

# Pilotażowe badania genetyczne tatrzańskich drzewostanów świerkowych



Tatrzański  
Park Narodowy



Sfinansowano ze środków funduszu  
leśnego przekazanych przez  
Państwowe Gospodarstwo Leśne  
Lasy Państwowe w roku 2014



## RAPORT

## **WYTYPOWANIE POTENCJALNYCH MIEJSC WYSTĘPOWANIA DRZEWOSTANÓW ŚWIERKOWYCH RODZIMEGO POCHODZENIA ORAZ SZTUCZNEGO W TATRZAŃSKIM PARKU NARODOWYM**

### **1. Przesłanki historyczne dla wyboru powierzchni**

Lasy Tatr Polskich podlegały kilkusetletniemu gospodarczemu użytkowaniu, które w drugiej połowie XIX wieku miało charakter rabunkowej eksploatacji drzewostanów. Z tego powodu drzewostany, zwłaszcza dolnoreglowe, zmieniły skład gatunkowy i strukturę wiekową. Od lat 80. XIX wieku wielkopowierzchniowe zręby, powierzchnie powiatrolomowe oraz kłęskowe wywołane żerowaniem kornika drukarza, o ile były odnawiane, to poprzez obsadzanie sadzonkami, lub wysiew nasion świerka.

Dotychczas nie udało się wskazać źródeł pochodzenia nasion świerkowych użytych do chowu sadzonek. W Bibliotece Kórnickiej zachowały się archiwalne dokumenty, w tym korespondencja w sprawie zagospodarowanie lasów, ale dotychczas materiał ten nie został poddany głębszej analizie. Podczas pobieżnego przeglądu zawartości archiwum autor niniejszego opracowania odnalazł dyplom przyznający złoty medal Władysławowi Zamoyskiemu – właścicielowi dóbr tatrzańskich w latach 1989-1924 – za sadzonki na Powszechnej Wystawie Krajowej we Lwowie 1894 roku (Biblioteka Kórnicka, sygnatura BK 7567). Nie wiadomo jednak, czy wspomniane sadzonki to rezultaty produkcji szkółkarskiej z rodzimych, tatrzańskich nasion, czy też z nasion sprowadzanych z firmy nasienniczej, na przykład z Wiener Neustadt w Austrii, jak się często uważa. Hipotezę o obcym pochodzeniu nasion podważa Marcei Marchlewski – leśnik związany z tatrzańskimi lasami od 1924 roku, a w okresie 1955 – 1970 dyrektor Tatrzańskiego Parku Narodowego (Marchlewski M. 2009).

Źródło wskazujące na sprowadzanie nasion dla restytucji tatrzańskich lasów odnalazł autor wśród archiwaliów Biblioteki Kórnickiej z lat 1924–1929 (sygnatura BK 8098), w których zachowała się korespondencja i wymiana uwag na temat cen, cenników oraz ofert reklamowych. W korespondencji wymieniane są ilości zamawianych nasion – najczęściej powtarzają się nasiona świerka, jodły, modrzewia, sosny banksa, limby, kosówki, wejmutki, daglezi, cisa. Wśród archiwaliów zachowały się oferty reklamowe firm sprzedających nasiona – rzadko polskich – głównie czeskich, niemieckich, austriackich, między innymi

firmy A. Grünwald Wiener-Neustadt z Austrii. Wobec powyższego, teza o obcym pochodzeniu świerków rosnących w Tatrzańskim Parku Narodowym (TPN) wydaje się prawdopodobna.

Celem opracowania jest wytypowanie na terenie TPN potencjalnych miejsc występowania rodzimych drzewostanów oraz drzewostanów, które mogą być obcego pochodzenia. Rozstrzygnięcie kwestii pochodzenia tatrzańskich świerczyn pozwoli na takie działania w ramach ochrony czynnej, które będą zabezpieczały pulę nasion z rodzimych świerków, dla dalszej przebudowy drzewostanów.

W opracowaniu dokonano analizy materiałów archiwalnych, przede wszystkim map leśnych i operatów urządzania lasów tatrzańskich. W rezultacie określono miejsca, gdzie z końcem XIX wieku występowały uprawy leśne. Dzisiejsze monokultury świerkowe w miejscach dawnych zrębów lub młodników można było uznać za drzewostany pochodzenia sztucznego, a więc powstałe wskutek nasadzeń. Przyjęto, że drzewostany te mogły być odnawiane sadzonkami świerka pochodzącymi z nasion sprowadzonych spoza Tatr. Dokonano także analizy drzewostanów naturalnych, które nigdy nie były objęte zabiegami hodowlano-leśnymi. Spośród nich wybrano lasy z drzewostanami wskazującymi na ich pierwotny charakter.

Wstępny wybór drzewostanów monokultur świerkowych pochodzenia sztucznego oraz drzewostanów o cechach pierwotnych i naturalnym pochodzeniu, został zweryfikowany podczas oględzin w terenie. W rezultacie lustracji terenowej dokonano wyboru pięciu powierzchni, gdzie z bardzo dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że zachowały się rodzime populacje świerka oraz osiem powierzchni, które mogły być obsadzone świerkiem obcego pochodzenia. Na wybranych w terenie powierzchniach wskazano w terenie drzewa, które ponumerowano i z których pobrano próby do badań genetycznych (pędy z igłami) oraz dokonano zbioru szyszek.

## **2. Szczegółowe kryteria wyboru drzewostanów pochodzenia naturalnego i sztucznego**

Dla szczegółowego wyboru powierzchni posłużono się niżej wymienionymi przesłankami.

### 2.1. Przesłanki orograficzne i biologiczne;

- wiek ( drzewostany naturalne - ponad 110 lat),
- orografia terenu,
- położenie nad poziom morza,
- dostępność lub niedostępność dla ewentualnego pozyskania drewna (drzewostany w pobliżu dróg transportowych i położone w łatwo i blisko dostępnym terenie, lasy trudnodostępne dla gospodarki leśnej, wysoko położone, np. urwiskowe),

### 2.2. Przesłanki historyczne;

- dane archiwalne o gospodarce w lasach dóbr Zamoyskiego,
- dane z pierwszych operatów leśnych dotyczące zabiegów odnowień i zalesień, nasiennictwa i szkółkarstwa,
- publikacje dotyczące historii lasów tatrzańskich.

## **3. Wybór powierzchni z drzewostanami świerkowymi pochodzenie sztucznego**

### 1. Capki

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacji lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa 1<sup>80</sup> Wydziału Zakopane 1898 r.* Skala: 1"=160<sup>0</sup>.

Wybrano wydzielenie III.13. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 10,63 ha; wiek 10 lat; czynnik zadrzewienia 0,8.*

## 2. Spadowiec

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacyi lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa I<sup>80</sup> Wydziału Zakopane 1898 r.* Skala: 1"=160°.

Wybrano wydzielenie IV.32. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 15,85 ha; wiek 10 lat; czynnik zadrzewienia 0,9.*

## 3. Spaleniec

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacyi lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa I<sup>80</sup> Wydziału Zakopane 1898 r.* Skala: 1"=160°.

Wybrano wydzielenie IV.28. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 11,97 ha; wiek 5 lat; czynnik zadrzewienia 0,7.*

## 4. Samkowa Czuba

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacyi lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa I<sup>80</sup> Wydziału Zakopane 1898 r.* Skala: 1"=160°.

Wybrano wydzielenie V.13. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 24,05 ha; wiek 3 lata; czynnik zadrzewienia 0,6.*

## 5. Mały Regiel

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacyi lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa Wydziału II<sup>80</sup> „Kościeliska” 1898.* Skala: 1:11520, 1"=160°.

Wybrano wydzielenie II.21. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 46,46 ha; wiek 10 lat; czynnik zadrzewienia 0,5.*

#### 6. Kończysta Turnia

Źródła historyczne:

- *Operat systematyzacyi lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów.
- *Państwo Zakopiańskie. Mapa Wydziału II<sup>80</sup> „Kościeliska” 1898.* Skala: 1:11520, 1"=160°.

Wybrano wydzielenie IV.56. Sygnatura na mapie oznaczona jako: *kultury*,

Opis w operacie: *powierzchnia wydzielenia 7,00 ha; wiek 5 lat; czynnik zadrzewienia 0,6.*

#### 7. Łęgi w Dolinie Białki

Źródła historyczne:

- Mapa z 1883 roku (bez tytułu, bez skali), operatu brak. Na mapie w wydzieleniu VI.22 i VI.20c nazwa: *zrąb*.
- 

#### 8. Goły Wierch

Źródła historyczne:

- Mapa z 1883 roku (bez tytułu, bez skali), operatu brak. Na mapie w wydzieleniu VI.18 i VI.28 żółta obwódka wokół wydzielenia, co prawdopodobnie wskazuje na zrąb.

### **4. Wybór powierzchni z drzewostanami świerkowymi pochodzenie naturalnego**

9. Roztocka Czuba,

10. Żabie,

11. Hala Gąsienicowa,

12. Styrznik,

13. Chotarz w Dolinie Chochołowskiej.

## **5. Prace terenowe**

Prace w terenie przeprowadzono w okresie pomiędzy 22 sierpnia a 15 września 2014 roku.

### **5.1. Wyznaczenie powierzchni z drzewostanami świerkowymi pochodzenia sztucznego**

Wybór powierzchni w terenie dokonywany był po uprzedniej analizie materiałów historycznych i przygotowaniu wyrysu z map archiwalnych. W terenie odszukiwano lokalizację dawnych wydzieleń, porównując je do wydzieleń uwidoczniionych na aktualnej mapie urządzeniowej. Przede wszystkim nawiązywano do charakterystycznych linii podziału powierzchniowego poprowadzonych grzbietami lub dolinami (ciekami wodnymi) oraz do przebiegu dawnych, a zachowanych do dzisiaj dróg gospodarczych.

Ostatecznej decyzji dokonywano po wyszukaniu drzew, których wygląd mógł wskazywać na wiek powyżej 110 lat i po sprawdzeniu świdrem przyrostowym faktycznego wieku, każdego z ośmiu świerków w obrębie konkretnej powierzchni badawczej.

Czynności na każdej z powierzchni ( nr 1 do 8) polegały na:

- Nawierceniu drzewa, pobraniu wywiertu i ustaleniu wieku,
- Numerowaniu drzewa (pierwsza cyfra oznaczająca nr powierzchni, druga cyfra nr drzewa, np. 1.1, 1.2 itd.),
- Pomiarze obwodu na wysokości 1,3 m,
- Pomiarze wysokości drzewa,
- Pobraniu z części wierzchołkowej drzewa pędów z igłami dla badań genetycznych oraz szyszek (o ile występowały) dla badań biometrycznych,
- Pomiarze GPS środka powierzchni badawczej.

### **5.2. Wyznaczenie powierzchni z drzewostanami świerkowymi pochodzenia naturalnego**

Wybór potencjalnych powierzchni w terenie dokonywany był po uprzedniej analizie materiałów historycznych, na podstawie których wykluczono możliwość działalności z zakresu hodowli lasu (odnowień sztucznych) w drzewostanach świerkowych regła górnego.

W ten sposób wybrano rejony z lasami naturalnymi o charakterze pierwotnym. W terenie weryfikowano wybór drzew na powierzchniach badawczych poprzez wstępne ustalenie wieku świerków, przyjmując zasadę wieku powyżej 110 lat. Na poszczególnych powierzchniach (nr 9 do 13) wykonywano te same czynności jak na powierzchniach pochodzenia sztucznego.

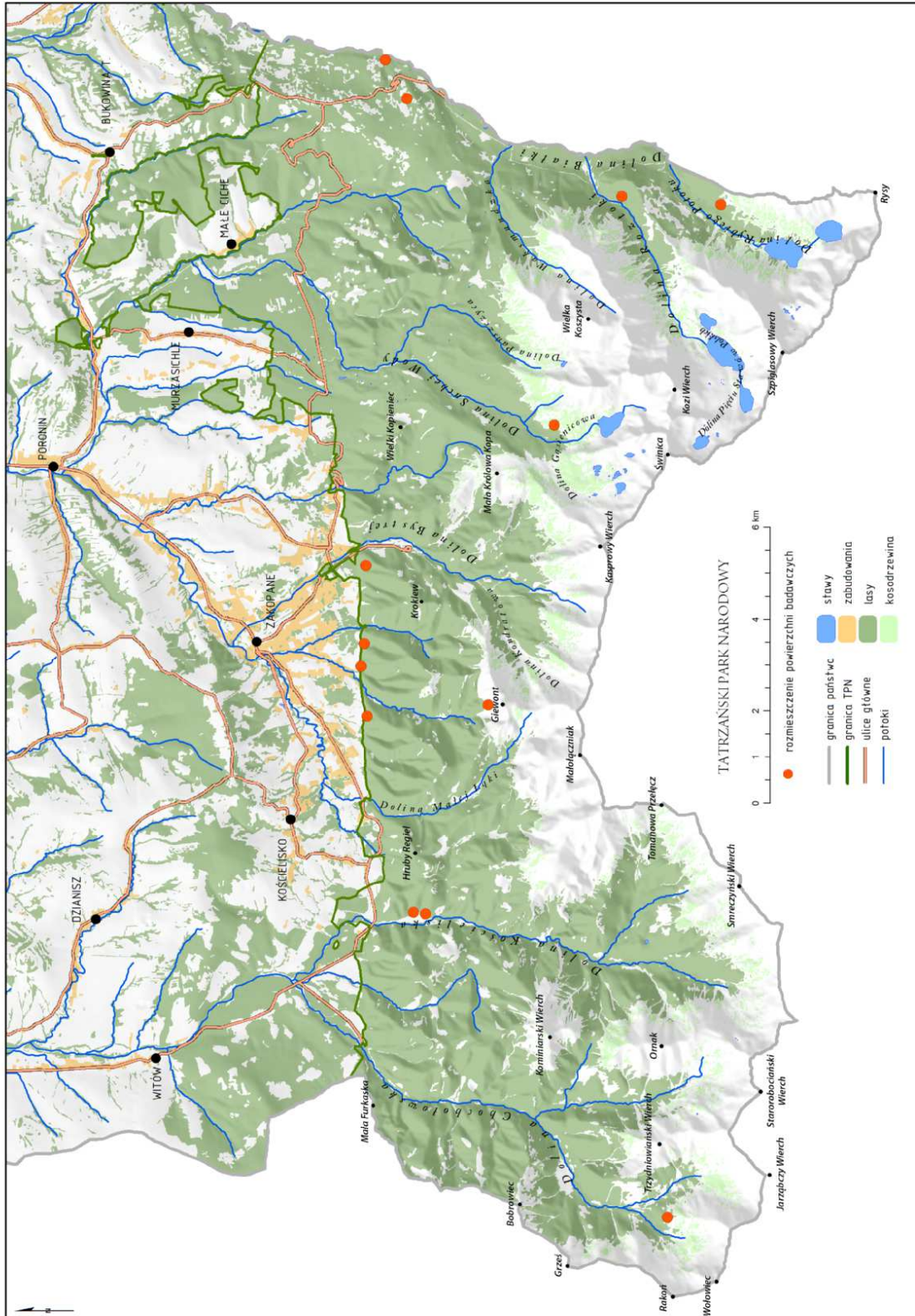
#### **Współrzędne powierzchni badawczych**

<b>NAZWA</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>
Capki	19,9750639871	49,2780770268
Spadowiec	19,9517150223	49,2782109696
Spaleniec	19,9449120183	49,2790889740
Samkowa Czuba	19,9298359919	49,2774369847
Mały Regiel	19,8716000374	49,2678220198
Kończysta Turnia	19,8712729756	49,2654470075
Łęgi w Dol. Białki	20,1256950013	49,2755549960
Goły Wierch	20,1142409630	49,2712760344
Roztocka Czuba	20,0859340187	49,2290699668
Żabie	20,0838600006	49,2096630111
Hala Gąsienicowa	20,0176050690	49,2416542273
Stryżnik	19,9338301444	49,2537839147
Chotarz w Dol. Chochołowskiej	19,7819972289	49,2173599583



