

Stan zdrowotny a zróżnicowanie genetyczne wybranych drzewostanów świerkowych na terenie RDLP w Krośnie

Genetic variability and health of Norway spruce stands in the Regional Directorate of the State Forests in Krosno

Justyna Gutkowska^{1*}, Małgorzata Borys², Anna Tereba², Miłosz Tkaczyk³, Tomasz Osza³, Justyna Anna Nowakowska²

¹Politechnika Białostocka, Zamiejscowy Wydział Leśny, Hajnówka, ul. Piłsudskiego 8, 17-200 Hajnówka;

²Instytut Badawczy Leśnictwa, Laboratorium Biologii Molekularnej, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn;

³Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Ochrony Lasu, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

*Tel. +48 85 537 593 270, e-mail: just60@onet.eu

Abstract. The study was conducted in 2015 in six spruce stands situated in different forest districts administratively belonging to the Regional Directorate of Forests State in Krosno. Each spruce population was represented by 30 trees and assessed in terms of their current health status. Genetic analyses were performed based on shoot samples from each tree using nine nuclear DNA markers and one mitochondrial DNA marker (*nad1*). The health status of the trees was described according to the classification developed by Szczepkowski and Tarasiuk (2005) and the correlation between health classes and the level of genetic variability was computed with STATISTICA ($\alpha = 0.05$).

Nuclear DNA analyses revealed a low level of genetic variability among spruce populations (only 3% of the total genetic variation ($F_{ST} = 0.028$) and a high variability within populations (97%). The total heterozygosity in all stands (H_T) was calculated as 0.646. Based on UPGMA analysis, the most genetically similar populations are spruce stands in the Bieszczady National Park and the Ustrzyki Dolne Forest District, which have the smallest genetic divergence of all populations ($D_N = 0.0165$).

Our analysis of the mitochondrial gene *nad1* revealed the presence of six different haplotypes “a”, “a1”, “b”, “c”, “d” and “d1”. Comprising 56% of all haplotypes, “a” was the most common showing a predominant impact on spruce migration from the Carpathian area. The analysis based on mitochondrial markers (by Nei) revealed a heterozygosity of 0.525.

Based on the observations of disease symptoms, 29% of the trees belong to health class 1, 30% to class 2, 28% to class 3 and class 4 contains 13% of trees. The comparison between health status and the level of genetic variation in the analyzed stands showed a positive correlation. Spruce stands with better health were also characterized by a greater degree of genetic variability.

Since most of the investigated spruce populations shared the mitochondrial haplotype “a”, we have ascertained their Hercynian-Carpathian origin. Only one stand (Cisna) had a high frequency (43.3%) of the Nordic haplotype “c” suggesting that this provenance is derived from the Baltic post-glacial refugium of *P. abies* in Europe.

Keywords: *Picea abies*, Norway spruce, health state, SSR markers, mtDNA, genetic diversity

1. Wstęp

Drzewa leśne charakteryzuje wysoki poziom zmienności genetycznej wewnątrz populacji oraz niski stopień zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami. Wynika to m.in. z intensywnego przepływu genów u tej grupy roślin (Hamrick et al. 1992; Działuk, Bucznyk 2005). Na podstawie przeprowadzonych badań genetycznych populacji drzew leśnych można przypuszczać, że drzewostany o ubogiej puli genowej są mniej odporne na zmiany środowiskowe oraz bardziej na-

rażone na działanie niepożądanych czynników (Nowakowska, Konecka 2013). Zatem zróżnicowanie genetyczne drzew leśnych odgrywa kluczową rolę w stabilności i dynamice ekosystemów leśnych (Gregorius 1991; Wojnicka-Półtorak et al. 2014). Zróżnicowanie międzypopulacyjne gatunków o szerokim i ciągłym zasięgu występowania, np. świerka, wynosi często poniżej 3% (Müller-Starck et al. 1992). Fakt ten sprzyja dużej zmienności wewnątrzpopulacyjnej oraz wielokierunkowej zmienności ekologicznej, geograficznej, morfologicznej i fizjologicznej (Boratyński et al. 1998).

Wpłynęło: 22.06.2016 r., recenzowano: 8.09.2016 r., zaakceptowano: 12.10.2016 r.

Według wyników badań monitoringowych stanu uszkodzenia lasów w Polsce (stan na 2013 r.), porównując udział drzew uszkodzonych, świerk (*Picea abies* L. Karst.) należy do gatunku uszkodzonego w wysokim stopniu (26,96%) (Wawrzoniak et al. 2014), a jego stan zdrowotny wpływa na szereg cech (np. kształtuje jakość hodowlaną i użytkową, implikuje trwałość i żywotność drzewostanów) warunkujących stabilność i odporność ekosystemów leśnych na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe i szkodotwórcze. Może on również wpływać na zachowanie lasu jako formacji roślinnej (Sierota 1998), zapewnienie ciągłości podstawowych procesów ekologicznych, trwałość użytkowania ekosystemów, utrzymanie naturalnej odporności drzewostanów i zbiorowisk oraz zachowanie zasobów genetycznych dla przyszłych pokoleń (Matras 2013).

Celem pracy było przeanalizowanie zróżnicowania i zmienności genetycznej dojrzałych drzewostanów świerka pospolitego z terenu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych (RDLP) w Krośnie na podstawie markerów molekularnych, zarówno DNA jądrowego (loci mikrosatelitarne), jak i mitochondrialnego (fragment genu *nad1*), określenie stanu zdrowotnego badanych populacji oraz porównanie parametrów zmienności genetycznej z parametrami określającymi stan zdrowotny analizowanych drzew.

2. Materiał i metody

Do badań wybrano 6 populacji świerka pospolitego (*Picea abies*), zlokalizowanych na terenie RDLP w Krośnie w nadleśnictwach: Lutowiska, Stuposiany, Cisna, Ustrzyki Dolne, Komańcza oraz w Bieszczadzkiem Parku Narodowym (BPN) (tab. 1). Z każdego drzewostanu zebrano jednoroczne pędy lub wywierty z pnia z 30 losowo wytypowanych w drzewostanie drzew, których wiek wahał się od 60 lat (dla drzewostanów Lutowiska i Stuposiany) do 117 lat (dla Bieszczadzkiego Parku Narodowego). Dla każdego drzewa mierzono pierśnicę (DBH), wysokość (H) oraz długość korony (H_k).

Ocenę wzrokową stanu zdrowotnego drzewa wykonano w okresie wiosennym, wykorzystując 4-stopniową skalę uszkodzeń opracowaną na podstawie metody Szczepkowskiego i Tarasiuka (2005), gdzie klasyfikowano drzewa na podstawie stopnia defoliacji koron. Dodatkowo obserwowano inne objawy uszkodzenia drzew, takie jak obecność żerowisk owadów, występowanie owocników patogenicznych grzybów oraz inne uszkodzenia pni drzew. W zastosowanej skali uszkodzenia świerków, klasa 1. wskazywała drzewa bez uszkodzeń lub lekko uszkodzone (wykazujące <25% defoliacji oraz obecność pojedynczych żerowisk owadów), 2 – drzewa słabo uszkodzone (25%–50% defoliacji, występowanie otwartych, drobnych uszkodzeń pnia, wycieków żywicznych oraz rzadkich żerowisk owadów), 3 – drzewa średnio uszkodzone (50%–70% defoliacji, obecność uszkodzeń mechanicznych, pęknięć pnia, częstych żerów owadów i wycieków żywicznych), natomiast klasa 4 – osobniki silnie uszkodzone (wykazujące ponad 70% defoliacji koron, obecność głębokich, otwartych ran z bardzo częstymi wyciekami

żywicznymi, częstych uszkodzeń mechanicznych, z łuszczącą się lub odpadającą płatami korą, a także bardzo licznym występowaniem żerów owadów i owocników patogenów grzybowych).

