

Justyna NOWAKOWSKA*, Krzysztof RAKOWSKI*

CHARAKTERYSTYKA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ SOSNY NAPIWODZKO-RAMUCKIEJ I SPALSKIEJ NA PODSTAWIE ANALIZ MITOCHONDRIALNEGO DNA

GENETICAL VARIATION OF POLISH NAPIWODZKO-RAMUCKA
AND SPALSKA SCOTS PINE PROVENANCES DETERMINED
BY MITOCHONDRIAL DNA ANALYSES

Abstract. *One specific pair of STS primers amplifying the B/C intron of mitochondrial nad1 gene was used to determine the genetic diversity level in fourteen different stands of Scots pine in Poland. The studied stands were situated in seed region of napiwodzko-ramucka Scots pine provenance (n° 205) and in seed region of spalska Scots pine provenance (n° 601). For each region, the genetic diversity level and the genetic phylogeny were examined in order to check the exactness of the border lines previously defined for 205 and 601 seed region. In both regions, 205 and 601, four different alleles were detected, i.e. haplotypes „a”, „b”, „c” and „d” with different frequencies across stands. The most frequent haplotype „c” (mean frequency of 0.481) was uniformly distributed among stands. Haplotypes „a” and „d” were present with mean frequencies 0.392 and 0.144 respectively. The presence of the rare haplotype „b” (mean frequency of 0.017) was mainly observed in spalska pine region (601). Our results confirm the current rules of transfer of the forest reproductive material from the regions 106, 205 and 401 to the region 451 and from the stands of the region 601 to the stands of the region 651. Few changes in current directives may be proposed concerning some stands in the seed regions 106, 205, 251, 401, 453, 601, 603 and 604. A relatively high degree of differentiation (overall G_{ST} about 62.5%) characterized all studied pines suggesting large gene flow among the studied stands. Our founding may be useful for the further verification of Scots pine reproductive material transfer rules in Poland.*

Key words: *conifers, genetic diversity, mitochondrial makers, Pinus sylvestris L., Scots pine, STS, within and among population-variability.*

* Instytut Badawczy Leśnictwa w Warszawie, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Las, 05-090 Raszyn, e-mail: J.Nowakowska@ibles.waw.pl

1. WSTĘP

Współczesna genetyka drzew leśnych zajmuje się poznaniem struktury genetycznej populacji, bada filogenezę oraz przepływ genów między populacjami (Neale i in. 1992, Chałupka 2003, Kremer i Reviron 2004).

Swobodny w obrębie populacji przepływ genów między osobnikami gatunków wiatropylnych, do których należą drzewa leśne, przyczynia się do tworzenia lokalnych pul genowych, pozostających ze sobą w stałym kontakcie (Sabor 2003, Burczyk i in. 2004). W zależności od lokalizacji drzew danego gatunku w drzewostanie, mogą one tworzyć populacje centralne lub brzeżne, o niejednorodnej strukturze genetycznej i zróżnicowanym poziomie przepływu genów z jednej populacji do drugiej (Hamrick i in. 1992, Smouse i Sork 2004). Populacje brzeżne, zlokalizowane wokół populacji centralnych, mogą również wpływać na swobodne mieszanie się genów. W ocenie struktury genetycznej populacji na ogół przyjmuje się model kojarzenia losowego, w którym każde drzewo ma jednakowe prawdopodobieństwo udziału w procesie kojarzenia (Hamrick i in. 1992, Sabor 2003). Działalność człowieka spowodowała w ostatnich stuleciach znaczną redukcję i fragmentację powierzchni leśnych, co w dużej mierze wpłynęło na ograniczenie przepływu genów i zawężenie puli genowej wielu populacji drzew leśnych.

W Polsce w 2000 r. wyznaczono granice regionów pochodzenia podstawowego materiału rozmnożeniowego dla dziesięciu głównych gatunków drzew leśnych. Obowiązujące w naszym kraju zasady leśnej regionalizacji nasiennej zostały ustalone na podstawie danych o zróżnicowaniu ekologicznym i genetycznym gatunków oraz zróżnicowaniu klimatycznym, geomorfologicznym i przyrodniczym Polski (Matras 1996, Kondracki 1998, Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r.). W rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r., wydanym na podstawie ustawy o leśnym materiale rozmnożeniowym z dnia 7 czerwca 2001 r., regiony pochodne zostały przekształcone w regiony pochodzenia leśnego materiału podstawowego. Granice istniejących mikroregionów nasiennych zmodyfikowano, dopasowując je do aktualnych granic podziału administracyjnego kraju. Korekta ta tylko w niewielkim stopniu wpłynęła na zmianę liczby regionów i ich położenie geograficzne.

Pierwotnie granice regionów pochodzeń tworzone na podstawie fenotypowych cech drzewostanów, toteż konieczne było zweryfikowanie granic istniejącej regionalizacji nasiennej w oparciu o analizy genetyczne na podstawie markerów DNA. W Polsce nie przeprowadzono dotychczas badań weryfikujących unikatowość zasobów genetycznych w wyznaczonych w powyższy sposób regionach nasiennych. Istnieje duże prawdopodobieństwo, zwłaszcza u gatunków, które podlegały w ostatnich stuleciach sztucznemu odnowieniu, że wyznaczone dotychczasowymi metodami regiony pochodzenia nie są genetycznie jednorodne. Ustalenie granic występowania populacji wyłącznie na podstawie cech fenotypowych może być obarczone dużym błędem, przede wszystkim dlatego, że ocena cech hodow-

lanych, szczególnie jakościowych, jest subiektywna, gdyż w większości cechy te podlegają wpływowi środowiska (Giertych 1993, Chałupka 2003).

Sosna zwyczajna jest jednym z gatunków o największym zasięgu naturalnym w Azji i Europie. Svoboda (1953) wyróżnił 29 klimatotypów sosny (12 północnych i 17 górskich) w ramach jej naturalnego zasięgu występowania na podstawie danych o zróżnicowaniu morfologicznym i fizjologicznym. Polskie pochodzenia sosny dzielą się dodatkowo m.in. na rasę ryską (północno-wschodnia Polska), rasę borussica (pozostała część Polski) oraz rasę polonica. Wright i Bull (1963) na podstawie badań siewek wyróżnili 14 ras (A–N) dla części zasięgu europejskiego i Skandynawii. Według tego podziału sosna w naszym kraju należy częściowo do grupy F (północno-wschodnia Polska) i grupy G.

W ostatnich latach badanie struktury genetycznej oraz filogenezy (czyli pochodzenia genetycznego) populacji drzew leśnych przeprowadzane jest technikami wykorzystującymi markery molekularne, m.in. izoenzymy i sekwencje DNA. Markery genetyczne DNA są wybranymi fragmentami genomu, które różnicują osobniki lub grupy osobników między sobą, określając tzw. genotyp. Obecnie istnieje szereg metod umożliwiających analizę zmienności DNA, np.: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), STS (Sequence Tagged Sites) oraz analiza DNA mikrosatelitarne. Jak dotąd, metody te stosowano z powodzeniem przy badaniu zmienności genetycznej wielu gatunków drzewiastych, np. dębu (Moreau i in. 1994, Barreneche i in. 1998, Mariette i in. 2001, Coart i in. 2002, Kremer i in. 2002, Petit i in. 2002, Dodd i Kashani 2003, Ainsworth i in. 2003), buka (Troggio i in. 1996, Tomaru i in. 1998, Sander i in. 2000), jesionu (Jeandroz i in. 1996, Heuetz 2003, Nowakowska i in. 2004), jarząbu (Oddou-Muratorio i in. 2001), topoli (Bradshaw i in. 1994, Rajora i Rahman 2003), wiązu (Coleman 2000), brzozy (Palmé i in. 2003), świerka (Paglia i in. 1998, Perry i Bousquet 1998, Perry i Bousquet 2001, Colignon i in. 2002, Jeandroz i in. 2002, Burczyk i in. 2004), jodły (Leibenguth i Shoghi 1998) i sosny (DeVerno i Mosseler 1997, Hick i in. 1998, Soranzo i in. 1998, Soranzo i in. 2000, Ribeiro i in. 2002, Nowakowska 2003, 2004).

