



Leśny Bank Genów Kostrzyca

**Zachowanie różnorodności biologicznej siedlisk
obszarów NATURA 2000, poprzez ochronę
ex situ jesionu wyniosłego, wiązu górskiego,
wiązu pospolitego oraz wiązu szypułkowego
na terenie Polski (FraxUmLBG)**



FraxUmLBG

Wydawca:

Państwowe Gospodarstwo Leśne Lasy Państwowe

Leśny Bank Genów Kostrzyca

Miłków 300, 58-535 Miłków

Redakcja:

Małgorzata Pałucka

Anna Pasławska

Autorzy zdjęć:

Magdalena Chudzińska, Paulina Hrydziusko, Katarzyna Nowik, Małgorzata Pałucka,

Dagmara Topoła, Urszula Wasileńczyk, Archiwum LBG Kostrzyca

Zdjęcie na okładce: Małgorzata Pałucka

Realizacja:

Wydawnictwo Poligrafia AD REM

58-500 Jelenia Góra, ul. Okrzei 12

www.adrem.jgora.pl

ISBN 978-83-65295-85-9

© by Leśny Bank Genów, Kostrzyca, 2017



Źródło dofinansowania:

Mechanizm finansowy Europejskiego Obszaru Gospodarczego „Ochrona różnorodności biologicznej i ekosystemów” (Islandia, Liechtenstein, Norwegia)

Tytuł projektu:

„Zachowanie różnorodności biologicznej siedlisk obszarów NATURA 2000, poprzez ochronę *ex situ* jesionu wyniosłego, wiązu górskiego, wiązu pospolitego oraz wiązu szypułkowego na terenie Polski (FraxUmLBG)”

Okres realizacji projektu:

marzec 2014 – kwiecień 2017

Operator Programu PL02:

Ministerstwo Środowiska we współpracy z Narodowym Funduszem Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej

PL02 Różnorodność biologiczna i działania na rzecz ekosystemów

Beneficjent:

Leśny Bank Genów Kostrzyca

SPIS TREŚCI

Wstęp	5
Zbiór i przygotowanie do przechowywania materiału rozmnożeniowego jesionu wyniosłego, wiązu szypułkowego, wiązu górskiego oraz wiązu polnego – zagadnienia teoretyczne i praktyczne.....	8
Tradycyjne i kriogeniczne zasoby genowe – zalety i wady.....	19
Zmienność genetyczna jesionu wyniosłego (<i>Fraxinus excelsior</i> L.) w Polsce	32
Ocena skuteczności krioterapii i termoterapii w zwalczaniu patogenów	43

WSTĘP

Czesław Koziol

Leśny Bank Genów Kostrzyca, Miłków 300, 58-535 Miłków

Czeslaw.Koziol@lbg.lasy.gov.pl

Lasy deszczowe strefy umiarkowanej, jak nazywane są czasem lasy łęgowe Europy, pełnią niezwykle cenną rolę ekosystemową. Będąc ogromnym rezerwuarem różnorodności biologicznej tworzącej zazwyczaj trójwarstwowy układ roślinności, są zarazem niezwykle wrażliwe na wszelkie zmiany środowiskowe, w tym przede wszystkim zmiany uwilgotnienia gleby. W wyniku zmian klimatycznych oraz działalności człowieka, polegającej na osuszaniu terenów zalewowych, regulacji koryt rzecznych i pogłębianiu rzek, budowy wałów przeciwpowodziowych – siedliska łęgowe ulegają procesowi brunatnienia gleb i w konsekwencji grądowienia, w wyniku czego powstają siedliska przejściowe pomiędzy łęgami a grądami bądź ich formy mozaikowe (Herbich 2004).

Jesion wyniosły, wiąz górski, pospolity i szypułkowy nie mają dużego znaczenia gospodarczego w Polsce, jednak są składnikiem niezwykle już rzadkich siedlisk łęgowych zajmujących w ok. 0,11% powierzchni naszego kraju, co odpowiada obszarowi ok. 338,6 km². Ich udział w areale wszystkich zespołów stanowi 3,62%, zaś ich udział w powierzchni lasów to 0,39% (Matuszkiewicz 2001). W Polsce wiązy zajmują zaledwie 0,24% powierzchni lasów (Filipiak A. i in. 2014) natomiast jesion 0,50% (Pałucka, Koziol 2015).

Wyodrębniamy dwie grupy lasów łęgowych (Matuszkiewicz 2001; Kaszyński B. Szczukowska H. 2012):

- lasy olszowe, jesionowe i wiązowe, należące do klasy *Querco-Fagetea*, rzędu *Fagetalia sylvaticea*, tworzące związek *Alno-Ulmion*,
- lasy wierzbowe i topolowe, należące do związku *Salicion albae*, należące do klasy *Salicetea purpureae*.

W obrębie związku *Alno-Ulmion* spotykamy 8 zespołów leśnych (Matuszkiewicz 2001):

- łęgi jesionowo-wiązowe, występujące przede wszystkim w dolinach dużych rzek,
- łęgi jesionowo-olszowe, skupione w lekko zabagnionych dolinach małych rzek, to najczęściej spotykany typ łęgu w naszym kraju,
- łęgi olszowe gwiazdnicowe, usytuowane w dolinach niewielkich i szybko płynących potoków,
- podgórski łęg jesionowy, zróżnicowany regionalnie, spotykany w formie niżowej (pomorskiej) i podgórskiej w odmianach: sudeckiej, wschodniokarpackiej i zachodniokarpackiej,
- nadrzeczna olszyna górską, to łęg związany z góorskimi aluwiami rzecznyymi,
- bagienna olszyna górską występująca w Karpatach,
- łęg jesionowy z jarzmianką, stanowiący postać podgórskiego łęgu jesionowego,
- łęg wiązowy z fiołkiem wonnym, który jest bardzo unikalną postacią łęgowego lasu wiązowego, spotykanego w dolinach dolnej Odry.

W kolejnej grupie związku *Salicion albae* lasy łęgowe reprezentowane są przez (Matuszkiewicz 2001):

- łęgi wierzbowo-topolowe, występujące na piaszczystych madach w zasięgu cyklicznych wylewów rzek, bardzo popularne w Polsce,
- nadrzeczne łęgi wierzbowe – ich usytuowanie związane jest z corocznymi zalewami, gdzie na piaszczystych aluwialnych rzekach spotykamy przedstawicieli różnych gatunków wierzb wraz z ich wczesnymi stadiami rozwoju czyli wiklinowiskami, również typowe dla krajobrazu naszego kraju,
- nadrzeczne łęgi topolowe, zdominowane przez topole, które rozwijają się w strefie okresowych zalewów.

Zainteresowanie Leśnego Banku Genów Kostrzyca czynną ochroną siedlisk łęgowych poprzez ochronę zmienności genetycznej najważniejszych drzewiastych komponentów tych siedlisk tj. jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), wiąz górskiego (*Ulmus glabra* Huds.), wiąz szypułkowego (*Ulmus laevis* Pall.) i wiąz pospolitego (*Ulmus minor* Mill.) związane było z jednej strony z faktem, iż gatunki te stały się wręcz rzadkie w lasach Europy, w tym w Polsce, ze względu na fragmentację i postępującą w pierwszej połowie wieku XX degradację właściwych dla nich siedlisk, a z drugiej, z powodu dziesiątkujących te gatunki chorób grzybowych spowodowanych przede wszystkim przez *Hymenoscyphus fraxineus* oraz *Ophiostoma novo-ulmi*. Drugą przyczyną jest to, że jak dotąd nie podjęto także w Polsce kompleksowych badań dotyczących zmienności genetycznej populacji tych gatunków.

Gatunki wiązków oraz jesion wyniosły nie są gatunkami podlegającymi prawnej ochronie w Polsce jednakże siedliska łęgowe, które gatunki te zasiedlają są niezwykle cenne dla Komisji Europejskiej i chronione są dyrektywą siedliskową (92/43/EWG). Trudno jest jednak zachować właściwy stan tych siedlisk (91F0 i 91E0) bez zachowania właściwej kondycji gatunków szkieletowych dla siedliska. Podczas prowadzonych przez nas prac spotykaliśmy się czasem z sytuacjami skrajnymi tj. zupełnym brakiem wskaźnikowych gatunków drzewiastych na siedlisku. Dodatkową przesłanką, dla której Lasy Państwowe podjęły się zadania czynnej ochrony *ex situ* zasobów genowych tych gatunków to fakt, że stan siedlisk opisany w przeprowadzonym w latach 2013-2014 monitoringu dla siedliska 91E0 oraz w latach 2009-2011 dla siedliska 91F0 został przedstawiony głównie jako niezadowolający lub zły, a w proponowanych działaniach ochronnych nie proponuje się prawie żadnych działań o charakterze ochrony czynnej, w tym pilnej ochrony i zachowania *ex situ* zasobów genetycznych na poziomie populacyjnym czy osobniczym poszczególnych, ważnych dla istnienia siedliska komponentów roślinnych, przede wszystkim drzew tworzących niejako szkielet ekosystemu. Tym samym nie są przestrzegane zapisy Konwencji o różnorodności biologicznej z Rio de Janeiro 1992 gdzie w art. 9 zdefiniowana jest konieczność ochrony *ex situ* zagrożonych gatunków i siedlisk. Jako propozycję ochrony jesionu wyniosłego podaje się ochronę bierną drzewostanów (91F0) bądź też wyłączanie łęgów z użytkowania gospodarczego (91E0). Jedynymi działaniami związanymi z ochroną czynną to zwalczanie gatunków inwazyjnych. Jedynie w podręczniku opisującym sposób przeprowadzania monitoringu dla siedliska 91F0 jako wskazówki do formułowania zaleceń ochronnych dla tego siedliska, w przypadkach zamierania i usu-

wania jesionu i braku szans na wprowadzanie jesionu w odnowieniach, proponuje się działania czynne polegające na wprowadzaniu w ramach odnowień sztucznych wiązków i dębów (<http://siedliska.gios.gov.pl>).

Prace zaproponowane przez LBG Kostrzyca w projekcie zatytułowanym „Zachowanie różnorodności biologicznej siedlisk obszarów NATURA 2000, poprzez ochronę *ex situ* jesionu wyniosłego, wiąz górskiego, wiąz pospolitego oraz wiąz szypułkowego na terenie Polski (FraxUmLBG)” koncentrowały się na monitoringu zdrowotności tych gatunków na wytypowanych stanowiskach z 36 obszarów Natura 2000 specjalnej ochrony ptaków, 71 obszarów Natura 2000 ochrony siedlisk, 2 obszarów Natura 2000 posiadających wspólne granice dla obszaru ptasiego oraz siedliskowego obejmujących głównie siedliska 91F0 i 91E0, identyfikacji patogenu *Hymenoscyphus fraxineus* na nasionach przeznaczonych do długookresowego przechowywania i podjęciu prób likwidacji tego patogenu, zabezpieczeniu w maksymalnym stopniu zmienności genetycznej tych gatunków *ex situ* w banku genów, jak również poznaniu zmienności genetycznej jesionu wyniosłego w Polsce. Działania te są zaledwie wstępem do planowanych kolejnych przedsięwzięć LBG Kostrzyca zmierzających do zidentyfikowania genotypów jesionów o wysokim poziomie odporności na *H. fraxineus* i utworzeniu z nich plantacji zachowawczej (odpornościowej), zbadaniu zmienności genetycznej wybranych populacji (stanowisk) wiązków w Polsce i utworzeniu archiwum zachowawczego wiąz górskiego na terenie Arboretum LBG Kostrzyca. Prace te w konsekwencji mają służyć przywróceniu gatunków wiązków i jesionu na właściwe dla nich siedliska, tak ważne dla naszego dziedzictwa narodowego.

Literatura:

1. Herbach J. (red), 2004. Lasy i bory. Poradnik ochrony siedlisk i gatunków Natura 2000 – podręcznik metodyczny. T. 5. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
2. Konwencja o różnorodności biologicznej, 1992 r.
3. Matuszkiewicz J. M., 2001. Zespoły leśne Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
4. Pałucka M., Koziół C., 2015. Ochrona *ex situ* zasobów genowych jesionu wyniosłego i wiązków w Polsce w aspekcie ustępowania tych gatunków z naturalnych siedlisk. *Postępy Techniki w Leśnictwie*, 129.
5. Kaszyński B., Szczukowska H., 2012. Łęgi, polskie lasy deszczowe. Studia i materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej. Rocznik 2012, tom 14 nr 32 (105-112).
6. Napierała-Filipiak A., Filipiak M., 2014. Rozmieszczenie zasobów drzew z rodzaju wiąz (*Ulmus* spp.) w lasach Polski w świetle dokumentacji leśnej. *Sylvan* 158 (11): 811-820.

ZBIÓR I PRZYGOTOWANIE DO PRZECHOWYWANIA MATERIAŁU ROZMNOŻENIOWEGO JESIONU WYNIOSŁEGO, WIĄZU SZYPUŁKOWEGO, WIĄZU GÓRSKIEGO ORAZ WIĄZU POLNEGO – ZAGADNIENIA TEORETYCZNE I PRAKTYCZNE

Marcin Beza

Leśny Bank Genów Kostrzyca, Miłków 300, 58-535 Miłków

Marcin.Beza@lbg.lasy.gov.pl

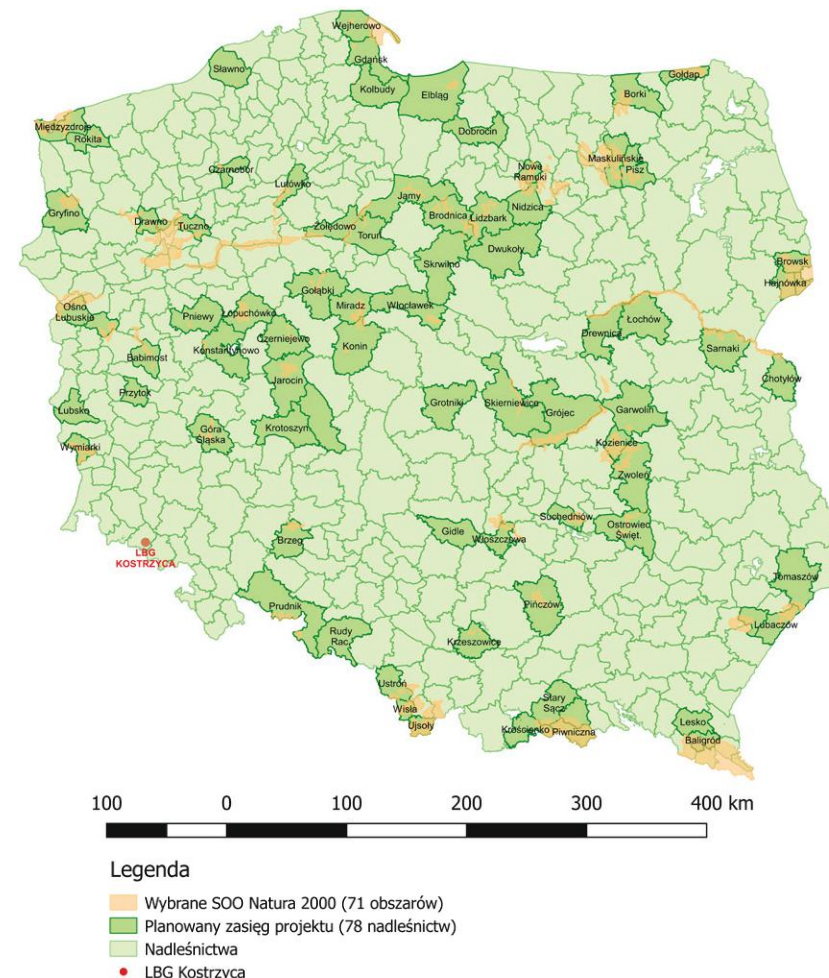
ZAŁOŻENIA PROJEKTU W ZAKRESIE ZBIORU MATERIAŁU ROZMNOŻENIOWEGO

W założeniach projektu pn. „Zachowanie różnorodności biologicznej siedlisk obszarów NATURA 2000, poprzez ochronę *ex situ* jesionu wyniosłego, wiązu górskiego, wiązu pospolitego oraz wiązu szypułkowego na terenie Polski (FraxUmL BG)”, przewidziano zbiór materiału rozmnożeniowego wyżej wymienionych gatunków z 303 stanowisk zlokalizowanych na terenie całej Polski. Pierwotna lokalizacja zbioru obejmowała:

- 36 obszarów Natura 2000 specjalnej ochrony ptaków (kod PLB),
- 71 obszarów Natura 2000 ochrony siedlisk (kod PLH),
- 2 obszary Natura 2000 posiadające wspólne granice dla obszaru ptasiego (PLB) oraz siedliskowego (PLH) o kodzie PLC,
- 78 nadleśnictw Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasy Państwowe.

Tabela 1. Obiekty przewidziane do zbioru materiału roślinnego w ramach projektu.

Gatunek	Rodzaj obiektu	Liczba obiektów	Liczba obszarów Natura 2000
Jesion wyniosły	Drzewo mateczne	28	7
	Drzewostan	23	18
	Źródło nasion	38	25
Wiąz górski	Drzewo mateczne	12	2
	Drzewo zachowawcze	31	2
	Źródło nasion	4	4
Wiąz szypułkowy	Drzewo mateczne	8	2
	Drzewo zachowawcze	39	2
	Źródło nasion	4	3
Jesion wyniosły, wiąz górski, wiąz szypułkowy, wiąz polny	Rezerwat przyrody	116	73
Razem		303	138



Ryc. 1. Planowany zasięg projektu (Archiwum LBG Kostrzyca).

MONITORING STANOWISK

Na wszystkich stanowiskach będących przedmiotem projektu wykonano monitoring, w celu określenia możliwości zbioru materiału rozmnożeniowego. Do częstych problemów, jakie napotymano, należały:

- pogorszenie stanu siedliska,
- mała liczebność populacji,
- zamieranie osobników lub ich obniżona żywotność,
- słaby urodzaj nasion lub nierównomierne obradanie,
- brak gatunku na stanowisku.

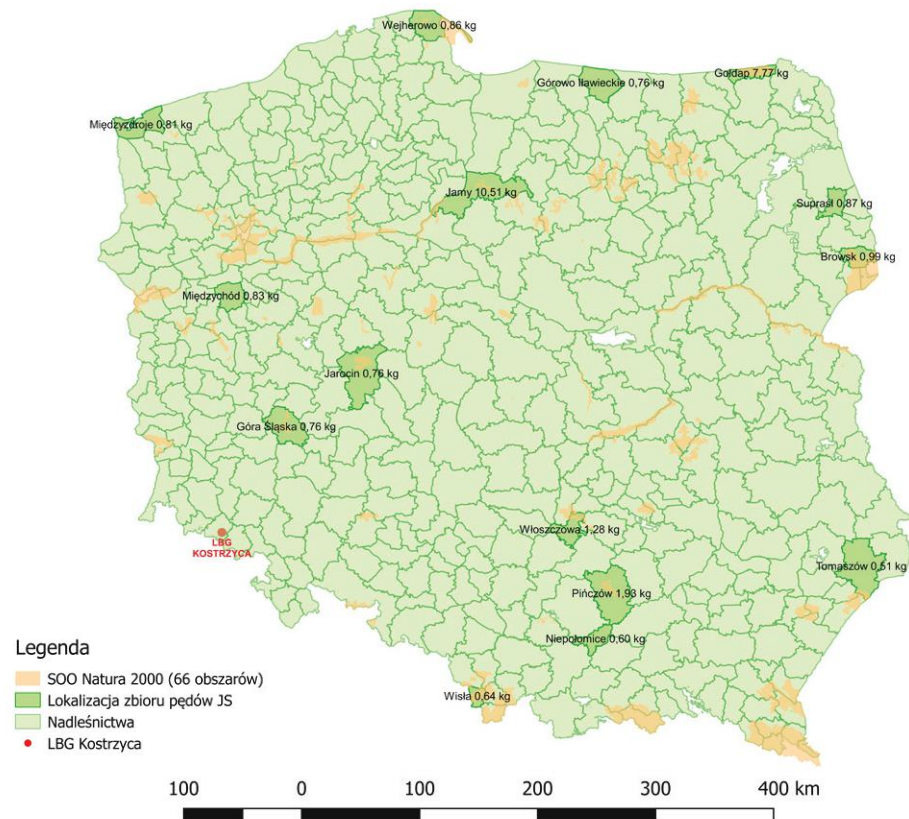
Wymownym faktem jest wynik oceny zdrowotności 9300 drzew jesionu wyniosłego, spośród których aż 82% wykazywało objawy porażenia patogenami grzybowymi.

