

AGATA KONECKA, ANNA TEREBA, JOLANTA BIENIEK, JUSTYNA A. NOWAKOWSKA

Porównanie zmienności genetycznej pokolenia matecznego i sztucznie wyhodowanego potomstwa sosny zwyczajnej na podstawie analiz DNA*

Comparison of the genetic variability of Scots pine trees and their progeny from nursery production based on DNA analyses

ABSTRACT

Konecka A., Tereba A., Bieniek J., Nowakowska J. A. 2018. Porównanie zmienności genetycznej pokolenia matecznego i sztucznie wyhodowanego potomstwa sosny zwyczajnej na podstawie analiz DNA. Sylwan 162 (1): 32-40.

The production of forest tree species in forest nurseries is performed via two main breeding systems: i) the traditional (conventional) way with the seedlings grown in soil, and ii) plants cultivated in the containers. The aim of the study was to assess the level of genetic variability in the populations of the mother stands and the progeny populations of Scots pine cultured with traditional way (in soil) and in containers in two nurseries in Olsztynek (N Poland) and Oleszyce (S Poland) forest districts. Four polymorphic microsatellite markers (SPAG 7.14, SPAC 11.6, SPAC 12.5 and SsrPt_ctg4363) were used to evaluate the genetic variability of the studied populations. The basic hypothesis assumed that higher gene pool characterizes the seedlings grown in the containers comparing to the seedlings grown in the ground. The results confirmed that. Seedlings from containerized breeding had larger gene pool and were more diverse than plants with conventional breeding, both in Olsztynek and Oleszyce. Our study revealed a significant human impact on shaping the pool of forest genetic resources of Polish forests at the early stage of nursery production and showed the need for a broader study on further stages of cultivation of forests.

KEY WORDS

genetic diversity, SSR markers, forest nursery production, *Pinus sylvestris* L.

ADDRESSES

Agata Konecka ^(1, 2) – e-mail: A.Konecka@wl.sggw.pl

Anna Tereba ⁽³⁾ – e-mail: A.Tereba@ibles.waw.pl

Jolanta Bieniek ⁽⁴⁾ – e-mail: J.Bieniek@ibles.waw.pl

Justyna A. Nowakowska ^(1, 5) – e-mail: j.nowakowska@uksw.edu.pl

⁽¹⁾ Laboratorium Biologii Molekularnej, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

⁽²⁾ Katedra Hodowli Lasu, SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

⁽³⁾ Zakład Ekologii Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

⁽⁴⁾ Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

⁽⁵⁾ Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego; ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa

*Badania sfinansowano z funduszy własnych na działalność statutową Instytutu Badawczego Leśnictwa, grant nr 240225 „Wpływ metod produkcji szkółkarskiej na kształtowanie się struktury genetycznej materiału sadzeniowego sosny zwyczajnej na podstawie analiz DNA”.

Wstęp

Określenie poziomu różnorodności genetycznej gatunków, które tworzą ekosystemy, może uzupełniać działania podjęte w celu zachowania stabilności gatunkowej, dając gwarancję trwałości lasu [Hampe, Petit 2005; Hosius i in. 2006]. Zróżnicowanie genetyczne populacji na ogół określa się na podstawie wielkości i zmienności puli genowej gatunku. Bogactwo puli genowej jest najczęściej określane za pomocą frekwencji różnych wariantów alleli poszczególnych genów zapisanych w łańcuchu DNA [Kremer, Reviron 2004; Neale, Ingvarsson 2008]. Lasy charakteryzują się długowiecznością, zajmują wielohektarowe powierzchnie i dlatego mają szczególny wpływ na zachowanie równowagi w przyrodzie. Ponieważ zmiany klimatyczne na całym świecie zachodzą w sposób ciągły oraz w dużej mierze są niekontrolowalne i nieodwracalne, zadaniem człowieka jest utrzymanie bogactwa genetycznego populacji drzew leśnych, aby miały możliwość przystosowania się przez przekształcenie struktury całych zbiorowisk [Zasady... 2012]. Stosowanie w hodowli lasu selekcji sztucznej – przez wybór osobników na poziomie nasion, sadzonek, a później w ramach czyszczeń, trzebieży i cięć rębnych – znacznie redukuje zmienność wewnątrzpopulacyjną. Sabor [2003] zauważa, że z tysiąca nasion sosny wyrasta około 200-250 siewek, z których do wieku rębnego pozostaje zaledwie 4-5 drzew.