Przepływ genów w populacjach drzew jest badany głównie na podstawie markerów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA. U drzew iglastych chloroplasty przekazywane są potomstwu przez pyłek drzewa ojcowskiego, mitochondria zaś przez drzewo mateczne (Newton i in. 1999, Hamrick 2004). W niniejszym opracowaniu przedstawiono analizę markerów miejsc znaczonej sekwencyjnie – STS (sequence-tagged-site) dla mitochondrialnej sekwencji genu NADH dehydrogenazy (*nad1*) (Mitton i in. 2000).

W celu weryfikacji granic wyznaczonych regionów pochodzeń, w badaniach uwzględniono dwa regiony modelowe: region sosny napiwodzko-ramuckiej (205), zlokalizowany w północnej Polsce na terenie RDLP Olsztyn, oraz region sosny spalskiej (601), położony w centralnej Polsce na terenie RDLP Łódź (Załęski i in. 2000). Oba regiony sosny stanowią odrębne bazy nasienne i objęte są regulami

transferu materiału rozmnożeniowego do innych regionów w Polsce (Matras 1996, Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r.).

Celem pracy* była ocena poprawności wyznaczenia granic regionów wybranych pochodzeń sosny zwyczajnej na podstawie informacji o strukturze genetycznej na poziomie DNA mitochondrialnego oraz filogenetycznego pokrewieństwa badanych pochodzeń.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. Materiał roślinny

Do analiz zmienności genetycznej zebrano młode igły z 3 drzewostanów zlokalizowanych w obrębie regionów pochodzenia 205 i 601 oraz z 4 drzewostanów położonych na zewnątrz tych regionów (tab. 1). Spośród trzech drzewostanów położonych w regionie pochodzenia sosny napiwodzko-ramuckiej (205) wytypowano drzewostan z centrum regionu (Jedwabno) oraz dwa drzewostany położone na jego obrzeżach (Nowe Ramuki i Wielbark). Cztery drzewostany weryfi-

Tabela 1. Charakterystyka badanych drzewostanów sosny zwyczajnej

Table 1. Description of studied Scots pine stands

Nadleśnictwo Forest District	Położenie geograficzne Latitude/Longitude	Region pochodzenia* Seed region*	Ilość drzew Number of sampled trees	Średni wiek (lata) Mean age (years)
Jedwabno	21° 42' N / 53° 32' E	205	50	115
Nowe Ramuki	20° 31' N / 53° 34' E	205	50	105
Wielbark	21° 56' N / 53° 32' E	205	50	109
Kudypy	20° 15' N / 53° 44' E	106	50	105
Wipsowo	20° 47' N / 53° 42' E	251	50	96
Myszyniec	21° 13' N / 53° 20' E	401	50	95
Nidzica	20° 28' N / 53° 15' E	451	50	96
Przedbórz	19° 57' N / 51° 09' E	601	50	92
Smardzewice	19° 55' N / 51° 09' E	601	50	92
Spała	20° 08' N / 51° 36' E	601	50	100
Brzeziny	19° 51' N / 51° 45' E	453	50	101
Włoszczowa	19° 51' N / 50° 54' E	603	50	91
Barycz	20° 25' N / 51° 11' E	604	50	105
Bełchatów	19° 21' N / 51° 28' E	651	50	96

* wg Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r. (Dz. U. 04, nr 67, poz. 621)

* according to the Directive of the Ministry of Environment (9th of March 2004, Dz. U. 04, no 67, item 621)

*Badania sfinansowano ze środków Narodowego Funduszu Środowiska i Gospodarki Wodnej (Grant 12-U-31).

kujące zasadność wyznaczenia granic regionu 205 były zlokalizowane poza jego granicami (Wipsowo – region 251, Myszyniec – 401, Nidzica – 451 i Kudypy – 106).

W regionie pochodzenia sosny spalskiej (601) wybrano jeden drzewostan położony centralnie (Smardzewice) oraz dwa drzewostany położone na obrzeżach (Spała i Przedbórz). Populacjami weryfikującymi zasadność granic regionu 601 były Brzeziny (region 453), Barycz (604), Włoszczowa (658) i Bełchatów (651).

Wyboru drzewostanów dokonano na podstawie Leśnej Regionalizacji Nasiennej (Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r.), kierując się takimi kryteriami, jak rodzimność drzewostanów, optymalna lokalizacja siedliskowa dla sosny (BMśw) oraz dobry stan zdrowotny (bez widocznych objawów uszkodzeń). Do analiz wybierano drzewostany z dużym udziałem sosny (60–100%), w pierwszej kolejności wyłączone drzewostany nasienne lub gospodarcze drzewostany nasienne, w wieku od 80 do 120 lat.

2.2. Metody

Całkowite DNA ekstrahowano z igieł za pomocą zestawów do izolacji DNA (DNeasy 250 Plant Mini Kit, QIAGEN). Wydajność ekstrakcji badano za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, a otrzymane wyniki analizowano za pomocą programu Gel DocTM 2000 (BioRad).

W dalszym etapie badań przeprowadzono analizy zmienności genetycznej na podstawie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) przy zastosowaniu techniki miejsc znaczonych sekwencyjnie (STS). W analizach STS, przy użyciu specyficznych starterów Hf i Ir, amplifikowano polimorficzny region DNA o długości ok. 254 par zasad (pz) intronu B/C genu NADH dehydrogenazy (*nad1*).

Uwzględniając zawartość DNA genomowego, oszacowaną dla każdego drzewa, przygotowano każdorazowo 25 µl następującej mieszaniny reakcyjnej (QIAGEN PCR Master Kit) dla każdego badanego osobnika (w nawiasach podano stężenia końcowe): DNA genomowe (30 ng), bufor reakcyjny (pH=8,0), MgCl₂ (1,5 mM), roztwór Q, dNTPs (200 µM), startery Hf i Ir (1 µM) oraz Taq polimeraza (1 U).

Mieszaninę umieszczano w termocyklerze (Biometra), zaprogramowanym na 30 cykli amplifikacji DNA (Soranzo i in. 2000, zmodyfikowane). Każdy cykl amplifikacji obejmował 4 etapy (1 etap: temp. 95 °C przez 3 min.; 2 etap: 92 °C, 30 s; 3 etap: 55 °C, 30 s; 4 etap: 72 °C, 1 min; 5 etap 72 °C, 5 min). Powielone fragmenty DNA poddano elektroforezie w 1,8% żelu agarozowym i analizowano zmienność profilów migracyjnych za pomocą programu BIO-PROFIL Bio-Gene Windows Application V99.05.

W analizie DNA przekazywanego matecznie, otrzymane warianty fragmentów DNA mitochondrialnego określano terminem „haplotyp”, w przeciwieństwie do genotypu, czyli całkowitej informacji genetycznej zawartej w DNA jądrowym. Powielone sekwencje DNA mitochondrialnego oznaczano dalej na podstawie następującego kodu: fragmenty o długości 189-222 par zasad – haplotyp „a”; 223-229

pz – „c”; 230-236 pz – „d” i 237-250 pz – „b” (Soranzo i in. 2000, zmodyfikowane).

Zmienność wewnątrzpopulacyjną w danej populacji obliczano na podstawie częstości haplotypów oraz współczynnika zmienności genetycznej h Nei (1978), zaś pokrewieństwo genetyczne – wyrażane za pomocą dendrogramów – według metody analizy skupień średnich połączeń (UPGMA, Nei 1978), obliczanych w programie PopGene wersja 1.32.