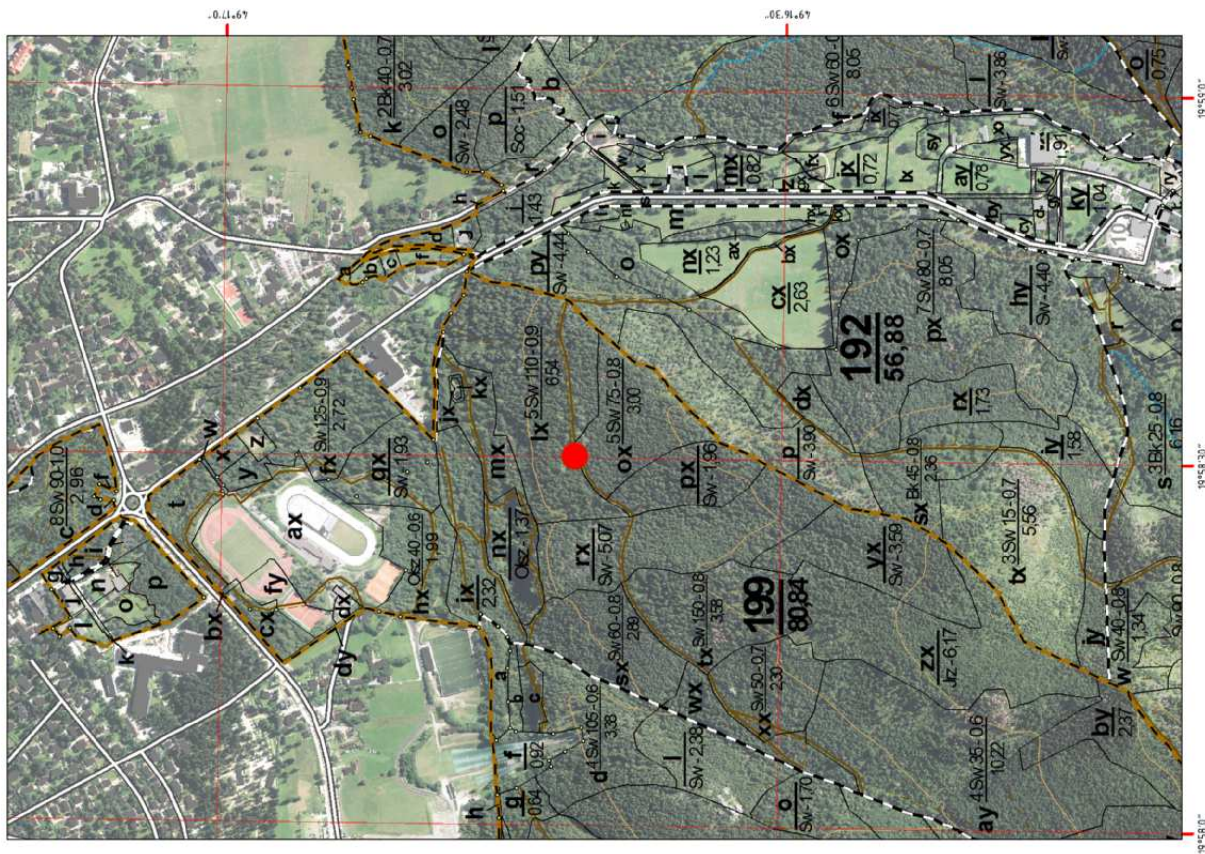
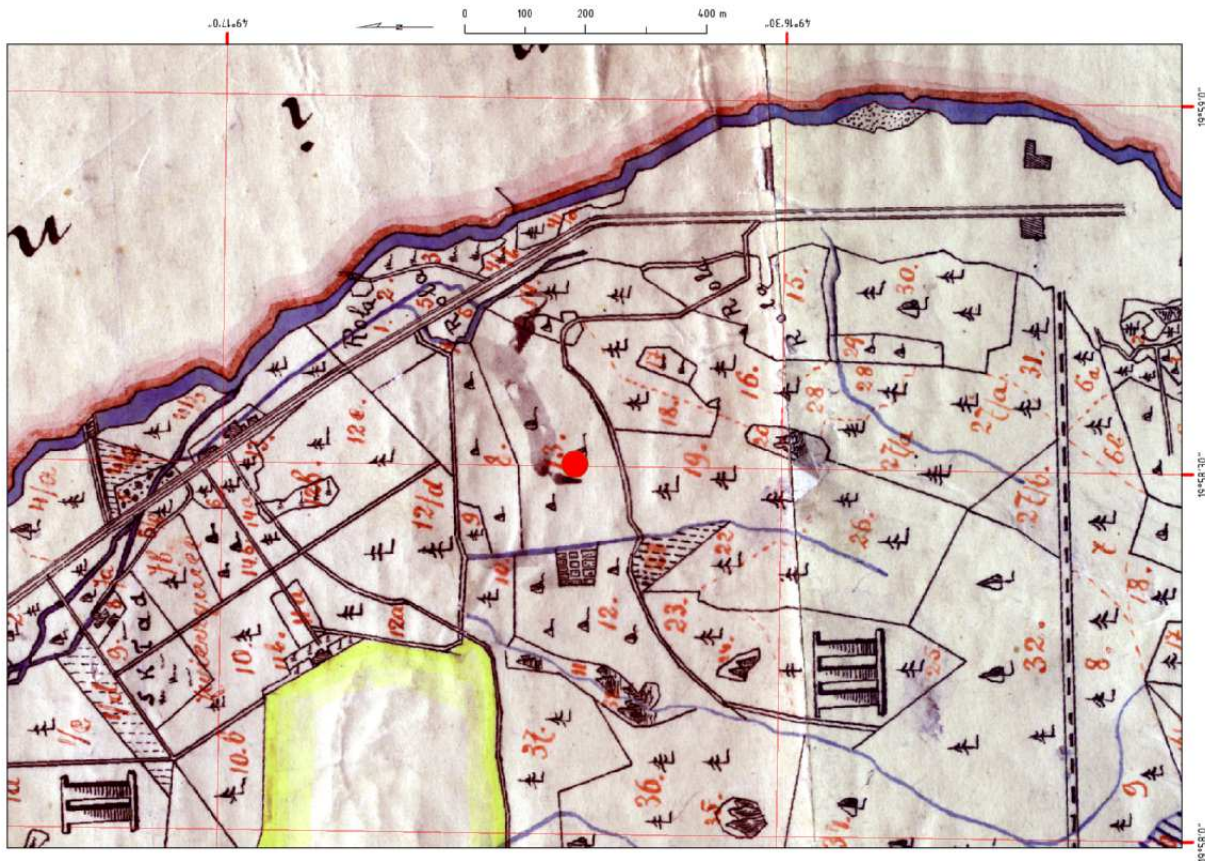
## 6. Mapy lokalizacji powierzchni badawczych

Mapa 1. Rozmieszczenie powierzchni badawczych w Tatrzańskim Parku Narodowym



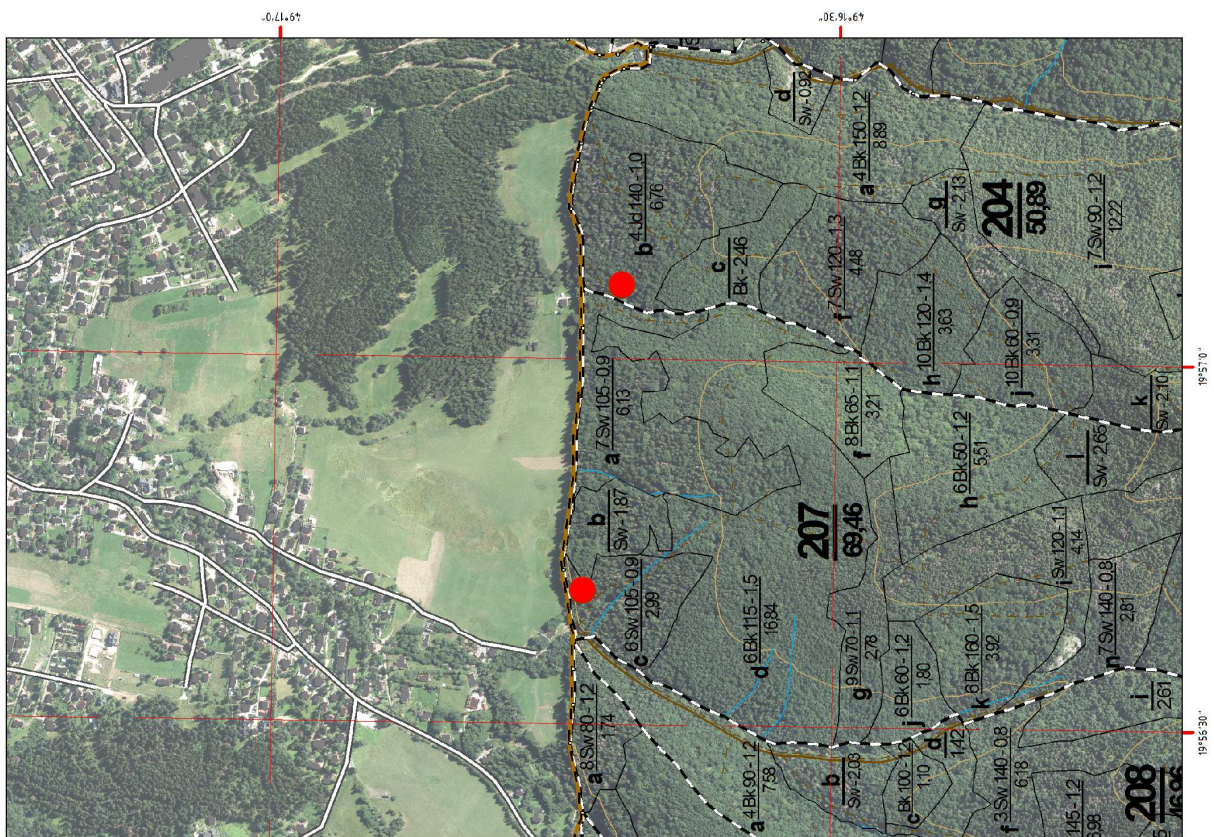


Mapa 2. Lokalizacja powierzchni nr 1 „Capki”



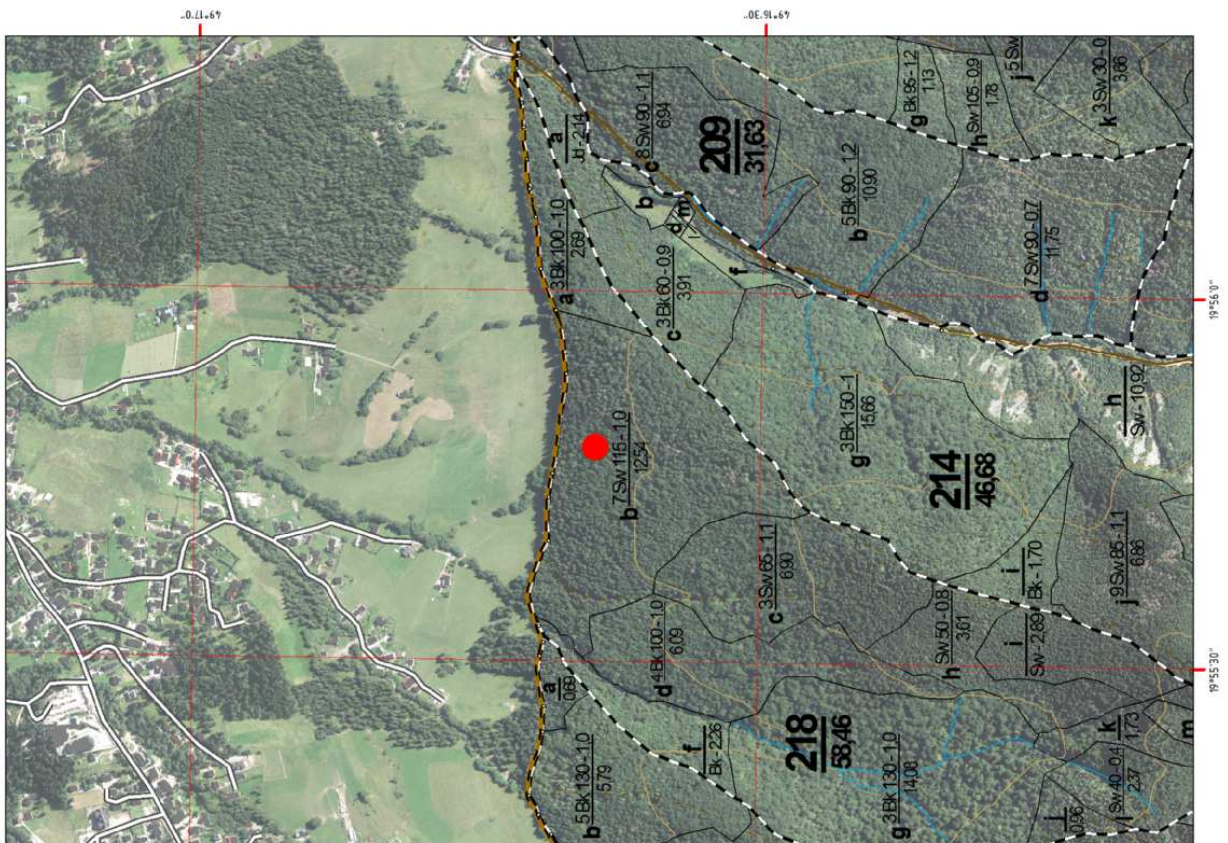


Mapa 3. Lokalizacja powierzchni nr 2 „Spadowiec” i nr 3 „Spalenie”



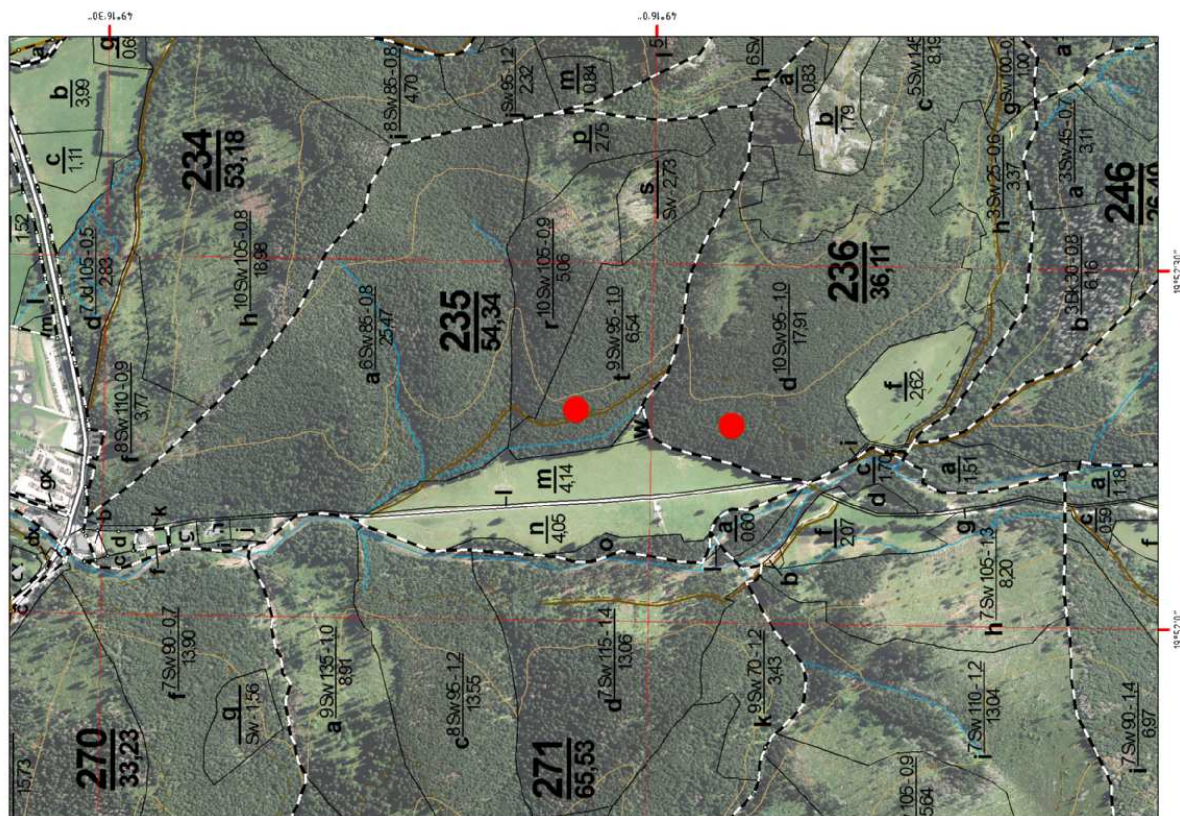
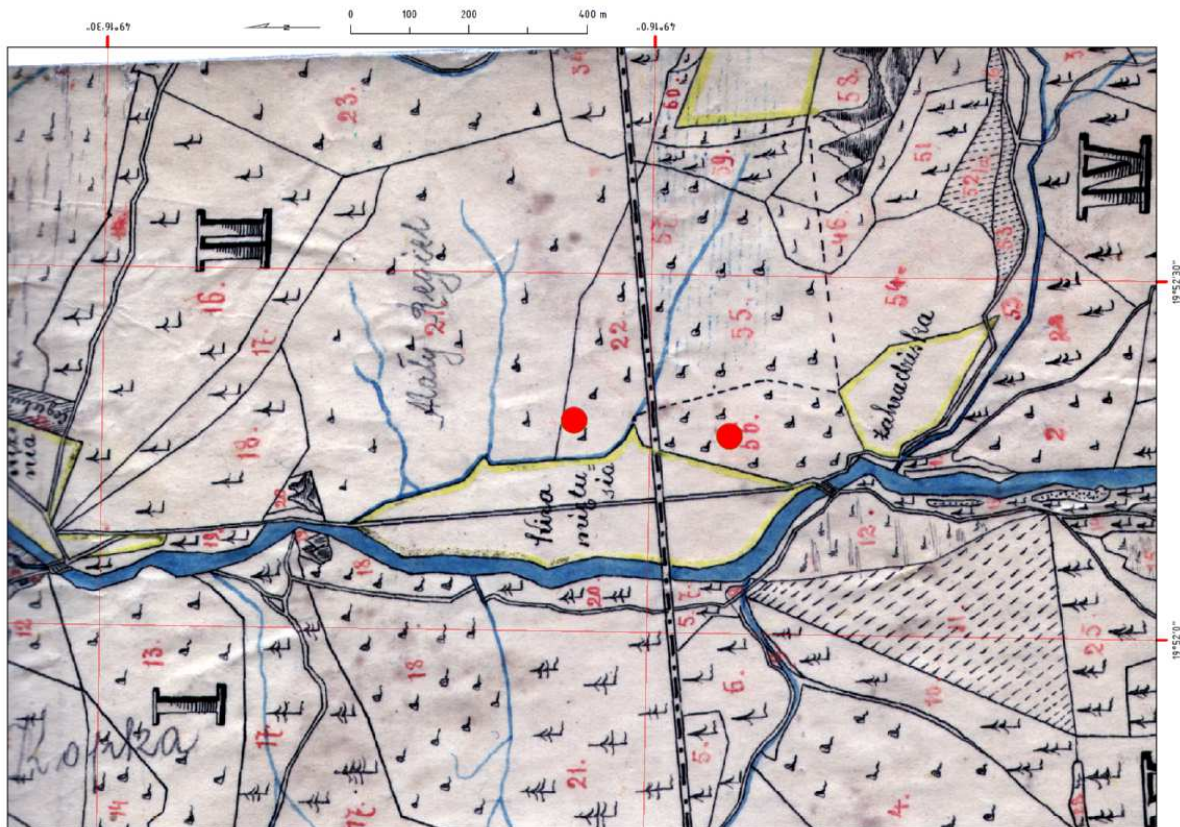


