

MAGDALENA CHUDZIŃSKA, MAŁGORZATA PAŁUCKA, ANNA PASŁAWSKA,
MONIKA LITKOWIEC, ANDRZEJ LEWANDOWSKI, CZEŚLAW KOZIOŁ

Wyniki wstępnych badań nad zmiennością genetyczną oraz zróżnicowaniem genetycznym między populacjami wiązu górskiego (*Ulmus glabra* Huds.) w Polsce

Results of preliminary research on genetic variation and genetic
differentiation between Wych elm populations (*Ulmus glabra* Huds.)
in Poland

ABSTRACT

Chudzińska M., Pałucka M., Paśławska A., Litkowiec M., Lewandowski A., Kozioł C. 2018. Wyniki wstępnych badań nad zmiennością genetyczną oraz zróżnicowaniem genetycznym między populacjami wiazu górskiego (*Ulmus glabra* Huds.) w Polsce. Sylwan 162 (9): 727-736.

Wych elm (*Ulmus glabra* Huds.) is a rare scattered forest tree species in Poland. First studies on genetic diversity of the species in its natural range in Poland give a good basis for the management and conservation of its genetic resources. In the present study, we determined the level of genetic variation and genetic differentiation of seventeen natural Wych elm populations in Poland using nine nuclear microsatellite loci. The number of analyzed individuals was 601. The level of genetic diversity of Polish populations of Wych elm corresponded with the results of the previous studies on this species in Europe. The populations show quite low level of genetic diversity of the species on the population level and quite high diversity on the interpopulation level. A total of 119 alleles was found, with average number per locus (A) equal 6.0 and allelic richness at medium high level ($AR_{10}=4.7$). Observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity reached 0.583 and 0.602 respectively. The genetic differentiation between Polish populations of Wych elm occurred at a low level ($F_{st}=0.089$). Inbreeding depression may occur in the next generations ($F_{is}=0.031$). Genetic diversity between Wych elm populations in Poland may be the result of unfavorable random processes related to the reduction of population size resulting from elm disease. To better understand the processes related to the genetic diversity of Wych elm populations, research on field elm variation should be undertaken. Such studies may give an answer to the potential influence of introgression between these species on the genetic structure of the Wych elm. Both *in situ* as well as *ex situ* conservation measures are highly recommended to preserve genetic resources of this valuable noble hardwood species in Polish landscape.

KEY WORDS

Wych elm, genetic variation, microsatellite markers, genetic resources, *ex situ* conservation

ADDRESSES

Magdalena Chudzińska ⁽¹⁾ – e-mail: magdalena.chudzinska@lbg.lasy.gov.pl

Małgorzata Pałucka ⁽¹⁾ – e-mail: malgorzata.palucka@lbg.lasy.gov.pl

Anna Paśławska ⁽¹⁾ – e-mail: anna.paslawska@lbg.lasy.gov.pl

Monika Litkowiec ⁽²⁾ – e-mail: mlit@man.poznan.pl

Andrzej Lewandowski ⁽²⁾ – e-mail: alew@man.poznan.pl

Czesław Kozioł ⁽¹⁾ – e-mail: Czeslaw.Kozioł@lbg.lasy.gov.pl

⁽¹⁾ Leśny Bank Genów Kostrzyca; Miłków 300, 58-535 Miłków

⁽²⁾ Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk; ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik

Wstęp

Wiąz górski, zwany także brzoSTEM (*Ulmus glabra* Huds.), występuje niemalże w całej Europie, za wyjątkiem północno-wschodnich krańców Skandynawii, północnej części Niziny Rosyjskiej, południowo-zachodniej partii Półwyspu Pirenejskiego oraz zachodu Francji. Na wschodzie sięga do około 60° długości geograficznej wschodniej [Boratyńska i in. 2015]. Obszar Polski znajduje się całkowicie w jego zasięgu. Rośnie on tu zarówno na niżu, jak i w niższych położeniach górskich, jednak poza górami jest gatunkiem stosunkowo rzadkim [Zajac, Zajac 2001].

