

Zmienność genetyczna naturalnego odnowienia i drzewostanu macierzystego sosny (*Pinus sylvestris* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.)

Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands

Justyna Anna Nowakowska*, Tadeusz Zachara, Agata Konecka

Instytut Badawczy Leśnictwa, Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych, Sękocin Stary, Braci Leśnej 3, 05–090 Raszyn

* Tel. +48227150467; email j.nowakowska@ibles.waw.pl

Abstract. The genetic variability and biodiversity of tree populations ensures the stability and sustainability of forest ecosystems. New research tools based on molecular DNA markers enable precise characterization of forest genetic resources, i.e. detection of different allele frequencies in mature trees and progeny populations. The paper describes the genetic structure of mature stands of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Oława Forest District, and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) in Jawor Forest District and stands of their respective progeny.

In the Scots pine stand, there was a slight increase (0.6%) in heterozygosity level and a larger increase (4.9%) in the inbreeding coefficient of progeny trees. In the Norway spruce stand, despite a small reduction (0.9%) in heterozygosity, a similar increase (4.6%) in the inbreeding coefficient of progeny was revealed. In both stands, allele richness and the partition probability of basic clustering were high. Both pine and spruce adults and progeny trees were characterized by high levels of genetic similarity (96% and 79% respectively). Gene flow between the mature and progeny populations was high ($N_m > 1$) for both Scots pine and Norway spruce.

Conservation of the gene pool within forest tree stands requires an increase in the proportion of natural regeneration. To estimate the extent to which genes are transmitted between adult trees and their progeny more studies are needed, especially taking into account the influence of silviculture measures, like selective tree cutting, on the genetic variability of the younger generation.

These results confirm that the gene pool was conserved when transmitted between the stands studied, as well as highlighting the usefulness of such a study for the silvicultural purposes.

Key words: nSSR markers, gene flow, genetic differentiation

1. Wstęp

Badanie puli genowej gatunku dostarcza cennych informacji na temat struktury genetycznej drzew leśnych, począwszy od sekwencji genomów poszczególnych gatunków, do poziomu zmienności genetycznej drzewostanów macierzystych i odnowienia. Bogactwo puli genowej poszczególnych populacji określane jest na podstawie częstości występowania w genomie różnych form alleli DNA. Poza zjawiskiem depresji outbredowej (z ang. *outbreeding depression*), czyli nagłego obniżenia kondycji spowodowanego kojarzeniem się osobników

pochodzących z odległych, izolowanych stanowisk, można przypuszczać, że bardziej zróżnicowana pula genowa gatunku daje większe prawdopodobieństwo wystąpienia korzystnej kombinacji alleli, gwarantujących przeżywalność i przystosowanie do zmiennych warunków środowiska (Reed, Frankham 2003).

Precyzyjna identyfikacja puli genowej drzewostanu na poziomie informacji genetycznej zawartej w DNA jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym oraz poznanie procesów dziedziczenia korzystnych cech hodowlanych i wpływu czynników zewnętrznych (antro-

pologicznych i środowiskowych) na zmiany w strukturze genetycznej populacji leżą u podstaw wielu badań (Hamrick, Nason 2000; Sperisen et al. 2001; Avise 2004; Kremer, Reviron 2004; Neale, Ingvarsson 2008). Również w Polsce prowadzono analizy zróżnicowania genetycznego sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego, m.in. RAPD, STS, PCR-RFLP i SSR (Csaikl et al. 2002; Dering, Lewandowski 2009; Nowakowska 2009, 2010). Wyniki tych badań potwierdzają kierunek głównych dróg rekolonizacji w Polsce np. świerka pospolitego z różnych refugium polodowcowych, o odrębnej puli genowej populacji świerków z refugium nordycko-bałtyckiego i populacji z południa, z refugium karpacko-hercyńskiego (Dering, Lewandowski 2009).

Powierzchnia lasów pochodzących z odnowienia naturalnego wzrosła w Polsce w ostatnich dziesięcioleciach z 3% do około 10% (Raport o stanie lasów 2012), ale pozostaje niższa w porównaniu do średniej europejskiej wynoszącej 67% (State of Europe's Forests 2011). Niezależnie od przyczyn takiego stanu rzeczy, istotnym zagadnieniem badawczym pozostaje kwestia możliwości i celowości zwiększania udziału tej powierzchni, przy wzięciu pod uwagę ekologicznych, produkcyjnych i społecznych funkcji lasu. Postulat trwałej i zrównoważonej gospodarki leśnej implikuje wzrost zainteresowania metodami naturalnego odnawiania lasu także gatunków światłolubnych, takich jak sosna (Dobrowolska 2010). W kompleksowych badaniach nad tym zagadnieniem nie można pomijać aspektu genetycznego. Przedstawiona tematyka badawcza wpisuje się w nurt badań struktury genetycznej na poziomie drzewostanu macierzystego i naturalnego odnowienia u sosny (*Pinus sylvestris* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.).

Hipotezą wyjściową było stwierdzenie, że lokalna pula genetyczna drzewostanu jest na podobnym poziomie zarówno u drzew dojrzałych, jak i w młodym pokoleniu podrostu, powstałego z naturalnego odnowienia (samosiewu). Badania miały na celu określenie puli genowej w obu grupach drzew każdego gatunku, określonej na podstawie poziomu zmienności genetycznej jądrowych *loci* DNA w odnowieniu naturalnym w odniesieniu do poziomu zmienności drzewostanu macierzystego.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny do badań genetycznych zebrano z 60 drzew każdego z analizowanych gatunków w następujących obiektach:

– sosna zwyczajna – Nadleśnictwo Oława, leśnictwo Karwiniec, oddz. 98c, 114-letni lity drzewostan sosnowy, rosnący na siedlisku lasu mieszanego świeżego,

będący w klasie odnowienia, z 7-letnim nalotem o pokryciu 10%.

– świerk pospolity – Nadl. Jawor, leśn. Muchów, oddz. 155h, 105-letni lity drzewostan świerkowy o zwarciu umiarkowanym, na siedlisku lasu mieszanego wyżynnego świeżego, z 7-letnim nalotem o pokryciu 30%.

DNA genomowe izolowano z 30–35 próbek drewna każdego gatunku, z losowo wybranych osobników z drzewostanu macierzystego, znajdujących się w odległości nie mniejszej niż 10 m od siebie, oraz z 30 próbek igieł z odnowienia. Do izolacji zastosowano zestawy DNeasy 250 Plant Mini Kit (QIAGEN), a otrzymane ilości DNA analizowano spektrofotometrycznie za pomocą aparatu NanoDrop ND-1000 (TK-Biotech). W celu scharakteryzowania struktury genetycznej osobników dorosłych i odnowienia sosny zwyczajnej, analizy przeprowadzono za pomocą trzech *loci* mikrosatelitarnego DNA jądrowego: SPAG 7.14, SPAC 12.5 i SsrPt-ctg-4363 (Soranzo et al. 1998; Chagné et al. 2004). W przypadku drzew dorosłych i odnowienia świerka pospolitego zastosowano również trzy *loci* nSSR: SpA-G2, SpAC1-H8 i SpAG-D1 DNA jądrowego wg Pfeiffer et al. (1997). Oznaczenie genotypów drzew dorosłych i odnowienia przeprowadzono za pomocą programu CEQ™ 8000 Series Genetic Analysis System Software v 9.0 w automatycznym sekwenatorze CEQ 8000 (Beckman Coulter®).

Obliczenia podstawowych parametrów genetycznych, w tym obserwowaną (n_a) i efektywną (n_e) liczbę alleli w *locus*, oraz frekwencje występowania alleli null wykonano za pomocą programu GenePop v. 4.0.10 (Rousset 2008). Procent *loci* polimorficznych (ang. *polymorphic informative content*, PIC) markerów mikrosatelitarnych obliczono w programie MolKin v.3.0 (Gutiérrez i in. 2009). Zmienność wewnątrz grup ustalono na podstawie częstości alleli oraz heterozygotyczności H_o i H_e (Nei 1978) w programie GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse 2012). Biorąc pod uwagę niejednakową liczbę badanych drzew w grupach drzew dorosłych i odnowienia sosny i świerka, oszacowano bogactwo alleli A_R za pomocą programu FSTAT v. 2.9.3.2 (Gudet 2002), obliczane dla najmniejszej liczebności próby w obrębie porównywanych grup. Ten sam program wykorzystano do obliczeń współczynników wsobności (F_{IS}) i utrwalenia (F_{ST}) wg Weir i Cockerham (1984). Podobieństwo genetyczne, obliczone na podstawie prawdopodobieństwa podziału między drzewami dorosłymi a odnowieniem (*partition probability*, P_t), uzyskano na podstawie analizy podstawowego skupienia MCMC (*basic clustering Markov Chain Monte Carlo*) dla $p = 0.02$ w programie BAPS 2.0 (Corander et al. 2003).

