

MAGDALENA CHUDZIŃSKA, MONIKA LITKOWIEC, MAŁGORZATA PAŁUCKA,
ANNA PAŚLAWSKA, ANDRZEJ LEWANDOWSKI, CZESŁAW KOZIOŁ

Struktura klonalna wiązu polnego (*Ulmus minor* Mill.) w Polsce

Clonal structure of field elm (*Ulmus minor* Mill.) in Poland

ABSTRACT

Chudzińska M., Litkowiec M., Pałucka M., Paślawska A., Lewandowski A., Kozioł C. 2019. Struktura klonalna wiązu polnego (*Ulmus minor* Mill.) w Polsce. Sylwan 163 (10): 839-845. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylvan.2019042>.

Field elm (*Ulmus minor* Mill.) is distributed mainly across central and southern Europe. In Poland this species occurs in the lowlands and foothills, where it grows mainly in the floodplain forests along the rivers. *U. minor* exists in a variety of climatic and ecological conditions. It is capable to tolerate floods as well as drought. Currently, most populations of *U. minor* are small and fragmented resulting from human activity and Dutch elm disease. Moreover, in the natural field elm populations, vegetative propagation by root suckers or sprouting can be observed. All these factors may affect the level of genetic variation of *U. minor* populations in Poland. In the present study, we determined the level of genetic variation and the clonal diversity of twelve natural *U. minor* populations in Poland (407 individuals) using eight nuclear microsatellite loci. The obtained results indicate that the studied field elm populations are characterized by low level of genetic variation ($H_e=0.382$; $H_o=0.555$; $A=7.0$). Additionally, the high level of clonality in field elm populations was estimated. The clonality level of examined elm populations varied among them, and in some cases was very high. Out of the 407 individuals analysed for clonal structure only 61 multilocus genotypes were identified. Furthermore, only one genotype was identified in the three study populations of field elm, which means that in each of these populations all trees belong to one genet. The values of genotypic richness (R) were heterogeneous among populations, with mean 0.148. The knowledge on the genetic diversity and the clonal structure of *U. minor* populations is essential to make future decisions regarding conservation of genetic resources of this species in Poland.

KEY WORDS

clonality, field elm, genetic conservation, genetic variation, microsatellite markers

ADDRESSES

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

Monika Litkowiec ⁽¹⁾ – e-mail: monika.litkowiec@lbg.lasy.gov.pl

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

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

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

Czesław Kozioł ⁽¹⁾ – e-mail: czeslaw.koziol@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 polny (*Ulmus minor* Mill.), zwany również wiązem pospolitym, występuje w środkowej i południowej Europie, na północy sięgając po Danię i południową Szwecję, a na południu po wybrzeża Morza Śródziemnego w Azji i Afryce [Boratyńska i in. 2015]. W Polsce rośnie na nizinach i pogórzach, przede wszystkim w dolinach rzek i strumieni, w lasach łąkowych oraz w lasach porastających słoneczne i często dosyć suche zbocza [Napierała-Filipiak i in. 2014].

Do połowy XX wieku wiązy należały obok lip do najbardziej znanych i rozpowszechnionych gatunków dużych drzew liściastych w wielu krajach Europy [Napierała-Filipiak i in. 2014]. Według Ralskiej-Jasiewiczowej i in. [2003] maksimum występowania osiągnęły około 6,5 tys. lat temu, przed pojawieniem się na terytorium Polski plemion neolitycznych. Presja ze strony ludzi oraz holenderska choroba wiązów (ang. Dutch elm disease) doprowadziły do stopniowego zmniejszania się udziału wiązów w składzie lasów. Choroba wiązów wywołana grzybami patogenicznymi z rodzaju *Ophiostoma* rozprzestrzeniła się na rozległych obszarach Europy, Ameryki Północnej i Azji, powodując pandemię z bardzo wysoką śmiertelnością [Grzywacz 2015]. Według Łakomego i in. [2016] wiąz polny jest spośród naszych rodzimych wiązów gatunkiem najbardziej wrażliwym na tę chorobę.