Mapa 4. Lokalizacja powierzchni nr 4 „Samkowa Czuba”





Mapa 5. Lokalizacja powierzchni nr 5 „Mały Regiel” i nr 6 „Kończysta Turnia”



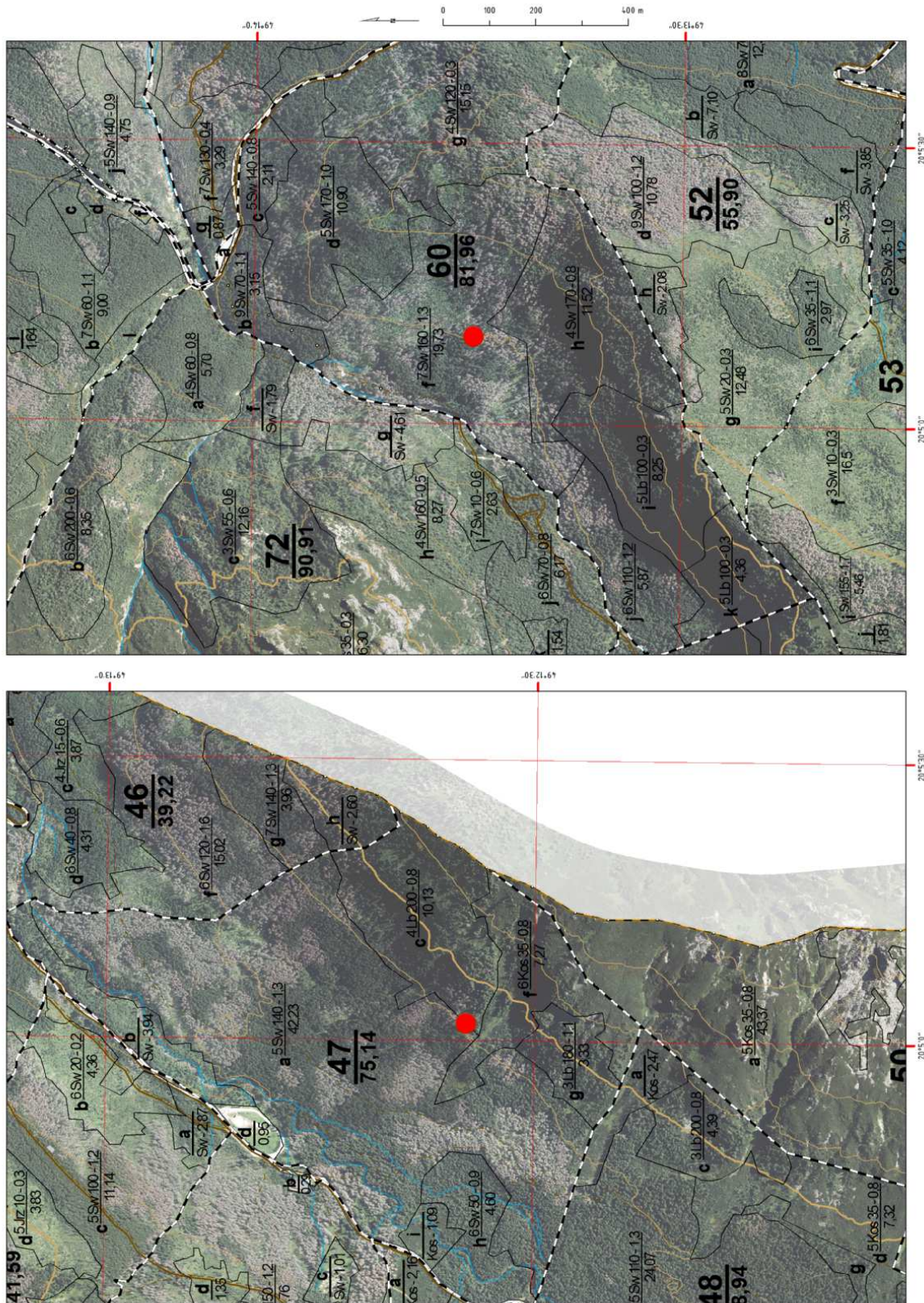


Mapa 6. Lokalizacja powierzchni nr 7 „Łęgi w Dolinie Białki” i nr 8 „Goły Wierch”



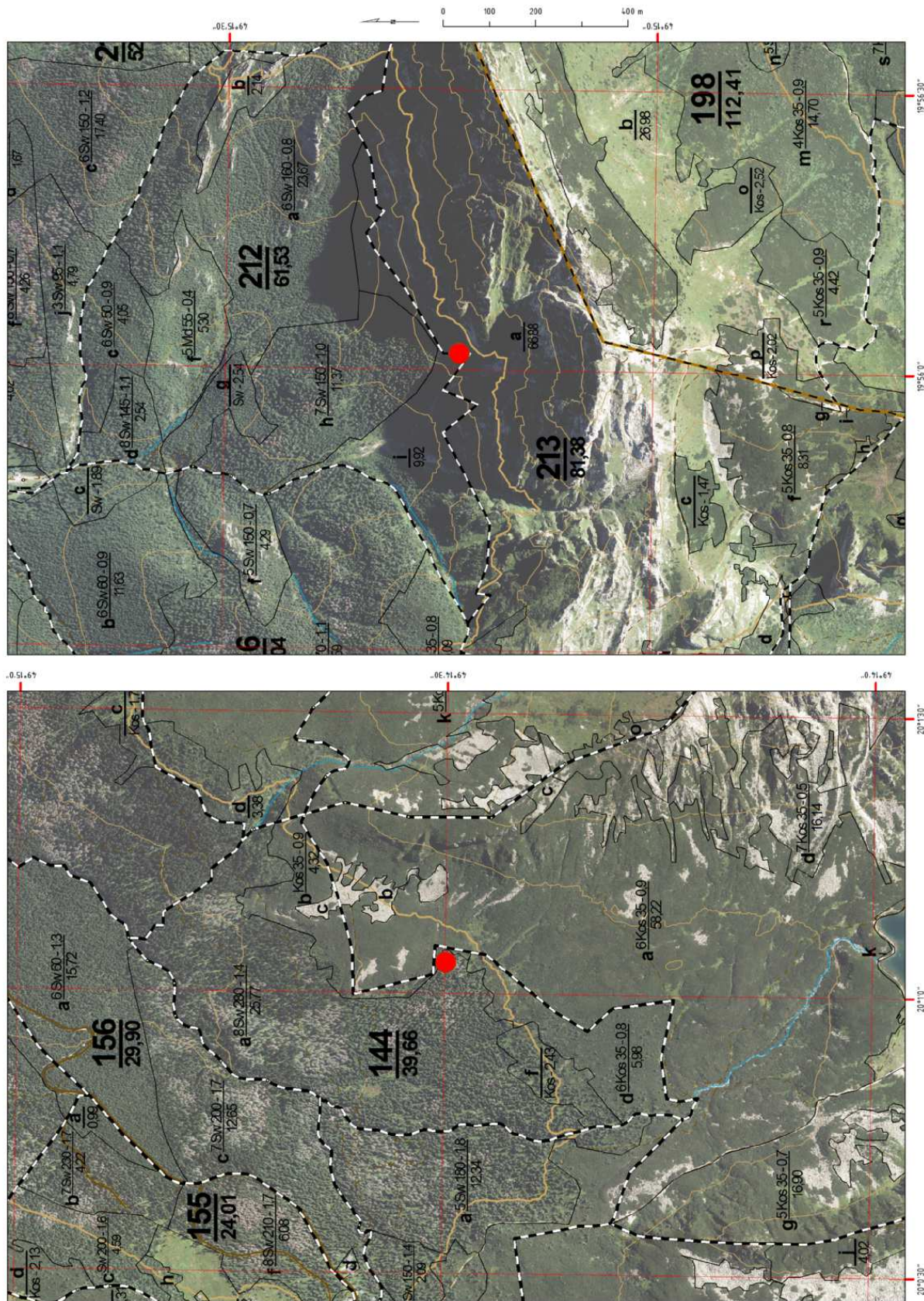


Mapa 7. Lokalizacja powierzchni nr 9 „Roztocka Czuba” i nr 10 „Żabie”



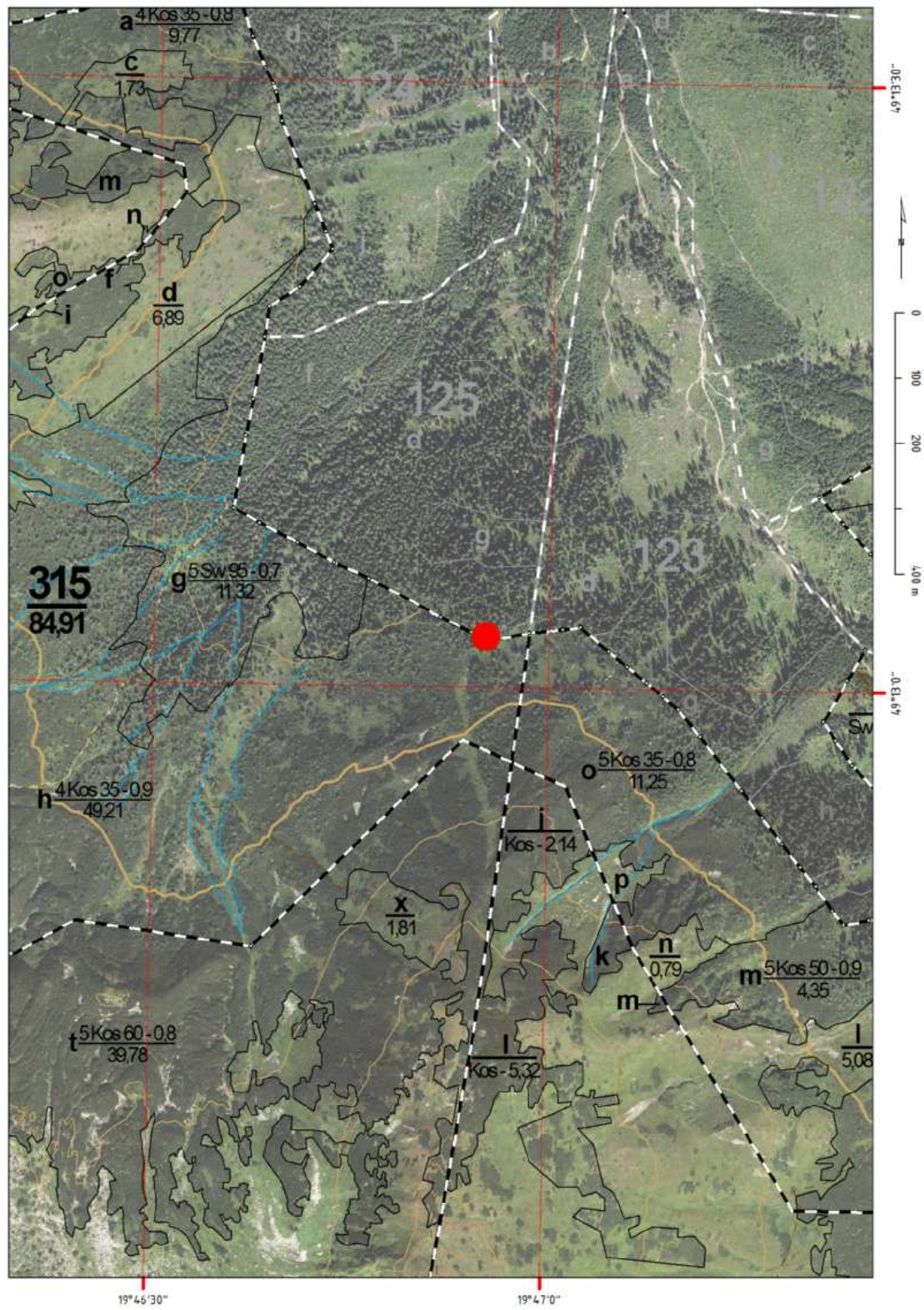


Mapa 8. Lokalizacja powierzchni nr 11 „Hala Gąsienicowa” i nr 12 „Styrznik”





Mapa 9. Lokalizacja powierzchni nr 13 „Chotarz w Dolinie Chochołowskiej”



## **Bibliografia, materiały archiwalne (operaty i mapy)**

Biblioteka Kórnicka, sygnatura BK 7567

Biblioteka Kórnicka, sygnatura BK 8098

Fabijanowski J. 1962. *Lasy tatrzańskie*. W: (red. W. Szafer) *Tatrzański Park Narodowy*. Zakład Ochrony Przyrody PAN, Kraków.

Fabijanowski J., Oleksy B. 1959. *Metody przebudowy niektórych drzewostanów dolnoreglowych w Tatrzańskim Parku Narodowym*. Ochr. Przyr. 26: 95-171.

Dziewolski J. i Skawiński P. 1988 a. *Zmiany w składzie gatunkowym i strukturze wiekowej wybranych drzewostanów Tatrzańskiego Parku Narodowego*. Ochr. Przyr. 46: 75-90.

Dziewolski J., Skawiński P. 1992. *Ocena strukturalnych przemian drzewostanów Tatrzańskiego Parku Narodowego w Dolinie Kościeliskiej i Małej Łąki w okresie od 1924 do 1975 roku*. Parki nar. i Rez. Przyr. 11,2,3: 29-37.

Hołub-Pacewiczowa Z. 1931. *Osadnictwo pasterskie i wędrowniki w Tatrach i na Podhalu*. W: Prace Komisji Geograficznej PAU, nr 1.

Majerczyk K. 1982. *Historia i dzień dzisiejszy lasów Wspólnoty Leśnej Ośmiu Wsi w Witowie k. Zakopanego*. W: (red. J. Ciuruś) *Problemy rolniczo-leśne województwa nowosądeckiego*. Podhalańskie Tow. Przyj. Nauk, Nowy Targ - Zakopane.

Marchlewski M. 2009. *Pracowałem w tatrzańskich lasach*. Tatrzański Park Narodowy, Zakopane.

Obidowicz A. 1995. *Historia szaty roślinnej; szata roślinna Tatr Polskich*. W: (red. Z. Mirek, J. Wójcicki) *Szata roślinna parków narodowych i rezerwatów Polski południowej*. Polish Botanical Studies; Guidebook series, 12.

Skawiński P. 1993. *Gospodarka leśna i pasterska w Dolinie Rybiego Potoku w Tatrach w okresie sporu granicznego o Morskie Oko*. W: (red. J.M. Roszkowski) *Spór o Morskie Oko*. Wydawnictwo Muzeum Tatrzańskie, Zakopane.

Skawiński P., Zięba T., Babicz J. 1995. *Przyroda i gospodarka*. W: (red. M.J. Adamczyk) *Tatrzańska Wspólnota Leśna w Witowie*. Podhalańskie Tow. Przyj. Nauk, Nowy Targ.

Zwoliński S. 1984. *Wpływ działalności hut zakopiańskich na stan lasów tatrzańskich*. Parki nar. i Rez. Przyr. 5,1: 43-50.