Stwierdzono brak występowania jesionu wyniosłego na 5 stanowiskach, 3 źródła nasion oraz 1 drzewostan zostały wykreślone z rejestru leśnego materiału podstawowego LP.

W przypadku wiązów – stwierdzono brak ich występowania aż na 65 stanowiskach, po monitoringu wykreślono z rejestrów Lasów Państwowych 18 drzew matecznych i zachowawczych wiązu górskiego, 4 drzewa zachowawcze i 1 drzewo mateczne wiązu szypułkowego.

ZBIÓR PĘDÓW JESIONU WYNIOSŁEGO

W 2014 r. dokonano zbioru pędów jesionu wyniosłego z pąkami spoczynkowymi na potrzeby przechowywania kriogenicznego oraz późniejszych prób hodowli materiału sadzeniowego. Łącznie pozyskano 16 partii pędów o łącznej masie 29,87 kg. Zebrany materiał reprezentuje 13 gospodarczych drzewostanów nasiennych oraz 3 źródła nasion, które znajdują się na terenie 16 obszarów Natura 2000.



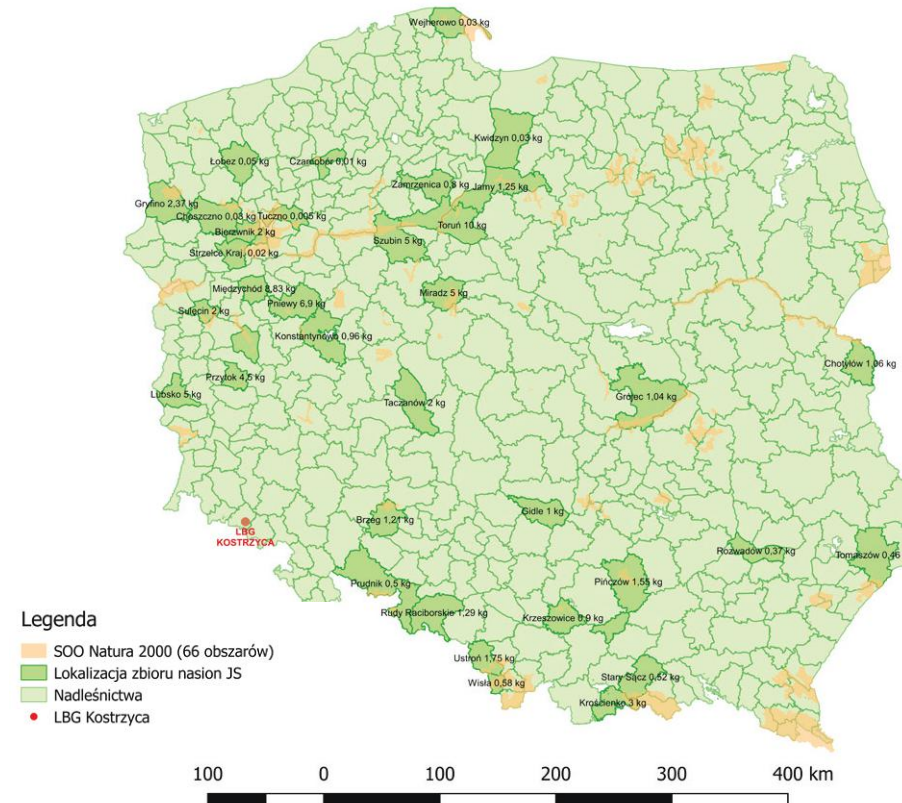
Ryc. 2. Lokalizacja zbioru pędów jesionu wyniosłego (Archiwum LBG Kostrzyca).



Fot. 1. Zbiór pędów jesionu wyniosłego w Nadleśnictwie Gołdap (Archiwum LBG Kostrzyca).

ZBIÓR NASION JESIONU WYNIOSŁEGO

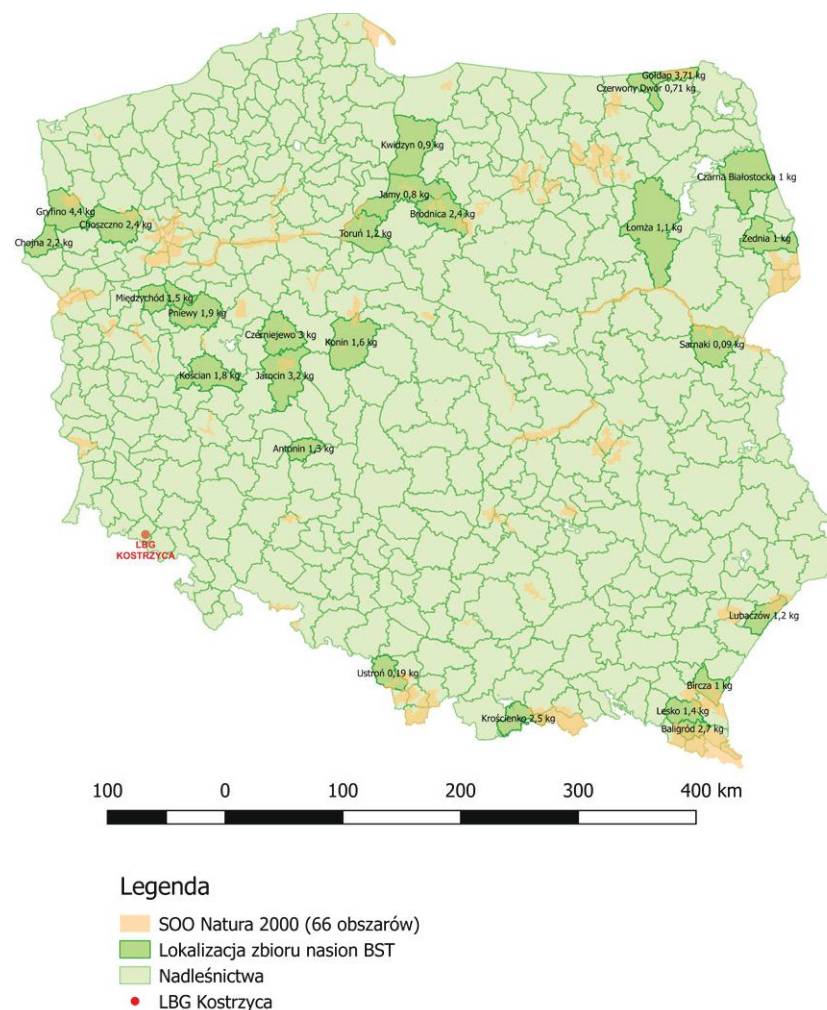
W latach 2014-2016 dokonano zbioru nasion jesionu wyniosłego. Nasiona zbierano w okresie od października do grudnia, uzyskując w sumie 78 partii nasion o łącznej masie 167,3 kg. Zebrany materiał reprezentuje 46 obszarów Natura 2000 w tym 37 rezerwatów przyrody, 15 źródeł nasion oraz 20 gospodarczych drzewostanów nasiennych.



Ryc. 3. Lokalizacja zbioru nasion jesionu wyniosłego (Archiwum LBG Kostrzyca).

ZBIÓR NASION WIĄZU GÓRSKIEGO

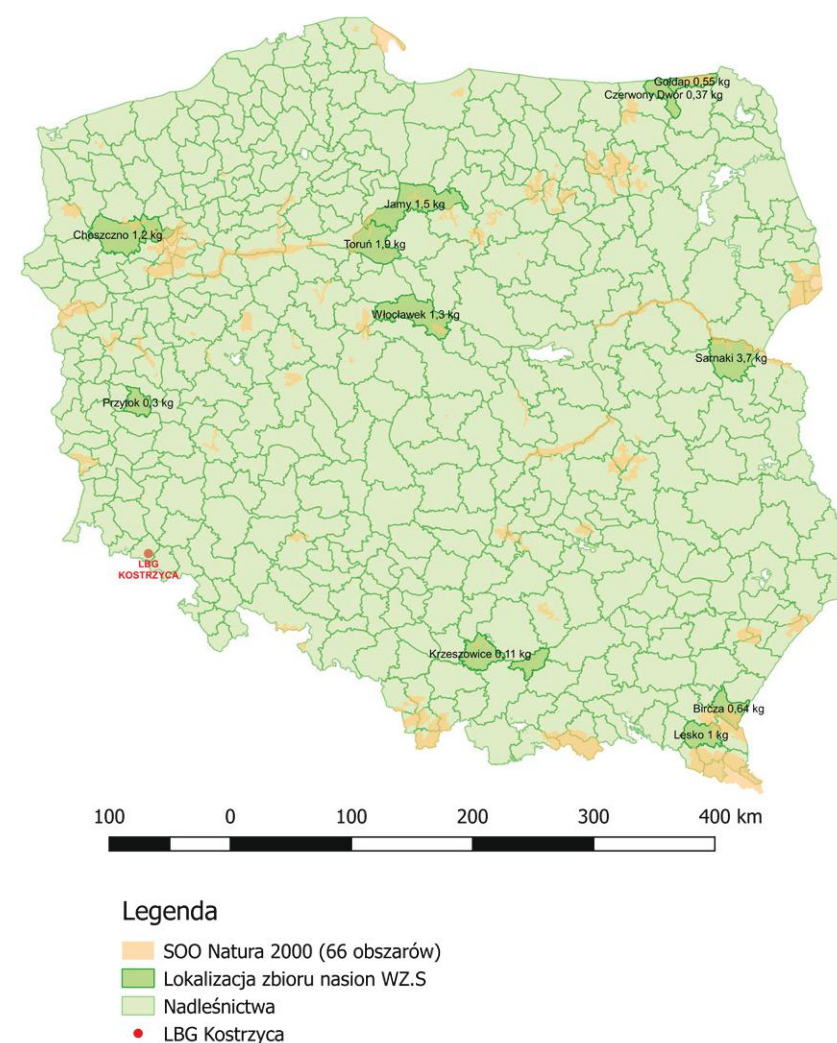
W maju i czerwcu 2015 r. dokonano zbioru nasion wiazu górskiego. Uzyskano łącznie 71 partii nasion o masie 48,91 kg. Zebrany materiał reprezentuje 31 rezerwatów przyrody, 30 drzew zachowawczych, 6 źródeł nasion, 3 drzewa mateczne oraz 1 gospodarczy drzewostan nasienny, znajdujące się na 34 obszarach Natura 2000.



Ryc. 4. Lokalizacja zbioru nasion wiazu górskiego (Archiwum LBG Kostrzyca).

ZBIÓR NASION WIĄZU SZYPUŁKOWEGO

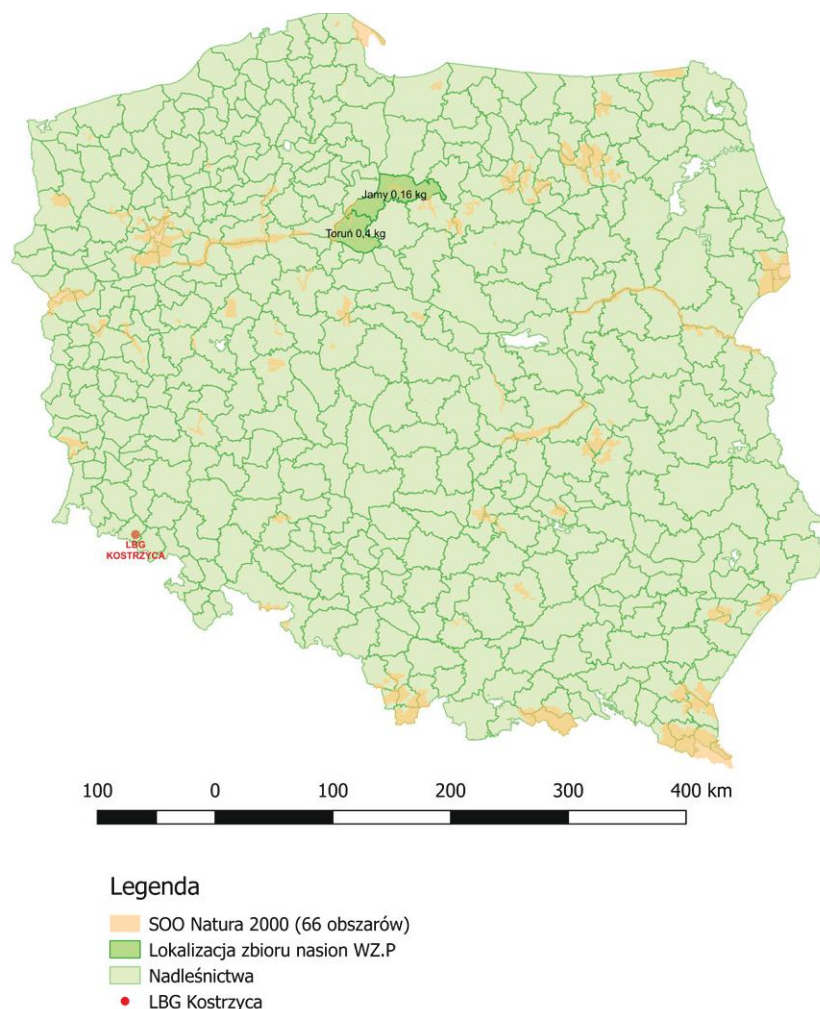
W maju i czerwcu 2015 r. dokonano również zbioru nasion kolejnego gatunku wiazu – wiazu szypułkowego. Pozyskano w sumie 26 partii nasion o masie 14,97 kg. Zebrany materiał reprezentuje 11 rezerwatów przyrody, 9 drzew zachowawczych, 4 drzewa mateczne oraz 2 źródła nasion, znajdujące się na 16 obszarach Natura 2000.



Ryc. 5. Lokalizacja zbioru nasion wiazu szypułkowego (Archiwum LBG Kostrzyca).

ZBIÓR NASION WIĄZU POLNEGO

Ostatnim, z objętych zbiorem nasion, gatunkiem wiazu – był wiąz polny. Czynności zbioru dokonano również w 2015 r., przy czym nasiona udało się pozyskać jedynie z 2 rezerwatów przyrody, zlokalizowanych na terenie Nadleśnictwa Toruń oraz Nadleśnictwa Jamy. Łączna masa zebranych nasion to 0,56 kg. Kod obszaru Natura 2000, na którym położone są stanowiska to: PLH040003.



Ryc. 6. Lokalizacja zbioru nasion wiazu polnego (Archiwum LBG Kostrzyca).

TECHNIKI ZBIORU NASION I PĘDÓW

Z uwagi na stan populacji gatunków objętych projektem, stosowaną techniką zbioru był zbiór z wykorzystaniem technik alpinistycznych (Boratyński A., 1995, Jaworski A., 2011).

Wybór takiej metody podyktowany był gwarantowanym brakiem uszkodzeń pni i gałęzi, które występować mogą np. przy wspinaczce z wykorzystaniem kołców. Zbieracze wyjątkową uwagę poświęcić musieli przygotowaniu stanowiska pracy w koronach drzew – osłabione chorobami grzybowymi osobniki cechowały się dużą ilością osłabionych lub obumarłych konarów, stwarzających ryzyko upadku z dużej wysokości.



Fot. 2. Zbiór z drzew stojących z wykorzystaniem technik alpinistycznych (Archiwum LBG Kostrzyca).

DOSTAWA MATERIAŁU ROZMNOŻENIOWEGO DO LBG KOSTRZYCA

Zebrany materiał dostarczany był do LBG Kostrzyca osobiście przez zbieraczy lub pocztą kurierską. Nasiona lub pędy podlegały ważeniu, a następnie dane poszczególnych partii wpisywane były do systemu informatycznego. Każda partia otrzymywała indywidualny numer oraz opatrzona była etykietą gwarantującą oddzielne składowanie materiału na etapie przygotowania do przechowywania. Protokoły dostawy, podpisane przez stronę przekazującą i przyjmującą, potwierdzały prawidłowość wykonania zbioru.

Nr zapasu:	511/ZP/15
Data przyjęcia:	2015-12-23
Kod gatunku:	JS
RLMP_LP:	39620
Nr drzewa wg. IBL:	
Typ LMP:	ZR NAS
Numer bazy nasiennej:	238 -g
Przekazujący:	WYS-EKO
Właściciel:	LBG KOSTRZYCA
Nadleśnictwo - pochodzenie:	TACZANÓW
Opis przeznaczenia:	Zasób,
Uwagi:	Leśnictwo Koryta 238g, zebrano drzewa owocujące nr 1-30, realizacja projektu EOG zgodnie z umową nr 27/ZmPb/2014 z dnia 29 września 2014 r.

Nr pojemnika	Masa w pojemniku [kg]
1	2,0000
Razem:	2,0000

Ryc. 7. Etykieta zbiorcza (Archiwum LBG Kostrzyca).



PROTOKÓŁ DOSTAWY

1. Przekazujący:	WYS-EKO
2. Właściciel:	LBG KOSTRZYCA
3. Nadleśnictwo - pochodzenie:	TACZANÓW
4. Data przyjęcia:	2015-12-23
5. Numer zapasu:	511/ZP/15
6. Nr dok. poch. LMR (z SILP):	
7. Nr rejestrowy LMP (z KR BNL):	MP/1/41330/05
8. Nr świadectwa LMR (z KR BNL):	MR/48335/16/PL
9. Nr paszportu roślin:	
10. Kod gatunku:	JS
11. Nr RLMP_LP:	39620
12. Nr drzewa wg IBL:	
13. Typ LMP:	ZR NAS
14. Numer bazy nasiennej:	238 -g
15. Rodzaj materiału:	Skrzydłaki
16. Masa deklarowana [kg]:	2,0000
17. Masa przyjęcia [kg]:	2,0000
18. Opis przeznaczenia:	Zasób,
19. Uwagi:	Leśnictwo Koryta 238g, zebrano drzewa owocujące nr 1-30, realizacja projektu EOG zgodnie z umową nr 27/ZmPb/2014 z dnia 29 września 2014 r.

Ryc. 8. Protokół dostawy (Archiwum LBG Kostrzyca).

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU ROZMNOŻENIOWEGO DO PRZECHOWYWANIA

Podstawą teoretyczną przygotowania nasion jesionu wyniosłego oraz 3 gatunków wiązków do przechowywania były wymagania dotyczące żywotności oraz czystości nasion, określone w Polskiej Normie PN-R-65700. Istotne znaczenie miał tu głównie minimalny udział nasion czystych. Dla wyżej wymienionych gatunków dążono do wysokiego poziomu czystości (min. 95% w przypadku nasion jesionu wyniosłego oraz min. 70% w przypadku nasion wiązków).

Tabela 2. Wymagania dotyczące żywotności i czystości nasion jesionu wyniosłego (Polska Norma PN-R-65700).

Żywotność				Czystość	
Klasa	Kielkowanie		Wynik barwienia	Poziom	%
	Zdolność	Energia			(minimalny udział czystych nasion)
					% (co najmniej)
I	x	x	81	Wysoki	95
II	x	x	71	Średni	90
III	x	x	50	Dopuszczalny	85

Tabela 3. Wymagania dotyczące żywotności i czystości nasion wiąz górskiego, wiąz szypułkowego oraz wiąz polnego (Polska Norma PN-R-65700).

Żywotność				Czystość	
Klasa	Kielkowanie		Wynik barwienia	Poziom	%
	Zdolność	Energia			(minimalny udział czystych nasion)
	% (co najmniej)				
I	76	57	x	Wysoki	70
II	61	31	x	Średni	50
III	40	20	x	Dopuszczalny	20

Samo przygotowanie nasion do przechowywania obejmowało następujące czynności (Bugala W., 2015, Suszka B. i in., 1994):

- wstępne doczyszczanie – usunięcie zanieczyszczeń w postaci liści, pędów i innych zanieczyszczeń mechanicznych,
- oddzielanie nasion od szypulek – ręczne obrywanie nasion,
- separację grawitacyjną – odwirowanie nasion pustych i niedokształconych od nasion pełnych (tylko w przypadku jesionu wyniosłego),
- separację ręczną – przebieranie nasion, dla których separacja grawitacyjna nie pozwoliła uzyskać pożądanego poziomu czystości (głównie gatunki wiązków),
- suszenie nasion do wymaganego poziomu wilgotności (jesion wyniosły: 8 – 10%, wiąz górski: 8 – 10%, wiąz szypułkowy: 5,5 – 6,5%, wiąz polny 7,5 – 8%).