Zubożona pula genetyczna prawdopodobnie czyni drzewostany sztucznego pochodzenia mniej odpornymi na niepożądane czynniki zewnętrzne w porównaniu do bardziej zróżnicowanych populacji naturalnych. W konsekwencji populacje takie mogą być mniej stabilne i bardziej narażone na zniszczenie ze strony czynników patogenicznych oraz szkodliwych zmian środowiska [Nowakowska, Konecka 2013; Pszczółkowska i in. 2017].

Celem pracy było określenie poziomu zmienności genetycznej, na poziomie DNA jądrowego, sadzonek sosny zwyczajnej i poznanie struktury genetycznej drzew pokolenia matecznego, z których zebrano nasiona do produkcji odnowienia sztucznego, w odniesieniu do puli genowej sadzonek wyprodukowanych w szkółkach leśnych dwoma sposobami: w szkółce gruntowej (z odkrytym systemem korzeniowym) i szkółce kontenerowej jako sadzonki z bryłką (zakryty system korzeniowy). Badania prowadzono w dwóch nadleśnictwach: Olsztynek i Oleszyce, przyjmując hipotezę, że sadzonki z produkcji kontenerowej są bardziej zróżnicowane genetycznie i cechują się bogatszą pulą genową niż sadzonki hodowane w tradycyjny sposób.

Materiał i metody

Badania prowadzono na materiale biologicznym sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z nadleśnictw Olsztynek (53°33' N, 20°22' E) oraz Oleszyce (50°06'-50°17' N, 22°56'-22°57' E). Nasiona z drzew matecznych z obu nadleśnictw wykorzystano do hodowli sadzonek w szkółce kontenerowej oraz gruntowej według schematu ogólnie stosowanego w szkółkach. Do badań zmienności genetycznej wykorzystano igły z wyhodowanych sadzonek.

Celem określenia zmienności genetycznej pokolenia matecznego pobrano z pniaków drzew matecznych materiał w postaci niewielkich próbek drewna z 34 drzew w Nadleśnictwie Olsztynek oraz z 21 drzew w Nadleśnictwie Oleszyce. W dalszej części pracy materiał badawczy określano jako populację z Olsztyńka oraz populację z Oleszyc.

Nasiona zostały wysiane na wiosnę w nadleśnictwach Olsztynek i Oleszyce. Część partii zebranych nasion została wysiana (siew rzędowy) w szkółce gruntowej i pielęgnowana przez cały okres wegetacyjny zgodnie z zasadami przyjętymi w danych jednostkach. Druga część partii zebranych nasion została wysiana do kontenerów i pielęgnowana w namiotach w warunkach kontrolowanych, zgodnie z praktyką prowadzoną w szkółkach [Szabla, Pabian 2003]. Do badań

pokolenia potomnego wybrano losowo po 150 sadzonek z produkcji kontenerowej i produkcji gruntowej, pobierając około 100 mg igieł z każdego osobnika na koniec sezonu wegetacyjnego, tj. we wrześniu i październiku 2012 roku. Częsteczki DNA izolowano z zebranego materiału roślinnego za pomocą komercyjnego zestawu NucleoSpin® Plant II według procedury producenta (MacheryNagel®, Niemcy). Analizę sekwencji mikrosatelitarnych przeprowadzono według procedury opracowanej w LBM IBL opartej na modyfikacji opisu Soranzo i in. [1998] przy zastosowaniu *loci* mikrosatelitarnych SPAG 7.14, SPAC 11.6 i SPAC 12.5 oraz według opisu Chagné i in. [2004] dla *locus* SsrPt_ctg4363. Markery te cechuje niski procent alleli null [Nowakowska 2016]. Wielkość otrzymanych w reakcji PCR fragmentów DNA analizowano w sekwenatorze kapilarnym CEQ™8000 (Beckman Coulter®, Fullerton, USA) według zaleceń producenta.

