

Genetická diverzita pěti populací jedle bělokoré v oblasti Šumavy

Genetic diversity of five populations of European silver fir in the Bohemian Forest

Jana Ešnerová^{1,*}, Jiří Mánek^{2,1} & Richard Kolář³

¹Fakulta lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 1176, CZ-16521 Praha 6 –
Suchdol, Česká republika

²GenLab – genetická laboratoř, Záhoříčko 14, CZ-38481 Čkyně, Česká republika

³Správa NP a CHKO Šumava, Sušická 399, CZ-34192 Kašperské Hory, Česká republika
*esnerova@fld.czu.cz

Abstract

Genetic study of five populations of European silver fir (*Abies alba* Mill.) was made in the area of the Šumava National Park using isoenzyme electrophoretic approach. Nine enzyme systems (IDH, GDH, GOT, LAP, PGM, PGI, PX, PEPCA, 6-PGDH) were used in total. On the basis of the results obtained so far, it seems that the populations of silver fir do not differ significantly from the populations found in the neighbouring countries.

Key words: Šumava National Park, *Abies alba*, isoenzymes

Úvod

Studiem genetické variability v rámci druhu *Abies alba* Mill. se v zahraničí zabývá mnoho autorů. Mezi první práce, které využívaly isoenzymy jako genetické markery ke sledování genetické diverzity, patří práce MEJNARTOWICZE (1980) a KORMUŤÁKA (1982). V pozdějších studiích pak byla pomocí elektroforézy isoenzymů sledována úroveň genetické variability u této dřeviny jak na lokální úrovni, tak v rámci celého jejího areálu (např. SCHROEDER 1989, BERGMANN et al. 1990, BERGMANN 1996, KONNERT & BERGMANN 1995, BREITENBACH-DORFER et al. 1997, FADY et al. 1999, MEJNARTOWICZ 2003, 2004, BALLIAN & KAJBA 2005). Byly sledovány také souvislosti mezi genetickou strukturou a tolerancí k environmentálním stresům (KONNERT 1993, BERGMANN & GREGORIUS 1993) nebo k průmyslovému znečištění (LONGAUER et al. 2001, 2004). Isoenzymy byly využity i při rozlišování jednotlivých druhů rodu *Abies* (např. VICARIO et al. 1995, SCALTSOYIANNES et al. 1999).

Na území České republiky však zatím žádné komplexnější studie prováděny nebyly. I s ohledem na probíhající práce při zakládání semenného sadu jedle bělokoré na Šumavě, byly pomocí metody horizontální elektroforézy isoenzymů provedeny analýzy u 5 šumavských populací. Cílem studie bylo posoudit genetickou variabilitu jedle bělokoré na vybraných lokalitách v NP Šumava v rámci sledované oblasti.



Obr. 1. Mapa Národního parku Šumava s vyznačenými lokalitami sběru materiálu. Populace č. 3 (Soubor 1000+) byla tvořena jedinci, kteří rostli napříč Šumavou v nadmořské výšce nad 1000 m.

Fig. 1. A map of the Šumava National Park with distribution of the scored populations. The population No. 3 (Soubor 1000+) consisted of dispersed individuals growing on the whole area above 1000 m a.s.l.

MATERIÁL A METODIKA

Odběr vzorků pro genetické analýzy probíhal na pěti lokalitách (Tab. 1, Obr. 1) v zimním období v letech 2006 a 2007. Zájmové lokality reprezentovaly dospělé porosty jedle, u nichž se předpokládal původní výskyt. Populace označená jako Soubor 1000⁺ zahrnovala jedince rostoucí v nadmořských výškách nad 1000 m n. m. napříč celou Šumavou. Populace označené jako Gerlova Huť, Velký Bor, Povydří a Stožecko zastupovaly každá konkrétní samostatnou lokalitu (Obr. 1).

