

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE  
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV  
SLOVENSKÁ AKADÉMIA VIED  
ÚSTAV GENETIKY A BIOTECHNOLÓGIÍ RASTLÍN

**Genetická štruktúra jedľových pralesov Slovenska zisťovaná  
pomocou DNA markerov**

Autoreferát dizertačnej práce  
na získanie vedecko-akademickej hodnosti *philosophiae doctor*  
v študijnom odbore: 4.2.4 genetika

Ing. Miriam Kádasi Horáková

Nitra, 2009

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Ústave genetiky a biotechnológií rastlín Slovenskej akadémie vied.

Doktorand: Ing. Miriam Kádasi Horáková  
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín  
Slovenská akadémia vied  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc.  
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín  
Slovenská akadémia vied

Oponenti: prof. Ing. Štefan Hraška, DrSc.  
Katedra botaniky a genetiky  
Fakulta prírodných vied  
Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre

doc. Ing. Katarína Hrubíková, PhD.  
Katedra genetiky a šľachtenia rastlín  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Ing. Roman Longauer, CSc.  
Odbor pestovania lesa a lesníckych technológií  
Lesnícky výskumný ústav Zvolen  
Národné lesnícke centrum

Autoreferát bol odoslaný dňa .....

Stanovisko k dizertácii vypracoval Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Slovenská akadémia vied.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa ..... o ..... h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác študijného odboru 4.2.4 genetika na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Miesto konania: Katedra genetiky a šľachtenia rastlín  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: knižnica

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom odbore 4.2.4

prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

## ABSTRAKT

Genetická štruktúra a diverzita jedľových pralesov sa porovnávala s príľahlými porastami jedle bielej, ktoré sú lesnícky obhospodarované a to na základe polymorfizmu chloroplastovej DNA (cpDNA) a mikrosatelitnej jadrovej DNA.

Na úrovni cpDNA sa hodnotil pomer haplotypov A a B vzniknutých štiepením medzigénového úseku *psbC – trnS* cpDNA endonukleázou *Hae III*. Pralesový porast jedle bielej v Stuzici sa v tomto ohľade významne odlišoval od podobných porastov v Dobroči a Badíne. Naproti tomu rozdiely v pomere haplotypov medzi jedľovými pralesmi a obhospodarovanými porastami jedle nedosiahli hladinu štatistickej významnosti, okrem lokality Badín – obhospodarovaný porast. Očakávaná heterozygotnosť pralesov v Badíne a Dobroči bola vyššia ako u príslušných porastov, ktoré sú lesnícky obhospodarované. Výnimkou bola lokalita Stuzica, kde tento pomer bol obrátený.

Na úrovni mikrosatelitnej jadrovej DNA bol sledovaný polymorfizmus v štyroch lokusoch SFb4, SFb5, SF239 a SF331. Tak pri cpDNA ako aj pri mikrosatelitnej jadrovej DNA boli počet efektívnych alel a pozorovaná heterozygotnosť spravidla vyššie iba u dvoch z trojice analyzovaných lokalít. Výnimkou je pozorovaná heterozygotnosť v lokusoch SF239 a SF331, ktoré vykazovali vyššie hodnoty pozorovanej heterozygotnosti pri všetkých troch analyzovaných pralesoch. Lokus SFb5 mal však vyššiu hodnotu tohto parametra v obhospodarovaných porastoch, rovnako ako aj lokus SFb4, pri ktorom sa zistila vyššia pozorovaná heterozygotnosť u dvoch obhospodarovaných porastoch.

Zistené údaje naznačili relatívne nízky stupeň genetickej diferenciácie medzi jedľovými pralesmi a príľahlými obhospodarovanými jedľovými porastami.

Mikrosatelity nám poskytujú možnosť efektívne rozlíšiť stupeň genetickej diverzity medzi pralesmi a obhospodarovanými porastami jedle bielej v porovnaní s rozsahom premenlivosti zisťovanej pomocou reštrikčnej analýzy cpDNA.

**Kľúčové slová:** jedľa biela, pralesy, genetická diverzita, jadrové mikrosatelity, reštrikčná analýza cpDNA

## ABSTRACT

Genetic structure and diversity of silver fir forests were compared with that of the adjoining stands of the species using chloroplast DNA and nuclear DNA markers.

At the cpDNA level, the proportion of haplotypes A and B generated by digestion of *psbC – trnS* flanking region of chloroplast DNA (cpDNA) with *Hae III* was shown to differ significantly between the primeval forest in Stuzica on one side and in Dobroč and Badín on the other hand. On the contrary, the differences in haplotype proportions between the primeval forest given above and the corresponding managed stands adjoining, them have not reached the level of statistical significance, except for the locality Badín – managed stands. Expected heterozygosity was higher in primeval forest. Badín and Dobroč than in the corresponding managed stands but the reverse figure was typical for the locality Stuzica.

At the microsatellite nuclear DNA level was observed the polymorphism in the four loci studies SFb4, SFb5, SF239 and SF331. The number of effective alleles and observed heterozygosity of chloroplast DNA as well as microsatellite nuclear DNA were higher only at two from the trinity of analysed localities. The reverse figure was observed in loci SF239 and SF331 of all the primeval forests. The locus SFb5 accounted higher of significance this parameter at the adjoining managed stands. The same is true for the locus SFb4.

Presented data indicate low rate of genetic differentiation between the primeval forest and the corresponding managed stands of silver fir.

The microsatellites offer the opportunity for effective discrimination between primeval forests and managed stands of silver fir with respect to the genetic diversity. In comparison with the extent of variability detected by restriction analysis of cpDNA, the genetic diversity at the microsatellite DNA level was higher.

**Key words:** silver fir, primeval forests, genetic diversity, nuclear microsatellites, restriction analysis cpDNA

## POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY

**AgNO<sub>3</sub>** – dusičnan strieborný; **cpDNA** – chloroplastová DNA; **DNA** – kyselina deoxyribonukleová; **dNTP** – deoxyribonukleotid trifosfáty; **EDTA** – kyselina etyléndiaminotetraoctová; **EtBr** – etídium bromid; **ISSR** – zmnoženie úsekov DNA medzi jednoduchými opakovaniami; **M** – mol.l<sup>-1</sup>; **ME** – merkaptóetanol; **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – uhličitan sodný; **NaCl** – chlorid sodný; **nDNA** – jadrová DNA; **PCR** – polymerázová reťazová reakcia; **RFLP** – dĺžkový polymorfizmus reštrikčných fragmentov; **rpm** – revolutions per minute (otáčky za minútu); **SSR** – jednoduché sekvenčné opakovania; **TBE** – tlmivý roztok tris-borát-EDTA; **UV** – ultrafialové žiarenie; **V** - volt; **λ** – vlnová dĺžka; **χ<sup>2</sup>** – chí - kvadrát

# O B S A H

Úvod.....	5
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	5
2 Cieľ práce.....	8
3 Materiál a metódy.....	9
4 Výsledky.....	12
5 Záver.....	16
6 Návrh na využitie výsledkov v praxi a pre ďalší rozvoj vednej disciplíny.....	16
7 Výber z použitej literatúry.....	16
8 Zoznam publikovaných prác autora súvisiacich s problematikou.....	20

## Ú V O D

Prales ako pôvodná biocenóza je vrcholom prírodného ekosystému, ktorého zložky sa cez vzájomnú látkovú výmenu dlhodobo vzájomne úzko ovplyvňujú. Je to typický komplexný systém so všetkými výraznými znakmi kontinuitne a zákonite sa vyvíjajúceho celku. V danej oblasti predstavuje najvyspelejšiu a najzložitejšiu geobiocenózu, aká môže vôbec vzniknúť a trvalo sa udržať.