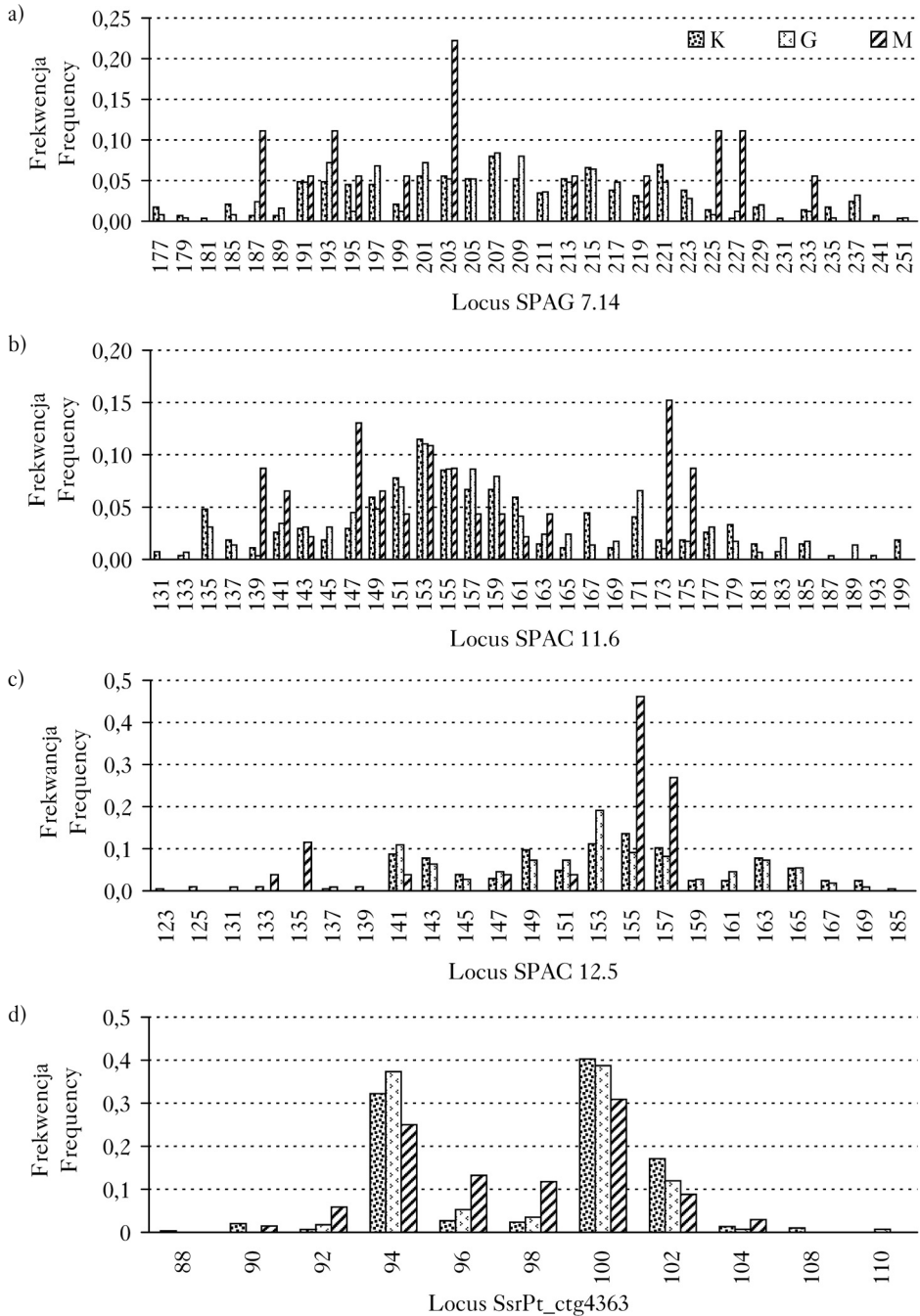
Zmienność genetyczną populacji matecznej i populacji potomnych określano za pomocą następujących wskaźników dla każdego *loci*: obserwowana liczba alleli na *locus* (N_a), oczekiwana liczba alleli na *locus* (N_e) według Hartla i Clarka [1989], heterozygotyczność obserwowana (H_o) i heterozygotyczność oczekiwana (H_e) według Nei'a [1987]. Poziom różnorodności genetycznej określono na podstawie heterozygotyczności (h) według Nei'a [1973]. Wartości współczynnika wsobności FIS [Hartl, Clark 1989] oraz zmienność genetyczną pomiędzy populacją mateczną i potomnymi wyliczono za pomocą współczynnika utrwalenia (fiksacji) F_{ST} według Wrighta [1921]. Podobieństwo genetyczne pomiędzy populacją mateczną i populacjami potomnymi określono za pomocą dystansu genetycznego DN [Nei 1978]. Powyższe parametry wyliczono w programie GenAEx 6.501 [Peakall, Smouse 2012] oraz GENEPOP 4.0.10 [Raymond, Rousset 1995], przyjmując istotne odchylenie od 0 dla $p < 0,05$.