Sběr vzorků spočíval v odběru koncové větvičky s dormantními pupeny, podle potřeby s využitím žebříku a aluminiové teleskopické tyče s housníkem na konci. Při sběru vzorků byla mezi jednotlivými sledovanými stromy zachována minimální vzdálenost 30 m. Sledované stromy na lokalitách Gerlova Huť, Velký Bor a jedinci hodnocení v souborné populaci Soubor 1000⁺ byly v terénu vyznačeny. Vzorky z oblasti Povydří a Stožecka byly sesbírány po orkánu Kyrill ze země. Při sběru vzorků na těchto dvou lokalitách se vycházelo z předpokladu, že větvičky sebrané ve vzdálenosti min. 30 m od sebe budou pocházet z různých jedinců. Proto bylo při hodnocení každé samostatné větvičky přiřazeno vlastní číslo a počet hodnocených větviček byl v tomto případě roven počtu hodnocených jedinců. Vzorky byly až do doby vlastní analýzy deponovány v mrazicím boxu při teplotě $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V této studii bylo analyzováno celkem 242 stromů (Tab. 1). Pro samotnou genetickou analýzu byl využíván proteinový extrakt z diploidní tkáně dormantních pupenů. Z každého jedince bylo použito cca 10 mg pupenů zbavených obalových šupin. Extrakt byl připraven homogenizací tkáně ve zkumavkách eppendorf s následným odstředěním na centrifuze. K extrakci byl použit tris-glycinový pufr s obsahem PVP a merkptoetanolu podle receptury MUONA et al. (1987) s některými drobnými úpravami. Vlastní elektroforéza probíhala v horizontálním uspořádání – chlazená termostatickým cirkulátorem zn. HAAKE na 3 °C, při napětí 170–300V a proudu 150mA po dobu 5 hodin. Po ukončení elektroforézy byly gely rozřezány na tenké plátky a každý z nich obarven speciální histochemickou reakcí pro zviditelnění zymogramů. Barvení isoenzymů probíhalo podle prací CONKLE et al. (1982) a CHELIAK & PITEL (1984), vyhodnocování zymogramů pak podle práce KONNERT (1992).

V elektroforetických separacích se využívá toho, že isoenzymy jsou rozdílně pohyblivé formy daného enzymu, které vznikají kombinací několika podjednotek enzymů. Asi polovina enzymů je složena ze dvou podjednotek (dimerické enzymy). Méně časté jsou trimerní (tři podjednotky) a tetramerní (čtyři podjednotky) enzymy. V rámci každého enzymového systému byl lokus, který se dostal nejbližší ke katodě označen písmenem A, pomalejší písmenem B, atd. Označení alel probíhalo také na základě jejich relativní elektroforetické mobility. Nejrychlejší alela byla označena číslem 1, pomalejší číslem 2, atd. Populace byly sledovány pomocí 9 enzymových systémů, které kódují celkem 16 interpretovatelných lokusů (Tab. 2).

Identifikované genotypy jednotlivých jedinců sloužily jako vstupní data pro hodnocení

Tabulka 1. Sledované populace s označením pořadového čísla, počtem sledovaných jedinců, zařazením do lesního vegetačního stupně (LVS) a průměrnou nadmořskou výškou.

Table 1. List of analysed populations with their codes, number of analyzed individuals, respective forest vegetation zones, and mean altitudes.

Lokalita / Locality	Název populace / Population code	Počet sledovaných stromů / No. of scored individuals	LVS /Forest vegetation zone	Průměrná nadmořská výška / Mean altitude
1	Gerlova Huť	48	6	800 m n. m.
2	Velký Bor	48	6	800 m n. m.
3	Soubor 1000+	50	6–7	>1000 m n. m.
4	Povydíří	48	5	650 m n. m.
5	Stožecko	48	5–6	700 m n. m.

Tabulka 2. Seznam sledovaných lokusů s uvedením jejich zkratky a kódu enzymové komise (E.C.).

Table 2. List of studied loci with their abbreviation and the code of enzyme commission (E.C.).