Obecnie udział wiązu w składzie lasów Polski jest niewielki. Stanowiska tego gatunku są rozproszone i zwykle znacznie oddalone od siebie, a zdecydowana ich część to drzewostany, w których drzewa występują miejscowo lub pojedynczo [Napierała-Filipiak i in. 2016]. Takie rozmieszczenie może w znacznym stopniu przyczynić się do izolacji przestrzennej z jej negatywnymi konsekwencjami. Wzrost fragmentacji, izolacja populacji oraz redukcja jej efektywnej wielkości mogą powodować erozję puli genowej poprzez zwiększony dryf genetyczny, wzrost kojarzenia wsobnego, ograniczony przepływ genów i spadek tempa migracji. W efekcie w lokalnych populacjach może dochodzić do utraty zmienności genetycznej, a co za tym idzie spadku ich żywotności i zdolności adaptacyjnych [Sork, Smouse 2006]. Dodatkowo na spadek poziomu zmienności genetycznej może mieć wpływ fakt, że wiąz polny często rozmnaża się wegetatywnie przez odrośla. W rzeczywistości całe populacje wiązu polnego mogą być reprezentowane przez jednego osobnika [Lopez-Almansa i in. 2003; Giertych 2015].

Jedną z głównych strategii umożliwiających przystosowanie długo żyjących drzew do zmieniającego się środowiska jest utrzymywanie wysokiego poziomu zmienności genetycznej. Populacje charakteryzujące się tą cechą mają teoretycznie większe szanse na przetrwanie dzięki możliwości przekazywania kolejnym pokoleniom korzystnej kombinacji genów. Poznanie poziomu zmienności genetycznej oraz poziomu klonalności wiązu polnego jest też ważne ze względu na podejrzenie, że podobnie jak w zachodniej Europie populacje tego gatunku mogą charakteryzować się zawężoną pulą genową [Fuentes-Utrilla i in. 2014; Buiteveld i in. 2016]. Szeroko wykorzystywanym narzędziem do tego typu badań są markery mikrosatelitarne jądrowego DNA. Mimo że obecnie znane są markery mikrosatelitarne dla wiązu polnego [Whiteley i in. 2003; Collada i in. 2004], to jednak do tej pory w Polsce nie przeprowadzono badań nad zmiennością genetyczną i klonalnością tego gatunku.

Celem badań było określenie poziomu zmienności genetycznej oraz stopnia klonalności w polskich populacjach wiązu polnego. Zdobyta wiedza może być w przyszłości wykorzystana w działaniach mających na celu opracowanie strategii ochrony tego gatunku w Polsce.

Materiał i metody

Materiał do badań w postaci liści wiązu polnego zebrano w latach 2016-2018 z 12 populacji znajdujących się na terenie 6 regionalnych dyrekcji Lasów Państwowych (tab. 1). Liczba osobników

Tabela 1.

Numer identyfikacyjny populacji (Pop.), lokalizacja (nadleśnictwo, leśnictwo i oddział lub rezerwat przyrody (RP)), współrzędne geograficzne (E, N) oraz liczba drzew, z których pobrano materiał do badań (Ndrz)

Identification number (Pop.), location (Lokalizacja: forest district, forest range and compartment or nature reserve (RP)), longitude (E) and latitude (N) as well as number of trees from which research material was collected (Ndrz) from the studied populations

Pop.	Lokalizacja		E	N	Ndrz
1	Hajnówka	Sacharewo 413 D	23°37'11,05"	52°42'19,36"	18
2	Łąck	Luszyn 147 C	19°44'16,44"	52°15'55,44"	16
3	Antonin	RP Wydymacz	17°51'05,76"	51°31'05,52"	29
4	Czerniejewo	RP Wiązy w Nowym Lesie	17°28'09,48"	52°28'14,16"	44
5	Krotoszyn	RP Dąbrowa Smoszew	17°30'16,56"	51°39'17,28"	50
6	Dobieszyn 1	Sucha 143k	20°53'39,48"	51°38'19,32"	51
7	Dobieszyn 2	Sucha 95Ac, nx	20°56'01,68"	51°38'07,80"	51
8	Dobieszyn 3	Turno 51 a, c	20°56'13,20"	51°39'25,20"	10
9	Staszów	Kleczanów 06d	21°31'34,18"	50°45'08,68"	39
10	Jamy	RP Łęgi na Ostrowiu Panieńskim	18°24'29,88"	53°21'20,16"	25
11	Toruń	RP Wielka Kępa	18°11'17,52"	53°08'37,32"	20
12	Wołów	Prawików 339 b	16°28'34,32"	51°14'58,56"	56

w populacjach związana była z różną liczbą drzew wiązu polnego występujących na danym terenie i wynosiła od 10 w populacji Dobieszyn 3 (Pop. 8) do 56 w populacji Wołów (Pop. 12). Łącznie zebrano liście z 409 osobników. Przed rozpoczęciem analiz laboratoryjnych materiał przechowywany był w zamkniętych kopertach w temperaturze pokojowej.