V rámci hierarchie zahrňujúcej ekosystémy a druhy je to predovšetkým polymorfizmus DNA, ktorá sa reprodukuje v čase a priestore a ktorá vytvára predpoklady pre evolúciu jednotlivých organizmov i celých druhov ako bezprostredná reakcia na zmeny vonkajšieho prostredia. Genomika, ktorej vznik a existencia sa viaže na obdobie posledných desiatich rokov predstavuje v súčasnosti najviac sofistikovaný prostriedok a nástroj na dešifrovanie diverzity na úrovni nukleotidov a génov. V oblasti lesných drevín, ako jednej z dominantných komponentov životného prostredia, vyústila do zistenia rozsahu variability, ktorú na základe morfolologickej klasifikácie lesných porastov nebolo možné postrehnúť. Uvedený aspekt sa vzťahuje aj na lesy Slovenska, ktorých porasty sú ekotypicky dobre odlišené podľa ich hospodársky významných ukazovateľov, menej sú však známe ich populačno-genetické parametre, vrátane variability na úrovni DNA. Odhliadnuc od teoretického prínosu, má analýza diverzity našich lesov na molekulovej úrovni aj bezprostredný praktický význam, ktorý súvisí s autochtóнным charakterom našich lesov. V dôsledku toho sú totiž naše lesné porasty často krát využívané aj ako génová báza v oblasti šľachtenia pre viaceré krajiny strednej Európy. Geomorfologická heterogénnosť nášho územia prispela k značnej ekotypickej diferenciacii hospodársky i ekologicky významných druhov lesných drevín, ktorých genetická štruktúra i vzájomné vzťahy nie sú zatiaľ dostatočne objasnené. V rámci ihličnatých drevín sa to týka smreka obyčajného, borovice lesnej ale aj ekotypov jedle bielej vrátane populácií z Dobročského pralesa a Badínskeho pralesa na strednom Slovensku resp. z východoslovenskej Stučice.

## **1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky**

### **1.1 Súčasný stav a výskyt pralesov na Slovensku**

Súčasný stav genetickej štruktúry a diverzity lesov Európy je odrazom v minulosti prebiehajúcej i terajšej interakcie jednotlivých genotypov lesných drevín s antropogénnymi faktormi, v priebehu ktorej sa diferencovali autochtónne populácie

jednotlivých druhov (Bradshaw, 2004). Tieto populácie sú chápané ako evolučné jednotky adaptácie a zároveň aj ako výsledok adaptácie na heterogenitu vonkajšieho prostredia počas evolúcie. Ich hlavnými atribútmi sú dobrá adaptácia na lokálne podmienky prostredia a genetická odlišnosť od ostatných populácií. S tým spravidla súvisí aj ich prevaha nad týmito populáciami. Prioritné postavenie autochtónnych populácií v lesnom ekosystéme je nepopierateľné, avšak aj v rámci samotných autochtónnych populácií sa často krát vyskytujú skupiny jedincov alebo spoločenstva s ešte vyšším stupňom priority – sú to pralesy.

V európskom kontexte predstavujú prežívajúce fragmenty prírodných lesov, ktoré majú určité známky predchádzajúceho antropogénneho pôsobenia, ale zároveň si zachovali aj človekom nenarušený charakter (Falinski, 1986). Vysoká miera biologickej diverzity pralesov spolu s ich vysokým stupňom genetickej premenlivosti, prírodným charakterom a jedinečnosťou sú tými charakteristikami, pre ktoré sú pralesy vysoko hodnotené z hľadiska ochrany lesov a šľachtenia (Parviainen et al., 1999).

Na Slovensku sa nachádza viacero pralesov, ktorých výskyt a štruktúru podrobne popísal prof. Korpel (1989). S ohľadom na jedľu bielu je treba uviesť najmä Dobročský a Badínsky prales na strednom Slovensku, resp. Stučický prales na krajnom východe republiky, v rámci ktorých činí podiel jedle 18-30% (Korpel, 1989). V nadväznosti na pôvodné štúdie prof. Korpela (1958, 1989), ilustrovali Saniga (1999, 1999A) a Saniga a Klimaš (2004) vývoj uvedených pralesov v priebehu nasledujúceho obdobia, a to z hľadiska ich štruktúry, produkčných pomerov a regeneračných procesov ako najvýznamnejších ukazovateľov dynamiky prebiehajúcich zmien.

Alarmujúcim je v tejto súvislosti zistenie znižujúceho sa podielu jedle bielej v Badínskom pralesi zo 65% v roku 1957 na 18% v roku 1987, ako aj v Dobročskom pralesi zo 41,8% v roku 1978 na 29,4% v roku 1998. Početné zastúpenie jedle v Stučici činí 30% a podľa autorov Sanigu a Klimaša (2004) sa výraznejšie nemení.

Príčinou uvedeného poklesu je prirodzené odumieranie jedincov vekovej kategórie okolo 400 rokov, resp. iba pozvoľné zvyšovanie podielu tejto dreveniny prostredníctvom generatívnej reprodukcie, najmä v dôsledku silného poškodzovania mladých jedincov srnčou zverou. Pomalé tempo prirodzenej obnovy jedle v spomenutých pralesoch kontrastuje so zistením Sanigu (1999) o zvyšujúcom sa generatívnom potenciáli jedle bielej na týchto lokalitách.

Z uvedeného vyplýva, že všetky tri pralesovité porasty jedle bielej na Slovensku boli doposiaľ spracované z fytoecologického hľadiska, ako aj s ohľadom na produkčný potenciál a regeneračné procesy. Pri porastovej štruktúre sa zohľadňovalo iba zastúpenie jednotlivých druhov drevín v týchto pralesoch a vekové kategórie jedle bielej.

Podrobnejšia genetická analýza jedincov jedle bielej tu zatiaľ chýba. Výnimkou je iba práca Longauera (2001), ktorý analyzoval genetickú štruktúru 26 populácií jedle bielej v západných Karpatoch a začlenil do experimentu aj populácie z Dobročského pralesa a Stučice. Genetickú štruktúru oboch pralesov odvodenú z izoenzymového polymorfizmu však neposudzuje samostatne, ale v kontexte regionálnych rozdielov a navrhovaných semenárskych oblastí jedle. V rovnakom zmysle možno hodnotiť aj ďalšie práce tohto druhu u nás, ktoré sú zamerané na kvantifikáciu genetickej variability vo vnútri populácií, ako aj medzi jednotlivými populáciami jedle bielej na Slovensku (Matúšová, 1995; Longauer, 1996; Longauer et al., 2003).

V širšom geografickom kontexte sa údaje izoenzymových analýz taktiež využívajú pri rekonštrukcii postglaciálnych migračných ciest jedle na európskom kontinente (Gómory et al., 2004). V európskom merítku sa venuje veľká pozornosť izoenzymovému polymorfizmu jedle bielej najmä v Nemecku (Bergman a Gregorius,

1990, 1993; Konnert a Bergman, 1995), Poľsku (Mejnartowicz, 2004) a Taliansku (Vicario et al., 1995). Paralelne sizoenzýmovými markermi sa však čoraz viac presadzujú vo výskume genetickej štruktúry jedlí – DNA markery. Spomedzi početných štúdií tohto druhu možno uviesť analýzu medzidruhových vzťahov jedlí a vnútrodruhovou variabilitu *Abies alba* (Ziegenhagen et al., 1995; Ziegenhagen a Fladung, 1997) a *A. sachalinensis* (Hayashi et al., 2000) na úrovni chloroplastovej a mitochondriálnej DNA, resp. introgresiu druhov *A. veitchii* a *A. homolepis* na úrovni jadrovej DNA (Isoda et al., 2000). Podľa Bradshawa (2004) je to najmä jadrový genóm, ktorý sa zdá byť vhodný na posúdenie existujúceho genofondu lesných drevín, ktorý bol v minulosti vystavený antropogénnemu ovplyvneniu rôznej intenzity.