### Wykorzystane operaty

*Operat systematyzacji lasów państwa zakopiańskiego na rok 1896*, autorstwa Jerzego Jarosza, zarządcy lasów

Wykorzystane mapy

*Państwo Zakopiańskie. Mapa I<sup>80</sup> Wydziału Zakopane 1898 r. Skala: 1"=160°.*

*Państwo Zakopiańskie. Mapa Wydziału II go „Kościeliska” 1898.  
Skala: 1:11520, 1"=160°.*

*Państwo Zakopiańskie. Mapa Wydziału Bukowina – Brzegi 1898.*

Zakopane, wrzesień 2014

# ANALIZA MOLEKULARNA POPULACJI ŚWIERKA TATRZAŃSKIEGO *PICEA ABIES* O RÓŻNEJ PROWENIENCJI

*Zbigniew Mirek, Michał Combik, Piotr Kiełtyk, Jolanta Urbanik, Anna Trela*

## **1. Wprowadzenie**

Tatrzański Park Narodowy, mimo że jest obszarem uchodzącym za teren o dobrze zachowanej szacie roślinnej, był jednak poddany od co najmniej czterech wieków poważnym oddziaływaniom antropogenicznym (Mirek 1996). Wśród nich szczególnie mocno zaznaczyły się przekształcenia dolnoreglowych buczyn i jedlin związane z historycznym już górnictwem i hutnictwem oraz szeroko rozumianą gospodarką leśną, głównie w okresie XVII i XVIII wieku. Wyrąbane wówczas drzewostany bukowo-jodłowe zostały zastąpione monokulturami świerkowymi, często ze świerkiem obcej proveniencji. Przez długi czas uznawano, w oparciu o nie do końca jednoznaczne przesłanki, że większość a przynajmniej znacząca część populacji dolnoreglowych nasadzeń świerka jest pochodzenia wschodnio-alpejskiego; inne mogą pochodzić z mniej lub bardziej odległych zachodnich obszarów spoza Tatr. Przyjęta współcześnie strategia ochrony bioróżnorodności nakazuje uwzględnienie w jej ramach także, wciąż słabo rozpoznanego, poziomu genetycznego (zmienności wewnątrzgatunkowej). Respektowanie w praktyce ochrony przyrody tego poziomu wymaga jego odpowiedniego rozpoznania, szczególnie w odniesieniu do przynajmniej wybranych grup gatunków, do których niewątpliwie należą przedstawiciele tatrzańskiej dendroflory. Jak konieczne jest uwzględnienie tego poziomu w odniesieniu do interesującego nas tutaj świerka (dotyczy to także innych gatunków drzew oraz krzewów i roślin zielnych), pokazuje glacialna i postglacialna historia tego gatunku (Ralska-Jasiewiczowa 2004) i pozostające w ścisłej z nią relacji, jego zróżnicowanie genetyczne na zasięgu europejskim (Fluch et al. 2011; Vendramin G. G. 2000). W tym kontekście rzetelna wiedza na temat stanu kontaminacji świerczyn tatrzańskich populacjami obcej proveniencji ma kluczowe znaczenie dla praktyki jego aktywnej ochrony obejmującej m.in. tzw. przebudowę drzewostanów (głównie dolnoreglowych) realizowaną w ramach Planu Ochrony Tatrzańskiego Parku Narodowego.

Niniejsze badania mają charakter badań pilotażowych (wstępnych). Ich jasno określonym celem jest ustalenie, w oparciu o badania morfometryczne szyszek oraz badania na poziomie molekularnym, czy i na ile da się potwierdzić istnienie populacji świerka obcej proveniencji na obszarze TPN oraz które z użytych metod mogą okazać się najbardziej użyteczne w przyszłych badaniach obejmujących całość obszaru Tatrzańskiego Parku Narodowego.

## 2. Materiały

Do badań pilotażowych wybrano trzynaście powierzchni badawczych rozrzuconych na obszarze TPN. Osiem z nich (populacje 1-8) to populacje dolnoreglowe, co do których istnieją uzasadnione podejrzenia, że mogą być i najprawdopodobniej są populacjami obcej proveniencji. Pozostałe pięć (populacje 9-13) pochodzi z drzewostanów górnoreglowych, co do których można, w oparciu o istniejące przesłanki przypuszczać, że są populacjami naturalnymi (naturalnego pochodzenia), zarówno co do proveniencji jak i struktury. Wykaz badanych stanowisk zawiera tabela 1. Na każdym stanowisku wytypowano osiem reprezentatywnych drzew, z których zebrano po pięć szyszek a dla badań molekularnych po 0,5 kg świeżych igieł. Dla każdej szyszki pomierzono pięć łusek nasiennych pobranych ze środkowej części szyszki. Ponieważ, nie na wszystkich stanowiskach możliwe było zebranie szyszek z ośmiu drzew, liczba szyszek objętych badaniami jest mniejsza niż wynikałoby to z przyjętego schematu pobierania prób. Łącznie pomierzono 220 szyszek i 1100 łusek nasiennych z 48 drzew (Tab. 1).



Ryc. 1. Stanowiska badanych drzewostanów świerkowych w Tatrzańskim Parku Narodowym. Kolorem szarym oznaczono stanowiska, z których nie pozyskano szyszek do analiz morfometrycznych.

Tabela 1. Wykaz i charakterystyka stanowisk badanych drzewostanów świerkowych w Tatrzańskim Parku Narodowym; N drzew – liczba drzew, z których zebrano szyszki, N szyszek – liczba pomierzonych szyszek, N łusek – liczba pomierzonych łusek nasiennych.

Stanowiska badane			Prace morfometryczne			Analizy molekularne	
Nr stanowiska	Lokalizacja	Pochodzenie drzewostanu	Liczba (N) drzew	Liczba (N) szyszek	Liczba (N) łusek	Analiza SSR	Analiza NGS
1	Capki	sztuczny	7	32	160	X	X
2	Spadowiec	sztuczny	–	–	–	X	–
3	Spaleniec	sztuczny	2	9	45	X	–
4	Samkowa Czuba	sztuczny	–	–	–	X	–
5	Mały Regiel	sztuczny	2	10	50	X	–
6	Kończysta Turnia	sztuczny	–	–	–	X	X
7	Łęgi w Dolinie Białki	sztuczny	6	23	115	X	–
8	Goły Wierch	sztuczny	3	13	60	X	X
9	Roztocka Czuba	naturalny	3	15	75	X	–
10	Żabie	naturalny	5	23	115	X	–
11	Hala Gąsienicowa	naturalny	8	38	195	X	X
12	Styrznik	naturalny	6	27	135	X	–
13	Chotarz w Dolinie Chochołowskiej	naturalny	6	30	150	X	X

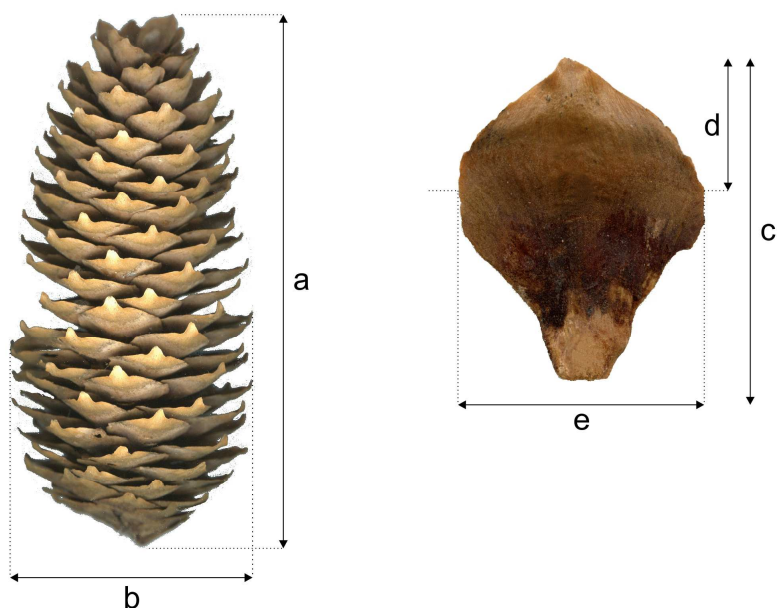
Ze względu na dwie grupy odrębnych cech badanych w niniejszym opracowaniu (badania morfometryczne i badania molekularne), metodykę dla każdej z nich omówiono odrębnie.

### **3. Metodyka**

#### **3.1. Metody analiz biometrycznych**

Dla każdej szyszki zmierzono jej długość i szerokość, natomiast dla każdej łuski nasiennej zmierzono długość, szerokość oraz odległość od wierzchołka łuski do najszerszego miejsca łuski (Ryc. 2.). Następnie na podstawie tych cech obliczono pięć cech kształtu będących ilorazami cech z pomiaru (Tab. 2).





Ryc. 2. Cechy użyte w badaniach morfometrycznych: a- długość szyszki, b – szerokość szyszki, c – długość łuski, d – długość górnej części łuski, e – szerokość łuski.

Tab. 2. Wykaz analizowanych cech morfologicznych.

Oznaczenie cechy	Objaśnienie
ConeL	Długość szyszki (mm)
ConeW	Szerokość szyszki (mm)
ScaleL	Długość łuski (mm)
ScaleW	Szerokość łuski (mm)
ScaleU	Długość górna łuski (mm)
ConeL.W	Długość szyszki / Szerokość szyszki
ScaleL.W	Długość łuski / Szerokość łuski
ScaleU.W	Długość górna łuski / Szerokość łuski
ScaleU.L	Długość górna łuski / Długość łuski

W celu stwierdzenia, czy na podstawie cech morfologicznych szyszek możliwe jest odróżnienie drzewostanów pochodzenia sztucznego od drzewostanów pochodzenia naturalnego, zastosowano metody numeryczne grupowania i klasyfikacji. Ponadto, zmienność cech między dwoma proveniencjami drzewostanów (naturalnych i sztucznych) oraz między poszczególnymi stanowiskami przedstawiono na wykresach ramkowych. Zróżnicowanie

morfolologiczne szyszek dla różnych proveniencji oraz dla poszczególnych stanowisk przedstawiono również w przestrzeni dwóch oraz trzech zmiennych na wykresach rozrzutu w formie diagramów dwu- i trójwymiarowych.

Wielowymiarowe analizy numeryczne grupowania metodą UPGMA i Warda oraz porządkowania metodą PCA przeprowadzono dla wszystkich 9 cech, które wcześniej poddano standaryzacji tak, aby średnia dla cechy wynosiła zero, a odchylenie standardowe było równe jedności. Analizę składowych głównych przeprowadzono w trzech wariantach. W wariancie pierwszym obiektem porządkowania było 10 stanowisk reprezentowanych przez wartości średnie cech morfolologicznych, w wariancie drugim porządkowanie przeprowadzono dla 48 drzew, natomiast w wariancie trzecim obiektem analizy były szyszki (220 sztuk) z zaznaczeniem drzewostanu, z którego zostały zebrane (naturalny lub sztuczny). Przed przystąpieniem do analizy składowych głównych PCA utworzono macierz korelacji cech zawierającą wartości współczynników korelacji parametrycznej (Pearsona) i nieparametrycznej (Spearmana). Macierz ta posłużyła do sprawdzenia, czy pomiędzy badanymi cechami nie zachodzi zbyt wysoka korelacja (powyżej 0,95), która mogłaby zniekształcić uprządkowanie obiektów w analizie PCA.

### 3. 2. Metodyka analiz molekularnych

W pracy zastosowano dwa typy analizy chloroplastowego DNA.

#### 3. 2. 1. Metoda analizy SSR

Wszystkie powierzone próby igieł (104 próbki) pochodzące z 13 populacji (8 prób z populacji) zostały poddane analizie SSR przy wykorzystaniu 7 losowo wybranych par primerów (tabela 3).

Jeden primer z pary (forward) był wyznakowany barwnikiem fluorescencyjnym w celu detekcji produktów reakcji PCR na sekwenatorze podczas elektroforezy kapilarnej. Reakcję PCR przeprowadzono przy wykorzystaniu zestawu „Phire Plant Direct PCR Kit” firmy Thermo Scientific zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Próby do analizy przygotowano z wykorzystaniem buforu „dilution buffer” dołączonego do zestawu.

Tabela 3. Lista primerów wykorzystanych do analizy.

Nazwa primer'a	Sekwencja 5'-3'	Zakres długości produktu PCR w parach zasad (pz)
Pa_28	F: GGCCGAAAGTGCTACTGCTA R: TGCTCCAGAAGAACAACACTACA	148-162pz
Pa_29	F: ACAACAGCAACAGCAGCAAC R: CGGGCTGAAGAATTTGTTGT	97-108pz
Pa_33	F: GGTCGAGGAGGAGGAGGTAG R: CACCGCTAGTGCAGTCTCTG	91-104pz



Pa_36	F: CGGCAGGAACATCACTGTTA R: ACCGTAACCTCCCCTACCAC	178-200pz
Pa_44	F: AAGGCAGCCAAAGTGAAGAA R: CTTGGCATTCCCTAGTGAGC	274-293pz
Pa_59	F: TAGACCACGTTGTGCTGAAA R: GCGACCTTTCGCAATTA AAC	90-112pz
Pa_60	F: CGCCGTATCCATTCCCAAGC R: CCCAGCCCAGTTCAGTTTGC	241-264pz

Uzyskane produkty reakcji PCR poddawano elektroforezie kapilarnej na sekwenatorze Genome Lab GeXP firmy Beckman&Coulter. Próby zaetykietowano niezmienionymi oryginalnymi numerami przekazanych przez TPN.

Metodą tą przebadano wszystkie populacje pochodzące zarówno z drzewostanów naturalnych jak i wtórnych (stanowiska 1 – 13 w tab. 1.).

### 3. 2. 2. Metodyka analizy NGS

Do sekwencjonowania wytypowano po jednej próbie z populacji nr: 1, 6, 8, 11 oraz 13 (Tab. 1.). Wykonanie sekwencjonowania genomu chloroplastowego wymaga izolacji i oczyszczenia tych organelli z wnętrza komórki, co zostało wykonane zestawem „Chloroplast Isolation Kit” firmy Invent Biotechnologies. W stosunku do oryginalnej procedury izolacji chloroplastów zalecanej przez producenta zestawu, wprowadzono kilka autorskich modyfikacji mających na celu podniesienie stężenia DNA próby ze względu na wymagania techniki NGS. Do izolacji jednej próby wykorzystano około 50g świeżych igieł świerkowych. Z uzyskanych w ten sposób chloroplastów wyizolowano DNA przy pomocy zestawu DNeasy plant mini kit firmy Qiagen zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta zestawu. Tak przygotowane izolaty DNA zostały wysłane do firmy Genomed S.A. gdzie przeprowadzono sekwencjonowanie na urządzeniu MiSeq firmy Illumina. Wstępna analiza surowych danych oraz złożenie pełnej sekwencji genomu chloroplastowego przeprowadziła firma Genomed S.A.

Sekwencje uzyskane z NGS zostały zestawione ze sobą i porównane w Instytucie Botaniki PAN przy zastosowaniu programu BioEdit w wersji 7.1.3.0

## **4. Wyniki badań**

Poniżej przeanalizowano i omówiono kolejno wyniki prac uzyskane każdą z omówionych wyżej metod.

### 4.1. Wyniki analiz morfometrycznych

Rezultaty analiz morfometrycznych omówiono kolejno, osobno dla każdej z nich.

#### 4. 1. 1. Analiza grupowania

Obraz grupowania stanowisk metodami UPGMA i Warda nie wskazuje, aby istniała możliwość wydzielenia jednorodnych grup stanowisk pochodzących z drzewostanów naturalnych i wtórnych. Obie zastosowane metody dały niemal identyczny wynik grupowania się obiektów, w którym stanowiska z drzewostanów naturalnych i sztucznych grupowane są razem na wyższym poziomie. Na niższym poziomie klasyfikacji, zaznacza się podobieństwo stanowisk 11 i 13 (Hala Gąsienicowa i Hotarz w Dol. Chochołowskiej), stanowisk 3 i 8 (Spaleniec i Goły Wierch), stanowisk 1 i 7 (Capki i Łęgi w Dol. Białki). Ponadto, obie zastosowane metody pogrupowały w bliskim sąsiedztwie stanowiska 5, 10, 12 i 9 (Mały Regiel, Żabie, Styrznik i Roztocka Czuba). Stanowiska 9, 10 i 12 zlokalizowane są w naturalnych drzewostanach górnoreglowych, jednak stanowisko 5 znajduje się w dolnym reglu niedaleko wylotu Doliny Kościeliskiej.

#### 4. 1. 2. Korelacje między cechami

Analiza korelacji między cechami (Tab. 4) wskazuje na istnienie silnego dodatniego związku między długością szyszki i długością łuski nasiennej (ConeL-ScaleL,  $r_p=0,8067$ ,  $r_s=0,8209$ ), oraz między długością szyszki i szerokością łuski (ConeL-ScaleW,  $r_p=0,7458$ ,  $r_s=0,7262$ ). Ponadto, stwierdzono silny związek między długością łuski i szerokością łuski (ScaleL-ScaleW,  $r_p=0,8592$ ,  $r_s=0,8411$ ) oraz cechami kształtu długości górnej szyszki do całkowitej długości łuski i długości górnej szyszki do szerokości łuski (ScaleU.L-ScaleU.W,  $r_p=0,8127$ ,  $r_s=0,8039$ ). Współczynniki korelacji nie przekroczyły wartości 0,95 dla żadnej pary cech, dlatego wszystkie cechy zostały włączone do analizy składowych głównych. Interesujący jest fakt, że między długością szyszki a jej szerokością zależność okazała się dość słaba ( $r_p=0,4926$ ,  $r_s=0,4480$ ).