Fot. 3. Nasiona jesionu wyniosłego przed i po oddzieleniu od szypulek (Archiwum LBG Kostrzyca).



Fot. 4. Separacja grawitacyjna nasion jesionu wyniosłego (Archiwum LBG Kostrzyca).



Fot. 5. Separacja ręczna nasion wiązgu górskiego (Archiwum LBG Kostrzyca)

Literatura:

1. Boratyński A., 1995. Jesion wyniosły, Polska Akademia Nauk, Instytut Dendrologii, Poznańska Drukarnia Naukowa, Poznań.
2. Bugała W., 2015. Wiązy. Red. Bugała W., Boratyński A., Iszkuło G., Polska Akademia Nauk, Instytut Dendrologii, Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
3. Jaworski A., 2011. Hodowla lasu, Tom III, Charakterystyka hodowlana drzew i krzewów leśnych, PWRiL, Warszawa.
4. Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M., 1994. Nasiona leśnych drzew liściastych – od zbioru do siewu, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poznań.

TRADYCYJNE I KRIOGENICZNE ZASOBY GENOWE – ZALETY I WADY

Dagmara Topoła, Paulina Hrydziuszeko

Leśny Bank Genów Kostrzyca, Miłków 300, 58-535 Miłków

Dagmara.Topola@lbg.lasy.gov.pl; Paulina.Hrydziuszeko@lbg.lasy.gov.pl

W związku z intensywnie postępującym zamieraniem jesionów i wiązów w Polsce, Leśny Bank Genów Kostrzyca podjął się zadania polegającego na zabezpieczeniu puli genowej ww. gatunków.

Zebrany w trakcie realizacji projektu materiał genetyczny został odpowiednio przygotowany i zabezpieczony w komorach chłodniczych (w temp. $-10^{\circ}\text{C}/-20^{\circ}\text{C}$) oraz w parach ciekłego azotu (w temp. około -150°C).



Fot. 1. Komora chłodnicza w LBG Kostrzyca (D. Topoła).



Fot. 2. Zbiornik kriogeniczny (U. Wasileńczyk).

Projektem objęto 303 stanowiska. Każda z kolekcji zebranych nasion została podzielona na dwie części – do przechowania tradycyjnego oraz przechowania kriogenicznego. W przypadku niewielkiej ilości nasion, która nie pozwalała na przechowanie materiału dwiema metodami – zachowano kolekcję tylko w temperaturach kriogenicznych. Podobnie z pąkami spoczynkowymi jesionu wyniosłego – utworzono z nich kriogeniczne zasoby genowe. Zachowane w LBG Kostrzyca kolekcje skrzydłaków jesionu wyniosłego oraz nasion wiązów, będą w przyszłości źródłem do odtworzenia zagrożonych, wymierających i osłabionych populacji tych gatunków drzew.

PRZECHOWYWANIE TRADYCYJNE MATERIAŁU NASIENNEGO

Do zachowania kolekcji *ex situ* metodą tradycyjną zebrano materiał nasienny jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.), wiąz szypułkowy (*Ulmus laevis* Pall.) oraz wiąz górski (*Ulmus glabra* Huds.).

Tabela 1. Ilość utworzonych kolekcji *ex situ* zachowanych metodą tradycyjną.

Gatunek	Ilość utworzonych kolekcji <i>ex situ</i>
jesion wyniosły (<i>F. excelsior</i> L.)	16
wiąz górski (<i>U. glabra</i> Huds.)	19
wiąz szypułkowy (<i>U. laevis</i> Pall.)	8

Każda partia nasion, która jest przeznaczona do przechowywania tradycyjnego w LBG Kostrzyca, w pierwszej kolejności jest sprawdzana pod względem jakości. Następnie poddaje się ją podsuszeniu, co redukuje zawartość wody i obniża aktywność metaboliczną. Kolejnym etapem jest utworzenie odpowiedniej struktury zasobu genowego. Nasiona podsuszone do bezpiecznego poziomu wilgotności przechowuje się w szczelnie zamkniętych aluminiowych pojemnikach lub aluminiowej folii trójwarstwowej (PET12/Al 7/PE85). Warunki przechowywania mają zapewnić nasionom utrzymanie ich wartości siewnej na niezmiennym poziomie przez jak najdłuższy czas.

W przypadku skrzydlaków jesionu wyniosłego istnieje kilka możliwości przechowania:

- 1) Po podsuszeniu do wilgotności 9 – 11% można przechowywać skrzydlaki luzem w warstwie do 30 cm grubości lub w skrzynkach czy przewiewnych workach – w suchym i chłodnym pomieszczeniu. Tak przygotowane skrzydlaki można przechować przez jedną zimę do rozpoczęcia procesu stratyfikacji (Antosiewicz i Kocięcki, 1976);
- 2) Skrzydlaki podsuszone do 7% wilgotności zachowują żywotność nawet po 2,5 roku przechowywania w szczelnie zamkniętych pojemnikach lub workach foliowych w temperaturze 10 – 11°C (Vlase i in., 1973);
- 3) Sposób klasyczny stosowany jest z powodzeniem w laboratoriach (Kórnik i Nancy) od szeregu lat. Po podsuszeniu w temperaturze 18 – 20°C do wilgotności 8 – 10% umieszcza się je w pojemnikach szczelnie zamykanych i przenosi do chłodni o temperaturze ujemnej (-3 do -5°C). W takich warunkach można je przechowywać przez co najmniej 8 – 10 lat.

Pozyskane w ramach projektu skrzydlaki jesionu wyniosłego zostały podsuszone do wilgotności 8 – 10%, szczelnie zapakowane w trójwarstwową folię aluminiową i umieszczone w temperaturze -10°C.

Przechowywanie nasion wiązków:

- 1) Nasiona podsuszone do ok. 10% wilgotności mogą być przechowywane w temperaturach -1°C oraz -3°C przez 5 lat bez utraty żywotności. Jednak już po 6

roku przechowywania obserwuje się 20% spadek kiełkowania (Barbour, Brinkman za Tylkowski, 1987);

- 2) Warunki przechowalnicze w LBG Kostrzyca umożliwiają przechowywanie nasion dla celów gospodarczych w warunkach -10°C oraz -20°C, zatem podjęto próbę przechowywania nasion wiązków w ww. temperaturach.

Pozyskane w ramach projektu nasiona zostały podsuszone do wilgotności 8,0 – 8,5% (wiąz górski); 5,5 – 6,5 % (wiąz szypułkowy), szczelnie zapakowane w trójwarstwową folię aluminiową i umieszczone w temperaturze -10°C oraz -20°C.



Wykres 1. Ilość oraz masa zgromadzonych kolekcji *ex situ* metodą tradycyjną

Każda partia przyjętego do LBG Kostrzyca materiału nasiennego poddawana jest analizie: czystości nasion, masy 1000 nasion, wilgotności nasion. W zależności od gatunku oraz zgodnie z obowiązującymi zasadami oceny nasion, sprawdzana jest także żywotność nasion różnymi metodami. Należą do nich:

Próba rentgenograficzna

Jest to metoda szybka i niedestrukcyjna dla nasion. Umożliwia odróżnienie nasion pełnych, pustych oraz opanowanych przez owady.

Próba krojenia

Próba ta umożliwia uzyskanie szybkiej informacji o jakości nasion badanej partii. Nasiona wydobyte ze skrzydlaków kroi się wzdłuż, zazwyczaj po 18 godzinach moczenia w wodzie. Uzyskane wyniki przelicza się na wartości procentowe, uwidaczniając przy tym w badanej partii udział nasion pełnych, pustych, zepsutych i uszkodzonych przez owady.

Próba barwienia TTC

Po wydobyciu ze skrzydlaków nasiona moczy się przez 18 h w wodzie, po czym na obu podłużnych krawędziach każdego nasienia ścina się podłużny pasek szerokości 0,5 mm. Tak spreparowane nasiona moczy się przez 16 – 24 h w temperaturze 30°C w ciemności, w 1% wodnym roztworze chlorku 2,3,5-trójfenylo-tetrazoliowego o pH 6,6 – 7,5 (TTC).

Po opłukaniu w wodzie odstania się zarodek każdego nasienia. Do kategorii żywotnych zalicza się wyłącznie zarodki całkowicie zabarwione na czerwono. Dopuszczalne są tylko nieznaczne przebarwienia bielma w miejscach oddalonych od zarodka.

Próba kiełkowania i wschodzenia

Metoda, która daje najbardziej wiarygodne wyniki co do rzeczywistej zdolności kiełkowania nasion i ich energii życiowej. Zgodnie z zasadami ISTA próby kiełkowania nasion jesionu wyniosłego przeprowadza się w temperaturze cyklicznie zmiennej 20~30°C przez 8 tygodni na wilgotnej bibule w kiełkowniku Jacobsena, po uprzednim przysposobieniu przez 2 miesiące w temperaturze 20°C, a następnie przez 7 miesięcy w 3 – 5°C. W Nancy (INRA, Francja) uzyskuje się znacznie lepsze wyniki przysposabiając je w pierwszej przez 16 tygodni na wilgotnym podłożu w temperaturze 20°C, a następnie przez 16 tygodni w 3°C, po czym w fazie kiełkowania poddaje się je oddziaływaniu temperatury cyklicznie zmiennej 5~15°C (14 + 10 godz./dobę). W ID PAN Kórniku uzyskuje się doskonałe wyniki prób kiełkowania po przysposobieniu w wymienionych powyżej warunkach cieplnych, w wilgotnym podłożu piaskowo-torfowym, stosując w fazie kiełkowania temperaturę cyklicznie zmienną 3~20°C lub, z jeszcze lepszym efektem, 3~25°C (16 + 8 godz./dobę).

Natomiast próba wschodzenia przeprowadzana w warunkach laboratoryjnych pozwala zrozumieć jak zachowują się nasiona wysiane w szkółce kontenerowej.

Ze względu na długotrwałość przedsięwzięcia przysposabiania (6 – 8 miesięcy) nasion jesionu wyniosłego celowe jest dysponowanie sposobami umożliwiającymi szybkie określenie żywotności nasion.

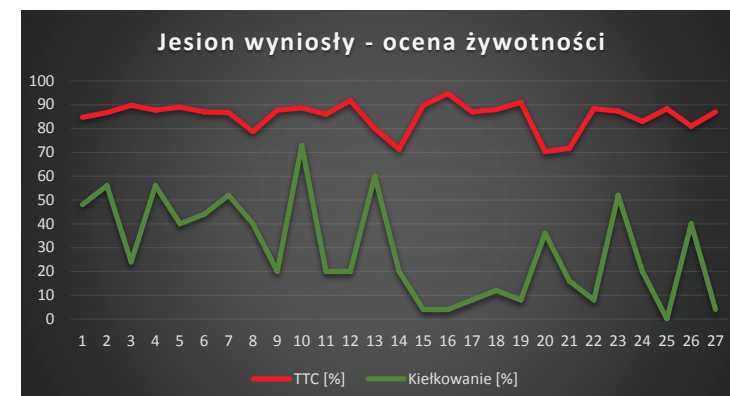
Skrzydłaki jesionu podlegają wielokrotnej blokadzie, w efekcie nie osiągają gotowości do kiełkowania zanim nie przejdą przez odpowiednie przysposobienie przed siewem. Spoczynek wywołany jest głównie przez egzogenne hamujące oddziaływanie owocni oraz endogenne spoczynki morfologiczne spowodowane niedorośnięciem zarodka. Owocnia silnie hamuje rozwój zarodka przez ograniczenie dostępu tlenu do nasiona i tym samym powoduje jego niedorośnięcie. Zarodek jest morfologicznie wykształcony jednak fizjologicznie niedojrzały i wymaga odpowiednich warunków do wzrostu i ustąpienia spoczynku. Stan spoczynku nasion jesionu likwidowany jest w czasie stratyfikacji (przysposabiania).

Istnieje kilka sposobów postępowania ze skrzydlakami jesionu wyniosłego w celu ich wybudzenia z uśpienia:

- 1) *przewyciężanie spoczynku w podłożu stratyfikacyjnym*
Nasiona umieszcza się w wilgotnym podłożu (piasek: torf w stosunku objętościowym 1:1). Przez pierwsze 16 tygodni temperatura podłoża wynosi 15 – 20°C, na kolejne 16 tygodni nasiona umieszcza się w temperaturze 3°C. Jest to stratyfikacja ciepłochłodna.
- 2) *przewyciężanie spoczynku bez podłoża stratyfikacyjnego*
Skrzydłaki nawilża się stopniowo przez rozpylanie nad nimi wody lub przez zraszanie połączone z mieszaniem, aż do wilgotności 55 – 60%. Po zakończeniu nawilżania zaprawia się skrzydlaki na sucho fungicydem. Wilgotność skrzydlaków kontroluje się metodą wagową.

Ocena barwienia TTC oraz kiełkowania nasion jesionu wyniosłego przed przechowywaniem

Materiał nasienny jesionu wyniosłego został poddany ocenie żywotności metodą barwienia TTC oraz kiełkowania. Nasiona jesionu wyniosłego przed próbą kiełkowania poddano stratyfikacji w podłożu. Zastosowano stratyfikację ciepłą 16 tygodniową w 20°C z następującą po niej 16 tygodniową stratyfikacją chłodną w 3°C.

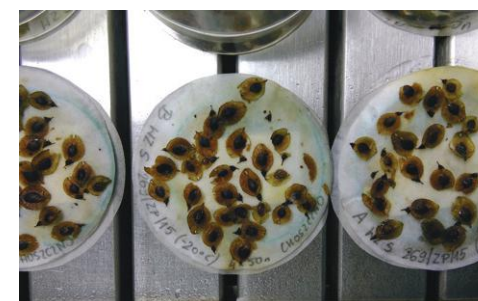


Wykres 2. Wyniki ocen barwienia TTC oraz kiełkowania jesionu wyniosłego przed przechowywaniem.

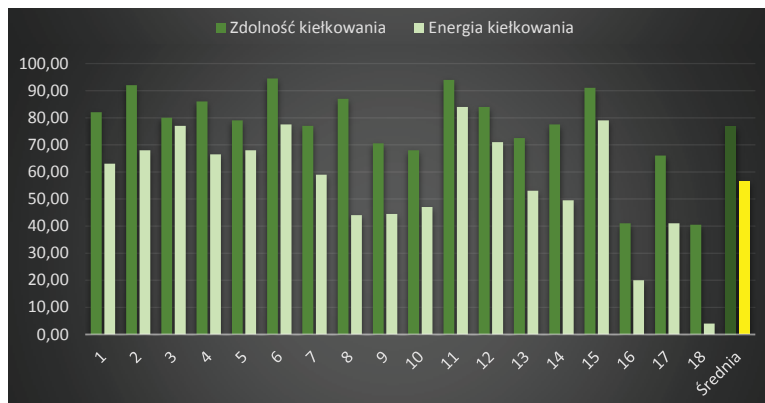
Wyniki barwienia TTC były wyższe niż wyniki uzyskane podczas kiełkowania. Wyniki barwienia TTC kształtowały się w granicach 70 – 94 %.

Kiełkowanie nasion wiązów górskiego przed przechowywaniem

Próby kiełkowania przeprowadzono na kiełkowniku Jacobsena, na wilgotnej bibule w temperaturze cyklicznie zmiennej w zakresie 20~30°C (16 + 8 godz./dobę). Średnia zdolność kiełkowania – 76,81%, średnia energia kiełkowania – 56,44%.



Fot. 3, 4, 5. Próba kiełkowania nasion wiązów (D.Topoła).



Wykres 3. Kiełkowanie nasion wiąz górskiego przed przechowywaniem

Kiełkowanie nasion wiąz górskiego w trakcie przechowywania (po około 9 miesiącach przechowywania) w dwóch temperaturach (-10 i -20°C)

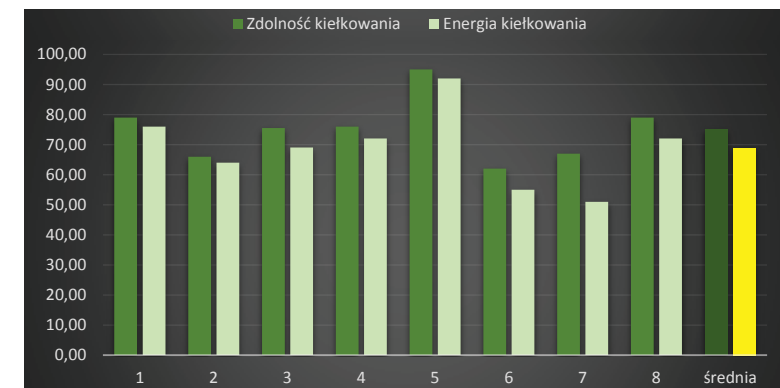
Próby kiełkowania przeprowadzono na kiełkowniku Jacobsena, na wilgotnej bibule w temperaturze cyklicznie zmiennej w zakresie 20~30°C (16 + 8 godz./dobę). Średnia zdolność kiełkowania materiału przechowywanego w -10°C to 60,72%, średnia energia kiełkowania – 45,44%. Natomiast średnia zdolność kiełkowania materiału przechowywanego w -20°C to 62,85%, średnia energia kiełkowania – 50,30%.

Tabela 2. Kiełkowanie nasion wiąz górskiego w trakcie przechowywania.

Nr partii	Kod gatunku	Ocena przed przechowywaniem		Ocena po 9-ciu miesiącach przechowywania w -10°C		Ocena po 9-ciu miesiącach przechowywania w -20°C	
		Zdolność [%]	Energia [%]	Zdolność [%]	Energia [%]	Zdolność [%]	Energia [%]
244/ZP/15 - EOG	BST	82,00	63,00	65,00	46,00	x	x
270/ZP/15 - EOG	BST	92,00	68,00	80,00	62,00	71,50	55,00
314/ZP/15 - EOG	BST	80,00	77,00	49,00	38,50	x	x
273/ZP/15 - EOG	BST	86,00	66,50	74,50	62,00	73,50	61,50
313/ZP/15 - EOG	BST	79,00	68,00	75,50	61,50	59,00	49,50
272/ZP/15 - EOG	BST	94,50	77,50	75,00	60,00	73,50	60,50
239/ZP/15 - EOG	BST	77,00	59,00	62,00	50,00	56,00	46,50
247/ZP/15 - EOG	BST	87,00	44,00	61,50	32,00	x	x
248/ZP/15 - EOG	BST	70,50	44,50	64,00	51,50	52,50	37,50
315/ZP/15 - EOG	BST	68,00	47,00	74,00	58,50	69,50	58,50
238/ZP/15 - EOG	BST	94,00	84,00	64,50	39,50	x	x
259/ZP/15 - EOG	BST	84,00	71,00	54,00	40,00	x	x
245/ZP/15 - EOG	BST	72,50	53,00	49,50	37,50	49,00	34,50
246/ZP/15 - EOG	BST	77,50	49,50	59,00	47,00	53,50	37,50
242/ZP/15 - EOG	BST	91,00	79,00	73,50	43,50	x	x
306/ZP/15 - EOG	BST	41,00	20,00	14,50	9,50	x	x
267/ZP/15 - EOG	BST	66,00	41,00	85,00	75,00	70,50	62,00
230/ZP/15 - EOG	BST	40,50	4,00	12,50	4,00	x	x
Średnio		76,81	56,44	60,72	45,44	62,85	50,30

Kiełkowanie nasion wiąz szypułkowego przed przechowywaniem

Próby kiełkowania przeprowadzono na kiełkowniku Jacobsena, na wilgotnej bibule w temperaturze cyklicznie zmiennej w zakresie 20~30°C (16 + 8 godz./dobę). Średnia zdolność kiełkowania – 74,94%, średnia energia kiełkowania – 68,88%.