Existujú dôvody predpokladať odlišnosť geneticko-populačných parametrov jedle bielej v pralesoch od zodpovedajúcich parametrov autochtónnych populácií jedle, kde sa v rôznej intenzite vykonávajú výchovné zásahy a ťažba.

## 1. 2 RFLP (Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov)

RFLP markery sú kodominantné a prejavujú jednoduchú Mendelistickú dedičnosť (Byrne et al., 1995). Táto vlastnosť z nich robí markery vhodné pre populačné genetické štúdie ako aj pre konštrukciu líniových máp (Burke, 1989; Bradshaw et al., 1994; Byrne et al., 1995).

Polymorfizmus DNA je analyzovaný štiepením DNA reštrikčnými endonukleázami, ktoré štiepia DNA na presných miestach vo vnútri špecifickej sekvencie, zvyčajne 4 – 6 bázových párov (bp).

Štiepenie DNA vzorky reštrikčnými enzýmami poskytuje reprodukovateľný súbor fragmentov. Zmeny v počte a/alebo veľkosti fragmentov môžu byť vyvolané sekvenčnými zmenami, dĺžkovou mutáciou a/alebo bodovou mutáciou v mieste rozštiepenia reštrikčným enzýmom na danom mieste DNA molekuly. Reštrikčné fragmenty dĺžkového polymorfizmu môžu byť detekované analýzou reštrikčných štiepení genomickej DNA prostredníctvom elektroforézy a DNA hybridizácie. Sondy používané pri RFLP analýze môžu byť vytvorené z klonovanej genomickej, komplementárnej (c)DNA, cpDNA a mtDNA fragmentov alebo zo špecifických DNA fragmentov amplifikovaných použitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). V závislosti od použitej sondy, RFLP markery môžu byť využité pre analýzu zmien v cytoplazmatických a jadrových genómoch (Wang a Szmidt, 2001).

## 1. 3 Mikrosatelity

Mikrosatelity sú jednoduché sekvenčné opakovania (SSR – simple sequence repeats) alebo krátke tandemové opakovania (STR – short tandem repeats). V súčasnej dobe sú najpoužívanejšími molekulárnymi markermi (Semagn et al., 2006). Sú typicky neutrálne, kodominantné a využívané ako molekulárna markery, ktoré majú široké využitie v genetike, najmä pri štúdiu príbuzenských vzťahov a v populačnej biológii.

Mikrosatelity sa označujú ako krátke opakovania nukleotidov (SSR), obsahujúce opakujúce sa poradie nukleotidov, tvorené 2 až 6 bázami (Putnová et al., 2003), alebo po sebe opakujúce sa poradie nukleotidov dlhé 1 až 6 báz, rovnomerne rozptýlené v eukaryotickom a prokaryotickom genóme (Field a Wills, 1998; Tóth et al., 2000).

Mikrosatelity sa označujú tiež ako tandemové opakovania krátkych úsekov (1 – 6 bp) s nízkym stupňom repetícií (5 – 100 repetitívnych jednotiek) a náhodnou

distribúciou mikrosatelitných oblastí na genóm (okolo  $10^4$  až  $10^5$ ). Preukazujú kodominantný spôsob dedičnosti, ktorý umožňuje rozlíšenie homozygotov a heterozygotov (Salina *et al.*, 2001). Vysoký stupeň ich dĺžkového polymorfizmu, ktorý je spôsobený rozdielnym počtom repetícií vo vnútri mikrosatelitných oblastí, môže byť ľahko detekovaný prostredníctvom polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).

Predpokladá sa, že väčšina rastlinných genómov je z veľkej časti (viac ako 60 %) zložená z repetitívnych sekvencií (Miksche, 1985; Kubis *et al.*, 1998). Mikrosatelity nie sú obmedzené len na jadrový genóm. Vyskytujú sa v chloroplastoch a sú tiež súčasťou mitochondriálneho genómu ako repetície G/C (Soranzo *et al.*, 1999). Chloroplastové mikrosatelity (SSRs) sú podobné jadrovým, ale opakovaný je vždy len 1 bp, napr.  $(T)_n$  (Provan *et al.*, 1999). Dostupnosť všetkých chloroplastových sekvencií *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.*, 1994) umožnila identifikovať chloroplastové SSRs. Tieto mikrosatelity sa skladajú z repetícií jedného nukleotidu (19 A/T a 1 G/C) (Powel *et al.*, 1995; Vendramin *et al.*, 1996). Väčšina mononukleotidových opakovaní chloroplastového genómu ihličnatých drevín je vysoko polymorfná vo vnútri aj medzi populáciami (Vendramin a Ziegenhagen, 1997; Morgante *et al.*, 1997).

Mikrosatelity ako molekulárne markery sa využívajú pri mapovaní genómov, v populačnej genetike a sú užitočné aj v taxonómii (Oliviera *et al.*, 2006). V súčasnosti sa výskumy zameriavajú na detekciu jadrového genómu. Jadrové mikrosatelitné markery sú vysoko polymorfné, selektívne neutrálne a kodominantné. Zatiaľ nie sú dostupné pre všetky druhy rodu *Abies*. Jadrové mikrosatelitné markery sú vyvinuté pre *Abies alba* a slúžia na analýzu rozsahu jej genetickej diverzity (Cremer *et al.* 2006).

## 2 CIEĽ PRÁCE

Dizertačná práca bola súčasťou projektu: Genetická štruktúra a reprodukčný potenciál jedľových pralesov Slovenska (Vega projekt č. 2/6001/27).

Ciele dizertačnej práce:

- Porovnať genetickú diverzitu jedle bielej (*A. alba* Mill.) v prirodzených podmienkach pralesov Badín, Dobroč, Stučica s genetickou diverzitou príslušných populácií jedle bielej podrobených výchovným zásahom a ťažbe, a to na základe polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov chloroplastovej DNA.
- Porovnať genetickú štruktúru jedle bielej v prirodzených podmienkach pralesov Badín, Dobroč, Stučica s genetickou štruktúrou príslušných populácií jedle bielej podrobených výchovným zásahom a ťažbe, a to na základe polymorfizmu zmnoženia úsekov medzi mikrosatelitmi.
- Na základe získaných experimentálnych údajov porovnať genetickú štruktúru na úrovni dospelých materských stromov a na úrovni regenerantov z voľného opelenia.
- Na základe získaných údajov porovnať pomer haplotypov I a II chloroplastovej DNA na úrovni pralesov a príslušných populácií jedle bielej.



## 3 MATERIÁL A METÓDY

### 3.1 Biologický materiál

Pre štúdium genetickej štruktúry pralesov Slovenska ako materiál sme použili čerstvo vyrašené ihlice dospelých stromov a regenerantov rodu *Abies*.

Analyzovaných bolo 980 jedincov *Abies alba*, z toho 413 jedincov dospelých stromov a 567 jedincov regenerantov. U dospelých stromov sa odber robil z dolnej etáže koruny jedle bielej, ktoré boli od seba vzdialené 30 – 50m a odber regenerantov sa robil náhodným výberom regenerantov, ktoré boli od seba vzdialené 30 až 50 m. Do zahájenia analýz bol biologický materiál uchovaný v hlbokomraziacom boxe pri teplote – 60°C.

Biologický materiál (čerstvo vyrašené ihlice populácie *Abies alba*) pochádza z oblastí Badínskeho, Dobročského pralesa na Strednom Slovensku a pralesa Stučice na východnom Slovensku a z obhospodarovaných jedľových porastov Badín, Dobroč a Stučica, ktoré sú príslušnými oblasťami jedľových pralesov.