W celu określenia przepływu genów między badanymi grupami drzew rodzicielskich i potomnych obliczono parametr N_m (Nei 1987).

3. Wyniki

Analiza genetyczna sosny zwyczajnej

Obie grupy osobników, tzn. drzew dorosłych i potomnych sosny w drzewostanie Oława, analizowano pod kątem występowania różnych alleli w trzech poszczególnych *loci*. I tak, w *locus* SPAG 7.14 otrzymano 27 różnych wariantów DNA o wielkości od 176 do 248 par zasad (ryc. 1). Wśród badanych drzew dorosłych najczęściej występowały allele 192 i 211 pz (frekwencja 11%), natomiast u drzew potomnych – dominował allele 192 pz (14%). Wśród potomstwa nie znaleziono 6 alleli (178, 184, 186, 197, 211 i 235 pz) spośród tych, które stwierdzono u drzew dorosłych, ale potwierdzono obecność 6 innych alleli – 176, 188, 190, 195, 230 i 248 pz. Dla *locus* SsrPt-ctg-4363 otrzymano 12 wariantów alleli, o wielkości od 92 do 123 pz (ryc. 1). Zarówno drzewa dorosłe, jak i odnowienie, cechowała dominacja allele 97 pz, występującego z frekwencją odpowiednio 44% i 47%. Populacja potomna miała 2 warianty alleli (101 i 123 pz) niewystępujące w populacji drzew dorosłych, natomiast nie miała 5 wariantów alleli o wielkości 92, 95, 107, 111 i 119 pz. *Locus* SPAC 12.5 miał 24 różne warianty alleli, o wielkości od 123 do 178 pz. W populacji drzew dorosłych odnotowano 8 alleli, które nie występowały w populacji potomnej, ale za to odnowienie miało 3 nowe warianty alleli: 137, 141 i 171 pz (ryc. 1). Zastosowane 3 mikrosatelitarne *loci* charakteryzowały się wysokim poziomem polimorfizmu (PIC = 84,1%).

Średnia obserwowana liczba alleli w *locus* drzew rodzicielskich ($n_a = 16,333$) była większa niż u drzew potomnych ($n_a = 14,333$; tab. 1). Oczekiwana średnia liczba alleli na *locus* była prawie taka sama u drzew rodzicielskich i potomnych, odpowiednio $n_e = 10,521$ oraz $n_e = 10,566$ (tab. 1). Współczynnik bogactwa alleli był nieznacznie wyższy u drzew dorosłych ($A_R = 15,290$) niż w odnowieniu ($A_R = 14,150$). Udział alleli null w *locus* wynosił średnio 8% u drzew dorosłych i 2% u odnowienia (nie zilustrowane).

U drzew potomnych heterozygotyczność obserwowana ($H_O = 0,884$) była wyższa niż u drzew rodzicielskich ($H_O = 0,841$). Heterozygotyczność oczekiwana pokolenia potomnego ($H_E = 0,859$) była o 0,6% większa niż drzew rodzicielskich ($H_E = 0,853$). Poziom wsobności drzew dorosłych wynosił 1,1% ($F_{IS} = 0,011$) i był nieistotny statystycznie, natomiast poziomy wsobności odnowienia wynosił 4,9% ($F_{IS} = 0,049$) (tab. 1). Średnia wartość współczynnika utrwalenia dla drzewostanu rodzicielskiego i odnowienia była niska $F_{ST} = 0,082$.

Obie grupy sosen charakteryzował niewielki dystans genetyczny $D_N = 0,041$, co potwierdza duże 96% podobieństwo genetyczne między badanymi drzewami dorosłymi i odnowieniem ($P_t = 1$; dla $p = 0,02$).

Ogólnie uważa się, że populację cechuje duży przepływ genów, gdy wartość $N_m > 1$ (Slatkin, Barton 1989). Współczynnik $N_m = 30,297$ wskazuje na wysoki przepływ genów między badanymi grupami drzew. Można zatem założyć, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa wzięły udział głównie drzewa dojrzałe badanego drzewostanu.

Tabela 1. Parametry zmienności genetycznej badanych drzew dorosłych i potomnych sosny zwyczajnej

Table 1. Genetic variation parameters for adult and progeny Scots pine trees

<i>Locus</i>	Typ drzew		A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
	Type	of trees							
SPAG 7.14	D		50	20,000	15,077	18,922	0,893	0,934	0,022 ^{ns}
	O		56	21,000	17,606	19,801	0,960	0,943	0,089*
SsrPt-ctg-4363	D		60	10,000	3,352	8,344	0,667	0,702	-0,062 ^{ns}
	O		48	7,000	3,704	6,642	0,792	0,730	0,067 ^{ns}
SPAC 12.5	D		54	19,000	13,1351	18,597	0,963	0,924	0,058 ^{ns}
	O		40	15,000	10,390	16,000	0,900	0,904	-0,006 ^{ns}
Średnia	D		57	16,333±5,508	10,521±6,284	15,290	0,841±0,155	0,853±0,131	0,011 ^{ns}
Mean	O		46	14,333±7,024	10,566±6,952	14,150	0,884±0,085	0,859±0,113	0,049 ^{ns}

D – drzewa dorosłe / adult trees

O – drzewa z odnowienia / natural regeneration

A_0 – średnia liczba alleli / mean allele number

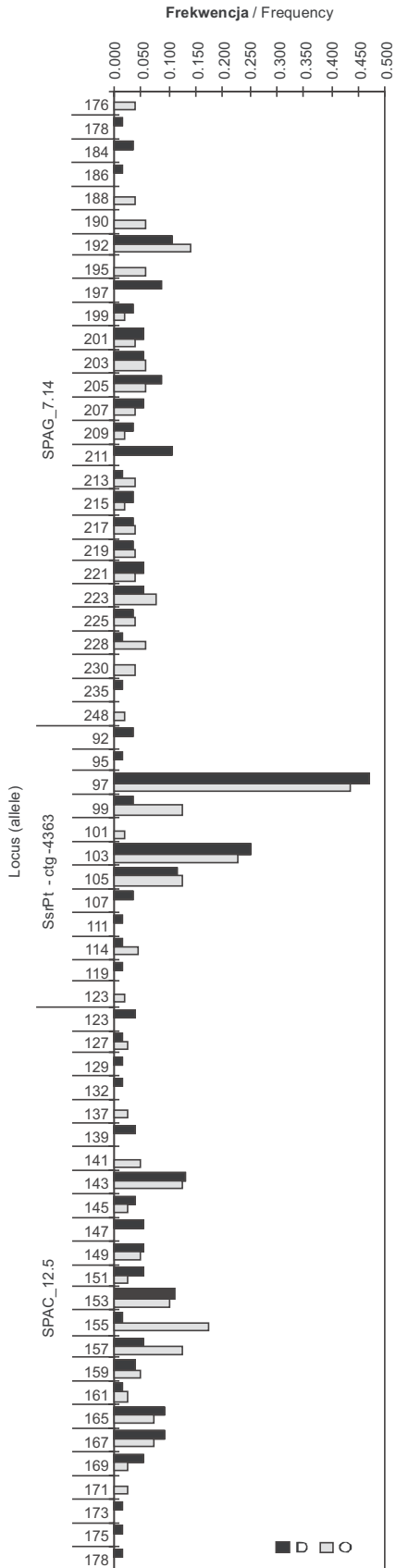
n_a, n_e – obserwowana i oczekiwana liczba alleli na *locus* / effective and expected allele number

A_R – bogactwo alleli / allelic richness

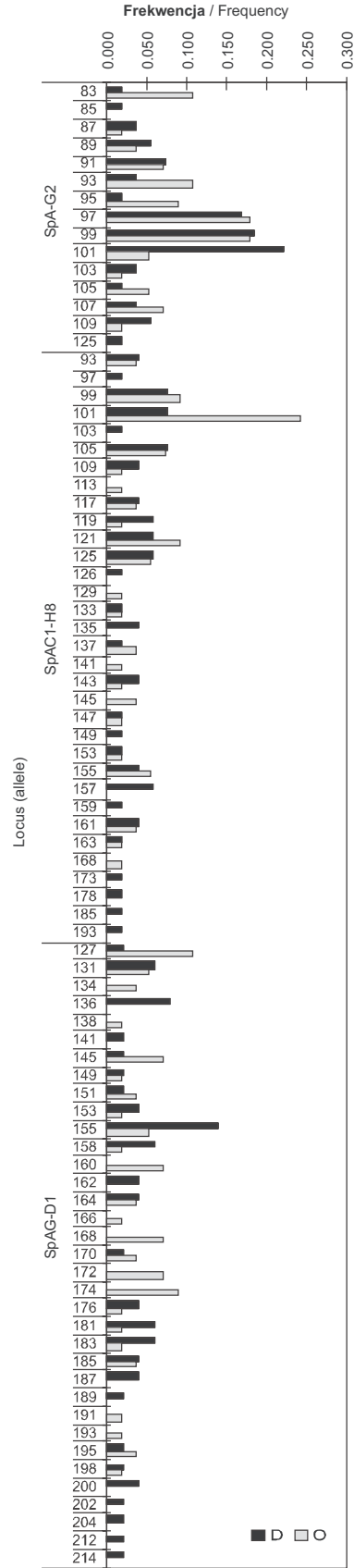
H_O – heterozygotyczność obserwowana / observed heterozygosity