Wykres 4. Kiełkowanie nasion wiąz szypułkowego przed przechowywaniem

Kiełkowanie nasion wiąz szypułkowego w trakcie przechowywania (po około 9 miesiącach przechowywania) w dwóch temperaturach (-10°C i -20°C)

Próby kiełkowania przeprowadzono na kiełkowniku Jacobsena, na wilgotnej bibule w temperaturze cyklicznie zmiennej w zakresie 20~30°C (16 + 8 godz./dobę). Średnia zdolność kiełkowania materiału przechowywanego w -10°C to 75,97%, średnia energia kiełkowania – 70,50%. Natomiast średnia zdolność kiełkowania materiału przechowywanego w -20°C to 77,25%, średnia energia kiełkowania – 77,25%.

Tabela 3. Kiełkowanie nasion wiąz szypułkowego w trakcie przechowywania.

Nr partii	Kod gatunku	Ocena przed przechowywaniem		Ocena po 9-ciu miesiącach przechowywania w -10°C		Ocena po 9-ciu miesiącach przechowywania w -20°C	
		Zdolność [%]	Energia [%]	Zdolność [%]	Energia [%]	Zdolność [%]	Energia [%]
260/ZP/15 - EOG	WZ.S	79,00	76,00	78,00	75,00	x	x
234/ZP/15 - EOG	WZ.S	66,00	64,00	71,00	70,00	x	x
268/ZP/15 - EOG	WZ.S	75,50	69,00	86,00	86,00	x	x
251/ZP/15 - EOG	WZ.S	76,00	72,00	66,50	52,00	x	x
249/ZP/15 - EOG	WZ.S	95,00	92,00	82,50	78,50	93,00	93,00
250/ZP/15 - EOG	WZ.S	62,00	55,00	44,00	38,00	45,00	45,00
271/ZP/15 - EOG	WZ.S	67,00	51,00	91,00	89,00	97,00	97,00
269/ZP/15 - EOG	WZ.S	79,00	72,00	88,75	75,50	74,00	74,00
Średnio		74,94	68,88	75,97	70,50	77,25	77,25

Przechowywanie kriogeniczne materiału nasiennego i pędów z pąkami spoczynkowymi

W warunkach kriogenicznych, w LBG Kostrzyca zachowano kolekcje *ex situ* skrzydlaków i pąków spoczynkowych jesionu wyniosłego oraz nasion trzech gatunków wiązków (Tabela 4).

Tabela. 4. Ilość utworzonych kolekcji *ex situ* zachowanych metodą kriogeniczną.

Gatunek	Ilość utworzonych kolekcji <i>ex situ</i>
Jesion wyniosły	29
Wiąz górski	69
Wiąz szypułkowy	26
Wiąz pospolity	2
Pąki spoczynkowe jesionu wyniosłego	16

Przygotowanie kriogenicznych zasobów genowych ze skrzydlaków i pąków spoczynkowych jesionu wyniosłego oraz nasion wiązków poprzedzono podsuszeniem materiału do bezpiecznego poziomu wilgotności, przy której zarówno materiał nasienny, jak i pąki mogły zostać bezpiecznie zamrożone w ultra niskich temperaturach ($\leq -150^{\circ}\text{C}$).

Tabela 5. Bezpieczny zakres wilgotności.

Materiał	Bezpieczny zakres wilgotności (BZW)	Średni poziom wilgotności materiału genetycznego przed zamrożeniem w parach ciekłego azotu
Skrzydłaki jesionu wyniosłego	7,2-19,5%*	7-10%
Orzeszki wiązu: górskiego, szypułkowego, pospolitego	3,3-17,7%	9-10%
Pędy z pąkami spoczynkowymi jesionu wyniosłego	30%	30%

*Źródło: Chmielarz P., 2007. Kriogeniczne przechowywanie nasion leśnych drzew liściastych z kategorii *orthodox* i *suborthodox*.

Utworzenie kriogenicznych kolekcji *ex situ* w LBG Kostrzyca

Kriogeniczne zasoby genowe jesionu wyniosłego i wiązków tworzone były z nasion wraz z okrywkami i skrzydełkami. Z materiału genetycznego utworzono: zasób podstawowy, próbki kontrolne oraz badawcze (Fot. 6). Podszuszony materiał zdeponowano w specjalnych kriofiolkach, które na-



Fot. 7. Wnętrze zbiornika kriogenicznego – widok z góry (U. Wasileńczyk).



Fot. 6. Kriogeniczny zasób genowy jesionu wyniosłego (P. Hrydziuszko)

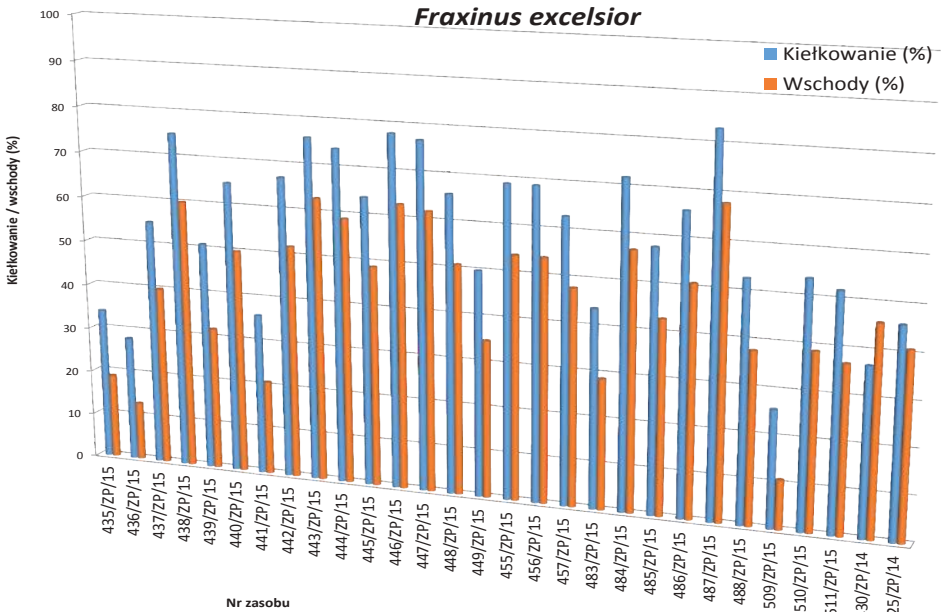


Fot. 8. Zamrażarka programowalna ICE CUBE (P. Hrydziuszko)

stępnie umiejscowiono w zbiornikach kriogenicznych (Fot. 7). Nasiona jesionu wyniosłego oraz trzech gatunków wiązków zamrożono bezpośrednio w temperaturze $\leq -150^{\circ}\text{C}$, do zamrożenia pąków spoczynkowych jesionu wyniosłego wykorzystano zamrażarkę programowalną (ICE CUBE) (Fot. 8). Zachowana w ten sposób kolekcja *ex situ*, w postaci kriogenicznych zasobów genowych, w przyszłości będzie źródłem umożliwiającym zasilenie siedlisk jesionowo-wiązkowych na terenie całego kraju.

Okresowa ocena żywotności skrzydlaków jesionu wyniosłego po odmrożeniu z ultra niskich temperatur

Po odmrożeniu materiał nasienny jesionu wyniosłego poddano stratyfikacji w podłożu. Zastosowano stratyfikację ciepłą 16 tygodniową w 20°C z następującą po niej 16 tygodniową stratyfikacją chłodną w 3°C . Średnia wilgotność skrzydlaków przysposobionych w wilgotnym podłożu wynosiła jak przed przemrożeniem 7-10%. Po zakończeniu fazy chłodnej próby kiełkowania przechowywano w temperaturze cyklicznie zmiennej $20\sim 3^{\circ}\text{C}$ (16 – 8 godz./dobę).



Wykres 5. Wpływ przechowywania kriogenicznego i stratyfikacji skrzydlaków jesionu wyniosłego na zdolność kiełkowania i wschody.

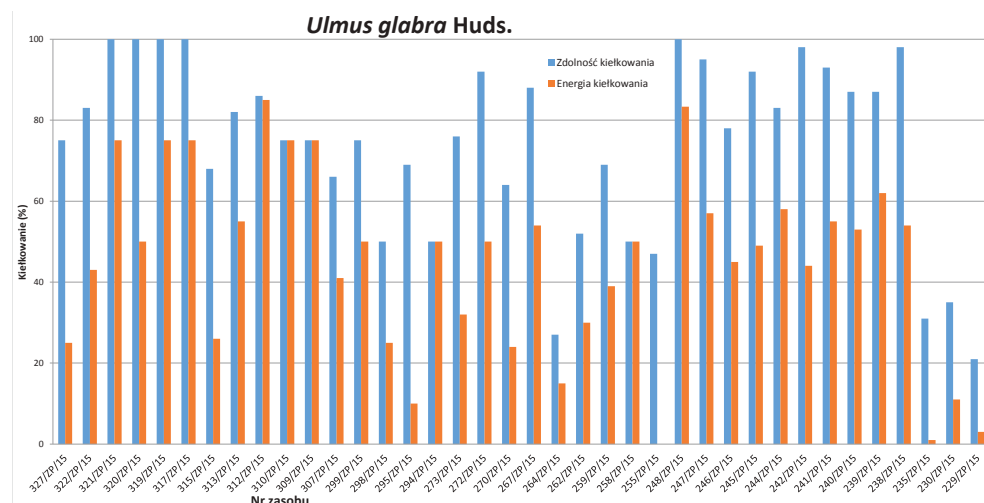
Średnia zdolność kiełkowania skrzydlaków jesionu wyniosłego, po odmrożeniu materiału nasiennego z temperatur kriogenicznych oraz stratyfikacji utrzymywała się na wysokim poziomie 58,21%.

Wschody skrzydlaków przemrożonych w temperaturach $\leq -150^{\circ}\text{C}$ przy średniej wilgotności 7 – 10%, były niższe o ok. 10 – 15% i wynosiły średnio 44,31%. Tendencja ta utrzymywała się, niezależnie od proveniencji materiału genetycznego, czego efektem był zbliżony procent otrzymanych siewek z przemrożonych skrzydlaków.

Okresowa ocena żywotności orzeszków trzech gatunków wiązków po odmrożeniu z temperatur ultra niskich

Próby kiełkowania przeprowadzono na kiełkowniku Jacobsena, na wilgotnej bibule w temperaturze cyklicznie zmiennej w zakresie 20~30°C (16 + 8 godz./dobę). Średnia wilgotność orzeszków trzech gatunków wiązków 9 – 10%.

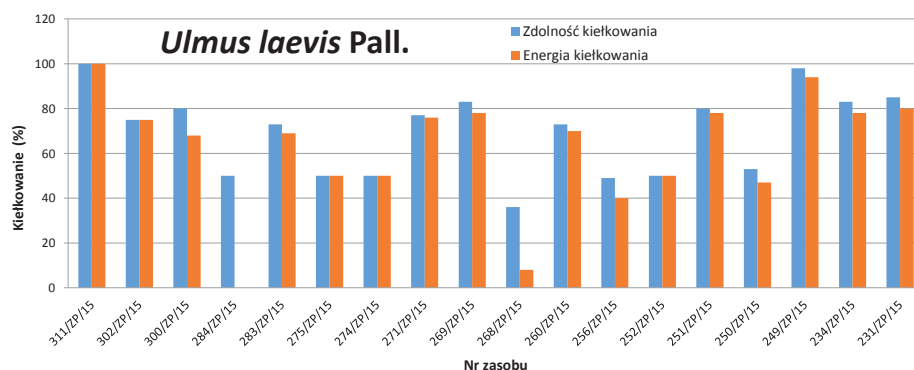
Wiąz górski *Ulmus glabra* Huds.



Wykres 6. Wpływ przechowywania kriogenicznego orzeszków wiąz górskiego na energię kiełkowania i zdolność kiełkowania.

Średnia zdolność kiełkowania wiąz górskiego utrzymywała się na wysokim poziomie 74,13%, podobnie jak nasion niemrożonych. Energia kiełkowania wyniosła 44,85%. Temperatury przechowywania, nie różnicowały zdolności kiełkowania nasion. Wskazują na to wartości uzyskane dla energii kiełkowania, zdolności kiełkowania oraz wschodów w 7 i 14 dniu. Wyniki przedstawiono dla 38 partii utworzonych kolekcji *ex situ*, dla pozostałych ocena żywotności po przechowywaniu w temperaturach kriogenicznych w toku.

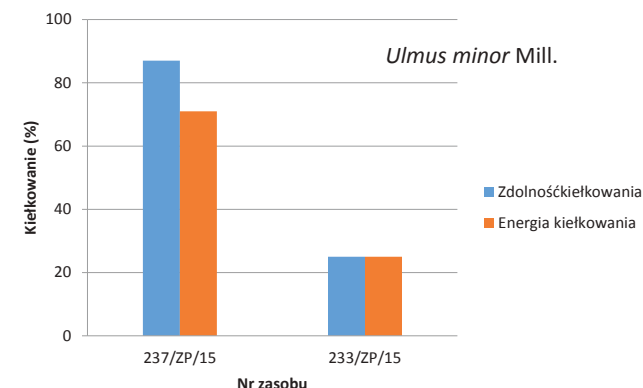
Wiąz szypułkowy *Ulmus laevis* Pall.



Wykres 7. Wpływ przechowywania kriogenicznego orzeszków wiąz szypułkowego na energię kiełkowania i zdolność kiełkowania.

Średnia zdolność kiełkowania wiąz szypułkowego utrzymywała się na poziomie 69,17%, energia kiełkowania wyniosła 61,72%. Zachowany materiał genetyczny w temperaturach kriogenicznych uzyskał zbliżoną wartość zdolności kiełkowania orzeszków jak materiał nasienny niemrożony. Wykres 7 przedstawia opisane wyniki dla 18 zasobów genowych wiąz szypułkowego.

Wiąz pospolity *Ulmus minor* Mill.

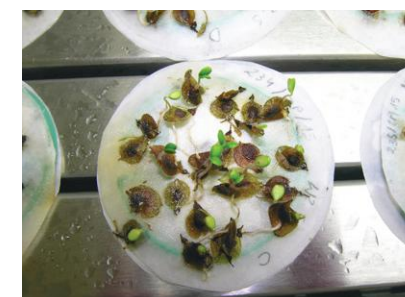


Wykres 8. Wpływ przechowywania kriogenicznego orzeszków wiąz pospolitego na energię kiełkowania i zdolność kiełkowania.

W projekcie pozyskano materiał nasienny z dwóch proveniencji: Jamy i Toruń. Utworzono tylko zasoby kriogeniczne. Średnia zdolność kiełkowania nasion wiąz pospolitego utrzymywała się na poziomie 56%, a energia kiełkowania wyniosła 48%.



Fot. 9. Wschody skrzydłaków jesionu wyniesłego po przechowywaniu w temp. ≤ -150°C (P. Hrydziuszko).



Fot. 10. Próba kiełkowania wiązków po przechowywaniu kriogenicznym (P. Hrydziuszko).



Fot. 11. Przekrój pąka spoczynkowego jesionu wyniesłego (U. Wasileńczyk).

Utworzenie zasobu genowego pędów z pąkami spoczynkowymi jesionu wyniosłego w temperaturach kriogenicznych

Zbiór jednorocznych pędów z pąkami spoczynkowymi jesionu wyniosłego przeprowadzono, gdy temperatura otoczenia spadła poniżej -5°C i utrzymywała się dłużej niż 72h. Pędy dzielono na fragmenty o zbliżonej długości i średnicy. Materiał podsuszono do wilgotności ok. 30%, a następnie rozpoczęto właściwy proces zamrażania. Temperaturę obniżano w sposób kontrolowany od 0°C do -30°C z szybkością $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Próbkę utrzymywano w tej temperaturze przez 24h. Po upływie doby próbkę przeniesiono do zbiorników kriogenicznych.

W celu sprawdzenia żywotności zamrożonych pąków – część z nich wyjęto z temperatur kriogenicznych i rozmrożono w łaźni wodnej. Odmrożony materiał hodowano na pożywkach agarowych. Żywotność pąków i sąsiadujących tkanek oceniano wizualnie na podstawie przekroju podłużnego odmrożonych pąków spoczynkowych (Fot. 11) i finalnie podczas hodowli *in vitro*. W przyszłości zachowana kolekcja pąków zimowych zostanie zaszczerpiona (okulizacja) na podkładkach.

Podsumowanie

Witalność materiału genetycznego, przechowywanego zarówno w sposób tradycyjny jak i kriogeniczny zależy od jego wyjściowych parametrów, określonych zaraz po zbiorze. Materiał nasienny cechujący się po zbiorze wysoką żywotnością, charakteryzował się wysokim poziomem zdolności kiełkowania, energią oraz wschodami. Nasiona o obniżonej już na samym początku żywotności, wykazywały obniżoną zdolność kiełkowania. Często fakt ten można łączyć ze złą kondycją zdrowotną osobników rodzicielskich na stanowiskach, z których dokonano pozyskania materiału roślinnego. Porównując dwie metody przechowywania (tradycyjną i kriogeniczną) kolekcji *ex situ* jesionu wyniosłego oraz trzech gatunków wiązów nie zaobserwowano istotnych różnic w jakości zgromadzonego materiału nasiennego. Dzięki zabezpieczeniu puli genowej w postaci zasobów genowych jesionu wyniosłego oraz trzech gatunków wiązów, realizując projekt, LBG Kostrzyca przyczynił się do:

- 1) Zabezpieczenia różnorodności genetycznej w postaci nasiennych zasobów genowych jesionu wyniosłego oraz trzech gatunków wiązów z obszarów Natura 2000, w kontekście zamierania tych gatunków, do czasu ustąpienia choroby lub do momentu opracowania skutecznych metod zwalczania przyczyn zamierania wiązów i jesionów.
- 2) Materiał nasienny będzie mógł być wykorzystany do hodowli sadzonek, co w przyszłości zwiększy liczebność populacji wyżej wymienionych gatunków, jeśli inne metody zwalczania patogenów nie dadzą pozytywnego rezultatu.
- 3) Zabezpieczenia różnorodności genetycznej w postaci pędów z pąkami spoczynkowymi jesionu wyniosłego z obszarów Natura 2000.
- 4) Zachowania dobrej, jakości materiału genowego w praktycznie nieograniczonym czasie, dzięki kriokonserwacji.

Literatura:

1. Antosiewicz Z., Kocięcki S., 1976. Nasiona drzew i krzewów leśnych i zadrzewieniowych Norma branżowa BN-76/9211-02, Leśnictwo, Wydawnictwa Normalizacyjne.
2. Barbour, Brinkman, 2008. The woody plant seed manual. Agriculture Handbook.
3. Chmielarz P., 2011. Cryopreservation of the non-dormant orthodox seeds of *Ulmus glabra*. Acta Biologica Hungarica. Volume 61, Issue 2.
4. Chmielarz P., 2009. Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior*) orthodox seeds. Tree Physiol. Oct;29(10):1279-85.
5. Cicek E., Tilki F., 2007. Seed germination of three *Ulmus* species from Turkey as influenced by temperature and light. J Environ Biol. 423-5 9(4):697-699.
6. Cicek E., Tilki F., 2006. Effects of Temperature, Light and Storage on Seed Germination of *Ulmus glabra* Huds. and *U. laevis* Pall. Pakistan Journal of Biological Sciences.
7. Forsline P.L., McFerson J., Lamboy W.F., Towill L.E., 1999. Development of base and active collections of *Malus* germplasm with cryopreserved dormant buds. Acta Hort. 484:75-78.
8. Forsline P.L., Towill L., Waddell J., Stushnoff C., Lamboy W., McFerson J.R., 1998. Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(3):365-370.
9. Niino T., Koyaman A., Shirata K., Ohuchi S., Suguli M., Sakai A., 1993. Long term storage of mulberry winter buds by cryopreservation. J. Seric. Sci. Jpn. 62(5):431-434.
10. Oka S., Yakuwa H., Sato K., Niino T., 1991. Survival and shoot formation in vitro of pear winter buds cryopreserved in liquid nitrogen. HortSci. 26:65-66.
11. Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M., 2000. Nasiona drzew i krzewów liściastych. Od zbioru do siewu. PWN W-wa Poznań.
12. Towill L.E., Forsline P.L., 1999. Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method. Cryoletters 20(4):215-222.
13. Towill L.E., Forsline P.L., Walters C., Waddell J., Laufmann J., 2004. Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: Results from 1915 accessions. Cryoletters 25(5):323-334.
14. Towill L.E., Bonnart R.M., 2005. Cryopreservation of apple using non-desiccated sections from winter collected scions. Cryoletters 26:323-332.
15. Załęski A. (red.) i in., 2000. Zasady i metodyka oceny nasion w LP, Centrum Informacyjne Lasów Państwowych W-wa.

