

**BŁAŻEJ WÓJKIEWICZ, WERONIKA B. ŻUKOWSKA, LECH URBANIAK, JAN KOWALCZYK, MONIKA LITKOWIEC, ANDRZEJ LEWANDOWSKI**

## Określenie pochodzenia wyłączonych drzewostanów nasiennych sosny rychtalskiej (*Pinus sylvestris* L.) z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych\*

Determination of the origin of the rychtal Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed tree stands using microsatellite markers

### ABSTRACT

Wójkiewicz B., Żukowska W. B., Urbaniak L., Kowalczyk J., Litkowiec M., Lewandowski A. 2019. Określenie pochodzenia wyłączonych drzewostanów nasiennych sosny rychtalskiej (*Pinus sylvestris* L.) z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych. Sylwan 163 (8): 637-644. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylvan.2019059>.

The rychtal pine is one of the most valuable ecotypes of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) approved for the breeding purposes in Poland. However, it occupies stands typical for oaks and beeches as shown by the compatibility analysis of species composition in relation to the habitat type in which they occur. Such result raises some doubts in terms of the naturalness of the rychtal pine and calls its history and origin into question. In the present study, we used the set of nuclear microsatellite markers to characterize and compare the gene pool composition of the selected seed tree stands of the rychtal pine with 200-year-old pine trees which grow at the Syców Forest District (SW Poland). We aimed to know to what extent the set of alleles specified for the group of the oldest trees from natural habitats is represented in the younger forest tree stands of the rychtal pine. The analysis of molecular variance (AMOVA) and clustering analysis showed that the gene pool of the studied pine populations was homogenous ( $F_{ST}=0,02\%$ ,  $K=1$ ). The parameters of genetic variation were similar for all populations except for the mean number of alleles. On average, 25 new alleles were found in two rychtal pine seed tree stands as compared to the set of alleles found in the group of old pine trees. However, all alleles defined for old pines were also present in the gene pool of younger rychtal pine forest stands. The differences in the gene pool richness result most likely from quite high differences in the number of individuals analyzed from each population. In conclusion, our results indicate the common origin of the studied Scots pine populations.

### KEY WORDS

Scots pine, genetic variation, gene pool, genetic structure, SSR markers

### ADDRESSES

Błażej Wójkiewicz <sup>(1)</sup> – e-mail: [bwojkiew@man.poznan.pl](mailto:bwojkiew@man.poznan.pl)

Weronika B. Żukowska <sup>(1)</sup> – e-mail: [wzukowska@man.poznan.pl](mailto:wzukowska@man.poznan.pl)

Lech Urbaniak <sup>(2)</sup> – e-mail: [lechurb@amu.edu.pl](mailto:lechurb@amu.edu.pl)

Jan Kowalczyk <sup>(3)</sup> – e-mail: [J.Kowalczyk@ibles.waw.pl](mailto:J.Kowalczyk@ibles.waw.pl)

Monika Litkowiec <sup>(4)</sup> – e-mail: [Monika.Litkowiec@lbg.lasy.gov.pl](mailto:Monika.Litkowiec@lbg.lasy.gov.pl)

Andrzej Lewandowski <sup>(1)</sup> – e-mail: [alew@man.poznan.pl](mailto:alew@man.poznan.pl)

\*Badania finansowane w ramach działalności statutowej Instytutu Dendrologii oraz projektu finansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych realizowanego przez konsorcjum naukowe DENDROGEN.

<sup>(1)</sup> Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk; ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

<sup>(2)</sup> Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań

<sup>(3)</sup> Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary; ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

<sup>(4)</sup> Leśny Bank Genów Kostrzyca; Miłków 300, 58-535 Miłków

## Wstęp

Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew w Polsce zakłada ochronę oraz poprawę wartości hodowlanej populacji drzew leśnych poprzez wykorzystywanie nasion pochodzących z wyselekcjonowanej bazy nasiennej. Szczególną rolę w programie odgrywają wyłączone drzewostany nasienne (WDN), wyróżniające się spośród innych drzewostanów rosnących w takich samych warunkach siedliskowych swoją jakością, zdrowotnością i zdolnościami adaptacyjnymi. Obecnie Lasy Państwowe mają około 17 000 ha wyselekcjonowanych i zarejestrowanych drzewostanów nasiennych [Chałupka i in. 2011].