H_E – heterozygotyczność oczekiwana / expected heterozygosity

F_{IS} – współczynnik wsobności: test P values Fishera dla niedoboru heterozygot; ns – nieistotne, * dla $p < 0,05$ / inbreed coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency, ns – not significant, * for $p < 0.05$



Rycina 1. Frekwencja alleli w badanych loci mikrosatelitarnego DNA u drzew dorosłych (D) i w odnowieniu (O) sosny zwyczajnej
Figure 1. Frequency of three microsatellite DNA loci within adult (D) and progeny (O) trees in Scots pine stand



Rycina 2. Frekwencja alleli w badanych loci mikrosatelitarnego DNA u drzew dorosłych (D) i w odnowieniu (O) świerka pospolitego
Figure 2. Frequency of three microsatellite DNA loci within adult (D) and progeny (O) trees in Norway spruce stand

Analiza genetyczna świerka pospolitego

Dla obu grup drzew – dorosłych i potomnych – w Nadl. Jawor, otrzymano 16 różnych wariantów alleli o wielkości od 83 do 125 par zasad dla *locus* SpA–G2 (ryc. 2). W grupie drzew dorosłych najczęściej występującym był allel 101 pz (22%), a u drzew z odnowienia: allele 97 i 99 pz (18%). W populacji potomnej brak było 2 rzadkich alleli – 85 i 125 pz – z puli populacji drzew dorosłych. Dla *locus* SpAC1–H8, odnotowano 33 wariantów alleli, w tym u drzew dorosłych dominowały allele 99, 101 i 105 pz (frekwencja odpowiednio 8%), a u drzew potomnych – allel 101 pz (24%). W populacji drzew dorosłych zaobserwowano brak 11 wariantów alleli, które były obecne w populacji potomnej (od 97 do 193 pz, ryc. 2) i obecność 5 innych alleli (w tym rzadkich, z frekwencją występowania 2%). *Locus* SpAG–D1 miał 35 różnych wariantów alleli, o wielkości od 127 do 214 pz. W populacji drzew dorosłych odnotowano obecność 10 alleli, które nie występowały w populacji potomnej. Wśród drzew potomnych dla tego *locus*, odnotowano 9 nowych wariantów alleli, nieobecnych wśród badanych drzew dorosłych (ryc. 2). Zastosowane w badaniach mikrosatelitarne *loci* charakteryzował wysoki poziom polimorfizmu (PIC = 93,9%).

W przypadku świerka średnia obserwowana i oczekiwana liczba alleli w *locus* oraz bogactwo alleli A_R u drzew rodzicielskich były wyższe ($n_a = 22,667$; $n_e = 15,404$; $A_R = 22,690$) niż u drzew potomnych ($n_a = 20,000$; $n_e = 12,178$; $A_R = 19,200$; tab. 2). Udział

alleli null we wszystkich badanych *loci* łącznie wynosił średnio 10% dla drzew dorosłych i odnowienia.

U drzew potomnych heterozygotyczność obserwowana i oczekiwana (odpowiednio $H_O = 0,723$ i $H_E = 0,913$) były niższe niż u drzew rodzicielskich ($H_O = 0,756$ i $H_E = 0,922$). Udział heterozygot w odnowieniu zmniejszył się o 0,9%. Współczynnik wsobności, określony dla *locus* SpAC1–H8 i SpAG–D1, w przypadku dorosłych świerków był statystycznie istotnie niższy niż współczynnik wsobności świerków w pokoleniu potomnym (tab. 2). Podobnie jak u sosny, dorosłe świerki miały mniejszy współczynnik wsobności ($F_{IS} = 0,190$) w porównaniu do drzew z odnowienia ($F_{IS} = 0,236$). Średnia wartość współczynnika utrwalenia, określającego spadek heterozygotyczności w populacji potomnej, była niska i wynosiła $F_{ST} = 0,032$.

Dystans genetyczny między pokoleniem drzew dojrzałych a odnowieniem okazał się niewielki $D_N = 0,241$; co potwierdził wysoki 79% poziom podobieństwa genetycznego między badanymi drzewami rodzicielskimi i potomnymi ($P_t = 1$; dla $p = 0,02$).

Obliczony dla badanych grup drzew świerka współczynnik $N_m = 18,678$ wskazuje na wysoki przepływ genów między badanymi pokoleniami.

4. Dyskusja

Zastosowane w niniejszych badaniach mikrosatelitarne *loci* jądrowego DNA są jednymi z najprecyzyjniejszych narzędzi służących do określenia genotypów

Tabela 2: Parametry zmienności genetycznej dla badanych drzew rodzicielskich i potomnych świerka pospolitego

Table 2: Genetic variation parameters for adult and progeny Norway spruce trees

<i>Locus</i>	Typ drzew		A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}
	Type	of trees							
SpAC1–H8	D		54	15,000	7,677	14,613	0,778	0,870	0,255***
	O		56	13,000	8,859	12,667	0,821	0,887	0,264***
SpA–G2	D		52	26,000	19,882	27,456	0,731	0,950	0,126 ^{ns}
	O		54	23,000	12,150	21,164	0,704	0,918	0,092*
SpAG–D1	D		50	27,000	18,657	26,000	0,760	0,946	0,182***
	O		56	24,000	15,525	23,761	0,643	0,936	0,341***
Średnia Mean	D		52	22,667±6,658	15,404±6,723	22,690	0,756±0,024	0,922±0,045	0,190**
	O		55	20,000±6,083	12,178±3,333	19,200	0,723±0,091	0,913±0,024	0,236**

D – drzewa dorosłe / adult trees,

O – drzewa z odnowienia / natural regeneration,

A_0 – średnia liczba alleli / mean allele number,

n_a , n_e – obserwowana i oczekiwana liczba alleli na *locus* / effective and expected allele number,

A_R – bogactwo alleli / allelic richness,

H_O – heterozygotyczność obserwowana / observed heterozygosity,

H_E – heterozygotyczność oczekiwana / expected heterozygosity,

F_{IS} – współczynnik wsobności: test P values Fishera dla niedoboru heterozygot; ns - nieistotne, * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$ / inbreed coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency; ns – not significant, * for $p < 0,05$, ** for $p < 0,01$; *** for $p < 0,001$

badanych drzew. Markery te cechuje wysoki polimorfizm oraz precyzja otrzymanych wyników. Zastosowanie tylko trzech markerów mikrosatelitarnych w analizach ok. 30 osobników z każdego pokolenia nie wpłynęło na otrzymane wyniki, ponieważ użyte markery charakteryzował wysoki PIC, średni procent alleli null oraz wysokie prawdopodobieństwo identyczności obliczone na podstawie algorytmu MCMC. Podobne badania, wykonane na mniejszej liczbie osobników, umożliwiły przeprowadzenie charakterystyki genetycznej np. izolowanych populacji jarzębu brekinii,nocków i sokoła (Oddou-Muratorio et al. 2003; Rivers et al. 2005; Rutkowski et al. 2010).

Badanie struktury genetycznej odnowienia naturalnego wykazało większe bogactwo puli genowej potomstwa sosny (o 0,6%) oraz uboższą pulę genetyczną odnowienia naturalnego świerka (o 0,9%) w stosunku do populacji drzew dorosłych. Zaobserwowane niewielkie zmiany w puli genowej obu pokoleń najprawdopodobniej wynikają z różnic częstości alleli, spowodowanych przez naturalny dobór osobników rodzicielskich oraz naturalną selekcję podczas adaptacji do zmiennych warunków środowiska (Gömöry 1992). Wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy populacją rodzicielską i potomną było również stwierdzone przez Chomicz (2013) w większości drzewostanów świerkowych Beskidu Śląskiego i Żywieckiego, gdzie odnotowano nieznaczne wzbogacenie puli genetycznej potomstwa w stosunku do pokolenia rodzicielskiego.