V tabuľke 1 sú znázornené počty analyzovaných jedincov jedle bielej (*Abies alba*).

Tabuľka 1. Prehľad počtu analyzovaných jedincov *Abies alba*

	Lokalita	Dospelé stromy	Regeneranty
Pralesy	Badínsky prales	63	93
	Dobročský prales	67	95
	Stučický prales	77	95
Obhospodarované porasty	Badín	52	92
	Dobroč	88	98
	Stučica	66	94

### 3.2 Charakteristika experimentálnych prístupov

#### 3.2.1 Izolácia celkovej DNA z ihlíc

Celkovú DNA sme izolovali z čerstvo vyrašených ihlíc dospelých stromov a regenerantov (semenáčikov) metódou podľa Murray a Thompson (1980).

#### 3.2.2 Podmienky polymerázovej reťazovej reakcie

V dizertačnej práci sme použili dve techniky založené na PCR, a to PCR-RFLP a PCR-ISSR.

*Optimalizácia reakčnej zmesi PCR -RFLP.*

Amplifikovali sme nekódujúci medzigénový úsek cpDNA, t. j. *psbC* (PSII 44 kDa) – *trnS* [tRNA-Ser(UGA)], ktorý sa nachádza v chloroplastovom genóme. Pre amplifikáciu sme použili univerzálne prajmery navrhnuté autorom Demesure *et al.* (1995) pre *psbC* – *trnS* odvodené zo známych sekvencií *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.*, 1994).

**Tabuľka 2.** Charakteristika prajmerov použitých pri PCR – RFLP

Označenie	Technika	Poradie nukleotidov (5' - 3')	Veľkosť PCR produktu (bp)
<i>psbC</i>	PCR – RFLP	GGTCGTGACCAAGAAACCAC	1680
<i>trnS</i>	PCR – RFLP	GGTTCGAATCCCTCTCTCTC	1680

PCR reakcia prebiehala v optimalizovanej 25 µl reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 1 x PCR tlmivý roztok (Promega), 1,5 mmol.dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0,64 mmol.dm<sup>-3</sup> dNTP; 0,8 nmol. dm<sup>-3</sup> jednotlivých prajmerov, 1 U Taq polymerázy (Finnzymes) a 15-20 ng DNA.

Použili sme termocyklér (Primus 25) s nasledovným teplotným profilom: počiatočná denaturácia 4 minúty pri 94 °C, 35 cyklov – 1 minúta pri 93 °C, 1 minúta pri 55 – 58 °C ( v závislosti od použitého páru prajmerov), 2 minúty pri 72 °C a ukončenie syntézy reťazcov 10 minút pri 72 °C.

Na výpočet teploty naviazania prajmera sme použili rovnice pre výpočet teploty rozštiepenia (melting) molekuly DNA prajmera (T<sub>m</sub>). Z hodnoty T<sub>m</sub> sa následne vypočíta teplota naviazania (annealing) prajmera podľa vzťahu T<sub>naviazania</sub> = T<sub>m prajmera</sub> – 4 °C.

Na výpočet T<sub>m</sub> prajmera sa použili dve rovnice:

$$T_m = [(A + T) \times 2 \text{ °C} + (G + C) \times 4 \text{ °C}]$$

kde A, T, G, C sú počty báz v reťazci prajmera ( PCR, Essentials data, Ed, 1995).

*Optimalizácia reakčnej zmesi PCR - ISSR.*

Pre amplifikáciu jadrového genómu sme použili univerzálne prajmery navrhnuté Cremer et al. (2006).

**Tabuľka 3.** Charakteristika prajmerov použitých pri PCR – ISSR

Označenie	Technika	Poradie nukleotidov (5' - 3')	Veľkosť PCR produktu (bp)
SF b4 (DQ218454)	PCR - ISSR	F: GCCTTTGCAACATAATTGG R: TCACAATTGTTATGTGTGTGG	166 - 186
SF b5 (DQ218455)	PCR - ISSR	F: AAAAAGCATCACTTTTCTCG R: AAGAGGAGGGGAGTTACAAG	143 - 155
SF 239 (DQ218460)	PCR - ISSR	F: GCTCTGTGCACTGCCTGT R: TTCGGAGACTAACGCATCTCA	108 - 122
SF 331 (DQ218462)	PCR - ISSR	F: TGTAATGCTTTTCATGGGCAA R: TTACATGGGAAAACCATCCA	106 - 116

PCR reakcia prebiehala v optimalizovanej 25 µl reakčnej zmesi, ktorá obsahovala 1 x PCR tlmivý roztok (Promega), 1,5 mmol.dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mmol.dm<sup>-3</sup> dNTP; 0,2 nmol. dm<sup>-3</sup> jednotlivých prajmerov, 1 U Taq polymerázy (Finnzymes) a 30 ng DNA.

Použili sme termocyklér (Primus 25) s nasledovným teplotným profilom: počiatočná denaturácia 5 minúty pri 94 °C, 35 cyklov – 1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 50 – 60 °C (v závislosti od použitého páru prajmerov), 2 minúty pri 72 °C a ukončenie syntézy reťazcov 7 minút pri 72 °C.

Prítomnosť amplifikovaných fragmentov PCR-RFLP a PCR-ISSR sme overili elektroforeticky. Elektroforéza prebiehala v 1 % agarózovom géli s obsahom EtBr ( 0,5 mg. ml<sup>-1</sup>) a v 1 x TBE tlmivom roztoku pri napätí 100 V. cm<sup>-1</sup>. Veľkosť

amplifikovaných fragmentov sme určili pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 360$  nm porovnaním so štandardným 1 kb markerom (Eurogentec). Na dokumentáciu sme použili fotografické zariadenie UVP BioImaging System.

### 3.2.3 Analýza polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov cpDNA

Na štiepenie amplifikovaných úsekov chloroplastového genómu sme použili reštrikčnú endonukleázu *HaeIII* (Promega) (výsledkom štiepenia sú fragmenty so zarovnanými = tupými koncami).

Reakcie prebiehali za podmienok doporučených výrobcom, zvyčajne 16 hod. pri 37° C cez noc. Priebeh reakcie sa uskutočnil pridaním 6x STOP roztoku (0,25 % BFM; 10 mM EDTA, pH 8,0; 30 % glycerol).

Reštrikčné fragmenty sme delili elektroforeticky v 8 % polyakrylamidovom géle. Elektroforéza prebiehala pri napätí 2,5 V. cm<sup>-1</sup> v 1 x TBE tlmivom roztoku 3hod..

Po ukončení elektroforézy polyakrylamidové géli sme vyfarbili v 1 % roztoku EtBr a vyfotografovali pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 360$  nm.

### 3.2.4 Analýza polymorfizmu mikrosatelitov jadrovej DNA

Amplifikované úseky jadrového genómu pred nanesením na gél sme zdenaturovali pri teplote 95 °C na 5 minút. Po skončení denaturácie, sme vzorky prudko ochladili na ľade.

Mikrosatelity sme delili elektroforeticky na polyakrylamidovom géle. Elektroforéza prebiehala pri napätí 45 V. cm<sup>-1</sup> v 1 x TBE (zohriatom) tlmivom roztoku 5 hod.

Po ukončení elektroforézy polyakrylamidové géli sme vyfarbili metódou podľa Bassam et al. (1991).

### 3.2.5 Vyhodnotenie výsledkov molekulových analýz

Genetickú štruktúru populácií sme hodnotili na základe premenlivosti štyroch mikrosatelitných lokusov.