Enzymový systém / Enzyme system	Zkratka / Abbreviation	E.C. kód / E.C. code	Počet hodnotitelných lokusů / Number of scored loci
Isocitric dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	1
Glutamate dehydrogenase	GDH	1.4.1.2	1
Glutamate-oxaloacetic transaminase	GOT	2.6.1.1	3
Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	2
Phosphoglucomutase	PGM	5.4.2.2	2
Phosphoglucoisomerase	PGI	5.3.1.9	2
Peroxidase	PX	1.11.1.7	2
Phosphoenolpyruvate carboxylase	PEPCA	4.1.1.31	1
6-Phosphogluconate dehydrogenase	6-PGDH	1.1.1.44	2

genetické diverzity a alelických frekvencí za pomoci počítačového programu BIOSYS-1 (SWOFFORD & SELANDER 1989) a FSTAT (GOUDET 2001). Byly počítány následující genetické charakteristiky: alelické frekvence, průměrný počet alel na lokus, podíl polymorfních lokusů, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost, Wrightův fixační index a Neiovy genetické vzdálenosti mezi populacemi. Pro analýzu genetické struktury sledovaných populací jedle bělokoré byla použita Wrightova F -statistika (byl určován stupeň inbreedingu – F_{IS} , stupeň populační diferenciace na subpopulace – F_{ST} , odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy – F_{IT}) a Neiova G -statistika (poměr diverzity mezi populacemi k celkové diverzitě – G_{ST}). Pomocí hodnoty pro F_{ST} (SLATKIN 1985) byl počítán i genový tok ($N_e m$).

VÝSLEDKY

Ve sledovaných populacích bylo celkem pozorováno 69 alelických variant. Dva lokusy (*Pgi-A*, *Pepca-B*) se na všech lokalitách projevíly monomorfně. Nejvyšší počet alel, celkem pět, byl pozorován pro lokus *Lap-B*. Čtyři alely byly pozorovány u lokusu *Lap-A* a *6-Pgdh-A*, tři alely u lokusů *Idh-A*, *Px-A*, *6-Pgdh-B*, *Got-B* a *Got-C*. U ostatních lokusů byly pozorovány dvě alely. Některé alely se jevíly jako místně specifické. Na lokalitě Gerlova Huť se jako na jediné projevil monomorfně lokus *Pgi-B*, u lokusu *6-Pgdh-A* se projevila první alela a u lokusu *6-Pgdh-B* se projevila alela třetí. U jedle rostoucí v nadmořské výšce nad 1000 m (populace Soubor 1000⁺) byla pozorována třetí alela lokusu *Px-A* a monomorfně se zde projevil lokus *Gdh-A*. Pouze na lokalitě Stožecko se projevila pátá alela lokusu *Lap-A*, první alela u lokusu *6-Pgdh-B* a naopak u lokusu *Got-B* se první alela neprojevila. První alela lokusu *Px-A* se projevila na lokalitě Povydí (Tab. 3).

U sledovaných populací jedle bělokoré se podíl polymorfních lokusů pohyboval v rozmezí 56,3 % (Soubor 1000⁺) a 81,3 % (Povydí a Stožecko) (Tab. 4). V populaci označené jako Soubor 1000⁺ byl pozorován také nejmenší průměrný počet alel na lokus. Ve všech populacích byla pozorovaná heterozygotnost nižší než heterozygotnost očekávaná. V populacích tedy převažují homozygotní jedinci nad jedinci heterozygotními, o čemž svědčí i kladné hodnoty Wrightova fixačního indexu (WRIGHT 1922), který porovnává sledovanou populaci s panmiktickým modelem (Tab. 4) a kladná hodnota stupně inbreedingu (F_{IS} Tab. 5). Ve sledovaných populacích byl pozorován téměř 50% pokles heterozygotnosti ve srovnání s Hardy-Weinbergovým zákonem. Malé hodnoty spočítané pro stupeň diferenciace (F_{ST}) a poměr diverzity mezi populacemi k celkové diverzitě (G_{ST}) poukazují na malé genetické rozdíly mezi sledovanými populacemi. Poměr diverzity mezi populacemi k celkové diverzitě (G_{ST}) byl 6 %. To znamená, že přibližně 94 % celkové genetické diverzity je dáno vnitropopulačně a jen 6 % připadá na rozdíly mezi populacemi. Malé genetické rozdíly mezi populacemi byly potvrzeny i výpočtem koeficientů Neiových genetických vzdáleností (Tab. 6). Grafické znázornění genetických vzdáleností pomocí shlukové analýzy je uvedeno v Obr. 2. Ve sledovaných populacích byl pozorován genový tok 3,32 (Tab. 5).