Przewaga jakościowa dojrzałego drzewostanu wyróżniającego się na tle innych gospodarczych drzewostanów nie może być jednak traktowana jako gwarancja jego rodzimości. Dotyczy to głównie sosny, świerka i modrzewia, których nasiona wykorzystywane do zalesień w XIX i na początku XX wieku były w sposób niekontrolowany rozprzestrzeniane po całej Europie [Bradshaw 2004; Lewandowski i in. 2012; Jensen i in. 2017]. Jak podają źródła historyczne, administracja Lasów Państwowych wydała zakaz zakupu nasion drzew iglastych z zagranicy w Polsce dopiero w 1925 roku. Jednocześnie nałóżono na administrację leśną obowiązek zaspokajania zapotrzebowania na nasiona we własnym zakresie. W ostateczności można było korzystać z prywatnych wyłuszczeni krajowych, jednak przy kontroli pochodzenia każdej partii nasion [Kostyrko 1925].

Najbardziej wiarygodnych informacji o rodzimości drzewostanów dostarcza dokumentacja dotycząca pochodzenia użytego materiału odnowieniowego lub sposobu jego odnowienia. Niestety, ze względu na burzliwą historię Polski tego typu dokumentacja w większości nie przetrwała do naszych czasów. W świetle braku danych historycznych duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem markerów molekularnych, które doskonale sprawdziły się w analizach historii demograficznej populacji wielu gatunków drzew leśnych [Petit i in. 1998, 2002; Cheddadi i in. 2006; Litkowiec i in. 2016; Wójkiewicz i in. 2016a; Żukowska, Wachowiak 2017]. Dla przykładu analizy genetyczne wykonane w ramach badań nad historią świerka w Polsce wskazują na duży udział w drzewostanach tego gatunku sztucznie wprowadzonego świerka pochodzenia alpejskiego [Lewandowski i in. 2014]. Niestety, mimo wielu zakończonych już projektów badawczych znacznie mniej wiadomo na temat historii i pochodzenia drzewostanów sosny zwyczajnej, najważniejszego lasotwórczego gatunku w Polsce.

Wieloletnie badania proveniencyjne dostarczyły szeregu informacji na temat przystosowania i wartości hodowlanej poszczególnych populacji sosny zwyczajnej w Polsce. W oparciu o uzyskane wyniki za jeden z najcenniejszych ekotypów sosny uznana została sosna rychtalska z obrębu Rychtal Nadleśnictwa Syców [Giertych 1980; Matras 1989]. Analiza zgodności składu gatunkowego z siedliskiem wskazuje jednak, że drzewostany sosny rychtalskiej zajmują siedliska, gdzie gatunkami panującymi są głównie dąb, buk oraz jesion. Taka informacja rodzi pewne obawy co do rodzimości tych drzewostanów, stawiając pytanie o pochodzenie tego ekotypu sosny.

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę porównawczą puli genowej dwóch wyłączonych drzewostanów nasiennych sosny rychtalskiej oraz grupy 200-letnich osobników tego gatunku rosnących na terenie Nadleśnictwa Syców. Grupa starych drzew, z uwagi na swój wiek, stanowi populację referencyjną reprezentującą, jak się przypuszcza, lokalną pulę genową drzewostanów

sosnowych. Hipotezę tę wspiera fakt, że na początku XIX wieku infrastruktura związana zarówno z produkcją, jak i z przemieszczaniem leśnego materiału rozmnożeniowego, była w Europie słabo rozwinięta. Dlatego też należy założyć, że w tym okresie sztuczne nasadzenia wykonywano głównie z wykorzystaniem nasion pochodzących ze źródeł lokalnych.

Celem pracy było zbadanie poziomu zmienności dwóch wyłączonych drzewostanów nasiennych sosny rychtalskiej oraz próba odpowiedzi na pytanie, na ile pula genowa najstarszych osobników jest reprezentowana w wyłączonych drzewostanach sosny rychtalskiej. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w aspekcie lokalnego pochodzenia analizowanych drzewostanów sosny rychtalskiej, stanowiących bazę nasienną tego ekotypu sosny w Polsce.

