 7.14, SPAC 12.5 i SsrPt-ctg-4363 (Soranzo et al. 1998; Chagné et al. 2004). W przypadku drzew dorosłych i odnowienia świerka pospolitego zastosowano również trzy *loci* nSSR: SpA-G2, SpAC1-H8 i SpAG-D1 DNA jądrowego wg Pfeiffer et al. (1997). Oznaczenie genotypów drzew dorosłych i odnowienia przeprowadzono za pomocą programu CEQ™ 8000 Series Genetic Analysis System Software v 9.0 w automatycznym sekwenatorze CEQ 8000 (Beckman Coulter®).

Obliczenia podstawowych parametrów genetycznych, w tym obserwowaną (n_a) i efektywną (n_e) liczbę alleli w *locus*, oraz frekwencje występowania alleli null wykonano za pomocą programu GenePop v. 4.0.10 (Rousset 2008). Procent *loci* polimorficznych (ang. *polymorphic informative content*, PIC) markerów mikrosatelitarnych obliczono w programie MolKin v.3.0 (Gutiérrez i in. 2009). Zmienność wewnątrz grup ustalono na podstawie częstości alleli oraz heterozygotyczności H_o i H_E (Nei 1978) w programie GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse 2012). Biorąc pod uwagę niejednakową liczbę badanych drzew w grupach drzew dorosłych i odnowienia sosny i świerka, oszacowano bogactwo alleli A_R za pomocą programu FSTAT v. 2.9.3.2 (Gudet 2002), obliczane dla najmniejszej liczebności próby w obrębie porównywanych grup. Ten sam program wykorzystano do obliczeń współczynników wsobności (F_{IS}) i utrwalenia (F_{ST}) wg Weir i Cockerham (1984). Podobieństwo genetyczne, obliczone na podstawie prawdopodobieństwa podziału między drzewami dorosłymi a odnowieniem (*partition probability*, P_t), uzyskano na podstawie analizy podstawowego skupienia MCMC (*basic clustering Markov Chain Monte Carlo*) dla $p = 0.02$ w programie BAPS 2.0 (Corander et al. 2003).

W celu określenia przepływu genów między badanymi grupami drzew rodzicielskich i potomnych obliczono parametr N_m (Nei 1987).

3. Wyniki

Analiza genetyczna sosny zwyczajnej

Obie grupy osobników, tzn. drzew dorosłych i potomnych sosny w drzewostanie Oława, analizowano pod kątem występowania różnych alleli w trzech poszczególnych *loci*. I tak, w *locus* SPAG 7.14 otrzymano 27 różnych wariantów DNA o wielkości od 176 do 248 par zasad (ryc. 1). Wśród badanych drzew dorosłych najczęściej występowały allele 192 i 211 pz (frekwencja 11%), natomiast u drzew potomnych – dominował allele 192 pz (14%). Wśród potomstwa nie znaleziono 6 alleli (178, 184, 186, 197, 211 i 235 pz) spośród tych, które stwierdzono u drzew dorosłych, ale potwierdzono obecność 6 innych alleli – 176, 188, 190, 195, 230 i 248 pz. Dla *locus* SsrPt-ctg-4363 otrzymano 12 wariantów alleli, o wielkości od 92 do 123 pz (ryc. 1). Zarówno drzewa dorosłe, jak i odnowienie, cechowała dominacja allele 97 pz, występującego z frekwencją odpowiednio 44% i 47%. Populacja potomna miała 2 warianty alleli (101 i 123 pz) niewystępujące w populacji drzew dorosłych, natomiast nie miała 5 wariantów alleli o wielkości 92, 95, 107, 111 i 119 pz. *Locus* SPAC 12.5 miał 24 różne warianty alleli, o wielkości od 123 do 178 pz. W populacji drzew dorosłych odnotowano 8 alleli, które nie występowały w populacji potomnej, ale za to odnowienie miało 3 nowe warianty alleli: 137, 141 i 171 pz (ryc. 1). Zastosowane 3 mikrosatelitarne *loci* charakteryzowały się wysokim poziomem polimorfizmu (PIC = 84,1%).