DISKUSE

Enzymový systém IDH se zdá být u rodu jedle více variabilní než je u jiných rodů jehličnatých dřevin (SCHROEDER 1989). V šumavských populacích podobně jako v jiných studiích (SCHROEDER 1989, VICARIO et al. 1995, BREITENBACH-DORFER et al. 1997) nebyla identifikována čtvrtá alela lokusu *Idh-A*, která byla pozorována v některých populacích jedle bělokoré v Rakousku (BREITENBACH-DORFER et al. 1992) nebo ve švýcarských Alpách (HUSSENDÖRFER 1999). U lokusu *Idh-B* byla dokonce objevena jasná klinální závislost na teplotních poměrech (nadmořské výšce a zeměpisné šířce; BERGMANN & GREGORIUS 1993).

Tabulka 3. Souhrnná tabulka frekvencí výskytu alel sledovaných lokusů.

Table 3. Summary table of the allele frequencies of the analysed loci.

Lokus / Locus	Alela / Allele	Populace / Population				
		1 Velký Bor	2 Gerlova Hut'	3 Soubor 1000+	4 Povydří	5 Stožecko
<i>Idh-A</i>	1	0,116	0,326	0,100	0,198	0,240
	2	0,023	0,000	0,050	0,052	0,000
	3	0,861	0,674	0,850	0,750	0,760
<i>Pgm-A</i>	1	1,000	0,957	1,000	0,990	0,927
	2	0,000	0,043	0,000	0,010	0,073
<i>Pgm-B</i>	1	0,081	0,087	0,080	0,021	0,083
	2	0,919	0,913	0,920	0,979	0,917
<i>Lap-A</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,174	0,033	0,090	0,010	0,031
	3	0,745	0,934	0,840	0,896	0,854
	4	0,081	0,033	0,070	0,094	0,094
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021
<i>Lap-B</i>	1	0,116	0,174	0,140	0,010	0,021
	2	0,616	0,772	0,730	0,333	0,313
	3	0,256	0,043	0,120	0,115	0,219
	4	0,012	0,011	0,010	0,469	0,353
	5	0,000	0,000	0,000	0,073	0,094
<i>Pgi-A</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>Pgi-B</i>	1	0,221	0,000	0,020	0,083	0,094
	2	0,779	1,000	0,980	0,917	0,906
<i>Px-A</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,052	0,000
	2	1,000	1,000	0,980	0,948	1,000
	3	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000
<i>Px-B</i>	1	0,047	0,000	0,000	0,052	0,052
	2	0,953	1,000	1,000	0,948	0,948
<i>6-Pgdh-A</i>	1	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000
	2	0,384	0,283	0,430	0,645	0,707
	3	0,593	0,673	0,570	0,311	0,293
	4	0,023	0,022	0,000	0,044	0,000
<i>6-Pgdh-B</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021
	2	1,000	0,978	1,000	1,000	0,979
	3	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000
<i>Got-A</i>	1	0,000	0,011	0,000	0,010	0,052
	2	1,000	0,989	1,000	0,990	0,948

Tabulka 3. Pokračování.

Table 3. Continued.

Lokus / Locus	Alela / Allele	Populace / Population				
		1 Velký Bor	2 Gerlova Huť	3 Soubor 1000+	4 Povydří	5 Stožecko
<i>Got-B</i>	1	0,081	0,043	0,050	0,042	0,000
	2	0,896	0,870	0,890	0,906	0,990
	3	0,023	0,087	0,060	0,052	0,010
<i>Got-C</i>	1	0,012	0,033	0,120	0,022	0,083
	2	0,779	0,782	0,840	0,891	0,834
	3	0,209	0,185	0,040	0,087	0,083
<i>Gdh-A</i>	1	0,023	0,033	0,000	0,021	0,021
	2	0,977	0,967	1,000	0,979	0,979
<i>Pepca-B</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabulka 4. Genetické charakteristiky sledovaných populací (v závorce uvedena střední chyba odhadu).

Table 4. Genetic characteristics of the scored populations (standard errors in parentheses).