3. WYNIKI

3.1. Izolacja DNA

Średnia zawartość cząsteczek genomowego DNA w każdej próbce dla badanych pochodzeń sosny wynosiła od 10 do 20 μg DNA/100 mg świeżej masy igieł dla pojedynczego drzewa. Dane te posłużyły do ustalenia składu buforu reakcyjnego tak, aby w amplifikacji brało udział 30 ng wyjściowej ilości DNA.

3.2. Analizy STS i frekwencje haplotypów

Powielone w reakcji PCR fragmenty STS prezentowały 4 różne haplotypy genu *nad1* sosny zwyczajnej (haplotyp „a”, „b”, „c” i „d”) wśród badanych drzewostanów sosnowych z RDLP Olsztyn i Łódź.

Haplotyp „a” występował we wszystkich badanych drzewostanach w obu regionach sosny napiwodzko-ramuckiej i spalskiej, ze szczególnie dużą frekwencją w populacji Wipsowo (77,5%, region 251) i Włoszczowa (91,8%, region 658) (tab. 2). Najmniejszy udział haplotypu „a” stwierdzono w drzewostanach: Barycz (12,0%, region 604) i Wielbark (18,4%, region 205). Haplotyp „a” występował w regionach pochodzenia sosny napiwodzko-ramuckiej oraz spalskiej z podobną częstością (odpowiednio 39,8 i 38,6%) (tab. 2).

Niską dwuprocentową frekwencję występowania odnotowano dla haplotypu „b” w populacjach: Wipsowo (region 251), Myszyniec (401), Spała (601), Smardzewice (601) i Barycz (604). Względnie dużą częstość występowania tego haplotypu stwierdzono w populacji Brzeziny (6,0%, region 453) i Bełchatów (8,2%, region 651) (tab. 2). Zaobserwowano, że pochodzenia sosny spalskiej mają większy udział haplotypu „b” (2,9%) niż pochodzenia sosny napiwodzko-ramuckiej (0,6%).

Haplotypy „c” i „d” występują we wszystkich badanych drzewostanach, jedynie w populacji Włoszczowa (658) nie występuje haplotyp „d” (tab. 2). Haplotyp „c” w regionie 205 występuje ze średnią częstością 48,1%. Największą częstość ma on w populacji Nidzica (66,0%), a najmniejszą w populacji Wipsowo (18,4%). Drzewostany z regionu 601 charakteryzuje mniejsza frekwencja haplotypu „c” (41,2%) niż drzewostany z regionu 205. Największy udział haplotypu „c” od-

Tabela 2. Frekwencje haplotypów genu *nad1* w badanych drzewostanach sosny zwyczajnej
 Table 2. Haplotype-frequencies of *nad1* gene in studied Scots pine stands

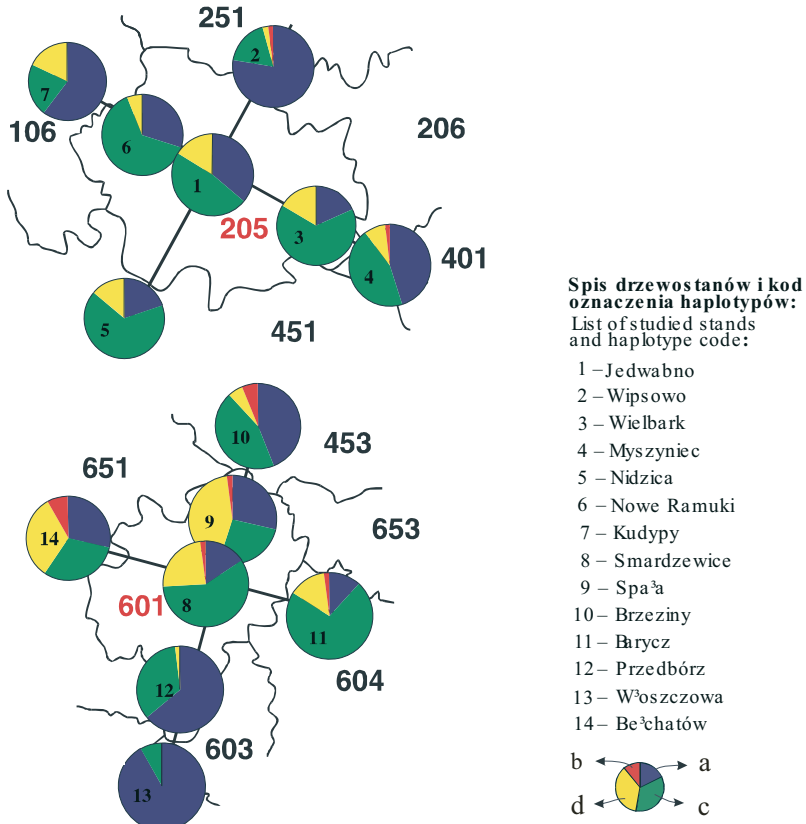
Region pochodzenia Seed region	Nadleśnictwo Forest District	Frekwencje haplotypów Haplotype-frequencies				h Nei
		a	b	c	d	
205	Jedwabno	0,360	–	0,480	0,160	0,614
205	Nowe Ramuki	0,300	–	0,640	0,060	0,497
205	Wielbark	0,184	–	0,653	0,163	0,513
106	Kudypy	0,520	–	0,300	0,180	0,607
251	Wipsowo	0,775	0,020	0,184	0,020	0,364
401	Myszyniec	0,449	0,020	0,449	0,082	0,590
451	Nidzica	0,200	–	0,660	0,140	0,505
Razem Total		0,398	0,006	0,481	0,115	$H_T = 0,597$
601	Przedbórz	0,640	–	0,340	0,020	0,474
601	Smardzewice	0,160	0,020	0,580	0,240	0,580
601	Spała	0,286	0,020	0,265	0,429	0,664
453	Brzeziny	0,440	0,060	0,440	0,060	0,606
603	Włoszczowa	0,918	–	0,082	–	0,348
604	Barycz	0,120	0,020	0,720	0,140	0,447
651	Bełchatów	0,286	0,082	0,306	0,326	0,711
Razem Total		0,386	0,029	0,412	0,173	$H_T = 0,650$
Razem Total		0,392	0,017	0,447	0,144	$G_{ST} = 0,626$

notowano w populacji Barycz (72,0%, region 604), zaś najmniejszy – w populacji Włoszczowa (8,2%, region 603) (tab. 2).

Pochodzenia sosny spalskiej mają większy udział haplotypu „d” (17,3%) niż pochodzenia sosny napiwodzko-ramuckiej (11,5%). Populacja Spała ma najwięcej haplotypu „d” (42,9%), a populacja Przedbórz – najmniej (2%) (tab. 2).

Na rycinie 1 przedstawiono geograficzne rozmieszczenie frekwencji otrzymanych haplotypów w badanych drzewostanach sosny zwyczajnej obu regionów. W regionie sosny napiwodzko-ramuckiej trzy drzewostany położone w obrębie regionu 205 oraz dwie populacje sosny z regionów obrzeżnych – Nidzica (451) i Kudypy (106) mają podobny rozkład występowania haplotypów („a”, „c” i „d”), z wyraźnym brakiem haplotypu „b” (ryc. 1). Jedynie dwie populacje obrzeżne: Wipsowo (251) i Myszyniec (401) różnią się od innych populacji tego regionu, gdyż charakteryzuje je występowanie haplotypu „b” i duży udział haplotypu „a” (ryc. 1).