Średnia obserwowana liczba alleli w *locus* drzew rodzicielskich ($n_a = 16,333$) była większa niż u drzew potomnych ($n_a = 14,333$; tab. 1). Oczekiwana średnia liczba alleli na *locus* była prawie taka sama u drzew rodzicielskich i potomnych, odpowiednio $n_e = 10,521$ oraz $n_e = 10,566$ (tab. 1). Współczynnik bogactwa alleli był nieznacznie wyższy u drzew dorosłych ($A_R = 15,290$) niż w odnowieniu ($A_R = 14,150$). Udział alleli null w *locus* wynosił średnio 8% u drzew dorosłych i 2% u odnowienia (nie zilustrowane).

U drzew potomnych heterozygotyczność obserwowana ($H_O = 0,884$) była wyższa niż u drzew rodzicielskich ($H_O = 0,841$). Heterozygotyczność oczekiwana pokolenia potomnego ($H_E = 0,859$) była o 0,6% większa niż drzew rodzicielskich ($H_E = 0,853$). Poziom wsobności drzew dorosłych wynosił 1,1% ($F_{IS} = 0,011$) i był nieistotny statystycznie, natomiast poziomy wsobności odnowienia wynosił 4,9% ($F_{IS} = 0,049$) (tab. 1). Średnia wartość współczynnika utrwalenia dla drzewostanu rodzicielskiego i odnowienia była niska $F_{ST} = 0,082$.

Obie grupy sosen charakteryzował niewielki dystans genetyczny $D_N = 0,041$, co potwierdza duże 96% podobieństwo genetyczne między badanymi drzewami dorosłymi i odnowieniem ($P_t = 1$; dla $p = 0,02$).

Ogólnie uważa się, że populację cechuje duży przepływ genów, gdy wartość $N_m > 1$ (Slatkin, Barton 1989). Współczynnik $N_m = 30,297$ wskazuje na wysoki przepływ genów między badanymi grupami drzew. Można zatem założyć, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa wzięły udział głównie drzewa dojrzałe badanego drzewostanu.

Tabela 1. Parametry zmienności genetycznej badanych drzew dorosłych i potomnych sosny zwyczajnej

Table 1. Genetic variation parameters for adult and progeny Scots pine trees

<i>Locus</i>	Typ drzew		A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
	Type	of trees							
SPAG 7.14	D		50	20,000	15,077	18,922	0,893	0,934	0,022 ^{ns}
	O		56	21,000	17,606	19,801	0,960	0,943	0,089*
SsrPt-ctg-4363	D		60	10,000	3,352	8,344	0,667	0,702	-0,062 ^{ns}
	O		48	7,000	3,704	6,642	0,792	0,730	0,067 ^{ns}
SPAC 12.5	D		54	19,000	13,1351	18,597	0,963	0,924	0,058 ^{ns}
	O		40	15,000	10,390	16,000	0,900	0,904	-0,006 ^{ns}
Średnia	D		57	16,333±5,508	10,521±6,284	15,290	0,841±0,155	0,853±0,131	0,011 ^{ns}
Mean	O		46	14,333±7,024	10,566±6,952	14,150	0,884±0,085	0,859±0,113	0,049 ^{ns}

