

## Czy na plantacjach nasiennych zawężamy zmienność genetyczną? Próba odpowiedzi na podstawie analiz mikrosatelitarnego DNA szczepów rosnących na plantacji nasiennej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) z Nadleśnictwa Susz

Are we narrowing genetic variability in seed orchards? An attempt to answer, based on the analysis of microsatellite DNA of grafts growing in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchard in the Forest District Susz

Paweł Przybylski

Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn  
Tel. +48 22 7150460, fax +48 22 7200397, e-mail: p.przybylski@ibles.waw.pl

**Abstract.** Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the most common species in Poland's forest stands. The mode of pine stands renovation requires that silviculture practitioners have continuous access to seed banks. Orchard-grown seeds are predicted to constitute an increasingly larger part of the average demand for pine seeds in Poland. Seed orchards, due to a limited number of maternal trees as well as the irregularity of their blooming and pollination, enhance the risk of genetic diversity reduction in planted forest stands. This is of particular importance in the context of dynamic climate change. Markers based on microsatellite DNA fragments are effective tools for monitoring genetic variability. In the present study, three different microsatellite DNA fragments were used: SPAC 12.5, SPAG 7.14 and SPAC 11.4. The main objective of this research was to study genetic variability in one of the biggest seed orchards in Poland, located in the Forest District Susz. The obtained results indicated heterozygosity loss within the orchard, proving the existence of specimen selection effects on genetic variability. Hence, it seems quite important to take account of molecular genetic variability of maternal trees in future breeding strategies.

**Keywords:** microsatellite DNA, tree breeding, seed orchard

### 1. Wstęp

Sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.) należy do podstawowych gatunków lasotwórczych w Polsce. Według „Raportu o stanie lasów w Polsce na rok 2011” (CILP 2012) zajmuje ona 59,9% powierzchni leśnej wszystkich form własności. Zgodnie z wiedzą z zakresu ekologii i hodowli sosny przypuszcza się, że dla gatunku w najbliższych dziesięcioleciach materiał sadzeniowy będzie głównie pochodził ze szkółek leśnych. Dla gospodarki leśnej oznacza to potrzebę stałego dostępu do bazy nasiennej, którą stanowią obecnie w 88% drzewostany znanego pochodzenia (dawniej: gospodarze drzewostany nasienne), w 6% drzewostany wyselekcjonowane (dawniej: wyłączone drzewostany nasienne) i w 6% plantacje nasienne pochodzenia genetywnego i wegetatywnego (Plantacje nasienne w Lasach Państwowych – stan obecny i perspektywy” dane niepublikowane DGLP).

Rozwój nasiennictwa w Polsce przewiduje zwiększenie wykorzystania nasion z plantacji nasiennych. Z tego źródła planuje się pozyskać do 40% ogólnego zapotrzebowania na nasiona (Chałupka et al. 2010). Tendencja ta wynika m.in. z przesłanek rynkowych związanych z prognozowanym zwiększeniem popytu na surowiec drzewny. Omawiany wzrost zapotrzebowania jest jednak sprzeczny z szeroko pojętą ekologizacją gospodarki leśnej, uwzględniającą m.in. ochronę konserwatorską siedlisk leśnych. Dlatego należy dążyć do uzyskania wzrostu intensywności produkcji surowca drzewnego, na zmniejszonym obszarze drzewostanów gospodarczych. Warunek wyższej produkcji na mniejszym terenie ma szansę zostać spełniony, gdy pokolenie potomne drzewostanu będzie poprzez proces selekcji w większości dziedziczyło cechy pożądane gospodarczo. Ulepszone genetycznie nasiona pozyskuje się z plantacji nasiennych, a miarą opisującą efektywność tego procesu jest zysk genetyczny. Przykładowo w Szwecji uzyskiwany zysk

Wpłynęło: 30.06.2014 r., recenzowano: 15.08.2014 r., zaakceptowano: 2.02.2015 r.

genetyczny w drzewostanach wyhodowanych z nasion pochodzących z plantacji nasiennych trzeciej generacji wynosi 25% (Almqvist 2013).

Proces selekcji prowadzonej na plantacjach nasiennych, poza pozytywnym z punktu widzenia hodowcy zyskiem genetycznym, wprowadza i negatywne aspekty. Jako główny należy wymienić ograniczenie liczby osobników pokolenia matecznego, co w konsekwencji może doprowadzić do erozji genetycznej w pokoleniu potomnym i obniżenia plastyczności drzewostanów powstałych z nasion zebranych z plantacji. Niektórzy autorzy, jak: Koski (1980, 1982), Lindgren i Matheson (1986), Burczyk (1998), Kang (2001), za możliwą przyczynę zmniejszenia zmienności genetycznej na plantacjach uważają zbyt małą liczbę genotypów i ich nierównomierny udział w tworzeniu pokolenia potomnego. Poza tym przy wyborze drzew stanowiących pokolenie mateczne decydującą rolę odgrywają obecnie cechy fenotypowe. Nie ma natomiast informacji dotyczących intensywności kwitnienia i pylenia poszczególnych osobników oraz ich wartości genetycznej (White et. al 1993; Gömöry et. al 2000). Brak powyższych danych może być przyczyną niespełnienia postulatów panmiksji na plantacjach, o czym pisali m.in. Friedman i Adams (1981).

W celu zachowania zmienności genetycznej plantacje nasienne w Polsce zakłada się z minimum 40 klonów dla sosny i świerka, a 30 klonów dla pozostałych gatunków. Teoretycznie hodowcy przyjmują, że wszystkie posadzone rośliny uczestniczą w procesie rozmnażania generatywnego. Postulat ten jest jednak nierealny, dlatego też na całym świecie trwają intensywne prace badawcze dotyczące określenia minimalnej liczby osobników na plantacjach w celu zachowania zmienności genetycznej przyszłych populacji. Olsson i Lindgren (2001) rekomendują zakładanie nowych plantacji nasiennych z 20–30 klonów. McKeand i in. (2003)

wspominają o plantacjach nasiennych założonych jedynie z 5–10 klonów. Zagadnienie to studiowano także w Kolumbii Brytyjskiej (Stoehr, El-Kassaby 1997), gdzie obliczono, że użycie większej od siedmiu liczby klonów, mierzonej miarą efektywnej liczby klonów, jest wystarczającą wielkością populacji do uzyskania akceptowanej zmienności genetycznej.

Według Stoehr i El-Kassaby (1997) prowadzone prace przynoszą zamierzony efekt i plantacje nasienne zmniejszają zmienność genetyczną w akceptowanym i kontrolowanym zakresie. Przykładowo El-Kassaby i Benowicz (2000) opisali wyższą efektywną liczbę alleli na plantacjach nasiennych niż w populacjach naturalnych (tab. 1). Podobne wyniki otrzymano dla sosny przy porównaniu zmienności genetycznej plantacji nasiennych z drzewostanami naturalnymi (Matheson, Lindgren 1985; Kosińska et al. 2007).

Ponadto na plantacjach nasiennych, podobnie jak w dojrzałych drzewostanach sosnowych, często obserwuje się wzrost poziomu heterozygotyczności. O tym zjawisku pisali m.in. Prus-Głowacki i Nowak-Bzowy (1992). Tendencję tę tłumaczy się eliminacją, wraz z wiekiem populacji, osobników homozygotycznych powstałych na skutek samozapłodnienia lub zapłodnienia blisko spokrewnionych osobników. Burczyk (1998) stwierdził ponadto ujemne wartości współczynnika wsobności w populacji potomnej, powstałej z nasion pozyskanych z plantacji nasiennych. Wynik ten świadczy o przewadze krzyżowania nie krewniaczego, które Burczyk (1998) uważa za efekt specyficznego rozmieszczenia klonów na plantacji oraz zmienności w fenologii kwitnienia.

W świetle tych danych powstaje pytanie, czy zmienność genetyczna na plantacjach nasiennych jest istotnie zawężana. Odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą można uzyskać, wykorzystując zmienność markerów molekularnych.

**Tabela 1. Porównanie parametrów zmienności genetycznej pomiędzy populacją: naturalną, hodowlaną, hodowlaną pierwszej i drugiej generacji dla daglezi zielonej (El-Kassaby, Ritland 1995)**

Table 1. Comparison of genetic variability parameters between Douglas fir natural population and breeding population (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation) (El-Kassaby, Ritland 1995)

Populacja Population	Procent polimorficznych loci Percent of polymorphic loci (%)	Liczba alleli na locus Number of alleles per locus	Heterozygotyczność oczekiwana Expected heterozygosity
<b>Drzewostan naturalny</b> Natural stand	53	2,14	0,171
<b>Populacja hodowlana</b> Breeding population	65	2,50	0,176
<b>Populacja hodowlana 1. generacji</b> Breeding population 1 <sup>st</sup> generation	63	2,28	0,172
<b>Populacja hodowlana 2. generacji</b> Breeding population 2 <sup>nd</sup> generation	56	2,25	0,163

Niestety niewiele jest opracowań na temat zmienności genetycznej polskich plantacji nasiennych na podstawie markerów DNA. Nieliczne znane autorowi badania to rozprawy doktorskie Trojankiewicz (2006) i Cieślewicza (2009). Zatem prezentowane wyniki są cennym uzupełnieniem wiedzy dotyczącej potencjalnego zawężenia zmienności genetycznej na skutek selekcji fenotypowej.