Tabela 4. Macierz korelacji cech morfologicznych szyszek. Nad przekątną macierzy współczynniki korelacji parametrycznej Pearsona ( $r_p$ ), pod przekątną współczynniki korelacji nieparametrycznej Spearmana ( $r_s$ ).

	ConeL	ConeW	ConeL.W	ScaleL	ScaleW	ScaleU	ScaleL.W	ScaleU.W	ScaleU.L
ConeL	1	0.4926	0.3888	<b>0.8067</b>	<b>0.7458</b>	0.4424	0.1155	-0.3182	-0.4492
ConeW	0.4480	1	-0.5953	0.4121	0.5222	0.2511	-0.2184	-0.2951	-0.1974
ConeL.W	0.4461	-0.5515	1	0.3209	0.1463	0.1815	0.3410	0.0446	-0.1777
ScaleL	<b>0.8209</b>	0.3659	0.3961	1	<b>0.8592</b>	0.6937	0.2620	-0.1624	-0.3775
ScaleW	<b>0.7262</b>	0.4799	0.1889	<b>0.8411</b>	1	0.5683	-0.2636	-0.4502	-0.3592
ScaleU	0.4726	0.1888	0.2677	0.6530	0.5174	1	0.2306	0.4688	0.3972
ScaleL.W	0.1780	-0.1740	0.3515	0.2879	-0.2398	0.2564	1	0.5477	-0.0371
ScaleU.W	-0.3117	-0.2647	0.0007	-0.1980	-0.4751	0.4336	0.5263	1	<b>0.8127</b>
ScaleU.L	-0.4694	-0.1977	-0.2201	-0.4181	-0.3864	0.3214	-0.0276	<b>0.8039</b>	1

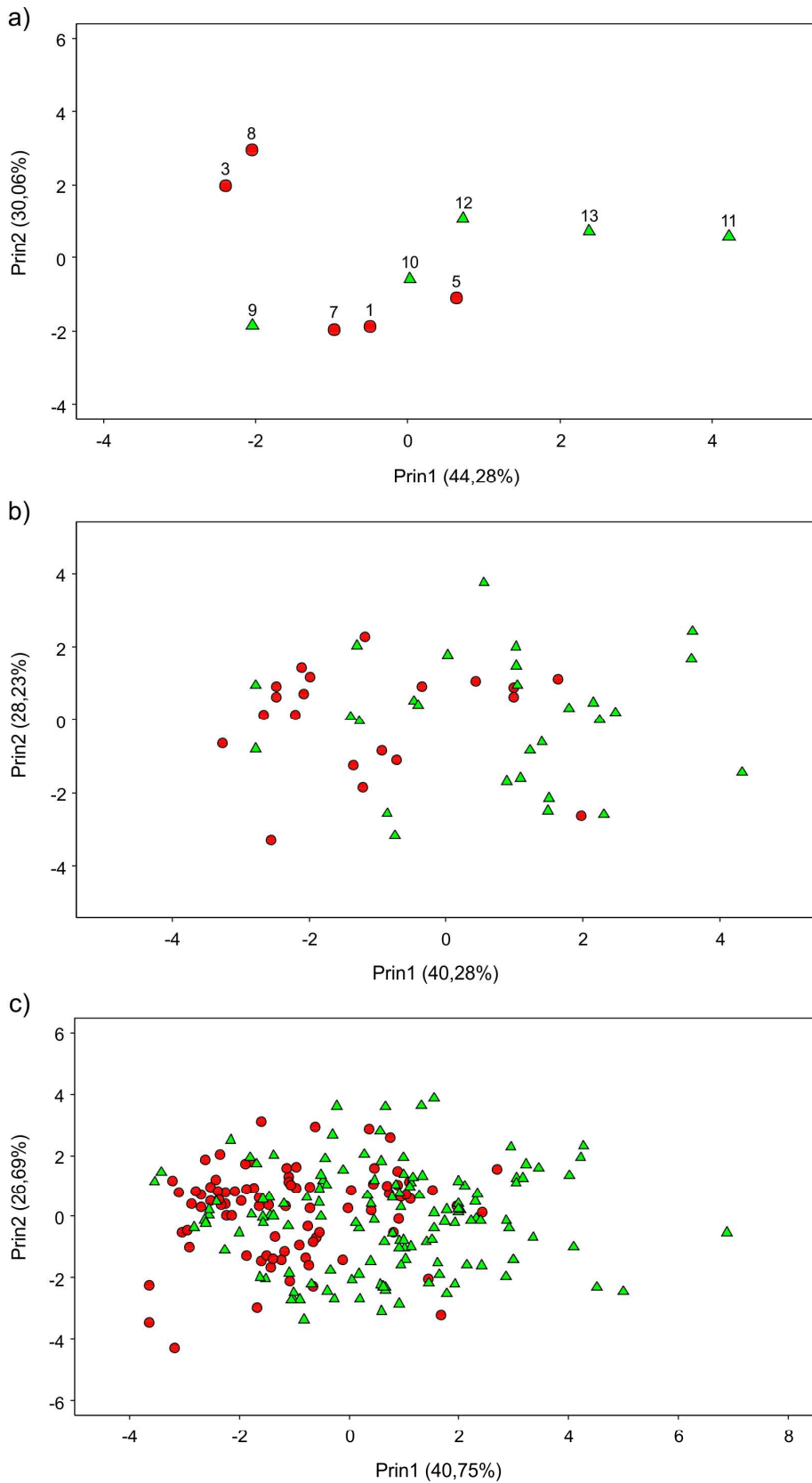
#### 4. 1. 3. Analiza składowych głównych PCA

Wszystkie trzy warianty analizy składowych głównych przeprowadzonych dla różnych poziomów (szyszek, drzew oraz stanowisk) dały bardzo zbliżony obraz zachodzenia się obiektów z drzewostanów naturalnych i sztucznych (Ryc. 3). W uporządkowaniu obiektów wzdłuż pierwszej składowej głównej, można zauważyć niewielkie przesunięcie środka ciężkości dla drzewostanów sztucznego pochodzenia w lewą stronę diagramu w stosunku do drzewostanów pochodzenia naturalnego (Ryc. 3 a, b, c).

Przesunięcie to jest wyraźniejsze na poziomie stanowisk i pojedynczych szyszek niż na poziomie drzew. Cechami, które są w większym stopniu związane z uporządkowaniem obiektów wzdłuż składowej pierwszej (Prin1) są długość szyszki (ConeL), długość łuski nasiennej (ScaleL) oraz szerokość łuski nasiennej (ScaleW) (Tab. 5). Ponieważ wartości współczynników korelacji pierwszej składowej głównej Prin1 z powyższymi cechami są ujemne to obiekty uporządkowane po prawej stronie diagramu PCA mają mniejsze wartości tych cech, w porównaniu z obiektami uporządkowanymi z lewej strony. Wynika stąd, że drzewostany pochodzenia sztucznego mają przeważnie dłuższe szyszki oraz większe wymiary łusek nasiennych w porównaniu do drzewostanów pochodzenia naturalnego.

Tabela 5. Wkład poszczególnych cech w uporządkowanie obiektów wzdłuż pierwszej i drugiej składowej głównej PCA; PCA I – analiza dla 10 stanowisk reprezentowanych przez wartości średnie cech morfologicznych szyszek i łusek, PCA II - analiza dla 48 drzew, PCA III - analiza dla 220 szyszek.

Cecha	PCA I		PCA II		PCA III	
	Prin1	Prin2	Prin1	Prin2	Prin	Prin2
ConeL	<b>-0.449</b>	-0.13	<b>-0.464</b>	-0.123	<b>-0.472</b>	-0.082
ConeW	-0.303	0.225	-0.321	0.210	-0.306	0.181
ConeL.W	-0.16	-0.332	<b>-0.051</b>	-0.352	-0.113	-0.287
ScaleL	<b>-0.491</b>	-0.009	<b>-0.465</b>	-0.263	<b>-0.480</b>	-0.212
ScaleW	<b>-0.449</b>	-0.139	<b>-0.487</b>	-0.023	<b>-0.487</b>	0.014
ScaleU	-0.386	0.323	-0.206	<b>-0.480</b>	-0.259	<b>-0.481</b>
ScaleL.W	-0.254	0.306	0.036	<b>-0.456</b>	0.015	<b>-0.429</b>
ScaleU.W	0.017	<b>0.579</b>	0.282	<b>-0.484</b>	0.241	<b>-0.542</b>
ScaleU.L	0.158	<b>0.519</b>	0.318	-0.275	0.277	-0.351



Ryc. 3. Uporządkowanie 10 stanowisk (a), 48 drzew (b) oraz 220 szyszek (c) metodą analizy składowych głównych (PCA) na podstawie 9 cech morfologicznych szyszek i łusek nasiennych. Symbole: kółka - stanowiska oraz szyszki z drzewostanów pochodzenia sztucznego, trójkąty - stanowiska oraz szyszki z drzewostanów pochodzenia naturalnego. Stanowiska i drzewa reprezentowane są przez wartości średnie cech szyszek i łusek nasiennych. Wkład poszczególnych cech w uporządkowanie obiektów przedstawiony jest w Tabeli 4.

#### 4.1.4. Zmienność poszczególnych cech między drzewostanami naturalnymi i sztucznymi oraz pomiędzy stanowiskami

Porównanie wartości poszczególnych cech morfologicznych szyszek i łusek nasiennych dla drzewostanów pochodzenia naturalnego i sztucznego wskazuje, że na podstawie analizowanych cech nie jest możliwe pewne odróżnienie pochodzenia drzewostanu (Ryc. 4, Tab. 6). Wartości prawie wszystkich cech mają szeroki zakres zmienności i zachodzą na siebie dla różnych stanowisk oraz pochodzenia drzewostanu. Cechą, której wartości najbardziej różnią się w obydwu typach drzewostanów jest szerokość szyszki (Ryc. 4b). W drzewostanach sztucznych szerokość szyszki wyniosła średnio 42 mm, natomiast w naturalnych – 35 mm. Na wykresach przedstawiających zakres zmienności tej cechy, wartości pomiędzy 1 i 3 kwartyłem (25%-75%) prawie nie zachodziły na siebie dla stanowisk z drzewostanów naturalnych i sztucznych. Wyjątkiem było tu stanowisko 5 z drzewostanu sztucznego pochodzenia (Mały Regiel u Wylotu Dol. Kościeliskiej), które podobnie jak w analizach grupowania wykazało duże podobieństwo do drzewostanów naturalnych. Ponadto szyszki w drzewostanach sztucznych miały nieco większą długość (Ryc. 4a), większą długość i szerokość łuski nasiennej (Ryc. 4d,e) oraz mniejsze wartości dwóch cech kształtu łuski, tj. stosunku długości górnej do szerokości łuski (Ryc. 4h) i stosunku długości górnej do długości całkowitej łuski (Ryc. 4i). Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie cechy z wyjątkiem szerokości szyszki, zachodziły się wartościami dla drzewostanów sztucznych i naturalnych w znacznym stopniu (Ryc. 4, Tab. 6).

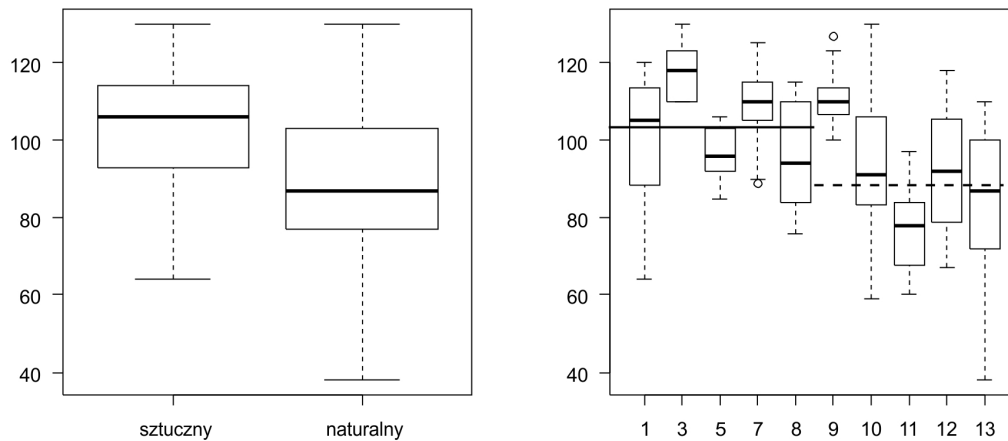
Tabela 6. Wartości cech morfologicznych szyszek (n=220) i łusek (n=1100) świerka pospolitego z drzewostanów pochodzenia naturalnego i sztucznego: odchylenie standardowe (SD), wartość minimalna (Min.) i maksymalna (Maks.), mediana (Me), średnia arytmetyczna (X) oraz wartość percentyli 10%, 25%, 75% i 90%.

Cecha	Pochodzenie d-stanu	SD	Min.	10%	25%	Me	X	75%	90%	Maks.
ConeL (mm)										
	sztuczne	13.43	64.0	85.5	94.0	106.00	103.5	114.0	118.0	130.0
	naturalne	17.50	38.0	66.0	77.0	87.00	88.5	102.8	110.0	130.0
ConeW (mm)										
	sztuczne	6.61	27.0	31.5	39.3	41.5	42.2	47.0	50.0	55.0
	naturalne	7.55	17.0	25.0	29.0	36.5	35.3	40.0	43.7	50.0
ConeL.W										
	sztuczne	0.41	1.78	2.08	2.20	2.44	2.50	2.77	3.05	3.89
	naturalne	0.64	1.67	1.89	2.07	2.40	2.59	3.02	3.58	4.32
ScaleL (mm)										
	sztuczne	2.93	18.0	21.0	23.0	25.0	25.0	27.0	28.0	34.0
	naturalne	3.01	13.5	19.0	21.0	22.0	22.6	25.0	27.0	30.0
ScaleW (mm)										

	sztuczne	1.77	12.0	14.0	15.0	17.0	16.4	18.0	18.0	21.0
	naturalne	2.12	8.0	12.5	13.5	15.0	14.9	17.0	18.0	19.0
ScaleU (mm)										
	sztuczne	1.56	7.0	8.0	9.0	10.0	10.1	11.0	12.0	16.0
	naturalne	1.34	5.0	8.0	9.0	10.0	9.7	10.0	11.0	13.0
ScaleL.W										
	sztuczne	0.11	1.19	1.39	1.47	1.53	1.53	1.59	1.67	1.85
	naturalne	0.13	1.21	1.36	1.43	1.53	1.52	1.62	1.69	1.85
ScaleU.W										
	sztuczne	0.08	0.44	0.53	0.56	0.61	0.62	0.67	0.72	0.88
	naturalne	0.09	0.38	0.54	0.59	0.67	0.66	0.71	0.77	0.91
ScaleU.L										
	sztuczne	0.05	0.29	0.35	0.37	0.40	0.40	0.44	0.47	0.53
	naturalne	0.05	0.25	0.37	0.41	0.43	0.43	0.46	0.48	0.56

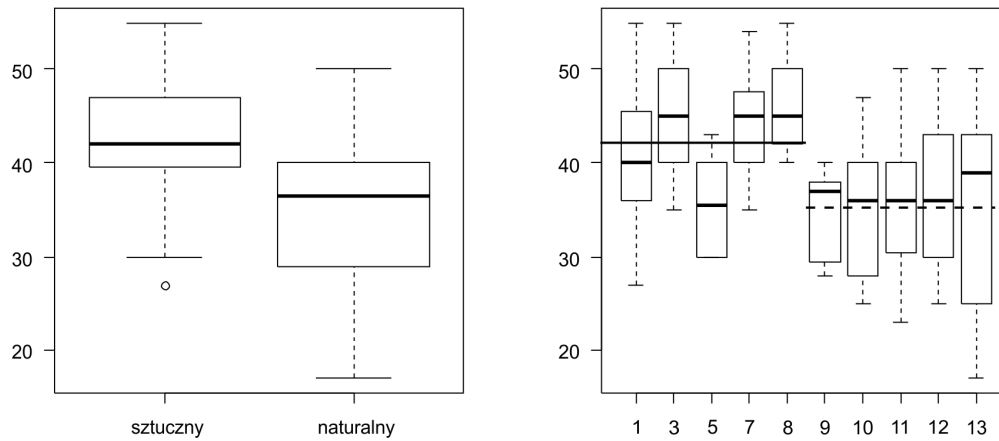
a)

Długość szyszki (mm)