Geograficzne rozmieszczenie haplotypów w pochodzeniach sosny spalskiej wskazuje na dużą frekwencję rzadkiego haplotypu „b” w populacjach obrzeżnych: Brzeziny (453) i Bełchatów (651), oraz nieco mniejszą frekwencję haplotypu „b” w populacji Barycz (604) i dwóch populacjach wewnątrz regionu 601: Smardzewice i Spała (ryc. 1). Pozostałe populacje brzeżne dla tego regionu, tj. Przedbórz (603) i Włoszczowa (658), cechuje brak występowania haplotypu „b”, a w przypadku populacji Włoszczowa również brak haplotypu „c”.



Ryc. 1. Frekwencje haplotypów „a”, „b”, „c” i „d” genu *nad1* w badanych drzewostanach sosny zwyczajnej

Fig. 1. The „a”, „b”, „c”, „d” haplotype-frequencies of *nad1* gene in Scots pine studied stands

3.3. Zróżnicowanie genetyczne badanych drzewostanów

Analiza współczynnika zmienności wewnątrzpopulacyjnej h (Nei, 1978) wykazała, że najwyższe zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne charakteryzuje populację Bełchatów ($h = 0,711$), a najniższe – populację Włoszczowa ($h = 0,348$). Obie te populacje należą do regionu sosny spalskiej, którego średnia całkowita zmienność wewnątrzpopulacyjna H_T wynosi 0,650 i jest większa od całkowitej średniej zmienności wewnątrzpopulacyjnej dla sosny napiwodzko-ramuckiej ($H_T = 0,597$). Spośród badanych drzewostanów sosny napiwodzko-ramuckiej, największą zmienność wewnątrzpopulacyjną odnotowano dla populacji Jedwabno ($h = 0,614$), a najmniejszą dla populacji Wipsowo ($h = 0,364$). Współczynnik relatywnego zróżnicowania genetycznego między wszystkimi populacjami jest wysoki i wynosi $G_{ST} = 0,626$ (tab. 2).

3.4. Charakterystyka filogenetyczna

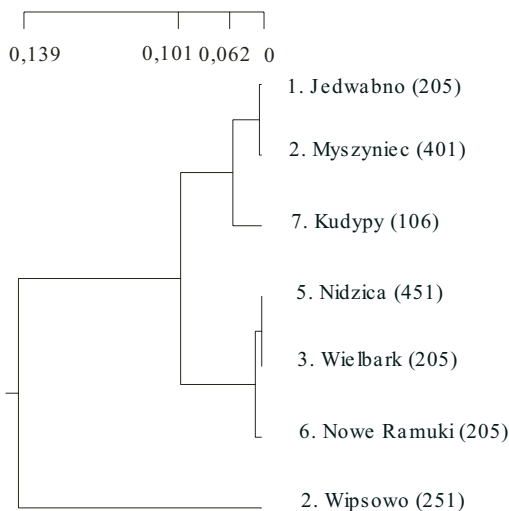
Na podstawie dystansu genetycznego D_N , obliczonego techniką UPGMA, skonstruowano dendrogramy dla drzewostanów z dwóch badanych regionów sosny: napiwodzko-ramuckiej i spalskiej (ryc. 2 i 3).

Wśród badanych drzewostanów z regionu 205 wyróżniono dwie grupy populacji spokrewnionych genetycznie. Do pierwszej grupy zaliczono Jedwabno, Myszyniec i Kudypy, a do drugiej – Nidzicę, Wielbark i Nowe Ramuki. Obie grupy dzieli dystans genetyczny $D_N = 0,101$. Drzewostan Wipsowo oddziela większy dystans genetyczny od pozostałych populacji z tego regionu ($D_N = 0,139$) (ryc. 2).

Na podstawie analizy dystansu genetycznego (Nei 1978) dla badanych drzewostanów z regionu 601 i okolic można stwierdzić, że populacje Barycz, Smardzewice, Bełchatów i Spała tworzą jedną grupę drzewostanów spokrewnionych genetycznie, podczas gdy Brzeziny, Przedbórz i Włoszczowa należą do innej grupy filogenetycznej (ryc. 2).

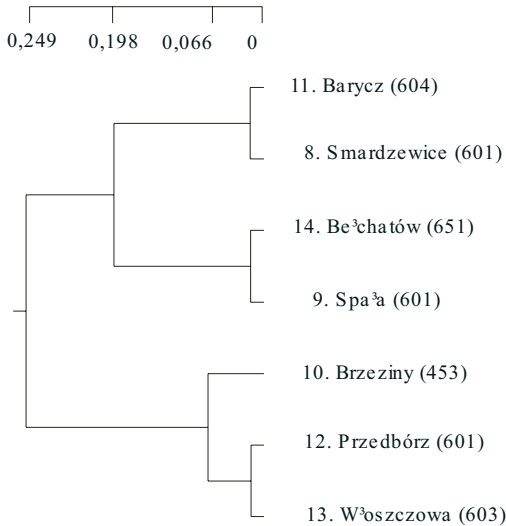
3.5. Korelacje zmienności genetycznej z czynnikami klimatycznymi

Biorąc pod uwagę geograficzne położenie badanych drzewostanów i panujące w nich warunki klimatyczne zgodnie z „Leśną regionalizacją nasienną dla nasion i sadzonek w Polsce” (Załęski i in. 2000), zbadano korelację między genotypem populacji a średnimi opadami rocznymi i średnim okresem wegetacyjnym. Dla badanych populacji w regionie 205 nie wykazano istotnej korelacji między współczynnikiem zmienności genetycznej h Nei a średnim okresem wegetacyjnym ($R^2 = 0,277$; $F = 1,922$; $p = 0,22$), średnimi opadami rocznymi ($R^2 = 0,018$; $F = 0,093$; $p = 0,77$) ani średnią wysokością nad poziomem morza ($R^2 = 0,025$; $F = 0,129$; $p = 0,73$). Ten ostatni parametr przedstawiono w zestawieniu ze współczynnikiem



Ryc. 2. Dendrogram odległości genetycznych wg Nei (1978) dla drzewostanów sosny zwyczajnej z regionu pochodzenia 205 i okolic. Cyframi oznaczono poszczególne drzewostany, a numery regionów podano w nawiasach jak na ryc. 1.

Fig. 2. Dendrogram of genetic distances (Nei 1978) among Scots pine stands from the seed region 205 and the neighborhood. Stand number and seed region numbers (in brackets), as presented in Fig. 1.



Ryc. 3. Dendrogram odległości genetycznych wg Nei (1978) dla drzewostanów sosny zwyczajnej z regionu pochodzenia 601 i okolic. Cyfry oznaczające drzewostany i numery regionów (w nawiasach) jak na ryc. 1.

Fig. 3. Dendrogram of genetic distances (Nei 1978) among Scots pine stands from the seed region 601 and the neighborhood. Stand number and seed region numbers (in brackets) as presented in Fig. 1.

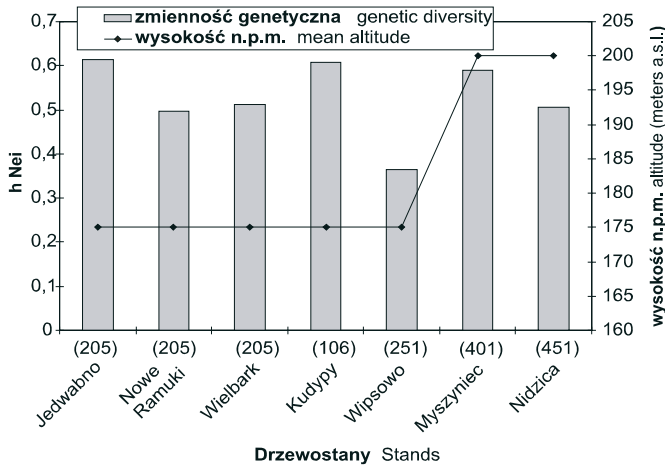
zmienności h Nei na rycinie 4. Dwie populacje (Myszyniec i Nidzica) położone na średniej wysokości 200 m n.p.m. nie różnią się istotnie pod względem wartości współczynnika h od pozostałych populacji z regionu 205, położonych na 175 m n.p.m.