Celem badań było określenie poziomu zmienności genetycznej drzew matecznych sosny zwyczajnej, tworzących plantację nasienną w Nadleśnictwie Susz. Otrzymane wyniki pozwolą m.in. dać odpowiedź na pytanie: jaki wpływ na pulę genów i parametry zmienności genetycznej plantacji nasiennej ma wybór ograniczonej liczby roślin tworzących pokolenie mateczne.

## 2. Materiały i metodyka

### Material roślinny

Materiałem roślinnym wykorzystanym w badaniach były igły zebrane wczesną wiosną 2011 roku z plantacji nasiennej im. doc. S. Kocięckiego w Nadleśnictwie Susz, zlokalizowanej w Krainie Bałtyckiej. Plantacja powstała w latach 1977–1985 na powierzchni 32,25 ha, w jej ramach założono 30 kwater, w których rozmieszczono 175 klonów. Wybrany

do badań materiał roślinny pozwolił opisać zmienność genetyczną 117 klonów drzew matecznych. Analizy genetyczne przeprowadzono jedynie na genotypach, które zostały pozytywnie zweryfikowane z genotypem drzewa matecznego rosnącego w terenie. Wybrane drzewa mateczne pochodziły z pięciu nadleśnictw: Jagielek, Susz, Stare Jabłonki, Miłomłyn, Kudypy (tab. 2).

### Badane markery mikrosatelitarnego DNA

W badaniach wykorzystano trzy polimorficzne systemy mikrosatelitarnego DNA: SPAC 12.5, SPAG 7.14 i SPAC 11.4 (Sorenzo et al. 1998). W celu przeprowadzenia analiz wyekstrahowano całkowite DNA z zebranego materiału roślinnego. Do wykonania ekstrakcji wykorzystano komercyjny zestaw do izolacji A&A Biotechnology. Wydajność ekstrakcji weryfikowano w 1% żelu agarozowym za pomocą skanera GelDoc™Xr+ z programem ImageLab 4.0 firmy BioRad. Uzupełniającą metodą weryfikacji jakości materiału genetycznego była absorbcja fali świetlnej 260 i 280 nm. Pomiar wykonano, wykorzystując urządzenie NanoDrop ND 1000.

W następnym etapie, stosując łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), namnożono wybrane markery mikrosatelitarnego DNA. W reakcji PCR wykorzystano: 12,5µl

**Tabela 2. Wykaz badanych drzew matecznych**

Table 2. List of examined maternal trees

Nr drzewa IBL FRI Ref. No.	Rok uznania Year of confirmation	Nadleśnictwo Forest district	Leśnictwo Forest division	Oddział Compartment
335	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	96g
336	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
337	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100a
339	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
341	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
342	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
344	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
345	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
347	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
348	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
349	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
350	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	101d
351	1970	Miłomłyn	Tabórz	94c
352	1970	Miłomłyn	Przylądek	132b
353	1970	Miłomłyn	Przylądek	132b
354	1970	Miłomłyn	Przylądek	132b
359	1970	Miłomłyn	Perskie	7d
360	1970	Miłomłyn	Perskie	8b

<b>Nr drzewa IBL</b> FRI Ref. No.	<b>Rok uznania</b> Year of confirmation	<b>Nadleśnictwo</b> Forest district	<b>Leśnictwo</b> Forest division	<b>Oddział</b> Compartment
361	1970	Miłomłyn	Perskie	8b
362	1970	Miłomłyn	Zakątek	105c
364	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
365	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
366	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
367	1970	Stare Jabłonki	Białe Błota	254b
1311	1970	Stare Jabłonki	Białe Błota	254b
1316	1974	Miłomłyn	Bagińsko	132a
1317	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1318	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1319	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1320	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1321	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1322	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1323	1974	Miłomłyn	Zakątek	106c
1324	1974	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
1325	1974	Miłomłyn	Tabórz	94c
1326	1974	Miłomłyn	Tabórz	94c
1695	1975	Miłomłyn	Tabórz	70d
1697	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	101d
1698	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	100f
1699	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	80i
1705	1975	Stare Jabłonki	Gąsiorzy	243a
1708	1975	Kudypy	Stary Dwór	293c
1713	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
1714	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
1715	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1716	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1717	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1718	1975	Kudypy	Żelazowice	480a
1719	1975	Kudypy	Żelazowice	480a
1720	1975	Kudypy	Żelazowice	488h
1721	1975	Kudypy	Żelazowice	488h
1725	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
2118	1976	Susz	Michałowice	18d
2127	1975	Kudypy	Stara Góra	287h
2128	1976	Kudypy	Stary Dwór	293c
2130	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
2131	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
2133	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c

<b>Nr drzewa IBL</b> FRI Ref. No.	<b>Rok uznania</b> Year of confirmation	<b>Nadleśnictwo</b> Forest district	<b>Leśnictwo</b> Forest division	<b>Oddział</b> Compartment
2135	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
2136	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
2137	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	57i
2138	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2139	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2140	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2141	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2142	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2143	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2144	1976	Stare Jabłonki	Draby	150h
2145	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2147	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2148	1976	Stare Jabłonki	Draby	159m
2149	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2151	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2152	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2153	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2154	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2155	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2156	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2157	1976	Stare Jabłonki	Draby	187a
2158	1976	Kudypy	Żelazowice	480c
2159	1976	Kudypy	Stara Góra	310d
2161	1976	Miłomłyn	Przemysławów	138f
2165	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2166	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2167	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2168	1976	Miłomłyn	Zakątek	108d
2169	1976	Miłomłyn	Perskie	7a
2170	1976	Miłomłyn	Perskie	27c
2171	1976	Miłomłyn	Perskie	7a
2172	1976	Miłomłyn	Perskie	28a
2173	1976	Miłomłyn	Perskie	28a
2174	1976	Miłomłyn	Jeziory	85n
2201	1976	Kudypy	Stary Dwór	360a
2202	1976	Kudypy	Stary Dwór	346b
2204	1976	Stare Jabłonki	Draby	150a
2205	1976	Stare Jabłonki	Draby	150a
2207	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2208	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d

Nr drzewa IBL FRI Ref. No.	Rok uznania Year of confirmation	Nadleśnictwo Forest district	Leśnictwo Forest division	Oddział Compartment
2210	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2211	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2212	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2213	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2214	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2215	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2222	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2223	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2224	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2225	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2226	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2227	1976	Stare Jabłonki	Ostrowin	296g
2228	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	281i
2229	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	281f
2230	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	281f
2232	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	243a
2233	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	243a
2234	1976	Stare Jabłonki	Gąsiory	243a
2235	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d

mieszaniny 2xPCR MixPlus Hight GC (Taq DNA polimeraza 0,1 U/ $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4mM, dNTPs 0,5mM, odczynniki podwyższające specyficzność reakcji) (A&A Biotechnology), startery znakowane fluoroscencyjnie o stężeniu 5 $\mu$ M SPAG 7.14 (1  $\mu$ l), SPAC 12.5 (1  $\mu$ l), SPAC 11.4 (1  $\mu$ l) (SigmaAldrich) oraz DNA matrycowe o stężeniu końcowym 20 ng/ $\mu$ l (1  $\mu$ l).

Mieszaninę umieszczono w termocyklerze Eppendorf Mastercycler eGradientS zaprogramowanym na 40 cykli (Soranzo et al. 1998). Cykl obejmował trzy etapy: denaturację 92°C (60 s), annealing 56°C (60 s), elongację 72°C (60 s). Wstępna denaturacja odbywała się w 94°C (5 min), a finałowa elongacja w 70°C (7 min). Wydajność PCR weryfikowano w 2% żelu agarozowym za pomocą skanera GelDoc<sup>tm</sup>Xr+ w programie ImageLab 4.0 firmy BioRad.

Próby rozdzielono na sekwenatorze kapilarnym Beckman Coulter, a produkty reakcji archiwizowano za pomocą programu CEQ<sup>TM</sup>800. Elektroforezę kapilarną wykonano w polimerze LPA I, wykorzystując standard długości Frag I. Uzyskane wartości pogrupowano w klasy alleli z dokładnością do jednej pary zasad (pz.).