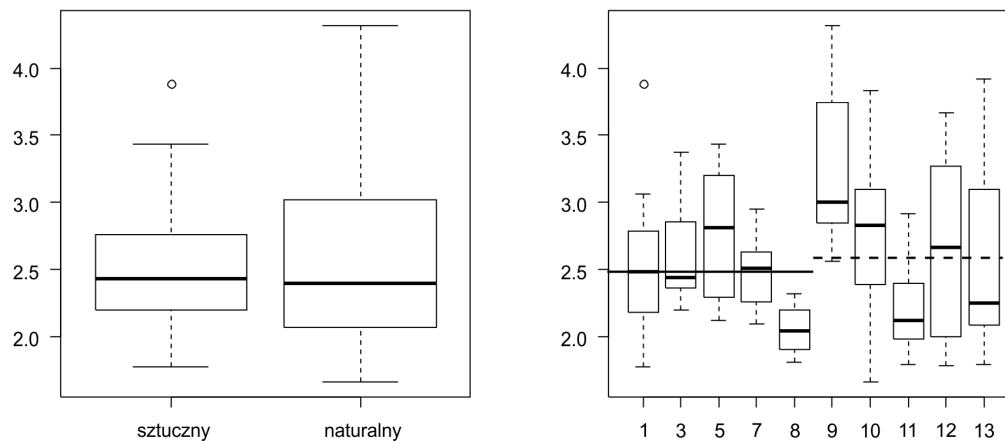
b)

Szerokość szyszki (mm)



c)

Długość szyszki / szerokość szyszki

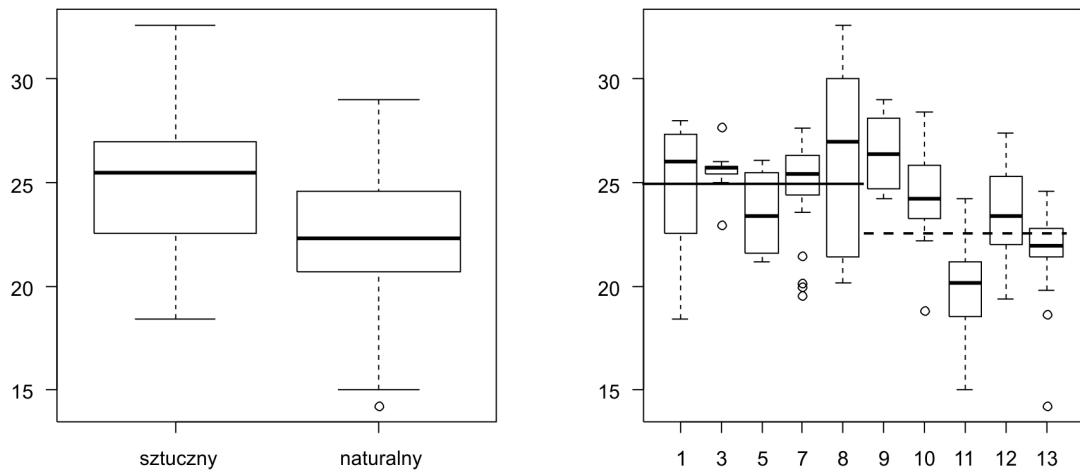


Ryc. 4. Zmienność cech szyszek i łusek nasiennych w drzewostanach świerkowych pochodzenia sztucznego i naturalnego (lewa kolumna) oraz dla poszczególnych stanowisk (prawa kolumna); linia wewnątrz pudełka - mediana, szerokość pudełka - rozstęp ćwiartkowy (IQR - interquartile range), wąsy - zakres  $1,5 \cdot \text{IQR}$ , linia pozioma ciągła - wartość średniej dla stanowisk 1-8 (d-stany pochodzenia sztucznego), linia pozioma przerywana - wartość średniej dla stanowisk 9-13 (d-stany pochodzenia naturalnego). Wykaz stanowisk znajduje się w Tabeli 1.

6).

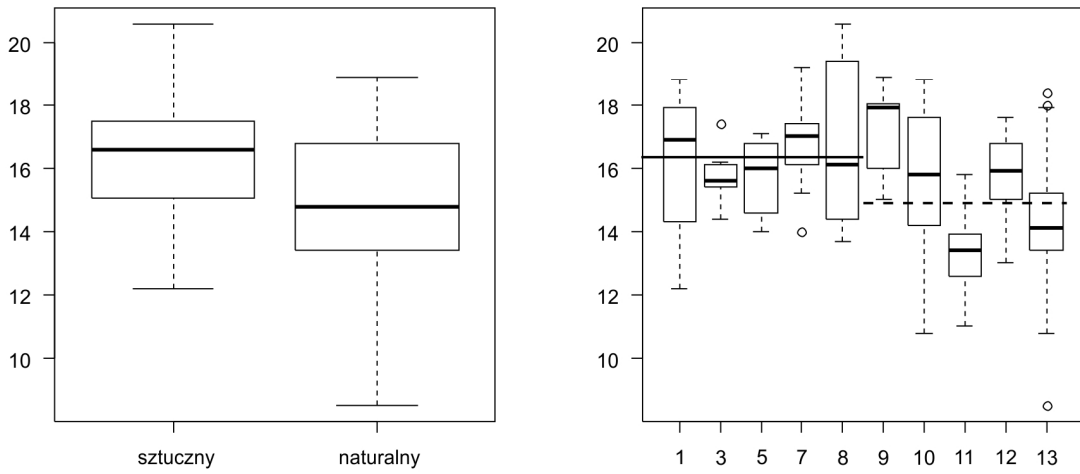
d)

Długość łuski (mm)



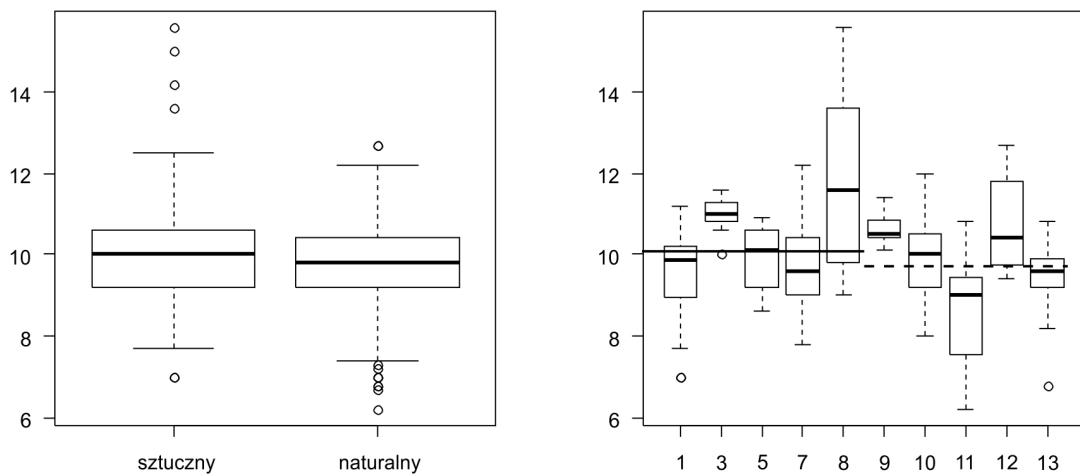
e)

Szerokość łuski (mm)



f)

Długość górna łuski (mm)

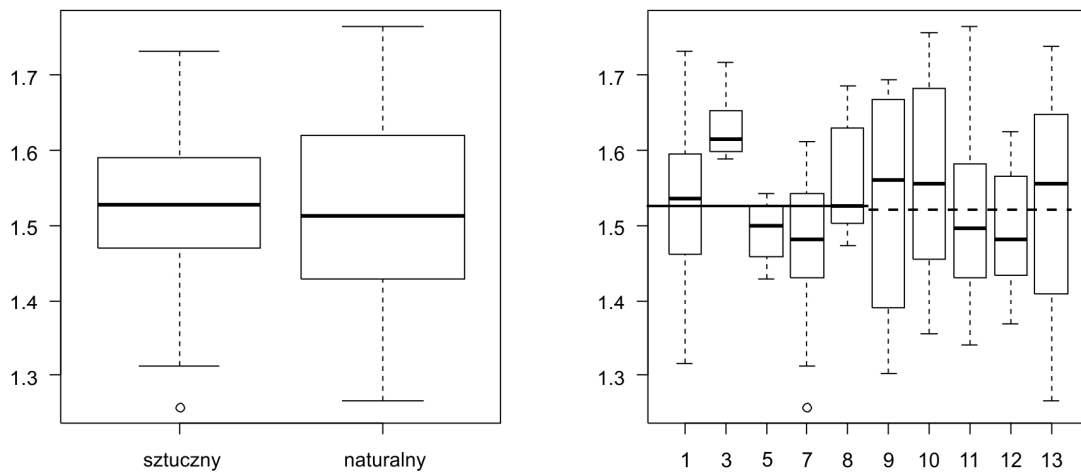


Ryc. 4. (kontynuacja)



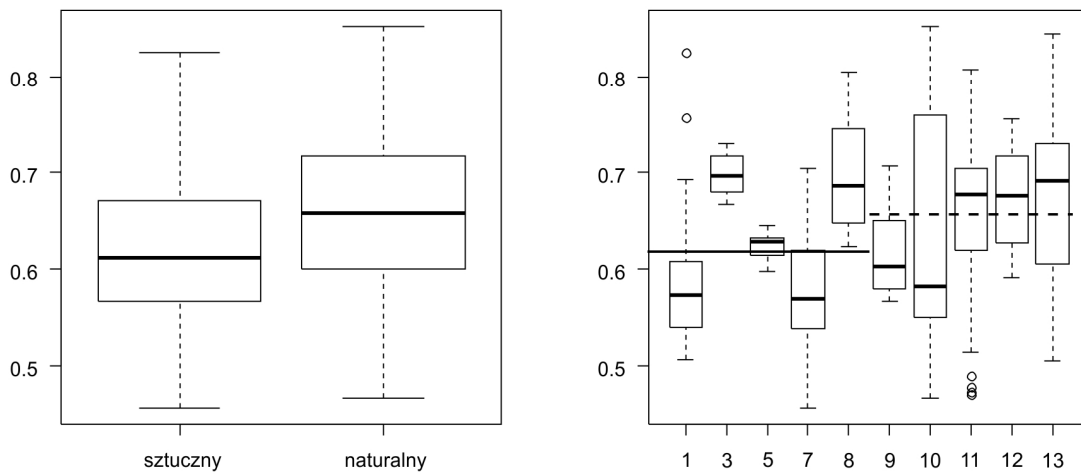
g)

Długość łuski / szerokość łuski



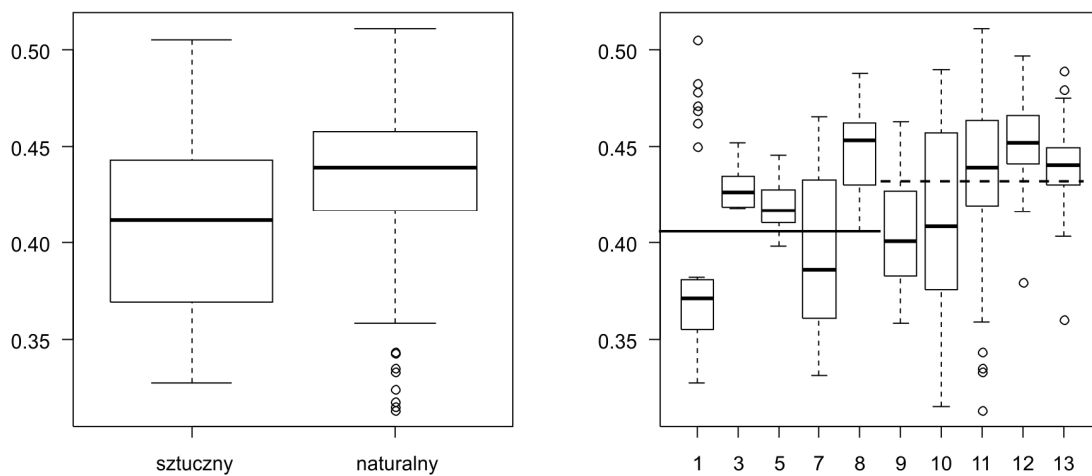
h)

Długość górna łuski / szerokość łuski



i)

Długość górna łuski / długość łuski



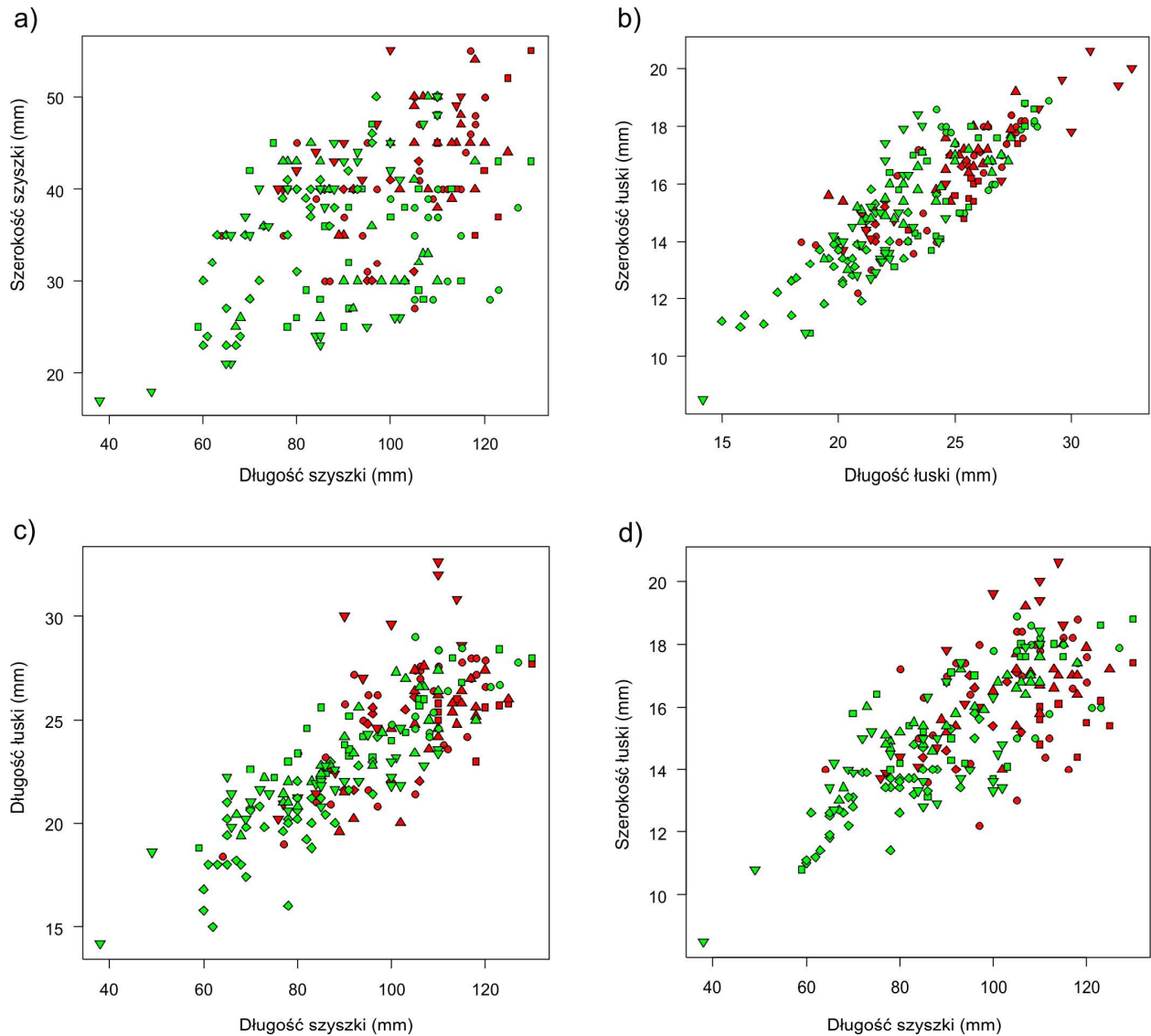
Ryc. 4. (kontynuacja)