Oczekiwana średnia liczba alleli na *locus* była prawie taka sama u drzew rodzicielskich i potomnych, zarówno w przypadku sosny, jak i świerka. Wśród badanych drzew dorosłych i w odnowieniu odnotowano nieistotny statystycznie niedobór heterozygot, określony za pomocą współczynnika wsobności – odpowiednio 1,1% ($F_{IS} = 0,011$) i 4,9% ($F_{IS} = 0,049$) (tab. 1). Niedobór heterozygot w populacji jest zjawiskiem spotykanym w przyrodzie. Czasami, czynniki selekcyjne mogą działać w kierunku powstawania homozygotycznych *loci* w jednym miejscu genomu, a heterozygotycznych – w innych miejscach genomu, zmniejszając przez to obciążenie genetyczne przez faworyzowanie alleli, odpowiedzialnych za korzystne cechy adaptacyjne populacji (Whitlock 2002). U wielu gatunków roślin i zwierząt obserwuje się dodatnią korelację między poziomem heterozygotyczności a dostosowaniem populacji w trakcie ewolucji. Odwrotny trend korelacji obserwowany jest również w populacjach, w których zachodzi eliminacja szkodliwych alleli oraz chów wsobny (Reed, Frankham 2003).

W przypadku sosny pula genowa pokolenia potomnego została wzbogacona o „nowe” genotypy (niewielki wzrost wartości H_E w porównaniu do drzew dorosłych), prawdopodobnie przy udziale pyłku z drzewostanów sąsiednich. Niska wartość współczynnika utrwalenia

($F_{ST} = 0,082$ dla sosny i $F_{ST} = 0,032$ dla świerka) świadczy o niewielkiej różnicy genetycznej pomiędzy obydwoma pokoleniami drzewostanów.

Powyższe wyniki potwierdziły wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy odnowieniem naturalnym a drzewami dorosłymi zarówno w przypadku sosny (96%), jak i świerka (79%), co może sugerować trwałość badanych drzewostanów, dostosowanych do określonych warunków środowiska. W drzewostanie sosnowym z Nadleśnictwa Oława, wysoki przepływ genów między badanymi grupami drzew ($N_m = 30,297$) oraz niewielkie wzbogacenie puli genowej o nowe genotypy wskazują, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa wzięła udział większość pokolenia drzew dojrzałych, i że nie można wykluczyć udziału drzew z sąsiednich drzewostanów. W badanych grupach drzew świerka z Nadleśnictwa Jawor duża wartość współczynnika migracji ($N_m = 18,678$) i niewielki spadek heterozygotyczności w odnowieniu sugerują, że w kształtowaniu puli genowej potomstwa uczestniczyły głównie drzewa rosnące w obrębie drzewostanu, przy braku lub małym udziale drzew z populacji sąsiednich. Jednak dopiero dalsze badania, uzupełnione np. o analizę przepływu pyłku w warunkach kontrolowanych, całkowicie wyjaśniłyby tę kwestię.

Uzyskane wyniki wskazują na korzystny obraz zachowania struktury genetycznej drzewostanów potomnych we wczesnych fazach wzrostu. Osiągnięcie sukcesu hodowlanego w dużej mierze zależy od poziomu wiedzy o wartości genetycznej drzewostanów rodzicielskich i ich potomstwa. Odnawianie sztuczne głównych gatunków lasotwórczych pozwala zachować większą kontrolę nad przebiegiem selekcji hodowlanej. Jednak zmniejszenie zróżnicowania genetycznego sadzonek produkowanych w szkółkach, będące konsekwencją selekcji, może być przyczyną ich mniejszej tolerancji na czynniki szkodliwe niż w przypadku odnowień naturalnych.

Ze względu na zakres badań pominięto zagadnienia związane ze sposobem zagospodarowania drzewostanu macierzystego, choć mogą one mieć wpływ na pulę genową drzewostanu potomnego (Sabor 2003). Zdaniem Sabora (2003), stosowana rębnia musi umożliwiać swobodny przepływ genów między populacjami danego gatunku tak, aby nie zubażać puli genowej drzewostanu. Niekorzystne jest również odnawianie izolowanych populacji, gdzie pyłek nie ma możliwości wymiany z sąsiednimi drzewostanami, gdyż zjawisko to może prowadzić do chowu wsobnego (Tigerstedt et al. 1982). Według obserwacji prowadzonych dla jodły i buka, najkorzystniejsze są rębnie stopniowe z długim okresem odnowienia, a także, w nieco mniejszym stopniu, rębnia przerębowa (Konnert et al. 2007). Badania prowadzone nad sosną w Nadl. Gubin, wykazały duże podobieństwo struktury genetycznej naturalnego odnowienia do drze-

wostanu macierzystego, jednak był to rzadko występujący u sosny drzewostan wielogeneracyjny z odnowieniem w wieku 20–50 lat (Kosińska et al. 2007). Z drugiej strony wyniki uzyskane w ramach niniejszych badań w drzewostanie sosnowym w Nadl. Oława wskazują, że również przy krótkim okresie odnowienia można uzyskać młode pokolenie o zbliżonej puli genowej do pokolenia macierzystego.

Dla zachowania puli genowej drzewostanu, oprócz sposobu odnowienia, istotny jest także wpływ stosowanych cięć pielęgnacyjnych (czyszczeń oraz trzebieży). Prowadzone w przeszłości trzebieże sortymentowe ukierunkowane na pozyskanie cennych sortymentów wielkowymiarowych, w konsekwencji prowadziły do pozostawiania w drzewostanach osobników o najgorszych cechach pod względem fenotypowym, jakościowym i zdrowotnym (Bernadzki et al. 1999). Badania prowadzone w drzewostanach, gdzie zastosowano rzadkie, ale bardzo silne cięcia pielęgnacyjne, wykazały, że silna trzebież również niesie ze sobą ryzyko utraty rzadkich alleli (Konnert et al. 2007).

5. Wnioski

1. Struktura genetyczna drzewostanu, określona współczynnikiem heterozygotyczności populacji, może być podstawą oceny puli genowej pokolenia potomnego drzew leśnych z odnowienia naturalnego.

2. Poziom zmienności genetycznej drzew, zarówno w przypadku sosny, jak i świerka, w drzewostanie macierzystym i w pokoleniu potomnym z odnowienia naturalnego nie różni się; zmiany w obecności i częstotliwości rzadkich alleli były nieliczne.

3. Niewielkie zmiany w strukturze genetycznej dwóch pokoleń sosny i świerka sugerują zachowanie tego samego poziomu zdolności przystosowawczych nowego pokolenia do zmieniających się warunków środowiska naturalnego.

4. Zachowanie puli genowej w młodym pokoleniu gatunków lasotwórczych wymaga zwiększenia udziału odnowień naturalnych. Do oszacowania skali tego wzrostu niezbędne są badania na szerszą skalę, uwzględniające wpływ rodzaju rębni na zmienność genetyczną młodego pokolenia.

Podziękowania

W publikacji przedstawiono wyniki badań zrealizowanych w ramach projektu „Odnowienie naturalne najważniejszych gatunków lasotwórczych w Polsce jako element strategii trwałego i zrównoważonego zagospodarowania lasu” sfinansowanego przez Dyрекcję Generalną Lasów Państwowych.

Szczególne podziękowania składamy pracownikom Nadleśnictw Jawor i Oborniki Śląskie za udostępnienie drzewostanów do badań, jak również Jolancie Bieniek, Małgorzacie Borys i Annie Terebie z Zakładu Hodowli i Genetyki Drzew Leśnych IBL, za pomoc w analizach laboratoryjnych DNA i opracowaniu danych.

Pracę dedykujemy naszej Koleżance, śp. Anecie Michalskiej, która brała aktywny udział w analizach laboratoryjnych sosny i świerka.

Literatura

- Avise J. C. 2004. Molecular markers, natural History, and Evolution. Second Ed., Sinauer Associates, USA: s. 664. ISBN 0-87893-041-8.
- State of Europe's Forests 2011. Status and trends in sustainable forest management in Europe. UNECE/FAO: s. 340.
- Bernadzki E., Ilmurzyński E., Szymański S. 1999. Trzebieże. Warszawa, PWRiL. 258 s. ISBN 83-09-00192-4.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T. et al. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1204-1214.
- Chomicz E. 2013. Zmienność genetyczna odnowień naturalnych świerka (*Picea abies* L. Kart.) w zamierających drzewostanach Beskidu Śląskiego i Żywieckiego. Rozprawa doktorska, Sękocin Stary, Instytut Badawczy Leśnictwa, s. 111.
- Corander J., Waldmann P., Sillanpää M. J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367–374.
- Csaikl U. M., Glaz I., Baliuckas V., Petit R. J., Jensen J. S. 2002. Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland. *Forest Ecology Management*, 156: 211–222.
- Dering M., Lewandowski A. 2009. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? *Forest Ecology Management*, 259: 229–235.
- Devey M.E., Delfinomix A., Kinloch B.B., Neale D.B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white-pine blister rust in sugar pine. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 2066–2070.
- Dobrowolska D. 2010. Warunki powstawania odnowień naturalnych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Tuszyna. *Leśne Prace Badawcze*, 71 (3): 217–224.
- Gudet J. 2002. J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*, 86(6): 485–486.
- Gömöry D. 1992. Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology Management*, 54: 215–223.
- González-Martínez S.C., Ersoz E., Brown G.R., Wheeler N.C., Neale D.B. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics*, 172: 1915–1926.