Genotypy získané molekulovými analýzami boli použité na výpočet nasledujúcich genetických charakteristík:

- Alelických frekvencií.
- Očakávanej ( $H_e$ ) a pozorovanej ( $H_o$ ) heterozygotnosti.
- Genetickej diverzity (efektívneho počtu alel na lokus).
- F – štatistiky.
- Genetickej diferenciacie hodnotené Neiovými genetickými vzdialenosťami (Nei, 1978).

Na interpretáciu matíc genetických vzdialeností medzi populáciami bola použitá analýza UPGMA (Nei, 1978). Všetky údaje boli vyhodnotené v programe POPGENE VERSION 1.31.

### 3.2.6 Štatistické vyhodnotenie haplotypov v populácií jedle

Na vyhodnotenie pomeru haplotypov v populáciách *Abies alba* sme použili chí – kvadrát test. Ide o štatistický odhad pravdepodobnosti zhody alebo rozdielu medzi dvoma súbormi čísel.

Vzorec pre výpočet chí – kvadrátu je:

$$\chi^2 = \sum \frac{(n_e - n_t)^2}{n_t}, \text{ kde}$$

$n_e$  predstavuje experimentálnu hodnotu vyštiepených fenotypových kategórií po hybridizácií,

$n_t$  predstavuje hypotetickú hodnotu.

Vypočítaná hodnota chí – kvadrátu bola na základe stupňa voľnosti porovnávaná s tabuľkovou hodnotou a podľa nej bola určená pravdepodobnosť (P) zhody alebo rozdielov medzi teoretickými a experimentálnymi hodnotami.

Ak  $\chi^2 = 0$ , potom  $P = 1$ . Medzi experimentálnymi a teoretickými hodnotami je zhoda na 100 % - nej hladine významnosti.

$P > 0,05$  preukazná zhoda pri hladine významnosti nad 5 %.

$P < 0,05$  preukazné rozdiely pri hladine významnosti pod 5 %.

### 3 VÝSLEDKY

V našej prezentovanej práci sme porovnávali genetickú diverzitu jedle bielej v prirodzených podmienkach pralesov Badín, Dobroč, Stučica s ich príľahlými obhospodarovanými jedľovými porastami, a to na základe polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov chloroplastovej DNA a na základe polymorfizmu zrnčenia úsekov medzi mikrosatelitmi.

Úsek medzi génmi *psbC* – *trnS* je jedným zo segmentov chloroplastovej DNA, v ktorom bola zistená individuálna variabilita jedincov jedle bielej (Ziegenhagen et al., 1995). Štiepením PCR produktov uvedeného segmentu endonukleázou *Hae III*, sme v našich sledovaných populáciách jedľových pralesov a obhospodarovaných príľahlých jedľových porastov rozlíšili dva haplotypy, t. j. haplotyp A, ktorý obsahoval tri fragmenty o veľkosti 700, 470 a 120 bp a haplotyp B, ktorý obsahoval štyri fragmenty o veľkosti 700, 300, 170 a 120 bp.

Podľa Ziegenhagen et al. (1995) ide o mutáciu typu inercia/delécia, a s tým súvisiacu prítomnosť alebo absenciu reštrikčného miesta pre *Hae III*. V tejto súvislosti bol taktiež vyslovený názor, že uvedená mutácia úseku chloroplastovej DNA zohráva úlohu v evolúcii celého rodu *Abies* (Ziegenhagen a Fladung, 1997). Individuálnu variabilitu na úrovni PCR – RFLP postulujú pre 5 druhov jedlí prirodzene rozšírených v Japonsku aj Tsumura et al. (2000), a to v dôsledku inverzie 42 kb segmentu chloroplastovej DNA zahrňujúceho aj gén *trnS*.

V jedľových pralesoch a v príľahlých obhospodarovaných jedľových porastoch Badín, Dobroč bola prevaha haplotypu A, opačný prípad bol v pralese Stučica, kde bola zaznamenaná prevaha haplotypu B. V ostatných prípadoch zastúpenie haplotypov A a B v jedľových pralesoch Badín, Dobroč a Stučica a v príľahlých porastoch, kde sa uskutočňujú prebierky a ťažobná činnosť boli pomerne vyrovnané. Uvedené zistenie iba čiastočne zapadá do kontextu postulovanej zníženej genetickej diverzity tejto dreviny v strednej Európe, ktorú Larsen (1986) odvodil na základe provenienčných pokusov a pomocou izoenzymových markerov potvrdil na území Slovenska Longauer (1994). Pozorované rozdiely boli iba mierne a iba na jednej z pozorovaných lokalít Badín – obhospodarovaný jedľový porast dosiahla hladinu štatistickej významnosti.

Jedným z dôležitých komponentov genetickej diverzity je očakávaná a pozorovaná heterozygotnosť. V lokalitách jedľových pralesoch Badín a Dobroč sme

zaznamenali vyššiu očakávanú heterozygotnosť v porovnaní s jedľovým pralesom Stužica.

V pralese Badín bola pozorovaná heterozygotnosť 0,110, zatiaľ čo v jedľovom pralese Dobroč bola 0,107. Tieto hodnoty sú v zhode s odpovedajúcimi hodnotami, ktoré uvádza Longauer (2001) pre prirodzené populácie jedle bielej v piatich rozličných regiónoch Slovenska, pokrývajúcich celý areál prirodzeného rozšírenia druhu jedle bielej u nás, a to na základe izoenzymových analýz. Môžeme len uvažovať, či zistená redukovaná heterozygotnosť ( $H_0$ ) pralesa Stužica je typickou vlastnosťou populácie jedle bielej na tejto lokalite, alebo tam pôsobia iné príčiny zodpovedné za zistený pokles pozorovanej heterozygotnosti. V spojitosti s týmto je vhodné sa zmieniť o skutočnosti, že podstatne znížená očakávaná heterozygotnosť bola zistená v populáciách jedle bielej v lokalite Komancza v Poľsku (Mejnartowicz, 1996), ktorá sa nachádza v blízkosti našej hranice, čo sa môže považovať ako indikácia redukovanej diverzity jedle bielej u nás. O nič menšiu pozornosť treba venovať aj zisteniu, že Müller – Starck et al. (1992) zahrňujú jedlu bielu medzi endemity, ktoré zaberajú malé geograficky izolované plochy, ktoré majú tendenciu vykazovať významnú medzipopulačnú diferenciáciu, avšak miernu vnútropopulačnú genetickú variabilitu.

Pri izoenzymových analýzach bola zistená znížená heterozygotnosť v jedľových obhospodarovaných porastoch v porovnaní s jedľovými pralesmi. Tento aspekt je vhodný na ilustráciu v našich sledovaných populáciách Badín a Dobroč zistenej pomocou reštrikčnej analýzy chloroplastovej DNA. Výhovným zásahom a ťažbou v týchto populáciách je taktiež sprevádzané poklesom niektorých alel, čoho výsledkom je zníženie pozorovanej heterozygotnosti. Analýzou 14 populácií smreka na Slovensku, Gömöry (1992) nezistil podstatné rozdiely medzi pôvodnými lesmi a prirodzene regenerovanými porastami. Avšak autor ale pozoroval zníženú genetickú diverzitu v umelo vytvorených porastoch, čo môžeme porovnať s našimi sledovanými populáciami jedľových pralesov ako ich príblyých obhospodarovaných porastov jedle bielej.

Z našich výsledkov je zrejmé, že izoenzymy ako markery sú oveľa viac účinnejšie ako analýza chloroplastovej DNA. Izoenzymy v porovnaní s chloroplastovou DNA sú vhodnejšie na sledovanie a/alebo vyhodnocovanie génového toku v populáciách jedle bielej. PCR – RFLP metóda sa zdá mať obmedzený potenciál v populáciách jedle bielej, to aj napriek široko – rozptylovej distribúcií *psbC* – *trnS/Hae III* jedle bielej v oblastiach Kalabrie, Korziky, Švajčiarska a Poľska (Ziegenhagen et al., 1995). Najväčšou prekážkou je v tomto ohľade nedostatok vhodných markerov na úrovni chloroplastovej DNA.

