

Genetická diverzita 5 populací jedle bělokoré v oblasti Šumavy

Genetic diversity of 5 populations of European Silver Fir in the Šumava area

Jana Ešnerová¹, Jiří Mánek^{2,1}, Richard Kolář³

¹ ČZU v Praze, Fakulta lesnická a dřevařská, Kamýcká 1176, 165 21 Praha 6 – Suchdol, e-mail: esnerova@fld.czu.cz

² GenLab – genetická laboratoř, Záhoříčko 14, 384 81 Čkyně, e-mail: jmanek@gen-lab.cz

³ Správa NP Šumava, Sušická 399, 341 92 Kašperské Hory

Abstrakt

Na území NP Šumava bylo pomocí metody horizontální elektroforézy isoenzymů sledována genetická diverzita 5 populací jedle bělokoré (*Abies alba* Mill.). Ke sledování bylo využito celkem 10 enzymových systémů (IDH, GDH, GOT, LAP, PGM, PGI, PX, PEP, 6-PGDH, G-6-PDH). Na základě získaných výsledků se zdá, že jedle rostoucí na Šumavě se z genetického hlediska výrazně neodlišuje od populací rostoucích v sousedních státech.

Klíčová slova: NP Šumava, *Abies alba*, isoenzymy

Abstract

Genetic study of 5 populations of silver fir (*Abies alba* Mill.) was made in the area of Sumava National Park with the help of electrophoresis of isoenzymes. 10 enzymes systems (IDH, GDH, GOT, LAP, PGM, PGI, PX, PEP, 6-PGDH, G-6-PDH) were used in total. On the basis of the results it seems that the populations of silver fir are not significantly different in the area of Sumava National Park compared to the populations found in other neighbouring states.

Key words: Sumava 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 (MEJNARTOWICZ 1980) a Kormuťáka (KORMUŤÁK 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 a 2004). Isoenzymy byly také využity při rozlišování jednotlivých druhů v rámci rodu *Abies* (např. VICARIO et al. 1995, SCALTSOYIANNES et al. 1999).

V tomto příspěvku předkládáme výsledky studie, která se zabývala sledováním genetické diverzity v 5 šumavských populacích.

Materiál a metodika

Odběr vzorků pro genetické analýzy – koncové větvičky s dormantními pupeny – probíhal na pěti lokalitách v zimním období v letech 2006 a 2007 (seznam lokalit viz tab. č. 1 a obr. č. 1). Při sběru vzorků byla mezi jednotlivými sledovanými stromy zachována minimální vzdálenost alespoň 30 m. Vzorky z lokalit označených jako Gerlova Huť, Velký Bor a 8. LVS byly sbírány s využitím žebříku a aluminiové teleskopické tyče s housenikem na konci. Vzorky z oblasti Povydíří a Stožecka byly sesbírány po orkánu Kyrill ze země. Vzorky z těchto populací zahrnovaly plošně mnohem rozsáhlejší oblast než první dvě populace (MÁNEK 2007). Populace označená jako 8. LVS zahrnovala jedince rostoucí napříč celou Šumavou v nadmořských výškách nad 1000 m n. m. Sledované stromy na lokalitách označených jako Gerlova Huť, Velký Bor a 8. LVS byly v terénu vyznačeny.

Materiál byl až do doby vlastní analýzy deponován v mrazicím boxu při teplotě -22 °C.

V této studii bylo analyzováno celkem 242 stromů (viz tab. č. 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 v eppendorf zkumavkách s následným odstředěním extraktu na centrifuze. K extrakci byl použit tris-glicínový pufr s obsahem PVP a merkaptoethanolu 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). Označení alel probíhalo na základě jejich relativní elektroforetické mobility. Nejrychlejší alela byla označena číslem 1, pomalejší číslem 2, atd. V rámci každého enzymového systému byl lokus, který se dostal nejbližší ke katodě označen písmenem A, pomalejší písmenem B, atd.

Populace byly sledovány pomocí 10 enzymových systémů, které kódují celkem 17 interpretovatelných lokusů (viz tab. č. 2).

Tabulka 1. Sledované populace s označením pořadového čísla, počtem sledovaných jedinců a zařazením do LVS.