## Materiał i metody

Badaniami objęto 210 osobników sosny zwyczajnej z obszaru Nadleśnictwa Syców. Materiał do badań pochodził z dwóch wyłączonych drzewostanów nasiennych sosny w wieku około 130 (WDN) i 160 lat (WDNS) oraz pojedynczych starych drzew (S) z leśnictw: Drołtówice, Czermin oraz Bałdowice (tab. 1). Izolację całkowitego DNA z igieł przeprowadzono według protokołu z pracy Dumolin i in. [1995]. Otrzymane izolaty DNA zostały ocenione pod względem jakościowym i ilościowym z wykorzystaniem spektrofotometru BioPhotometer firmy Eppendorf.

Do analiz wykorzystano zestaw czterech loci mikrosatelitarnych jądrowego DNA: SSRPtctg4363 [Chagné i in. 2004], PtTx8446, PtTx4001 [Elsik i in. 2000] i Spag7.14 [Soranzo i in. 1998]. Amplifikację fluoroscencyjnie wyznakowanych starterów przeprowadzono z zastosowaniem metody PCR multipleks i zestawu Multiplex Master Mix (Qiagen, Niemcy), według zaleceń producenta. Profil temperaturowy reakcji PCR obejmował: denaturację – 15 min w 95°C, amplifikację – 8 cykli „touchdown”: 30 sek. w 94°C, 1 min 30 sek. w 63°C (–1°C/cykl), 1 min w 72°C oraz 28 cykli: 30 sek. w 94°C, 1 min 30 sek. w 55°C, 1 min w 72°C, a także końcowe wydłużanie – 10 min w 72°C. Rozdział amplifikowanych produktów wykonano przy użyciu automatycznego sekwenatora ABI PRISM 3130 (Thermo Fisher Scientific, USA) z wewnętrznym markerem wielkości GENESCAN-LIZ600 (Thermo Fisher Scientific, USA), według procedury dostarczonej przez producenta. Wielkość otrzymanych w reakcji PCR fragmentów DNA analizowano z wykorzystaniem programu GeneMapper® Software Version 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Poziom polimorfizmu loci mikrosatelitarnych wykorzystanych w badaniu określony został w oparciu o ogólną liczbę wykrytych alleli ( $A_L$ ). Dla każdego z loci obliczona została również heterozygotyczność obserwowana ( $H_o$ ) i oczekiwana ( $H_e$ ) przy użyciu programu GenAlEx [Peakall, Smouse 2006]. Częstość występowania alleli zerowych (NAF) w badanych loci oszacowana została za pomocą programu FreeNA [Chapuis, Estoup 2007].

Tabela 1.

Położenie i wiek (W [lata]) badanych populacji sosny zwyczajnej oraz liczba analizowanych osobników (N) Location and age (W [years]) of the studied Scots pine populations with number of analysed specimen (N)

	Leśnictwo	Oddział	Lokalizacja	W	N
WDN	Smardze	68a, 68b, 69a	N 51,1961 E 17,9310	128-133	104
WDNS	Smardze	81b, 81j	N 51,1841 E 17,9573	163	77
	Drołtówice	153a	N 51,3134 E 17,5552	200	22
S	Czermin	158g	N 51,3215 E 17,8306	200	3
	Bałdowice	2111	N 51,3104 E 17,7676	200	4