### Analizy statystyczne

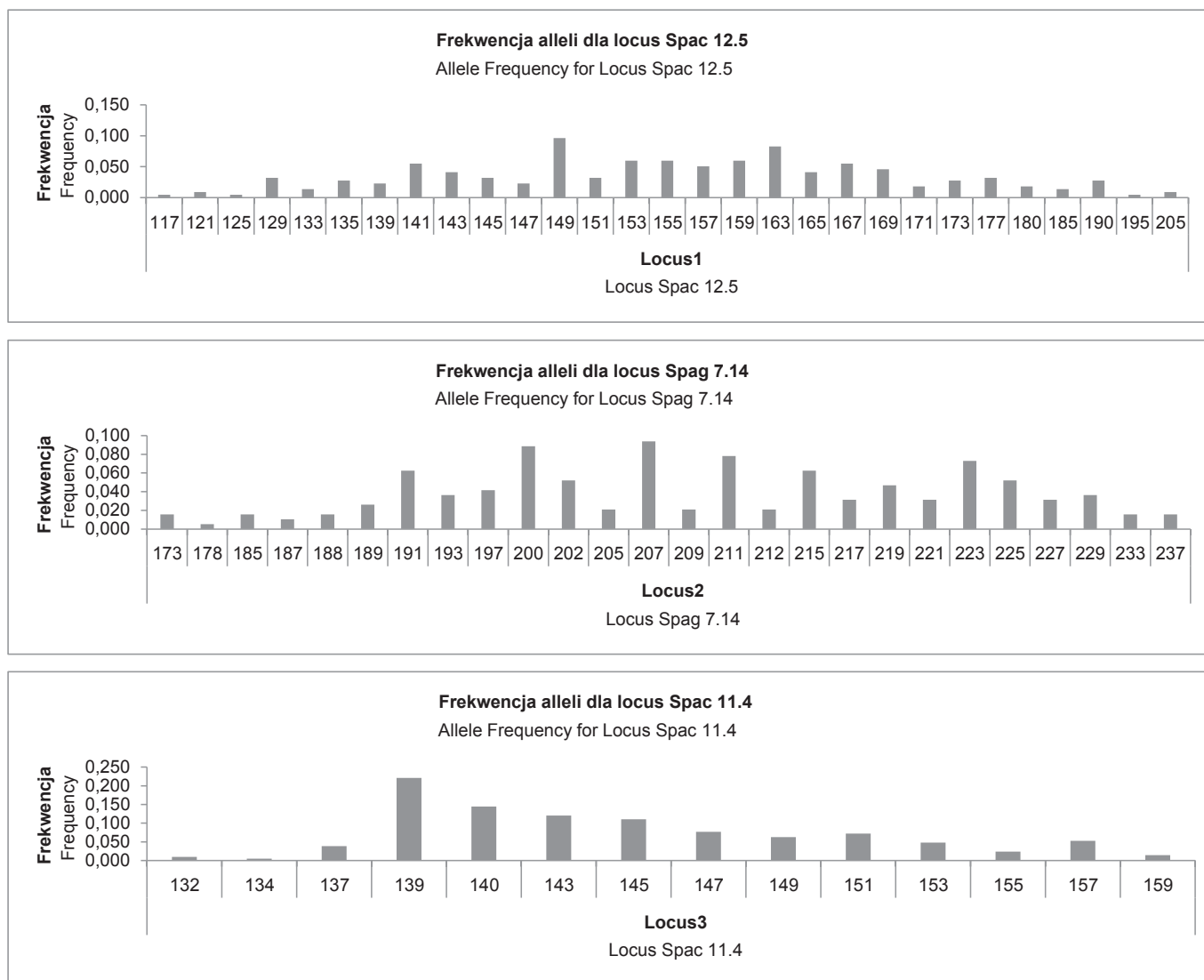
W celu obliczenia parametrów zmienności genetycznej plantacji nasiennej posłużono się programami kom-

puterowymi „PopGen” 32 (Yeh et al. 2000) i GeneA1Ex 6.1 (Peakall, Smouse 2006). Analiza danych pozwoliła obliczyć, m.in.: heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną, efektywną liczbę alleli, liczbę loci polimorficznych, stan równowagi Hardy’ego-Weiberga oraz współczynniki wsobności Wrighta (F). Przy ocenie wpływu alleli zerowych (null) na parametry genetyczne wykorzystano programy Cervus 3.0.7 (Marshall 2014) i Micro Checker (van Oosterhout et al. 2005)

### 3. Wyniki

Plantację nasienną badano pod kątem występowania alleli trzech loci. Dla locus SPAC 12.5 otrzymano 29 wariantów długości DNA od 117 do 205 pz., dla SPAG 7.14 – 26 alleli o długości od 173 do 237 pz., natomiast dla SPAC 11.4 – 14 alleli o długości od 132 do 159 pz.

Wśród badanych osobników najliczniejszym allelem dla SPAC 12.5 był allel o długości 149 pz., dla SPAG 7.14 – allel o długości 207 pz., a dla SPAC 11.4 – allel o długości 139 pz. Dla wszystkich loci określono allele najrzadziej występujące, tzn. z frekwencją poniżej 1%. I tak dla locus SPAC 12.5 opisano 5 alleli z frekwencją poniżej 1% o długości: 117 pz., 121 pz., 125 pz., 195 pz., 205 pz., dla locus SPAG 7.14 – 1 allel o długości 178 pz. i dla SPAC 11.4 – 2 allele o długości 132 pz. i 134 pz. (ryc. 1).



Rycina 1. Frekwencja alleli na plantacji nasiennej w Nadleśnictwie Susz dla 3 badanych loci

Figure 1. The allele frequency in the Forest District Susz seed orchard at 3 loci examined

Wszystkie zastosowane w badaniach loci były polimorficzne, dzięki temu wartości prawdopodobieństwa identyczności ( $P_{ID}=6,59E-07$ ) i prawdopodobieństwa identyczności pomiędzy osobnikami spokrewnionymi ( $P_{ID_{sib}}=0,024$ ) pozwoliły na przypisanie genotypu szczepu do genotypu drzewa matecznego.

Analizowane w pracy markery w dwóch loci (SPAC 12.5 i SPAG 7.14), z trzech analizowanych, odbiegały na podstawie testu chi kwadrat ( $p<0,001$ ) od równowagi Hardy'ego-Weinberga. Dla wymienionych loci współczynnik wsobności był dodatni i wyniósł odpowiednio dla SPAC 12.5 – 0,054, natomiast dla SPAC 7.14 – 0,196, przy czym średnio dla całej populacji –  $F=0,097$ .

Dla analizowanych locus wykonano test istotności wpływu alleli zerowych (null) na otrzymane wyniki. I tak dla loci SPAC 12.5 i SPAG 7.14 allele zerowe nie wpłynęły istotnie na otrzymany wynik, natomiast dla locus SPAC 11.4 zauważono ich istotny wpływ ( $P<0,001$ ).

Na badanej plantacji nasiennej efektywna liczba alleli wynosiła średnio 15,67, przy czym dla poszczególnych loci kształtowała się następująco: SPAC 12.5 – 20,15; SPAG 7.14 – 18,46; SPAC 11.4 – 8,41. Największą różnicę procentową (0,4) pomiędzy obserwowaną liczbą alleli, a efektywną liczbą alleli wykazano dla locus SPAC 11.4.

Dla wszystkich loci odnotowano mniejsze wartości heterozygotyczności obserwowanej ( $H_o$ ) od oczekiwanej ( $H_e$ ), tj. dla locus SPAC 12.5 –  $H_e = 0,95$ ,  $H_o = 0,89$ ; dla locus SPAG 7.14 –  $H_e = 0,94$ ,  $H_o = 0,76$ ; a dla locus SPAC 11.4 –  $H_e = 0,88$ ,  $H_o = 0,84$ .

#### 4. Dyskusja

Wykorzystane w niniejszej pracy mikrosatelitarne DNA jest jednym z najpowszechniejszych i najprecyzyjniejszych narzędzi badawczych wykorzystywanych przy ustalaniu genotypu drzew leśnych (Nowakowska et al. 2014). W prezentowanej pu-

blikacji zastosowano trzy zmienne loci dzięki czemu przypisano genotyp szczepu do genotypu drzewa matecznego. Ten etap zwany weryfikacyjnym jest niezbędnym elementem związanym z opisaniem zmienności genetycznej na takich obiektach jak plantacje nasienne. Podobne badania przeprowadzone w Europie wykazują, że na plantacjach nasiennych błędy sadzenia sięgają średnio 27% (Gömöry, Paule 1993; Gömöry et al. 2000). Wielkość ta prawdopodobnie jest zbliżona do błędów sadzenia na polskich plantacjach nasiennych (Burczyk et al. 2000; Cieślęwicz 2009; Przybylski 2012). W konsekwencji obce dla plantacji genotypy wnoszą do niej obce allele, które sztucznie zawyżają poziom zmienności genetycznej, co uniemożliwia prawidłowe wnioskowanie. W prezentowanych badaniach wykluczono obce genotypy, a analizie poddano pozytywnie zweryfikowany zestaw klonów.

Badana plantacja nasienne należy do jednych z największych w Polsce, w jej ramach rozmieszczono klony 175 drzew matecznych. Jest to znacznie więcej niż przewidują wytyczne dotyczące zakładania plantacji nasiennych sosny w Polsce. Przepisy wymagają bowiem, aby plantacja nasienne sosny składała się z genotypów minimum 40 roślin. Autor publikacji opisał genotyp 117 drzew matecznych, co umożliwia ocenę wpływu selekcji fenotypowej na zmienność genetyczną. Otrzymane wyniki potwierdzają wysoki polimorfizm badanych markerów mikrosatelitarnego DNA. W badaniach stwierdzono występowanie 29 alleli dla SPAC 12.5 i 26 alleli dla SPAC 7.14, są to liczby zbliżone do wyników otrzymanych przez Trojankiewicz (2006) i Cieślęwicza (2009). Dla trzeciego z badanych locus – Spac 11.4 – wykazano mniejszą liczbę alleli (14), jednakże jego polimorfizm wydaje się być wystarczający do rekomendacji locus Spac 11.4 w celach weryfikacji innych plantacji nasiennych. Aktualnie stosowane w Polsce systemy weryfikacyjne wykorzystują najczęściej oprócz loci SPAC 12.5 i SPAG 7.14 loci z grupy PtTx: 3025, 3107, 3116, 4001, są to jednak fragmenty DNA wykazujące mniejszą zmienność niż rekomendowany w niniejszej publikacji locus SPAC 11.4.