Table 1. Names of analysed populations, their numerical order, number of analyzed individuals and their forest vegetation zone.

Číslo lokality/ Code of locality	Název populace/ Name of population	Počet sledovaných stromů/ Number of scored individuals	LVS/ Forest vegetation zone
1	Dálnice - Gerlova Huť	48	6
2	Velký Bor	48	6
3	8. LVS	50	8
4	Rejštejn, Povydří	48	5
5	Stožecko	48	5-6



Obr.1. Souhrnná mapa Národního parku Šumava s vyznačenými lokalitami sběru materiálu (zdroj www.npsumava.cz – upraveno)

Fig. 1. Map of Šumava National Park with distribution of scored populations (source www.npsumava.cz – modified)

Tabulka 2. Seznam sledovaných lokusů s uvedením jejich zkratky a kódu enzymové komise.

Table 2. List of studied loci with their abbreviation and the code of enzyme commission.

Enzymový systém Enzyme systeme	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	PEP	4.1.1.31	1
6-Phosphogluconate Dehydrogenase	6-PGDH	1.1.1.44	2
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase	G-6-PDH	1.1.1.49	1

Výsledky

Ve sledovaných populacích bylo celkem pozorováno 69 alelických variant. Dva lokusy (PGI-A, PEP) se na všech lokalitách projeví monomorfně (Souhrnná tabulka frekvencí výskytu jednotlivých alel je uvedena v MÁNEK 2007).

Hodnocení genetické diverzity a alelických frekvencí bylo provedeno 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. Přehled sumárních výsledků genetické struktury jednotlivých lokalit je uveden v tabulce č. 3.

U sledovaných populací jedle bělokoré se podíl polymorfních lokusů pohyboval v rozmezí 56,3 % (8. LVS) a 81,3 % (Rejštejn a Stožecko). Ve všech populacích byla pozorovaná heterozygotnost nižší než heterozygotnost očekávaná. V populacích tedy převažují homozygoté nad heterozygoty, o čemž svědčí i kladné hodnoty Wrightova fixačního indexu, který porovnává sledovanou populaci s panmiktickým modelem (WRIGHT 1922) (viz tab. č. 3).

Pro analýzu genetické struktury jedle bělokoré byla použita Wrightova F-statistika a Neiova G-statistika. Byl určován stupeň inbreedingu (F_{IS}), stupeň populační diferenciace na subpopulace (F_{ST}), odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (F_{IT}) a poměr diverzity mezi populacemi k celkové diverzitě (G_{ST}). Pomocí hodnoty pro F_{ST} (SLATKIN 1985) byl počítán i genový tok ($N_e m$). Přehled průměrných hodnot počítaných ze všech hodnocených lokusů je uveden v tabulce č. 4. 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 (viz. tabulka č. 5). Grafické znázornění genetických vzdáleností pomocí klastrové analýzy je uvedeno na obrázku 2.

Tabulka 3. Genetické charakteristiky sledovaných populací (v závorce uvedena střední chyba odhadu)

Table 3. Genetic characteristic of the scored populations (standart errors are stated within brackets)

Číslo lokality Code of locality	Název populace Name of population	Ø počet stromů na lokus Ø number of trees per locus	Ø počet alel na lokus Ø number of alleles per locus	Podíl polymorfních lokusů Percentage of polymorphic loci	Heterozygotnost Heterosigosity		Wrightův fixační index Wright's fixation index
					pozorovaná observed	očekávaná excepted	
1	Dálnice, Gerlova Huť	43	2,1 (0,2)	62,5	0,116 (0,039)	0,181 (0,049)	0,359
2	Velký Bor	46	2,1 (0,3)	68,8	0,053 (0,014)	0,149 (0,043)	0,644
3	8. LVS	50	1,9 (0,2)	56,3	0,076 (0,028)	0,137 (0,042)	0,445
4	Rejštejn, Povydí	46,5	2,2 (0,2)	81,3	0,090 (0,028)	0,155 (0,046)	0,419
5	Stožecko	46,9	2,1 (0,2)	81,3	0,090 (0,030)	0,174 (0,046)	0,483

Tabulka 4. Průměrné hodnoty F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} , G_{ST} a $N_e m$ pro sledované populace