Przed przystąpieniem do izolacji DNA wykonano naważki po 20 mg tkanki roślinnej. Następnie tkankę poddano homogenizacji w młynie kulowym MM 400 (Retsch, Niemcy). W celu wyizolowania DNA użyto komercyjnych zestawów ISOLATE II Plant DNA Kit firmy Bioline (Wielka Brytania), z niewielkimi zmianami.

Wstępnie przetestowano 23 jądrowe loci mikrosatelitarne opracowane dla rodzaju *Ulmus*: Ulm2, Ulm3, Ulm6, Ulm9, Ulm12, Ulm19 i Ulm8 [Whiteley i in. 2003], Ulmi1-11, Ulmi1-21, Ulmi1-98, Ulmi1-165 i Ulmi2-16 [Collada i in. 2004] oraz UR101, UR123, UR138, UR141, UR153, UR158, UR159, UR173a, UR173b, UR175 i UR188a [Zalapa i in. 2008]. Ostatecznie wybrano 8 loci mikrosatelitarnych charakteryzujących się czytelnymi elektroforogramami i wysokim polimorfizmem: Ulm2, Ulmi1-165, Ulmi1-21, UR141, UR158, UR159, UR175 i UR188a.

Zaprojektowano reakcję typu multipleks, gdzie równocześnie było amplifikowanych 8 wcześniej wybranych loci, która została przeprowadzona w objętości 10 µl, przy użyciu odczynników Multiplex Master Mix (Qiagen, Niemcy), według procedury dołączonej przez producenta. Amplifikację prowadzono w termocyklerze Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Niemcy): wstępna denaturacja w 94°C przez 3 min, denaturacja w 94°C przez 15 s, annealing w 53°C przez 1 min 30 s, elongacja w 72°C przez 2 min (30 cykli) i końcowa elongacja w 72°C przez 20 min.

Produkty amplifikowanych loci poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w analizatorze genetycznym 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta. Do analizy fragmentów 8 mikrosatelitarnych loci wykorzystano program GeneMapper® (ver. 4.0; Thermo Fisher Scientific, USA), który umożliwia odczytanie wielkości fragmentów mikrosatelitarnych w porównaniu z wewnętrznym markerem wielkości GENESCAN-600LIZ (Thermo Fisher Scientific, USA).

Strukturę klonalną poszczególnych populacji okroślono za pomocą programu GENCLONE 2.0 [Arnaud-Hoand, Belkhir 2007] w oparciu o następujące parametry: liczba osobników w populacji (N), liczba obserwowanych genotypów (genetów, G), liczba unikatowych genotypów (genetów składających się tylko z pojedynczej ramety, G_u) oraz bogactwo genotypów ($R=(G-1)/(N-1)$). Dodatkowo określono liczbę ramet (drzew) w poszczególnych genetach (N_c).

Poziom zmienności genetycznej poszczególnych loci mikrosatelitarnych określono w oparciu o liczbę alleli (A), efektywną liczbę alleli w locus (A_e) oraz heterozygotyczność oczekiwaną (H_e) i obserwowaną (H_o). Do obliczeń wykorzystano programy FSTAT 2.9.3 [Goudet 2001] oraz GENALEX 6.5 [Peakall, Smouse 2006].

W celu sprawdzenia, czy badane populacje wiązu polnego wykazują istotne statystycznie odchylenie od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga, zastosowano metodę Monte Carlo łańcuchów Markowa (MCMC), będącą odpowiednikiem testu dokładnego (ang. exact test) [Weir, Cockerham 1996]. Wartość odchylenia przedstawiono za pomocą współczynnika wsobności F_{is} wyliczonego dla każdego locus. Do obliczeń użyto programu GENEPOP v. 4.0 [Rousset 2008].