Po ostatnim zlodowaczeniu wiązy wkroczyły na terytorium Polski z kierunku południowo-wschodniego, często wraz z leszczyną, osiągając maksimum występowania około 6,5 tys. lat temu. Następnie, jak się uważa, presja plemion neolitycznych na środowisko przyrodnicze oraz prawdopodobnie rozprzestrzeniająca się w całej Europie choroba wiązów, podobna do epidemii, z jaką mamy do czynienia współcześnie, doprowadziły do stopniowego zmniejszenia udziału wiązów w składzie lasów [Ralska-Jasiewiczowa i in. 2003]. Wszystkie trzy rodzime gatunki wiązów (górski, polny i szypułkowy) są obecnie gatunkami z dominującym udziałem miejscowego występowania, tj. od 5 do 10% w składzie drzewostanów, a powierzchnia zredukowana zajmowana przez te gatunki wynosi 17,6 tys. ha (0,24% ogólnej powierzchni Lasów Państwowych) [Napierała-Filipiak i in. 2014]. Taki rodzaj występowania stwarza realne zagrożenie erozją puli genowej. Fragmentacja populacji i redukcja zagęszczenia osobników w populacji potencjalnie mogą ograniczać przepływ genów, co w konsekwencji może prowadzić do utraty zmienności genetycznej, niezbędnej w przystosowaniu gatunku do zmieniającego się środowiska [Sork, Smouse 2006]. Małe, rozdrobnione populacje są bardziej podatne na niekorzystne skutki procesów losowych, jak efekty „założyciela” i „wąskiego gardła” [Jump i in. 2003; Leroy i in. 2017]. Tym niemniej uważa się, że wiatropylne gatunki drzew, do jakich zalicza się brzoST, są mniej wrażliwe na fragmentację populacji z powodu potencjalnie dalekiej dyspersji pyłku [Meagher 2007].

Pierwszym krokiem do rozpoznania skali zagrożenia utraty zmienności genetycznej wiązu górskiego i opracowania strategii ochrony gatunku jest poznanie zmienności genetycznej i zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami. Bardzo dobrym narzędziem badawczym, szeroko wykorzystywanym w tego typu pracach, są markery mikrosatelitarne jądrowego DNA. Obecnie znane są i wykorzystywane markery mikrosatelitarne dla licznych gatunków wiązów, w tym wiązu górskiego [Whiteley i in. 2003; Collada i in. 2004]. Jednak do tej pory w Polsce nie prowadzono żadnych badań z wykorzystaniem markerów genetycznych do poznania poziomu zmienności rodzimych wiązów.

Celem badań było określenie poziomu zmienności oraz zróżnicowania genetycznego pomiędzy kilkunastoma polskimi populacjami wiązu górskiego.

Materiał i metody

Materiał do badań w postaci liści wiązu górskiego został zebrany z 17 populacji na terenie 11 regionalnych dyrekcji Lasów Państwowych w latach 2016-2017. Łącznie zebrano 601 prób (tab. 1). Przed dalszymi analizami materiał przechowywany był w zamkniętych kopertach w temperaturze pokojowej.

Przed przystąpieniem do izolacji wykonano naważki po 20 mg tkanki roślinnej. Tkanekę poddano homogenizacji w młynie kulowym MM 400 (Retsch, Niemcy). W celu wyizolowania

Tabela 1.

Numer identyfikacyjny (NI), lokalizacja badanych populacji oraz liczba osobników, z których pozyskano liście (N)

Identification number (NI), location of the tested populations and the number of individuals from which the leaves were obtained (N)

NI	Lokalizacja				N
1	Gołdap	Boczki (R)	22°29'54,495" E	54°19'54,08" N	51
2	Rudy Raciborskie	Baborów 331 b	18°1'56,873" E	50°6'56,682" N	10
3	Ustroń	Skarpa Wiślicka (R)	18°47'28,391" E	49°49'13,238" N	50
4	Krościenko	Biała Woda (R)	20°35'0,754" E	49°23'56,544" N	41
5	Lesko	Glinne 93 b	22°21'28,379" E	49°27'9,337" N	17
6	Tomaszów	Łabunie 87 c	23°21'26,029" E	50°37'13,144" N	37
7	Jarocin	Dwunastak (R)	17°31'0,001" E	52°10'0,001" N	20
8	Ostrowiec Świętokrzyski	Bodzechów 227 b	21°26'41,549" E	50°54'9,782" N	50
9	Staszów	Kleczanów 06 d	21°31'34,176" E	50°45'8,676" N	38
10	Choszczno	Skalisty Jar Libberta (R)	15°11'11,309" E	53°3'16,186" N	49
11	Drawno	Grądowe Zbocza (R)	15°34'14,718" E	53°16'16,493" N	14
12	Gościno	Ledowo 444 b	15°31'15,707" E	53°56'32,532" N	50
13	Jamy	Rogóżno Zamek (R)	18°56'51,435" E	53°31'18,642" N	50
14	Świdnica1	Lutomia 325 C	16°29'53,595" E	50°43'45,336" N	24
15	Świdnica2	Lutomia 313	16°31'16,32" E	50°44'15,54" N	27
16	Wałbrzych	Jedlinka 185 i, j; 186 c, f	16°18'30,758" E	50°41'28,885" N	23
17	Złotoryja	Ostrzyca Proboszczowicka (R)	15°3'21,906" E	51°45'47,214" N	50

(R) – rezerwat przyrody; nature reserve

DNA użyto komercyjnych zestawów do izolacji ISOLATE II Plant DNA Kit firmy Bioline (Wielka Brytania), zgodnie z protokołem producenta, z drobnymi modyfikacjami.