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały na badanej plantacji nasiennej brak równowagi genetycznej dla loci SPAC 12.5 i SPAG 7.14. Jest to zjawisko rzadkie w populacjach drzew leśnych, bowiem swobodny przepływ pyłku pomiędzy populacjami sprzyja utrzymaniu równowagi Hardy’ego-Weinberga. Uważa się, że otrzymany wynik potwierdza wpływ selekcji fenotypowej na strukturę genetyczną plantacji. Podobne wyniki otrzymano w badaniach przeprowadzonych na plantacji nasiennej w Zdrojowej Górze (Cieślęwicz 2009), gdzie w przypadku dwóch loci zaobserwowano istotne odchylenia od stanu równowagi genetycznej. W prezentowanych badaniach i badaniach Cieślęwicza (2009) opisano dodatkowo wysokie dodatnie wartości współczynnika wsobności. Wynik ten świadczy o przewadze w populacji homozygot. Cieślęwicz (2009) uważał, że przyczyną zaobserwowanego zjawiska jest obecność alleli zerowych (null), które uniemożliwiają odróżnienie homozygoty od heterozygoty (Callen et al. 1993). Frekwencję alleli null w populacjach drzew Scotti i in. (2000) szacują na 20%. W prezentowanych badaniach wykluczono jednak

ich wpływ, ponieważ wykonane testy istotności miały wartość ujemną, co w zasadzie wyklucza istotność alleli null na otrzymany wynik. Z tego względu autor uważa, że przyczyną zwiększonej frekwencji homozygot na badanej plantacji nasiennej jest proces selekcji. Samo zjawisko wsobności jest często spotykane w przyrodzie. W ten sposób faworyzowane są allele odpowiedzialne za genetycznie korzystne cechy adaptacyjne (Whitlock 2002). Możliwe jest natomiast, że samo zwiększenie homozygotyczności na plantacjach nie wpływa na poziom zmienności pokolenia potomnego, o czym świadczą wyniki Burczyka (1998).

Plantacje nasienne sosny, jako końcowe ogniwo prowadzonej przez Lasy Państwowe hodowli selekcyjnej (Kowalczyk 2012), muszą składać się z minimum 40 niespokrewnionych roślin. Wyniki dotychczasowych badań potwierdzają, że liczba ta powinna być wystarczająca w celu zachowania różnorodności genetycznej (Gulberg et al. 1985; Mejnartowicz, Bergmann 1985; Paule, Mrazikova 1990; Burczyk 1990; Burczyk et al. 2000). Należy jednak pamiętać, że sosna jest gatunkiem charakteryzującym się wysoką zmiennością genetyczną (Wang et al. 1991; Prus-Głowacki, Bernard 1994; Działuk, Burczyk 2002; Kosińska et al. 2007; Nowakowska 2010), na co znaczny wpływ ma jej sposób rozmnażania, w którym dominuje zapłodnienie krzyżowe (Działuk 2004; Wasilewska et al. 2005), oraz przepływ genów pomiędzy populacjami (Działuk, Burczyk 2005). Obostrzenia wynikające z zasad zakładania plantacji nasiennych, np. izolacja od źródeł obcego pyłku, są przyczyną naukowej dyskusji dotyczącej potencjalnego zmniejszenia zmienności genetycznej. Jest to duże zagrożenie przy dynamicznie zmieniających się warunkach klimatycznych. Porównanie otrzymanych wyników z drzewostanami wyselekcjonowanymi przez Nowakowską (2007) potwierdza wyższe wartości współczynnika wsobności na badanej plantacji nasiennej w porównaniu do drzewostanów wyselekcjonowanych. W świetle otrzymanych wyników sądzi się, że prowadzona selekcja fenotypowa wpływa na obniżenie zmienności genetycznej pokolenia matecznego, co jest sprzeczne z wcześniej prowadzonymi badaniami (Paule, Mrazikova 1990; El-Kassaby, Benowicz 2000). Za przyczynę wykazanych różnic wniosków badawczych autor podejrzewa nie wyeliminowanie w poprzednich badaniach błędów sadzenia z obliczeń zmienności genetycznej. Zmniejszenie wskaźników zmienności genetycznej na plantacjach nasiennych jest bowiem zjawiskiem oczekiwanym i bezpośrednio wynikającym z idei prac selekcyjnych. Ważne jest natomiast, aby w kolejnych etapach prac hodowlanych stale monitorować zmienność molekularną pokoleń potomnych w celu minimalizacji ryzyka hodowlanego.

## 5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Zmienność genetyczna wyrażana poziomem heterozygotyczności obserwowanej jest zawężona na badanej plan-

tacji nasiennej, co świadczy o efektywności prowadzonej selekcji fenotypowej.

2. W kolejnych etapach prac selekcyjnych należy uwzględnić zmienność na poziomie molekularnym w planowaniu przestrzennym plantacji nasiennych.

3. Markery mikrosatelitarnego DNA (SPAC 12.5, SPAG 7.14, SPAC 11.4) są przydatne w weryfikacji i określaniu zmienności genetycznej plantacji nasiennych.

4. Błędy na plantacjach nasiennych są elementem istotnie wpływającym na pulę alleli.

## Konflikt interesów

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów.

## Podziękowania i źródła finansowania

Autor dziękuje Jerzemu Przyborowskiemu, Jolancie Bieniek i Małgorzacie Borys za pomoc przy realizacji niniejszych badań a Janowi Matrasowi, Janowi Kowalczykowi, Ireneuszowi Odrzykoskiemu za wsparcie merytoryczne. Badania zostały wykonane w ramach grantu statutowego Instytutu Badawczego Leśnictwa (temat statutowy 240201)

## Literatura

- Almqvist C. 2013. Basic principles of developing forest tree seed orchards in Sweden, in: Improving seed production from forest seed orchards in the Baltic Sea region countries – establishment, management, flowering stimulation and protection. Mat. konferencyjne. Riga.
- Burczyk J. 1990. Struktura genetyczna plantacji nasiennej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Nadleśnictwie Gniewkowo. *Arboretum Kórnickie* 35: 91–101.
- Burczyk J. 1998. Mating system variation in a Scots pine clonal seed orchard. *Silvae Genetica* 47: 155–158.
- Burczyk J., Działuk A., Lewandowski A. 2000. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na klonowej plantacji nasiennej w Gniewkowie. *Sylwan* 4: 65–47.
- Callen D.F., Thompson A.D., Phillips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Southerland G.R. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites markers. *The American Journal of Human Genetics* 52: 922–927.
- Chałupka W., Matras J., Barzdajn W., Burczyk J., Tarasiuk S., Sabor S., Kowalczyk J., Fonder W., T. Grądzki, P. Kacprzak, Cz. Kozioł, Z. Rzońca, T. Pytko, Z. Szelaż, Z. Gryzo, S. Błonkowski 2010. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce na lata 2010–2035. CILP, Warszawa, 142 s. ISBN: 978-83-61633-60-0.
- Cieślewicz A. 2009. Charakterystyka wybranych loci mikrosatelitarnych u sosny zwyczajnej i ich wykorzystanie do identyfikacji szczepów drzew matecznych. Rozprawa doktorska. manuskrypt. UAM, Poznań.
- Gömöry D., L Paule 1993. Inferences on mating system and genetic composition of a seed crop in the European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Animal Breeding and Genetics* 46: 309–314.
- Działuk A, Burczyk J. 2005. Intensywność przepływu genów u drzew leśnych. *Wiadomości Botaniczne* 49(3/4): 15–27.
- Działuk A. 2004. Przepływ genów w drzewostanie nasiennym sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* (L.). Rozprawa doktorska. Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- Działuk J., Burczyk J. 2002. Comparison of genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from qualified seed tree stand and clonal seed orchard. *Ecological Questions* 2: 89–94.
- El-Kassaby Y.A., Benowicz I. 2000. Effects of commercial thinning on genetic, plant species and structural diversity in second growth Douglas fir stands. *Forest Genetics* 7(3): 133–203.
- Friedman S. T., Adams W.T. 1981. Genetic efficiency in loblolly pine seed orchards. Proceedings of 16th Southern Forest Tree Improvement Conference, Blackburg, VA, s. 213–224.
- Gomory D., Bruchanik, R., Paule, L 2000. Effective population number estimation of three Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchards based on an integrated assessment of flowering, floral phenology, and seed. *Forest Genetics* 7: 65–75.
- Gulberg U., Yazdani R., Rudin D., Ryman N. 1985. Allozyme variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Sweden. *Silvae Genetica* 34(6): 193–201.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Creel S. 2006. Using DNA from non-invasive samples to identify individuals and census populations: an evidential approach tolerant of genotyping errors. *Conservation Genetics Resources* 7: 319–129.
- Kang K.S. 2001. Genetic gain and gene diversity of seed orchard crops. Swedish University of Agricultural Sciences, Umea.
- Kosińska J., Lewandowski A., Chałupka W. 2007. Genetic variability of Scots pine maternal populations and their progenies. *Silva Fennica* 41(1): 5–12.
- Koski V. 1982. Quantified standards for regional clonal seed orchards. *Forest Genetic Resources* 11: 11–19.
- Koski V. 1980. Minimum requirements for seed orchards of Scots pine in Finland. *Silva Fennica* 14: 136–149.
- Kowalczyk J., Markiewicz P, Matras J. 2012. Zabiegi hodowlane w plantacjach nasiennych i uprawach plantacyjnych. *Biblioteczka Leśniczego*, 354.
- Lindgren D., Matheson A.C. 1986. An algorithm for increasing the genetic quality of seed from seed orchards by using the better clones in higher proportions. *Silvae Genetica* 35: 173–177.
- Marshall T 2014. [http://www.fieldgenetics.com/pages/about-Cervus\\_Overview.jsp](http://www.fieldgenetics.com/pages/about-Cervus_Overview.jsp). [10.08.2013].
- Matheson A.C., Lindgren D. 1985. Gains from the clonal and the clonal seed orchard options compared for tree breeding programs. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 242–249.
- McKeand S., Mulin T., Byram T., White T. 2003. Deployment of genetically improved loblolly and slash pines in the South. *Journal of Forestry* 101(3): 32–37.
- Mejnartowicz L., Bergmann F. 1985. Genetic differentiation among Scots pine population from the lowlands and the mountains in Poland, in: Population Genetics in Forestry (red. H.R. Gregorius), Lecture Notes in Biomathematics 60, 253–266. DOI 10.1007/978-3-642-48125-3\_17.
- Nowakowska J. 2007. Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej na podstawie analiz polimorfizmu DNA. Rozprawa hab. Manuskrypt Instytutu Badawczego Leśnictwa.
- Nowakowska J. 2010. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU 13.
- Nowakowska J., Zachara T., Konecka A. 2014. Zmienność genetyczna naturalnego odnowienia i drzewostanu macierzystego sosny i świerka. *Leśne Prace Badawcze* 75(1): 47–54.