- Gutiérrez J.P., Royo L.J., Álvarez I., Goyache F. 2005. MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718–721.
- Hamrick J. L., Nason J. D. 2000. Gene flow in forest trees. w: Forest conservation genetics: principles and practice. Ed. A. Young, D. Boshier, T. Boyle, Wallingford, UK, CABI, s. 81–90. ISBN 0-85199-504-7.
- Konnert M., Hosius B., Hüssendorfer E. 2007. Genetische Auswirkungen waldbaulicher Maßnahmen – Ergebnisse, Stand und Forschungsbedarf. *Forst und Holz*, 62, 1: 8–14. ISSN 0932-9315.
- Kosińska J., Lewandowski A., Chałupka W. 2007. Genetic variability of Scots pine maternal populations and their progenies. *Silva Fennica*, 41(1): 5–12.
- Kremer A., Reviron M. P. 2004. Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 197: 1–2.
- Lindner M., Maroschek M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J. et al. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 259: 698–709.
- Longauer R., Gömöry D., Pacalaj M., Krajmerova D. 2010. Genetic aspects of stress tolerance and adaptability of Norway spruce. w: Spruce forest decline in the Beskids. Hlásny T., Sitková Z. (red.). Zvolen, National Forest Centre – Forest Research Institute Zvolen. s. 131–143.
- Mejnartowicz L. 2010. Zmienność jodły (*Abies alba* Mill.) w polskich Karpatach i Sudetach. w: Postęp badań w zakresie genetyki populacyjnej i biochemicznej drzew leśnych. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13: Kraków, Polska Akademia Umiejętności: 27–36.
- Namkoong G. 1991. Maintaining Genetic Diversity in Breeding for Resistance in Forest Trees. *Annual Review of Phytopathology* 29: 325–342. DOI: 10.1146/annurev.py.29.090191.001545.
- Neale D. B., Ingvarsson P.K. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. *Plant Biology*, 11(2): 149–155.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 23: 341–369.
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press. ISBN 0-231-06320-2.
- Nowakowska J. A. 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Poland. *Dendrobiology*, 61: 119–129.
- Nowakowska J. A. 2010. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13, Kraków, Polska Akademia Umiejętności, s. 37–53.
- Nowakowska J. A., Oszako T. 2008. Stan zdrowotny i różnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA. *Sylwan*, 9: 11–20.
- Oddou-Muratorio S., Houot M.L., Demesure-Musch B., Austerlitz F. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, 12(12): 3427–3439.
- Peakall, R., Smouse P.E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pfeiffer A., Olivieri A. M., Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Genome*, 40: 411–419.
- Prus-Głowacki W., Godzik S. 1995. Genetic structure of *Picea abies* trees tolerant and sensitive to industrial pollution. *Silvae Genetica*, 44: 62–65.
- Raport o stanie lasów w Polsce 2012. CILP, Warszawa 2011: 84 s.
- Reed D. H., Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1): 230–237.
- Rivers N.M., Butlin R. K., Altringham J.D. 2005. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14: 4299–4312.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rutkowski R., Rejt Ł., Tereba A., Gryczyńska-Sięmiątkowska A., Janic B. 2010. Population genetic structure of the European kestrel *Falco tinnunculus* in Central Poland. *European Journal of Wild Research*, 56: 297–305.
- Sabor J. 2003. Wpływ stosowanych zabiegów pielęgnacyjnych i rębni na zmianę struktury genetycznej drzewostanów. *Sylwan*, 2: 39–48.
- Slatkin M., Barton N. H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349–1368.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1260–1261.
- Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Gebourek T., Vendramin G. G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology*, 10: 257–263.
- Tigerstedt P.M.A., Rudin D., Niemelä T., Tammissola J. 1982. Competition and neighbouring effect in a naturally regenerating population of Scots pine. *Silva Fennica*, 16: 122–129.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Whitlock M.C. 2002. Selection, load, and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics*, 160: 1191–1202.

Wkład autorów

J.A.N. opracowała koncepcję badawczą i zaprojektowała eksperymenty, analizowała dane i napisał manuskrypt. T.Z. uczestniczył w zbieraniu materiału roślinnego i napisał manuskrypt. A.K. przyczyniła się do głównych idei zawartych w dyskusji.

Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands

Justyna Anna Nowakowska*, Tadeusz Zachara, Agata Konecka

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

Tel. +48 22 7150467, e-mail: j.nowakowska@ibles.waw.pl

Abstract: The genetic variability and biodiversity of tree populations ensure the stability and sustainability of forest ecosystems. New research tools based on molecular DNA markers enable precise characterisation of forest genetic resources, i.e. detection of different allele frequencies in mature trees and progeny populations. The paper describes the genetic structure of mature stands of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Oława Forest District and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) in Jawor Forest District and stands of their respective progeny.

In the Scots pine stand, there was a slight increase (0.6%) in heterozygosity level and a larger increase (4.9%) in the inbreeding coefficient of progeny trees. In the Norway spruce stand, despite a small reduction (0.9%) in heterozygosity, a similar increase (4.6%) in the inbreeding coefficient of progeny was revealed. In both stands, allele richness and the partition probability of basic clustering were high. Both pine and spruce adults and progeny trees were characterised by high levels of genetic similarity (96% and 79%, respectively). Gene flow between the mature and progeny populations was high ($N_m > 1$) for both Scots pine and Norway spruce.

Conservation of the gene pool within forest tree stands requires an increase in the proportion of natural regeneration. To estimate the extent to which genes are transmitted between adult trees and their progeny, more studies are needed, especially taking into account the influence of silviculture measures, like selective tree cutting, on the genetic variability of the younger generation.

These results confirm that the gene pool was conserved when transmitted between the stands studied, as well as highlight the usefulness of such a study for silvicultural purposes.

Key words: nSSR markers, gene flow, genetic differentiation

1. Introduction

Knowledge about gene pool of forest tree species provides valuable information on the genetic structure of stands, including the genome sequence of an individual tree, as well as genetic variation at the population level. The richness of the gene pool of each population is determined on the basis of DNA allele occurrence in the genome. Despite the phenomenon of outbreeding depression, caused by a sudden drop in the mating of individuals

from remote and isolated stands, it can be assumed that a more diverse gene pool of the species ensures a greater likelihood of a favourable combination of alleles, guaranteeing the survival and adaptation to changing environmental conditions (Reed, Frankham 2003).

Many studies have been devoted to the genetic structure analysis relying on nuclear, mitochondrial and chloroplast DNA markers, as well as to the transmission of favourable breeding and resistance traits from mature trees to their progeny (Hamrick, Nason 2000; Sperisen

et al. 2001; Avise 2004; Kremer, Reviron 2004; Neale, Ingvarsson 2008). In Poland, the research concerning genetic structure of forest tree populations was carried out, for example, Scots pine and Norway spruce based on nuclear and mitochondrial DNA markers, including RAPD, STS, PCR-RFLP and SSR (Csaikl et al. 2002; Dering, Lewandowski 2009; Nowakowska 2009, 2010). Those studies revealed for example two main directions of recolonisation routes of Norway spruce migration in Poland (Dering, Lewandowski 2009).

The forest area deriving from natural regeneration in Poland increased from 3% to 10% in recent decades (Report on the State of Forests in 2012), but still remains below the average of 67% portion in Europe (State of Europe's Forests 2011). An important issue then arises: is there any advisability and possibility of increasing the share of the naturally regenerated trees, regarding the environmental, economic and social functions of the forest? The postulate of sustainable forest management implied increased interest in natural regeneration methods e.g. for pine (Dobrowolska 2010).

The present research topic stays in line with the current study. The assessment of the genetic structure of pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) mature stands and their progeny may help to understand the gene pool transmission between generations. The preliminary hypothesis was that the local genetic pool of pine and spruce stands is at a similar level, both in mature trees as well as in young generation resulting from natural regeneration (self-seeding). The study aimed to determine the gene pool level in both groups of trees of each species, defined on the basis of the level of genetic variability of nuclear DNA *loci*.

2. Materials and methods

Plant material (needles) was collected from 60 trees located in the following areas:

- Scots pine population from Oława Forest District, Karwiniec Forest Division 98c, 114-year old stand, growing on fresh mixed forest habitat, in a class of renewal, with 10% of the 7-year-old progeny coverage;
- Norway spruce population from Jawor Forest District, Muchów Forest Division 155h, 105-year-old stand, a moderate habitat of upland fresh mixed forest, with 30% of 7-year-old of natural regeneration coverage.