Populace / Population	Průměrný počet stromů na lokus / Mean number of trees per locus	Průměrný počet alel na lokus / Mean number of alleles per locus	Podíl polymorfních lokusů / Percentage of polymorphic loci	Heterozygotnost / Heterozygosity		Wrightův fixační index / Wright's fixation index
				Pozorovaná / Observed	Očekávaná / Expected	
1 Gerlova Huť	43	2,1	62,5	0,116	0,181	0,359
		(0,2)		(0,039)	(0,049)	
2 Velký Bor	46	2,1	68,8	0,053	0,149	0,644
		(0,3)		(0,014)	(0,043)	
3 Soubor 1000+	50	1,9	56,3	0,076	0,137	0,445
		(0,2)		(0,028)	(0,042)	
4 Povydří	46,5	2,2	81,3	0,090	0,155	0,419
		(0,2)		(0,028)	(0,046)	
5 Stožecko	46,9	2,1	81,3	0,090	0,174	0,483
		(0,2)		(0,030)	(0,046)	

Tabulka 5. Průměrné hodnoty F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} , G_{ST} a $N_e m$ pro sledované populace.

Table 5. Average values of Wright's F-statistics and Nei's G-statistics of the scored populations

Souhrn za populace / Summary of all populations	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	G_{ST}	$N_e m$
	0,497	0,07	0,459	0,057	3,321

Tabulka 6. Matice genetických vzdáleností (podle NEI 1972).
Table 6. Matrix of the genetic distances (according to NEI 1972).

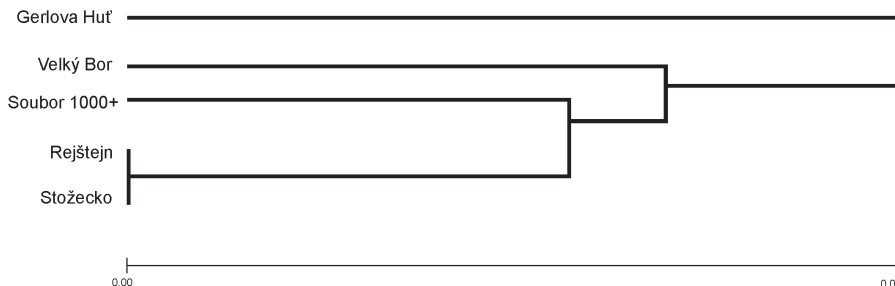
Populace / Population	1	2	3	4	5
1 Gerlova Hut'	***				
2 Velký Bor	0,010	***			
3 Soubor 1000+	0,005	0,005	***		
4 Povydrří	0,004	0,003	0,002	***	
5 Stožecko	0,006	0,006	0,006	0,001	***

I když byl u polských populací jedle rostoucích v nižších nadmořských výškách pozorován vyšší podíl polymorfních lokusů (MEJNARTOWICZ 2003, 2004), nemusí být nadmořská výška v některých oblastech vždy hlavním faktorem, který ovlivňuje genetickou strukturu populací jedle bělokoré (KORSHIKOV et al. 2005). Publikované výsledky analýz ze Švýcarska (HUSSENDÖRFER 1999), Ukrajiny (KORSHIKOV et al. 2005) nebo z jihovýchodní části Francie (FADY et al. 1999) podobný trend, jaký byl pozorován u šumavských populací – tedy snížení podílu polymorfních lokusů nebo snížení počtu alel na lokus ve vyšších nadmořských výškách – neukazují.

Hodnoty pozorované heterozygotnosti v šumavských populacích podpořily výsledky studie sledující populace jedle v oblasti Rakouska a Německa, ve které se projevoval trend snižování heterozygotnosti směrem k severu a k východu (BREITENBACH-DORFER et al. 1997). Ve srovnání s populacemi rostoucími jihovýchodně od šumavských populací byla heterozygotnost v námi sledovaných populacích nižší.