Netografia:

1. Otwarta Encyklopedia Leśna www.encyklopedia.lasypolskie.pl

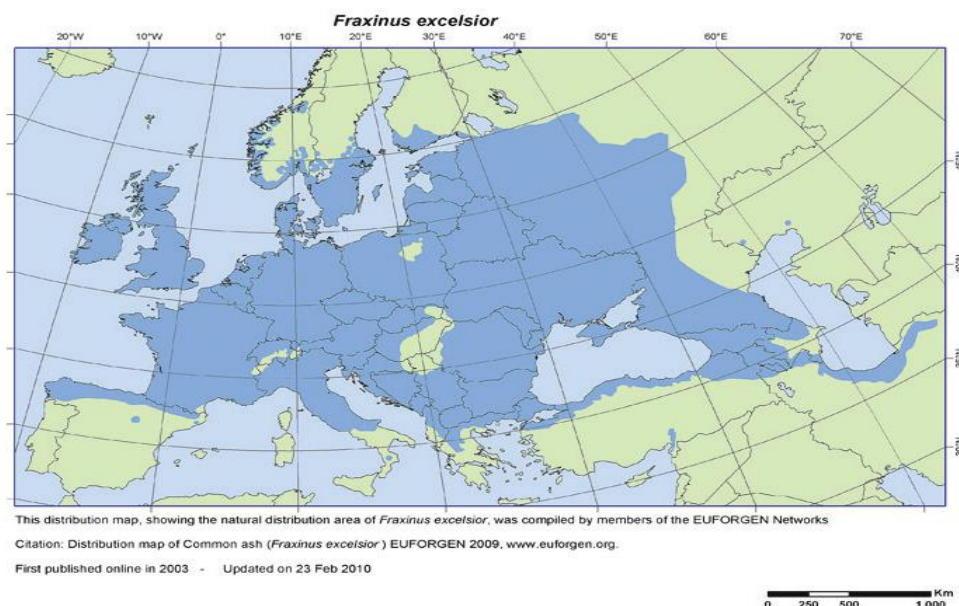
ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA JESIONU WYNIOSŁEGO (*FRAXINUS EXCELSIOR* L.) W POLSCE

Warmbier, J., Chybicki, I.J., Burczyk, J.

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Wydział Nauk Przyrodniczych,
Instytut Biologii Eksperymentalnej, Katedra Genetyki,
Al. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz
Korespondencja: burczyk@ukw.edu.pl

WSTĘP

Jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.) występuje na obszarze całej Europy, z wyjątkiem środkowej i południowej Hiszpanii, północnej części Półwyspu Skandynawskiego i Islandii (Ryc. 1). W Polsce jesion wyniosły jest obecny na obszarze całego kraju z wyjątkiem regla górnego. Jest cennym gatunkiem lasotwórczym występującym głównie w drzewostanach mieszanych. Tolerancja na suszę i wrażliwość na mróz sprawiają, że jesion mógłby być gatunkiem, który potencjalnie preferuje ocieplanie się klimatu. Jednakże, zjawisko zamierania drzew i drzewostanów jesionu wyniosłego wywołane przez patogen *Hymenoscyphus fraxineus* rodzi obawy związane z utratą lub ograniczeniem zasobów genowych jesionu w całej Europie.



Ryc. 1. Zasięg naturalnego występowania jesionu wyniosłego (www.euforgen.org).

Uważa się, że wysoki poziom zmienności genetycznej w populacjach drzew leśnych sprzyja ich zdolności adaptacji do zmieniających się warunków środowiska przyrodni-

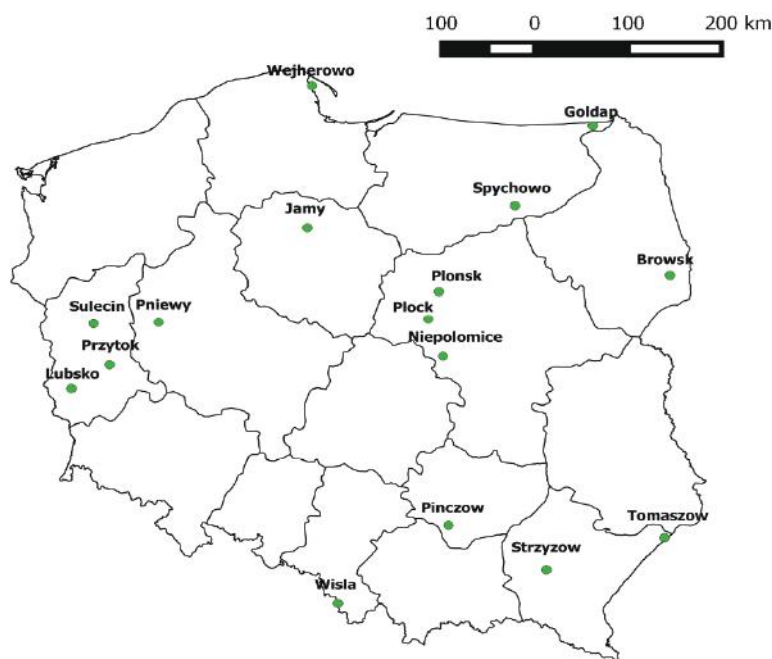
czego, a także przetrwania infekcji patogenów. W znacznym stopniu warunkuje to ciągłość procesów ekologicznych, utrzymuje naturalną odporność i w konsekwencji determinuje stabilność i trwałość lasu. Opracowanie skutecznych strategii ochrony zasobów genowych wymaga informacji na temat zmienności genetycznej, różnicowania między populacjami, a także zrozumienia procesów, które mają kluczowy wpływ na poziom i rozmieszczenie zmienności genetycznej (Booy i in. 2000). U długowiecznych gatunków drzew leśnych poziom różnorodności genetycznej w obrębie populacji w znacznym stopniu odzwierciedla poziom różnicowania całego gatunku. Niemniej, ze względu na ograniczony przepływ genów, zachodzący na skutek dyspersji pyłku i nasion, populacje znajdujące się w znacznej odległości od siebie będą genetycznie zróżnicowane (Wright 1943; Schaal i in. 1998). Z drugiej strony, odległość geograficzna nie wyjaśnia zwykle całkowitego zróżnicowania genetycznego, ponieważ wzorce zmienności mogą być również efektem zmienności środowiska, które wpływa na przetrwanie gatunku (Duminil i in. 2013), a także historii demograficznej populacji. Szczególne znaczenie odgrywa w tym względzie zjawisko „bottleneck” polegające na gwałtownym spadku liczebności populacji, ponieważ prowadzi ono do utraty znaczącej zmienności genetycznej, a z drugiej strony zwiększenia zróżnicowania między populacjami w następstwie dryfu genetycznego (Frankham 1995; Hamrick i Godt 1996).

Zmienność genetyczna jesionu wyniosłego w skali Europy jest stosunkowo dobrze poznana. Badania w oparciu o markery genomu chloroplastowego (cpDNA) ujawniły niski poziom zmienności genetycznej oraz wysoki poziom zróżnicowania genetycznego między populacjami. Wykazano, że średnio jedynie 11% całkowitej zmienności genetycznej cpDNA gatunku znajduje się w pojedynczej populacji. Wzorce rozmieszczenia geograficznego pięciu najczęstszych haplotypów odpowiadają czterem refugiom glacialnym zlokalizowanych we wschodnich Alpach oraz na Półwyspie Iberyjskim, Apenińskim i Bałkańskim (Heuertz i in. 2004). Jednakże, taki wzorec nie jest obserwowany przy zastosowaniu mikrosatelitarnych markerów jądrowych, które identyfikują jednorodną pulę genową w pasie od wysp Brytyjskich poprzez środkową Europę aż do Litwy, charakteryzującą się wysokim poziomem zmienności genetycznej. Natomiast niski poziom zmienności genetycznej, a tym samym wysokie zróżnicowanie genetyczne wykazały populacje zlokalizowane w południowo-wschodniej Europie (Heuertz i in. 2004). Obszar Polski w powyższych badaniach był bardzo słabo reprezentowany, co uniemożliwia określenie struktury zmienności genetycznej poszczególnych rodzimych populacji.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań, których celem było określenie zmienności genetycznej oraz poziomu zróżnicowania genetycznego jesionu wyniosłego w Polsce.

MATERIAŁY I METODY

Do badań wytypowano 16 drzewostanów zlokalizowanych na obszarach NATURA 2000 (Ryc. 2). Materiał roślinny w postaci liści zebrano z 771 drzew, przy czym liczba osobników objętych badaniami w pojedynczej populacji liczyła od 30 do 51. Dla każdego osobnika ustalono współrzędne geograficzne w oparciu o pozycjonowanie GPS.



Ryc. 2. Rozmieszczenie badanych populacji jesionu wyniosłego.

Izolację DNA z materiału roślinnego wykonano za pomocą zestawu GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit firmy EURx. Na podstawie przeprowadzonych analiz wstępnych oraz oceny jakości produktów PCR wytypowano 10 markerów mikrosatelitarnych genomu jądrowego oraz 5 markerów mikrosatelitarnych genomu chloroplastowego, które charakteryzowały się znacznym polimorfizmem oraz łatwością amplifikacji w reakcji multiplex PCR. Reakcje PCR zostały przeprowadzone z zastosowaniem termocyklera MJ Research PTC 200 i zestawu odczynników Taq Multiplex PCR Kit firmy Qiagen. Analizę otrzymanych produktów przeprowadzono na analizatorze genetycznym Applied Biosystems 3130xl. Interpretację wyników wykonano z użyciem programów komputerowych GeneScan 3.7 oraz Genotyper 3.7, dostarczonych przez producenta analizatora genetycznego.

Określone genotypy dla indywidualnych drzew stanowiły podstawę do określenia podstawowych parametrów zmienności genetycznej: liczby alleli (A), efektywnej liczby alleli (A_e), liczby alleli prywatnych (A_u), sumy częstości alleli prywatnych (P_u), heterozygotyczności obserwowanej (H_o) oraz heterozygotyczności oczekiwanej (H_e). Do zweryfikowania hipotezy o jednorodności badanych populacji pod względem wymienionych parametrów zastosowano test Friedmana, traktując poszczególne loci jako niezależne próbki zmienności genetycznej genomu. Określono również takie parametry jak efektywna wielkość populacji (w oparciu o poziom nierównowagi sprzężeń), poziom zróżnicowania genetycznego (w oparciu o wskaźnik F_{st}) oraz przestrzenną strukturę genetyczną (za pomocą korelogramu pokrewieństwa w ramach stanowiska oraz wskaźnika S_p Vekemansa-Hardy'ego). Testy dla różnicy między grupami drzew o dobrym i złym

stanie zdrowotnym dla poszczególnych parametrów struktury genetycznej przeprowadzono w oparciu o permutacje między grupami. Wykorzystując symulację Monte Carlo określono również wpływ redukcji wielkości populacji.

WYNIKI

Efektywność procedury określania genotypów

W przypadku mikrosatelitarnych markerów genomu jądrowego skuteczność procedury genotypowania wynosiła średnio 96,39%. Natomiast, w przypadku markerów genomu chloroplastowego efektywność genotypowania wyniosła 99,6%. Wszystkie loci genomu jądrowego były polimorficzne, natomiast jeden locus genomu chloroplastowego okazał się monomorficzny (nie stwierdzono polimorfizmu). Uzyskane genotypy stanowiły podstawę do przeprowadzenia dalszych analiz statystycznych.

Zmienność genetyczna wewnątrz populacji

Ogółem we wszystkich 10 loci genomu jądrowego stwierdzono 434 alleli. W pojedynczych populacjach liczba alleli w locus mieściła się w zakresie od 2 do 36. Najwyższy poziom polimorfizmu stwierdzono w populacji Płock (190 alleli), oraz Lubsko i Pniewy (188 alleli) (Tabela 1). Najniższym poziomem polimorfizmu charakteryzowały się populacje Pińczów (116 alleli) oraz Spychowo (117 alleli). Populacja Płock charakteryzowała się najwyższym poziomem zmienności również pod względem efektywnej liczby alleli. Tym niemniej, najniższą efektywną liczbę alleli stwierdzono dla populacji Brońsk i Wisła. Najwięcej alleli prywatnych zanotowano w populacji Prztyk (15 alleli). Z kolei najmniej alleli prywatnych stwierdzono w populacji Wejherowo (1 allel) oraz Spychowo (2 allele). Populacje wykazały znaczną zmienność pod względem heterozygotyczności oczekiwanej (H_o) i obserwowanej (H_e). Należy podkreślić, że wszystkie populacje charakteryzowały się istotnym statystycznie nadmiarem homozygot w stosunku do populacji będącej w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga.

Tabela 1. Zmienność genetyczna dla loci genomu jądrowego: A – liczba alleli, A_e – efektywna liczba alleli, A_u – liczba alleli prywatnych, P_u – suma częstości alleli prywatnych, H_o – heterozygotyczność obserwowana, H_e – heterozygotyczność oczekiwana.

Populacja	A	A_e	A_u	P_u	H_o	H_e
Gołdap	13,7	4,479	5	0,010	0,545	0,777
Jamy	15,0	4,162	7	0,027	0,538	0,760
Wejherowo	14,4	3,791	1	0,002	0,483	0,729
Brońsk	12,7	3,616	6	0,016	0,519	0,723
Wisła	12,2	3,569	8	0,022	0,501	0,720
Pińczów	11,6	3,723	7	0,014	0,610	0,731
Tomaszów	15,1	4,063	7	0,012	0,496	0,754
Płock	19,0	6,006	5	0,006	0,634	0,834
Płońsk	16,1	4,994	4	0,006	0,605	0,800
Strzyżów	17,9	3,848	9	0,010	0,531	0,740
Spychowo	11,7	4,350	2	0,002	0,589	0,770

Populacja	A	Ae	Au	Pu	Ho	He
Lubsko	18,8	4,997	4	0,008	0,566	0,800
Pniewy	18,8	4,770	9	0,019	0,592	0,790
Sulęcín	14,4	3,654	6	0,011	0,489	0,726
Przytok	18,1	5,310	15	0,044	0,519	0,812
Niepołomice	14,4	5,059	3	0,012	0,513	0,802
Średnia	15,244	4,393	6,188	0,014	0,545	0,767

Analizy polimorficznych markerów mikrosatelitarnych genomu chloroplastowego wykazały obecność od 2 do 3 alleli w locus, których wzajemna kombinacja dała 6 haplotypów cpDNA. W pojedynczych populacjach liczba haplotypów mieściła się w zakresie od 1 (Wisła, Spychowo, Lubsko, Pniewy) do 4 (Płońsk), ze średnią 2,2 (Tabela 2). Z kolei pod względem efektywnej liczby haplotypów, najwyższy poziom zmienności cpDNA wykazała populacja Browsk ($A_e=2,5$).

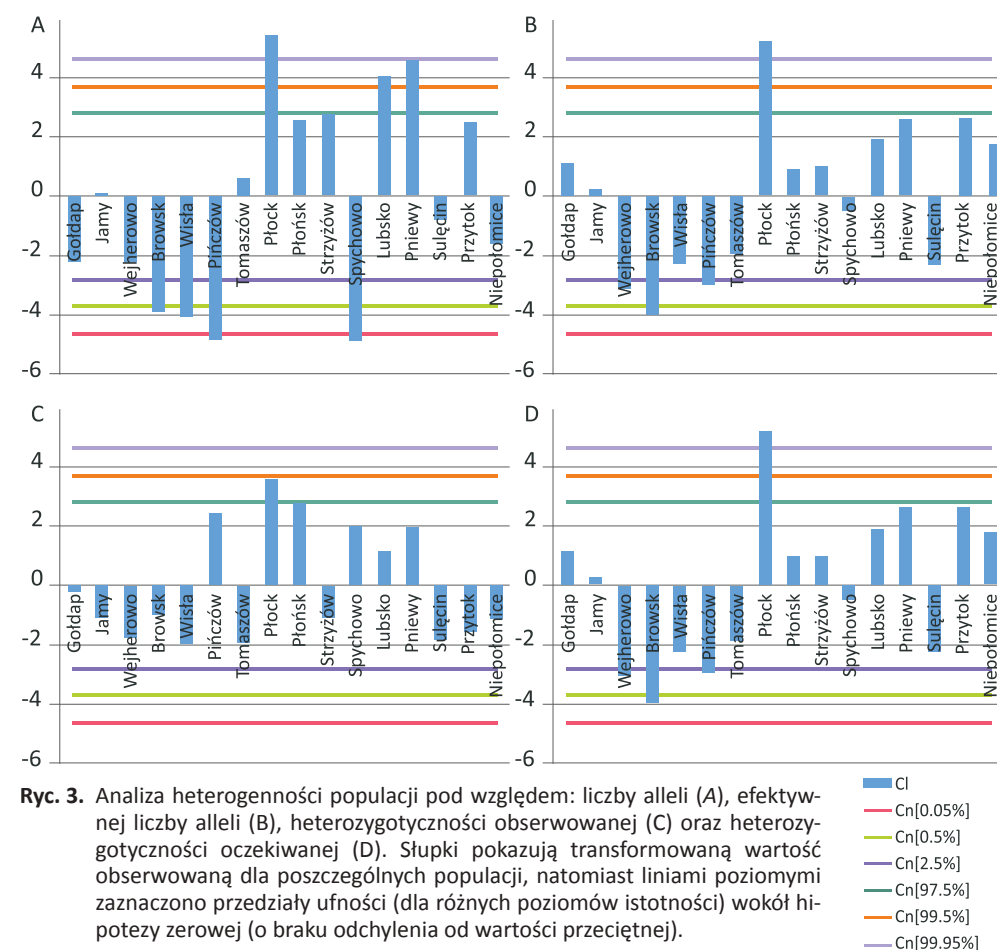
Tabela. 2. Zmienność genetyczna dla genomu chloroplastowego: A – liczba haplotypów, A_e – efektywna liczba haplotypów, H_e – heterozygotyczność oczekiwana.

Populacja	A	Ae	He
Gołdap	2	1,314	0,239
Jamy	2	1,161	0,139
Wejherowo	3	1,185	0,190
Browsk	3	2,545	0,607
Wisła	1	1,000	0
Pińczów	2	1,960	0,490
Tomaszów	3	1,669	0,401
Płock	2	1,225	0,184
Płońsk	4	2,195	0,544
Strzyżów	3	1,132	0,117
Spychowo	1	1,000	0
Lubsko	1	1,000	0
Pniewy	1	1,000	0
Sulęcín	2	1,888	0,470
Przytok	3	1,232	0,189
Niepołomice	2	1,378	0,274
Średnia	2,188	1,430	0,238

Różnice w poziomie zmienności genetycznej między populacjami

Analiza zmienności genetycznej pomiędzy populacjami wykazała, że badane populacje różnią się istotnie statystycznie pod względem obserwowanej liczby alleli ($\chi^2=76,47$, $df=15$, p -wartość $<0,001$), efektywnej liczby alleli ($\chi^2=43,92$, $df=15$, p -wartość $<0,001$), heterozygotyczności oczekiwanej ($\chi^2=44,04$, $df=15$, p -wartość $<0,001$) oraz heterozygotyczności obserwowanej ($\chi^2=25,13$, $df=15$, p -wartość $<0,05$). Na tle badanych populacji Płock charakteryzuje się odstającymi w kierunku dodatnim wskaźnikami zmienności genetycznej, tj. A, A_e oraz H_e (Ryc. 3A, B, D). Pod względem liczby alleli za populacje odstające w kierunku dodatnim należy uznać także Lubsko oraz Pniewy (Ryc. 3A). Z ko-

lei w kierunku ujemnym od przeciętnej (mediany) pod względem liczby alleli odstają populacje Browsk, Wisła, Pińczów oraz Spychowo. Browsk należy uznać za odstającą w kierunku ujemnym również ze względu na efektywną liczbę alleli oraz poziom heterozygotyczności.