Wyniki

Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę o różnicy na poziomie zmienności genetycznej materiału sadzeniowego produkowanego różnymi metodami. Populacje z Olsztyńka (ryc. 1) i Oleszyc (ryc. 2) cechowało podobne, małe zróżnicowanie genetyczne na poziomie mikrosatelitarnego DNA jądrowego. Najwięcej alleli (32) zaobserwowano w *locus* SPAG 7.14 w dwóch populacjach sadzonek z kontenerów w obu nadleśnictwach, Olsztynek (ryc. 1a) i Oleszyce (ryc. 2a), zaś najmniejszą liczbę – 7 alleli – odnotowano w *locus* SPAC 12.5 wśród drzew matecznych z Nadleśnictwa Olsztynek (ryc. 2c, tab.).

Rozpatrując zmienność i bogactwo genetyczne w ramach populacji potomnych rozłącznie względem pokolenia matecznego, stwierdzono, że sadzonki z hodowli kontenerowej mają większą pulę genową i są bardziej zróżnicowane od sadzonek z hodowli tradycyjnej – zarówno w populacji z Olsztyńka, jak i Oleszyc. Świadczą o tym największe wartości obserwowanej i oczekiwanej liczby alleli w *locus*, heterozygotyczności oczekiwanej i heterozygotyczności według Nei'a [1973] obliczonej dla populacji kontenerowej w obydwu nadleśnictwach (tab.).

Wzrost wartości heterozygotyczności według Nei'a populacji potomnej z hodowli kontenerowej w stosunku do drzew-matek wskazuje, że badana grupa sadzonek, zarówno w Olsztyńku, jak i w Oleszycach, była odpowiednio o 3,4 i 4,1% bogatsza o nowe genotypy w stosunku do puli matecznej, natomiast sadzonki hodowane w tradycyjny sposób cechowało mniejsze wzbogacenie puli – odpowiednio o 2,8 i 4%. Analiza współczynnika utrwalenia F_{ST} między populacjami z Nadleśnictwa Olsztynek wykazała, że zróżnicowanie genetyczne populacji potomnej z hodowli kontenerowej różniło się jedynie o 2,8% od pokolenia matecznego, a populacji potomnej z hodowli tradycyjnej – o 3,2%. W przypadku populacji z Nadleśnictwa Oleszyce zróżnicowanie genetyczne populacji potomnej z hodowli kontenerowej i populacji potomnej produkowanej tradycyjnie różniło się odpowiednio o 2,3 i 2,2% od pokolenia matecznego (tab.). Dla populacji