D – drzewa dorosłe / adult trees

O – drzewa z odnowienia / natural regeneration

A_0 – średnia liczba alleli / mean allele number

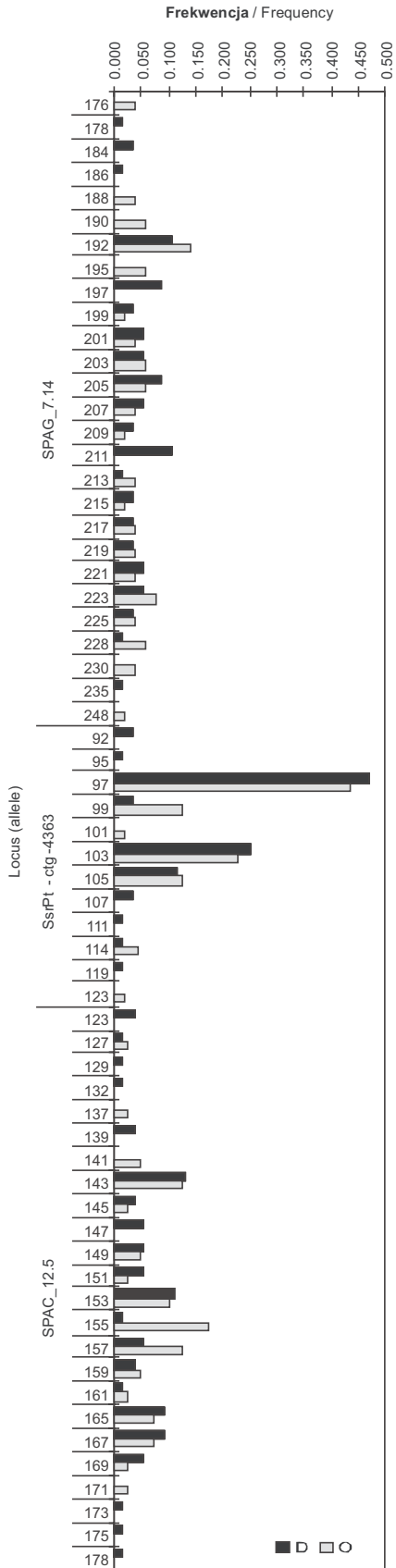
n_a, n_e – obserwowana i oczekiwana liczba alleli na *locus* / effective and expected allele number

A_R – bogactwo alleli / allelic richness

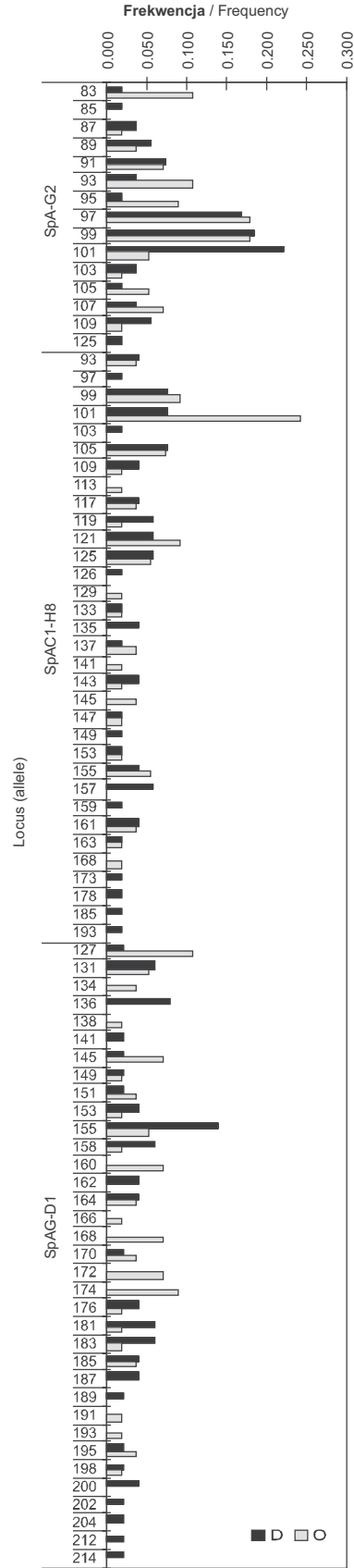
H_O – heterozygotyczność obserwowana / observed heterozygosity

H_E – heterozygotyczność oczekiwana / expected heterozygosity

F_{IS} – współczynnik wsobności: test P values Fishera dla niedoboru heterozygot; ns – nieistotne, * dla $p < 0,05$ / inbreed coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency, ns – not significant, * for $p < 0.05$



Rycina 1. Frekwencja alleli w badanych loci mikrosatelitarnego DNA u drzew dorosłych (D) i w odnowieniu (O) sosny zwyczajnej
 Figure 1. Frequency of three microsatellite DNA loci within adult (D) and progeny (O) trees in Scots pine stand



Rycina 2. Frekwencja alleli w badanych loci mikrosatelitarnego DNA u drzew dorosłych (D) i w odnowieniu (O) świerka pospolitego
 Figure 2. Frequency of three microsatellite DNA loci within adult (D) and progeny (O) trees in Norway spruce stand