Wstępnie przetestowano 23 markery genetyczne przeznaczone dla rodzaju *Ulmus*: Ulm2, Ulm3, Ulm6, Ulm9, Ulm12, Ulm19, Ulm8 [Whiteley i in. 2003]; Ulmi1-11, Ulmi-21, Ulmi1-98, Ulmi1-165, Ulmi2-16 [Collada i in. 2004]; UR101, UR123, UR138, UR141, UR 153, UR158, UR159, UR173a, UR173b, UR175 i UR188a [Zalapa i in. 2008]. Reakcje przeprowadzono w objętości 10 µl przy użyciu odczynników Multiplex Master Mix firmy Qiagen (Niemcy). Ostatecznie do badań wybrano 9 najbardziej polimorficznych markerów jądrowego DNA i przygotowano 2 reakcje Multiplex PCR (Multiplex1: UR138, UR141, UR159, UR188a, Ulm3; Multiplex2: Ulm8, Ulm1-165, UR153, UR175). Reakcje zostały przeprowadzone przy użyciu odczynników Multiplex Master Mix (Qiagen, Niemcy) w termocyklerze Nexus Gradient (Eppendorf, Niemcy).

Uzyskane produkty reakcji PCR poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w analizatorze genetycznym 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), według procedury dostarczonej przez producenta. Do odczytania wyników elektroforezy kapilarnej dziewięciu mikrosatelitarnych loci zastosowano program GeneMapper® Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA), który umożliwia określenie wielkości fragmentów mikrosatelitarnych w porównaniu z wewnętrznym markerem wielkości GeneScan™ 600 LIZ (Life Technologies, USA).

Poziom zmienności genetycznej w badanych populacjach wiązu górskiego określono w oparciu o średnią (A) i efektywną (A_e) liczbę alleli w locus oraz heterozygotyczność oczekiwaną (H_e) i obserwowaną (H_o). Ze względu na nierówną liczebność badanych populacji wyliczono bogactwo alleliczne (AR10) – redukując liczebność wszystkich populacji do 10 osobników (liczebność populacji Rudy Raciborskie), co pozwala na realne porównanie tego parametru między populacjami.

Oszacowano także liczbę „alleli prywatnych” dla danych populacji. Do obliczeń wykorzystano programy FSTAT 2.9.3 [Goudet 2001] oraz GENALEX [Peakall, Smouse 2006].

W celu sprawdzenia, czy populacja wykazuje odchylenie od stanu równowagi Hardy-Weinberga, zastosowano metodę Monte Carlo z wykorzystaniem łańcuchów Markowa, będącą odpowiednikiem testu dokładnego (ang. exact test) [Weir, Cockerham 1996], zaimplementowaną w programie GENEPOP v.4.0 [Rousset 2008]. Wykorzystując program GENEPOP, obliczono współczynnik wsobności (F_{is}).

Poziom zróżnicowania genetycznego między populacjami określono, wykorzystując parametr F_{st} . Do jego obliczenia wykorzystano programy FSTAT 2.9.3 i FREENA. Metoda zaimplementowana w programie FREENA pozwala na obliczenie F_{st} za pomocą metody ENA (ang. Excluding Null Alleles), korygującej dodatkowo obciążenie estymatora wynikające z obecności alleli zerowych [Chapuis, Estoup 2007]. Ocenę efektywnej wielkości populacji przeprowadzono w oparciu o model nierównowagi gametycznej, wykorzystując oprogramowanie NeEstimator v.2.0 [Do i in. 2014].

Wyniki i dyskusja

POLIMORFIZM MARKERÓW GENETYCZNYCH (ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA CAŁEGO BADANEGO MATERIAŁU). Badane loci były niejednorodne pod względem poziomu zmienności genetycznej. Najmniejszą liczbę alleli (5) stwierdzono w locus UR141, a największą (28) w locus Ulmi1-165. We wszystkich analizowanych loci znaleziono łącznie 119 alleli. Średnia liczba alleli w przeliczeniu na locus wyniosła 13,2. Znacznie niższa była efektywna liczba alleli w locus (A_e): od 1,6 w locus UR159 do 6,5 w najbardziej zmiennym locus Ulmi1-165, przy średniej 3,2. Średnią wartość heterozygotyczności oczekiwanej oszacowano na 0,602. Najniższą wartość heterozygotyczności oczekiwanej, $H_e=0,335$, stwierdzono w locus UR159, a najwyższą, $H_e=0,841$, w locus Ulmi1-165. Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej ($H_o=0,583$) była nieco niższa od średniej wartości heterozygotyczności oczekiwanej. W pięciu badanych loci stwierdzono niewielki nadmiar heterozygot w stosunku do równowagi Hardy-Weinberga, a w czterech – nadmiar homozygot. W trzech przypadkach odchylenie to było istotne statystycznie.