Možnosti dostatočného experimentálneho overenia tohto ukazovateľa populačnej štruktúry nám ponúka analýza mikrosatelitnej DNA chloroplastového a jadrového genómu jedle bielej. Mikrosatelity totiž vykazujú vyšší stupeň genetickej variability tejto dreviny v porovnaní s rozsahom premenlivosti zisťovanej pomocou reštrikčnej analýzy chloroplastovej DNA (Vendramin a Ziegenhagen, 1997; Vendramin et al., 1999; Parducci et al., 2001).

Nami prezentované výsledky s jadrovými mikrosatelitmi sa iba čiastočne zhodujú s výsledkami Cremer et al. (2006), ktorí podrobili analýze 14 mikrosatelitov vrátane štyroch lokusov, ktoré sme analyzovali v našej práci. Odchýlky sme zaznamenali hlavne pri lokuse SF239 a SF331, kde Cremer et al. (2006) uvádzajú počet alel 5 a 6, zatiaľ čo my sme boli schopný rozlíšiť iba 4 alely v týchto lokusoch. Príčiny môžu byť aj technického charakteru. Vyššie uvedení autori použili totiž automatický sekvenátor pri svojich analýzach. V našom prístupe sme sa obmedzili na sekvenčné polyakrylamidové gély s nižšou rozlišovacou schopnosťou.

Tiež parametre heterozygotnosti boli značne odlišné. V sledovaných lokusoch pri priemernom počte jedincov jedle bielej 24, uvádzajú Cremer et al. (2006) pozorovanú heterozygotnosť 0,654, zatiaľ čo priemerná očakávaná heterozygotnosť ( $H_e$ ) bola 0,645. Nami skúmané počty jedincov činili pri jednotlivých lokusoch 934 – 1002 stromov, pričom pozorovaná heterozygotnosť sa v priemerných hodnotách ( $H_o = 0,323$ ) približovala k údaju uvádzanému Cremerom et al. (2006) a to  $H_o = 0,354$ . Výrazné rozdiely sme však zistili pri očakávanej heterozygotnosti, kde naše zistenia boli podstatne nižšie ( $H_e = 0,389$ ) ako v prípade vyššie uvedených autorov ( $H_e = 0,645$ ). Príčinou môže byť už spomenutý rozdiel v počte zistených alel pri lokusoch SF239 a SF331. Celkove však môžeme konštatovať pomerne dobrú zhodu nami zistenej pozorovanej ( $H_o = 0,323$ ) a očakávanej heterozygotnosti ( $H_e = 0,389$ ) pre populácie jedle bielej u nás.

Vysoký stupeň zhody medzi obidvoma typmi heterozygotnosti uvádzajú pre *Abies fraseri* taktiež Josserand et al. (2006), ktorí však pozorovali mierne zvýšenie pozorovanej heterozygotnosti ( $H_o = 0,67$ ) oproti heterozygotnosti očakávanej ( $H_e = 0,62$ ) pri 13 populáciach uvedeného druhu jedle na severoamerickom kontinente.

Nízka úroveň heterozygotnosti jedle bielej je zrejماً aj z pozorovania s taxonomicky príbuznou jedľou kaukazskou (*Abies normandiana*). Analýzou 5 mikrosatelitných lokusov jadrovej DNA pri štyroch populáciach zahrňujúcich 145 – 160 jedincov zistili Hansen et al. (2005) očakávanú heterozygotnosť v rozpätí 0,669 – 0,837. Príslušné hodnoty činili v priemere  $H_e = 0,904$  a  $H_o = 0,701$ . Autori vyzdvihujú účinnosť týchto nukleárných markerov pri identifikácii jednotlivých klonov semenných sadov jedle kaukazskej, ako aj pri monitorovaní toku génov v nich.

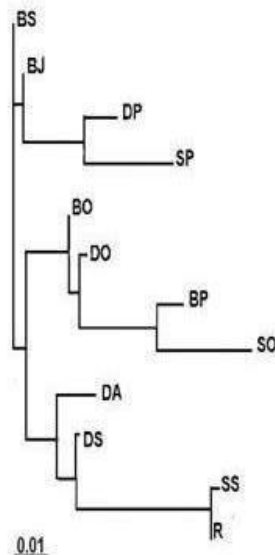
Naše výsledky iba potvrdili odporúčania Cremera et al. (2006), že jadrové mikrosatelity sú vysoko polymorfné, selektívne neutrálne, kodominantné markery, ktoré sú vhodné aj na analýzu malého rozsahu genetickej diverzity. Aj napriek malému počtu sledovaných lokusov nám poskytujú tieto markery možnosť efektívne rozlíšiť stupeň genetickej diverzity medzi pralesmi a ich priľahlými obhospodarovanými porastmi jedle bielej. Polymorfný charakter mikrosatelitov jadrovej DNA potvrdili aj už spomenutí autori Josserand et al. (2006), ktorí analyzovali 14 jadrových mikrosatelitov u *Abies fraseri*.

Z hľadiska pôvodného zámeru dizertačnej práce, t. j. potvrdiť alebo vyvrátiť predpoklad o vyššej genetickej diverzite jedľových pralesov ako ich obhospodarovaných porastov, nie sú výsledky jednoznačné. Tak pri chloroplastovej DNA ako aj pri mikrosatelitnej jadrovej DNA boli počet efektívnych alel a pozorovaná heterozygotnosť spravidla vyššie u dvoch z trojice analyzovaných lokalít. Výnimkou je pozorovaná heterozygotnosť v lokusoch SF239 a SF331, ktoré vykazovali vyššie hodnoty pozorovanej heterozygotnosti pri všetkých troch analyzovaných pralesoch. Lokus SF5 mal však vyššiu hodnotu tohto parametra u obhospodarovaných porastoch, rovnako ako aj lokus SFb4, pri ktorom sa zistila vyššia pozorovaná heterozygotnosť u dvoch obhospodarovaných porastoch. V rovnakom zmysle možno hodnotiť aj heterozygotnosť pozorovanú na úrovni chloroplastovej DNA, ktorá bola vyššia iba pri dvoch jedľových pralesoch. Značne premenlivým bol na úrovni prales – obhospodarované porasty aj počet zistených alel v jednotlivých lokusoch. Interpretáciu týchto zistení komplikuje absencia poznatkov o pôvodnosti, či umelom charaktere obhospodarovaných porastov, nakoľko tejto problematike nie je venovaná dostatočná pozornosť.

Vzhľadom na postulovanú väčšiu genetickú heterogenitu potomstiev u pohlavne sa rozmnožujúcich rastlín by sa dalo očakávať aj vyššia genetická diverzita regenerantov oproti dospelým jedincom jednotlivých populácií. Tento predpoklad sa

naplnil iba v prípade lokusu SFb4, ktorý sa vyznačoval vyššou mierou pozorovanej heterozygotnosti u regenerantov pralesa i obhospodarovaného porastu na lokalite Badín. Na ostatných lokalitách bol tento vzťah pomerne premenlivý. V lokuse SF239 bola pozorovaná heterozygotnosť dokonca nižšia u regenerantov všetkých analyzovaných populácií. Vysoký podiel prirodzeného úhynu regenerantov (semenáčikov) alebo v dôsledku ich prednostného požierania srnčou zverou sa ponúka ako jedno z možných vysvetlení tohto fenoménu.