Analiza genetyczna świerka pospolitego

Dla obu grup drzew – dorosłych i potomnych – w Nadl. Jawor, otrzymano 16 różnych wariantów alleli o wielkości od 83 do 125 par zasad dla *locus* SpA–G2 (ryc. 2). W grupie drzew dorosłych najczęściej występującym był allel 101 pz (22%), a u drzew z odnowienia: allele 97 i 99 pz (18%). W populacji potomnej brak było 2 rzadkich alleli – 85 i 125 pz – z puli populacji drzew dorosłych. Dla *locus* SpAC1-H8, odnotowano 33 wariantów alleli, w tym u drzew dorosłych dominowały allele 99, 101 i 105 pz (frekwencja odpowiednio 8%), a u drzew potomnych – allel 101 pz (24%). W populacji drzew dorosłych zaobserwowano brak 11 wariantów alleli, które były obecne w populacji potomnej (od 97 do 193 pz, ryc. 2) i obecność 5 innych alleli (w tym rzadkich, z frekwencją występowania 2%). *Locus* SpAG-D1 miał 35 różnych wariantów alleli, o wielkości od 127 do 214 pz. W populacji drzew dorosłych odnotowano obecność 10 alleli, które nie występowały w populacji potomnej. Wśród drzew potomnych dla tego *locus*, odnotowano 9 nowych wariantów alleli, nieobecnych wśród badanych drzew dorosłych (ryc. 2). Zastosowane w badaniach mikrosatelitarne *loci* charakteryzował wysoki poziom polimorfizmu (PIC = 93,9%).

W przypadku świerka średnia obserwowana i oczekiwana liczba alleli w *locus* oraz bogactwo alleli A_R u drzew rodzicielskich były wyższe ($n_a = 22,667$; $n_e = 15,404$; $A_R = 22,690$) niż u drzew potomnych ($n_a = 20,000$; $n_e = 12,178$; $A_R = 19,200$; tab. 2). Udział

alleli null we wszystkich badanych *loci* łącznie wynosił średnio 10% dla drzew dorosłych i odnowienia.

U drzew potomnych heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana (odpowiednio $H_O = 0,723$ i $H_E = 0,913$) były niższe niż u drzew rodzicielskich ($H_O = 0,756$ i $H_E = 0,922$). Udział heterozygot w odnowieniu zmniejszył się o 0,9%. Współczynnik wsobności, określony dla *locus* SpAC1-H8 i SpAG-D1, w przypadku dorosłych świerków był statystycznie istotnie niższy niż współczynnik wsobności świerków w pokoleniu potomnym (tab. 2). Podobnie jak u sosny, dorosłe świerki miały mniejszy współczynnik wsobności ($F_{IS} = 0,190$) w porównaniu do drzew z odnowienia ($F_{IS} = 0,236$). Średnia wartość współczynnika utrwalenia, określającego spadek heterozygotyczności w populacji potomnej, była niska i wynosiła $F_{ST} = 0,032$.

Dystans genetyczny między pokoleniem drzew dojrzałych a odnowieniem okazał się niewielki $D_N = 0,241$; co potwierdził wysoki 79% poziom podobieństwa genetycznego między badanymi drzewami rodzicielskimi i potomnymi ($P_t = 1$; dla $p = 0,02$).

Obliczony dla badanych grup drzew świerka współczynnik $N_m = 18,678$ wskazuje na wysoki przepływ genów między badanymi pokoleniami.

4. Dyskusja

Zastosowane w niniejszych badaniach mikrosatelitarne *loci* jądrowego DNA są jednymi z najprecyzyjniejszych narzędzi służących do określenia genotypów

Tabela 2: Parametry zmienności genetycznej dla badanych drzew rodzicielskich i potomnych świerka pospolitego