Dla każdej z analizowanych populacji obliczono: średnią ( $A$ ) i średnią efektywną ( $A_e$ ) liczbę alleli, liczbę alleli prywatnych ( $P_a$ ) oraz heterozygotyczność obserwowaną ( $H_o$ ) i oczekiwaną ( $H_e$ ). Wszystkie wyżej wymienione parametry zostały oszacowane z wykorzystaniem programu GenAlEx. Program FSTAT 2.9.3 [Goudet 2001] został użyty w celu określenia wielkości współczynnika wsobności ( $F_{IS}$ ) oraz bogactwa allelicznego ( $A_R$ ) dla wielkości próby – 29 osobników ( $A_{R29}$ ). Istotność odchylenia populacji od stanu równowagi Hardy’ego-Weinberga (HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium) została określona z wykorzystaniem programu GENEPOP 4.0.10 [Raymond, Rousset 1995]. Wartość współczynnika wsobności ( $F_{IS}$ ) została również obliczona z uwzględnieniem korekty na obecność alleli zerowych ( $F_{ISNULL}$ ), przy wykorzystaniu programu INEST 2.2 [Chybicki, Burczyk 2009]. Efektywna wielkość analizowanych populacji ( $N_e$ ) została oszacowana w oparciu o metodę analizy nierównowagi sprzężeń badanych loci (LD – linkage disequilibrium) za pomocą programu NeEstimator\_V2.1 [Waples, Do 2010]. W związku z obecnością rzadkich alleli uwzględniono w obliczeniach (zgodnie z zaleceniami autorów programu) wyłącznie allele o częstości większej niż 2% ( $P_{crit}=0,02$ ) [Waples 2005].

Stopień zróżnicowania genetycznego badanych populacji określono z wykorzystaniem analizy wariancji molekularnej (AMOVA) przy użyciu programu ARLEQUIN 3.11 [Excoffier, Lischer 2010]. Grupowanie populacji wykonano w programie BAPS [Corander, Tang 2007]. Powiązania filogenetyczne między populacjami zostały określone w oparciu o dystans genetyczny  $D_{ST}$  [Nei 1972] z zastosowaniem metody przyłączania sąsiadów NJ (ang. neighbor-joining method), przy użyciu programu POPTREEW [Takezaki i in. 2014].

Test na zawężenie puli genowej populacji w wyniku efektu „wąskiego gardła” (bottleneck effect) wykonano, wykorzystując program INEST 2.2, poprzez oszacowanie współczynnika  $M$ . Analizy przeprowadzono w oparciu o model mutacji TPM (Two Phase Mutation Model), stosując parametry rekomendowane w pracy Peery i in. [2012]. Istotność analizowano testem permutacyjnym Wilcoxon (1 000 000 permutacji) [Cornuet, Luikart 1996].

## Wyniki

Wykorzystane do analiz loci mikrosatelitarne pozwoliły na wykrycie 73 alleli (tab. 2). Podstawowe parametry zmienności genetycznej analizowanych populacji zestawiono w tabeli 3. Średnia liczba alleli ( $A$ ) mieściła się w zakresie od 10,2 dla populacji S do 17,0 dla populacji WDN, ze średnią 14,2. Średnia efektywna liczba alleli i współczynnik bogactwa allelicznego kształtowały się na podobnym poziomie, ze średnią wartością  $A_e=7,8$  oraz  $A_{R29}=11,5$ . W populacji WDN wykryto 10 alleli prywatnych, o częstości mieszczącej się w zakresie od 0,015 do

**Tabela 2.**

Liczba alleli w locus ( $A_L$ ), liczba alleli dla poszczególnych populacji (A/WDN, A/WDNS, A/S), heterozygotyczność obserwowana ( $H_o$ ) i oczekiwana ( $H_e$ ) oraz średnia częstość alleli zerowych (NAF) loci mikrosatelitarnych wykorzystanych w badaniu

Number of alleles in locus ( $A_L$ ), number of alleles found in given population (A/WDN, A/WDNS, A/S), observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity and mean null allele frequency (NAF) of the loci used in the investigation

Locus	$A_L$	A/WDN	A/WDNS	A/S	$H_o$	$H_e$	NAF
SSrPtctg4363	15	14	10	5	0,59	0,71	0,08
PtTx4001	14	14	10	5	0,40	0,71	0,17
PtTx8446	11	11	11	10	0,77	0,83	0,05
Spag7.14	33	29	31	20	0,55	0,95	0,21
Średnia Mean	18,25	17	15,5	10	0,58	0,80	0,13

Tabela 3.