HAMRICK et al. (1992) publikovali výsledky, kde byla stanovena průměrná hodnota G_{ST} pro rod *Abies* 6,3 % a pro všechny nahosemenné dřeviny 7,3 %. V šumavských populacích byla hodnota G_{ST} nižší, ale byla vyšší ve srovnání s publikovanými výsledky studií z Chorvatska (BALLIAN & KAJBA 2005), Ukrajiny (KORSHIKOV et al. 2005), Polska (LEWANDOWSKI et al. 2001) a Slovenska (MATUŠOVÁ 1995).

Malé genetické vzdálenosti mezi populacemi pocházejícími z geograficky malých oblastí, tak jako byly pozorovány v této studii, byly pozorovány také v jiných studiích (BRAUN & GOMÉZ 1994, SAGNARD et al. 2002).



Obr. 2. Dendrogram shlukové analýzy (metodou UPGMA) na základě Neiových genetických vzdáleností.
Fig. 2. An UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance between populations.

ZÁVĚR

Nejmenší podíl polymorfních lokusů a nejmenší průměrný počet alel na lokus byl pozorován u jedlí rostoucích nad 1000 m n. m. Tyto výsledky tedy ukazují na to, že u jedle rostoucí na Šumavě v extrémních podmínkách mimo optimum svého výskytu dochází ke snižování genetické variability. Nižší pozorovaná heterozygotnost ve sledovaných populacích je v souladu s již v zahraničí publikovanou hypotézou o trendu snižování heterozygotnosti u jedle bělokoré směrem k severu a východu. Také pozorované malé genetické vzdálenosti mezi populacemi v geograficky poměrně malé oblasti naznačují, že sledované populace jedle nejsou výrazně odlišné od populací jedle rostoucích v sousedních státech. Avšak vzhledem k tomu, že závěry jsou vyvozeny na základě provedených genetických analýz u omezeného počtu šumavských populací, je nutné podpořit je hlubším studiem (zejména studiem většího počtu populací) genofondu jedle bělokoré v této oblasti.

Poděkování. Tento projekt vznikl za podpory grantu NPV II MŠMT 2B06012 – Management biodiverzity v Krkonoších a na Šumavě.

LITERATURA

- BALLIAN D. & KAJBA D., 2005: Estimation of the isoenzyme genetic variability of the silver fir (*Abies alba* Mill.) from the area of Gorski Kotar (Croatia). *Periodicum Biologorum*, 107: 67–72.
- BERGMANN F., 1996: Population genetics of natural regeneration of *Abies alba* in relation to the adult stand. *Allgemeine Forst Zeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge*, 51: 1046–1047.
- BERGMANN F. & GREGORIUS, H.-R., 1993: Ecogeographical distribution and thermostability of isocitrate dehydrogenase (IDH) alloenzymes in European silver fir (*Abies alba*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 597–605.
- BERGMANN F., GREGORIUS H.-R. & LARSEN J.B., 1990: Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba*). *Genetica*, 82: 1–10.
- BRAUN H. & GÓMEZ L.L., 1994: Die Tanne (*Abies alba* Mill.) in Sachsen. In: *Ergebnisse des 7. IUFRO-Tannensymposiums der WP S. 1.01-08 „Ökologie und Waldbau der Weißtanne“*, EDER W. (ed.), IUFRO, Altensteig, Germany, 31 Oct. – 4 Nov. 1994: 201–216.
- BREITENBACH-DORFER M., PINSKER W., HACKER R. & MÜLLER E., 1992: Clone identification and clinal allozyme variation in populations of *Abies alba* from the Eastern Alps (Austria). *Plant Systematics and Evolution*, 181: 109–120.
- BREITENBACH-DORFER M., KONNERT M., PINSKER W., STARLINGER F. & GEBUREK T., 1997: The contact zone between two migration routes of silver fir, *Abies alba* (Pinaceae), revealed by allozyme studies. *Plant Systematics and Evolution*, 206: 259–272.
- CONKLE M.T., HODGSKISS P.D., NUNNALLY L.B. & HUNTER S.C., 1982: *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. United States Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report PSW-64, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, 18 pp.
- CHELIAK W.M. & PITEL J.A., 1984: *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Petawawa National Forestry Institute, Canada, 49 pp.
- FADY B., FOREST I., HOCHU I., RIBIOLLET A., DE BEAULIEU J.-L., PASUSZKA P., 1999: Genetic differentiation in *Abies alba* Mill. populations from southeastern France. *Forest Genetic*, 6: 129–138.
- GOUDET J., 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. HAMRICK J.L., GODT M.J.W., SHERMAN-BROYLES S.L., 1992: Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95–124. HUSSENDÖRFER E., 1999: Genetic variation of Silver fir populations (*Abies alba* Mill.) in Switzerland. *Forest Genetics*, 6: 101–113.
- KONNERT M., 1992: Genetische Untersuchungen in geschädigten Weißtannen-Beständen (*Abies alba* Mill.) Südwestdeutschlands. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Forstlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. 116 pp. + Anexe. (Depon in Library of Georg-August-Universität Göttingen)
- KONNERT M., 1993: Untersuchungen über die genetische Variation der Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Bayern. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 164 (9–10): 162–169.
- KONNERT M. & BERGMANN F., 1995: The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution*, 196: 19–30.
- KORMUŤÁK A., 1982: Biochemical variation of the sub-arctic ecotype of the silver fir (*Abies alba* Mill.). *Folia*