Genomic DNA was isolated from 30–35 wood samples of each adult tree, randomly located within the stand, separated by a 10-metre distance, as well as from 30 needles from young generation plants. Extraction was performed

with DNeasy 250 Plant Mini Kit (QIAGEN), and yielded DNA was analysed spectrophotometrically in NanoDrop ND-1000 (TK-Biotech). In order to characterise the genetic structure of Scots pine samples, three nuclear microsatellite *loci* were used: SPAG 7.14, SPAC 12.5 and SsrPt-ctg-4363 (Soranzo et al. 1998; Chagné et al. 2004). In the case of Norway spruce samples, the following three nuclear microsatellite *loci* were applied: SpA-G2, SpAC1-H8 and SpAG-D1 according to Pfeiffer et al. (1997). Genotyping of investigated trees was performed with CEQ™ 8000 Series Genetic Analysis System software v 9.0 in CEQ 8000 sequencer (Beckman Coulter®).

Genetic variation parameters for adult and progeny trees were estimated by effective (n_e) and expected (n_e) allele number per *locus*, as well as frequencies of null allele occurrence in GenePop v.4.0.10 software (Rousset 2008). Polymorphic informative content (PIC) was calculated with MolKin v.3.0 software (Gutiérrez et al. 2005). Observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) (Nei 1978) were evaluated with GenAlEx 6.5 software (Peakall, Smouse 2012). FSTAT v. 2.9.3.2 software (Gudet 2002) was used to calculate allelic richness (A_R), taking into account unequal number of individuals in the experiment, as well as the inbreed coefficient (F_{IS}) and the differentiation coefficient (F_{ST}) according to Weir and Cockerham (1984). Genetic similarity between adult and progeny trees was estimated by partition probability (P_j), resulting from basic clustering Markov Chain Monte Carlo algorithm (MCMC), $p = 0.02$ with BAPS 2.0 software (Corander et al. 2003). Gene flow between groups of trees was given by N_m parameter (Nei 1987).

3. Results

Genetic analysis of Scots pine stand

In SPAG 7.14 *locus*, 27 different allele variants were obtained, ranging from 176 base pairs (bp) to 248 bp (Fig. 1). Two alleles (192 and 211 bp) were predominantly present with 11% of frequency within adult pines, whereas in progeny trees allele 192 bp was predominant (14% of frequency). Six alleles were missing in progeny trees (178, 184, 186, 197, 211 and 235 bp) but six new ones appeared (176, 188, 190, 195, 230 and 248 bp). In SsrPt-ctg-4363 *locus*, 12 allele variants were found ranging from 92 to 123 bp (Fig. 1). In this *locus*, allele 97 bp was predominant both in adult and progeny trees, with frequencies of 44% and 47%, respectively. Next generation of trees had two new alleles (101 and 123 bp) not found in mature stand, but had missed five

alleles (92, 95, 107, 111 and 119 bp). Twenty-four different alleles were observed in *locus* SPAC 12.5 from 123 to 178 bp. Adult trees had eight unique alleles, not present in progeny. Conversely, next generation of trees had three new alleles, i.e. 137, 141 and 171 bp (Fig. 1). All three SSR *loci* had a high level of PIC = 84.1%.

Mean observed number of alleles per locus was higher in adult trees ($n_a = 16.333$) than in natural regeneration ($n_a = 14.333$, Table 1). Expected mean allele numbers per locus were at the same level in both groups of trees: $n_e = 10.521$ and $n_e = 10.566$, respectively (Table 1). Allelic richness was higher in mature stand ($A_R = 15.290$) than in the progeny ($A_R = 14.150$). Null allele share (8%) was high in adult trees compared with 2% in progeny (not illustrated).

The observed heterozygosity ($H_O = 0.884$) in progeny was higher than in the parental trees ($H_O = 0.841$). The expected heterozygosity ($H_E = 0.859$) in progeny was about 0.6% higher than the parental trees ($H_E = 0.853$). The level of inbreeding coefficient in adult trees was lower ($F_{IS} = 0.011$) than in progeny ($F_{IS} = 0.049$), but both values were statistically insignificant (Table 1). The average allele fixation index between parental and regenerated stand was low ($F_{ST} = 0.082$).

Small genetic distance $D_N = 0.041$ separated both groups of pines, confirmed by high (96%) genetic similarity between the studied adult and young trees ($Pt = 1$, $p = 0.02$).

It is generally considered that a value of $N_m > 1$ characterises large gene flow within a given population (Slatkin, Barton 1989). Thus, our study value of $N_m = 30.297$ obtained indicates a high gene flow between investigated groups of trees. It can therefore be assumed that mainly mature trees of the Oława stand had taken a major role in shaping the gene pool of the offspring.

Genetic analysis of Norway spruce stand

For both groups of trees – adult and progeny spruces from Jawor Forest District – 16 different allelic variants ranging from 83 to 125 bp were obtained in *locus* SpA-G2 (Fig. 2). In this locus, 101 bp allele was the most frequent (22%) in adult trees, whilst 97 and 99 bp alleles were predominant (18%) within the progeny. Two rare alleles – 85 and 125 bp – from a gene-pool of adult population were missing in renewal trees. In *locus* SpAC1 H8, 33 allelic variants were reported, including dominant alleles of size 99, 101 and 105 bp (frequency c.a. 8%) in adult trees and

Table 1. Genetic variation parameters for adult and progeny Scots pine trees

<i>Locus</i>	Type of trees	A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}^a
SPAG 7.14	D	50	20.000	15.077	18.922	0.893	0.934	0.022 ^{ns}
	O	56	21.000	17.606	19.801	0.960	0.943	0.089*
SsrPt-ctg-4363	D	60	10.000	3.352	8.344	0.667	0.702	-0.062 ^{ns}
	O	48	7.000	3.704	6.642	0.792	0.730	0.067 ^{ns}
SPAC 12.5	D	54	19.000	13.1351	18.597	0.963	0.924	0.058 ^{ns}
	O	40	15.000	10.390	16.000	0.900	0.904	-0.006 ^{ns}
Mean	D	57	16.333±5.508	10.521±6.284	15.290	0.841±0.155	0.853±0.131	0.011 ^{ns}
	O	46	14.333±7.024	10.566±6.952	14.150	0.884±0.085	0.859±0.113	0.049 ^{ns}

D – adult trees

O – natural regeneration

A_0 – mean allele number

n_a, n_e – effective and expected allele number

A_R – allelic richness

H_O – observed heterozygosity

H_E – expected heterozygosity

F_{IS} – inbreeding coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency, ns – not significant, * for $p < 0.05$

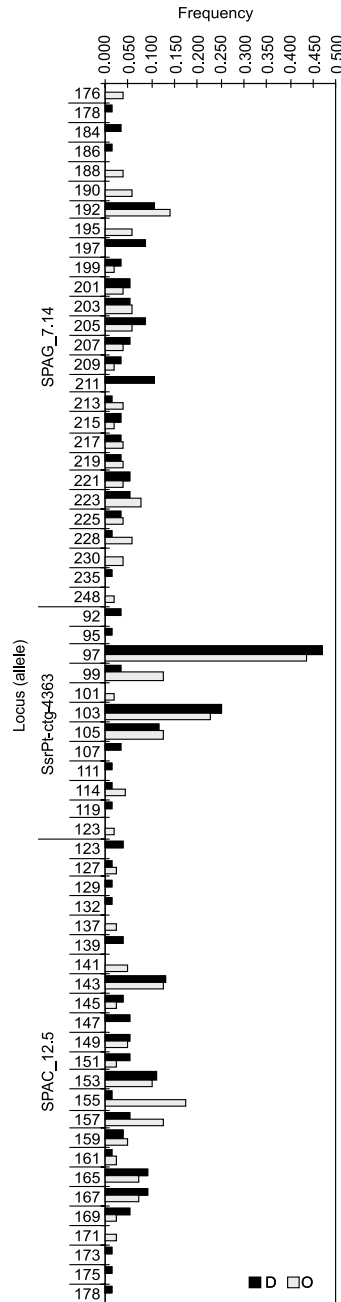


Figure 1. Frequency of three microsatellite DNA *loci* within adult (D) and progeny (O) trees in Scots pine stand