Ekstrakcję DNA genomowego z materiału roślinnego przeprowadzono za pomocą zestawu do izolacji DNA NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel®), natomiast ilość otrzymanego DNA analizowano spektrofotometrycznie za pomocą aparatu NanoDrop® ND-1000 (TK-Biotech). W celu poznania struktury genetycznej jądrowego DNA przeprowadzono analizy sekwencji mikrosatelitarnych (SSR) dla 180 drzew przy użyciu następujących 9 loci mikrosatelitarnych: EATC1B02, EATC1E3, EATC2G05, SPAGC1, SPAGG3, EATC1G2, EATC2B02, G2 i SPAGC2 (Pfeiffer et al. 1997; Scotti et al. 2002). Do genotypowania drzew zastosowano sekwenator 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies™) z wykorzystaniem oprogramowania 3500 Data Collection Software.

Haplotypy mitochondrialnego DNA świerka oceniano na podstawie amplifikacji fragmentu genu *nad1* wg Sperisen i in. (2001). Produkty amplifikacji analizowano na podstawie elektroforezy chipowej (Bioanalyser®) wg zaleceń producenta, przy użyciu chipów DNA-1000 i klasyfikowano wg wielkości alleli „a”, „b”, „c” i „d” opisanych przez Sperisen i in. (2001). Haplotypy, które miały inną wielkość alleli niż u Sperisen i in. (2001), opisano kodem „a1” – dla allelu 350 par zasad, oraz „d1” dla 280 pz.

Obliczenia statystyczne podstawowych parametrów genetycznych dla markerów mikrosatelitarnych i DNA mitochondrialnego, w tym obserwowana (n_a) i efektywna (n_e) liczba alleli w locus, heterozygotyczność obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e), liczba alleli prywatnych (A_{priv}) oraz indeks Shannona (I) zostały wykonane w programie GenAlEx 6.501 (Peakall, Smouse 2012). Dendrogram podobieństwa genetycznego uzyskano w programie Mega 6.0.6 (Tamura et al. 2013), na podstawie metody średnich połączeń (UPGMA). Obliczenia korelacji między parametrami genetycznymi a stanem zdrowotności drzew sporządzono za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana przy wykorzystaniu programu Microsoft Office Excel 2007 oraz STATISTICA 10 (dla $\alpha=0,05$).

3. Wyniki

Badane drzewa charakteryzowały się następującymi parametrami DBH, H_k , H (tab. 2).

Świerk pospolity ze wszystkich sześciu populacji charakteryzował się największym udziałem (30%) osobników słabo uszkodzonych (klasa 2 zdrowotności). Około 29% stanowiły drzewa z 1. klasy zdrowotności (drzewa bez uszkodzeń/drzewa lekko uszkodzone) oraz 28% drzew średnio uszkodzonych (3 klasa zdrowotności). Najmniejszy udział (13%) odnotowano dla 4. klasy zdrowotności. Drzewostan z Nadl. Cisna charakteryzował się najlepszą zdrowotnością (ryc. 1), wyrażoną wysokim odsetkiem (64%) drzew bez uszkodzeń i drzew lekko uszkodzonych (1. klasa zdrowotności). Jedynie 3% drzew tej populacji przypisano do 4. klasy zdrowotności

Tabela 1. Opis taksacyjny drzewostanów świerkowych, z których zebrano materiał roślinny do analiz DNA, zlokalizowanych na terenie RDLP w Krośnie (dane według obecnie obowiązujących planów urządzania lasu dla analizowanych nadleśnictw)

Table 1. Stand description of studied spruce populations in the Krosno Regional Directorate of State Forests (data after Forest Management Plans for analyzed Forest Districts)

Nadleśnictwo Forest District	Obręb Forest Inspectorate	Leśnictwo Forest Subdistrict	Oddział Forest Compartment	Region nas. Seed region	Szerokość [N] Latitude [N]	Długość [E] Longitude [E]
Bieszczadzki Park Narodowy	BPN Górny San	Górny San	61g, 61c	806	49°04'99"	22°86'38"
Ustrzyki Dolne	Brzegi	Brzegi	125a, 113d	806	49°43'76"	22°64'00"
Stuposiany	Stuposiany	Czereszanka	10c	806	49°19'46"	22°71'71"
Lutowiska	Lutowiska	Lipie	2a	806	49°27'62"	22°71'92"
Komańcza	Komańcza	Turzańsk	8f	806	49°35'27"	22°08'23"
Cisna	Wetlina	Stare Sioło	82a, 82f	806	49°16'85" 49°16'66"	22°44'69" 22°44'55"

*LGśw / fresh mountain coniferous forest, LWYŻśw / fresh upland broadleaved forest, **przerywane (prz) / intermittent, luźne (luż) / loose, umiarkowane (umiark) / middling

Tabela 2. Charakterystyka badanych populacji świerka pospolitego według klas zdrowotności

Table 2. Characteristics of studied Norway spruce populations according to health classes

Zdrowotność Health state	Pierśnica [cm] Diameter at the breast height DBH [cm]	Wysokość osadzenia korony H_k [m] Crown height H_k [m]	Wysokość H [m] Height H [m]
1	48,94	4,54	26,42
2	42,62	6,01	25,87
3	39,00	5,43	25,14
4	38,50	5,45	25,55

(drzew silnie uszkodzonych). We wszystkich analizowanych drzewostanach, za najczęściej powtarzające się objawy uznano wycieki żywiczne (29,6%), żer ochojnika świerkowo-modrzewiowego (27,2%), uszkodzenia mechaniczne (22,8%) oraz defoliację (16%) (ryc. 2). Na pojedynczych drzewach odnotowano żery innych owadów (3,7%).

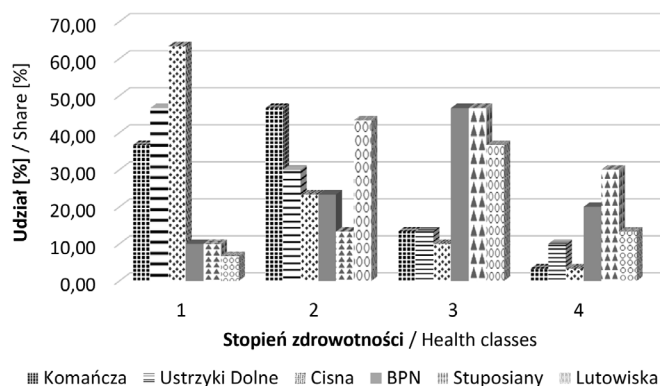
Wysoki udział drzew w 1. klasie zdrowotności (47%) miał również drzewostan z Nadl. Ustrzyki Dolne. Tu drzewa z 2. klasy zdrowotności (słabo uszkodzone) stanowiły 30%, zaś drzewa z klasy 3. i 4. tylko 13 i 10% (ryc. 1, 2).