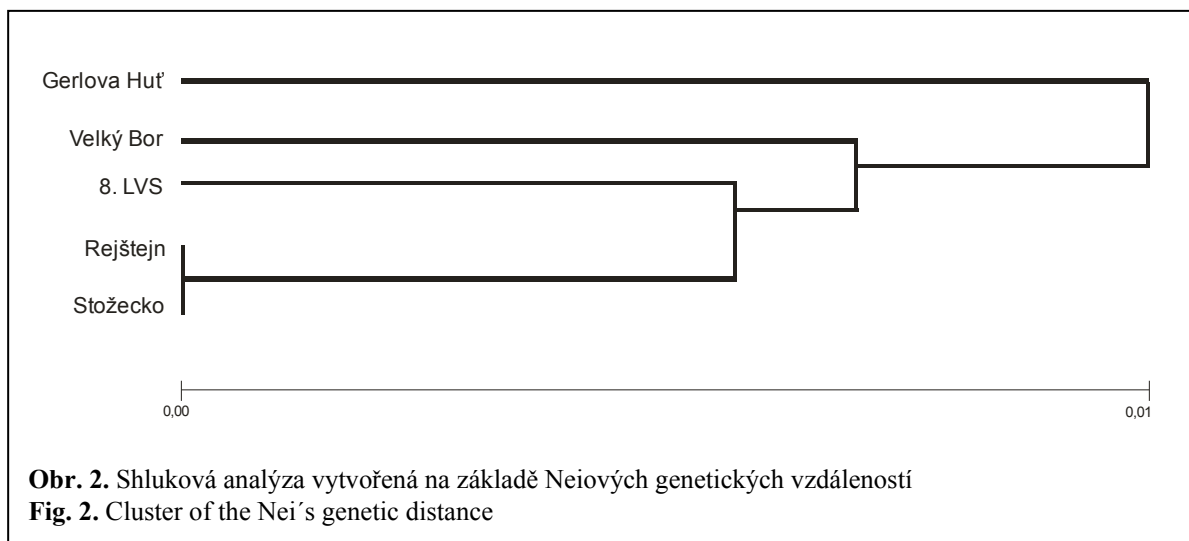
Table 4. Average values of Wright's F-statistic and Nei's G-statistic of the scored populations

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 5. Matice genetických vzdáleností, dle NEI 1978

Table 5. Matrix of the genetic distances (according NEI 1978)

Populace Population	1	2	3	4	5
1 Gerlova Huť	***				
2 Velký Bor	0,010	***			
3 mix (8. LVS)	0,005	0,005	***		
4 Rejštejn	0,004	0,003	0,002	***	
5 Stožecko	0,006	0,006	0,006	0,001	***



Diskuse

Enzymov systém IDH se zdá být u rodu jedle více variabiln než je u jiných rod jehličnatých dřevin (SCHROEDER 1989). V řumavskch populacích podobn jako v jiných studiích (SCHROEDER 1989, VICARIO et al. 1995, BREITENBACH-DORFER et al. 1997) nebyla identifikována tvrt alela lokusu IDH-A, kter byla pozorována v některých populacích jedle belokor v Rakousku (BREITENBACH-DORFER et al. 1992) nebo ve řvcarskch Alpách (HUSSENDÖRFER 1999). U lokusu IDH-B byla dokonce objevena jasn klinální závislost (BERGMANN & GREGORIUS 1993).

Pozorování heterozygotnost v řumavskch populacích podpořila výsledky studie sledující populace jedle v oblasti Rakouska a Německa, ve které se projevoval trend sniřovn heterozygotnosti směrem k severu a k východu (BREITENBACH-DORFER et al. 1997). Ve srovnání s populacemi rostoucími jihovchodn od řumavskch populací byla heterozygotnost v námi sledováních populacích niřší.

HAMRICK et al. (1992) publikovali výsledky, kde byla stanovena prmrn hodnota G_{ST} pro rod *Abies* 6,3 % a pro vřechny nahosemenné dřeviny 7,3 %. V řumavskch populacích byla hodnota G_{ST} niřší, ale ve srovnání s publikovnmi výsledky studií z Chorvatska (BALLIAN & KAJBA 2005), Ukrajiny (KORSHIKOV et al. 2005), Polska (LEWANDOWSKI et al. 2001) a Slovenska (MATřOV 1995) byla vřší.