Średnia wartość współczynnika wsobności F_{is} wyniosła 0,028. Pomędzy badanymi populacjami stwierdzono stosunkowo wysoki poziom zróżnicowania genetycznego (średnia wartość $F_{st}=0,089$). Obecność alleli zerowych nie wpłynęła na oszacowaną wartość zróżnicowania genetycznego ($F_{stNull}=0,088$). Spośród analizowanych loci najbardziej różnicującym badane populacje był locus Ulm8 ($F_{st}=0,120$). Najmniejsze zróżnicowanie pomiędzy badanymi populacjami znaleziono w locus Ulm3 ($F_{st}=0,061$) (tab. 2).

Część z loci analizowanych przez autorów prezentowanego opracowania była wcześniej wykorzystana w badaniach nad zmiennością wiązków górskich na terenie Europy. Z zestawu 9 analizowanych loci 2 były analizowane w populacjach duńskich [Nielsen, Kjær 2010] oraz 5 w populacjach hiszpańskich [Martin del Puerto i in. 2017]. W locus Ulm3 w materiale z Danii znaleziono 6 alleli, w Hiszpanii 9, zaś w Polsce 13 alleli. W najbardziej zmiennym locus Ulmi1-165 zidentyfikowano w Polsce aż 28 alleli, w Hiszpanii 23 allele, natomiast w Danii 15. Badane loci wykazywały większy polimorfizm w populacjach polskich niż hiszpańskich i duńskich.

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA POSZCZEGÓLNYCH POPULACJI. W badanym materiale spośród wykrytych 119 alleli 24 było allelami rzadkimi, występującymi z częstościami poniżej 5%. Spośród wszystkich alleli 19 było allelami prywatnymi, czyli takimi, które były charakterystyczne tylko dla jednej z 17 badanych populacji (tab. 3). Najwięcej alleli prywatnych, po 4, znaleziono w popu-

lacjach z Jarocina (pop. 7) i Złotoryi (pop. 17). Zazwyczaj allele prywatne występowały z niskimi częstościami, poniżej 10%. Na uwagę zasługuje populacja z Jarocina, w której wszystkie prywatne allele występowały z częstościami powyżej 10%. Pięć z badanych populacji (Gołdap, Staszów, Drawno, Świdnica2 oraz Wałbrzych) nie miało alleli prywatnych.

Tabela 2.

Poziom zmienności genetycznej loci mikrosatelitarnych

Level of genetic diversity of microsatellite loci

Locus	A	A _e	H _o	H _e	F _{is}	P _{HW}	F _{st}	F _{stNull}
Ulm3	13	2,8	0,635	0,625	-0,027	0,698	0,061	0,060
Ulm8	12	1,7	0,342	0,345	0,003	0,178	0,120	0,125
Ulm1-165	28	6,5	0,800	0,841	0,054	0,063	0,076	0,072
UR138	12	3,2	0,681	0,679	-0,003	0,911	0,102	0,101
UR141	5	2,6	0,514	0,611	0,159	<0,001	0,063	0,060
UR153	13	2,6	0,536	0,603	0,109	<0,001	0,092	0,089
UR159	8	1,6	0,338	0,335	-0,016	0,023	0,081	0,084
UR175	11	3,1	0,651	0,640	-0,011	0,278	0,095	0,094
UR188a	17	4,2	0,749	0,739	-0,013	0,727	0,118	0,117
Średnia Average	13,2	3,2	0,583	0,602	0,028		0,089	0,088

A – liczba alleli, A_e – efektywna liczba alleli, H_o – heterozygotyczność obserwowana, H_e – heterozygotyczność oczekiwana, F_{is} – współczynnik wsobności, P_{HW} – istotność testu na zgodność ze stanem równowagi Hardy-Weinberga; F_{st} – współczynnik utrwalenia, F_{stNull} – współczynnik utrwalenia z korektą ENA

A – number of alleles, A_e – effective number of alleles, H_o – observed heterozygosity, H_e – expected heterozygosity, F_{is} – Wright's fixation index, P_{HW} – significance of departure from Hardy-Weinberg equilibrium, F_{st} – fixation index, F_{stNull} – fixation index with ENA correction

Tabela 3.