Średnia (A) i średnia efektywna (Ae) liczba alleli, bogactwo alleliczne określone dla 29 osobników ( $A_{R29}$ ), liczba alleli prywatnych (Pa), heterozygotyczność obserwowana (Ho) i oczekiwana (He), współczynnik wsobności ( $F_{IS}$ ), współczynnik wsobności obliczony z korektą na obecność alleli zerowych ( $F_{ISNULL}$ ), bayesowski 95-procentowy przedział ufności dla parametru  $F_{ISNULL}$  (CI 95%), współczynnik M oraz jego wartość oczekiwana (Meq), istotność współczynnika M ( $P_M$ ), efektywna wielkość populacji (Ne) (określona po odrzuceniu alleli o częstości niższej niż  $P_{crit}=0,02$ ) oraz 95-procentowy przedział ufności dla oszacowanej Ne (CI 95%) dla analizowanych populacji

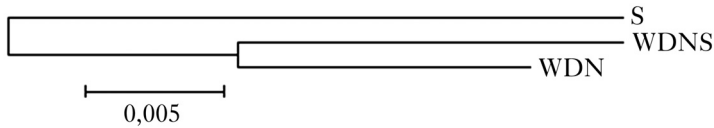
Mean (A) and mean effective (Ae) number of alleles, allelic richness estimated for 29 individuals ( $A_{R29}$ ), number of private alleles (Pa), observed (Ho) and expected (He) heterozygosity, inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ), inbreeding coefficient with the correction for the presence of null alleles ( $F_{ISNULL}$ ), Bayesian 95% confidence intervals (CI 95%), M ratio and its expected value (Meq), p-value of M ratio ( $P_M$ ), effective population size (Ne) (allele frequency used  $P_{crit}=0.02$ ) as well as Bayesian 95% confidence intervals (CI 95%) for the analyzed populations

	WDN	WDNS	S	Średnia Mean
A	17	15,5	10,2	14,2
Ae	8,1	8,2	7,1	7,8
$A_{R29}$	12,3	12	10,3	11,5
Pa	10	5	0	5
Ho	0,57	0,62	0,54	0,58
He	0,81	0,81	0,78	0,8
$F_{IS}$	0,30	0,24	0,32	0,29
$F_{ISNULL}$	0,15	0,04	0,12	0,1
CI 95%	0,00-0,27	0,00-0,11	0,00-0,29	
M	0,83	0,76	0,73	0,77
Meq	0,83	0,81	0,77	0,8
$P_M$	0,5	0,23	0,3	
Ne ( $P_{crit}=0,02$ )	241,5	76,1	59,2	125,6
CI 95%	111,2-5208,3	47,3-148,8	23,3-123,5	

0,025. Z kolei w populacji WDNS wykryto 5 takich alleli, o częstości w zakresie od 0,007 do 0,015. W referencyjnej grupie starych drzew nie zidentyfikowano alleli prywatnych.

Średnia oszacowana heterozygotyczność obserwowana ( $Ho=0,58$ ) dla populacji była niższa niż średnia heterozygotyczność oczekiwana ( $He=0,80$ ), co wskazuje na niedobór heterozygot we wszystkich badanych populacjach. Odchylenie od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga analizowanych populacji sosny potwierdziła istotna statystycznie wartość współczynnika wsobności (średnia  $F_{IS}=29\%$ ,  $p<0,05$ ). Niemniej jednak dodatkowe analizy wykazały, że wartość współczynnika  $F_{IS}$  została przeszacowana, a nadmiar homozygot w badanych populacjach był zawyżony z uwagi na obecność alleli zerowych. Średnia wartość współczynnika wsobności po korekcie ( $F_{ISNULL}$ ) wyniosła 10%. W żadnej z analizowanych populacji nie stwierdzono zawężenia puli genowej na skutek efektu „wąskiego gardła”. Wartości współczynnika M były wysokie i porównywalne między populacjami, nie odbiegając istotnie od wartości oczekiwanej Meq. Efektywna wielkość populacji najmłodszego w zestawie drzewostanu (WDN) wyniosła  $Ne=241,5$  i była średnio 4 razy wyższa od oszacowanej efektywnej wielkości pozostałych analizowanych populacji (tab. 3).