Najniższym udziałem drzew bez uszkodzeń lub drzew lekko uszkodzonych (7%) wśród badanych populacji charakteryzował się drzewostan z Nadl. Lutowiska (ryc. 1, 2). W tej populacji najwięcej drzew przypisano do 2. i 3. klasy zdrowotności, czyli drzew słabo (43%) i średnio (37%) uszkodzonych. Osobniki z 4. klasy zdrowotności (silnie uszkodzone) występowały w udziale 13%.

Na podstawie analizy struktury genetycznej (DNA jądrowe) stwierdzono, że najbardziej polimorficzny był locus SPAGC2, u którego odnotowano 32 różne fragmenty DNA o wielkości od 83 do 181 par zasad, spośród których 8 alleli występowało z frekwencją większą niż 3%. Najmniejszą liczbę alleli odnotowano w locus EATC1E3 (5 alleli), przy średniej efektywnej liczbie alleli 1,46. Dla wszystkich analizowanych loci średnia liczba alleli w locus wyniosła $A=89,333$.

Populacje, które były najbardziej zróżnicowane genetycznie posiadały także wysokie wartości całkowitej liczby alleli w locus, odpowiednio: Ustrzyki Dolne $A=97$, Cisna $A=94$ i Komańcza $A=92$. Największe wartości obserwowanej (n_a) i oczekiwanej (n_c) liczby alleli na locus miały świerki z Nadleśnictwa Ustrzyki Dolne, odpowiednio $n_a=10,778$ i $n_c=5,412$, natomiast najmniejsze wartości tych parametrów cechowały populację z Nadleśnictwa Stuposiany $n_a=9,111$ i $n_c=4,786$, wraz z najmniejszą całkowitą liczbą alleli $A=82$ (tab. 3).

Ilość prób genetycz. Number of samples	Powierzchnia [ha] Area [ha]	TSL* Forest Site Type*	Skład gatunkowy Species composition	Wiek (lata) Age [years]	Zadrzewienie Stocking	Zwarcie** Stand density**	Pierśnica [cm] DBH [cm]	Wysokość [m n.p.m.] Altitude [asl]	Bonitacja Site index	Jakość Quality of soil
30	20,53	LGśw	5Jd,3Bk,2Św / 6Św, 4Ol.S	117	0,5	prz/prz. umiark	50	619	II	3
30	19,4	LWYŻśw	6Św,4Jd/7Jd, 2Jw,1Św	87- 65	0,5-0,9	luź/umiark	37	463	III	3
30	26,31	LGśw	5Jd, 3Jd, 2Św	60	0,5	prz/luź	34-50	593	II	2
30	9,47	LGśw	8Św,2Św	60	0,5	prz	32	619	II	3
30	22,7	LGśw	6Św, 4Jd	95	0,5	prz/luź	36	560	II	3
30	28,13	LGśw	8Św(103)2Św(81)	87	0,7 / 1,0	umiark/luź	52	600	II	2

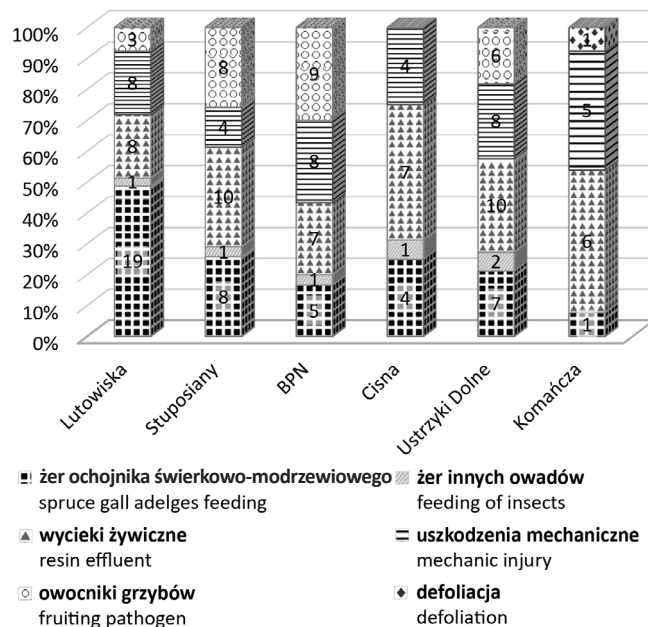


Rycina 1. Udział klas zdrowotności w badanych populacjach świerka z terenu RDLP w Krośnie

Figure 1. Share of health classes of studied spruce populations in the area of Krosno Regional Directorate of State Forests

Wszystkie badane drzewostany miały wysokie parametry różnicowania genetycznego: $n_a=9,926$, $n_e=5,068$, $H_o=0,487$, $H_T=0,646$ (tab. 3). Średnie wartości współczynników wsobności (F_{IS}) i heterozygotyczności (F_{IT}) genotypów badanych populacji były zbliżone do siebie, odpowiednio $F_{IS}=0,272$ i $F_{IT}=0,292$, co świadczy o zachowanej równowadze udziału osobników heterozygotycznych i homozygotycznych we wszystkich populacjach. Średnia zmienność genetyczna (F_{ST}) dla wszystkich badanych populacji jest niska $F_{ST}=0,028$ i wskazuje na występowanie większej zmienności genetycznej wewnątrz badanych drzewostanów niż pomiędzy nimi.

W każdej populacji zaobserwowano występowanie drzew z udziałem alleli prywatnych, z czego największą ich liczbę



Rycina 2. Udział objawów uszkodzeń w poszczególnych nadleśnictwach i Bieszczadzkiem PN

Figure 2. Share of damage symptoms in forest districts and Bieszczady NP

miały drzewostany z Nadl. Ustrzyki Dolne ($A_{priv}=0,889$), natomiast najmniejszą z Bieszczadzkiego P.N. ($A_{priv}=0,333$). Drzewo nr 12 pochodzące z powierzchni w Nadl. Komańcza posiadało aż 2 allele prywatne – 110 pz w locus SPAGC1 i 210 pz w locus EATC1B02.

Na podstawie analizy zgrupowania UPGMA otrzymano dwie grupy populacji zbliżonych genetycznie: grupę 1) BPN,

Tabela 3. Poziom zróżnicowania genetycznego badanych populacji świerka z terenu RDLP w Krośnie, na podstawie analiz mikrosatelitarnych loci jądrowego DNA

Table 3. Genetic diversity of studied spruce populations in the area of Krosno Regional Directorate of State Forests, based on analysis of nuclear microsatellite loci of DNA

Lp. / No	Populacja Population	A	n_a	n_e	A_{priv}	H_O	H_E
1.	BPN	85	9,444	5,08	0,333	0,467	0,631
2.	Ustrzyki Dolne	97	10,778	5,412	0,889	0,52	0,666
3.	Stuposiany	82	9,111	4,786	0,556	0,468	0,635
4.	Lutowiska	86	9,556	5,087	0,556	0,452	0,638
5.	Komańcza	92	10,222	4,7	0,667	0,509	0,668
6.	Cisna	94	10,444	5,344	0,778	0,507	0,637
Średnie ogółem / Overall:		89,333	9,926	5,068	0,630	0,487	$H_T = 0,646$

A – całkowita liczba alleli / total number of alleles,

n_a – obserwowana liczba alleli na locus / observed number of alleles per locus,

n_e – oczekiwana liczba alleli na locus / expected number of alleles per locus,

A_{priv} – liczba alleli prywatnych / number of private alleles,

H_O – heterozygotyczność obserwowana wg Nei (1978) / observed heterozygosity (Nei 1978),

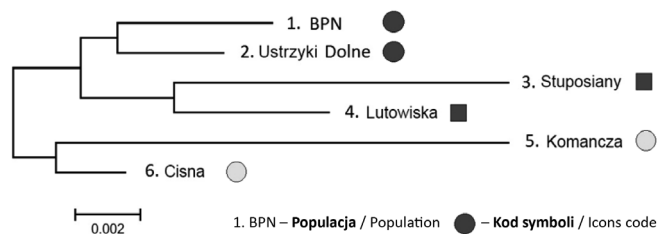
H_E – heterozygotyczność oczekiwana wg Nei (1978) / expected heterozygosity (Nei 1978),

H_T – całkowita średnia heterozygotyczność w drzewostanie / total mean heterozygosity per stand.