Ryc. 3. Analiza heterogenności populacji pod względem: liczby alleli (A), efektywnej liczby alleli (B), heterozygotyczności obserwowanej (C) oraz heterozygotyczności oczekiwanej (D). Słupki pokazują transformowaną wartość obserwowaną dla poszczególnych populacji, natomiast liniami poziomymi zaznaczono przedziały ufności (dla różnych poziomów istotności) wokół hipotezy zerowej (o braku odchylenia od wartości przeciętnej).

Różnice w poziomie zmienności genetycznej między drzewami o dobrym i złym stanie zdrowotnym

Spośród wszystkich drzew, 520 zostało sklasyfikowanych jako wykazujące dobry stan zdrowotny, 168 zostało sklasyfikowanych jako wykazujące zły stan zdrowotny, natomiast w przypadku 83 brak było informacji o stanie zdrowotnym osobnika. W analizach markerów genomu jądrowego większą liczbę alleli stwierdzono wśród drzew o dobrym stanie zdrowotnym. Również w tej grupie stwierdzono więcej alleli prywatnych (A_u) oraz większą sumaryczną częstość alleli prywatnych (P_u). Spośród wymienionych wskaźników zmienności genetycznej jedynie P_u wykazał istotną różnicę między grupami drzew o różnym stanie zdrowia (Tabela 3).

Tabela 3. Porównanie poziomu zmienności genetycznej między drzewami o dobrym i złym stanie zdrowotnym w markerach genomu jądrowego (oznaczenia symboli parametrów jak w tabeli 1).

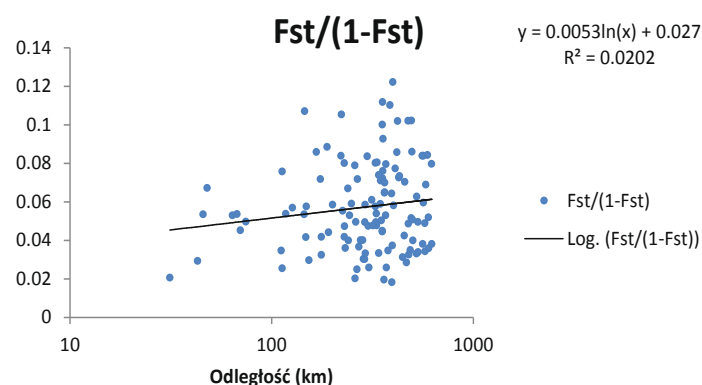
Parametr	Zły stan zdrowotny	Dobry stan zdrowotny	Różnica	E[Różnica- H0]	Q2.5 H0	Q97.5 H0
A	29,3	39,7	-10,4	-9,08	-10,9	-7,2
Ae	5,018	5,321	-0,303	-0,004	-0,399	0,373
Au	31	135	-104	-90,5	-110	-71
Pu	0,020	0,060	-0,040*	-0,023	-0,032	-0,015
Ho	0,565	0,547	0,018	0,000	-0,026	0,025
He	0,801	0,812	-0,011	0,000	-0,016	0,014

*różnica istotna statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$.

Zróżnicowanie genetyczne między populacjami

Zróżnicowanie genetyczne między populacjami (*Gst*) mierzone na poziomie genomu jądrowego wyniosło średnio 0,054 i było istotne statystycznie. Oznacza to, że jedynie 5,4% zmienności genetycznej wynika z różnic między populacjami. Nie stwierdzono przy tym większych różnic między badanymi loci. Udział całkowitej zmienności metapopulacji w pojedynczej populacji wyniósł przeciętnie 94,6%. W przypadku genomu chloroplastowego stwierdzono znacznie wyższe zróżnicowanie genetyczne między populacjami (65,4%). Zróżnicowanie genetyczne na poziomie haplotypów chloroplastowych wyniosło 0,627. Zatem średnio jedynie ok. 37% całkowitej zmienności znajduje się w pojedynczej populacji, a ok. 63% zmienności badanej metapopulacji wynika z różnic międzypopulacyjnych.

Zróżnicowanie genetyczne między parami populacji jesionu na poziomie genomu jądrowego nie wykazało statystycznie istotnego związku z odległością geograficzną (Ryc. 4) (test Mantela: $r = 0,106$; p -wartość = 0,224). W przypadku genomu chloroplastowego dodatnia korelacja między zróżnicowaniem genetycznym a odległością geograficzną była istotna statystycznie ($r = 0,221$; p -wartość = 0,029).

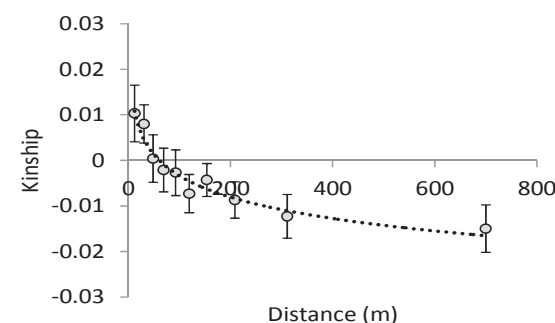


Ryc. 4. Związek między dystansem (zróżnicowaniem) genetycznym a odległością geograficzną między populacjami obserwowany na podstawie jądrowych markerów mikrosatelitarnych.

Przestrzenna struktura genetyczna

Pośród badanych populacji jedynie w trzech przypadkach nie stwierdzono istotnego ujemnego związku między pokrewieństwem a odległością między osobnikami, tj. Pińczów, Przytok i Niepołomice. Najintensywniejszą przestrzenną strukturę genetyczną stwierdzono w populacjach Gołdap, Jamy, Tomaszów, Spychowo i Sulęcín. W przypadku wymienionych populacji wartość indeksu *Sp* była istotnie większa niż wartość średnia dla gatunku ($Sp=0,01$). Istotnie niższe od średniej wartości wskaźnika *Sp* stwierdzono jedynie dla populacji Pińczów oraz Strzyżów.

Korelogram obliczony dla wszystkich populacji jednocześnie wykazał, że osobniki znajdujące się przeciętnie w odległości mniejszej niż ok. 30 metrów wykazują istotne pokrewieństwo (Ryc. 5). Z kolei osobniki zlokalizowane w odległości powyżej 100 metrów są niespokrewnione.



Ryc. 5. Związek między odległością a pokrewieństwem (*kinship*) między osobnikami jesionu wyniosłego. Punkty pokazują średnie wartości pokrewieństwa w kolejnych klasach odległości jako średnia dla wszystkich populacji, natomiast wąsy pokazują 95% przedział ufności dla średniego pokrewieństwa w danej klasie odległości.

Efektywna wielkość populacji

Efektywna wielkość populacji (*LDNe*), oszacowana dla poszczególnych populacji, mieściła się w zakresie od 15,9 (Browsk) do nieskończoności (Strzyżów), ze średnią harmoniczną równą 57,6. Poza populacjami Browsk i Spychów, dla których odnotowano stosunkowo niskie wartości efektywnej wielkości populacji, kilka populacji wykazywało wartości pośrednie w granicach 40-60 (Gołdap, Pińczów, Sulęcín, Tomaszów). Pozostałe populacje prezentowały wysokie oceny efektywnej wielkości populacji.

Ocena ryzyka zawężenia zmienności genetycznej tworzonego zasobu genowego

Symulacje komputerowe redukcji wielkości populacji wykazały, że w przypadku gdy liczba osobników maleje do 20 na populację, wówczas istotnie statystycznie maleje liczba alleli w markerach genomu jądrowego. Innym ważnym efektem redukcji wielkości populacji jest wzrost liczby i frekwencji alleli prywatnych, jednakże nie jest on spodziewany dla wszystkich badanych populacji. Statystycznie istotny wzrost częstości alleli prywatnych stwierdzono jedynie w przypadku populacji Płock, Płońsk, Spychowo oraz Lubsko. Analogiczny wpływ redukcji wielkości populacji na zmienność genetyczną stwierdzono również w przypadku założenia, że liczba osobników na populację będzie wynosić 10. W przypadku genomu chloroplastowego, redukcja wielkości populacji miała niewielki wpływ na zmienność genetyczną w ramach populacji. Nie stwierdzono przy tym statystycznie istotnych efektów genetycznych redukcji wielkości populacji do poziomu 20 lub 10 osobników.

DYSKUSJA

Stopień zmienności genetycznej determinuje zdolność danej populacji do przystosowania się w drodze doboru naturalnego do zmiennych warunków środowiska. Ocena zmienności genetycznej populacji i określenie relacji pomiędzy populacjami odgrywa kluczową rolę dla programów ochrony i zarządzania zasobami naturalnymi. Genetyka konserwatorska koncentruje się na identyfikacji i ochronie genetycznie odmiennych populacji, ponieważ ochrona genetycznie zróżnicowanych populacji pozwala utrzymać potencjał ewolucyjny gatunku. Markery molekularne w połączeniu z narzędziami statystycznymi umożliwiają określenie podstawowych parametrów i cech ważnych dla ochrony gatunku, takich jak struktura genetyczna czy efektywna wielkość populacji. Takie badania genetyczne mogą być pomocą w monitorowaniu różnorodności genetycznej populacji, co pozwala na priorytetyzację działań ochronnych.

Analizowane populacje jesionu wyniosłego w Polsce charakteryzują się stosunkowo wysokim poziomem zmienności genetycznej, wyrażonej poprzez liczbę alleli, efektywną liczbę alleli, a także heterozygotyczność oczekiwaną. Populacje Płock, Płońsk, Strzyżów, Lubsko, Pniewy, Przytok charakteryzują się ponadprzeciętnymi parametrami zmienności genetycznej, które mogą stanowić podstawę do tworzenia zasobów genowych. Zakłada się, że im bardziej zróżnicowana jest pula genowa gatunku, tym większe istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia korzystnych alleli lub kombinacji alleli, które zagwarantują przeżywalność i przystosowanie do zmieniających się warunków otoczenia. Zachowanie możliwie szerokiej zmienności genetycznej jesionu wyniosłego ma zatem fundamentalne znaczenie dla stabilności drzewostanów i całych ekosystemów leśnych, szczególnie istotne w kontekście występowania chorób wywołanych przez grzyb *Hymenoscyphus fraxineus*.

Porównanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy drzewami zdrowymi i chorymi może wyjaśnić czy podatność jesionu wyniosłego na patogen może być uwarunkowana genetycznie. W niniejszym opracowaniu, większość parametrów opisujących poziom zmienności genetycznej przyjmowała wyższe wartości dla osobników zdrowych, jednakże wykazane różnice były nieistotne statystycznie. W związku z tym, podatność drzew jesionu na czynnik patogenny nie wpływa na poziom zmienności genetycznej mierzony za pomocą neutralnych markerów genetycznych. Większość cech adaptacyjnych takich jak odporność na patogeny jest kodowana przez wiele genów, które działają na zasadzie addytywnej i są regulowane przez czynniki biotyczne i abiotyczne.

Zróżnicowanie genetyczne stanowi tę część zróżnicowania genotypowego, która jest spowodowana zmiennością składu genetycznego osobników danej populacji. Jesion wyniosły charakteryzuje się niewielkim zróżnicowaniem genetycznym między populacjami, wynoszącym przeciętnie 5,4%. Uzyskany wynik jest charakterystyczny dla drzew klimatu umiarkowanego i wiąże się z typowymi dla drzew cechami biologicznymi, takimi jak znaczne rozmiary, duża płodność, długowieczność, występowanie na dużych obszarach geograficznych, a tym samym globalnie duża liczebność gatunku. Jednocześnie wykazano, że podobieństwo genetyczne między populacjami jest w niewielkim stopniu zależne od odległości geograficznej między populacjami. Sugeruje to, że gatunek charakteryzuje się stosunkowo intensywnym przepływem genów, który sprawia, że popula-

cje odległe od siebie nie różnią się znacząco pod względem genetycznym. Wynik ten sugeruje, że w procesie pozyskiwania nasion dla potrzeb zachowania zasobów genowych gatunku nie jest konieczne, aby materiał genetyczny pochodził z dużej liczby populacji. Niemniej, ze względu na istnienie potencjalnych różnic między populacjami we fragmentach genomu związanych z adaptacją do określonych warunków środowiska uzyskane wyniki należy interpretować ostrożnie, dążąc do możliwie szerokiej, jednak uzasadnionej ekonomicznie, reprezentacji populacji w tworzonych zasobach genowych..

W naturalnych populacjach jesionu wyniosłego istnieje tendencja do tworzenia przestrzennej struktury genetycznej, która może być wynikiem ograniczonego przepływu genów na skutek izolacji, zróżnicowanego zagęszczenia osobników czy systemu rozmnażania. Wśród tych czynników najprawdopodobniej największy wpływ na przestrzenną strukturę genetyczną ma dyspersja nasion. Wyniki badań w Bułgarii wskazują, że rozsiewanie nasion występuje generalnie w promieniu 14 metrów od drzewa (Heuertz i in. 2001). Bezpośrednią konsekwencją istnienia pokrewieństwa między występującymi blisko siebie osobnikami jest możliwość wzrostu wsobności w pokoleniu potomnym, co z kolei może prowadzić do obniżenia dostosowania potomstwa na skutek depresji wsobnej.

Dla utrzymania ewolucyjnej zmienności niezbędnej do tego, aby populacje trwały w czasie i w przestrzeni, niezbędna jest wysoka efektywna wielkość populacji pozwalająca na zachowanie istniejącej zmienności genetycznej. Dla większości badanych populacji odnotowano stosunkowo wysokie wartości efektywnej wielkości populacji. Oznacza to, że przebieg procesów reprodukcyjnych zachodzi przy udziale znacznej liczby osobników zwiększając szansę na przekazanie możliwie szerokiego zakresu zmienności genetycznej pokoleniu potomnemu. Populacje o dużej efektywnej wielkości charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną i są w mniejszym stopniu narażone na losowe zmiany częstości alleli. W związku z tym rzadko dochodzi do utraty alleli w wyniku działania dryfu genetycznego.

Przeprowadzone badania symulacyjne wykazały, że zmniejszenie liczby osobników do poziomu 20 lub nawet 10 osobników na populację, powoduje poważny spadek zmienności genetycznej populacji. Jednocześnie, redukcja liczby osobników prowadzi do istotnego wzrostu liczby alleli prywatnych w poszczególnych populacjach. Stopień zmian nie jest jednorodny i zależy od wyjściowego poziomu zmienności genetycznej obserwowanej w danej populacji. Należy jednak uznać, że utrata zmienności genetycznej będzie proporcjonalna do wyjściowej zmienności genetycznej oraz będzie zależała od skali redukcji liczby osobników wykorzystywanych do tworzenia zasobu genowego. W przypadku populacji o niedostatecznej liczebności utrata zmienności genetycznej odpowiada za pogorszenie zdolności adaptacyjnych populacji w przypadku zmian w środowisku, wzrasta specjalizacja i wrażliwość na zdarzenia losowe, maleje zdolność do rekolonizacji przywróconych siedlisk. W niewielkich populacjach utrata różnorodności genetycznej może prowadzić do spadku dostosowania i ostatecznie do wymarcia.

Drzewa leśne ze swymi znacznymi zasobami genowymi stanowią najważniejszy składnik ekosystemów leśnych, kształtujący nisze ekologiczne dla innych gatunków roślin, a także zwierząt, grzybów i innych organizmów środowiska leśnego. W związku z tym zachowa-

nie jak najbardziej zróżnicowanych pul genetycznych poszczególnych gatunków drzew leśnych jest jednym z najistotniejszych zadań współczesnego leśnictwa. Dla prawidłowej ochrony i zrównoważonego zarządzania leśnymi zasobami genetycznymi, istotne jest dobre zrozumienie procesów kształtujących zmienność genetyczną drzew leśnych.

Literatura

1. Booy G., Hendriks R.J.J., Smulders M.J.M., Van Groenendael J.M., Vosman B., 2000. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant biology* 2(04): 379-395.
2. Duminil J., Brown R.P., Ewédjè E.E.B., Mardulyn P., Doucet J.L., Hardy O.J., 2013. Large-scale pattern of genetic differentiation within African rainforest trees: insights on the roles of ecological gradients and past climate changes on the evolution of *Erythrophleum* spp (Fabaceae). *BMC evolutionary biology* 13(1): 1.
3. Frankham R., 1995. Conservation genetics. *Annual review of genetics* 29(1): 305-327.
4. Hamrick J.L., Godt M.J.W., 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351(1345): 1291-1298.
5. Heuertz M., Hausman J.F., Tsvetkov I., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X., 2001. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology* 10(7): 1615-1623.
6. Heuertz M., Fineschi S., Anzidei M., Pastorelli R., Salvini D., Paule L., Vendramin G.G., 2004. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* 13(11): 3437-3452.
7. Heuertz M., Hausman J.F., Hardy O.J., Vendramin G.G., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X., 2004. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58(5): 976-988.
8. Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., Smith W.A., 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7(4): 465-474.
9. Wright S., 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28(2): 114.

OCENA SKUTECZNOŚCI KRIOTERAPII I TERMO-TERAPII W ZWALCZANIU PATOGENÓW

U. Wasileńczyk¹, A. Paślawska¹, K. Nowik², M. Pałucka¹, M. Chudzińska¹,
P. Hrydziusko¹

¹ Leśny Bank Genów Kostrzyca, Miłków 300, 58-535 Miłków,
korespondencja: Urszula.Wasilenczyk@lbg.lasy.gov.pl;

² Zespół Ochrony Lasu we Wrocławiu, Grunwaldzka 90, 50-001 Wrocław,
korespondencja: K.Nowik@lasy.gov.pl

WPROWADZENIE

W celu oszacowania możliwości eliminacji patogenu *H. fraxineus* ze skrzydlaków jesionu wyniosłego przeprowadzono procesy krioterapii i termoterapii skrzydlaków pozyskanych z osobników o symptomach chorobowych w wytypowanych stanowiskach. Po terapii wykonano oceny żywotności nasion oraz ocenę eliminacji patogenu.

Ze względu na słabe owocowanie jesionu wyniosłego, konieczne było włączenie do puli badanego materiału skrzydlaków pozyskanych w czasie dwóch kolejnych sezonów (zbiór 2014/2015 oraz 2015/2016). Tabele 1 i 2 zawierają informacje o stanowiskach, z których materiał wykorzystany został przy realizacji zadania.

Tabela 1. Zestawienie stanowisk na obszarach Natura 2000, z których pozyskano nasiona do pierwszego etapu. Pogrubioną czcionką wskazano stanowiska, dla których wykonano pełny profil badawczy.

Nr stano-wiska	RDLP	Nadleśnictwo	Leśnictwo, oddział/ nazwa rezerwatu	Kategoria obiektu	Ilość prób w ho-dowli	Oznaczenie mikologiczne
1	Poznań	Pniewy	Wielki Las	Rezerwat przyrody	60	T1
2	Szczecin	Międzychód	Muchocin, oddz. 449d	Drzewostan	100	T1
3	Szczecin	Choszczno	Skalisty Jar Libberta	Rezerwat przyrody	400	T1,T2,T3,LN
4	Szczecin	Głusko	Wołogoszcz oddz. 234h	Źródło nasion	100	T1
5	Szczecin	Strzelce Krajeńskie	Buszów, Oddz. 96j	Źródło nasion	100	T1
6	Szczecin	Gryfino	Źródliskowa Buczyzna im. Jerzego Jackowskiego	Rezerwat przyrody	100	T1
7	Szczecin	Łobez	Winniki, oddz. 331i	Źródło nasion	400	T1,T2,T3,LN
8	Piła	Tuczno	Leśne Źródła	Rezerwat przyrody	100	T1
9	Szczecinek	Czarnobór	Bagno Ciemino	Rezerwat przyrody	100	T1
10	Gdańsk	Kwidzyn	Las Mątawski	Rezerwat przyrody	400	T1,T2,T3,LN
11	Gdańsk	Wejherowo	Darżlubie, oddz.224t	Drzewostan	400	T1,T2,T3,LN
12	Toruń	Jamy	Rogóżno Zamek	Rezerwat przyrody	400	T1,T2,T3,LN
13	Toruń	Zamrzenica	Lnianek, oddz. 166d	Źródło nasion	400	T1,T2,T3,LN

Konieczność zabezpieczenia odpowiedniej ilości materiału z zakładanej ilości drzew (170) była istotnym czynnikiem brany pod uwagę przy planowaniu pozyskania w kolejnym sezonie (2015/2016).