Pula genowa badanych populacji była jednorodna:  $F_{ST}=0,02\%$ ,  $P=1,000$ ,  $K=1$ . Między badanymi populacjami stwierdzono również niskie wartości dystansów genetycznych (ryc. 1). Największy dystans genetyczny dzieli populacje WDN i S ( $D_{ST}=0,042$ ), podczas gdy najmniejszy populacje WDN i WDNS ( $D_{ST}=0,024$ ). Niemniej jednak analiza składu puli genowej badanych



Ryc.

Relacje między analizowanymi populacjami sosny w oparciu o dystans genetyczny  $D_{ST}$  Neia  
Relationships among the analyzed pine populations based on the Nei's genetic distance

populacji wskazała na obecność alleli prywatnych w wyłączonych drzewostanach sosny rychtalskiej (tab. 3).

## Dyskusja

Analizowane populacje sosny rychtalskiej charakteryzował wysoki poziom zmienności genetycznej, porównywalny do poziomu obserwowanego w innych drzewostanach tego gatunku w Europie. Nieco wyższy średni poziom heterozygotyczności obserwowanej ( $H_o=0,77$ ) został oszacowany dla populacji sosny zwyczajnej z Polski północno-wschodniej [Nowakowska 2016]. Niemniej jednak Wójkiewicz i in. [2016b] przy wykorzystaniu większej liczby markerów oszacowali średni poziom heterozygotyczności dla populacji sosny z całego zasięgu europejskiego na  $H_o=0,45$ . Podobny wynik ( $H_o=0,42$ ) uzyskano dla 16 pochodzeń sosny z Polski w pracy Hebdy i in. [2017]. Stwierdzone różnice poziomu heterozygotyczności wynikają najprawdopodobniej z faktu, że na wartość tego parametru ma wpływ ilość analizowanych osobników, jak i poziom polimorfizmu wykorzystanych markerów. Żukowska i in. [2017] wskazują jednoznacznie, że poziom heterozygotyczności poszczególnych loci mikrosatelitarnych spada wraz z ich zmiennością, co w przypadku zastosowania w analizach markerów o niskim polimorfizmie skutkuje obniżeniem średniego poziomu heterozygotyczności badanej populacji. Wartość współczynnika wsobności po korekcji na obecność alleli zerowych mieściła się w zakresie od kilku do kilkunastu procent, co wskazuje na jedynie nieznaczne odchylenie badanych populacji od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga. Analizowane wyłączone drzewostany sosny rychtalskiej charakteryzowało również wysokie bogactwo alleliczne, jak i wysoka efektywna wielkość populacji (średnia  $N_e=158,8$ ). Odnosząc te wartości do reguły 50/500 [Franklin 1980], według której  $N_e=50$  jest wystarczająca, aby zapobiegać depresji wsobnej w perspektywie kilku generacji, można uznać, że analizowane WDN sosny rychtalskiej są bez wątpienia populacjami stabilnymi genetycznie, które mogą być wykorzystywane w hodowli.

Przeprowadzona analiza zróżnicowania genetycznego wskazała, że struktura genetyczna wyłączonych drzewostanów sosny rychtalskiej, jak i grupy 200-letnich osobników sosny jest jednorodna ( $F_{ST}=0,02\%$ ,  $P=1,000$ ;  $K=1$ ). Potwierdzają to również niskie wartości dystansów genetycznych obliczone pomiędzy parami badanych populacji. Jednakże, co należy podkreślić, niski poziom zróżnicowania genetycznego obserwuje się w całym zasięgu występowania sosny w Europie Środkowej [Sinclair i in. 1998; Wachowiak i in. 2014; Wójkiewicz i in. 2016a, b]. Dlatego też wynik ten nie może być traktowany jako bezsprzeczne potwierdzenie lokalnego pochodzenia badanych wyłączonych drzewostanów sosny rychtalskiej. Dodatkowe wątpliwości budzi obecność nowych alleli w badanych WDN, w stosunku do referencyjnej grupy 200-letnich drzew. Niemniej jednak wartość parametru określająca bogactwo alleliczne ( $AR_{29}$ ) była porównywalna między analizowanymi populacjami. Wyniki te potwierdzają więc silną zależność między wykrytą liczbą alleli a liczbą badanych osobników [Petit i in. 1998]. Dlatego nie można wykluczyć, że część wspomnianych alleli może być pochodzenia lokalnego, jednak nie została wykryta w grupie starych drzew ze względu na małą liczbę analizowanych osobników. Nowe allele mogły