Ustrzyki Dolne, Stuposiany i Lutowiska oraz grupę 2) Komańcza i Cisna (ryc. 3). Największy dystans genetyczny obliczony na podstawie analizy loci SSR był między populacjami Komańcza i Stuposiany ($D_N=0,056$), zaś najmniejszy między populacjami BPN i Ustrzyki Dolne ($D_N=0,0165$). Rozmieszczenie geograficzne populacji o zbliżonych genotypach wykazuje podział na część wschodnią regionu 806, do której należą populacje z grupy pierwszej dendrogramu, oraz na część zachodnią, w której znajdują się dwie populacje z grupy drugiej dendrogramu (ryc. 4).

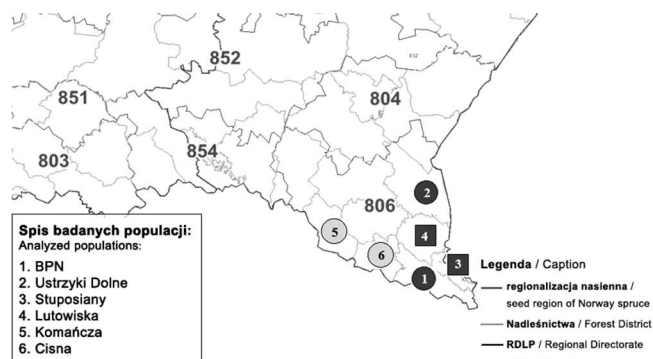
Analiza mitochondrialnego genu *nad1* wykazała występowanie 6 różnych wariantów haplotypów: „a”, „a1”, „b”, „c”, „d” i „d1”. Wśród wszystkich badanych populacji najczęściej występował haplotyp „a” (z frekwencją 56%) i haplotyp „d”

(25%). Rzadziej występowały haplotypy „a1”, „b”, „c” i „d1” (z frekwencjami odpowiednio 5%, 2%, 7% i 5%). Charakterystyczny dla północnego zasięgu świerka haplotyp „c” odnotowano tylko w drzewostanie Cisna, z dość dużą frekwencją (43,3%). Najbardziej zmienny genetycznie był drzewostan Nadleśnictwa Cisna. Zawierał on najwięcej (5) wariantów haplotypów: „a”, „b”, „c”, „d” i „d1”, cechował się najwyższą heterozygotycznością h Nei=0,618 oraz jako jedyny spośród wszystkich populacji posiadał allele prywatne. Najniższą wartość heterozygotyczności otrzymano dla populacji Nadleśnictwa Stuposiany: h Nei=0,382 (tab. 4). Największy dystans



Rycina 3. Dendrogram podobieństwa genetycznego na podstawie dystansu DN (Nei 1978) między badanymi populacjami świerka pospolitego. Populacje o zbliżonym podobieństwie genetycznym wyróżniono odrębnym symbolem

Figure 3. Dendrogram of genetic similarity of Nei (1978) based on nDNA, between the studied populations of Norway spruce. Populations with similar genetic similarity was marked a different icon



Rycina 4. Geograficzne rozmieszczenie grup populacji świerka pospolitego, na podstawie analizy DNA mikrosatelitarnego. Grupy populacji zbliżonych genetycznie oznaczono wg zgrupowania UPGMA dendrogramu z ryc. 3

Figure 4. Geographical location of spruce population groups, based on microsatellite DNA analysis. Genetically similar groups of populations were marked by grouping UPGMA dendrogram of Fig. 3

Tabela 4. Charakterystyka badanych drzewostanów populacji świerka z terenu RDLP w Krośnie na podstawie analiz mitochondrialnego genu *nad1*

Table 4. Characteristics of studied spruce stands in the area of Krosno Regional Directorate of State Forests, based on analysis of mitochondrial gene *nad1*

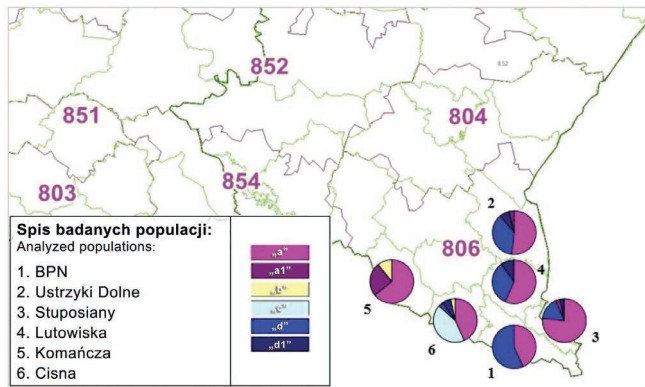
Populacja Population	n_a	n_e	A_{priv}	h Nei
BPN	2	1,965	0	0,491
Ustrzyki Dolne	4	2,422	0	0,587
Stuposiany	4	1,619	0	0,382
Lutowiska	3	2,261	0	0,558
Komańcza	3	2,052	0	0,513
Cisna	5	2,616	1	0,618
Średnia / Mean	3,500	2,156	0,167	0,525

n_a – obserwowana liczba alleli na locus / observed number of alleles per locus,

n_e – oczekiwana liczba alleli na locus / expected number of alleles per locus,

A_{priv} – liczba alleli prywatnych / number of private alleles,

h Nei – heterozygotyczność wg Nei (Nei 1978) / Nei (1978) heterozygosity.



Rycina 5. Udział występowania haplotypów genu *nad1* w badanych populacjach świerka pospolitego z terenu RDLP w Krośnie, na podstawie analiz DNA mitochondrialnego

Figure 5. Haplotype participation of the gene *nad1* in the studied populations of Norway spruce from the area of Krosno Regional Directorate of State Forests, based on analysis of mitochondrial DNA

genetyczny $D_N=0,994$ obliczony na podstawie mtDNA dzielił populacje Ustrzyki Dolne i Lutowiska. Najbardziej podobne genetycznie były za to populacje BPN i Cisna, które dzielił najmniejszy dystans $D_N=0,469$ (niez zilustrowane).

W tabeli 5 przedstawiono zestawienie współczynników genetycznego zróżnicowania jądrowego i mitochondrialnego DNA ze stanem zdrowotnym badanych drzew, określanym na podstawie 4 klas wg Szczepkowskiego i Tarasiuka (2005).