Mal genetick vzdálenosti mezi populacemi pocházejícími z geograficky malých oblastí byly pozorovány také v jiných studiích (BRAUN & GOMZ 1994, SAGNARD et al. 2002)

Zvř

Nejmenř podl polymorfních lokusů a nejmenř prmrn počet alel na lokus byl pozorován v populaci rostoucí nad 1000 m n. m. Tyto výsledky tedy ukazují na to, že u jedle rostoucí na řumav v těchto extrémních podmínkách mimo optimum svého výskytu dochází ke sniřovn genetick variability. Podle pedlořench pedbřnch výsledků se zdá, že z hlediska genetick variability není jedle rostoucí na řumav nijak vrazn odliřn od jedle rostoucí v sousedních státech.

Poděkování: Tento projekt vznikl za podpory grantu NPV II MřMT 2B06012 – Management biodiverzity v Krkonořch a na řumav.

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(1): 67-72.
- BERGMANN F., 1996: Population genetics of natural regeneration of *Abies alba* in relation to the adult stand. *AFZ Der Wald* 51(19): 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(5): 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: Eder, W. (eds): Ergebnisse des 7.IUFRO-Tannensymposiums der WP S. 1.01-08 „Ökologie und Waldbau der Weißtanne“, s. 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). - *Pl. Syst. Evol.* 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.L. & HUNTER S.C., 1982: Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA For. Serv. Tech. Rep. PSW-64.
- CHELIAK W.M. & PITEL J.A., 1984: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canada, s. 49.
- 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(3): 129-138.
- GOUDET J., 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Dostupné z: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Updated from Goudet (1995).
- 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(2): 101-113.
- KONNERT M., 1992: Genetische Untersuchungen in geschädigten Weißtannen-Beständen (*Abies alba* Mill.) Südwestdeutschlands. Dissertation Erhaltung des Doktorgrades der Forstlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. 116 pp. + Anexe.
- 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.
- KORMUŠÁK 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 YA.V., 2005: Genetic Variation and Differentiation of *Abies alba* Mill. Populations from Ukrainian Carpathians, *Russ. J. Genet.* 41(3): 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(3): 215-219.
- LONGAUER R., GÖMÖRY D., PAULE L., KARNOSKY D.F., MAŇKOVSKÁ 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., MAŇKOVSKÁ B., MÜLLER-STARCK G., SCHUBERT R., PERCY F., SZARO R.C. & KARNOSKY D.F., 2004: Genetic effect of air pollution on forest tree species of the Carpathian Mountains. *Environmental Pollution* 130: 85-92.
- MATÚŠOVÁ R., 1995: Genetic variation in five populations of Silver Fir (*Abies alba* Mill.) in Slovakia. *Biológia (Bratislava)* 50: 53-59.
- MÁNEK J., 2007: Isoenzymová analýza čtyřech populací jedle bělokoré z oblasti NP Šumava + bonus 8.LVS. Závěrečná zpráva zpracovaná ke grantu Management biodiverzity v Krkonoších a na Šumavě na základě objednávek České zemědělské univerzity č. 4106/0047/06 a č. 4106/0027/07.
- 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(12): 1063–1070.

- MEJNARTOWICZ L., 2003: Genetic analysis of silver-fir populations in the Beskids. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(2): 115-119.
- MEJNARTOWICZ L., 2004: Genetic analysis of silver-fir populations in the north Carpathian and Sudeten mountains. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 73(4): 285-292.
- MUONA O., YAZDANI R. & LUNDQUIST G., 1987: Analysis of linkage in *Picea abies*. *Hereditas* 106: 31 - 36.
- 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(3-4): 130-133.
- SLATKIN M., 1985: Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 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, s. 43.
- VICARIO F., VENDRAMIN G.G., ROSSI P., LIÒ P., GIANNINI R., 1995: Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1012-1018.
- WRIGHT S., 1922: Coefficients of inbreeding and relationship. *American Naturalist* 56: 330 – 338.