- Dendrologica*, 9: 5–14.
- KORSHIKOV I.I., PIRKO N.N., PIRKO Y.V., 2005: Genetic variation and differentiation of *Abies alba* Mill. populations from Ukrainian Carpathians. *Russian Journal of Genetic*, 41: 275–283.
- LEWANDOWSKI A., FILIPIAK M., BURCZYK J., 2001: Genetic variation of *Abies alba* Mill. in Polish part of Sudety Mts. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70: 215–219.
- LONGAUER R., GÖMÖRY D., PAULE L., KARNOŠKY D.F., MAŇKOVŠKÁ B., MÜLLER-STARCK G., PERCY K. & SZARO R., 2001: Selection effects of air pollution on gene pools of Norway spruce, European silver fir and European beech. *Environmental Pollution*, 115: 405–411.
- LONGAUER R., GÖMÖRY D., PAULE L., BLADA I., POPESCU F., MAŇKOVŠKÁ B., MÜLLER-STARCK G., SCHUBERT R., PERCY F., SZARO R.C. & KARNOŠKY D.F., 2004: Genetic effect of air pollution on forest tree species of the Carpathian mountains. *Environmental Pollution*, 130: 85–92.
- MATUŠOVÁ R., 1995: Genetic variation in five populations of silver fir (*Abies alba* Mill.) in Slovakia. *Biologia (Bratislava)*, 50: 53–59.
- MEJNARTOWICZ L., 1980: Polymorphism at the LAP and GOT loci in *Abies alba* Mill. populations. *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences. Série des Sciences Biologiques*, C1. V., 27: 1063–1070.
- MEJNARTOWICZ L., 2003: Genetic analysis of silver-fir populations in the Beskids. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72: 115–119.
- MEJNARTOWICZ L., 2004: Genetic analysis of silver-fir populations in the north Carpathian and Sudeten mountains. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73: 285–292.
- MUONA O., YAZDANI R. & LUNDQUIST G., 1987: Analysis of linkage in *Picea abies*. *Hereditas*, 106: 31–36.
- NEI M., 1972: Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106: 283–292.
- SANGARD F., BARBEROT C., FADY B., 2002: Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. *Forest Ecology and Management*, 157: 175–189.
- SCALTSOYIANNES A., TSAKTSIRA M. & DROUZAS A.D., 1999: Allozyme differentiation in the Mediterranean firs (*Abies*, Pinaceae). A first comparative study with phylogenetic implications. *Plant Systematics and Evolution*, 216: 289–307.
- SCHROEDER S., 1989: Isoenzyme polymorphisms of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Silvae Genetica*, 38: 130–133.
- SLATKIN M., 1985: Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393–430.
- SWOFFORD D.L. & SELANDER R.B., 1989: *BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics*. Illinois Natural History Survey, Champaign, 43 pp.
- VICARIO F., VENDRAMIN G.G., ROSSI P., LIŇ P., GIANNINI R., 1995: Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 1012–1018.
- WRIGHT S., 1922: Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist*, 56: 330–338.

Received: 19 January 2010

Accepted: 7 May 2010