Na podstawie analizy współczynnika korelacji rang Spearmana wykazano istotny statystycznie (na poziomie istotności $\alpha=0,05$) związek między wysokością osadzenia korony

a pierśnicą (0,405) oraz wysokością osadzenia korony i wysokością drzew (0,565). Porównanie klas zdrowotności, pierśnicy (DBH), wysokości (H) oraz wysokości osadzenia korony (H_k) w odniesieniu do parametrów genetycznych (tab. 6) wykazało ujemne korelacje jedynie pomiędzy klasą zdrowotności a obserwowaną liczbą alleli na locus (n_a) i indeksem zmienności Shannona (I).

4. Dyskusja

Analizy stanu zdrowotnego drzew leśnych są częstym przedmiotem badań dotyczących populacji różnych gatunków drzew występujących w Polsce, prowadzonych zarówno na obszarze w zarządzie Lasów Państwowych, jak i parków narodowych, w celu porównania kondycji naszych lasów w przebiegu kilku dekad (Zajączkowski 1993; Borecki et al. 1995; Wawrzoniak et al. 1995, 1996, 1998, 2000, 2003, 2014; Sierota 1998; Zwoliński 2003; Szczepkowski, Tarasiuk 2005; Nowakowska, Oszako 2008; Żółciak et al. 2009; Zmarz et al. 2012).

Stan zdrowotny sześciu populacji świerka pospolitego badanych na terenie RDLP w Krośnie charakteryzował się największym udziałem (30%) osobników słabo uszkodzonych oraz najmniejszym (13,33%) silnie uszkodzonych. Wyniki te znajdują potwierdzenie w długoletnich badaniach monitoringowych Wawrzoniaka i in. (1995, 1996, 1998, 2000, 2003, 2014). Mimo zastosowania różnych klasyfikacji, wyniki stanu zdrowotnego świerczyny otrzymane w niniejszej pracy na podstawie sumy wszystkich czynników przybierają wartości klas defoliacji zbliżone do przedstawionych przez Wawrzoniaka i in. (2013), którzy zanotowali dla osobników powyżej 60-letnich 15,15% udziału drzew w klasie defoliacji 0 (do 10%), 72,73% w klasie lekkiej defoliacji oraz 12,12% drzew powyżej 25% defoliacji i martwych.

Ocenę wzrokową stanu zdrowotnego drzew na analizowanych terenach wykonywano w czasie wielodniowych opadów deszczu w okresie wiosennym 2015 roku, co mogło wpłynąć na zamaskowanie pewnych objawów chorobowych, jak barwa i długość igieł oraz obecność owocników patogenów grzybowych, pojawiających się w okresie jesiennym, np. opieńki.

Dobry stan zdrowotny analizowanych drzewostanów może być także uwarunkowany genetycznie. Zazwyczaj jest on wypadkową dwóch rodzajów odporności: pionowej (ukierunkowanej na dany patogen) i poziomej (na wiele czynników szkodliwych), np. w wyniku długotrwałej suszy i osłabienia drzew na skutek nasilonego ataku opieńki *Armillaria* spp., organizmów grzybopodobnych z rodzaju *Phytophthora* i *Pythium* lub owadów wtórnych (Nowakowska, Oszako 2008). W niniejszych badaniach nie przeprowadzono analiz pod kątem identyfikowania czynników sprawczych uszkodzeń, na podstawie pobranych prób, izolacji i hodowli patogenów.

Zróżnicowanie drzew leśnych pod względem cech genetycznych pełni ważną rolę w stabilności i dynamice ekosystemów leśnych (Wojnicka-Półtorak et al. 2014), decyduje o wartości surowca oraz warunkuje wpływ oddziaływania negatywnych czynników biotycznych i abiotycznych (Matras 2006). Zastosowane w pracy markery molekularne SSR i STS są zaliczane

Tabela 5. Parametry zróżnicowania genetycznego we wszystkich badanych populacjach według klas zdrowotności i typu analizowanego DNA (jądrowe loci mikrosatelitarne nSSR i mitochondrialny gen *nad1* – mtDNA)Table 5. Genetic diversity parameters in all studied populations by health class and type of analyzed DNA (nuclear microsatellite loci nSSR and mitochondrial gene *nad1* – mtDNA)

Typ markera Marker type	Klasy zdrowotności Health classes	n_a	n_e	I	H_o	H_E	F
nSSR	1	5,389	3,663	1,181	0,471	0,562	0,172
	2	5,852	3,971	1,289	0,495	0,584	0,194
	3	5,315	3,797	1,247	0,496	0,593	0,161
	4	3,333	2,668	0,854	0,492	0,455	-0,122
mtDNA		n_a	n_e	I	N	h Nei	uh
	1	2,667	2,064	0,745	8,333	0,459	0,604
	2	2,5	1,743	0,664	9	0,408	0,47
	3	2,333	1,886	0,707	8,167	0,468	0,59
4	1,667	1,452	0,338	3,667	0,211	0,265	

 n_a – obserwowana liczba alleli na locus / observed number of alleles per locus, n_e – oczekiwana liczba alleli na locus / expected number of alleles per locus, I – indeks Shannona wg Lewontin (1972) / Shannon index after Lewontin (1972), H_o – heterozygotyczność obserwowana wg Nei (1978) / observed heterozygosity after Nei (1978), H_E – heterozygotyczność oczekiwana wg Nei (1978) / expected heterozygosity after Nei (1978), F – współczynnik zmienności fiksacji / fixation index, N – średnia liczba alleli / mean allele number, h Nei – heterozygotyczność wg Nei (Nei 1978) / Nei (1978) heterozygosity, uh – nieobciążony estymator heterozygotyczności / unbiased heterozygosity.**Tabela 6. Macierz korelacji rang Spearmana między klasami zdrowotności i parametrami opisującymi zmienność genetyczną**

Table 6. Correlation matrix Spearman rank between health classes and parameters describing genetic variability

Cechy Features	Cechy wzrostu Growth			Parametry zmienności genetycznej Parameters of genetic variability					
	DBH	H	H_k	n_a	n_e	I	H_o	H_E	F
Klasa zdrowotności Health class	-0,264	0,237	-0,210	-0,469	-0,285	-0,447	-0,011	-0,248	-0,280
DBH	-	-0,286	0,405	0,122	0,127	0,073	-0,103	-0,008	0,002
H	-0,286	-	0,565	0,124	0,187	0,149	0,387	0,334	0,207
H_k	0,405	0,565	-	0,204	0,282	0,168	0,217	0,282	0,231

DBH – pierśnica / diameter of breast height,

H – wysokość drzewa / height of the tree,

 H_k – wysokość osadzenia korony / crown height, n_a – obserwowana liczba alleli na locus / observed number of alleles per locus, n_e – oczekiwana liczba alleli na locus / expected number of alleles per locus, I – indeks Shannona wg Lewontin (1972) / Shannon index after Lewontin (1972), H_o – heterozygotyczność obserwowana wg Nei (1978) / observed heterozygosity after Nei (1978), H_E – heterozygotyczność oczekiwana wg Nei (1978) / expected heterozygosity after Nei (1978), F – współczynnik zróżnicowania genetycznego wg Nei (1987) / genetic diversity coefficient (Nei 1978).

do jednych z najprecyzyjniejszych narzędzi badawczych w genetyce drzew leśnych. Są one coraz powszechniej wykorzystywane do identyfikacji pojedynczych osobników, oszacowania zmienności genetycznej populacji i całych gatunków (Lewandowski, Burczyk 2002; Maghuly et al. 2006; Nowakowska 2006; Nowakowska 2011; Lewandowski 2013).