## 4.1.5. Obraz zmienności szyszek w przestrzeni dwu i trzech cech morfologicznych

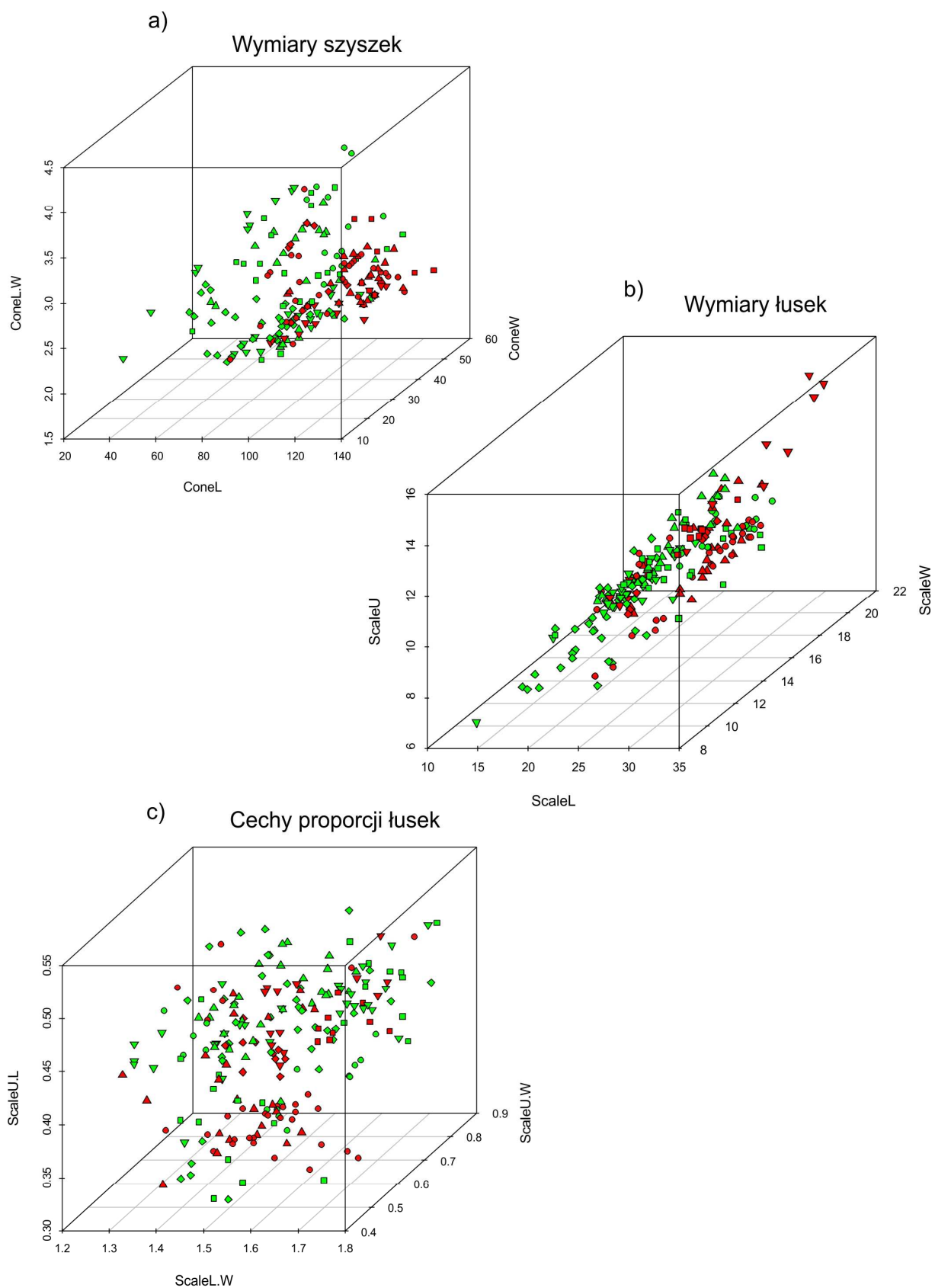
Analiza rozrzutu szyszek w przestrzeni dwóch (Ryc. 5) oraz trzech cech morfologicznych (Ryc. 6) wskazuje, że pomimo rozdzielania środków ciężkości dla szyszek z drzewostanów naturalnych i sztucznych, istnieje bardzo szeroka strefa zachodzenia się szyszek zebranych w tych dwóch typach drzewostanów. Na każdym z tych diagramów szyszki z drzewostanów naturalnych grupują się w zakresie niższych wartości wymiarów szyszek i łusek nasiennych. Uwagę zwraca natomiast brak jakiejkolwiek zależności w rozrzucie szyszek w przestrzeni trzech cech kształtu łusek nasiennych (Ryc. 6c).

#### 4.1.6. Zmienność cech w obrębie szyszki, drzewa, pomiędzy drzewami i między stanowiskami

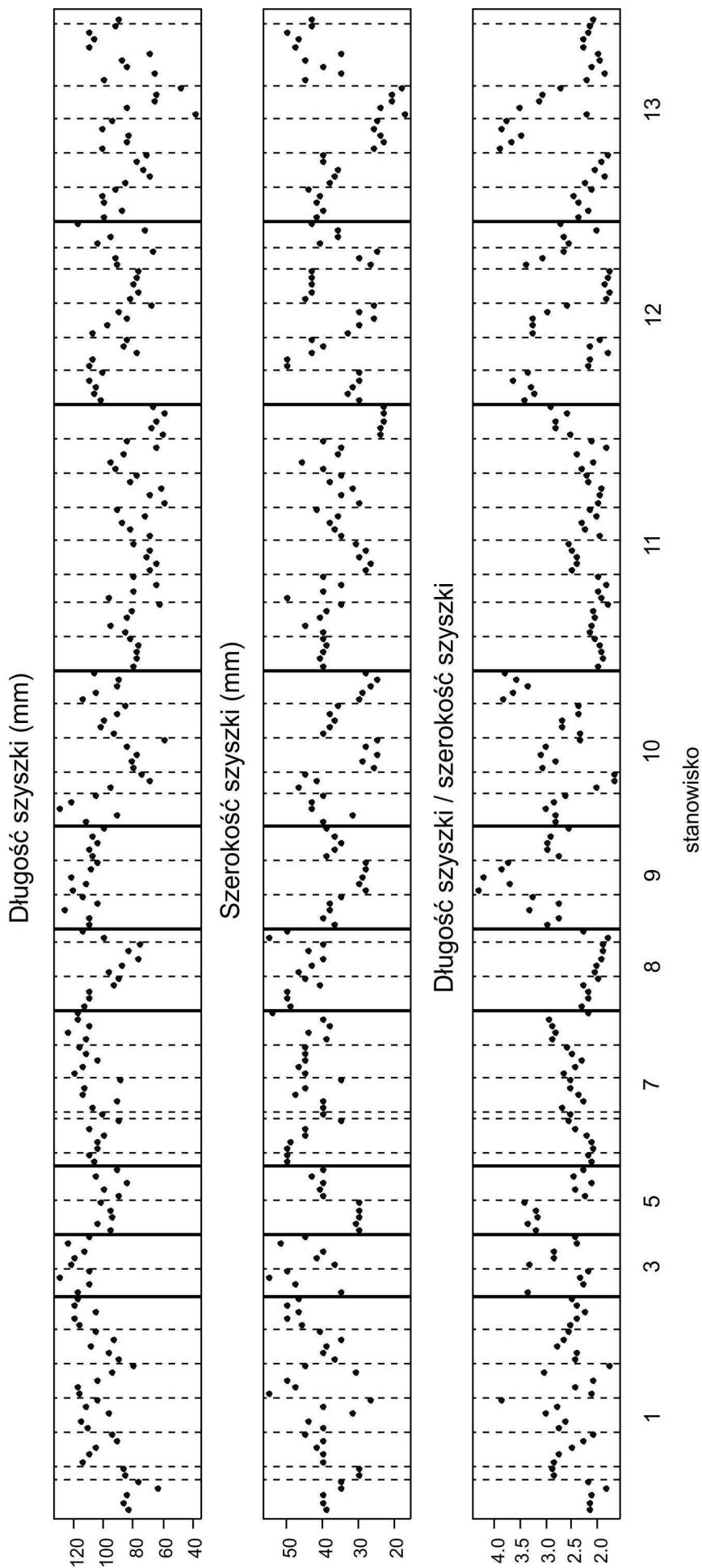
Analiza zmienności cech szyszek wskazuje, że zmienność pomiarów długości szyszek w obrębie drzewa najczęściej nie jest duża, natomiast w obrębie stanowiska obserwuje się większą zmienność tej cechy pomiędzy poszczególnymi drzewami (Ryc. 7). Cechami w jeszcze większym stopniu zmiennymi pomiędzy drzewami i jednocześnie bardziej wyrównanymi w obrębie pojedynczego drzewa są szerokość szyszki i stosunek długości do szerokości szyszki (Ryc. 7). Wymiary łusek nasiennych w obrębie szyszki najczęściej były dość wyrównane i przyjmowały jednakowe lub bardzo zbliżone wartości, natomiast zmienność cech pomiędzy szyszkami tego samego drzewa była znacznie większa (Ryc. 7). Największą zmienność w cechach łusek obserwowano jednak najczęściej w odniesieniu do różnych cech pomiędzy drzewami w obrębie stanowiska. Wyniki te wskazują na istnienie dużej zmienności w cechach szyszek i łusek nasiennych między drzewami i mogą one tłumaczyć znaczne zachodzenie się wartości cech między poszczególnymi stanowiskami i w konsekwencji między drzewostanami pochodzenia naturalnego i sztucznego.



Ryc. 5. Wykresy rozrzutu dla 220 szyszek z 10 badanych stanowisk w przestrzeni dwóch cech morfologicznych szyszek i łusek nasiennych. Oznaczenie symboli: kolor czerwony - drzewostany pochodzenia sztucznego (kółko - stanowisko 1, kwadrat - 3, romb - 5, trójkąt skierowany wierzchołkiem do góry - 7, trójkąt skierowany wierzchołkiem do dołu - 8), kolor zielony - drzewostany pochodzenia naturalnego (kółko - stanowisko 9, kwadrat - 10, romb - 11, trójkąt skierowany wierzchołkiem do góry - 12, trójkąt skierowany wierzchołkiem do dołu - 13.)



Ryc. 6. Wykresy rozrzutu dla 220 szyszek z 10 badanych stanowisk w przestrzeni trzech cech morfologicznych szyszek (a) i łusek (b,c). Oznaczenie symboli stanowisk jak na Ryc. 5.

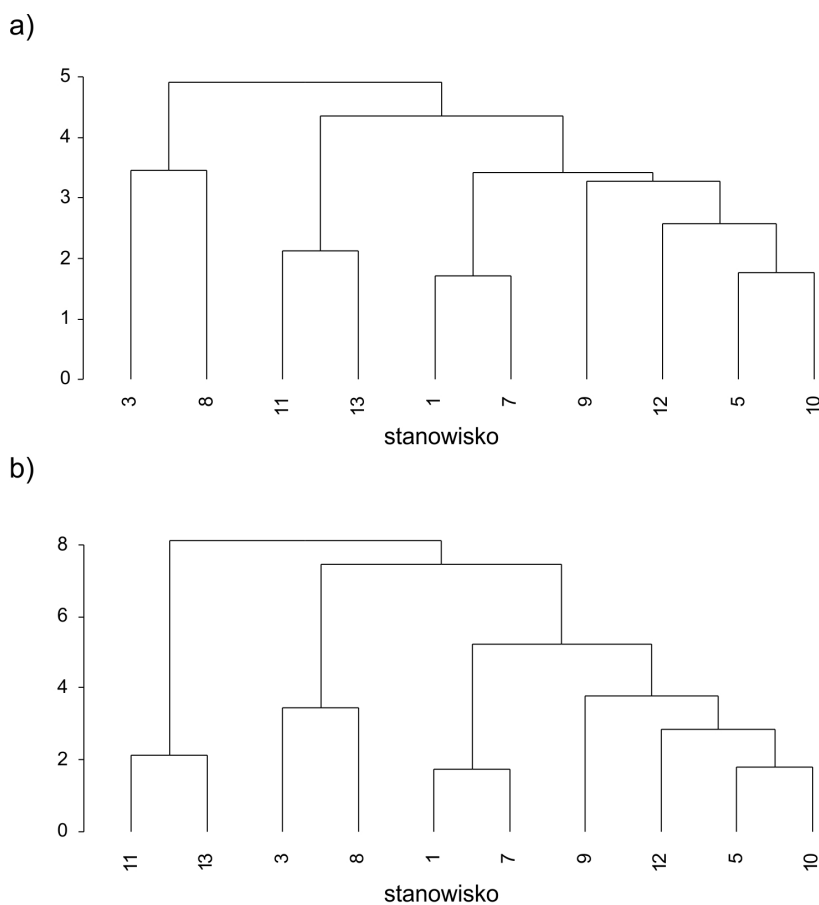


Ryc. 7. Wartości cech morfologicznych 220 szyszek świerka pospolitego. Punkty na wykresie reprezentują pomiar dla pojedynczej szyszki, linie przerywane rozdzielają pomiary dla poszczególnych drzew, natomiast linie ciągłe rozdzielają pomiary dla stanowisk. Wykaz stanowisk znajduje się w Tabeli 1.

## 4.2. Wyniki analiz molekularnych

### 4.2.1. Wyniki analizy SSR

W przypadku wszystkich zastosowanych primerów uzyskano produkty reakcji PCR o przewidywanych wielkościach (długościach w pz) nadające się do analizy porównawczej badanych populacji. Markery uzyskane przy użyciu primerów Pa-28, Pa-29, Pa\_33, Pa\_44, Pa\_59, Pa\_60 charakteryzowały się pełną jednorodnością we wszystkich badanych populacjach, oznacza to, że nie wykryły one różnic genetycznych w przebadanych próbach. W przypadku markera Pa\_36 zaobserwowano odmienną długość produktu (192pz) dla 3 populacji (nr 9, nr 11, nr 12) w stosunku do pozostałych badanych populacji (Ryc. 8.), dla których produkt PCR miał długość (189pz).



Ryc. 8. Dendrogramy struktury podobieństwa 10 stanowisk reprezentowanych przez wartości średnie 9 cech morfologicznych szyszek i łusek nasiennych; grupowanie metodą nieważonej średniej arytmetycznej (UPGMA) (a) oraz Warda (b).

Dla pewności wykonano powtórnie analizę dla wszystkich prób przy użyciu tego markera i ponownie uzyskano dokładnie taki sam wynik analizy. Wszystkie trzy wyróżnione przez ten marker populacje należą do jednej grupy populacji o domniemanym „polskim pochodzeniu”. Oznacza to, że marker ten może być przydatny w ujawnieniu cechy

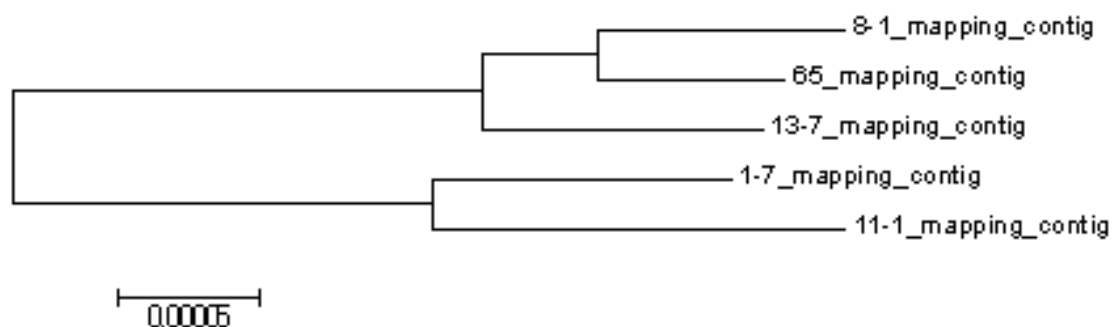
genetycznej charakterystycznej dla co najmniej części populacji świerka, rodzimego pochodzenia. Marker ten powinien być przydatny do szerszych badaniach populacyjnych na większej liczbie prób i populacji.

Należy zaznaczyć, że ze względu na ograniczone środki finansowe przeznaczone na tą analizę przetestowano tylko niewielką część znanych markerów mikrosatelitarnych świerka. Pomimo tego udało się wykryć jeden marker o stabilnej zdolności do detekcji zmienności mikrosatelitarnej w przebadanych populacjach. Dają to nadzieję na wykrycie kolejnych przydatnych do tego celu markerów w przypadku przetestowania większej ich liczby.

#### 4.2.2. Wyniki analizy NGS

Z każdej z sekwencjonowanych próbek uzyskano sekwencje o długości 127kbp (127 tysięcy par zasad), co odpowiada zakresowi wielkości tych genomów u roślin. Zestawione razem i wyrównane sekwencje prób charakteryzują się 122 miejscami je różnicującymi (Tab. 7). Dendrogram obrazujący dystans genetyczny pomiędzy próbkami obliczony na podstawie liczby miejsc w sekwencji różnicujących badane próby jest przedstawiony na Ryc. 9.

Ryc. 9. Dendrogram obrazujący dystans genetyczny pomiędzy badanymi próbkami



Na dendrogramie można wyróżnić dwa skupienia, pierwsze zawierające próby 8, 6 oraz 13 oraz drugie dla prób 1 i 11. Oznacza to, że próby znajdujące się w dwóch różnych skupieniach charakteryzują się między sobą większym dystansem genetycznym niż próby w obrębie danego skupienia. Tak więc próby 1 oraz 11 są wyraźnie odróżnione od pozostałych. W obrębie górnego skupienia można także wyróżnić populację 13, która pomimo iż została zaliczona do tego samego skupienia jest odmienna od prób 8 i 6. Należy ponadto pamiętać, że dendrogram obrazuje dystans genetyczny jedynie na poziomie genomu chloroplastowego, który jest niewielką częścią całości informacji genetycznej w komórce.