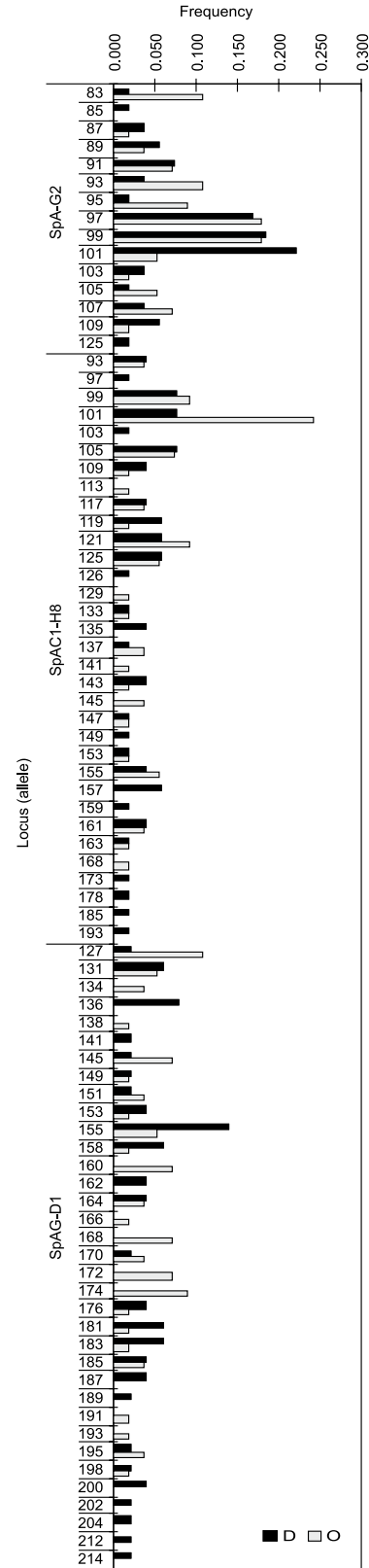


Figure 2. Frequency of three microsatellite DNA *loci* within adult (D) and progeny (O) trees in Norway spruce stand

one dominant 101 bp allele (frequency 24%) in progeny trees. Eleven allelic variants present in the progeny population (ranging from 97 to 193 bp) were missing in adult population (Fig. 2). Conversely, the later population was enriched by five other rare alleles, i.e. occurring with c.a. 2% in the investigated trees.

The *locus* SPAG-D1 had 35 different allelic variants, ranging in size from 127 to 214 bp. In adult tree population, 10 unique alleles (i.e. not present in the progeny population) were revealed, while the progeny population had nine new allelic variants present in this locus (Fig. 2). High level of polymorphism (PIC = 93.9%) characterised all investigated microsatellite loci.

The observed and expected average numbers of alleles per locus, as well as allelic richness (A_R), were higher ($n_a = 22.667$, $n_e = 15.404$, $A_R = 22.690$) in adult trees compared with the progeny ($n_a = 20.000$, $n_e = 12.178$, $A_R = 19.200$; Table 2). The average share of null alleles in all loci was estimated for 10% for both groups of spruce.

In progeny population, the observed and expected heterozygosity ($H_O = 0.723$ and $H_E = 0.913$, respectively) was lower than in the adult population ($H_O = 0.756$ and $H_E = 0.922$). Compared with the adult population,

a 0.9% loss of heterozygotes was observed in progeny population.

In the case of adult spruces, inbreeding coefficients for SpAC1-H8 and SPAG-D1 *loci* were statistically significantly lower than in next generation of trees (Table 2). Similar to the pine stand, adult spruce population have lower coefficient of inbreeding ($F_{IS} = 0.190$) compared with progeny ($F_{IS} = 0.236$). The average value of the coefficient of fixation, determining a decrease of heterozygosity in natural regeneration population, was low ($F_{ST} = 0.032$).

Small genetic distance between the generation of mature and progeny trees was observed ($D_N = 0.241$), confirmed by high level of 79% genetic similarity between the studied groups of trees ($Pt = 1$, $p = 0.02$).

The migration coefficient $N_m = 18.678$ indicates high gene flow between the studied generations of Norway spruce trees.

4. Discussion

The nuclear microsatellite DNA *loci* are nowadays considered to be the most precise tools to determine the genotypes of living organisms. These markers are

Table 2. Genetic variation parameters for adult and progeny Norway spruce trees

Locus	Type of trees	A_0	n_a	n_e	A_R	H_O	H_E	F_{IS}^a
SpAC1-H8	D	54	15.000	7.677	14.613	0.778	0.870	0.255***
	O	56	13.000	8.859	12.667	0.821	0.887	0.264***
SpA-G2	D	52	26.000	19.882	27.456	0.731	0.950	0.126 ^{ns}
	O	54	23.000	12.150	21.164	0.704	0.918	0.092*
SpAG-D1	D	50	27.000	18.657	26.000	0.760	0.946	0.182***
	O	56	24.000	15.525	23.761	0.643	0.936	0.341***
Mean	D	52	22.667 ± 6.658	15.404 ± 6.723	22.690	0.756 ± 0.024	0.922 ± 0.045	0.190**
	O	55	20.000 ± 6.083	12.178 ± 3.333	19.200	0.723 ± 0.091	0.913 ± 0.024	0.236**

D – adult trees

O – natural regeneration

A_0 – mean allele number

n_a , n_e – effective and expected allele number

A_R – allelic richness

H_O – observed heterozygosity

H_E – expected heterozygosity

F_{IS} – inbreeding coefficient: Fisher exact test P values for heterozygote deficiency; ns – not significant, * for $p < 0.05$,

** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$

characterised by high polymorphism and repeatability. The high PIC, average percentage of null alleles and high probability of identity calculated with MCMC algorithm prevailed the small number of three microsatellite markers used in the present analysis of approximately 30 individuals from each generation. Similar studies carried out on a smaller number of individuals allowed conducting a similar genetic study on isolated populations of wild cherry, bat and the falcon (Oddou-Muratorio et al. 2003; Rivers et al. 2005; Rutkowski et al. 2010).

The present study revealed c.a. 0.6% greater variety of gene pool of young pines and 0.9% poorer gene pool of natural regeneration of spruce compared with the population of adult trees. The observed small changes in the gene pool of both generations are most likely due to differences in allele frequencies caused by the natural selection during adaptation of the stand to changing environmental conditions (Gömöry 1992). High genetic similarity between populations of parental and progeny was also observed by Chomicz (2013) in few spruce stands from Silesian and Żywiecki Beskid, where a slight enrichment of the gene pool of the offspring in relation to parental generation was observed.

Both in the case of pine and spruce stands, the average expected number of alleles *per locus* was almost the same in adults and progeny trees. Among the studied populations, non-significant heterozygote deficiency, determined by the coefficient of inbreeding $F_{IS} = 0.011$ and $F_{IS} = 0.049$ respectively, was reported (Table 1).

A heterozygote deficiency at the population level may occur in nature. Sometimes, selection agents may favour homozygous allele in a single *locus* of the genome, and sometimes may favour heterozygous alleles – in another *locus* – by choosing alleles responsible for the advantageous adaptive features of a population (Whitlock, 2002). The positive correlation between the level of heterozygosity and the adaptation of population during the evolution of many plants and animals species has been observed. The opposite (negative) trend may also occur, when the elimination of harmful alleles and inbreeding process leads to the impoverishment of a gene pool (Reed, Frankham 2003).

In the case of Scots pine stand, the gene pool of young generation of trees has been enriched by ‘new’ alleles (as far as a slight increase in the value of H_E compared with adult trees was denoted), probably mediated via pollen migration from neighbouring stands. Low coefficients of fixation level ($F_{ST} = 0.082$ for pine, and $F_{ST} = 0.032$ for spruce) show little difference between the two generations of the investigated stands.

These findings endorse the hypothesis of high genetic similarity between the new generation and the adult trees, both for pine (96%) and spruce (79%) stands, suggesting genetic stability of those populations, well adapted to specific environmental conditions. The Scots pine from Oława Forest District revealed high gene flow ($N_m = 30.297$) between adult trees and offspring generation. Small enrichment of population with new genotypes indicates that adult generation took a major role in shaping the gene pool of the population, without excluding the participation of pollen deriving from neighbouring stands.

Similarly, high value migration level ($N_m = 18.678$) and a slight decrease of heterozygosity in the progeny trees in Norway spruce from the Jawor Forest District suggests that mainly trees growing within a stand took part in shaping the gene pool of the offspring, with little participation of the neighbouring stands. However, more studies are needed to elucidate this issue, e.g. the analysis of pollen flow under controlled conditions.

Breeding success largely depends on knowledge about the genetic value of forest tree stand. The awareness about genetic structure of the natural regeneration and mature trees producing pollen ensures the success of the silviculture measures. During artificial regeneration, there is a risk of reduction of genetic diversity (via selection) of plant material produced in forest nurseries, resulting sometimes in smaller tolerance of the young seedlings to the harmful environmental conditions.

According to the scope of this study, issues related to the forest management performed in mature stands have been omitted, although they may play a crucial role in gene pool of the offspring (Sabor 2003). In agreement with this author, thinning must allow free pollen flow between neighbouring populations. Another problem may occur in isolated populations where pollen exchange with neighbouring tree stands is limited, and often leads to inbreeding process (Tigerstedt et al. 1982). According to the observations made for fir and beech stands, a irregular shelterwood cutting and selection cutting are the most suitable for genetic stability of a stand (Konnert et al. 2007). Research conducted over the pines in Gubin Forest District showed great similarity of the genetic structure between natural regeneration and adult trees (Kosińska et al. 2007). Moreover, the results obtained in the pine population from Oława Forest District (present study) indicate that even the short-term regeneration period can get in the offspring a similar gene pool with the adult trees.