Drzewostany z regionu 601 charakteryzowały się większą korelacją między współczynnikiem zmienności genetycznej h Nei a średnim okresem wegetacyjnym ($R^2 = 0,416$; $F = 3,563$; $p = 0,11$), średnimi opadami rocznymi ($R^2 = 0,561$; $F = 6,381$; $p = 0,05$) oraz średnią wysokością nad poziomem morza ($R^2 = 0,386$; $F = 3,151$; $p = 0,13$). Najniżej położona populacja Brzeziny, leżąca 150 m n.p.m., ma zmienność genetyczną h Nei = 0,606, porównywalną do zmienności w populacjach Przedbórz, Smardzewice, Spała i Bełchatów, położonych na wysokości 200 m n.p.m. (ryc. 5). Dwie najwyższe położone populacje z regionu sosny spalskiej, tj. Włoszczowa (250 m n.p.m) i Barycz (300 m n.p.m.), wykazują najniższe współczynniki zmienności genetycznej (odpowiednio h Nei = 0,348 i h Nei = 0,447).

4. DYSKUSJA

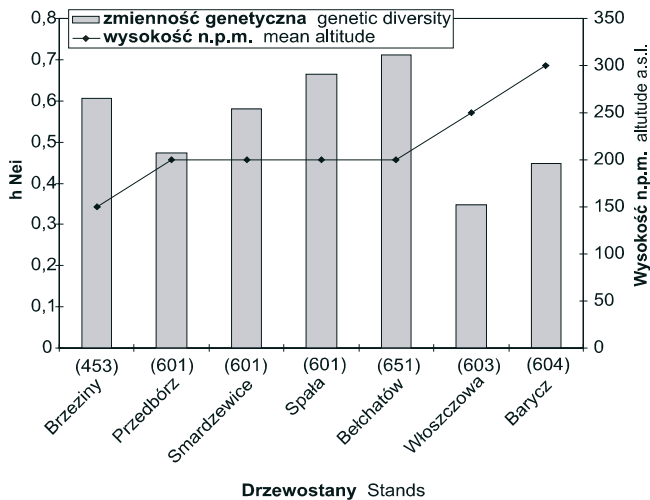
Charakterystyka genetyczna gatunków drzew leśnych dostarcza podstawowych danych do wypracowania w przyszłości nowych modeli hodowli lasu (Chałupka 2003, Hamrick 2004, Kremer i Reviron 2004). Dokładne poznanie poziomu zróżnicowania genetycznego sosny zwyczajnej w Polsce będzie miało kluczowe znaczenie przy identyfikacji cennych genotypów, ich ochronie oraz reintrodukcji w regionach poddanych antropopresji.

Badane drzewostany z regionu sosny napiwodzko-ramuckiej i spalskiej charakteryzuje zmienność występowania czterech haplotypów „a”, „b”, „c” i „d” genu



Ryc. 4. Zmienność genetyczna h (Nei 1978) badanych drzewostanów sosny napiwodzko-ramuckiej RDLP Olsztyn (w nawiasach podano regiony pochodzenia) oraz średnia wysokość n.p.m.

Fig. 4. Genetic diversity h (Nei 1978) and mean altitude of napiwodzko-ramucka Scots pine stands (seed regions in brackets).



Ryc. 5. Zmienność genetyczna h (Nei 1978) badanych drzewostanów sosny spalskiej RDLP Łódź (regiony pochodzenia w nawiasach) oraz średnia wysokość n.p.m.

Fig. 5. Genetic diversity h (Nei 1978) and mean altitude of spalska Scots pine stands (seed regions in brackets).

nad1. Najczęściej występującym haplotypem w obu regionach jest haplotyp „c” (44,7%), najrzadziej zaś – haplotyp „b” (1,7%) (tab. 2). Populacje sosny napiwodzko-ramuckiej cechuje mniejsze zróżnicowanie haplotypów w porównaniu z populacjami sosny spalskiej, m.in. mniejszy jest w nich udział rzadkiego haplotypu „b”, który wynosi 0,6% w porównaniu do 2,9% u sosny spalskiej (tab. 2).

Dotychczasowe badania haplotypowej zmienności mitochondrialnego DNA u sosny wykazały występowanie haplotypu „a” głównie w południowo-zachodniej Hiszpanii, Niemczech, Czechach oraz Szkocji (Soranzo i in. 2000). Udział rzadkiego haplotypu genu *nad1* był, jak dotąd, charakterystyczny głównie dla hiszpańskich populacji sosny zwyczajnej (Pireneje i wschodnie wybrzeże Hiszpanii). Poza populacjami hiszpańskimi tylko w jednej spośród badanych przez Soranzo i in. (2000) polskich populacji (leśnictwo Kubryk, Nadl. Miłomłyn) występował haplotyp „b”. Niniejsze badania potwierdziły występowanie rzadkiego haplotypu „b” w polskich populacjach sosny zwyczajnej i dodatkowo wskazały na występowanie dwóch dodatkowych haplotypów „c” i „d”.

Analiza zróżnicowania genetycznego badanych populacji sosny zwyczajnej wykazała, że populacje z regionu sosny spalskiej zlokalizowane w centrum Polski charakteryzuje większy stopień zmienności wewnątrzpopulacyjnej ($H_T = 0,650$) niż populacje sosny napiwodzko-ramuckiej, występujące na północy Polski ($H_T = 0,597$). Wysoki stopień zróżnicowania genetycznego $G_{ST} = 0,626$ stwierdzony na podstawie analiz STS w badanych populacjach sosny kontrastuje ze względnie niskimi wartościami $G_{ST} = 0,215$ i $H_T = 0,262$ otrzymanymi dla polskich populacji sosny przy użyciu markerów RAPD (Nowakowska 2003).

Różnice obserwowanych wartości współczynników genetycznych H_T i G_{ST} mogą wynikać z odmiennego mechanizmu dziedziczenia markerów organellowych (mitochondrialnych) i markerów DNA genomowego (RAPD). Markery mitochondrialne cechuje większy procent mutacji punktowych i szybsze tempo ich powstawania niż markery jądrowe (Latta i in. 2001). Ponieważ DNA mitochondrialne nie podlega procesom rekombinacji i jest przekazywane z jednej generacji do następnej w nielicznych kopiach, przy równoczesnym braku zmienności genetycznej między potomstwem a drzewem matecznym, różnice w strukturze DNA mitochondrialnego mają charakter stały na przełomie pokoleń (Latta i in. 2001). Czynniki te sprawiają, że markery przekazywane matecznie wykazują większy stopień zróżnicowania genetycznego niż markery jądrowe, dziedziczone od obojga rodziców (Hamrick 2004).