Allele prywatne w badanych populacjach wiązu górskiego (NI) i ich częstość (Cz)

Private alleles in the studied mountain elm populations (NI) and their frequency (Cz)

NI	Locus	Allel	Cz
2	Ulm8	182	0,05
2	UR188a	127	0,1
3	UR188a	141	0,01
4	UR159	262	0,012
5	Ulm8	190	0,059
6	UR138	207	0,027
7	Ulm3	186	0,105
7	Ulm8	170	0,132
7	Ulm8	210	0,132
7	UR153	185	0,132
8	UR188a	139	0,06
10	Ulm8	184	0,061
12	UR153	167	0,01
13	UR153	175	0,01
14	UR138	243	0,021
17	Ulm3	190	0,01
17	Ulm1-165	153	0,01
17	Ulm1-165	205	0,03
17	UR175	209	0,08

Ogólnie badane populacje charakteryzowały się średnim poziomem zmienności genetycznej (tab. 4). Średnia (A) liczba alleli w locus wyniosła 6,2, wahając się w zakresie od 5 w populacjach z Leska (pop. 5) i Staszowa (pop. 9) do 8 w populacji z Choszczna (pop. 10). Średnia wartość bogactwa allelicznego AR10 wyniosła 4,7 i była dość jednorodna, oscylując w zakresie od 4 w sześciu populacjach do 6 w trzech populacjach. Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej ($H_o=0,583$) była niższa od średniej wartości heterozygotyczności oczekiwanej ($H_e=0,602$), wskazując na niewielki poziom wsobności analizowanego materiału ($F_{is}=0,031$, $p<0,001$). Tym niemniej w sześciu badanych populacjach (Krościenko, Lesko, Ostrowiec Świętokrzyski, Drawno, Jamy i Świdnica2) stwierdzono nadmiar osobników heterozygotycznych w stosunku do równowagi Hardy-Weinberga. Największy nadmiar osobników heterozygotycznych stwierdzono w populacji Świdnica2 ($F_{is}=-0,130$). Najbardziej wsobna ($F_{is}=0,151$) była populacja z Jarocina (pop. 7).

Powyższe analizy znajdują odzwierciedlenie w wyliczonych wartościach współczynnika genetycznego zróżnicowania pomiędzy badanymi populacjami wiazu górskiego (F_{st}). Średnio współczynnik zróżnicowania genetycznego pomiędzy siedemnastoma populacjami był wysoki ($F_{st}=0,089$) i statystycznie istotny ($p<0,01$). Najmniejsze genetyczne zróżnicowanie ($F_{st}=0,010$) stwierdzono pomiędzy populacjami z Rud Raciborskich (pop. 2) i Wałbrzycha (pop. 16), a największe pomiędzy populacjami z Jarocina (pop. 7) i Staszowa (pop. 9) (ryc.). Zróżnicowanie genetyczne było nieistotne statystycznie tylko pomiędzy Rudami Raciborskimi a populacjami z Choszczna, Drawna, Świdnicy1 i Wałbrzycha oraz pomiędzy Choszcznem a Drawnem i Drawnem a Świdnicą1. Wszystkie pozostałe wartości były statystycznie istotne ($p<0,01$).

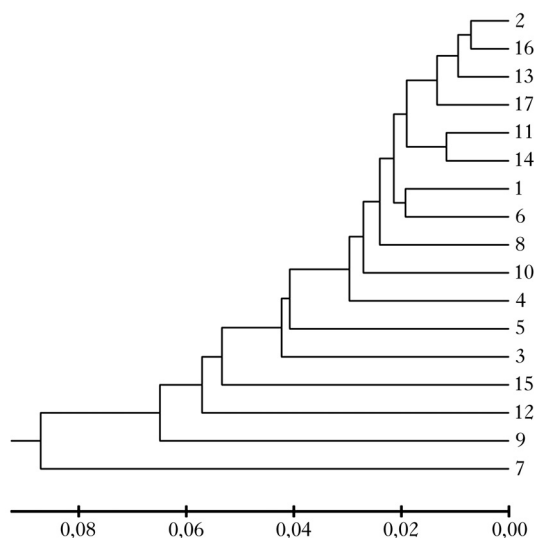
Tabela 4.

Zmienność genetyczna w badanych populacjach wiazu górskiego
Genetic variability of the studied mountain elm populations

NI	N	A	AR10	H_o	H_e	F_{is}	P_{HW}	N_e	CI (95%)
1	51	7	5	0,577	0,598	0,035	0,079	28,1	20,9-39,2
2	10	6	6	0,589	0,643	0,089	0,014	60,3	12,8-∞
3	50	6	4	0,502	0,528	0,048	0,299	237,1	74,7-∞
4	41	7	5	0,583	0,581	-0,003	0,148	25	17,9-63,9
5	17	5	4	0,654	0,630	-0,038	0,571	20,6	10,9-58,8
6	37	6	5	0,572	0,581	0,015	0,111	42,8	27,4-79,0
7	19	7	6	0,655	0,769	0,151	0,001	1,7	1,5-2,0
8	50	6	4	0,606	0,589	-0,030	0,827	23,1	17,2-31,8
9	38	5	4	0,439	0,512	0,145	0,003	61,4	30,9-371,9
10	49	8	6	0,657	0,717	0,085	<0,001	16	13,4-19,2
11	14	6	5	0,659	0,628	-0,051	0,639	166,6	23,7-∞
12	50	6	4	0,447	0,454	0,015	0,136	22,2	16,3-31,0
13	50	7	5	0,593	0,591	-0,002	0,212	133,5	71,8-515,8
14	24	6	5	0,560	0,627	0,108	0,002	21,1	13,6-37,4
15	27	6	5	0,696	0,617	-0,130	1,000	8,5	5,7-12,5
16	24	7	5	0,602	0,626	0,039	0,334	35,2	21,4-75,8
17	50	6	4	0,518	0,547	0,054	0,067	35	21,7-72,9
Średnia Average		6,2	4,7	0,583	0,602	0,031	<0,001	14,7	