Posledný aspekt, ktorý vyplynul z porovnávajúcich štúdií sa týka miery genetickej divergencie medzi analyzovanými pralesmi jedle bielej navzájom i medzi jej obhospodarovanými porastami. Zistené údaje naznačujú relatívne nízky stupeň genetickej diferenciácie medzi pralesmi v porovnaní napr. *Abies fraseri* (Josserand et al., 2006), kde sa taktiež použili mikrosatelitné markery jadrovej DNA. Vyjadrené Neiovými genetickými vzdialenosťami sa pralesy v Dobroči a v Stučici ukazujú byť omnoho príbuznejšie (0,0370) ako je ich vzdialenosť k pralesu v Badíne (0,0764; 0,0933). Na úrovni obhospodarovaných porastov sa zdá, že tento vzťah je iný, ako to dokazuje úzka príbuznosť medzi obhospodarovanými porastami jedle bielej v Badíne a Dobroči (0,0045) a ich väčšia vzdialenosť od obhospodarovaného porastu v Stučici (0,0455; 0,0491) (obrázok 1).



**Obrázok 1** Dendrogram znázorňujúci genetické vzdialenosti medzi jednotlivými populáciami

*BP-Badín-prales-dospelé stromy, BJ-Badín-prales-regeneranty, BO-Badín-obhospodarovaný porast-dospelé stromy, BS-Badín-obhospodarovaný porast-regeneranty, DP-Dobroč-prales-dospelé stromy, DS-Dobroč-prales-regeneranty, DO-Dobroč-obhospodarovaný porast-dospelé stromy, DA-Dobroč-obhospodarovaný porast-regeneranty, SP-Stučica-prales-dospelé stromy, SS-Stučica-prales-regeneranty, SO-Stučica-obhospodarovaný porast-dospelé stromy, R-Stučica-obhospodarovaný porast-regeneranty*

## 5 ZÁVER

Relatívna uniformita slovenských populácií jedle bielej postulovaná na úrovni morfológických znakov a enzýmových markerov nezapadá do kontextu pozorovanej variability chloroplastovej DNA (cpDNA) a mikrosatelitnej DNA jadra.

Variabilita medzigénového úseku *psbC* – *trnS* vyústila do zistenia dvoch haplotypov chloroplastovej DNA (cpDNA) jedle bielej, zatiaľ čo variabilita mikrosatelitov jadrovej DNA bola ešte väčšia. Oba vyššie uvedené typy DNA markerov sa ukázali byť vhodnými pre populačno – genetické štúdium jedle bielej. Aj napriek tomu, že ide o obmedzený počet markerov, získané výsledky naznačujú existenciu pomerne rozsiahlej vnútrodruhovej variability tejto dreviny, ako aj značnú genetickú diferenciáciu jej domácich populácií.

Bol to zrejme aj obmedzený počet markerov, ktorý znemožnil presvedčivejšiu ilustráciu zvýšenej genetickej diverzity jedľových pralesov oproti obhospodarovaným porastom jedle bielej. V rámci chloroplastovej DNA (cpDNA) sa nalyzoval iba jeden lokus, avšak odvodené parametre genetickej diverzity ( $n_e$ ,  $H_o$ ) boli spravidla vyššie v pralesoch ako v obhospodarovaných porastoch.

Na úrovni mikrosatelitnej jadrovej DNA sa však zistili aj výsledky, ktoré majú protirečivý charakter. Vyššie počty efektívnych alel sa v prípade pralesov zistili iba v troch zo štvorice analyzovaných lokusov (SFb4, SFb5, SF331), zatiaľ čo vyššia heterozygotnosť sa pozorovala iba v lokuse SF331.

Začlenenie ďalších DNA markerov, respektívne zvýšenie počtu lokusov sa zdá byť nevyhnutným predpokladom pre plnšiu a objektívnejšiu charakterizáciu genetickej variability jedľových pralesov.

## 6 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV V PRAXI

Predložená dizertačná práca prispeje k objektívnejšiemu posúdeniu existujúceho genofondu jedle bielej na Slovensku.

Popri už známych poznatkoch o produkčnom a regeneračnom potenciáli jedľových porastov u nás, predstavujú získané výsledky nový aspekt v mozaike biologických predností týchto porastov. Zistenie porovnateľného rozsahu genetickej diverzity jedľových pralesov a príľahlých k nim obhospodarovaných porastov naznačuje možnosti využitia semenného materiálu aj z obhospodarovaných porastov pri dopestovaní sadbového materiálu pre danú oblasť, čo s prihliadnutím na zákaz akýchkoľvek praktických aktivít v pralesoch nie je bezvýznamné. Získané údaje bude možné použiť ako jeden z argumentov pre ďalšiu ochranu jedľových pralesov u nás.

## 7 VÝBER Z POUŽITEJ LITERATÚRY

BASSAM, B. J. – CAETANO-ANOLLÉS, G. – GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. In *Anal. Biochem.*, vol. 196, 1991, p. 3 – 80.

BERGMANN, F. – GREGORIUS, H. R. – LARSEN, J. B. 1990. Levels of genetics variation in European silver fir (*Abies alba*). Are they related to the species decline? In *Genetica*, vol. 82, 1990, p. 1 – 10.

BERGMANN, F. – GREGORIUS, H. R. 1993. Ecogeographical distribution and thermostability of isocitrate dehydrogenase (IDH) allozymes in European silver fir (*Abies alba*). In *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 21, 1993, p. 597 – 605.



- BRADSHAW, R. H. 2004. Past anthropogenic influence on European forests and some possible genetic consequences. In *For. Ecol. Manage.*, vol. 197, 2004, p. 203 – 212.
- BRADSHAW, R. H. JR. – VILLAR, M. – WASTON, B. D. – OTTO, K. G. – STEWART, S. – STETTLER, R. F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. A genetic linkage map of a hybrid polar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. In *Theor. Appl. Genet.*, vol. 89, 1994, p. 167 – 178.
- BURKE, T. 1989. DNA fingerprinting and RFLP analysis. In *Tree*, vol. 4, 1989, p. 140 – 145.
- BYRNE, M. – MURELL, J. C. – ALLEN, B. – MORAN, G. F. 1995. An integrated genetic linkage map for eucalypt using RFLP, RAPD and isozyme markers. In *Theor. Appl. Genet.*, vol. 91, 1995, p. 869 – 875.
- CREMER, E. – LIEPELT, S. – SEBASTIANI, F. – BUONAMICI, A. – MICHALCZYK, M. – ZIEGENHAGEN, B. – VENDRAMIN, G. G. 2006. Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. In *Molecular Ecology*, vol. 6, 2006, p. 374 – 376.
- DEMESURE, B. – SODZI, N. – PETIT, R. J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. In *Mol. Ecol.*, vol. 4, 1995, p. 129 – 131.
- FALINSKI, J. B. 1986. Vegetation dynamics in temperate lowland primeral forests. In *Ecological studies in Bialowieza forest*, Kluwer Academica Publisher, Dordrecht, 1986, p. 152.
- FIELD, D. – WILLS, C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. In *Biological Sciences*, vol. 263, 1998, p. 209 – 215.
- GÖMÖRY, D. – LONGAUER, R. – LIEPELT, S. – BALLIAN, D. – BRUS, R. – KRAIGHER, H. – PARPAN, I. V. – PARPAN, T. V. – PAULE, L. – STUPAR, V. I. – ZIEGENHAGEN, B. 2004. Variation patterns of mitochondrial DNA of *Abies alba* ill. In structure zone of postglacial migration in Europe. In *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, vol. 73, 2004, p. 203 – 206.
- GÖMÖRY, D. 1992. Effect of stand origin on genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. In *Forest Ecology and Management*, vol. 54 (1 – 4), 1992, p. 215 – 223.
- HANSEN, O. K. – VENDRAMIN, G. G. – SEBASTIANI, F. – EDWARDS, J. 2005. Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross – species amplification in the *Abies* genus. In *Molecular Ecology Notes*, vol. 5, 2005, p. 784 – 787.
- HAYASHI, E. – UBUKATA, M. – IUZUKA, K. – ITAHANA, N. 2000. Genetic differentiation among 19 populations of *Abies sachalinensis* from Hokkaido. In *Forest Genetics*, vol. 7, 2000, p. 31 – 38.
- ISODA, K. – SHIRAISHI, S. – WATANABE, S. – KITAMURA, K. 2000. Molecular evidence of natural hybridization between *Abies veitchii* and *A. homolepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. In *Molecular Ecology*, vol. 9, 2000, p. 1965 – 1974.
- JOSSERAND, S. A. – POTTER, K. M. – JOHNSON, G. – BOWEN, A. – FRAMPTON, J. – NELSON, C. D. 2006. Isolation and characterization of microsatellite markers in fraser fir (*Abies fraseri*). In *Molecular Ecology Notes*, vol. 6, 2006, p. 65 – 68.
- KONNERT, M. – BERGMANN, F. 1995. The geographical distribution og genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. In *Plant systematics and evolution*, vol. 195, 1995, p. 19 – 30.