Wyniki analiz STS mogą być przydatne w określaniu granic pochodzeń sosny w regionach 205 i 601 na podstawie zmienności wykrytych haplotypów. Badane drzewostany sosnowe w regionie sosny napiwodzko-ramuckiej wykazały dużą jednorodność haplotypową w regionach 106, 205, 401 i 451. Jedyne drzewostan Wipsowo (region 251) stanowi odrębną pulę genową, gdyż dzieli go od innych populacji największy dystans genetyczny. Według obowiązujących zasad transferu leśnego materiału rozmnożeniowego w regionie sosny napiwodzko-ramuckiej, regiony 106, 205 i 401 objęte są zakazem sprowadzania materiału rozmnożeniowego z innych regionów (Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 19 kwietnia 2004 r. w sprawie wykorzystania pochodzenia leśnego materiału rozmnożeniowego poza regionem jego pochodzenia, Dz. U. 04, nr 84, poz. 791). Niniejsze analizy STS potwierdziły możliwość przenoszenia leśnego materiału rozmnożeniowego z badanych drzewostanów z regionów 106, 205 i 401 do drzewostanu Nidzica (451). Zakaz transferu nasion z drzewostanów Kudypy (106), Jedwabno (205), Nowe Ramuki (205) i Wielbark (205) do drzewostanu Wipsowo

(251) wydaje się być uzasadniony. W związku z tym, że populacje sosny napiwodzko-ramuckiej wykazują duże podobieństwo haplotypów między sobą, granice regionu 205 mogą być poszerzone o badane drzewostany z regionów 106, 401 i 451.

W regionie sosny spalskiej stwierdzono, że granice regionu 601 mogą być rozszerzone o sąsiadujące populacje: Barycz (604) i Bełchatów (651), gdyż mają one podobne haplotypy genu *nad1*. Drzewostan Przedbórz (region 601) nie jest genetycznie spokrewniony z innymi badanymi drzewostanami regionu 601 ze względu na duży udział haplotypu „a”. Poprzez duże podobieństwo filogenetyczne z drzewostanem Włoszczowa (603), drzewostan Przedbórz może być włączony z regionu pochodzenia 603. Mimo ograniczeń transferu leśnego materiału rozmnożeniowego z innych regionów do regionu 601 wg Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 19 kwietnia 2004 r., wydaje się możliwe uwzględnienie transferu materiału do tego regionu z drzewostanów Barycz (604) i Bełchatów (651). Objęte ustawą pozwolenie na transfer materiału rozmnożeniowego z regionu 601 (drzewostan Spała) i 651 (drzewostan Bełchatów) do regionu 453 (drzewostan Brzeziny) wydaje się nieuzasadnione, biorąc pod uwagę odrębność filogenetyczną badanych drzewostanów. Wytyczne transferu nasion obowiązujące w regionie sosny spalskiej wydają się słuszne dla regionu 651 (drzewostan Bełchatów), do którego można sprowadzać materiał z drzewostanów Smardzewice (601) i Spała (601).

Ponieważ niniejsze badania przeprowadzono na podstawie danych sekwencji jednego z dwóch aktualnie dostępnych genów mitochondrialnego DNA – *nad1*, w przyszłości warto również rozszerzyć analizy o zmienność drugiego mitochondrialnego genu *cox1* (Sinclair i in. 1999, Newton i in. 1999).

W obu badanych regionach sosny nie wykryto istotnych korelacji między współczynnikiem zmienności wewnątrzpopulacyjnej (h Nei) a średnim okresem wegetacyjnym, średnimi opadami rocznymi oraz wysokością nad poziomem morza. Korelacje te były wyższe dla pochodzeń sosny spalskiej niż napiwodzko-ramuckiej. Brak znaczących powiązań między markerami genetycznymi a czynnikami środowiskowymi wynika prawdopodobnie z dynamiki procesu adaptacji, jaką przeszły populacje drzew leśnych zasiedlające tereny o podobnych warunkach siedliskowych, tj. zbliżonym składzie gleby, wysokości i długości okresu wegetacyjnego (Chybicki i Burczyk 2002, Kremer i in. 2002).

Zależność między zmiennością genetyczną a środowiskiem w znacznej mierze wynika z procesów dyspersji i przepływu genów między osobnikami tego samego gatunku. W zależności od lokalizacji populacji (centralnej lub brzeżnej), pule genowe mogą mieć charakter jedno- lub niejednorodny, wynikający z pełnej lub częściowej izolacji przepływu genów z jednej populacji do drugiej. Spośród badanych drzewostanów w dwóch regionach, region 205 charakteryzuje mniejszy przepływ mitochondrialnego genu *nad1* ($G_{ST} = 0,597$) w porównaniu z w regionem 601, w którym przepływ tego genu jest większy ($G_{ST} = 0,626$). Zatem badane drzewostany sosny napiwodzko-ramuckiej charakteryzuje większa jednorodność haplotypów niż bardziej zróżnicowaną pulę genową populacji z regionu sosny spalskiej.

Polskie populacje sosny zwyczajnej charakteryzuje większe zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne niż pomiędzy populacjami, co wskazywałoby na swobodny przepływ genów między drzewostanami tego gatunku (Nowakowska 2003). Dobór naturalny w obrębie populacji utrzymuje względnie stałą jakość puli genetycznej, przystosowanej do warunków panujących w danym regionie, a geograficzna izolacja pewnej grupy osobników może prowadzić do zawężenia puli genowej i wzrostu homozygotyczności, co jest jednym z czynników powodujących wzrost zróżnicowania międzypopulacyjnego (Loveless i Hamrick 1984). Z drugiej strony, przepływ genów na dalekie odległości (nasiona i ziarna pyłku) jest jedną z przyczyn zmniejszenia różnic między populacjami drzew leśnych (Hamrick i in. 1992). A zatem, zasady wyboru drzewostanów i pojedynczych drzew w ramach regionów leśnego materiału podstawowego powinny opierać się na badaniach genetycznych DNA, tak aby w pełni zidentyfikować pulę genową danej populacji, w odróżnieniu do populacji sąsiednich. Poznanie struktury genetycznej populacji na podstawie markerów DNA może mieć decydujące znaczenie w regionalizacji nasiennej, hodowli leśnej oraz ekologii (Newton i in. 1999, Ratkiewicz i Borkowska 2002, Hamrick 2004). Wyróżnienie regionów pochodzenia leśnego materiału rozmnożeniowego na podstawie analizy DNA może stanowić wartościową informację o składzie genetycznym populacji, np. w celu stworzenia optymalnych warunków wykorzystania cennych zasobów genowych oraz zahamowania dopływu materiału rozmnożeniowego gorszej jakości.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzone badania wskazują na przydatność techniki STS do określenia zmienności genetycznej oraz powiązań filogenetycznych polskich populacji sosny zwyczajnej w obrębie regionu sosny napiwodzko-ramuckiej i spalskiej.

Stwierdzono, że sosna zwyczajna pochodzenia napiwodzko-ramuckiego i spalskiego ma cztery haplotypy „a”, „b”, „c” i „d” mitochondrialnego genu *nad1*. Haplotyp „a” jest obecny we wszystkich badanych drzewostanach, haplotyp „b” cechuje głównie drzewostany sosny spalskiej, haplotypy „c” i „d”, po raz pierwszy wykryte w Polsce, występują w obu regionach pochodzeń.

Badane drzewostany sosny napiwodzko-ramuckiej cechuje mniejsze zróżnicowanie haplotypów niż drzewostany sosny spalskiej, m.in. poprzez mniejszy udział rzadkiego haplotypu „b”, odpowiednio: 0,6 i 2,9%.

Sosna spalska ma większą zmienność wewnątrzpopulacyjną ($H_T = 0,650$) niż sosna napiwodzko-ramucka ($H_T = 0,597$). Ogólny poziom zróżnicowania międzypopulacyjnego dla badanych drzewostanów sosny jest wysoki ($G_{ST} = 0,626$).

Większe zróżnicowanie haplotypów *nad1* w drzewostanach sosny spalskiej wskazuje prawdopodobnie na większy przepływ genów między populacjami sosny z mikroregionu 601 do regionów sąsiednich, niż to ma miejsce w regionie 205.