Na uzyskanych sekwencjach genomu chloroplastowego można zaobserwować 82 mutacje punktowe o charakterze substytucji, 20 miejsc z jednonukleotydową sekwencją powtórzoną o

różnej liczbie powtórzeń, 11 indeli o długości od 1 do 18 pz, 3 mikrosatelity o powtarzalnym motywie „TA” oraz jedno miejsce z inwersją sekwencji o długości 35 pz. (patrz tabela 7).

Najbardziej przydatne do analizy zróżnicowania genetycznego wydają się 3 znalezione miejsca mikrosatelitarne jednak, aby określić je jako markery mikrosatelitarne, należy przeprowadzić testy populacyjne. Także liczne mutacje punktowe dają nadzieję na wyselekcjonowanie markerów opartych na detekcji trawienia enzymami restrykcyjnymi.

Ponadto przeanalizowano fragmenty sekwencji kodujących wykorzystywane jako loci do barkodingu DNA roślin (rbcL i matk) ale nie zaobserwowano różnic w obrębie tych loci pomiędzy badanymi próbkami.

Tabela 7. Wykaz i charakterystyka różnic w sekwencji nukleotydowej genomu chloroplastowego badanych prób.

Lp.	Miejsce wystąpienia na sekwencji genomu chloroplastowego	Charakter różnic	Szczegóły	Komentarz
1	1256	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
2	1307	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
3	2456	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
4	2545	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
5	3658	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
6	4650	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
7	7053-7056	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 8,6 i 11 posiadają 9 powtórzeń „C”. Populację 1 charakteryzuje 8 powtórzeń a populację 13 aż 11 powtórzeń nukl. „C”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR.
8	7292	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
9	8227	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
10	8246	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 11 posiada 10 powtórzeń „T”. Pozostałe populacje charakteryzują się 9 powtórzeniami „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydową różnicę między populacjami.
11	9666	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 8 i 13 posiadają 11 powtórzeń „A”. Pozostałe populacje charakteryzuje 12 powtórzeń nukl. „A”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na



				jednonukleotydomą różnicę między populacjami.
12	11031	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
13	11934	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
14	12905	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
15	12911	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
16	13106	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
17	15634	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
18	15635-15636	Jednonukleotydoma sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 6 posiada 16 powtórzeń „A”. Pozostałe populacje charakteryzuje 14 powtórzeń nukl. „A”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
19	16208	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
20	16238	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
21	16285	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
22	19830	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
23	20578	Indel punktowy	Populacje 8 i 6 brak nukleotydu „C” w stosunku do pozostałych prób	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
24	20633-20637	5-cio nukleotydomy indel	Populacje 8 i 6 brak pięcionukleotydomowego motywu „GTCTC” występującego w pozostałych próbach	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
25	20750-20771	Powtarzający się motyw mikrosatelitarny	Powtarzający się motyw (TA) Populacje 8 i 13 charakteryzują się 5 powtórzeniami motywu. U pozostałych populacji występuje 11 powtórzeń.	Łatwe do detekcji locus mikrosatelitarny ze względu na duże różnice w długości motywu powtarzalnego pomiędzy próbkami.
26	22535	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
27	27915-27925	Jednonukleotydoma sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 8,6 i 13 posiadają 10 powtórzeń nukl. „A”. Populacja 1 tylko 9 powtórzeń. Próbę 11 charakteryzuje 11 powtórzeń nukl. „A”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomą różnicę między populacjami.
28	28302	Jednonukleotydoma sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 1 i 11 posiadają 11 powtórzeń nukl. „T”. Pozostałe populacje charakteryzuje 12 powtórzeń nukl. „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomą różnicę między populacjami.
29	28918	Jednonukleotydoma	Populacje 1 i 11 posiadają 7 powtórzeń	W przypadku stabilnej długości

		sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	nukl. „A”. Pozostałe populacje charakteryzuje 8 powtórzeń nukl. „A	mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydową różnicę między populacjami.
30	29225-29229	5-cio nukleotydowy indel	Populacja 1 posiada pięcionukleotydowy indel „CACGG” którego brak w pozostałych populacjach w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
31	29817	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
32	30540-30543	3 nukleotydowa substytucja	Populacja 11 charakteryzuje się trójnukleotydowym motywem „GTA”. U pozostałych populacji występuje motyw „TAC”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
33	31288	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
34	31525	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
35	31694-31706	14-sto nukleotydowy indel	Populacja 1 posiada pięcionukleotydowy indel „CTTCTCTTTTCT” którego brak w pozostałych populacjach w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych lub ze względu na wystarczającą długość w reakcji PCR.
36	32486	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
37	32732	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
38	32749	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
39	33549	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 oraz 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
40	35198	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
41	35584	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
42	36036-36050	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 8 i 6 posiadają 15 powtórzeń nukl. „T”. Próby 1 i 11 posiadają 14 powtórzeń A próba 13 charakteryzuje się 13 powtórzeniami nukl. „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR.
43	40470-40483	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 13 charakteryzuje się 13-oma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 12 powtórzeń „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR.
44	51246	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
45	52676-52686	Jednonukleotydowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 8 i 1 charakteryzuje się 10-oma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 11 powtórzeń „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydową różnicę między populacjami.
46	52828	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do

			Pozostałe próby nukleotyd „A	detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
47	53140	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
48	53738-53755	18-sto nukleotydowy indel	Populacja 6 i 13 posiada 18-sto nukleotydowy indel „TTTTTTCATCTTCATCTTT” którego brak w pozostałych populacjach w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych lub ze względu na wystarczającą długość w reakcji PCR.
49	53944-53953	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 11 charakteryzuje się 10-oma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 9 powtórzeń „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomową różnicę między populacjami.
50	54281-54291	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 1 i 11 charakteryzuje się 10-oma powtórzeniami nukl. „A”. Pozostałe próby posiadają 11 powtórzeń „A”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomową różnicę między populacjami.
51	56621	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „G	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
52	57248-57258	12-sto nukleotydowy indel	W populacji 6 brak 12-sto nukleotydowego indela „ATTTTGGCACTA” którego jest obecny w pozostałych populacjach w tym miejscu sekwencji	Potencjalny transpozon.(sprawdzić CACTA) Przydatny do detekcji w reakcji PCR
53	57265	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych.
54	58884	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
55	59368	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
56	62332	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
57	63885-63897	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 1 i 11 charakteryzuje się 11-stoma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 13 powtórzeń „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
58	65634-65649	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 6 charakteryzuje się 16-stoma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 13 powtórzeń „T”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
59	67187-67188	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 motyw „TT, populacja 11 motyw ”AT” Pozostałe próby motyw „AA”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
60	67553	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
61	67750	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
62	67948	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
63	69700-69704	4 nukleotydomowa substytucja	Populacja 1 i 11 charakteryzuje się czteronukleotydomowym motywem	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów

			„ATGG”. U pozostałych populacji występuje motyw „CCAT”	restrykcyjnych
64	70084	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
65	70320	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
66	70756	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
67	71362	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
68	72853	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
69	73903-73914	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacje 1 i 13 charakteryzują się 12-stoma powtórzeniami nukl. „T”. Próby 6 i 11 posiadają 11 powtórzeń a próba 8 tylko 10 powtórzeń „T.”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
70	74870	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
71	75389-75401	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 13 charakteryzują się 13-stoma powtórzeniami nukl. „T”. Pozostałe próby posiadają 12 powtórzeń „T.”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomową różnicę między populacjami
72	75452-75464	Powtarzający się motyw mikrosatelitarny „TA”	Powtarzający się motyw (TA) Populacje 1 charakteryzuje 5 powtórzeń motywu. U pozostałych populacji występuje 6 powtórzeń	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
73	78207	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
74	81292-81301	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 13 charakteryzują się 10-ciomą powtórzeniami nukl. „G”. Pozostałe próby posiadają 9 powtórzeń „G.”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomową różnicę między populacjami
75	81753	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
76	81896-81910	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 13 charakteryzują się 12-stoma powtórzeniami nukl. „T”. Próba 11 14-stoma powtórzeniami, natomiast Pozostałe próby posiadają 13powtórzeń „T.”	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
77	84880	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
78	85236	Punktowa (substytucja)	Populacja 6 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
79	88047-88050	4 nukleotydomowa substytucja	Populacja 11 charakteryzuje się czteronukleotydomowym motywem „AAAA”. U pozostałych populacji występuje motyw „TTTT”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
80	88793	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów

				restrykcyjnych
81	90172	Punktowa (substytucja)	Populacje 8 i 6 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
82	91887	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
83	94638	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
84	94958	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
85	95901	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
86	95976	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
87	98646	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
88	99472-99486	15-sto nukleotydowy indel	W populacji 1 i 11 obecny 12-sto nukleotydowy indel „ATTCAAATATAGATT” którego brak u pozostałych populacji w tym miejscu sekwencji	Przydatny do detekcji w reakcji PCR przy użyciu selektywnych primerów.
89	102112-102113	2 nukleotydowa substytucja	Populacja 1 i 11 charakteryzuje się dwunukleotydowym motywem „TT”. U pozostałych populacji występuje motyw „CG”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
90	102166-102167	2 nukleotydowa substytucja	Populacja 6 charakteryzuje się dwunukleotydowym motywem „CA” Próba 13 motywem „CG”. U pozostałych populacji występuje motyw „TT”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
91	102248	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
92	102864-102869	6-cio nukleotydowy indel	W populacji 11 obecny jest 6-cio nukleotydowy indel „AAAGTA” którego brak u pozostałych populacji w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
93	102873	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
94	102875	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
95	104784	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
96	104928	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
97	105268	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
98	105825	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
99	107140	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 i 6 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
100	107211	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „G” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów

				restrykcyjnych
101	109143	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 i 6 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
102	109659-109660	2 nukleotydowy indel	W populacjach 1 i 11 brak jest dwunukleotydowego indela „AT” który jest obecny u pozostałych populacji w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
103	109944	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 i 6 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
104	110779	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
105	110862	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
106	111347-111353	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 8 charakteryzują się 7-mioma powtórzeniami nukl. „T”, natomiast pozostałe próby posiadają 6 powtórzeń „T.”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych. Trudny do detekcji ze względu na jednonukleotydomową różnicę między populacjami
107	112776-112793	Powtarzający się motyw mikrosatelitarny „AT”	Powtarzający się motyw (AT) Populacje 1 i 11 charakteryzuje 9 powtórzeń motywu. U pozostałych populacji występuje 7 powtórzeń	W przypadku stabilnej długości mikrosatelity w populacji istnieje możliwość utworzenia markera SSR
108	112993	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 i 11 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
109	114162	Punktowa (substytucja)	Populacja 13 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
110	115431-115441	Jednonukleotydomowa sekwencja powtórzona o różnej liczbie powtórzeń w zależności od populacji	Populacja 13 charakteryzują się 11-stoma powtórzeniami nukl. „T”, Populacje 8 i 6 dziesięcioma powtórzeniami, natomiast pozostałe próby posiadają 6 powtórzeń „T.”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych lub jako marker mikrosatelitarny.
111	115555	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
112	115851-115858	8-śmio nukleotydowy indel	W populacjach 6 i 13 brak jest motywu „AAATATGG” który jest obecny u pozostałych populacji w tym miejscu sekwencji	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych lub elektroforezy wysokiej rozdzielczości.
113	116337	Punktowa (substytucja)	Populacje 1 i 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
114	116706	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
115	116963-116966	4-ro nukleotydowy indel	W populacjach 1 i 11 występuje motyw „CCCG”, którego brak u pozostałych populacji.	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
116	121043	Punktowa (substytucja)	Populacja 11 nukleotyd „T” Pozostałe próby nukleotyd „G”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
117	121484	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
118	121519	Punktowa (substytucja)	Populacja 8 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „A”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych

119	121484-121519	Inwersja	W populacji 8 inwersja sekwencji w stosunku do sekw. Pozostałych prób	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
120	121775	Punktowa (substytucja)	Populacje 1 i 11 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
121	122925	Punktowa (substytucja)	Populacje 8 i 6 nukleotyd „C” Pozostałe próby nukleotyd „T”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych
122	123566	Punktowa (substytucja)	Populacja 1 nukleotyd „A” Pozostałe próby nukleotyd „C”	Potencjalnie przydatna do detekcji przy pomocy enzymów restrykcyjnych

## **5. Wnioski ogólne**

Wyniki uzyskane w badaniach biometrycznych wykazują stosunkowo dużą zmienność zarówno wewnątrz- jak i międzypopulacyjną. Także różnice pomiędzy dwoma głównymi grupami populacji (rodzime, wtórne) nie są jednorodne zarówno w odniesieniu do średnich jak i zakresu wyznaczonego przez dwie ćwiartki ( $2\sigma$ ). Biorąc jednak pod uwagę to, co wiemy na temat zmienności badanych cech szyszek z obszaru Polski, jest to sytuacja typowa dla większości populacji regionalnych, które są zwykle mieszaniną wszystkich trzech głównych morfotypów, tj. var. *abies*, var. *acuminata* i var. *alpestris* (Staszkievicz 1977, Bugała 1988). Jak wykazano to na przykładzie kilku rodzimych populacji tatrzańskich, obecne są w nich w różnych proporcjach wszystkie trzy morfotypy, choć zdecydowaną dominację wykazuje odmiana typowa var. *abies*, którą w każdej populacji reprezentowało około 85-90% osobników. Mimo pewnej niejednorodności i wyraźnym nawiązywaniu prób populacji uznanych za najprawdopodobniej wtórne, możemy dostrzec wyraźne przesunięcie zakresów ich zmienności w stosunku do tych, które uznano za naturalne.

W tym stanie rzeczy bardzo trudno, niejako z natury rzeczy, o precyzyjniejszą interpretację uzyskanych wyników badań morfometrycznych. Choć grupy, o których mowa nie rozdzielają się w sposób wyrazisty, to jednak używając średnich wartości dla populacji oraz średnich dla poszczególnych drzew można było w oparciu o analizę składowych głównych (Ryc. 3), jednoznacznie rozdzielić 80% z badanych populacji i około 2/3 do 3/4 badanych drzew reprezentujących każdą z dwóch głównych grup, co przy istniejącej zmienności drzewostanów naturalnych jest wynikiem bardzo satysfakcjonującym.

W tym kontekście bardziej jednoznaczne, co do zróżnicowania materiału, są wyniki badań molekularnych. Pozwalają one, w przypadku badań mikrosatelitarnych oddzielić na podstawie jednego z markerów, populacje pierwotne od wtórnych. Mniej klarowny jest pilotażowy wynik uzyskany drugą z metod (NGS), choć dalsze analizy otrzymanych wyników mogą pozwolić na wydobycie z nich obrazu bardziej czytelnego.

Ostatecznie więc wyniki wszystkich trzech analiz, skonfrontowane z istniejącą szerszą wiedzą na temat zmienności świerka (*Picea abies*), zarówno tą morfologiczną (Staszkiwicz 1977, Bugała 1988 i cytowana tam literatura) jak i genetyczną (Giertych 1998) i cytowana tam literatura), należy uznać za obiecujące i stwarzające na przyszłość możliwość skutecznego rozróżnienia populacji pierwotnych od wtórnych nasadzeń świerka. Tym samym uzyskujemy narzędzie, które może być wykorzystane w przyszłości dla celów szczegółowego opracowania mapy wtórnych świerczyn dolnoregłowych; tę zaś (mapę) użyć w aplikowaniu odpowiednich zabiegów przebudowy drzewostanów wtórnych w ramach „Planu Ochrony TPN” oraz wyznaczania rodzimych populacji świerka dolnoregłowego (głównie na morenach „przedgórze” Tatr Wysokich).

## **6. Spis literatury**

Fluch S., Burg A., Homolka A., Soiless N., Vendramin G. G. 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BioMed Central Research Notes* 4: 401-406.

Giertych M. 1998. Zmienność proveniencyjna i dziedziczenie. [W: A. Boratyński, W. Bugała (red.). *Biologia świerka pospolitego*. 1998. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznań]: 213-239.

Mirek Z. 1996. Antropogeniczne zagrożenia i przekształcenia środowiska przyrodniczego. [W: Z. Mirek (red.). *Przyroda Tatrzańskiego Parku Narodowego*. Instytut Ochrony Przyrody PAN, Instytut Botaniki PAN, Tatrzański Park Narodowy, Kraków-Zakopane]: 595-617.

Obidowicz A. et al. 2004. Isopollen history of trees and shrubs: *Picea abies* (L.) H. Karst. [W: M. Ralska-Jasiewiczowa et al. (red.) 2004. *Late glacial and holocene history of vegetation in Poland based on isopollen maps*. W. Szafer Institute of Botany PASc, Kraków]: 147-157.

Staszkiwicz J. 1977. Systematyka. [W: S. Białobok (red.). 1977. *Świerk pospolity *Picea abies* (L.) Karst.*, PWN. Warszawa – Poznań]: 20-36.

Vendramin G. G., Anzidei M., Madaghiele A., Sperisen C., Bucci G. 2000. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43(1): 68-78.