zostać przeniesione także z innych regionów występowania gatunku. Szereg badań przeprowadzonych na drzewach leśnych potwierdza efektywny przepływ genów za pośrednictwem pyłku na duże odległości [Lindgren i in. 1995; Williams 2017]. Na wspólną historię analizowanych populacji wskazuje ich homogenna struktura genetyczna oraz obecność wszystkich alleli z grupy starych drzew w puli genowej wyłączonych drzewostanów nasiennych.

Uzyskane wyniki nie dostarczyły jednoznacznych dowodów na naturalne pochodzenie badanych drzewostanów sosny rychtałskiej, jednak nie wykluczają ich lokalnego pochodzenia. Głównym ograniczeniem dla precyzyjnego wnioskowania wydaje się być siła rozdzielcza wykorzystanych w badaniu markerów mikrosatelitarnych. Obiecującą alternatywę dla przyszłych badań nad pochodzeniem populacji sosny zwyczajnej stanowi możliwość rozszerzenia analiz o nowo opracowane dla tego gatunku markery mitochondrialnego DNA [Donnelly i in. 2017]. Mimo to zaprezentowana koncepcja badawcza, która opiera się na włączeniu do badań populacji referencyjnej, złożonej z punktowo występujących w niektórych rejonach starych osobników reprezentujących pozostałości naturalnych populacji, może być użyteczna w ustalaniu relacji genetycznych i rodzimoci populacji sosny zwyczajnej w Polsce.

## Podziękowania

Dziękujemy Panu Nadleśniczemu Marcinowi Dubickiemu z Nadleśnictwa Syców za pomoc w zbiorze materiału oraz Pani Marii Ratajczak za pomoc techniczną.

## Literatura

- Bradshaw H. W. R. 2004. Past anthropogenic influence on European forests and some possible genetic consequences. *Forest Ecology and Management* 197: 203-212.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T., Vendramin G. G., Garcia V., Frigerio J. M., Echt C., Richardson T., Plomion C. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1204-1214.
- Chałupka W., Matras J., Barzdajn W., Blonkowski S., Burezyk J., Fonder J., Grądzki T., Gryzło Z., Kacprzak P. 2011. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew w Polsce na lata 2011-2035. CILP.
- Chapuis M. P., Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-631.
- Cheddadi R., Vendramin G. G., Litt T., Francois L., Kageyama M., Lorentz S., Laurent J. M., de Beaulieu J.-L., Sadori L., Jost A., Lunt D. 2006. Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecology and Biogeography* 15: 271-282.
- Chybicki I. J., Burezyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100: 106-113.
- Corander J., Tang J. 2007. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences* 205: 19-31.
- Cornuet J.-M., Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Donnelly K., Cottrell J., Ennos R. A., Vendramin G. G., A'Hara S., King S., Perry A., Wachowiak W., Cavers S. 2017. Reconstructing the plant mitochondrial genome for marker discovery: a case study using *Pinus*. *Molecular Ecology Resources* 17: 943-954.
- Dumolin S., Demesure B., Petit R. J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Elsik C. G., Minihan V. T., Scarpa A. M., Hall S. E., Williams C. G. 2000. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome* 43: 550-555.
- Excoffier L., Lischer H. E. L. 2010. Arlequin ver. 3.0: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Franklin I. R. 1980. Evolutionary change in small populations. W: Soule M. E., Wilcox B. A. [red.]. *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer, Sunderland, MA. 135-149.
- Giertych M. 1980. Polskie rasy sosny, świerka i modrzewia w międzynarodowych doświadczeniach proweniencyjnych. *Arboretum Kórnickie* 25: 135-159.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Switzerland.