Na podstawie mitochondrialnych markerów genu *nad1* stwierdzono, że granice regionu 205 mogą być poszerzone o analizowane drzewostany: Kudypy (106), Myszyniec (401) i Nidzica (451), gdyż stanowią one tę samą pulę genetyczną co region pochodzenia 205. Niniejsze badania potwierdziły możliwość przenoszenia leśnego materiału rozmnożeniowego z drzewostanów Kudypy (106), Jedwabno (205), Nowe Ramuki (205), Wielbark (205) i Myszyniec (401) do drzewostanu Nidzica (451). Transfer materiału rozmnożeniowego z drzewostanu Kudypy (106) i badanych drzewostanów z regionu 205 do drzewostanu Wipsowo (251) nie jest wskazany.

Granice regionu sosny spalskiej mogą być rozszerzone o drzewostany Barycz (604) i Bełchatów (651). Drzewostan Przedbórz (601) przynależy filogenetycznie do badanych drzewostanów z regionu 603 a nie z regionu 601. W regionie sosny spalskiej możliwe jest przenoszenie materiału rozmnożeniowego z drzewostanów Barycz (604) i Bełchatów (651) do drzewostanów Smardzewice (601) i Spała (601) oraz z drzewostanu Włoszczowa (603) do drzewostanu Przedbórz (601). Nie wydaje się wskazane przenoszenie materiału rozmnożeniowego z drzewostanów Bełchatów (651), Smardzewice (601) i Spała (601) do drzewostanu Brzeziny (453).

Brak istotnych korelacji między współczynnikiem zmienności wewnątrzpopulacyjnej (h Nei) a warunkami środowiskowymi (średni okres wegetacyjny, średnie opady roczne oraz wysokość n.p.m.) wskazuje na brak powiązań tych czynników z haplotypową zmiennością genetyczną.

Przedstawione powinowactwo genetyczne zostało określone w wyniku analiz dotyczących jednego genu i na podstawie względnie małej liczby drzewostanów. W celu dokładnej weryfikacji zasobów genetycznych należy przeprowadzić badania z zastosowaniem większej liczby genów dla większej liczby drzewostanów w regionie.

Autorzy dziękują Pani Jolancie Bieniek i mgr Marcie Zaleskiej za pomoc w analizach laboratoryjnych oraz dr inż. Janowi Kowalczykowi, mgr. inż. Michałowi Zawadzkiemu i pracownikom nadleśnictw i leśnictw regionalnych dyrekcji Lasów Państwowych Olsztyn i Łódź za pomoc w pozyskaniu materiału badawczego.

GENETICAL VARIATION OF POLISH NAPIWODZKO-RAMUCKA AND SPALSKA SCOTS PINE PROVENANCES DETERMINED BY MITOCHONDRIAL DNA ANALYSES

Summary

The genetic variation of napiwodzko-ramucka (seed region 205) and spalska (seed region 601) Scots pine provenances were determined with sequence-tagged-site (STS) markers. The mitochondrial DNA markers were used in order to check the accurateness of the seed region border lines, previously established for the transfer of the reproductive seed material in two seed regions. The mitochondrial B/C intron of NADH dehydrogenase gene (*nad1*) was analyzed in order to determine the genetic diversity level within and among studied stands, in comparison to the stands surrounding the regions 205 and 601.

Four different haplotypes of *nad1* gene („a”, „b”, „c” and „d”) were detected. The haplotypes „c” and „d” were reported for the first time in Polish Scots pine stands and the presence of the rare haplotype „b” was confirmed. Two studied regions presented different profile of haplotype-frequencies. Especially the spalska Scots pine provenance was characterized by higher haplotype „b” frequency of *nad1* gene (2.9%) compared to napiwodzko-ramucka pine (0.6%). Higher genetic differentiation ($H_T = 0.650$) was observed in the region 601, compared to $H_T = 0.597$ found in the region 205. A relatively high degree of variation (overall G_{ST} about 62.5%) characterized all studied stands and suggests an important human impact performed on these stands in the past.

According to the genetic similarities analysis, the stands from the 205 region were characterized by lower gene flow than the stands from the 601 region. The analysis of mitochondrial *nad1* gene variation showed two main gene pools in the napiwodzko-ramucka Scots pine: one gene pool concerned the stands Jedwabno (205), Wielbark (205), Nowe Ramuki (205), Myszyniec (401), Nidzica (451) and Kudypy (106), and another gene pool was presented by one stand – Wipsowo (251). The borderlines of the 205 region could be then enlarged then with Myszyniec (401), Nidzica (451) and Kudypy (106) stands. As far as the current transfer rules of the plant reproductive material are considered, the seed transfer from the studied stands of regions 106, 205 and 401 to the Nidzica stand (451) is justified by STS marker analysis. Because of differences in gene pool, the transfer of seed material from studied stands of 106 and 205 regions to the stand Wipsowo (251) is not advised.

Spalska Scots pine has higher haplotype diversity assessed with *nad1* gene because of a large proportion of population-specific haplotypes scored in seed region 601. It can indicate possibility of changes in previously established borderlines for the 601 region. The region area may be enlarged with two stands: Barycz (604) and Bełchatów (651) because they belong to the gene pool of region 601. The Przedbórz stand of the 601 seed region which has high similarities with the neighbouring stand Włoszczowa (603), may be transferred to the seed region 603. The STS analysis confirmed the distinctiveness of the Brzeziny (453) stand comparing to the other stands in the region 601. The seed transfer from the region 601 to the stand Bełchatów (651) is in respect with the seed transfer rules previously established but the transfer of the seed material from stands of the regions 601 and 651 to the stand Brzeziny (453) should not be advised.

Based on STS data, no evidence of correlation between genetic diversity level and environmental factors (i.e. mean vegetation period per year, mean precipitations and mean altitude) were detected.

The large genetic diversity revealed with STS markers among studied pine stands in Poland indicates a possible usefulness of mitochondrial markers to determine distinct gene pools of *P. sylvestris* and may bring new information for conservation and breeding purposes.

LITERATURA

- Ainsworth E. A., Tranel P. J., Drake B. G., Long S. P. 2003: The clonal structure of *Quercus geminata* revealed by conserved microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 12: 527-532.
- Barrenche T., Bodenens C., Lexer C., Trotin J.F. Fluch S., Streiff R., Plomion C., Roussel G., Steinkeller H., Burg K., Favre J.M., Glossl J. and Kremer A. 1998: A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isoenzyme and rDNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 97:1090-1103.
- Bradshaw H. D., Villar M., Watson B. D., Otto K. G., Stewart S., Stettler R. F. 1994: Molecular genetics of growth and development in Poplar. III. A genetic map of hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 167-178.
- Burczyk J., Lewandowski A., Chałupka W. 2004: Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] *For. Ecol. Managm.*, 197: 39-48.
- Chałupka W. 2003: Współczesne trendy w badaniach genetycznych drzew leśnych. *Prace Inst. Bad. Leś.*, A, 1: 69-75.
- Chybicki I., Burczyk J. 2002: Wykorzystanie metod autokorelacji przestrzennej w badaniach zmienności genetycznej i modelowaniu procesów demograficznych populacji roślin. *Wiad. Bot.*, 46(3/4): 7-18.
- Coart E., Lamote V., De Loose M., Van Bockstaele E., Lootens P., Roldán-Ruiz I. 2002: AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species [*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in Flemish populations. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 431-439.
- Collignon A. M., Van de Sype H., Favre J. M. 2002 : Geographical variation in random amplified polymorphic DNA and quantitative traits in Norway spruce. *Can. J. For. Res.*, 32: 266-282.
- Coleman M. 2000: Application of RAPDs to the critical taxonomy of the English endemic elm *Ulmus plottii* Druce. *Botanic Journal of the Linnean Society*, 133: 241-262.
- DeVerno L. L., Mosseler A. 1997: Genetic variation in red pine (*Pinus resinosa*) revealed by RAPD and RAPD-RFLP analysis. *Can. J. For. Res.*, 27: 1316-1320.
- Dodd R. S., Kashani N. 2003: Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section Lobatae). *Theor. Appl. Genet.*, 107: 884-892.
- Giertych M. 1993: Zmienność proweniencyjna. [W:] *Biologia sosny zwyczajnej* (S. Białobok, A. Boratyński, W. Bugała) Wyd. Sorus PAN, Poznań-Kórnik: 325-339.
- Hamrick J. L. 2004: Response of forest trees to global environmental changes. *For. Ecol. Manag.*, 197: 323-335.
- Hamrick J. L., Godt M. J. W., Sherman-Broyles S. L. 1992: Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124.
- Heuertz M. 2003: Population genetics structure in common ash: a focus on southeastern European genetic resources. Free University of Brussels. Public research Centre – Gabriel Lippmann: 17-30.
- Hick M., Adams D., O'Keefe S., Macdonald E., Hodgetts R. 1998: The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. latifolia). *Genome*, 41: 797-805.
- Jeandroz S., Frascaria-Lacoste N., Bousquet J. 1996: Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. *For. Gen.*, 3(4): 237-242.
- Jeandroz S., Bastien D., Du Jardin P., Favre J. M. 2002: A set of primers for amplification of mitochondrial DNA in *Picea abies* and other conifer species. *Mol. Ecol. Notes*, 2(4): 389-392.
- Kondracki J. 1998: *Geografia regionalna Polski*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Kremer A., Kleinschmit J., Cottrell J., Cundall E. P., Deans J. D., Ducouso A., Konig A. O., Lowe A. J., Munro R. C., Petit R. J. 2002: Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection between genetic diversity in European oaks ? *For. Ecol. Manag.*, 156: 75-85.
- Kremer A., Reviron M. P. 2004: Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems. *For. Ecol. Manag.*, 197: 1-2.