Średnia heterozygotyczność obserwowana we wszystkich drzewostanach wyniosła 0,487. Jest to wynik w znacznym stopniu niższy od otrzymanego w badaniach prowadzonych przez Nowakowską (2009), która dla świerka w Polsce otrzymała $H_o=0,729$, jednak był też znacznie wyższy niż w innych podobnych badaniach prowadzonych w Polsce przy użyciu różnych markerów molekularnych: $H_o=0,129$ (Lewandowski et al. 1997), $H_o=0,212$ (Modrzyński, Prus-Głowacki 1998), $H_o=0,163$ (Lewandowski, Burczyk 2002), $H_o=0,212$ (Prus-Głowacki, Modrzyński 2003), $H_o=0,120$ (Sabor et al. 2013), $H_o=0,237$ (Wojnicka-Półtorak et al. 2014), $H_o=0,147$ (Masternak, Polak-Berecka 2014), oraz w Europie: na Litwie przez Goncharenko i in. (1995) ($H_o=0,187$) oraz nieznacznie niższy niż w Austrii $H_o=0,495$ (Maghuly et al. 2006).

Otrzymany średni współczynnik zmienności genetycznej (F_{ST}) pomiędzy wszystkimi badanymi populacjami był bardzo niski $F_{ST}=0,028$. Świadczy to o występowaniu większej zmienności genetycznej wewnątrz badanych drzewostanów niż pomiędzy nimi, co potwierdza zasadę dotyczącą większości gatunków drzew leśnych, u których tylko mały procent zmienności występuje na poziomie międzypopulacyjnym, co jest wynikiem wyższego polimorfizmu, na który składają się DNA poszczególnych osobników budujących populacje (Hamrick et al. 1992; Nowakowska 2007). Badane populacje świerka charakteryzowało małe zróżnicowanie DNA jądrowego w stosunku do wyników badań z Polski i Europy. Lewandowski i in. (1997) dla świerczyn z Beskidów otrzymali zmienność genetyczną na poziomie 0,059, Modrzyński i Prus-Głowacki (1998) dla populacji z Polski $F_{ST}=0,063$, Nowakowska (2009) otrzymała najwyższy wynik $F_{ST}=0,088$, natomiast Maghuly i in. (2006) w Austrii zanotowali $F_{ST}=0,014$. Identyczny wynik współczynnika zmienności genetycznej, jak przedstawiony w tej pracy ($F_{ST} = 0,028$), odnotowali Lewandowski i Burczyk (2002) dla polskich populacji świerka, analizowanych na podstawie markerów izoenzymatycznych.

Rozpatrując dystans genetyczny pomiędzy badanymi populacjami, stwierdzono, że populacje BPN, Ustrzyki Dolne, Stuposiany i Lutowiska z pierwszej grupy dendrogramu otrzymanego na podstawie markerów SSR położone są bliżej wschodniej granicy Polski z Ukrainą, zaś populacje świerka z drugiej grupy dendrogramu (Nadl. Komańcza i Cisna) są położone bardziej na zachód w porównaniu do innych analizowanych populacji. Takie zgrupowanie populacji drzew leśnych o podobnym poziomie zmienności genetycznej na danym terenie jest bardzo rzadkie i wymagałoby dalszych badań.

Jako marker DNA mitochondrialnego użyto genu *nad1*, którego skuteczność została potwierdzona w wielu popu-

lacjach świerka badanych w Polsce (Nowakowska 2009; Nowakowska 2011; Lewandowski 2013). Markery DNA mitochondrialnego (STS) zastosowano m.in. u *Pinus sylvestris* i *Picea abies* (Sperisen et al. 2001; Nowakowska 2007). Mitochondrialne geny są często pomocne w badaniach dróg migracji polodowcowej fauny i flory (Gugerli et al. 2001; Naydenov et al. 2007; Pyhajarvi et al. 2008; Dering, Lewandowski 2009; Litkowiec et al. 2009).

Frekwencja występowania haplotypu „a” (56%) znacząco przeważa w 4 populacjach, co w większości potwierdza przynależność badanych drzewostanów z RDLP Krosno do hercyńsko-karpackiego ośrodka występowania, który charakteryzuje głównie występowanie haplotypów „a” i „a1” (Pfeiffer et al. 1997; Sperisen et al. 2001; Eriksson 2009; Nowakowska 2007). Na szczególną uwagę zasługuje drzewostan w Nadleśnictwie Cisna, w którym wysoki (aż 43%) udział miał haplotyp „c”, charakterystyczny dla północnego (nordyckiego) zasięgu świerka w Polsce. Fakt ten może świadczyć o dużym przemieszaniu się pul genowych drzew leśnych w przeszłości, głównie w wyniku prowadzonej gospodarki leśnej w ubiegłych stuleciach (Dering, Lewandowski 2009). Obecność haplotypu „c” w drzewostanie Cisna może również wynikać częściowo z sukcesji leśnej oraz krajowego programu zalesiania po stratach wojennych. W latach 20. XX w. trwała wzmożona eksploatacja drzewostanów karpackich w celu uzyskania budulca potrzebnego do odbudowy wsi i miast (Luboński 2006; Marszałek 2011; Orłowski 2012). Lasy Nadleśnictwa Cisna w latach 20. XIX w. stanowiły własność prywatną i nastawione były na intensywną produkcję drewna (Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych w Krośnie 2015). Po wycince drzewostanu zręb odnawiano sprowadzonymi sadzonkami świerka (Orłowski 2012). Dodatkowo, wyręb drzewostanów w wieku przedrębnym spowodował duże spustoszenie w zasobach lasów bieszczadzkich (Luboński 2006). Płądrowniczy sposób gospodarowania stał się podstawową przyczyną przemian w ich składzie gatunkowym, np. w miejsce jodły i buka wprowadzano świerka (Marszałek 2011).

Przedstawione relacje historyczno-gospodarcze potwierdzają rozważania o możliwości sprowadzania w przeszłości materiału sadzeniowego pochodzenia nordyckiego na tereny obecnego Nadleśnictwa Cisna. Pozostałe haplotypy, „b”, „d” i „d1” występują zarówno w południowym, jak i północnym, tzw. naturalnym zasięgu świerka w Polsce, i są odzwierciedleniem dwóch głównych nurtów migracji (zasięg borealny/nordycki i zasięg hercyńsko-karpacki) *Picea abies* w Europie.

Dla parametrów mierzalnych drzew (DBH, H i H_k) otrzymano dodatnie wartości korelacji między klasami zdrowotności a parametrami mierzalnymi drzew, co świadczy o tym, iż długość korony wzrasta proporcjonalnie do wzrostu wysokości drzewa lub wartości pierśnicy. Jest to wynikiem fizjologicznej budowy drzew. Potwierdzeniem tej zależności są badania przeprowadzone przez Kowalczyka i Kahana (2010), którzy dla sosny udowodnili występowanie silnych pozytywnych korelacji fenotypowych i genotypowych między pierśnicą, wysokością i przyrostem wysokości, przy czym prostocień strzały na

poziomie fenotypowym była negatywnie skorelowana z szerokością korony, a pozytywnie na poziomie genetycznym.