Tabela 2. Zestawienie stanowisk na obszarach Natura 2000, z których pozyskano nasiona do drugiego etapu. Dla wszystkich stanowisk zabezpieczoną zakładaną ilość materiału.

Nr stanowiska	RDLP	Nadleśnictwo	Leśnictwo, oddział/nazwa rezerwatu	Kategoria obiektu	Ilość prób w hodowli	Zastosowany wariant terapii
14	Toruń	Toruń	Płutowo	Rezerwat przyrody	400	T1,T2,T3,LN
15	Toruń	Żołędowo	Kruszyn 475a	Źródło nasion	400	T1,T2,T3,LN
16	Radom	Pińczów	Teresów 356f	Drzewostan	400	T1,T2,T3,LN
17	Katowice	Brzeg	Barucice	Rezerwat przyrody	400	T1,T2,T3,LN
18	Kraków	Niepołomice	Ispina 421 c	Drzewostan	400	T1,T2,T3,LN

OCENA SKUTECZNOŚCI KRIOTERAPII I TERMOTERAPII W ZWALCZANIU PATOGENÓW

Celem badań było sprawdzenie, czy poprzez krioterapię i termoterapię nasion jesionu wyniosłego pochodzących z drzew wykazujących objawy chorobowe charakterystyczne dla obserwowanego od 1992 r. procesu zamierania jesionu, można spowodować dezaktywację głównego sprawcy tej choroby, grzyba *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz, Hosoya, comb. nov. oraz innych grzybów zasiedlających nasiona.

METODYKA BADAŃ

Na podstawie danych z literatury opracowano warianty krioterapii i termoterapii tj. oddziaływania określonej temperatury w konkretnym przedziale czasowym. Wariant T1 termoterapii posłużył jako kontrola doświadczenia. Skrzydłaki umieszczono w temperaturze optymalnej dla patogenu (20°C w czasie 0,5h). Ramowy opis procedury został przedstawiony w Tabeli nr 3.

Tabela 3. Opis metodyki badań (LN – z ang. liquid nitrogen – ciekły azot)

Krioterapia LN	Termoterapia T1 (kontrola)	Termoterapia T2	Termoterapia T3
Krioterapię w temp. -150°C	Termoterapię T1 przeprowadzono w temp. około 20°C	Termoterapię w temp. T2 i T3 przeprowadzono w łaźni wodnej	
Sterylizacja powierzchniowa (Kowalski, Bartnik, 2010)			
Pasaż na pożywkę (Kowalski, Bartnik, 2010)			



Fot. 1. Termoterapia skrzydłaków jesionu wyniosłego (U. Wasileńczyk).



Fot. 2. Krioterapia (P. Hrydziusko).

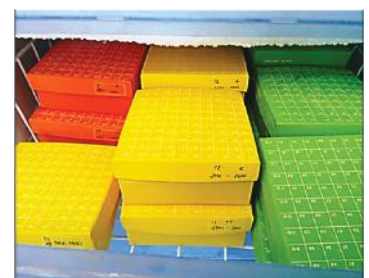


Fot. 3. Pasaż na pożywkę (M. Pałucka).

Do czasu opracowania testu materiał biologiczny ze skrzydłaków jesionu został zabezpieczony w -20°C (Fot. 4).

Kontrola molekularna

W ramach zadania opracowano metodykę kontroli molekularnej. Wybrane stadia izolacji DNA przedstawiono na zdjęciach nr 5 i 6.



Fot. 4. Materiał biologiczny ze skrzydłaków jesionu wyniosłego do analiz molekularnych (M. Pałucka).



Fot. 5. Izolacja DNA ze skrzydłaka jesionu wyniosłego (M. Chudzińska).

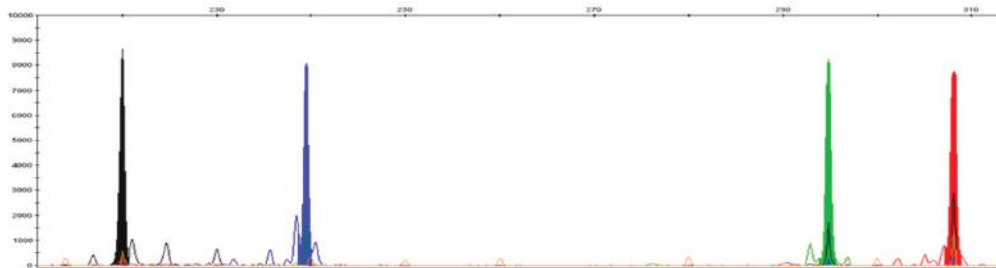


Fot. 6. Inkubacja materiału roślinnego w termo mikserze (M. Chudzińska).

W kolejnych etapach realizacji zadania opracowano test molekularny, który pozwolił na ocenę eliminacji patogenu po procesie termoterapii (3 warianty temperaturowe) oraz krioterapii.

W związku z dotychczasowym profilem zadań realizowanych w Pracowni Analizy DNA zdecydowano o przygotowaniu testu w oparciu o DNA mikrosatelitarne.

Uzyskane dane pozwoliły na wytypowanie czterech markerów (na podstawie Gherghel et al, 2014). Prezentację ostatecznej wersji testu molekularnego przedstawiono na rysunku nr 1.



Ryc. 1. Wzorcowy elektroforogram – uzyskana w programie GeneMapper wizualizacja rozdziału fragmentów DNA w analizatorze genetycznym. Każdy kolorowy pik reprezentuje jeden marker genetyczny.

Wyniki

Dla każdego z etapów zastosowano odmienny profil analiz. W pierwszym określono panel mikroorganizmów zasiedlających skrzydlaki jesionu, w drugim skupiono się na oznaczeniu tych patogenów, które przeżywają testowane warianty T2 i T3 termoterapii. Niezależnie, w obydwu, szczególną uwagę skoncentrowano na wyizolowaniu czynnika sprawczego zamierania jesionu, patogenu *Hymenoscyphus fraxineus*.

Hodowla mikroorganizmów – wyniki dla etapu I (2014/2015)

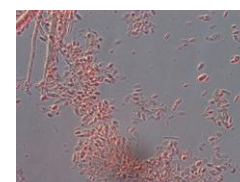
Po przeprowadzeniu krioterapii i termoterapii według przyjętego schematu postępowania, sprawdzono skuteczność tych procesów poprzez hodowlę mikrobiologiczną, a także porównano uzyskane wyniki z hodowlą mikroorganizmów z nasion niepoddanych tym procesom (wariant kontrolny – T1).

Analizę prowadzono głównie pod kątem obecności *H. fraxineus*. Brano pod uwagę cechy kolonii wyrastających z nasion, jak i obecność na powierzchni struktur charakterystycznych dla tego gatunku. W celu identyfikacji innych organizmów grzybowych porastających skrzydlaki hodowle przekazano do Zespołu Ochrony Lasu we Wrocławiu (ZOL). Fotografie 7 – 14 przedstawiają wybrane mikroorganizmy oznaczone w ZOL. Wyniki analiz zestawiono w Tabeli nr 4.

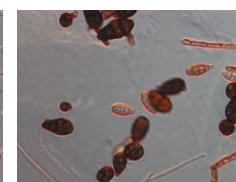
Tabela. 4. Grzyby wyrastające z nasion poddanych krioterapii i termoterapii – I etap.

Lp.	Rodzaj/ gatunek grzyba	Ilość kolonii grzybów				Razem	%
		T1	T2	T3	LN		
1	<i>Acremoniella sp.</i>				2	2	0,19
2	<i>Acremonium sp.</i>	6		2	3	11	1,05
3	<i>Alternaria alternata</i>	131	5	45	78	259	24,83
4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	6			12	18	1,73
5	<i>Botrytis cinerea</i>				2	2	0,19
6	Niezarodnikujące ciemne	18			3	21	2,01
7	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	95		10	79	184	17,64

8	<i>Cladosporium herbarum</i>	9	3	3	18	33	3,16
9	<i>Colletotrichum x gloeosporioides</i>	72		1	15	88	8,44
11	<i>Cytospora sp.</i>	1				1	0,10
12	Drożdżaki	4	6	4	5	19	1,82
13	<i>Epicoccum nigrum</i>	6		2	3	11	1,05
14	<i>Fusarium spp.</i>	85			44	129	12,37
15	<i>Mycosphaerella sp.</i>			8	4	12	1,15
16	Niezarodnikujące	8		3	5	16	1,53
17	<i>Penicillium sp.</i>	2		1		3	0,29
18	<i>Periconia sp.</i>	1		2		3	0,29
19	<i>Phoma spp.</i>	54			17	71	6,81
20	<i>Phomopsis spp.</i>	55	5	11	53	124	11,89
21	<i>Ulocladium botryosum</i>	26		2	8	36	3,45
	Razem	579	19	94	351	1043	100,00



Fot. 7. *Acremonium* (K. Nowik).



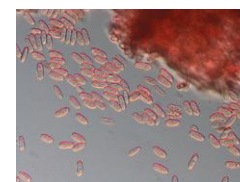
Fot. 8. *Alternaria alternata* (K. Nowik).



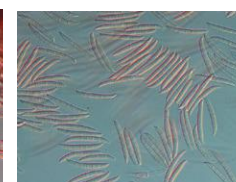
Fot. 9. *Aureobasidium pullulans* (K. Nowik).



Fot. 10. *Cladosporium cladosporioides* (K. Nowik).



Fot. 11. *Colletotrichum* (K. Nowik).



Fot. 12. *Fusarium* (K. Nowik).



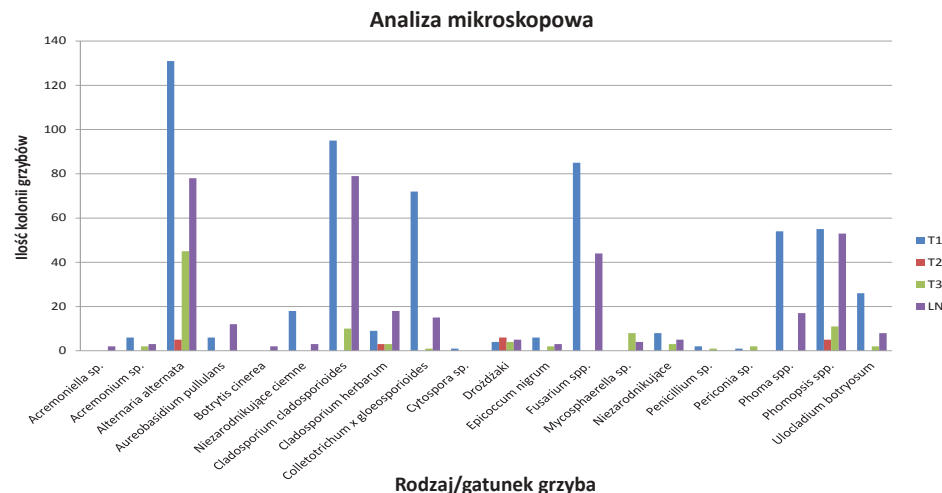
Fot. 13. *Phoma* (K. Nowik).



Fot. 14. *Phomopsis* (K. Nowik).

W pierwszym etapie badań (skrzydlaki pozyskane na przełomie lat 2014/2015) analiza mikroskopowa została wykonana dla każdego wariantu temperaturowego, aby możliwe było dokonanie oceny ilościowej grzybów zasiedlających nasiona. Hodowle po krio- i termoterapii przeprowadzono dla pięciu stanowisk, po wariacie kontrolnym dla wszystkich ujętych w etapie I proveniencji, tj. trzynastu.

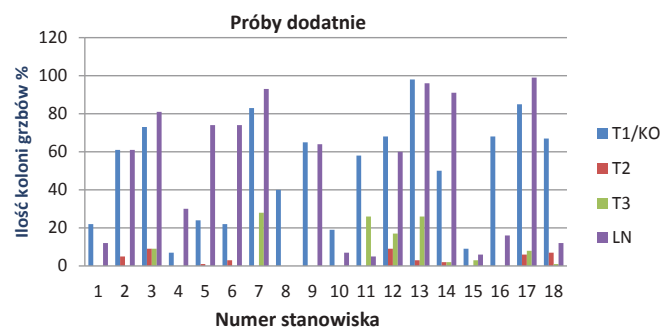
W żadnym wariacie nie wyizolowano grzyba *H. fraxineus*, który jest głównym sprawcą obserwowanego w Europie procesu zamierania jesionu. Zależność występowania konkretnych gatunków grzybów po zastosowaniu poszczególnych wariantów przedstawiono na Wykresie 2.



Wykres 2. Analiza mikroskopowa dokonana dla każdego wariantu temperaturowego. Kolor niebieski – kontrola, kolor czerwony – termoterapia w temp. T2, kolor zielony – termoterapia w T3, kolor fioletowy – krioterapia – LN.

Analiza ilościowa

W ramach przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 1043 kolonie grzybów. Analiza ilościowa wykazała, że najliczniej kolonia grzybów wzrastała na fragmentach nasion jesionu w wariantach T1 (kontrola) – 579 kolonii i po krioterapii w -150°C (LN) – 351 kolonii grzybów. Najmniej licznie zainfekowane były nasiona po termoterapii T2 (18 kolonii). Uzyskane wyniki przedstawia Wykres 3.



Wykres 3. Wyniki hodowli na podłożach mikrobiologicznych. Kolor niebieski – kontrola, kolor czerwony – termoterapia w temp. T2, kolor zielony – termoterapia w T3, kolor fioletowy – nasiona poddane krioterapii.

Analiza jakościowa

Podczas analiz stwierdzono występowanie około 20 rodzajów grzybów. Najliczniej występowały grzyby rodzaju *Alternaria* wraz z *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Phomopsis*. Licznie występowały grzyby rodzajów *Phoma* i *Colletotrichum*. Najmniej zróżnicowane były hodowle w wariacie T2 (4 rodzaje), najbardziej w wariantach T1 i LN (po 18 rodzajów). W wariacie T2 nie występowały grzyby *Fusarium*, stwierdzono obecność nielicznych *Alternaria* sp., *Phomopsis* spp. i *Cladosporium* spp.

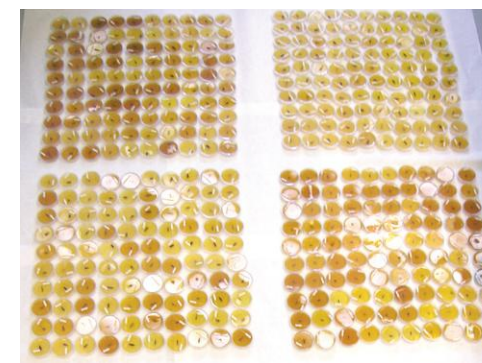
Hodowla mikroorganizmów – wyniki dla etapu II (2015/2016)

W drugim etapie badań przeprowadzono krioterapię i termoterapię według tego samego schematu jak w etapie I (Tabela 3).

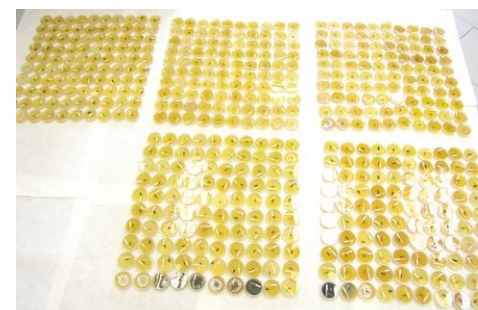
W celu uściślenia informacji na temat wrażliwości patogenów grzybowych na zastosowane temperatury, dokonano analizy ilościowej występowania grzybów po zastosowaniu czterech wariantów temperaturowych oraz analizę mikroskopową dla tych, które wykazały wzrost po procesie termoterapii.



Fot. 15. Hodowla patogenów zasiedlających nasiona po termoterapii, wariant T1. (U. Wasileńczyk).



Fot. 16. Hodowla patogenów, zasiedlających nasiona po termoterapii, wariant T2. (U. Wasileńczyk).



Fot. 17. Hodowla patogenów zasiedlających nasiona po termoterapii, wariant T3. (U. Wasileńczyk).



Fot. 18. Hodowla patogenów, zasiedlających nasiona po Krioterapii, wariant LN. (U. Wasileńczyk).

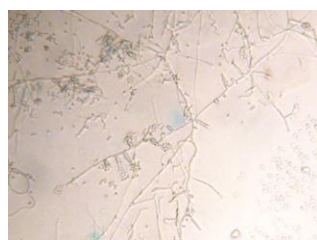
Określono, jakie rodzaje grzybów podejmują wzrost na nasionach po zastosowaniu wariantów T2 i T3 termoterapii. Są to głównie *Alternaria alternata* oraz *Phomopsis* spp. stanowiące prawie 80% grzybów występujących po zastosowaniu termoterapii. Dla T1 w obydwu wariantach stwierdzono również kilkuprocentowy udział trzech innych grup – dla T2: szczepów niezarodnikujących jasnych (7%), *Colletotrichum x gleosporioides* (7%) oraz drożdżaków (7%); dla T3: niezarodnikujących jasnych (7%), *Ulocladium botryosum* (8%), *Phoma* spp. (8%).

Również w tym etapie badania były prowadzone głównie pod kątem występowania *Hymenoscyphus fraxineus* oraz jego dezaktywacji po zastosowaniu termote-

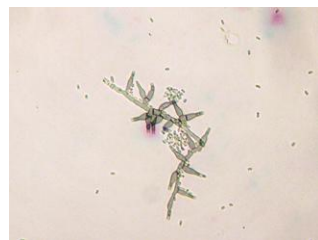
rapii i krioterapii. Obecność patogenu w hodowlach stwierdzono w trzech powiniencjach, jedynie w kontroli (T1) oraz po zastosowaniu krioterapii (LN). Analizę mikroskopową potwierdziły również badania molekularne przeprowadzone dla wszystkich 5-ciu stanowisk oraz dla każdego wariantu temperaturowego – w sumie 2 000 próbek.



Fot. 19. Zdjęcie skrzydłaka jesionu wyniosłego, porośniętego grzybem *Hymenoscyphus fraxineus* (U. Wasileńczyk).



Fot. 20. *Hymenoscyphus fraxineus*. Zdjęcie spod mikroskopu (U. Wasileńczyk).



Fot. 21. *Hymenoscyphus fraxineus*. Zdjęcie spod mikroskopu (U. Wasileńczyk).

Analiza molekularna

W celu weryfikacji wyników hodowlanych z fragmentów tych samych nasion, które zostały wyłożone na pożywkę dokonano również analizy molekularnej. Łącznie, w II etapach, przeanalizowano 4 400 sztuk skrzydłaków jesionu wyniosłego, pochodzących z 11 stanowisk. Szczegółowe zestawienie zaprezentowano w Tabeli nr 5.

Tabela 5. Zestawienie ilości prób dodatnich dla poszczególnych partii nasion. Kursywą oznaczono stanowiska, dla których w skrzydłakach nie stwierdzono obecności materiału genetycznego patogenu.