Table 2: Genetic variation parameters for adult and progeny Norway spruce trees

<i>Locus</i>	Typ drzew		A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
	Type	of trees							
SpAC1-H8	D		54	15,000	7,677	14,613	0,778	0,870	0,255***
	O		56	13,000	8,859	12,667	0,821	0,887	0,264***
SpA-G2	D		52	26,000	19,882	27,456	0,731	0,950	0,126 ^{ns}
	O		54	23,000	12,150	21,164	0,704	0,918	0,092*
SpAG-D1	D		50	27,000	18,657	26,000	0,760	0,946	0,182***
	O		56	24,000	15,525	23,761	0,643	0,936	0,341***
Średnia	D		52	22,667±6,658	15,404±6,723	22,690	0,756±0,024	0,922±0,045	0,190**
Mean	O		55	20,000±6,083	12,178±3,333	19,200	0,723±0,091	0,913±0,024	0,236**

D – drzewa dorosłe / adult trees,

O – drzewa z odnowienia / natural regeneration,

A_0 – średnia liczba alleli / mean allele number,

n_a , n_e – obserwowana i oczekiwana liczba alleli na *locus* / effective and expected allele number,

A_R – bogactwo alleli / allelic richness,

H_O – heterozygotyczność obserwowana / observed heterozygosity,

H_E – heterozygotyczność oczekiwana / expected heterozygosity,

F_{IS} – współczynnik wsobności: test P values Fishera dla niedoboru heterozygot; ns - nieistotne, * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$ / inbreed coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency; ns – not significant, * for $p < 0,05$, ** for $p < 0,01$; *** for $p < 0,001$

badanych drzew. Markery te cechuje wysoki polimorfizm oraz precyzja otrzymanych wyników. Zastosowanie tylko trzech markerów mikrosatelitarnych w analizach ok. 30 osobników z każdego pokolenia nie wpłynęło na otrzymane wyniki, ponieważ użyte markery charakteryzował wysoki PIC, średni procent alleli null oraz wysokie prawdopodobieństwo identyczności obliczone na podstawie algorytmu MCMC. Podobne badania, wykonane na mniejszej liczbie osobników, umożliwiły przeprowadzenie charakterystyki genetycznej np. izolowanych populacji jarzębu brekinii,nocków i sokoła (Oddou-Muratorio et al. 2003; Rivers et al. 2005; Rutkowski et al. 2010).

Badanie struktury genetycznej odnowienia naturalnego wykazało większe bogactwo puli genowej potomstwa sosny (o 0,6%) oraz uboższą pulę genetyczną odnowienia naturalnego świerka (o 0,9%) w stosunku do populacji drzew dorosłych. Zaobserwowane niewielkie zmiany w puli genowej obu pokoleń najprawdopodobniej wynikają z różnic częstości alleli, spowodowanych przez naturalny dobór osobników rodzicielskich oraz naturalną selekcję podczas adaptacji do zmiennych warunków środowiska (Gömöry 1992). Wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy populacją rodzicielską i potomną było również stwierdzone przez Chomicz (2013) w większości drzewostanów świerkowych Beskidu Śląskiego i Żywieckiego, gdzie odnotowano nieznaczne wzbogacenie puli genetycznej potomstwa w stosunku do pokolenia rodzicielskiego.

Oczekiwana średnia liczba alleli na *locus* była prawie taka sama u drzew rodzicielskich i potomnych, zarówno w przypadku sosny, jak i świerka. Wśród badanych drzew dorosłych i w odnowieniu odnotowano nieistotny statystycznie niedobór heterozygot, określony za pomocą współczynnika wsobności – odpowiednio 1,1% ($F_{IS} = 0,011$) i 4,9% ($F_{IS} = 0,049$) (tab. 1). Niedobór heterozygot w populacji jest zjawiskiem spotykanym w przyrodzie. Czasami, czynniki selekcyjne mogą działać w kierunku powstawania homozygotycznych *loci* w jednym miejscu genomu, a heterozygotycznych – w innych miejscach genomu, zmniejszając przez to obciążenie genetyczne przez faworyzowanie alleli, odpowiedzialnych za korzystne cechy adaptacyjne populacji (Whitlock 2002). U wielu gatunków roślin i zwierząt obserwuje się dodatnią korelację między poziomem heterozygotyczności a dostosowaniem populacji w trakcie ewolucji. Odwrotny trend korelacji obserwowany jest również w populacjach, w których zachodzi eliminacja szkodliwych alleli oraz chów wsobny (Reed, Frankham 2003).