Badania Nowakowskiej i Oszako (2010) dotyczące porównania stopnia zmienności genetycznej ze stopniem uszkodzeń przez fitopatogeny w drzewostanach bukowych i dębowych wykazały, że drzewostany o lepszej zdrowotności charakteryzuje większy stopień zróżnicowania genetycznego. Odnosząc się do zestawienia wyników ze wszystkich populacji, w drugiej części macierzy otrzymano ujemne korelacje między stanem zdrowotnym a współczynnikami zróżnicowania genetycznego. Oznacza to, że im wyższa klasa zdrowotności (gorsza zdrowotność), tym wartości wspomnianych wskaźników są niższe (mniejsze zróżnicowanie genetyczne). Tym samym otrzymano potwierdzenie wyników osiągniętych przez Nowakowską i Oszako (2008, 2010), iż podatność drzew na różnego rodzaju choroby czy odporność na ataki owadzie ma uwarunkowanie genetyczne.

Jak stwierdzono na podstawie analizy markera mtDNA, badane świerki nie były wyłącznie lokalnego pochodzenia, lecz zostały sprowadzone jako sadzonki lub nasiona z terenów położonych w północnym zasięgu świerka. Cechy fenotypowe, które są brane pod uwagę w trakcie oceny materiału rozmnożeniowego, nie zawsze mogą pokrywać się z naturalnym zasięgiem pochodzenia gatunku na danym terenie. Wykorzystanie technik molekularnych stwarza możliwość uzyskania bardziej obiektywnych kryteriów selekcji i doboru materiału rodzicielskiego do nasadzeń (Zawadzka 2011).

5. Wnioski

1. Dobry stan zdrowotny świerczyn badanych na obszarze RDLP w Krośnie potwierdza wyniki wieloletnich badań monitoringowych prowadzonych w Polsce.

2. Podatność drzew na choroby i uszkodzenia jest uwarunkowana genetycznie. Potwierdzono występowanie dodatniej zależności między zróżnicowaniem genetycznym a stanem zdrowotnym drzew leśnych: im większa zmienność genetyczna, tym lepszy stan zdrowotny.

3. Zaobserwowany niski (2,8%) poziom zmienności międzypopulacyjnej badanych świerków w porównaniu z poziomem zmienności wewnątrzpopulacyjnej (97,2%) wpisuje się w ogólnie obserwowany trend zmienności genetycznej w populacjach drzew leśnych.

4. Wysoka frekwencja występowania haplotypu „a” mitochondrialnego locus *nad1* (56%) wskazuje na przynależność większości badanych drzewostanów świerkowych do zasięgu hercyńsko-karpackiego.

5. Struktura genetyczna świerków z Nadleśnictwa Cisna sugeruje odrębne, borealne pochodzenie drzewostanów, prawdopodobnie powstałych ze sprowadzanych nasion (lub sadzonek) świerka.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Podziękowania i źródła finansowania

Autorzy składają podziękowania dr hab. Małgorzacie Sułkowskiej, mgr. inż. Andrzejowi Sierpińskiemu i pracownikom nadleśnictw Lutowiska, Stuposiany, Cisna, Ustrzyki Dolne i Komańcza oraz Dyrekcji Bieszczadzkiego Parku Narodowego za pomoc w zbiorze materiału roślinnego w terenie, oraz Pani Jolancie Bieniek za pomoc w zbiorze materiału roślinnego i analizach laboratoryjnych.

Badania sfinansowano z grantu DGLP nr 500-413 „Charakterystyka genetyczna polskich populacji świerka z podzasięgu południowego (Hercyńsko-Karpackiego) na podstawie analiz DNA”.

Literatura

- Borecki T., Miścicki S., Nowakowska J., Wójcik R. 1995. Stan drzewostanów parków narodowych. PIOŚ, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- Boratyński A., Bugała W. 1998. Biologia świerka pospolitego. Opracowanie zbiorowe. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
- Dering M., Lewandowski A. 2009. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? *Forest Ecology and Management* 259(2): 229–235. DOI 10.1016/j.foreco.2009.10.018.
- Działuk A., Burczyk J. 2005. Intensywność przepływu genów u drzew leśnych. *Wiadomości Botaniczne* 49(3/4): 15–27.
- Eriksson G. 2009. *Picea abies*. Recent Genetic Research. Ed. SLU Uppsala, 197. ISBN 91-576-7190-7.
- Goncharenko G.G., Zadeika I.V., Birgelis J.J. 1995. Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia *Forest Ecology and Management* 72(1): 31–38. DOI 10.1016/0378-1127(94)03447-5.
- Gregorius H.R. 1991. Gene conservation and the preservation of adaptability, w: Species conservation: a population-biological approach. (red. A. Seitz, V. Loeschke). Birkhauser, Basel. 31–47. DOI 10.1007/978-3-0348-6426-8_3.
- Gugerli F., Sperisen Ch., Büchler U., Magni F., Geburek T., Jeandroz S., Senn J. 2001. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Molecular Ecology* 10: 1255–1263. DOI 10.1046/j.1365-294X.2001.01279.x.
- Hamrick J.L., Godt M.J., Sherman-Broyles S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95–124. DOI 10.1007/978-94-011-2815-5_7.
- Kowalczyk J., Kahan D. 2010. Wartość hodowlana wybranych rodów sosny zwyczajnej testowanych na powierzchni doświadczalnej w Gubinie. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary. <https://www.nfosigw.gov.pl/download/gfx/nfosigw/pl/.../858/23/1/2010-365.pdf>.
- Lewandowski A., Burczyk J., Chałupka W. 1997. Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66(2): 197–200. DOI 10.5586/asbp.1997.025.
- Lewandowski A., Burczyk J. 2002. Allozyme variation of *Picea abies* in Poland. *Scandinavian Journal of Forest Research* 17: 487–494. DOI 10.1080/02827580260417134.