Lp.	RDLP	Nadleśnictwo	Nr zapasu w LBG	Ilość badanych prób	Ilość prób dodatnich	Odsetek prób dodatnich
1	Szczecin	Choszczno	436/ZP/14	400	1	0,25%
2	Szczecin	Łobez	447/ZP/14	400	8	2,00%
3	Gdańsk	Kwidzyn	450/ZP/14	400	3	0,75%
4	Gdańsk	Wejherowo	451/ZP/14	400	1	0,25%
5	<i>Toruń</i>	<i>Jamy</i>	<i>425/ZP/14</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00%</i>
6	<i>Toruń</i>	<i>Zamrzenica</i>	<i>134/ZP/15</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00%</i>
7	<i>Toruń</i>	<i>Toruń</i>	<i>436/ZP/15</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00%</i>
8	<i>Toruń</i>	<i>Żołędowo</i>	<i>439/ZP/15</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00%</i>
9	Radom	Pińczów	440/ZP/15	400	2	0,50%
10	Katowice	Brzeg	444/ZP/15	400	63	15,75%
11	Kraków	Niepołomice	445/ZP/15	400	40	10,00%
Suma				4 400	118	2,68%

Dodatni wynik testu molekularnego uzyskano dla 118 z 4 400 skrzydłaków (2,68%), pochodzących z siedmiu z badanych jedenastu stanowisk. Biorąc pod uwagę jedynie stanowiska, w których stwierdzono występowanie patogenu (7, co daje 2 800

prób), odsetek dodatnich wynosi 4,21%. Większość prób dodatnich (103, co stanowi 87,29% wszystkich prób dodatnich) stwierdzono w partiach pochodzących z nadleśnictw Brzeg i Niepołomice. W przypadku czterech stanowisk nie stwierdzono obecności materiału genetycznego patogenu w badanych skrzydłakach. Wszystkie one są zlokalizowane na terenie Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Toruniu (rezerwat przyrody: Rogóźno Zamek w Nadleśnictwie Jamy i Płutowo w Nadleśnictwie Toruń oraz dwa źródła nasion: w nadleśnictwach Zamrzenica i Żołędowo).

Ocena eliminacji patogenu

Skrzydłaki zebrano z 233 drzew, a więc zakładany w projekcie FraxUmLBG wskaźnik 170 osobników – został osiągnięty. Każdy skrzydłak, po sterylizacji powierzchniowej i poddaniu wariantowi krio- lub termoterapii, podzielono w aseptycznych warunkach komory laminarnej na dwie części. Jedną wyłożono na specjalistyczną pożywkę hodowlaną celem namnożenia organizmów grzybowych zasiedlających materiał roślinny, z drugiej wyizolowano DNA totalne i wykonywano molekularny test diagnostyczny na obecność materiału genetycznego *H. fraxineus*. Analizę wyników pod kątem stwierdzenia występowania patogenu opisuje Tabela 6.

Tabela 6. Zestawienie wyników pod kątem stwierdzenia występowania *Hymenoscyphus fraxineus* na poszczególnych stanowiskach. Stanowiska 3, 7, 10, 11, 12, 13 – opracowane w I etapie, 14 – 18 – w II etapie doświadczenia. Kursywą oznaczono stanowiska, dla których w skrzydłakach nie stwierdzono obecności materiału genetycznego patogenu.

Nr stanowiska	RDLP	Nadleśnictwo	Leśnictwo, oddział/nazwa rezerwatu	Kategoria obiektu	Ilość prób	Hodowla (+)		Test mol. (+)	
						Ilość	%	Ilość	%
3	Szczecin	Choszczno	Skalisty Jar Libberta	Rezerwat przyrody	400	0	0,00	1	0,25
7	Szczecin	Łobez	Winniki, oddz. 331i	Źródło nasion	400	0	0,00	8	2,00
10	Gdańsk	Kwidzyn	Las Mątawski	Rezerwat przyrody	400	0	0,00	3	0,75
11	Gdańsk	Wejherowo	Darzlubie, oddz. 224t	Drzewostan	400	0	0,00	1	0,25
12	<i>Toruń</i>	<i>Jamy</i>	<i>Rogóźno Zamek</i>	<i>Rezerwat przyrody</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>
13	<i>Toruń</i>	<i>Zamrzenica</i>	<i>Lnianek, oddz. 166d</i>	<i>Źródło nasion</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>
14	<i>Toruń</i>	<i>Toruń</i>	<i>Płutowo</i>	<i>Rezerwat przyrody</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>
15	<i>Toruń</i>	<i>Żołędowo</i>	<i>Kruszyn 475a</i>	<i>Źródło nasion</i>	<i>400</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>	<i>0</i>	<i>0,00</i>
16	Radom	Pińczów	Teresów oddz. 356f	Drzewostan	400	1	0,25	2	0,50
17	Katowice	Brzeg	Barucice	Rezerwat przyrody	400	9	2,25	63	15,75
18	Kraków	Niepołomice	Ispina, oddz. 421, c	Drzewostan	400	3	0,75	40	10,00
łącznie					4 400	13	0,30	118	2,68
Dla stanowisk, dla których stwierdzono obecność materiału genetycznego patogenu					2 800	13	0,46	118	4,21

Za pomocą testów hodowlanych wykryto obecność patogenu w trzech proveniencjach (nadleśnictwa: Pińczów, Brzeg i Niepołomice). Wynik został pozytywnie zweryfikowany na drodze analiz molekularnych. Dla czterech stanowisk dodatnie wyniki uzyskano jedynie w testach DNA (nadleśnictwa: Choszczno, Łobez, Kwidzyn, Wejherowo). Dla pozostałych czterech (nadleśnictwa: Jamy, Zamrzenica, Toruń, Żółędowo) obydwa testy wypadły negatywnie, tj. ani na drodze hodowli, ani analiz DNA nie stwierdzono obecności *H. fraxineus* w badanej puli prób. Należy zwrócić uwagę na znacznie wyższy poziom wykrywalności patogenu przy zastosowaniu metody molekularnej. Wynika to między innymi z biologii organizmu – wykazuje się on bardzo powolnym wzrostem, w związku z czym często przegrywa konkurencję z szybciej rozwijającymi się mikroorganizmami towarzyszącymi. Detekcja mikro– a zwłaszcza makroskopowa jest w takich przypadkach bardzo utrudniona, czasem wręcz niemożliwa.

Wyniki oceny skuteczności krioterapii i termoterapii w zwalczaniu patogenów zawarto w Tabeli 7. Zestawia ona próby z siedmiu stanowisk, dla których analizy molekularne wykryły obecność materiału genetycznego patogenu w skrzydlakach jesionu wyniosłego, ale w rozbiciu na poszczególne warianty doświadczenia (krioterapię – LN, kontrolę – T1, dwa warianty termoterapii – T2 i T3). Wykazano, że ilość prób zawierających DNA *H. fraxineus* jest w każdej puli podobna (od 24 w T2, do 36 w T1; w ujęciu procentowym odpowiednio: od 3,43% do 5,15%), ze średnią wartością 29,5, co stanowi 4,21% analizowanych 2 800 prób. Należy zaznaczyć, że zastosowany test molekularny, oparty o detekcję mikrosatelitarnego DNA daje wynik dodatni nawet w przypadku braku aktywności biologicznej tkanek analizowanego gatunku, czyli pozwala na wykrycie śladu obecności organizmu już martwego. Oznacza to, iż w przypadku wykonywanej oceny skuteczności krioterapii i termoterapii, dodatni test molekularny przy ujemnym teście hodowlanym wskazuje, iż patogen był obecny w tkance gospodarza, ale został dezaktywowany. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku dwóch wariantów: T2 i T3.

Tabela 7. Analiza wyników pod kątem stwierdzenia występowania *H. fraxineus* w poszczególnych wariantach terapii. Tabela zestawia dane dla stanowisk, na których potwierdzono obecność patogenu (3, 7 10, 11, 16, 17, 18). LN – krioterapia, T1 – wariant kontrolny, T2, T3 – warianty termoterapii.

Ilość prób w poszczególnych wariantach					
Wariant	Ilość prób	Hodowla (+)		Test mol. (+)	
		Ilość	Odsetek	Ilość	Odsetek
LN	700	2	0,29%	32	4,57 %
T1	700	11	1,57%	36	5,14 %
T2	700	0	0,00%	24	3,43 %
T3	700	0	0,00%	26	3,71 %
Suma	2 800	13	0,46%	118	4,21 %

Wnioski

Badania przeprowadzone w Zespole Pracowni Badawczo-Wdrożeniowych LBG Kostrzyca oraz w ZOL we Wrocławiu potwierdziły obecność *H. fraxineus* w skrzydlakach jesionu

wyniosłego, a co za tym idzie ugruntowały tezę, że skrzydlaki mogą być wektorem przenoszącym patogen. Wykazano również korelację obecności grzyba ze stanowiskiem, z którego pozyskano nasiona. Występowanie patogenu stwierdzono w Nadleśnictwach: Choszczno (rezerwat Skalisty Jar Libberta), Łobez (Leśnictwo Winniki), Kwidzyn (rez. Las Mątawski), Wejherowo (Leśnictwo Darzłubie), Pińczów (Leśnictwo Teresów), Brzeg (rez. Barucice), Niepołomice (Leśnictwo Ispina). Należy zaznaczyć, iż brak patogenu w samych próbach doświadczalnych z pozostałych proveniencji nie oznacza, że stanowiska te są wolne od sprawcy zamierania jesionu.

Dezaktywacja *H. fraxineus*

W ramach oceny skuteczności krioterapii i termoterapii opracowano szybki test diagnostyczny na obecność *H. fraxineus* w tkankach jesionu wyniosłego (skrzydlaki, nasiona, pędy, liście). Dzięki połączeniu metody molekularnej i klasycznej (hodowlanej) wykazano skuteczność termoterapii w zwalczaniu patogenu. Brak wzrostu w hodowlach ze skrzydlaków poddanych termoterapiom przy jednoczesnym stwierdzeniu w próbach śladów materiału genetycznego patogenu wskazuje na skuteczność opracowanych metod termoterapii w zwalczaniu *H. fraxineus*. Wyniki analiz jakościowych i ilościowych wykonanych w ZOL we Wrocławiu wskazują również na znaczne ograniczenie wzrostu innych patogenów grzybowych poddanych działaniu T2 i T3. Wyniki dla etapu I (pełny panel mikologiczny) wskazują, iż wariant T2 jest bardziej efektywny w stosunku do najczęściej występujących mikroorganizmów, tj. grzybów z rodzajów: *Alternaria*, *Cladosporium* oraz *Phomopsis*. Zastosowanie wariantu LN (krioterapia) nie pozwala na eliminację zarówno *H. fraxineus*, jak i towarzyszących grzybów.

Skuteczność krioterapii i termoterapii

Wszystkie oceny wykonane na podstawie ilościowej i jakościowej analizy fitopatologicznej nasion jesionu poddanych krioterapii i termoterapii wskazują, że zastosowane w wariantach T2 parametry termoterapii skutecznie eliminują większość rodzajów grzybów związanych ze skrzydlakami jesionu wyniosłego (w tym *H. fraxineus*) lub w istotny sposób ograniczają ich ilość.

Ocena żywotności nasion po procesie krioterapii i termoterapii

Celem badań było sprawdzenie żywotności nasion po zastosowaniu krioterapii i termoterapii nasion jesionu wyniosłego (*F. excelsior* L.) pochodzących z drzew wykazujących objawy chorobowe.

Metodyka badań

Zarys metodyki badań przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Schemat metodyki badań

Krioterapia	Termoterapia T1 (kontrola)	Termoterapia T2	Termoterapia T3
Stratifikacja nasion (Suszka et al., 2000)			
Ocena żywotności nasion metodą barwienia TTC – Test Tetrazolinowy (ISTA, 2003)			

Wyniki

Ocenę żywotności przeprowadzono w drugim etapie badań dla nasion pozyskanych z pięciu stanowisk w sezonie 2015/2016.

Tabela 9. Zestawienie stanowisk, z których pozyskano nasiona do drugiego etapu.

Nr stanowiska	RDLP	Nadleśnictwo	Leśnictwo, oddział/nazwa rezerwatu	Kategoria obiektu	Ilość prób w hodowli
14	Toruń	Toruń	Płutowo	Rezerwat przyrody	400
15	Toruń	Żołędowo	Kruszyn 475a	Źródło nasion	400
16	Radom	Pińczów	Teresów 356f	Drzewostan	400
17	Katowice	Brzeg	Barucice	Rezerwat przyrody	400
18	Kraków	Niepołomice	Ispina 421 c	Drzewostan	400

Wrażliwość nasion na temperaturę par ciekłego azotu -150°C.

Zdolność kiełkowania skrzydlaków jesionu wyniosłego przemrożonych w parach ciekłego azotu (LN) przy wilgotności około 10% nie różniła się istotnie od zdolności kiełkowania skrzydlaków nie traktowanych LN. Wschody uzyskane ze skrzydlaków przemrożonych w LN przy wilgotności około 10% były wyraźnie niższe. Zróżnicowanie pomiędzy próbą kiełkowania a wschodami jest ściśle związane z pochodzeniem nasion. Najślabsze wyniki uzyskano dla stanowiska nr 14 – Nadleśnictwo Toruń (rezerwat Płutowo) oraz stanowiska nr 16 – Nadleśnictwo Pińczów (Leśnictwo Teresów). Po zakończeniu prób kiełkowania i wschodów stwierdzono dla tych stanowisk duży udział nasion pustych oraz uszkodzonych przez owady.

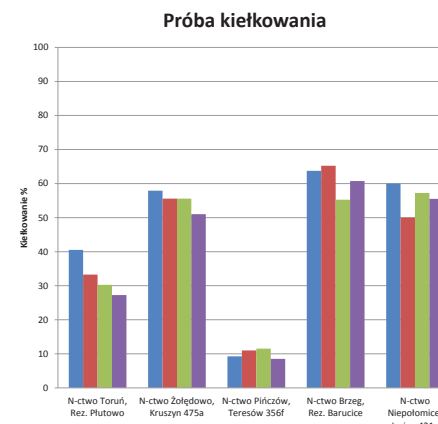
Wrażliwość nasion na podwyższoną temperaturę zastosowaną w wariantach T2 i T3

Zdolność kiełkowania skrzydlaków jesionu wyniosłego po termoterapiach T2 i T3 nie różniła się istotnie od nasion niepoddanych podwyższonej temperaturze (T1/Kontrola). Większe zróżnicowanie uzyskano dla wschodów. W przypadku dwóch partii (nadleśnictwa: Brzeg i Niepołomice) lepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu termoterapii T2 w odniesieniu do kontroli (T1). Najślabiej wzrosły siewki pochodzące z Nadleśnictwa Toruń oraz Pińczów, podobnie jak w próbie kiełkowania, co potwierdza ścisłą zależność z pochodzeniem nasion. Wynik przedstawiają Wykresy 4 i 5.

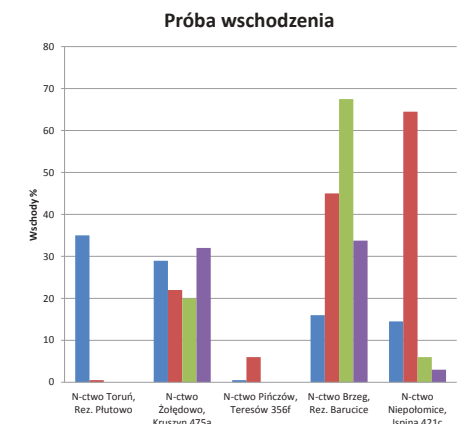
Zarówno skrzydlaki przemrożone w -150°C jak i poddane termoterapii T2 i T3, nie wykazują dużego zróżnicowania.

Jedynie dla nasion pozyskanych z Nadleśnictwa Pińczów obserwuje się znaczny spadek żywotności po przemrożeniu.

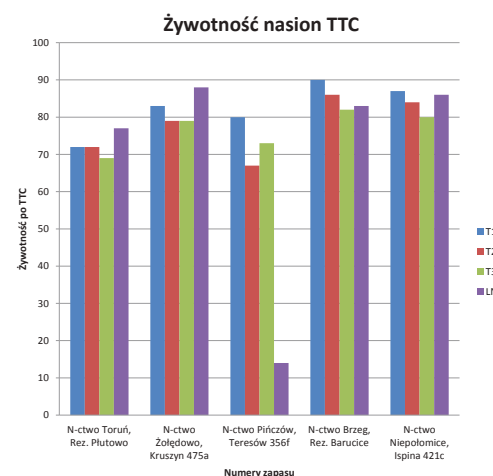
Bardziej równomierne wyniki uzyskane w teście tetrazolinowym związane są głównie z metodyką wyboru nasion do badań (do stratyfikacji użyto całych, oskrzydłych nasion, natomiast do testu tetrazolinowego nasiona wcześniej wyłuskano) co znacznie wpłynęło na końcowy rezultat. Wyniki przedstawia Wykres 6.



Wykres 4. Próba kiełkowania.



Wykres 5. Próba wschodzenia.



Wykres 6. Próba barwienia TTC.



Fot. 22. *Fraxinus excelsior* L. – wschody (U. Wasileńczyk).



Fot. 23. *Ulmus laevis* Pall. – wschody (U. Wasileńczyk).



Fot. 24. *Ulmus glabra* Huds. – wschody (U. Wasileńczyk).

PODSUMOWANIE

Zarówno nasiona po procesie krioterapii jak termoterapii nie wykazują znacznego spadku żywotności, wszelkie odchylenia związane są najprawdopodobniej z pochodzeniem nasion i kondycją zdrowotną osobników rodzicielskich. Wskazuje to, iż zastosowane do eliminacji patogenu warianty temperaturowe są bezpieczne dla skrzydlaków jesionu wyniosłego. Ich wykorzystanie do ochrony materiału nasiennego nie spowoduje negatywnych zmian w jego jakości.

Literatura

1. Baral H.O., Queloz V., Hosoya T., Hymenoscyphus fraxineus, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. IMA FUNGUs · volume 5 · NO 1: 79-80.
2. Cleary M.R., Arhipova N., Gaitnieks T., Stenlid J., Vasaitis R., 2012: Natural infection of Fraxinus excelsior seeds by Chalara fraxinea in For. Path. 43 (2013), 83-85.
3. Chmielarz P., 2007. Kriogeniczne przechowywanie nasion leśnych drzew liściastych z kategorii Orthodox i suborthodox. str. 41. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
4. Chmielarz P. (2009). Cryopreservation of dormant European ash (*Fraxinus excelsior* L.) orthodox seeds. *Tree physiology*, 29(10), 1279-1285.
5. Gherghel F., Fussi B., Dones K., Hausteine M., Jakob K.M., Muller K., Piskur B., Hauptman T., Lenz H.D., Konnerth M., Kost G., Rexer K.-H., 2014: The development of a species-specific test to detect Hymenoscyphus pseudoalbidus in ash tissues in For. Path. 44 (2014), 137-144.
6. Hayatgheibi H., 2013: Studies on the microflora associated with the seeds of European ash (*Fraxinus excelsior*) and the infection biology of the pathogen Hymenoscyphus pseudoalbidus causing ash dieback – Independent project in biology – Master's thesis, 30 hp, EX0565 Swedish University of Agriculture Science Department of Forest Mycology and Plant Pathology.
7. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing, Vol II. 1st Edition, 2003.
8. Johansson S.B.K., Vasaitis R., Ihrmark K., Barklund P., Stenlid J., 2009: Detection of Chalara fraxinea from tissue of Fraxinus excelsior using species-specific ITS primers in For. Path. 40 (2010), 111-115.
9. Kowalski T., Bartnik Cz., 2010: Morphological variation in colonies of Chalara fraxinea isolated from ash *Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure in Acta Agrobotanica Vol. 63 (1): 99-106 (2010).
10. Kowalski T., Kraj W., 2012: Sprawozdanie końcowe z prac wykonanych w latach 2006 – 2012 w temacie badawczym pt. „Ustalenie przyczyn i uwarunkowań zamierania jesionów i jaworów dla wypracowania podstaw postępowania hodowlano-ochronnego”.
11. PM 7/117 (1) Hymenoscyphus pseudoalbidus in EPPO Bulletin (2013) 43 (3). 449-461.
12. Schumacher J., Kehr R., Leonhard S. (2009): Mycological and histological investigations of Fraxinus excelsior nursery samplings naturally infected by Chalara fraxinea in For. Path. 40 (2010), 419-429.
13. Sullivan M., 2011. CPHTS Pest Datasheet for Chalara fraxinea. USDA-APHIS-PPQ-CPHST.
14. Suszka B., Muller C., Bonnet-Masimbert M. (2000). Nasiona leśnych drzew liściastych, od zbioru do siewu. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa-Poznań.
15. Queloz V., et al. "Cryptic speciation in Hymenoscyphus albidus." *Forest Pathology* 41.2 (2011): 133-142.