N – liczba analizowanych drzew, A – średnia liczba alleli, AR10 – bogactwo alleli, H_o – heterozygotyczność obserwowana, H_e – heterozygotyczność oczekiwana, F_{is} – współczynnik wsobności, P_{HW} – istotność testu na zgodność ze stanem równowagi Hardy-Weinberga, N_e – efektywna wielkość populacji, CI (95%) – 95-procentowy przedział ufności

N – number of analyzed trees, A – average number of alleles, AR10 – allelic richness, H_o – observed heterozygosity, H_e – expected heterozygosity, F_{is} – Wright's fixation index, P_{HW} – significance of departure from Hardy-Weinberg equilibrium, N_e – effective population size, CI (95%) – 95% confidence interval



Ryc.

Grupowanie badanych populacji wiązu górskiego metodą NJ na podstawie wartości F_{stNull}
Neighbor-joining tree for analysed mountain elm populations based on pairwise F_{stNull} estimated from 9 nSSR loci

Badane populacje różniły się także pod względem oszacowanej wartości efektywnej wielkości populacji (N_e), która wahała się w szerokim zakresie: od zaledwie 1,7 (pop. 7) do 237,1 (pop. 3) (tab. 4). Wskazuje to, że badane populacje powstały z bardzo zróżnicowanej liczby osobników. Niekiedy, tak jak w przypadku populacji z Jarocina (pop. 7) i Świdnicy2 (pop. 15), mogło to być zaledwie kilka osobników (silne zawężenie puli genowej).

Pierwsze tego typu badania nad polskimi populacjami wiązu górskiego potwierdziły wyniki wcześniejszych badań nad zmiennością wiązu górskiego w Europie, wskazując, że jest to gatunek o stosunkowo niskim poziomie zmienności genetycznej i dużym zróżnicowaniu międzypopulacyjnym [Nielsen, Kjær 2010; Martin del Puerto i in. 2017]. Populacje polskie miały niższą średnią liczbę alleli w locus ($A=6$) niż populacje duńskie ($A=8$) i hiszpańskie ($A=9$) oraz pośrednią wartość heterozygotyczności oczekiwanej ($H_e=0,602$) w stosunku do populacji hiszpańskich ($H_e=0,566$) i duńskich ($H_e=0,774$) [Nielsen, Kjær 2010; Martin del Puerto i in. 2017]. Populacje z Polski były znacznie mniej zróżnicowane niż populacje z Hiszpanii, odpowiednio: $F_{st}=0,089$ i $F_{st}=0,239$ [Martin del Puerto i in. 2017]. Przy czym należy zaznaczyć, że porównania pomiędzy badanymi populacjami wiązów w Europie powinny być ostrożne, ze względu na odmienne zestawy analizowanych loci i liczbę badanych osobników i populacji.

Polskie populacje wiązu górskiego mają niższy poziom zmienności genetycznej ($A=6,2$; $H_e=0,602$), również w porównaniu do wielu innych gatunków drzewiastych rosnących w naszym kraju. Dużo wyższy poziom zmienności genetycznej wykazują dąb szypułkowy i topola czarna – odpowiednio $A=22,2$ i $H_e=0,847$ oraz $A=14,7$ i $H_e=0,731$ [Lewandowski, Litkowiec 2017; Burczyk i in. 2018]. Podobnie wysoki poziom zmienności wykazują gatunki iglaste, jak choćby sosna zwyczajna i modrzew polski [Lewandowski i in. 2017]. W populacjach cisa pospolitego, który występuje podobnie jak wiąz w małych, rozproszonych populacjach, wykryto średnio 11,7 allela w locus oraz $H_e=0,738$ [Litkowiec i in. 2018].

Jest wysoce prawdopodobne, że wiązy utraciły wysoki poziom zmienności genetycznej, jaki wykazuje większość europejskich gatunków drzewiastych, już w ostojach refugialnych czy też w trakcie wędrówki gatunku po ostatnim zlodowaceniu, w wyniku rozprzestrzeniającej się w całej Europie choroby wiązów [Ralska-Jasiewiczowa i in. 2003]. Redukcja liczebności populacji mogła prowadzić do powstania i utrwalenia stosunkowo dużego zróżnicowania międzypopu-

lacyjnego w makroskali. Tym niemniej badania przeprowadzone w Danii wskazują, że przepływ genów w skali lokalnej pomiędzy drzewami rosnącymi w rozproszeniu może być ciągle efektywny [Nielsen, Kjær 2010]. Wyższy poziom genetycznego zróżnicowania pomiędzy populacjami hiszpańskimi niż polskimi należy wiązać z tym, że populacje z Półwyspu Pirenejskiego są filogenetycznie starsze. Wiązy wkroczyły na teren Polski dopiero po ostatnim zlodowaceniu.