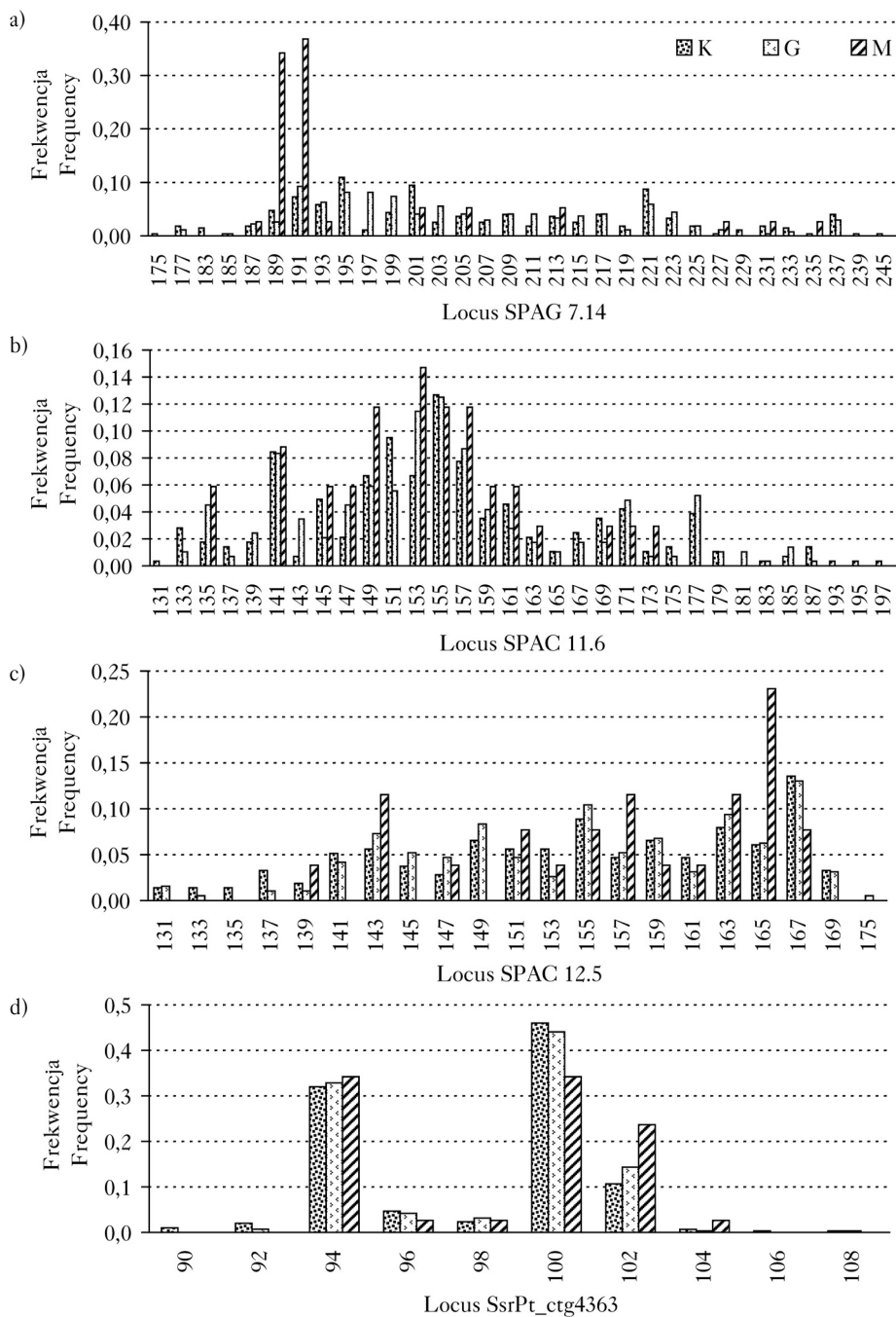


Ryc. 1.

Frekwencja występowania alleli w *loci* SPAG 7.14 (a), SPAC 11.6 (b), SPAC 12.5 (c) i SsrPt_ctg4363 (d) DNA mikrosatelitarnego w populacjach sosny zwyczajnej z Nadleśnictwa Olsztynek

Frequency of SPAG 7.14 (a), SPAC 11.6 (b), SPAC 12.5 (c) and SsrPt_ctg4363 (d) microsatellite DNA *loci* in Scots pine populations in the Olsztynek Forest District

K, G, M – oznaczenie jak w tabeli; K, G, M – denotes as in the table



Ryc. 2.

Frekwencja występowania alleli w loci SPAG 7.14 (a), SPAC 11.6 (b), SPAC 12.5 (c) i SsrPt_ctg4363 (d) DNA mikrosatelitarnego w populacjach sosny zwyczajnej z Nadleśnictwa Oleszyce

Frequency of SPAG 7.14 (a), SPAC 11.6 (b), SPAC 12.5 (c) and SsrPt_ctg4363 (d) microsatellite DNA loci in Scots pine populations in the Oleszyce Forest District

K, G, M – oznaczenie jak w tabeli; K, G, M – denotes as in the table

Tabela.