W przypadku sosny pula genowa pokolenia potomnego została wzbogacona o „nowe” genotypy (niewielki wzrost wartości H_E w porównaniu do drzew dorosłych), prawdopodobnie przy udziale pyłku z drzewostanów sąsiednich. Niska wartość współczynnika utrwalenia

($F_{ST} = 0,082$ dla sosny i $F_{ST} = 0,032$ dla świerka) świadczy o niewielkiej różnicy genetycznej pomiędzy obydwojma pokoleniami drzewostanów.

Powyższe wyniki potwierdziły wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy odnowieniem naturalnym a drzewami dorosłymi zarówno w przypadku sosny (96%), jak i świerka (79%), co może sugerować trwałość badanych drzewostanów, dostosowanych do określonych warunków środowiska. W drzewostanie sosnowym z Nadleśnictwa Oława, wysoki przepływ genów między badanymi grupami drzew ($N_m = 30,297$) oraz niewielkie wzbogacenie puli genowej o nowe genotypy wskazują, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa wzięła udział większość pokolenia drzew dojrzałych, i że nie można wykluczyć udziału drzew z sąsiednich drzewostanów. W badanych grupach drzew świerka z Nadleśnictwa Jawor duża wartość współczynnika migracji ($N_m = 18,678$) i niewielki spadek heterozygotyczności w odnowieniu sugerują, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa uczestniczyły głównie drzewa rosnące w obrębie drzewostanu, przy braku lub małym udziale drzew z populacji sąsiednich. Jednak dopiero dalsze badania, uzupełnione np. o analizę przepływu pyłku w warunkach kontrolowanych, całkowicie wyjaśniłyby tę kwestię.

Uzyskane wyniki wskazują na korzystny obraz zachowania struktury genetycznej drzewostanów potomnych we wczesnych fazach wzrostu. Osiągnięcie sukcesu hodowlanego w dużej mierze zależy od poziomu wiedzy o wartości genetycznej drzewostanów rodzicielskich i ich potomstwa. Odnawianie sztuczne głównych gatunków lasotwórczych pozwala zachować większą kontrolę nad przebiegiem selekcji hodowlanej. Jednak zmniejszenie zróżnicowania genetycznego sadzonek produkowanych w szkółkach, będące konsekwencją selekcji, może być przyczyną ich mniejszej tolerancji na czynniki szkodliwe niż w przypadku odnowień naturalnych.

Ze względu na zakres badań pominięto zagadnienia związane ze sposobem zagospodarowania drzewostanu macierzystego, choć mogą one mieć wpływ na pulę genową drzewostanu potomnego (Sabor 2003). Zdaniem Sabora (2003), stosowana rębnia musi umożliwiać swobodny przepływ genów między populacjami danego gatunku tak, aby nie zubażać puli genowej drzewostanu. Niekorzystne jest również odnawianie izolowanych populacji, gdzie pyłek nie ma możliwości wymiany z sąsiednimi drzewostanami, gdyż zjawisko to może prowadzić do chowu wsobnego (Tigerstedt et al. 1982). Według obserwacji prowadzonych dla jodły i buka, najkorzystniejsze są rębnie stopniowe z długim okresem odnowienia, a także, w nieco mniejszym stopniu, rębnia przerębowa (Konnert et al. 2007). Badania prowadzone nad sosną w Nadl. Gubin, wykazały duże podobieństwo struktury genetycznej naturalnego odnowienia do drze-

wostanu macierzystego, jednak był to rzadko występujący u sosny drzewostan wielogeneracyjny z odnowieniem w wieku 20–50 lat (Kosińska et al. 2007). Z drugiej strony wyniki uzyskane w ramach niniejszych badań w drzewostanie sosnowym w Nadl. Oława wskazują, że również przy krótkim okresie odnowienia można uzyskać młode pokolenie o zbliżonej puli genowej do pokolenia macierzystego.