- Olsson T., Lindgren D. 2001. Blancing genetic gain and relatedness in seed orchards. *Silvae Genetica* 50: 222–227.
- Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.F. 2005. Micro Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/> [10.08.2013].
- Paule L., Mrazikova M. 1990. Genetic analysis of the Sots pine (*Pinus sylvestris* L) progeny of the seed orchard. *Lesnictvi* 36(10).
- Peakall R., Smouse P. 2006. Genealex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Prus-Głowacki W., Bernard E. 1994. Allozyme variation in population of *Pinus sylvestris* L. from a 1912 provenance trial in Pula (Poland) populations. *Silvae Genetica* 43: 132–138.
- Prus-Głowacki W., Nowak-Bzowy R. 1992. Genetic structure of a naturally regenerating scots pine population tolerant for high pollution near a zink smelter. *Water, Air and Soil Pollution* 62: 249–259.
- Przybylski P. 2012. Analiza zmienności genetycznej drzew matecznych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), oraz utworzenie z uzyskanych informacji relacyjnej bazy danych. Spr. Kon. Manuskrypt. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary.
- Scotii I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce expressed sequences. *Genome* 43: 41–46.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7: 1260–1261.
- Stoehr M.W., El-Kassaby Y.A. 1997. Levels of genetic diversity of different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 83–90.
- Trojankiewicz M. 2006. Efektywna wielkość populacji na plantacji nasiennej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Nadleśnictwie Gniewkowo. Rozprawa Doktorska UKW, Bydgoszcz. Manuskrypt.
- Wang X. R., Szmidt A. E., Lindgren D. 1991. Allozyme differentiation among populations of *Pinus sylvestris* L. from Sweden and China. *Hereditas* 114: 219–226.
- Wasilewska M., Klemm M., Burczyk J. 2005. Genetic diversity and mating system of Scots pine plus trees. *Dendrobiology* 53: 57–62.
- White T.L., Hodge G.R., Powell G.L. 1993. An advanced-generation tree improvement plan for slash pine in the southeastern united states. *Silvae Genetica* 43: 359–371.
- Whitlock M.C. 2002. Selection, load and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics* 160: 1191–1202.
- Yeh F.C., Boyle T., Yang R., Ye Z., Xiyang J.M. 2000. PopGene32, Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Edmonton, Alberta, Canada.

## Are we narrowing genetic variability in seed orchards? An attempt to answer, based on the analysis of microsatellite DNA of grafts growing in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchard in the Forest District Susz

Paweł Przybylski

Forest Research Institute, Department of Silviculture and Genetics of Forest Trees, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn, Poland

Tel. +48 22 71 50 460, fax +48 22 72 00 397, e-mail: [p.przybylski@ibles.waw.pl](mailto:p.przybylski@ibles.waw.pl)

**Abstract.** Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the most common species in Poland's forest stands. The mode of pine stands renovation requires that silviculture practitioners have continuous access to seed banks. Orchard-grown seeds are predicted to constitute an increasingly larger part of the average demand for pine seeds in Poland. Seed orchards, due to a limited number of maternal trees as well as the irregularity of their blooming and pollination, enhance the risk of genetic diversity reduction in planted forest stands. This is of particular importance in the context of dynamic climate change. Markers based on microsatellite DNA fragments are effective tools for monitoring genetic variability. In the present study, three different microsatellite DNA fragments were used: SPAC 12.5, SPAG 7.14 and SPAC 11.4. The main objective of this research was to study genetic variability in one of the biggest seed orchards in Poland, located in the Forest District Susz. The obtained results indicated heterozygosity loss within the orchard, proving the existence of specimen selection effects on genetic variability. Hence, it seems quite important to take account of molecular genetic variability of maternal trees in future breeding strategies.

**Keywords:** microsatellite DNA, tree breeding, seed orchard

### 1. Introduction

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is one of the essential forest-forming species in Poland and occupies 59.9% of Poland's total forest area, regardless of the ownership type (Forests in Poland 2011; CILP 2012). Based on up to date knowledge on pine ecology and breeding, it is predicted that in the coming decades, Scots pine will be planted using seedlings from forest nurseries. In view of forest management practice, there will have to be ensured regular access to seed collecting areas, which now include in Poland: source-identified tree stands (previously: managed seed stands) - 88%, selected tree stands (previously: excluded seed stands) - 6% and seed orchards with generative or vegetative origin - 6% (DGLP unpublished data). Advanced seed production in Poland will involve greater than before utilization of seed orchard production, i.e. up to 40% of overall seed demand (Chałupka et al. 2010). Among others, this tendency results

from market indicators forecasting the growth of demand for wood raw materials. However, the latter can be contrary to ecological forest management aspects, including the protection of forest habitats. Hence, it is vital to achieve greater wood production efficiency on the reduced forest areas under management. The requirement for greater stand production on smaller areas can only be fulfilled if, through selection, stand progeny inherits economically desirable traits. Genetically improved seeds are produced in seed orchards, and genetic gain is the measure of selection process success. For example, in Sweden, 25% genetic gain was achieved in forest stands derived from third generation seed orchards (Almqvist 2013).

In addition to the achievement of genetic gain (a positive effect from the silviculturist's perspective), the selection process carried out in seed orchards also brings about negative silvicultural effects. The main important problem in this context is narrowing down the number of maternal

Received: 30.06.2014, reviewed: 15.08.2014, accepted after revision: 02.02.2015.

generation specimens, which may in turn result in lead to decreasing genetic variability genetic erosion in the next generation. The authors such as Koski (1980, 1982), Lindgre and, Matheson (1986), Burczyk (1998) as well as Kang (2001) believe that the insufficient number of genotypes and their unequal participation in forming progeny generation are the main reasons behind decreasing genetic variability in seed orchards. Besides, phenotypic traits have so far been key criteria used in the selection of maternal generation specimens. On the other hand, there has been available no data on individual intensity of Scots pine flowering and pollination as well as on individual tree genetic value (White et al. 1993, Gomory et al. 2000). Lack of this data may ultimately lead to failure in obtaining seed orchard panmixia described, among others, by Friedman and Adams (1981).

In order to preserve genetic diversity, seed orchards in Poland are established with at least 40 clones of pine or fir each, or else 30 clones of other species. The growers theoretically, presume that all planted trees take part in generative reproduction. This postulate, however, is not realistic, therefore, all over the world, wide-ranging studies are carried out on determination of the minimum number of seed orchard specimens allowing for retention of genetic variability in future generations. The University of North Carolina (2001) recommends establishing new seed orchards based on 20–30 clones. McKeand et al. (2003) refer to orchards made of no more than 5–10 clones. The issue was also studied in British Columbia (Canada), where it was evaluated by means of the effective clone number method that the clone number higher 7 was sufficient to retain acceptable genetic diversity (Stoehr, El-Kassaby 1997). El-Kassaby and Benowicz (2000) showed that the effective number of alleles in Douglas fir seed orchards was higher than that in natural populations (Table 1). Similar results were obtained for Scots pine, when comparing genetic variability in seed orchards with that in natural stands (Matheson, Lindgren 1985, Kosińska et al. 2007).

In addition, in pine seed orchards, similarly to mature forest stands, there is often observed an increase of hetero-

zygosity. This tendency is explained by gradual elimination of homozygous specimens derived from self-pollination or pollination by closely related specimens. Burczyk (1998) found that the progeny population grown from seeds produced in the seed orchard indicated negative values of the inbreeding coefficient. These results suggest the advantage of crossbreeding over inbreeding, which is perceived by Burczyk (1998) as the effect of specific distribution of clones within the seed orchard area as well as variability in flowering phenology.

Given the aforesaid, the question arises as to whether genetic variability is indeed being narrowed in seed orchards. The answer to this research hypothesis can be obtained using molecular marker data. However, in subject literature, there is available only scarce information on genetic diversity in Poland's seed orchards with reference to DNA markers. There have been accessible, to the author's knowledge, no more than the results of PhD dissertations by Trojankiewicz (2006) and Cieślewicz (2009). Thus, the present study can constitute value added to the knowledge on the potential reduction of genetic diversity as a result of phenotypic selection.

The goal of the present study was to determine a level of genetic variability change in Scots pine maternal trees growing in the Forest District Susz seed orchard. The results obtained will, among others, allow answering the question: what is the effect of the selection of limited number of maternal specimens on seed orchard gene pool and genetic variability?