Obserwowana (N_a) i oczekiwana (N_e) liczba alleli, obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e) heterozygotyczność oraz heterozygotyczność według Nei'a (h_{Nei}) dla badanych populacji matecznej (M) oraz populacji potomnych ze szkółki kontenerowej (K) i gruntowej (G) z nadleśnictw Olsztynek i Oleszyce

Observed (N_a) and expected (N_e) number of alleles, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity as well as Nei heterozygosity (h_{Nei}) for maternity population (M) as well as container (K) and ground-nursery (G) progeny populations in Olsztynek and Oleszyce forest districts

		SPAG 7.14	SPAC 11.6	SPAC 12.5	SsrPt_ctg4363	Mean
Olsztynek						
N_a	M	11	14	7	8	10
	K	32	30	21	10	23
	G	29	29	17	8	21
N_e	M	9	11	3	5	7
	K	21	18	12	3	14
	G	19	18	11	3	13
H_o	M	0,444	0,913	0,615	0,529	0,626
	K	0,889	0,852	0,660	0,624	0,756
	G	0,856	0,800	0,891	0,648	0,799
H_e	M	0,883	0,908	0,695	0,798	0,821
	K	0,953	0,945	0,919	0,703	0,880
	G	0,947	0,943	0,908	0,692	0,872
h_{Nei}	M	0,935	0,929	0,723	0,810	0,849
	K	0,957	0,948	0,924	0,705	0,883
	G	0,951	0,946	0,916	0,694	0,877
Oleszyce						
N_a	M	10	14	12	6	11
	K	32	31	20	10	23
	G	26	28	21	8	21
N_e	M	4	11	8	3	7
	K	18	16	15	3	13
	G	18	15	14	3	13
H_o	M	0,421	0,941	0,692	0,789	0,711
	K	0,934	0,859	0,776	0,687	0,814
	G	0,726	0,840	0,917	0,657	0,785
H_e	M	0,735	0,908	0,882	0,708	0,808
	K	0,945	0,939	0,933	0,671	0,872
	G	0,946	0,935	0,928	0,675	0,871
h_{Nei}	M	0,755	0,936	0,917	0,727	0,834
	K	0,949	0,942	0,938	0,674	0,875
	G	0,949	0,938	0,933	0,677	0,874

drzew matecznych z nadleśnictw Olsztynek i Oleszyce zaobserwowano niedobór heterozygot ($FIS=0,272$ i $0,151$), ale nie były to wartości statystycznie istotne. Na podstawie dystansu genetycznego (DN) wyliczonego między poszczególnymi populacjami w Nadleśnictwie Olsztynek można stwierdzić, że pokolenie potomne z hodowli gruntowej dzieli większy dystans ($DN=0,441$) od pokolenia matecznego niż dystans, który dzieli pokolenie z hodowli kontenerowej ($DN=0,375$). W Nadleśnictwie Oleszyce zależność ta jest odwrotna i większy dystans zaobserwowano między sadzonkami z produkcji kontenerowej niż materiału sadzeniowego ze szkółki tradycyjnej w stosunku do pokolenia matecznego (DN odpowiednio $0,274$ i $0,254$). Oznacza to, że pokolenia potomne z hodowli kontenerowej i gruntowej w obu lokalizacjach miały strukturę genetyczną

w średnim stopniu podobną do drzew pokolenia matecznego (populacje w Nadleśnictwie Olsztynek odpowiednio 68,8 i 64,3%; populacje w Nadleśnictwie Oleszyce odpowiednio 76 i 77,5%). Wyliczony wskaźnik podobieństwa genetycznego wykazuje na podobieństwo między populacjami potomnymi na poziomie 97%, na podstawie markerów nSSR, w populacjach z Olsztyńka i Oleszyc.