- Lewandowski A. 2013. Markery mitochondrialnego DNA pomocne w ustaleniu pochodzenia świerka pospolitego w Polsce. *Postępy Techniki w Leśnictwie* 122: 13–16. ISSN 0562-1445.
- Lewontin R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381–398. DOI 10.1007/978-1-4684-9063-3_14.
- Litkowiec M., Dering M., Lewandowski A. 2009. Utility of two mitochondrial markers for identification of *Picea abies* refugia origin. *Dendrobiology* 61: 65–71.
- Luboński P. 2006. Bieszczady. Przewodnik. Oficyna Wydawnicza „Rewasz”, Pruszków.
- Maghuly F., Pinsker W., Praznik W., Fluch S. 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Forest Ecology and Management* 232: 266–271. DOI 10.1016/j.foreco.2005.10.025.
- Marszałek E. 2011. Gospodarka leśna w karpackiej części Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Krośnie i jej wpływ na ochronę przyrody. *Roczniki Bieszczadzkie* (19): 59–75.
- Masternak K., Polak-Berecka M. 2014. Polimorfizm izoenzymów świerka pospolitego rasy istebniańskiej, tarnawskiej oraz wybranych pochodzeń doświadczenia IPTNS-IUFRO 1964/68 w Krynicy. *Sylwan* 7: 158.
- Matras J. 2006. Ochrona leśnych zasobów genowych, w: Elementy genetyki i hodowli selekcyjnej drzew leśnych (red. J. Sabor). Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa. 573–577.
- Matras J. 2013. Ochrona różnorodności genetycznej drzew leśnych. *Polish Journal of Argonomy* 14: 22–36.
- Modrzyński J., Prus-Głowacki W. 1998. Isoenzymatic variability in some of the Polish populations of Norway spruce (*Picea abies*) in the IUFRO-1972 provenance trial. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67(1): 75–82. DOI 10.5586/asbp.1998.010.
- Müller-Starck G., Baradat Ph., Bergmann F. 1992. Genetic variation within European tree species. *New Forests* 6: 23–47. DOI 10.1007/BF00120638.
- Naydenov K., Senneville S., Beaulieu J., Tremblay F., Bousquet J. 2007. Glacial variance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for a complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and Asia Minor. *BMC Evolutionary Biology* 7: 233.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nowakowska J.A. 2006. Zastosowanie markerów DNA (RAPD, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie. *Leśne Prace Badawcze* 1: 73–101.
- Nowakowska J.A. 2007. Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz polimorfizmu DNA. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*. Rozprawy i monografie. Sękocin Stary, 118. ISBN 978-83-878647-70-4.
- Nowakowska J.A. 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of *Picea abies* populations in Poland. *Dendrobiology* 61: 119–129.
- Nowakowska J.A. 2011. Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service. *Folia Forestalia Polonica*, series A, 53(2): 142–149.
- Nowakowska J.A., Konecka A. 2013. DNA jako narzędzie w badaniach struktury genetycznej drzew leśnych. *Postępy Techniki w Leśnictwie* 122: 7–12.
- Nowakowska J.A., Michalska A., Zachara T. 2014. Zmiany w strukturze genetycznej naturalnego odnowienia dębu (*Quercus petraea* [Matt.] Lieb.) w odniesieniu do drzew matecznych. *Sylwan* 158(2): 83–89.
- Nowakowska J.A., Oszako T. 2008. Stan zdrowotny i zróżnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA. *Sylwan* 9: 11–20.
- Nowakowska J.A., Oszako T. 2010. Porównanie zdrowotności drzew leśnych ze stopniem zróżnicowania genetycznego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 554: 135–146.
- Orłowski E. 2012. Historia gospodarki leśnej w rejonie Komańczy, powstanie i działalność Nadleśnictwa Komańcza, w: Historia, kultura i tradycja w 500 letniej Komańczy. Wstęp do monografii. Komańcza.
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenA1Ex 6.501: genetic analysis in Excel. <http://biology-assets.anu.edu.au/GenA1Ex/Welcome.html>.
- Pfeiffer A., Olivieri A.M., Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Genome* 40: 411–419.
- Prus-Głowacki W., Modrzyński J. 2003. Zmienność izoenzymatyczna niektórych polskich populacji świerka (*Picea abies* (L.) Karst.) z doświadczenia proweniencyjnego IUFRO-1972. *Sylwan* 147(3): 3–10.
- Pyhajarvi T., Salmela M.J., Savolainen O. 2008. Colonization routes of *Pinus sylvestris* inferred from distribution of mitochondrial DNA variation. *Tree Genetics and Genomes* 4: 247–254.
- Plan urządzenia lasu dla Nadleśnictwa Cisna na lata 2016–2025. 2016. Biuro Urządzania Lasu i Geodezji Leśnej. Oddział w Przemysłu.
- Sabor J., Kempf M., Masternak K. 2013. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) provenances tested in IPTNS-IUFRO 1964/68 experiment in Krynica. *Folia Forestalia Polonica* 55(1): 10–17. DOI 10.2478/ffp-2013-0002.
- Scotti I, Paglia G, Magni F, Morgante M. 2002. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1035–1041. DOI 10.1007/s00122-001-0843-7.
- Sierota Z. 1998. Kryteria i metody oceny stanu zdrowotnego drzew i drzewostanów. *Prace Instytutu Badań Leśnictwa* 854.
- Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Geburek T., Vendramin G.G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology* 10(1): 257–263. DOI 10.1046/j.1365-294X.2001.01180.x.
- Szczepkowski A., Tarasiuk S. 2005. Stan zdrowotny zagrożonych zamieraniem drzewostanów bukowych w Polsce. *Acta Scientiarum Polonorum, Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria* 4(1): 71–85.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Wawrzoniak J., Małachowska J., Wójcik J., Liwińska A. 1996. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 1995 roku na podstawie badań monitoringowych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- Wawrzoniak J., Małachowska J., Wójcik J., Liwińska A., Lech P., Sierota Z., Załęski A. 1997. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 1996 roku na podstawie badań monitoringowych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- Wawrzoniak J., Małachowska J., Zajączkowski S., Wyrzykowski S., Solon J., Fałtynowicz W., Sierota Z., Załęski A., Kolk A., Lech P., Adamski L. 1999. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 1998 roku na podstawie badań monitoringowych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.

- Wawrzoniak J., Małachowska J., Dobrowolski M., Lech P., Kluziński L., Kolk A., Sierota Z., Wójcik J., Załęski A. 2001. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 2000 roku na podstawie badań monitoringowych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- Wawrzoniak J., Małachowska J., Fałtynowicz W., Janek M., Kluziński L., Kolk A., Lech P., Solon J., Wójcik J., Załęski A. 2004. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 2003 roku na podstawie badań monitoringowych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- Wawrzoniak J., Fałtynowicz W., Hildebrand R., Kantorowicz W., Kluziński L., Kowalska A., Lech P., Małachowska J., Pierzgałski E., Piwnicki J., Solon J., Stolarek A., Szczygieł R., Ślusarski S., Tyszka J., Wójcik J., Zajączkowski G. 2014. Stan uszkodzenia lasów w Polsce w 2013 roku na podstawie badań monitoringowych. Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa.
- Wojnicka-Półtorak A., Celiński K., Chudzińska E., Prus-Głowacki W., Korczyk A. F. 2014. Profil genetyczny najstarszych drzew *Picea abies* (L.) Karst. w Puszczy Białowieskiej. *Sylwan* 158(5): 370–376.
- Zajączkowski S. 1993. Ocena zdrowotnego i sanitarnego stanu lasów w praktyce urzędniowej. *Prace Instytutu Badań Leśnictwa*. Seria B, 18: 48–54.
- Zawadzka A. 2011. Identyfikacja gatunkowa modrzewia europejskiego (*Larix decidua* Mill.) i modrzewia japońskiego (*Larix kaempferi* Sarg.) na podstawie markerów genetycznych. Rozprawa doktorska. Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa.
- Zmarz A., Będkowski K., Miścicki S., Plutecki W. 2012. Ocena stanu zdrowotnego świerka na podstawie analizy zdjęć wielospektralnych wykonanych fotograficznymi aparatami cyfrowymi przenoszonymi przez bezzałogowy statek latający. *Archiwum Fotogrametrii, Kartografii i Teledetekcji* 23: 541–550.
- Zwoliński J. 2003. Ocena zagrożenia lasów świerkowych w Beskidzie Śląskim przez zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*. Seria A, 951(1): 53–68.
- Żółciak A., Oszako T., Sabor J. 2009. Evaluation of the health status of *Picea abies* provenances growing on the IUFRO 1964/68 experimental plots. *Dendrobiology* 61: Supplement 63–68.

Wkład autorów

J.G. – zbiór materiału w terenie, analizy laboratoryjne, opracowanie wyników, ocena zdrowotności, redakcja manuskryptu; J.A.N. – koncepcja pracy, wkład merytoryczny, opracowanie wyników, redakcja manuskryptu; M.B. – analizy laboratoryjne; A.T. – analizy genotypowania DNA; M.T. – analizy statystyczne; T.O. – koncepcja pracy, konsultacje fitopatologiczne, redakcja manuskryptu.