Another silvicultural measure, i.e. tending cuts (cleaning and thinning) has also an important effect on pop-

ulation structure. Thinning trials conducted in the past aimed at gaining valuable assortments of large size, and consequently led to less valuable trees remained in terms of phenotypic quality and health (Bernadzki et al. 1999). Research carried out in the stands where very strong cutting treatments were applied showed the risk of loss of rare alleles among next generation of trees (Konnert et al. 2007).

5. Conclusions

1. Genetic structure of the stand, defined by the heterozygosity coefficient of the population, can be useful in the gene pool assessment within progeny trees issued from natural regeneration.

2. There is no genetic variation between parental and naturally regenerated trees of Scots pine and Norway spruce in their respective stands; almost no changes in the presence and frequency of rare alleles were observed.

3. Minor changes in the genetic structure between two generations of pine and spruce trees suggest the maintenance of the same level of adaptability to changing environmental conditions in the progeny.

4. The conservation of the gene pool in the young generation of forest tree species requires an increase of natural regeneration as a reforestation method. To estimate the importance of natural regeneration scale in silviculture, more studies performed on a larger scale are needed, taking into account the influence of the different cutting methods on the genetic variability loss among the young generation of trees.

Acknowledgements

The paper presents the results of research carried out in the framework of the project ‘Natural regeneration most important commercial species in Poland as part of a strategy of sustainable forest management’ funded by the Directorate General of State Forests in Poland.

Special thanks are addressed to the employees of the Jawor and Oława Forest Districts, as well as to Jolanta Bieniek, Malgorzata Borys and Anna Tereba from the Department of Silviculture and Forest Tree Genetics of Forest Research Institute, for their help in laboratory analyses and compiling data.

The paper is dedicated to our colleague, Aneta Michalska, who recently passed away. She actively participated in plant material collection and performed the laboratory analyses of pine and spruce samples.

References

- Avise J. C. 2004. Molecular markers, natural History, and Evolution. Second Ed., Sinauer Associates, USA: p. 664. ISBN 0-87893-041-8.
- State of Europe’s Forests 2011. Status and trends in sustainable forest management in Europe. UNECE/FAO: p. 340.
- Bernadzki E., Ilmurzyński E., Szymański S. 1999. Trzebieże. Warszawa, PWRiL, 258 p. ISBN 83-09-00192-4.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T. et al. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1204–1214.
- Chomicz E. 2013. Zmienność genetyczna odnowień naturalnych świerka (*Picea abies* L. Kart.) w zamierających drzewostanach Beskidu Śląskiego i Żywieckiego. Rozprawa doktorska, Sękocin Stary, Instytut Badawczy Leśnictwa, p. 111.
- Corander J., Waldmann P., Sillanpää M. J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367–374.
- Csaikl U. M., Glaz I., Baliuckas V., Petit R. J., Jensen J. S. 2002. Chloroplast DNA variation of white oak in the Baltic countries and Poland. *Forest Ecology Management*, 156: 211–222.
- Dering M., Lewandowski A. 2009. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? *Forest Ecology Management*, 259: 229–235.
- Devey M. E., Delfinomia A., Kinloch B. B., Neale D. B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white-pine blister rust in sugar pine. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 2066–2070.
- Dobrowolska D. 2010. Warunki powstawania odnowień naturalnych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Tuszyma [Establishment condition of Scots pine natural regeneration in Tuszyma Forest District]. *Leśne Prace Badawcze*, 71 (3): 217–224.
- Gudet J. 2002. J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *Journal of Heredity*, 86 (6): 485–486.
- Gömöry D. 1992. Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology Management*, 54: 215–223.
- González-Martínez S. C., Ersoz E., Brown G. R., Wheeler N. C., Neale D. B. 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics*, 172: 1915–1926.
- Gutiérrez J. P., Royo L. J., Álvarez I., Goyache F. 2005. MolK-in v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718–721.
- Hamrick J. L., Nason J. D. 2000. Gene flow in forest trees. In: Forest conservation genetics: principles and practice. Ed. A. Young, D. Boshier, T. Boyle, Wallingford, UK, CABI, p. 81–90. ISBN 0-85199-504-7.

- Konnert M., Hosius B., Hüssendorfer E. 2007. Genetische Auswirkungen waldbaulicher Maßnahmen – Ergebnisse, Stand und Forschungsbedarf. *Forstund Holz*, 62, 1: 8–14. ISSN 0932-9315.
- Kosińska J., Lewandowski A., Chałupka W. 2007. Genetic variability of Scots pine maternal populations and their progenies. *Silva Fennica*, 41 (1): 5–12.
- Kremer A., Reviron M. P. 2004. Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 197: 1–2.
- Lindner M., Maroschek M., Netherer S., Kremer A., Barbati A., Garcia-Gonzalo J. et al. 2010. Climate change impacts, adaptive capacity and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology Management*, 259: 698–709.
- Longauer R., Gömöry D., Pacalaj M., Krajmerova D. 2010. Genetic aspects of stress tolerance and adaptability of Norway spruce. In: Spruce forest decline in the Beskids. Hlásny T., Sitková Z. (eds.). Zvolen, National Forest Centre – Forest Research Institute Zvolen, p. 131–143.
- Mejnartowicz L. 2010. Zmienność jodły (*Abies alba* Mill.) w polskich Karpatach i Sudetach. in: Postęp badań w zakresie genetyki populacyjnej i biochemicznej drzew leśnych [Variation of silver fir (*Abies alba* Mill.) in Polish Carpathian and Sudeten populations]. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13: Kraków, Polska Akademia Umiejętności: 27–36.
- Namkoong G. 1991. Maintaining Genetic Diversity in Breeding for Resistance in Forest Trees. *Annual Review of Phytopathology* 29: 325–342. DOI: 10.1146/annurev.py.29.090191.001545.
- Neale D. B., Ingvarsson P. K. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of adaptation in forest trees. *Plant Biology*, 11 (2): 149–155.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 23: 341–369.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press. ISBN 0-231-06320-2.
- Nowakowska J. A. 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in Poland. *Dendrobiology*, 61: 119–129.
- Nowakowska J. A. 2010. Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej i świerka pospolitego na podstawie markerów DNA jądrowego i mitochondrialnego [Genetic variability of Scots pine and Norway spruce populations on the basis of nuclear and mitochondrial DNA markers]. Prace Komisji Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAU, 13, Kraków, Polska Akademia Umiejętności, p. 37–53.
- Nowakowska J. A., Oszako T. 2008. Stan zdrowotny i zróżnicowanie genetyczne buka zwyczajnego w Nadleśnictwie Siewierz na podstawie analiz chloroplastowego DNA [Health condition and genetic differentiation level of beech in the Siewierz Forest District assessed with cpDNA markers]. *Sylwan*, 9: 11–20.
- Oddou-Muratorio S., Houot M. L., Demesure-Musch B., Austerlitz F. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, 12 (12): 3427–3439.
- Peakall, R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pfeiffer A., Olivieri A. M., Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Genome*, 40: 411–419.
- Prus-Głowacki W., Głodzik S. 1995. Genetic structure of *Picea abies* trees tolerant and sensitive to industrial pollution. *Silva Genetica*, 44: 62–65.
- Report on the State of Forests in 2012. CILP, Warszawa 2011: 84 p.
- Reed D. H., Frankham R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17 (1): 230–237.
- Rivers N. M., Butlin R. K., Altringham J. D. 2005. Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14: 4299–4312.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Gene pop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Rutkowski R., Rejt Ł., Tereba A., Gryczyńska-Sięmiątkowska A., Janic B. 2010. Population genetic structure of the European kestrel *Falco tinnunculus* in Central Poland. *European Journal of Wild Research*, 56: 297–305.
- Sabor J. 2003. Wpływ stosowanych zabiegów pielęgnacyjnych i rębni na zmianę struktury genetycznej drzewostanów [The effect of tending treatments and cutting systems on the genetic structure of stands]. *Sylwan*, 2: 39–48.
- Slatkin M., Barton N. H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349–1368.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 7: 1260–1261.
- Sperisen C., Büchler U., Gugerli F., Mátyás G., Gebourek T., Vendramin G. G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology*, 10: 257–263.
- Tigerstedt P. M. A., Rudin D., Niemelä T., Tammisola J. 1982. Competition and neighbouring effect in a naturally regenerating population of Scots pine. *Silva Fennica*, 16: 122–129.
- Weir B. S., Cockerham C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Whitlock M. C. 2002. Selection, load, and inbreeding depression in a large metapopulation. *Genetics*, 160: 1191–1202.

Contributions

J.A.N. designed the study, conceived the experiments, analysed data and wrote the manuscript. T.Z. collected the plant material and wrote the manuscript. A.K. contributed to essential ideas in the discussion. A.M. collected the plant material and performed laboratory analysis.