Dyskusja

Większość odnowień w lasach polskich jest wprowadzana w sposób sztuczny przez sadzenie wcześniej wyhodowanego materiału sadzeniowego w szkółkach leśnych. Osiągnięcie sukcesu hodowlanego w gospodarce leśnej zależy od poziomu wiedzy o wartości genetycznej drzewostanów matecznych i ich potomstwa. Dzięki badaniom polimorfizmu DNA istnieje możliwość dokładnego poznania niezbadanych i dynamicznych praw procesów wymiany genów między pokoleniem drzew matecznych oraz ich potomstwem [Wojnicka-Półtorak i in. 2014; Nowakowska 2016; Hebda i in. 2017]. Bogata pula genowa sadzonek wyhodowanych w szkółkach powinna być gwarancją trwałego i zróżnicowanego rozwoju ekosystemów leśnych [Kawecki, Ebert 2004; Wójkiewicz i in. 2016]. Zaleca się, aby do zakładania upraw leśnych stosować możliwie najwięcej sadzonek z pochodzących z naturalnego odnowienia, co obniży koszty produkcji materiału sadzeniowego i zagwarantuje zachowanie regionalnej puli genetycznej. Z drugiej strony ograniczenie naturalnego odnawiania lasu powoduje konieczność stosowania w polskich lasach odnawiania sztucznego. Ważne jest, aby cele produkcyjne były łączone z celami ekologicznymi, zwłaszcza w aspekcie zachowania różnorodności biologicznej na poziomie ekosystemów, gatunków i puli genowej poszczególnych populacji.

Przedstawione analizy zróżnicowania puli genowej potomstwa ze szkółek hodowanego różnymi metodami zostały przeprowadzone po raz pierwszy w Polsce. Otrzymane wartości współczynnika utrwalenia (populacja Olsztynek $F_{ST}=0,027$; populacja Oleszyce $F_{ST}=0,020$) potwierdzają bardzo niski charakter zmienności genetycznej występujący w populacjach wielu gatunków drzew leśnych [Hamrick i in. 1992; Petit, Hampe 2006]. Według skali ustanowionej przez Wrighta [1978] współczynnik F_{ST} zawierający się w przedziale 0-0,05 wskazuje na bardzo małe różnice genetyczne między badanymi populacjami.

W przeszłości koncentrowano się głównie na dopracowaniu metody produkcji sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym, która odznacza się wysoką jakością materiału sadzeniowego oraz wysoką udatnością upraw dzięki zmniejszeniu szoku adaptacyjnego i zwiększonej vitalności sadzonek. W dotychczasowych analizach dotyczących charakterystyki stosowanych metod produkcji szkółkarskiej skupiano uwagę głównie na takich aspektach jak koszt produkcji szkółkarskiej oraz sadzenia i poprawek, wielkość i długość produkcji, udatność nasadzeń, liczba sadzonek na hektar uprawy, wymagany okres pielęgnacji upraw oraz zdrowotność i adaptacja sadzonek [Sobczak 1992; Szabla 2009]. Badania nad materiałem sadzeniowym nie obejmowały jednak różnorodności genetycznej na poziomie DNA. Leśnicy zakładali, że większa udatność upraw wynika z dużego zróżnicowania genetycznego potomstwa [Szabla, Pabian 2003].

Zapewnienie kiełkującym nasionom optymalnych warunków termicznych i wilgotnościowych, a sadzonkom odpowiednich warunków wilgotnościowo-nawożeniowych powoduje, że prawie każde wysiane w systemie kontenerowym nasiono przekształca się w sadzonkę i będzie tworzyć nowe pokolenie drzew leśnych. Z kolei w populacji sadzonek hodowanych na polach siewnych szkółek gruntowych, gdzie panują zmienne warunki pogody, można założyć znaczny wpływ selekcji naturalnej. Czynniki ludzki ma o wiele mniejszy wpływ na kształtowanie się następnego pokolenia niż przy produkcji kontenerowej. Najprawdopodobniej zaobserwowany spadek bogactwa puli genowej sosny w szkółce gruntowej jest wynikiem procesu adaptacji sadzonek do panujących warunków siedliskowych oraz konkurencji między korzeniami i pędami sąsiadujących

sadzonek. W takich przypadkach zachowanie tylko wybranych kombinacji genów (osobników) pozwala na utrzymanie korzystnych cech hodowlanych i adaptacyjnych materiału rozmnożeniowego.

Poznanie zmienności genetycznej DNA na poziomie drzew matecznych i materiału rozmnożeniowego może być wysoce przydatne w opracowaniu długoterminowej strategii trwałego i zrównoważonego zagospodarowania lasu w przyszłości. Warto zauważyć, że „bogatsze” genetycznie sadzonki kontenerowe będą w przyszłości poddane procesom selekcji adaptacyjnej po wysadzeniu na uprawy leśne. Dlatego konieczne jest kontynuowanie badań dotyczących wpływu sposobów zagospodarowania lasu na poziom i zmianę zasobności genetycznej populacji drzew leśnych w różnych fazach rozwojowych drzewostanów.