Wyniki

STRUKTURA KLONALNA. Do analiz wybrano tylko osobniki z pełnym genotypem uzyskanym dla wszystkich zastosowanych jądrowych loci mikrosatelitarnych. Spośród 407 analizowanych osobników całkowita liczba zidentyfikowanych genotypów (genetów) wyniosła 61. Stwierdzony poziom klonalności wśród badanych populacji był bardzo zróżnicowany (tab. 2). Liczba zidentyfikowanych genotypów mieściła się w zakresie od 1 w populacjach Dobieszyn 3 (Pop. 8), Staszów (Pop. 9) i Toruń (Pop. 11), co oznacza, że w każdej z tych populacji wszystkie drzewa były jednym genetem, do 12 w populacji Wołów (Pop. 12). Genety z największą liczbą ramet (drzew) znaleziono w populacjach Krotoszyn (Pop. 5) i Dobieszyn 1 (Pop. 6), odpowiednio 49 i 46. Unikatywne genotypy G_u (czyli takie, które występowały tylko u jednego osobnika) zaobserwowano w 8 populacjach. Ich liczba wahała się od 1 w populacjach Czerniejewo (Pop. 4) i Krotoszyn (Pop. 5) do 9 w populacji Łąck (Pop. 2). W 4 populacjach nie znaleziono osobników z genotypem unikatowym

Tabela 2.

Klonalność populacji *Ulmus minor* w Polsce (1-12): liczba zidentyfikowanych genotypów (G), liczba unikatowych genotypów (G_u), liczba ramet (drzew) w genotypie (N_c) oraz bogactwo genotypów (R)
Clonality in *Ulmus minor* populations (1-12) in Poland: number of identified multilocus genotypes (G), number of unique genotypes (G_u), number of trees/ramets in MGL (N_c) and genotypic richness (R)

	G	G_u	N_c	R
1	2	0	2 (2,16)	0,059
2	11	9	2 (2,5)	0,667
3	6	2	4 (2,6,8,11)	0,178
4	6	1	5 (2,2,3,5,31)	0,116
5	2	1	1 (49)	0,020
6	4	3	1 (46)	0,062
7	4	2	2 (18,31)	0,060
8	1	0	1 (10)	0
9	1	0	1 (39)	0
10	11	3	8 (2,2,2,2,2,3,3,6)	0,417
11	1	0	1 (20)	0
12	12	6	6 (2,3,3,4,6,32)	0,200
Razem In total	61	27	34	0,148

wym G_u . Najwyższe bogactwo genotypowe (R) stwierdzono w populacji Łąck (0,667), przy średniej 0,148.

POLIMORFIZM MARKERÓW GENETYCZNYCH. Przeprowadzone analizy wykazały niski poziom zmienności genetycznej 8 jądrowych loci mikrosatelitarnych. Poziom zmienności genetycznej dla poszczególnych loci mikrosatelitarnych przedstawia tabela 3. Ogółem stwierdzono 56 alleli, tj. wariantów różniących się liczbą par zasad. Liczba alleli w locus mieściła się zakresie od 4 (locus UR141, UR188a) do 13 (locus Ulmi1-165), przy średniej 7,0. Znacznie mniejsza była efektywna liczba alleli w locus (A_e), wynosząca od 1,4 (locus UR188a) do 2,7 (locus Ulmi1-21), przy średniej 1,9. Średnia wartość heterozygotyczności obserwowanej (H_o) wynosiła 0,555. Najniższą wartość heterozygotyczności oczekiwanej ($H_e=0,181$) stwierdzono w locus UR188a, a najwyższą ($H_e=0,583$) w locus Ulmi1-21. Średnia wartość dla heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) wyniosła 0,382. Jedynie locus Ulmi1-165 odbiega od równowagi Hardy'ego-Weinberga i odchylenie to jest istotne statystycznie ($p<0,001$).

Tylko w 3 na 12 badanych populacji zidentyfikowano więcej niż po 10 odrębnych genotypów (tab. 2), w związku z tym w prezentowanej pracy nie przeprowadzono analizy zmienności genetycznej dla poszczególnych populacji.

Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że badane populacje wiązu polnego w Polsce charakteryzują się ogólnie niskim poziomem zmienności genetycznej i stosunkowo wysoką klonalnością. Wcześniejsze badania nad zmiennością genetyczną wiązów polnych na terenie Europy wskazują również na niski poziom zmienności jądrowych loci mikrosatelitarnych. Z zestawu 8 analizowanych loci 3 były wcześniej badane w populacjach hiszpańskich [Fuentes-Utrilla i in. 2014]. W locus Ulm2 w materiale z Hiszpanii znaleziono 7 alleli, zaś w Polsce 6 alleli. W locus Ulmi1-21 w Polsce zidentyfikowano 10 alleli, natomiast w Hiszpanii 9 alleli. Z kolei w najbardziej zmiennym locus Ulmi1-165 w Polsce było 13 alleli, a w Hiszpanii aż 19. Heterozygotyczność oczekiwana w badanych populacjach z Polski ($H_e=0,382$) była porównywalna z poziomem heterozygotyczności oczekiwanej dla populacji hiszpańskich ($H_e=0,333-0,592$) [Fuentes-Utrilla i in. 2014] i nieco niższa od poziomu heterozygotyczności oczekiwanej wykrytej w populacjach holenderskich

Tabela 3.