W naturze wiąz górski bardzo często krzyżuje się z wiązem polnym, wytwarzając osobniki mieszańcowe, dlatego aby lepiej poznać procesy, które mogły doprowadzić do zróżnicowania genetycznego pomiędzy polskimi populacjami wiązu górskiego, niezbędne jest podjęcie badań nad zmiennością wiązu polnego.

OCHRONA ZASOBÓW GENOWYCH. Po dokonaniu inwentaryzacji zasobów genowych wiązu górskiego w Polsce, a tym samym określeniu przynależności taksonomicznej stanowisk, w tym hybryd wiązu górskiego i polnego i późniejszej ocenie zmienności genetycznej populacji, należy zadbać o właściwe zachowanie ich naturalnych siedlisk. Spośród zinwentaryzowanych populacji należy wytypować do ochrony *in situ* te, w których można zlokalizować minimum 50 obradzających drzew i które charakteryzują się wysokim poziomem zmienności genetycznej. Działania hodowlane *in situ* koncentrować się powinny na propagowaniu i ochronie odnowień naturalnych, a także na wzmacnianiu, poprzez podsadzenia sztuczne, mniej licznych populacji i tych znajdujących się w stadium ubożenia zmienności genetycznej. Ważne jest podejmowanie działań hodowlanych polegających na tworzeniu z nasadzeń sztucznych korytarzy łączących istniejące populacje naturalne. W ramach działań *ex situ* należy przede wszystkim skoncentrować się na małych populacjach, poddanych silnej fragmentacji, na które wywierana jest silna presja wywołana DED (ang. Dutch Elm Disease). Ochrona *ex situ* polegać powinna na zakładaniu plantacji zachowawczych zarówno wegetatywnych, jak i generatywnych, najlepiej z tej samej strefy ekologicznej (regionu nasiennego), w celu zwiększenia efektywnej wielkości populacji. Dobrym sposobem ochrony zasobów genowych jest także zakładanie żywopłotów z reprezentujących daną populację lub różne populacje genotypów, co ogranicza możliwość infekcji przez owady z rodzaju *Scolytus*. Preferowanym sposobem długotrwałego przechowywania zasobów genowych z wszystkich wytypowanych do ochrony populacji jest metoda kriokonserwacji [Chmielarz 2007]. Przynajmniej kilka polskich populacji wiązu górskiego powinno zostać także włączonych do paneuropejskiego systemu EUFGIS ochrony *in situ* zasobów genowych wiązu górskiego [Collin i in. 2000; Eriksson 2001].

Wnioski

- ✦ Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze badania nad zmiennością wiązu górskiego w Europie, wskazując, że jest to gatunek o stosunkowo niskim poziomie zmienności genetycznej i dużym zróżnicowaniu międzypopulacyjnym.
- ✦ W naturze wiąz górski bardzo często krzyżuje się z wiązem polnym, wytwarzając osobniki mieszańcowe, dlatego aby lepiej zrozumieć procesy związane ze stwierdzonym znacznym zróżnicowaniem genetycznym pomiędzy populacjami wiązu górskiego, niezbędne jest podjęcie badań nad zmiennością wiązu polnego. Badania te mogą dać odpowiedź, jaki jest potencjalny wpływ introgresji między tymi gatunkami na strukturę genetyczną wiązu górskiego.
- ✦ W programie zachowania zasobów genowych wiązu górskiego w Polsce należy zwrócić szczególną uwagę na populacje charakteryzujące się wysokim poziomem zmienności genetycznej i o dużej efektywnej wielkości populacji. Z przebadanych populacji dwie – Jarocin i Świdnica2 – wydają się najmniej wartościowe pod tym względem. Tym niemniej populacja z Jarocina ma zestaw kilku utrwalonych alleli prywatnych, które być może warto zachować. Jednak z uwagi

na dość powszechny proces przepływu genów pomiędzy więzem górskim i polnym nie wiadomo na obecnym etapie badań, czy te allele nie pochodzą od wiązu polnego.