## 2. Materials and methodology

### Plant material

The plant material used in the study consisted of Scots pine needles collected in the early spring of 2011, in the seed orchard located in the Forest District Susz (the Baltic Forest and Nature Region). The orchard (32.25 ha) was established in 1977–1985 and named after Prof. S. Kocięcki.

**Table 1.** Comparison of genetic variability parameters between Douglas fir natural population and breeding population (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation) (El-Kassaby, Ritland 1995)

Population	Percent of polymorphic loci	Number of alleles per locus	Expected heterozygosity
Natural stand	53%	2.14	0.171
Breeding population	65%	2.50	0.176
Breeding population 1 <sup>st</sup> generation	63%	2.28	0.172
Breeding population 2 <sup>nd</sup> generation	56%	2.25	0.163

It encompasses in total 30 quarters with 175 clones. The examined plant material allowed to depict genetic variability in 117 clones of maternal trees. Genetic analyses were carried out only on the genotypes positively verified with those of maternal trees growing in the field. The maternal trees originated from five Forest Districts: Jagielek, Susz, Stare Jabłonki, Miłomłyn and Kudypy (Table 2).

### Microsatellite DNA markers

Three polymorphic systems of microsatellite DNA: SPAC 12.5, SPAG 7.14 and SPAC 11.4 were used in the analyses (Sorenzo et al. 1998). Total DNA was extracted from the collected plant material. The extraction was performed using A&A Biotechnology commercial isolation kit. The extraction efficiency was checked in 1% agarose gel using the GelDoc<sup>tm</sup>Xr+ scanner and ImageLab 4.0 software (BioRad). To confirm genetic material quality, 260 and 280 nm light wavelength absorbance was measured using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

In the next stage, the chosen microsatellite DNA markers were amplified using the polymerase chain reaction (PCR).

PCR procedure was performed with the use of 12.5 µl of ready-to-use mixture 2xPCR MixPlus High GC (Taq DNA polymerase 0.1 U/µl, MgCl<sub>2</sub> 4mM, dNTPs 0,5mM, reagents increasing reaction specificity) (A&A Biotechnology) along with fluorescently labeled primers at the concentration of 5 µM: SPAG 7.14 (1 µl), SPAC 12.5 (1 µl), SPAC 11.4 (1 µl) (SigmaAldrich), and template DNA at the final concentration of 20 ng/µl (1 µl). The mixture was transferred to the Eppendorf Mastercycler eGradientS thermocycler, programmed for 40 cycles (Soranzo et al. 1998, modified). Each cycle comprised three steps: denaturation at 92°C (60 s), annealing at 56°C (60 s), and elongation at 72°C (60 s). Initial denaturation was observed at 94°C (5 min), and final elongation - at 70°C (7 min). PCR efficiency was checked in 2% agarose gel, using the GelDoc<sup>tm</sup>Xr+ scanner with ImageLab 4.0 software (BioRad).

The samples were separated using the Beckman Coulter capillary sequencer, and the reaction products were archived using CEQ<sup>TM</sup>800 software. Capillary electrophoresis was performed using LPA I polymer and Frag I length standard. The values obtained were grouped into allele classes with an accuracy of a single base pair (bp).

**Table 2.** List of examined maternal trees

FRI Ref. No.	Year of confirmation	Forest District	Forest Division	Compartment
335	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	96g
336	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
337	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100a
339	1970	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
341	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
342	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
344	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	57g
345	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
347	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
348	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
349	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
350	1970	Stare Jabłonki	Perkunicha	101d
351	1970	Miłomłyn	Tabórz	94c
352	1970	Miłomłyn	Przyłądek	132b
353	1970	Miłomłyn	Przyłądek	132b
354	1970	Miłomłyn	Przyłądek	132b
359	1970	Miłomłyn	Perskie	7d
360	1970	Miłomłyn	Perskie	8b

FRI Ref. No.	Year of confirmation	Forest District	Forest Division	Compartment
361	1970	Miłomłyn	Perskie	8b
362	1970	Miłomłyn	Zakątek	105c
364	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
365	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
366	1970	Miłomłyn	Zakątek	106c
367	1970	Stare Jabłonki	Białe Błota	254b
1311	1970	Stare Jabłonki	Białe Błota	254b
1316	1974	Miłomłyn	Bagińsko	132a
1317	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1318	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1319	1974	Miłomłyn	Jeziory	85n
1320	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1321	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1322	1974	Miłomłyn	Zakątek	146k
1323	1974	Miłomłyn	Zakątek	106c
1324	1974	Miłomłyn	Sarni Dół	100b
1325	1974	Miłomłyn	Tabórz	94c
1326	1974	Miłomłyn	Tabórz	94c
1695	1975	Miłomłyn	Tabórz	70d
1697	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	101d
1698	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	100f
1699	1975	Stare Jabłonki	Perkunicha	80i
1705	1975	Stare Jabłonki	Gąsioro	243a
1708	1975	Kudypy	Stary Dwór	293c
1713	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
1714	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
1715	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1716	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1717	1975	Kudypy	Żelazowice	468g
1718	1975	Kudypy	Żelazowice	480a
1719	1975	Kudypy	Żelazowice	480a
1720	1975	Kudypy	Żelazowice	488h
1721	1975	Kudypy	Żelazowice	488h
1725	1975	Kudypy	Żelazowice	468d
2118	1976	Susz	Michałowice	18d
2127	1975	Kudypy	Stara Góra	287h
2128	1976	Kudypy	Stary Dwór	293c
2130	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c

FRI Ref. No.	Year of confirmation	Forest District	Forest Division	Compartment
2131	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
2133	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	78c
2135	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
2136	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d
2137	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	57i
2138	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2139	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2140	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2141	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2142	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2143	1976	Stare Jabłonki	Draby	196a
2144	1976	Stare Jabłonki	Draby	150h
2145	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2147	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2148	1976	Stare Jabłonki	Draby	159m
2149	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2151	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2152	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2153	1976	Stare Jabłonki	Draby	159c
2154	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2155	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2156	1976	Stare Jabłonki	Draby	160c
2157	1976	Stare Jabłonki	Draby	187a
2158	1976	Kudypy	Żelazowice	480c
2159	1976	Kudypy	Stara Góra	310d
2161	1976	Miłomłyn	Przemysławów	138f
2165	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2166	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2167	1976	Miłomłyn	Zakątek	106h
2168	1976	Miłomłyn	Zakątek	108d
2169	1976	Miłomłyn	Perskie	7a
2170	1976	Miłomłyn	Perskie	27c
2171	1976	Miłomłyn	Perskie	7a
2172	1976	Miłomłyn	Perskie	28a
2173	1976	Miłomłyn	Perskie	28a
2174	1976	Miłomłyn	Jeziory	85n
2201	1976	Kudypy	Stary Dwór	360a
2202	1976	Kudypy	Stary Dwór	346b

FRI Ref. No.	Year of confirmation	Forest District	Forest Division	Compartment
2204	1976	Stare Jabłonki	Draby	150a
2205	1976	Stare Jabłonki	Draby	150a
2207	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2208	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2210	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2211	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2212	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2213	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2214	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2215	1976	Stare Jabłonki	Laski	140d
2222	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2223	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2224	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2225	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2226	1976	Jagielek	Jagielek	358c
2227	1976	Stare Jabłonki	Ostrowin	296g
2228	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	281i
2229	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	281f
2230	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	281f
2232	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	243a
2233	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	243a
2234	1976	Stare Jabłonki	Gąsior	243a
2235	1976	Stare Jabłonki	Perkunicha	77d

### Statistical analysis

PopGen 32 (Yeh et al. 2000) and GeneAEx 6.1 (Peakall & Smouse 2006) software products were used for calculations concerning genetic variability parameters in the seed orchard tested. Data analysis allowed for computing such parameters as: observed and expected heterozygosity, the effective number of alleles, the number of polymorphic loci, the Hardy–Weinberg equilibrium and the Wright’s Inbreeding Coefficient (F). The effect of null alleles on genetic parameters was evaluated by means Cervus 3.0.7 (Marshall 2014) and Micro Checker (van Oosterhout et. al 2005) software products.