- Hebda A. M., Wójkiewicz B., Wachowiak W. 2017. Genetic characteristics of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite loci markers. *Silva Fennica* 51(2): article id 172; DOI: <https://doi.org/10.14214/sf.1721>.
- Jensen S., Konraad H., Guberek T. 2017. The extent of historic translocation of Norway spruce forest reproductive material in Europe. *Annals of Forest Science* 74: 56.
- Kostyrko J. 1925. Znaczenie pochodzenia żołądź używanych do siewu. *Las Polski* 1: 12-16.
- Lewandowski A., Litkowiec M., Grygier A., Dering M. 2012. Weryfikacja pochodzenia świerka pospolitego (*Picea abies*) w Nadleśnictwie Gołdap. *Sylwan* 156 (7): 494-501. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2012036>.
- Lewandowski A., Szydlarski M., Litkowiec M. 2014. Pochodzenie świerka pospolitego (*Picea abies* (L.) Karst.) w Nadleśnictwie Kartuszy. *Sylwan* 158 (7): 509-515. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2013125>.
- Lindgren D., Paule L., Shen X. H., Yazadani R., Segerstrom U., Wallin J. E., Lejdebrom M. L. 1995. Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances. *Grana* 34: 64-69.
- Litkowiec M., Lewandowski A., Rączka G. 2016. Spatial Pattern of the Mitochondrial and Chloroplast Genetic Variation in Poland as a Result of the Migration of *Abies alba* Mill. from Different Glacial Refugia. *Forests* 7: 284.
- Matras J. 1989. Badania proweniencyjne Zakładu Nasiennictwa i Selekcji IBL nad sosną pospolitą. *Sylwan* 133 (11-12): 1-5.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-291.
- Nowakowska J. A. 2016. Microsatellite markers in analysis of forest-tree populations. W: Abdurakhmonov I. Y. [red.]. *Microsatellite Markers*. Open Science INTECH, Croatia. 95-116.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peery Z. M., Kirby R., Reid B. N., Stoelting R., Doucet-Béer E., Robinson S., Vásquezcarrillo C., Pauli J. N., Pasbøll P. J. 2012. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology* 21: 3403-3418.
- Petit J. R., Brewer S., Bordaacs S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U. M., van Dam B., Deans J. D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P. G., Jensen J. S., König A. O., Lowe A. J., Madsen S. F., Matyas G., Munro R. C., Popescu F., Sladea D., Tabbener H., de Vries S. G. M., Ziegenhagen B., de Beaulieu J.-L., Kremer A. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Petit R. J., El Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying population for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.
- Raymond M., Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Sinclair W. T., Morman J. D., Ennos R. A. 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 8: 83-88.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7: 1247-1263.
- Takezaki N., Nei M., Tamura K. 2014. POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1622-1624.
- Wachowiak W., Wójkiewicz B., Cavers S., Lewandowski A. 2014. High genetic similarity between Polish and North European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations at nuclear gene loci. *Tree Genetics & Genomes* 10 (4): 1015-1025.
- Waples R. S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: to what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology* 14: 3335-3352.
- Waples R. S., Do C. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications* 3: 244-262.
- Williams C. G. 2017. How meso-scale pollen dispersal and its gene flow shape gene conservation decisions. *New Forests* 48: 217-224.
- Wójkiewicz B., Cavers S., Wachowiak W. 2016a. Current Approaches and Perspectives in Population Genetics of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Forest Science* 62 (3): 343-354.
- Wójkiewicz B., Litkowiec M., Wachowiak W. 2016b. Contrasting patterns of genetic variation in core and peripheral populations of highly outcrossing and wind pollinated forest tree species. *AoB Plants*. <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/plw054.plw054>.
- Żukowska W. B., Wachowiak W. 2017. Nuclear microsatellite markers reveal the low genetic structure of *Pinus mugo* Turra (dwarf mountain pine) populations in Europe. *Plant Systematics and Evolution* 303: 641-665.
- Żukowska W. B., Wójkiewicz B., Litkowiec M., Wachowiak W. 2017. Cross-amplification and multiplexing of cpSSRs and nSSRs in two closely related pine species (*Pinus sylvestris* L. and *P. mugo* Turra). *Dendrobiology* 77: 59-64.