Liczba alleli (A), efektywna liczba alleli (A_e), heterozygotyczność obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e) oraz współczynnik wsobności (F_{is}) analizowanych loci mikrosatelitarnych

Number of alleles (A), effective number of alleles (A_e), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity as well as Wright's fixation index (F_{is}) for investigated microsatellite loci

	A	A_e	H_o	H_e	F_{is}
Ulm2	6	1,6	0,484	0,293	-0,660
Ulmi1-165	13	2,3	0,576	0,457	-0,193*
Ulmi1-21	10	2,7	0,889	0,583	-0,543
UR141	4	1,6	0,558	0,341	-0,727
UR158	6	1,7	0,377	0,331	-0,226
UR159	5	1,8	0,624	0,411	-0,525
UR175	8	2,0	0,698	0,463	-0,505
UR188a	4	1,4	0,230	0,181	-0,337
Średnia Average	7,0	1,9	0,555	0,382	-0,465

*istotne dla $p<0,001$; significant at $p<0,001$

($H_c=0,483-0,628$) [Buiteveld i in. 2016]. Stwierdzony w przeprowadzonych badaniach poziom zmienności genetycznej wiązu polnego ($A=7,0$, $A_c=1,9$, $H_c=0,383$) jest zdecydowanie niższy od poziomu zmienności wiązu górskiego w Polsce ($A=13,2$, $A_c=3,2$, $H_c=602$) [Chudzińska i in. 2018]. Również w porównaniu z innymi gatunkami roślin drzewiastych występujących w Polsce – jak jarząb brekinia (*Sorbus torminalis* (L.) Crantz), gdzie $A=10$ i $H_c=0,756$ [Jankowska-Wróblewska i in. 2016], czy topola czarna (*Populus nigra* L.), gdzie $A=14,7$ i $H_c=0,731$ [Lewandowski, Litkowiec 2017] – populacje wiązu polnego wykazują znacząco niższy poziom zmienności genetycznej. Jest wysoce prawdopodobne, że wiązy mogły utracić wysoki poziom zmienności genetycznej już w obszarach refugialnych czy też w trakcie wędrówki gatunku po ostatnim zlodowaceniu, w wyniku rozprzestrzeniania się w całej Europie holenderskiej choroby wiązów – podobnej do epidemii, z jaką mamy do czynienia również współcześnie [Ralska-Jasiewiczowa i in. 2003].

W przypadku struktury klonalnej podobne wyniki uzyskano dla holenderskich populacji wiązu polnego, w których na 159 przebadanych osobników znaleziono tylko 66 genotypów, a bogactwo genotypowe (R) zawierało się w zakresie od 0,06 do 0,96 [Buiteveld i in. 2016]. W populacjach hiszpańskich duża klonalność występuje na wyspach Minorka i Majorka (u 169 osobników znaleziono 14 genotypów, gdzie $R=0-0,11$). Na Półwyspie Iberyjskim klonalność jest już dużo niższa – u 90 zbadanych osobników znaleziono 81 genotypów ($R=0,86-0,96$) [Fuentes-Utrilla i in. 2014]. W Polsce badane populacje wiązu polnego charakteryzowały się wyższym poziomem klonalności (u 407 osobników – 61 genotypów) niż jarząb brekinia, gdzie u 172 osobników znaleziono 100 genotypów [Jankowska-Wróblewska i in. 2016].

Przeprowadzone badania dostarczają cennych informacji dla tworzenia przyszłych programów związanych z ochroną i restytucją wiązu polnego. Wykazano, że w polskich populacjach tego gatunku istnieje zróżnicowanie, a w niektórych przypadkach bardzo wysoki poziom klonalności. Istnieje podejrzenie, że niektóre populacje mogą składać się tylko z pojedynczego osobnika. Dlatego niezbędne są badania dotyczące struktury klonalnej każdej populacji, która miałaby być uwzględniona w programach ochrony i restytucji gatunku. Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na populacje z dużą liczbą genotów, w tym genotów unikatowych, jak populacje Łąck (Pop. 2), Jamy (Pop. 10) i Wołów (Pop. 12).