Wnioski

- ✦ Przeprowadzone po raz pierwszy w Polsce i na świecie szczegółowe analizy DNA jądrowego sadzonek sosny zwyczajnej ze szkółek leśnych wykazały pozytywny wpływ stosowanych metod produkcji materiału sadzeniowego na zwiększenie zróżnicowania puli genowej pokolenia potomnego względem pokolenia matecznego.
- ✦ Populacje potomne – sadzonki kontenerowe oraz gruntowe – wiernie odzwierciedlają i zachowują poziom zmienności genetycznej drzew-matek.
- ✦ Zaobserwowane różnice w strukturze puli genowej między populacjami potomnymi wynikają z częstości występowania alleli, najprawdopodobniej spowodowanej przez naturalną selekcję zachodzącą podczas adaptacji do zmiennych warunków wzrostu i dużą konkurencją osobniczą w szkółkach gruntowych oraz brak tych czynników w kontrolowanych warunkach produkcji kontenerowej.

Podziękowania

Autorzy dziękują pracownikom szkółki Nadleśnictwa Olsztynek (RDLP Olsztyn) i Nadleśnictwa Oleszyce (RDLP Krosno) za pomoc w pozyskaniu materiału roślinnego do badań.

Literatura

- 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. *Theor. Appl. Gen.* 109: 1204-1214.
- Hampe A., Petit R. J. 2005. Perspectives conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters* 8: 461-467.
- Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in wood plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hartl D. L., Clark A. G. 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Hebda A., Skrzyszewski J., Wachowiak W. 2017. Zróżnicowanie fenotypowe i zmienność tła genetycznego polskich proveniencji sosny zwyczajnej. *Sylwan* 161 (4): 277-286.
- Hosius B., Leinemann L., Konnert M., Bergmann F. 2006. Genetic aspects of forestry in the central Europe. *European Journal of Forest Research* 125: 407-417.
- Kawecki T. J., Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7 (12): 1225-1241.
- Kremer A., Reviron M. P. 2004. Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems. *Forest Ecology and Management* 197: 1-2.
- Neale D. B., Ingvarsson P. K. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. *Plant Biology* 11 (2): 149-155.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 70: 3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
- 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.
- Nowakowska J. A., Konecka A. 2013. DNA jako narzędzie w badaniach struktury genetycznej drzew leśnych. W: Zastosowanie metod analiz DNA we współczesnym leśnictwie. Postępy Techniki w Leśnictwie 122: 7-12.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics 28 (19): 2537-2539.
- Petit R. J., Hampe A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 37: 187-214.
- Pszczołkowska A., Okorski A., Jastrzębski J. P., Pauksztó Ł., Gorzkowska A., Chreska A., Makowczenko K. 2017. First report of *Fagus sylvatica* leafspot infection by *Colletotrichum fioriniae* in forest nurseries in Northeastern Poland. Plant Disease. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0471-PDN>
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.
- Sabor J. 2003. Wpływ stosowanych zabiegów pielęgnacyjnych i rębni na zmianę struktury genetycznej drzewostanów. Sylwan 147 (2): 39-48.
- Sobczak R. 1992. Szkółkarstwo leśne. Oficyna Edytorska „Wydawnictwo Świat”, Warszawa.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. Molecular Ecology 7: 1260-1261.
- Szabla K. 2009. Hodowlane i ekonomiczne aspekty produkcji materiału sadzeniowego z zakrytym systemem korzeniowym poddanego zabiegowi sterowanej mikoryzacji. Sylwan 153 (4): 253-259.
- Szabla K., Pabian R. 2003. Szkółkarstwo kontenerowe. Nowe technologie i techniki w szkółkarstwie leśnym. CILP, 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.
- Wójkiewicz B., Cavers S., Wachowiak W. 2016. Current approaches and perspectives in population genetics of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Forest Science 62 (3): 343-354.
- Wright S. 1921. Systems of mating. Genetics 6: 111-178.
- Wright S. 1978. Variability within and among natural populations. W: Evolution and the genetics of populations. University of Chicago Press. Chicago. USA.
- Zasady hodowli lasu. 2012. CILP, Warszawa.