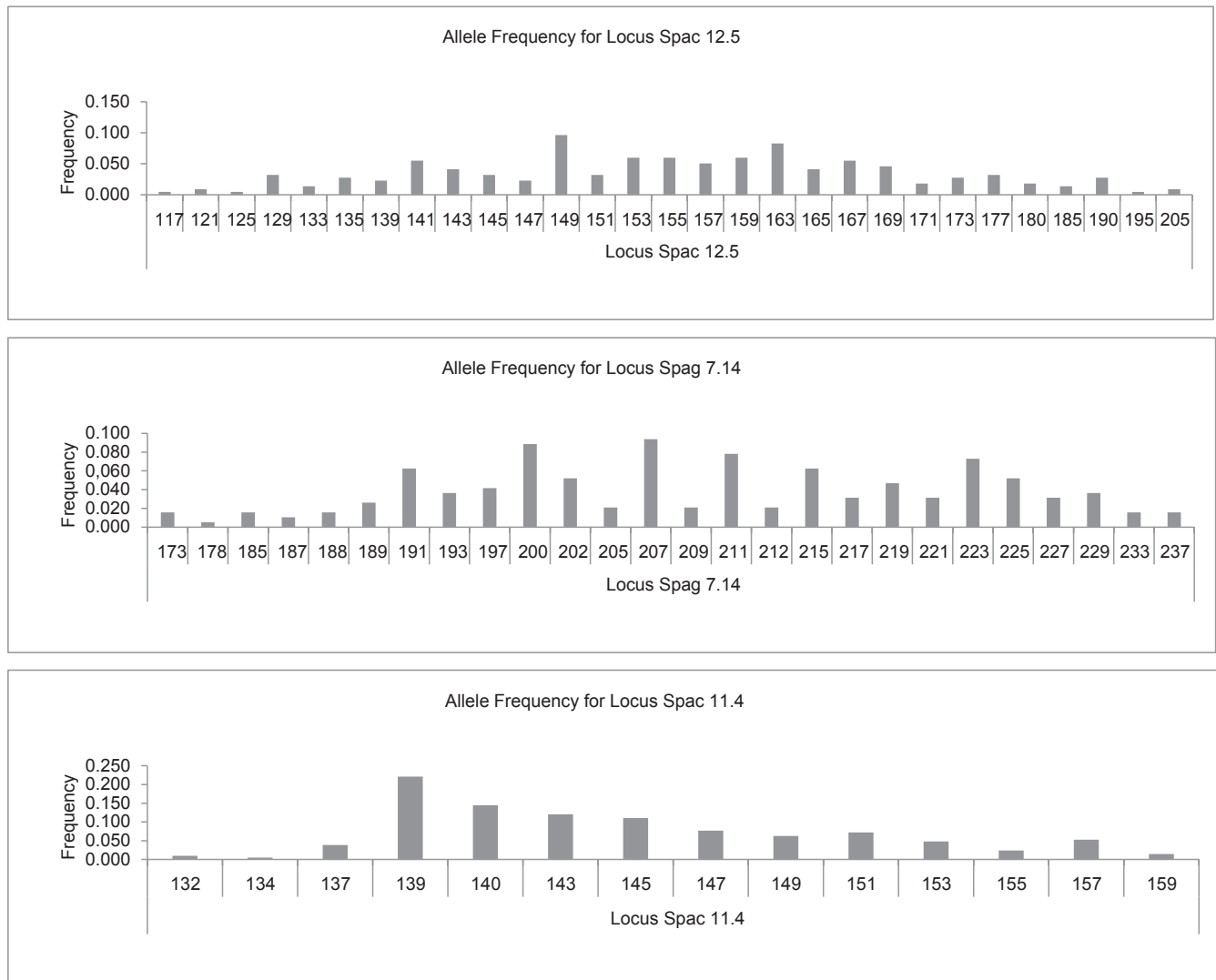
### 3. Results

The seed orchard was examined in consideration of the presence of alleles located at the three studied loci. There

were obtained 29 alleles (DNA length from 117 bp to 205 bp) at SPAC 12.5 locus, 26 alleles (DNA length from 173 bp to 237 bp) at SPAG 7.14 and 14 alleles (DNA length from 132 bp to 159 bp) at SPAC 11.4.

Among all the examined specimens, the most numerous alleles were: at SPAC 12.5 – an allele with DNA length 149 bp, at SPAG 7.14 – an allele with DNA length 207 bp, and at SPAC 11.4. – an allele with DNA length 139 bp. There were also determined the least frequent (less than 1% frequency) alleles at the three loci: 5 alleles at SPAC 12.5 locus, i.e. 117 bp, 121 bp, 125 bp, 195 bp and 205 bp; 1 allele at SPAG 7.14, i.e. 178 bp, and 2 alleles at SPAC 11.4, i.e. 132 bp and 134 bp. (Fig. 1).

All the loci studied were polymorphic, therefore, the values of probability of identity ( $P_{ID} = 6.59E-07$ ) as well as those obtained for related specimens ( $P_{ID_{sib}} = 0.024$ ) allowed to associate a given graft genotype with the genotype of the mother tree.



**Figure 1.** The allele frequency in the Forest District Susz seed orchard at 3 loci examined

Based on the chi square test results ( $P < 0.001$ ), it was found that the markers in 2 of 3 analyzed loci (SPAC 12.5 and SPAG 7.14) showed a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. In these loci, inbreeding coefficient values ( $F$ ) were positive, (0.054 and 0.196 for SPAC 12.5 and SPAC 7.14, respectively). At the same time, average,  $F$  value for the whole population, was 0.097.

The effect of null alleles on the results obtained was tested for all the loci analyzed. Null alleles had no significant effects on SPAC 12.5 and SPAG 7.14 loci, however, they showed a significant effect ( $P < 0.001$ ) on SPAC 11.4

The mean effective number of alleles in the examined seed orchard was 15.67, with the following values obtained for the loci observed: SPAC 12.5 – 20.15, SPAG 7.14

– 18.46, and SPAC 11.4 - 8.41. The highest percentage difference (0.4) between obtained and effective allele numbers was observed at SPAC 11.4.

All the loci examined, showed lower values of observed heterozygosity ( $H_o$ ) when compared to expected heterozygosity ( $H_e$ ), i.e.: for SPAC 12.5 –  $H_o = 0.89$  and  $H_e = 0.95$ ; for SPAG 7.14 –  $H_o = 0.76$  and  $H_e = 0.94$ ; for SPAC 11.4,  $H_o = 0.84$  and  $H_e = 0.88$ .

## 4. Discussion

Microsatellite DNA examined in the present study is one of the most common and precise research tools used to de-

termine forest tree genotypes (Nowakowska et al. 2014). Three variable loci were included in the study, hence it was possible to associate a given graft genotype with that of the maternal tree. This stage is an indispensable element of examination of genetic variability at the sites such as seed orchards. Indeed, relevant studies conducted in other European seed orchards showed average planting error that amounted to 27% (Gomory and Paule 1993, Gomory et al. 2000). This value is probably fairly close to that observed in Poland's seed orchards (Burczyk et al. 2000, Cieślewicz 2009, Przybylski 2012). Accordingly, alien genotypes are introduced into seed orchards and artificially boost a genetic variability level, thereby – negatively affect appropriate decision-making. In the present study, alien genotypes were excluded, and only a set of verified clones was analyzed.

The seed orchard examined is one of the largest in Poland and hosts 175 clones of maternal trees. This is much more than the number of clones recommended in regulations on seed orchards in Poland, which require minimum 40 different Scots pine genotypes in a given seed orchard. In the present paper, there are described genotypes of 117 maternal trees, and this allowed for evaluation of phenotypic selection effects on genetic variability. The obtained results confirmed a high level of polymorphism in examined satellite DNA markers. There were observed 29 alleles at SPAC 12.5 and 26 alleles at SPAC 7.14, and the results obtained were similar to those reported by Trojankiewicz (2006) and Cieślewicz (2009). Lower genetic variability was shown for the third of examined loci – SPAC 11.4 (14 alleles), nevertheless, polymorphism at this level seems sufficient enough for recommendation to use in verification procedures in other seed orchards. In Poland, currently applied verification systems most often use SPAC 12.5 and SPAG 7.14 as well as loci PtTx 3025, 3107, 3116 and 4001. The latter are DNA fragments with lower variability than SPAC 11.4 proposed in the present paper.

Statistical test results showed the lack of genetic equilibrium in the examined orchard for SPAC 12.5 and SPAG 7.14 loci. This phenomenon is rarely observed in forest tree populations, since the Hardy-Weinberg equilibrium is usually sustained as a result of open pollen transfer in between populations. The results obtained in this study apparently confirm the effect of phenotypic selection on population genetic structure. Comparable results were obtained by Cieślewicz (2009) in the Zdrojowa Góra seed orchard, where 2 loci showed significant deviations from the genetic equilibrium. In the present study, similarly to that of Cieślewicz (2009), high positive values of inbreeding coefficient were observed. Such result proves the domination of homozygotes in the population. Cieślewicz (2009) stated that this observable fact could be attributable to the presence of null

alleles which prevented the distinction of homozygotes from heterozygotes (Callen et al. 1993). Null allele frequency in tree populations assessed by Scotti et al. (2000) was approximately 20%. Nonetheless, in the present study, null allele effects on the results obtained were excluded, based on negative values obtained in statistical tests. Therefore, it can be accepted as true that the reason behind increased homozygote frequency within the seed orchard examined is the selection process itself. In general, inbreeding is regularly observed in natural world, as this is how alleles with desirable genetic traits of adaptation are promoted within the population (Whitlock 2002). It is possible, however, that only and only increasing homozygote occurrence within seed orchards will have no effect on progeny generation variability, as evidenced by Burczyk's results (1998).

In Poland, Scots pine seed orchards, as the final link of selective breeding conducted by the State Forests National Forest Holding (Kowalczyk 2012) must comprise at least 40 unrelated plants. Up to date study results indicate that that this number should be sufficient to sustain genetic variability (Gulberg et al. 1985; Mejnartowicz, Bergmann 1985; Paule, Mrazikowa M 1990; Burczyk 1990; Burczyk et al. 2000). However, it must be borne in mind that Scots pine is characteristic of considerably high genetic variability (Wang et al. 1991; Prus-Głowacki, Bernard 1994; Działuk, Burczyk 2002; Kosińska et al. 2007; Nowakowska 2010), which comes in large part from its reproductive cycle with prevailing cross-pollination (Działuk 2004, Wasilewska et al. 2005) and gene flow between populations (Działuk, Burczyk 2005). The restrictions resulting from the rules on establishing seed orchards, e.g. separation from foreign pollen sources, stimulate scientific debates on a potential decrease in genetic variability. Genetic diversity loss is a serious threat in the context of current dynamic changes in climate conditions. The comparison of the results on the seed orchard studied with those obtained by Nowakowska (2007) in selected tree stands confirms increased inbreeding coefficient values observed in this study. In view of the presented results, it is supposed that phenotypic selection adds to a decrease of genetic variability in maternal generation, which is contrary to earlier studies (Paule, Mrazikova 1990). The differences between the conclusions drawn by the abovementioned authors and the author of the present study, are probably due including planting errors into genetic variability calculations in previous studies. In fact, a decrease of inbreeding coefficient values is expected in the seed orchard, as this directly results from the concept of selection works. In any case, it is vital to monitor molecular variability in progeny generations in subsequent breeding, stages in order to minimize the risk associated with breeding programs.