Dla zachowania puli genowej drzewostanu, oprócz sposobu odnowienia, istotny jest także wpływ stosowanych cięć pielęgnacyjnych (czyszczeń oraz trzebieży). Prowadzone w przeszłości trzebieże sortymentowe ukierunkowane na pozyskanie cennych sortymentów wielkowymiarowych, w konsekwencji prowadziły do pozostawiania w drzewostanach osobników o najgorszych cechach pod względem fenotypowym, jakościowym i zdrowotnym (Bernadzki et al. 1999). Badania prowadzone w drzewostanach, gdzie zastosowano rzadkie, ale bardzo silne cięcia pielęgnacyjne, wykazały, że silna trzebież również niesie ze sobą ryzyko utraty rzadkich alleli (Konnert et al. 2007).

5. Wnioski

1. Struktura genetyczna drzewostanu, określona współczynnikiem heterozygotyczności populacji, może być podstawą oceny puli genowej pokolenia potomnego drzew leśnych z odnowienia naturalnego.

2. Poziom zmienności genetycznej drzew, zarówno w przypadku sosny, jak i świerka, w drzewostanie macierzystym i w pokoleniu potomnym z odnowienia naturalnego nie różni się; zmiany w obecności i częstotliwości rzadkich alleli były nieliczne.

3. Niewielkie zmiany w strukturze genetycznej dwóch pokoleń sosny i świerka sugerują zachowanie tego samego poziomu zdolności przystosowawczych nowego pokolenia do zmieniających się warunków środowiska naturalnego.

4. Zachowanie puli genowej w młodym pokoleniu gatunków lasotwórczych wymaga zwiększenia udziału odnowień naturalnych. Do oszacowania skali tego wzrostu niezbędne są badania na szerszą skalę, uwzględniające wpływ rodzaju rębni na zmienność genetyczną młodego pokolenia.

Podziękowania

W publikacji przedstawiono wyniki badań zrealizowanych w ramach projektu „Odnowienie naturalne najważniejszych gatunków lasotwórczych w Polsce jako element strategii trwałego i zrównoważonego zagospodarowania lasu” sfinansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych.

Szczególne podziękowania składamy pracownikom Nadleśnictw Jawor i Oborniki Śląskie za udostępnienie drzewostanów do badań, jak również Jolancie Bieniek, Małgorzacie Borys i Annie Terebie z Zakładu Hodowli i Genetyki Drzew Leśnych IBL, za pomoc w analizach laboratoryjnych DNA i opracowaniu danych.

Pracę dedykujemy naszej Koleżance, śp. Anecie Michalskiej, która brała aktywny udział w analizach laboratoryjnych sosny i świerka.

Literatura

- Avise J. C. 2004. Molecular markers, natural History, and Evolution. Second Ed., Sinauer Associates, USA: s. 664. ISBN 0-87893-041-8.
- State of Europe's Forests 2011. Status and trends in sustainable forest management in Europe. UNECE/FAO: s. 340.
- Bernadzki E., Ilmurzyński E., Szymański S. 1999. Trzebieże. Warszawa, PWRiL. 258 s. ISBN 83-09-00192-4.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T. et al. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1204-1214.
- Chomicz E. 2013. Zmienność genetyczna odnowień naturalnych świerka (*Picea abies* L. Kart.) w zamierających drzewostanach Beskidu Śląskiego i Żywieckiego. Rozprawa doktorska, Sękocin Stary, Instytut Badawczy Leśnictwa, s. 111.
- Corander J., Waldmann P., Sillanpää M. J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367–374.
- Csaikl U. M., Glaz I., Baliuckas V., Petit R. J., Jensen J. S. 2002. Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland. *Forest Ecology Management*, 156: 211–222.
- Dering M., Lewandowski A. 2009. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? *Forest Ecology Management*, 259: 229–235.
- Devey M.E., Delfinomix A., Kinloch B.B., Neale D.B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white-pine blister rust in sugar pine. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 2066–2070.
- Dobrowolska D. 2010. Warunki powstawania odnowień naturalnych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Tuszyna. *Leśne Prace Badawcze*, 71 (3): 217–224.
- Gudet J. 2002. J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*, 86(6): 485–486.
- Gömöry D. 1992. Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology Management*, 54: 215–223.
- González-Martínez S.C., Ersoz E., Brown G.R., Wheeler N.C., Neale D.B. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics*, 172: 1915–1926.