- ✦ Zróżnicowanie genetyczne pomiędzy populacjami wiązu górskiego w Polsce może być wynikiem niekorzystnych procesów losowych związanych z redukcją wielkości populacji (będącej skutkiem choroby wiązów). W związku z tym w trakcie realizacji przyszłych programów restytucji tego gatunku zasadne byłoby mieszanie nasion pochodzących z różnych rejonów Polski.
- ✦ Należy opracować strategię ochrony *in situ* i *ex situ* zasobów genowych wiązów w Polsce, w tym ze szczególnym uwzględnieniem wiązu górskiego, gdyż żaden z naszych rodzimych gatunków wiązów nie podlega ochronie prawnej ani też nie jest ujęty w ustawie o leśnym materiale rozmnożeniowym.

Literatura

- Boratyńska K., Sękiewicz M., Boratyński A. 2015. Morfologia, systematyka i rozmieszczenie geograficzne. W: Bugała W., Boratyński A., Iszkuło G. [red.]. Wiązy. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań. 24-52.
- Burczyk J., Chybicki I. J., Trojankiewicz M. 2018. High genetic diversity promotes a common-garden trial of *Quercus robur* as a potential seed source. *Dendrobiology* 79: 1-9.
- Chapuis M. P., Estoup A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24 (3): 621-631.
- Chmielarz P. 2007. Kriogeniczne przechowywanie nasion leśnych drzew liściastych z kategorii *orthodox* i *suborthodox* (intermediate). Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
- Collada C., Fuentes-Utrilla P., Gil L., Cervera M. T. 2004. Characterization of microsatellite loci in *Ulmus minor* Miller and cross-amplification in *U. glabra* Hudson and *U. laevis* Pall. *Molecular Ecology Resources* 4 (4): 731-732.
- Collin E., Bilger I., Eriksson G., Turok J. 2000. The conservation of elm genetic resources in Europe. W: Dunn Ch. P. [red.]. The Elms. Breeding, Conservation, and Disease Management. Springer, Boston, MA. 281-293.
- Do C., Waples R. S., Peel D., Macbeth G. M., Tillett B. J., Ovenden J. R. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14 (1): 209-214.
- Eriksson G. 2001. Conservation of noble hardwoods in Europe. *Canadian Journal of Forest Research* 31 (4): 577-587.
- Jump A. S., Woodward F. I., Burke T. 2003. *Cirsium* species show disparity in patterns of genetic variation at their range-edge, despite similar patterns of reproduction and isolation. *New Phytologist* 160 (2): 359-370.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, Version 2.9.3.
- Leroy G., Carroll E. L., Bruford M. W., Dewoody J. A., Strand A., Waits L., Wang J. 2017. Next-generation metrics for monitoring genetic erosion within populations of conservation concern. *Evolutionary Applications*.
- Lewandowski A., Kowalczyk J., Litkowiec M., Urbaniak L., Rzońca M. 2017. Wybór elitarnych drzew matecznych sosny zwyczajnej i modrzewia europejskiego do założenia plantacji nasiennych 1,5 generacji. *Sylvan* 161 (11): 917-926.
- Lewandowski A., Litkowiec M. 2017. Genetic structure of the old black poplar population along the bank of the Vistula River in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86 (1): 3524.
- Litkowiec M., Lewandowski A., Wachowiak W. 2018. Genetic variation in *Taxus baccata* L.: A case study supporting Poland's protection and restoration program. *Forest Ecology Management* 409: 148-160.
- Martin del Puerto M., Garcia F. M., Mohanty A., Martin J. P. 2017. Genetic diversity in relict and fragmented population of *Ulmus glabra* Hudson in the Central System of the Iberian Peninsula. *Forests* 8 (5): 143.
- Meagher T. R. 2007. Paternity analysis in a fragmented landscape. *Heredity* 99: 563-564.
- Napierała-Filipiak A., Filipiak M., Jaworek J. 2014. Rozmieszczenie zasobów drzew z rodzaju wiaz (*Ulmus* spp.) w lasach Polski w świetle dokumentacji leśnej. *Sylvan* 158 (11): 811-820.
- Nielsen L. R., Kjær E. D. 2010. Gene flow and mating patterns in individuals of wych elm (*Ulmus glabra*) in forest and open land after the influence of Dutch elm disease. *Conservation Genetics* 11 (1): 257-268.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources* 6 (1): 288-295.
- Ralska-Jasiewiczowa M., Nalepka D., Goslar T. 2003. Some problems of forest transformation at the transition to the oligocratic *Homo sapiens* phase of the Holocene interglacial in northern lowlands of central Europe. *Vegetation History and Archaeobotany* 12 (4): 233-247.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8 (1): 103-106.
- Sork V. L., Smouse P. E. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology* 21 (6): 821-836.

- Weir B. S., Cockerham C. 1996. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- Whiteley R. E., Black-Samuelsson S., Clapham D. 2003. Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*. Molecular Ecology Resources 3 (4): 598-600.
- Zajac M., Zajac A. [red.]. 2001. Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce. Pracownia Chorologii Komputerowej Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
- Zalapa J. E., Brunet J., Guries R. P. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl) and across-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). Molecular Ecology Resources 8 (1): 109-112.