## 5. Conclusions

1. Genetic variability, expressed with observed heterozygosity, is narrowed in the seed orchard examined, which demonstrates the effectiveness of phenotypic selection.

2. With regard to planning and design of seed orchards it is essential to consider molecular variability in subsequent selection stages

3. Microsatellite DNA markers (SPAC 12.5, SPAG 7.14, SPAC 11.4) are useful tools for determination of genetic variability in seed orchards.

4. Planting errors significantly affect seed orchard allele pools.

## Acknowledgements and financial support

The author would like to express his gratitude to Jerzy Przyborowski, Jolanta Bieniek and Małgorzata Borys for their help in conducting the research. He would also like to thank Jan Matras, Jan Kowalczyk and Ireneusz Odrzykoski for their expert support. Research was financially supported by Forest Research Institute (FRI) statute grant (MNiSW 24.02.01).

## Conflict of interests

The author declares no competing interests.

## References

- Almqvist C. 2013. Basic principles of developing forest tree seed orchards in Sweden, in: Improving seed production from forest seed orchards in the Baltic Sea region countries – establishment, management, flowering stimulation and protection. Mat. konferencyjne. Riga.
- Burczyk J. 1990. Struktura genetyczna plantacji nasiennej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Nadleśnictwie Gniewkowo. *Arboretum Kórnickie* 35: 91–101.
- Burczyk J. 1998. Mating system variation in a Scots pine clonal seed orchard. *Silvae Genetica* 47: 155–158.
- Burczyk J., Działuk A., Lewandowski A. 2000. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na klonowej plantacji nasiennej w Gniewkowie. *Sylvan* 4: 65–47.
- Callen D.F., Thompson A.D., Phillips H.A., Richards R.I., Mulley J.C., Southerland G.R. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites markers. *The American Journal of Human Genetics* 52: 922–927.
- Chałupka W., Matras J., Barzdajn W., Burczyk J., Tarasiuk S., Sabor S., Kowalczyk J., Fonder W., T. Grądzki, P. Kacprzak, Cz. Koziół, Z. Rzońca, T. Pytko, Z. Szelaąg, Z. Gryzo, S. Blonkowski 2010. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew leśnych w Polsce na lata 2010–2035. CILP, Warszawa, 142 p. ISBN: 978-83-61633-60-0.
- Cieślewicz A. 2009. Charakterystyka wybranych loci mikrosatelitarnych u sosny zwyczajnej i ich wykorzystanie do identyfikacji szczepów drzew matecznych. Rozprawa doktorska. manuskrypt. UAM, Poznań.
- Gömöry D., L Paule 1993. Inferences on mating system and genetic composition of a seed crop in the European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Animal Breeding and Genetics* 46: 309–314.
- Działuk A, Burczyk J. 2005. Intensywność przepływu genów u drzew leśnych. *Wiadomości Botaniczne* 49(3/4): 15–27.
- Działuk A. 2004. Przepływ genów w drzewostanie nasiennym sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* (L.). Rozprawa doktorska. Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- Działuk J., Burczyk J. 2002. Comparison of genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from qualified seed tree stand and clonal seed orchard. *Ecological Questions* 2: 89–94.
- El-Kassaby Y.A., Benowicz I. 2000. Effects of commercial thinning on genetic, plant species and structural diversity in second growth Douglas fir stands. *Forest Genetics* 7(3): 133–203.
- Friedman S. T., Adams W.T. 1981. Genetic efficiency in loblolly pine seed orchards. Proceedings of 16th Southern Forest Tree Improvement Conference, Blackburg, VA, p. 213–224.
- Gomory D., Bruchanik, R., Paule, L 2000. Effective population number estimation of three Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchards based on an integrated assessment of flowering, floral phenology, and seed. *Forest Genetics* 7: 65–75.
- Gulberg U., Yazdani R., Rudin D., Ryman N. 1985. Allozyme variation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Sweden. *Silvae Genetica* 34(6): 193–201.
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Creel S. 2006. Using DNA from non-invasive samples to identify individuals and census populations: an evidential approach tolerant of genotyping errors. *Conservation Genetics Resources* 7: 319–129.
- Kang K.S. 2001. Genetic gain and gene diversity of seed orchard crops. Swedish University of Agricultural Sciences, Umea.
- Kosińska J., Lewandowski A., Chałupka W. 2007. Genetic variability of Scots pine maternal populations and their progenies. *Silva Fennica* 41(1): 5–12.
- Koski V. 1982. Quantified standards for regional clonal seed orchards. *Forest Genetic Resources* 11: 11–19.
- Koski V. 1980. Minimum requirements for seed orchards of Scots pine in Finland. *Silva Fennica* 14: 136–149.
- Kowalczyk J., Markiewicz P, Matras J. 2012. Zabiegi hodowlane w plantacjach nasiennych i uprawach plantacyjnych. *Biblioteczka Leśniczego*, 354.
- Lindgren D., Matheson A.C. 1986. An algorithm for increasing the genetic quality of seed from seed orchards by using the better clones in higher proportions. *Silvae Genetica* 35: 173–177.
- Marshall T 2014. [http://www.fieldgenetics.com/pages/about-Cervus\\_Overview.jsp](http://www.fieldgenetics.com/pages/about-Cervus_Overview.jsp). [10.08.2013].
- Matheson A.C., Lindgren D. 1985. Gains from the clonal and the clonal seed orchard options compared for tree breeding programs. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 242–249.
- McKeand S., Mulin T., Byram T., White T. 2003. Deployment of genetically improved loblolly and slash pines in the South. *Journal of Forestry* 101(3): 32–37.

- Mejnartowicz L., Bergmann F. 1985. Genetic differentiation among Scots pine population from the lowlands and the mountains in Poland, in: Population Genetics in Forestry (red. H.R. Gregorius), Lecture Notes in Biomathematics 60, 253–266. DOI 10.1007/978-3-642-48125-3\_17.
- Nowakowska J. 2007. Zmienność genetyczna polskich wybranych populacji sosny zwyczajnej na podstawie analiz polimorfizmu DNA. Rozprawa hab. Manuskrypt Instytutu Badawczego Leśnictwa.
- Nowakowska J. 2010. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU 13.
- Nowakowska J., Zachara T., Konecka A. 2014. Zmienność genetyczna naturalnego odnowienia i drzewostanu macierzystego sosny i świerka. *Leśne Prace Badawcze* 75(1): 47–54.
- Olsson T., Lindgren D. 2001. Blancing genetic gain and relatedness in seed orchards. *Silvae Genetica* 50: 222–227.
- Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P.F. 2005. Micro Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. <http://www.microchecker.hull.ac.uk/> [10.08.2013].
- Paule L., Mrazikova M. 1990. Genetic analysis of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L) progeny of the seed orchard. *Lesnictvi* 36(10).
- Peakall R., Smouse P. 2006. Genealex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Prus-Głowacki W., Bernard E. 1994. Allozyme variation in population of *Pinus sylvestris* L. from a 1912 provenance trial in Pulawy (Poland) populations. *Silvae Genetica* 43: 132–138.
- Prus-Głowacki W., Nowak-Bzowy R. 1992. Genetic structure of a naturally regenerating scots pine population tolerant for high pollution near a zink smelter. *Water, Air and Soil Pollution* 62: 249–259.
- Przybylski P. 2012. Analiza zmienności genetycznej drzew maciecznych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), oraz utworzenie z uzyskanych informacji relacyjnej bazy danych. Spr. Kon. Manuskrypt. Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary.
- Raport o stanie lasów w Polsce 2012. CILP. <http://www.lasy.gov.pl/informacje/publikacje/informacje-statystyczne-i-raporty/raport-o-stanie-lasow>
- Scotii I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce expressed sequences. *Genome* 43: 41–46.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7: 1260–1261.
- Stoehr M.W., El-Kassaby Y.A. 1997. Levels of genetic diversity of different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 83–90.
- Trojankiewicz M. 2006. Efektywna wielkość populacji na plantacji nasiennej sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w Nadleśnictwie Gniewkowo. Rozprawa Doktorska UKW, Bydgoszcz. Manuskrypt.
- Wang X. R., Szmidt A. E., Lindgren D. 1991. Allozyme differentiation among populations of *Pinus sylvestris* L. from Sweden and China. *Hereditas* 114: 219–226.
- Wasilewska M., Klemm M., Burczyk J. 2005. Genetic diversity and mating system of Scots pine plus trees. *Dendrobiology* 53: 57–62.
- White T.L., Hodge G.R., Powell G.L. 1993. An advanced-generation tree improvement plan for slash pine in the southeastern united states. *Silvae Genetica* 43: 359–371.
- Whitlock M.C. 2002. Selection, load and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics* 160: 1191–1202.
- Yeh F.C., Boyle T., Yang R., Ye Z., Xiyan J.M. 2000. PopGene32, Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Edmonton, Alberta, Canada.