Wnioski

- ✦ Przeprowadzone badania wskazały na niski poziom zmienności genetycznej wiązu polnego w Polsce i jego stosunkowo dużą klonalność.
- ✦ Niski poziom zmienności genetycznej wiązu polnego może być wynikiem polodowcowej historii gatunku, jak również procesów demograficznych związanych z redukcją wielkości populacji oraz holenderskiej choroby wiązów, która także przyczyniła się do spadku liczebności populacji wiązów.
- ✦ W populacjach wiązu polnego Dobieszyn 3 (Pop. 8), Staszów (Pop. 9) i Toruń (Pop. 11) zidentyfikowano tylko jeden genotyp, co oznacza, że w każdej z tych populacji wszystkie drzewa były jednym genetem.
- ✦ W programach ochrony i restytucji wiązu polnego należałoby przeprowadzić badania dotyczące struktury klonalnej każdej populacji. Szczególną uwagę należy zwrócić na populacje z dużą liczbą genotów, w tym genotów unikatowych, jak populacje Łąck (Pop. 2), Jamy (Pop. 10) i Wołów (Pop. 12).

Literatura

Arnaud-Haond S., Belkhir K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7 (1): 15-17.

- Boratyńska K., Sękiewicz M., Boratyński A. 2015. Morfologia, systematyka, zmienność i rozmieszczenie geograficzne. W: Bugała W., Boratyński A., Iszkuło G. [red.]. Wiązy. Bogucki Wydawnictwo Naukowe. 24-52.
- Buiteveld J., Vanden Broeck A., Cox K., Collin E. 2016. Human impact on the Genetic diversity of Dutch field elm (*Ulmus minor*) populations in the Netherlands: implications for conservation. *Plant Ecology and Evolution* 149 (2): 165-176.
- Chudzińska M., Pałucka M., Paślawska A., Litkowiec M., Lewandowski A., Kozioł C. 2018. Wyniki wstępnych badań nad zmiennością genetyczną oraz zróżnicowaniem genetycznym między populacjami wiązu górskiego (*Ulmus glabra* Huds.) w Polsce. *Sylvan* 162 (9): 727-736. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylvan.2018064>.
- 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 Notes* 4 (4): 731-732.
- Fuentes-Utrilla P., Valbuena-Carabana M., Ennos R., Gil L. 2014. Population clustering and clonal structure evidence the relict state of *Ulmus minor* Mill. in the Balearic Islands. *Heredity* 113: 21-31.
- Giertych M. 2015. Genetyka. W: Bugała W., Boratyński A., Iszkuło G. [red.]. Wiązy. Bogucki Wydawnictwo Naukowe. 237-262.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.
- Grzywacz A. 2015. Ważniejsze choroby infekcyjne. W: Bugała W., Boratyński A., Iszkuło G. [red.]. Wiązy. Bogucki Wydawnictwo Naukowe. 324-367.
- Jankowska-Wróblewska S., Meyza K., Sztupecka E., Kubera Ł., Burezyk J. 2016. Clonal structure and high genetic diversity at peripheral populations of *Sorbus terminalis* (L.) Crantz. *iForest* 9 (6): 892-900.
- 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.
- Lopez-Almansa J. C., Pannel J. R., Gil L. 2003. Female sterility in *Ulmus minor* (*Ulmaceae*): a hypothesis involving the cost of sex in a clonal plant. *American Journal of Botany* 90 (4): 603-609.
- Łakomy P., Kwaśna H., Kuźmiński R., Napierała-Filipiak A., Filipiak M., Behnke K., Behnke-Borowczyk J. 2016. Investigation of *Ophistoma* population infected elms in Poland. *Dendrobiology* 76: 137-144.
- Napierała-Filipiak A., Filipiak M., Jaworek J. 2014. Rozmieszczenie zasobów drzew z rodzaju wiąz (*Ulmus* spp.) w lasach Polski w świetle dokumentacji leśnej. *Sylvan* 158 (11): 811-820. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylvan.2014017>.
- Napierała-Filipiak A., Filipiak M., Łakomy P., Kuźmiński R., Gubański J. 2016. Changes in elm (*Ulmus*) populations of mid-western Poland during the past 35 years. *Dendrobiology* 76: 145-156.
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 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. *Mol Ecol Resour.* 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: Method 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 Notes* 3 (4): 598-600.
- 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 Notes* 8 (1): 109-112.