- Gutiérrez J.P., Royo L.J., Álvarez I., Goyache F. 2005. MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718–721.
- Hamrick J. L., Nason J. D. 2000. Gene flow in forest trees. w: Forest conservation genetics: principles and practice. Ed. A. Young, D. Boshier, T. Boyle, Wallingford, UK, CABI, s. 81–90. ISBN 0-85199-504-7.
- Konnert M., Hosius B., Hüssendorfer E. 2007. Genetische Auswirkungen waldbaulicher Maßnahmen – Ergebnisse, Stand und Forschungsbedarf. *Forst und Holz*, 62, 1: 8–14. ISSN 0932-9315.
- Kosińska J., Lewandowski A., Chałupka W. 2007. Genetic variability of Scots pine maternal populations and their progenies. *Silva Fennica*, 41(1): 5–12.
- Kremer A., Reviron M. P. 2004. Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 197: 1–2.
- Lindner M., Maroschek M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J. et al. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 259: 698–709.
- Longauer R., Gömöry D., Pacalaj M., Krajmerova D. 2010. Genetic aspects of stress tolerance and adaptability of Norway spruce. w: Spruce forest decline in the Beskids. Hlásny T., Sitková Z. (red.). Zvolen, National Forest Centre – Forest Research Institute Zvolen. s. 131–143.
- Mejnartowicz L. 2010. Zmienność jodły (*Abies alba* Mill.) w polskich Karpatach i Sudetach. w: Postęp badań w zakresie genetyki populacyjnej i biochemicznej drzew leśnych. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13: Kraków, Polska Akademia Umiejętności: 27–36.
- Namkoong G. 1991. Maintaining Genetic Diversity in Breeding for Resistance in Forest Trees. *Annual Review of Phytopathology* 29: 325–342. DOI: 10.1146/annurev.py.29.090191.001545.
- Neale D. B., Ingvarsson P.K. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. *Plant Biology*, 11(2): 149–155.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 23: 341–369.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press. ISBN 0-231-06320-2.
- Nowakowska J. A. 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Poland. *Dendrobiology*, 61: 119–129.
- Nowakowska J. A. 2010. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13, Kraków, Polska Akademia Umiejętności, s. 37–53.
- Nowakowska J. A., Oszako T. 2008. Stan zdrowotny i różnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA. *Sylwan*, 9: 11–20.
- Oddou-Muratorio S., Houot M.L., Demesure-Musch B., Austerlitz F. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, 12(12): 3427–3439.
- Peakall, R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pfeiffer A., Olivieri A. M., Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Genome*, 40: 411–419.
- Prus-Głowacki W., Godzik S. 1995. Genetic structure of *Picea abies* trees tolerant and sensitive to industrial pollution. *Silvae Genetica*, 44: 62–65.
- Raport o stanie lasów w Polsce 2012. CILP, Warszawa 2011: 84 s.
- Reed D. H., Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1): 230–237.
- Rivers N.M., Butlin R. K., Altringham J.D. 2005. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14: 4299–4312.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rutkowski R., Rejt Ł., Tereba A., Gryczyńska-Sięmiątkowska A., Janic B. 2010. Population genetic structure of the European kestrel *Falco tinnunculus* in Central Poland. *European Journal of Wild Research*, 56: 297–305.
- Sabor J. 2003. Wpływ stosowanych zabiegów pielęgnacyjnych i rębni na zmianę struktury genetycznej drzewostanów. *Sylwan*, 2: 39–48.
- Slatkin M., Barton N. H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349–1368.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1260–1261.
- Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Gebourek T., Vendramin G. G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology*, 10: 257–263.
- Tigerstedt P.M.A., Rudin D., Niemelä T., Tammissola J. 1982. Competition and neighbouring effect in a naturally regenerating population of Scots pine. *Silva Fennica*, 16: 122–129.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Whitlock M.C. 2002. Selection, load, and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics*, 160: 1191–1202.

Wkład autorów

J.A.N. opracowała koncepcję badawczą i zaprojektowała eksperymenty, analizowała dane i napisał manuskrypt. T.Z. uczestniczył w zbieraniu materiału roślinnego i napisał manuskrypt. A.K. przyczyniła się do głównych idei zawartych w dyskusji.