- Latta R. G., Linhart Y. B., Mitton J. B. 2001: Cytonuclear disequilibrium and genetic drift in a natural population of ponderosa pine. *Genetics*, 158: 843-850.
- Leibenguth F., Shoghi F. 1998: Analysis of random amplified polymorphic DNA markers in three conifer species. *Silvae Gen.*, 47(2-3): 120-126.
- Loveless M. D., Hamrick J. L. 1984: Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15:65-95.
- Mariette S., Chagné D., Decroocq S., Vendramin G. G., Lalanne C., Madur D., Plomion C. 2001: Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. For. Sci.*, 58: 203-206.
- Matras J. 1996: Rejestr drzew doborowych, plantacji i plantacyjnych upraw nasiennych. DGLP, IBL, Warszawa.
- Mitton J. B., Kreiser B. R., Rehfeldt G. E. 2000: Primers designed to amplify a mitochondrial *nadI* intron in ponderosa pine, *Pinus ponderosa*, limber pine, *P. flexilis*, and Scots pine, *P. sylvestris*. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1269-1272.
- Moreau F., Kleinschmit J. R. G., Kremer A. 1994: Molecular differentiation between *Quercus petraea* and *Q. robur* assessed by random amplified DNA fragments. *For. Gen.*, 1(1): 51-64.
- Neale D. B., Devay M. E., Jemstad K. D., Ahuja M. R., Alosi M. C., Marshall K. A. 1992: Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New Forest*, 6: 391-407.
- Nei M. 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 89: 583-590.
- Newton A. C., Allnutt T. R., Gillies A. C. M., Lowe A. J., Ennos R. A. 1999: Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree*, 14(4): 140-141.
- Nowakowska J. 2003: Zróżnicowanie genetyczne wybranych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na podstawie analiz RAPD. *Sylwan*, 11: 26-37.
- Nowakowska J., Jabłonowski S., Bieniek J. Mockeliunaite R. 2004: Comparison of genetic variability within and among Polish and Lithuanian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) based on RAPD analysis. *Baltic Forestry*, 10(1): 57-64.
- Nowakowska J. 2004: Genetic variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations at regional level revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Miskininkyste*, 2(56): 13-20.
- Oddou-Muratorio S., Guesnet D., Ozdemir E., Petit R. J., Demesure B. 2001: Patterns of seeds dispersal in a scattered forest tree species (*Sorbus torminalis*) based on multi-scale investigation of population genetic structure for chloroplast DNA. [W:] Genetic response of forest systems to changing environmental conditions (Eds G. Müller-Starck and R. Shubert), Kluwer Academic Press, Dordrecht, Boston, London: 271-280.
- Paglia G. P., Olivieri A. M., Morgante M. 1998: Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Mol. Gen. Genet.*, 258: 466-478.
- Palmé A. E., Su Q., Rautenberg A., Manni F., Lascoux M. 2003: Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. *Mol. Ecol.*, 12: 201-212.
- Perry D. J., Bousquet J. 1998: Sequence-tagged site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics*, 149: 1089-1098.
- Perry D. J., Bousquet J. 2001: Genetic diversity and mating system of post-fire and post-harvest black spruce: an investigation using codominant sequence-tagged-site (STS) markers. *Can J. For. Res.*, 31: 32-40.
- Petit R. J., Latouche-Hallé C., Pemonge M. H., Kremer A. 2002: Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *For. Ecol. Manag.*, 156: 115-129.
- Ratkiewicz M., Borkowska A. 2002: Zastosowanie technik molekularnych w ekologii. *Wiad. Ekol.*, 2: 99-121.
- Rajora O. P., Rahman M. H. 2003: Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus × canadensis*) cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 470-477.
- Ribeiro M. M., Mariette S., Vendramin G. G., Szmidt E., Plomion C., Kremer A. 2002: Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast

- simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data. *Mol. Ecol.*, 11: 869-877.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 marca 2004 r. w sprawie wykazu, obszarów i mapy regionów pochodzenia leśnego materiału podstawowego (Dz. U. 04, nr 67, poz. 621).
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 19 kwietnia 2004 r. w sprawie wykorzystania pochodzenia leśnego materiału rozmnożeniowego poza regionem jego pochodzenia (Dz. U. 04, nr 84, poz. 791).
- Sabor J. 2003: Wpływ stosowanych zabiegów pielęgnacyjnych i rębni na zmianę struktury genetycznej drzewostanów. *Sylwan*, 2: 39-48.
- Sander T., Köning S., Rithe G. M., Janßen A., Weisgerber H. 2000: Genetic variation of European beech (*Fagus sylvatica*) along an altitudinal transect at mount Vogelsberg in Hesse, Germany. *Mol. Ecol.*, 9: 1349-1361.
- 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. *Mol. Ecol.*, 8: 83-88.
- Smouse P. E., Sork V. L. 2004: Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For. Ecol. Manag.*, 197: 21-38.
- Soranzo N., Alia R., Provan J., Powell W. 2000: Pattern of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Mol. Ecol.*, 9: 1205-1211.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998: Characterisation of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Mol. Ecol.*, 9: 1260-1261.
- Svoboda P. 1953: Lesni dřeviny a jejich porosty. Praha. Statni. Ped. Nakl.
- Tomaru N., Takahashi M., Tsumura Y., Takahashi M., Ohba K. 1998: Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *Am. J. Bot.*, 85(5): 629-636.
- Troggio M., DiMasso E., Leonardi S., Ceroni M., Bucci G., Piovani P., Menozzi P. 1996: Inheritance of RAPD and I-SRR markers and population parameters estimation in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *For. Gen.*, 3(4): 173-181.
- Wright J. W., Bull W. I. 1963: Geographic variation in Scotch Pine. *Silvae Gen.*, 12(12): 1-40.
- Załęski A., Matras J., Sabor J., Zajączkowska B. 2000: Leśna regionalizacja nasienna dla nasion i sadzonek w Polsce. CILP, Wyd. DGLP, IBL, Warszawa.