- KORPEL, Š. 1958. Príspevok k štúdiu pralesov Slovenska na príklade Badínského pralesa. In *Lesnícky časopis*, vol. 4, 1958, p. 349 – 385.
- KORPEL, Š. 1989. *Pralesy Slovenska*. Bratislava: Veda, 1989. 310 s. ISBN 80-224-0031-9.
- KUBIS, S. – SCHMIDT, T. – HESLOP-HARRISON, J. S. 1998. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. In *Ann. Bot.*, vol. 82, 1998, p. 45 – 55.
- LARSEN, J. B. 1986. Das Tannensterben eine neue Hypothese zur Klärung des Hintergrundes dieser rätselhaften Komplexkrankheit der Weißtanne (*Abies alba* Mill.). In *Forstwissenschaftliches Zentralblatt*, vol. 105, 1986, p. 381 – 396.
- LONGAUER, R. 1994. Genetic diversity and effect of stand origin on genetic structure of the European silver fir (in Slovak). Šľachtenie lesných drevín v meniacich sa podmienkach prostredia. Lesnícky výskumný ústav Zvolen, 1994, p. 27 – 35.
- LONGAUER, R. 1996. *Genetic diversity of European silver fir (Abies alba Mill.) in Eastern Europe: dizertačná práca*. Zvolen: Technická univerzita, 1996, s. 154.
- LONGAUER, R. 2001. Genetic variation of European silver fir (*Abies alba* Mill.) in the Western Carpathians. In *Journals of Forest Science*, vol. 47, 2001, p. 429 – 438.
- LONGAUER, R., - PAULE, L. – ANDONOSKI, A. 2003. Genetic diversity of southern populations of *Abies alba* Mill.. In *Forest Genetics*, vol. 10, 2003, p. 1 – 9.
- MATUŠOVÁ, R. 1995. Genetic variation in five populations of silver fir (*Abies alba* Mill.) in Slovakia. In *Biológia*, vol. 50, 1995, p. 53 – 59.
- MEJNARTOWICZ, L. 2004. Genetics analysis of silver fir populationns in the north Carpathian and Sudeten mountains. In *Acta Societatis botanicorum Poloniae*, vol. 73, 2004, p. 285 – 292.
- MIKSCH, J. 1985. Recent advances of biotechnology and forest trees. In *for. Chron.*, vol. 61, 1985, p. 449 – 453.
- MORGANTE, M.- FELICE, N. – VENDRAMIN, G. G. 1997. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halapensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In KARP, A. et al.: *Molecular Tools for Screening Biodiversity – Plant and animals*. New York: Chapman and Hall, 1997, p. 407 – 412.
- MURRAY, M. G. – THOMPSON, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In *Nucl. Acids Res.*, vol. 8, 1980, p. 4321 – 4325.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. In *Genetics*, vol. 89, 1978, p. 583 – 590.
- OLIVIERA, E. J. – PÁDUA, J. G. – ZUCCHI, M. I. – VENCOVSKY, R. – VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. In *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, no. 2, p. 294 – 307.
- PARDUCCI, L. – SZMIDT, A. E. – MADAGHIELE, A. – ANZIDE, M. – VENRAMIN, G. G. 2001. Genetic variation of chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 102, 2001, p. 733 – 740.
- PARVIAINEN, P. G. – LITTLE, D. – DOYLE, M. – O'SULLIVAN, A. – KETTUNEN, M. – KORHONEN, M. 1999. Research in forest reserves and natural forests in European countries – country reports for the cost action E4. In *Forest Reserves Research Network Proceedings*, vol. 16, 1999, p. 304.
- POWELL, W. – MORGANTE, M. – ANDRE, C. – McNICOL, J. W. – MACHRAY, G. C. – DOYLE, J. J. – TINGEY, S. V. – RAFALSKI, J. A. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. In *Curr. Biol.*, vol. 5, 1995, p. 1023 – 1029.

PROVAN, J. – RUSSEL, J. R. – BOOTH, A. – POWELL, W. 1999. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for population and systematic studies in the genus *Hordeum*. In *Mol. Ecol.*, vol. 8, 1999, p. 505 – 511.

PUTNOVÁ, L. – KNOLL, A. – DVOŘÁK, V. – DVOŘÁK, J. 2003. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 48, 2003, p. 307 – 314.

SALINA, E. A. – LEONOVA, I. N. – RÖDER, M. S. – LAIKOVA, L. S. – MAYSTRENKO, O. I. – BUDASHKINA, E. B. – SHUMNI, V. K. 2001. Wheat Microsatellite: The Prospect of Application for Gene Mapping and Analysis of the restructured Genomes. In *Russ. Journal of Plant Physiology*, vol. 48, 2001, p. 377 – 381.

SANIGA, M. – KLIMAŠ, V. 2004. Štruktúra, produkčné procesy a regenerácia pralesa Stuzica v 4. lesnom vegetačnom stupni. In *Acta Facultatis Forestalis Zvolen – Slovakia*, vol. XLVI, 2004, p. 93 – 104.

SANIGA, M. 1999. *Štruktúra, produkčné a regeneračné procesy Dobročského pralesa*. Zvolen: Technická univerzita, 1999. 64 s. ISBN 80-228-0837-7.

SANIGA, M. 1999. Štruktúra, produkčné pomery a regeneračné procesy Badínského pralesa. In *J. For. Sci.*, vol. 45, 1999, p. 121 – 130.

SEMANG, K. – NDJONDJOP, M. N. – CISSOKO, M. 2006. Microsatellites and agronomic traits for assessing genetic relationships among 18 New Rice for Africa (NERICA) varieties. In *African journal of Biotechnology*, vol. 5, 2006, p. 800 – 810.

SORANZO, N. – PROVAN, J. – POWELL, W. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. In *Genome*, vol. 42, 1999, p. 158 – 161.

TÓTH, G. – GÁSPARI, Z. – JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. In *Genome Research*, vol. 10, 2000, p. 967-981.

TSUMURA, Y. – SUYAMA, Y. – YOUSHMURA, K. 2000. Chloroplast DNA inversion polymorphism in population of *Abies* and *Tsuga*. In *Molecular and Biological Evolution*, vol. 17, 2000, p. 1302 – 1312.

VENDRAMIN, G. G. – DEGEN, B. – PETIT, R. J. – ANDIZEI, M. – MADAGHIELE, A. – ZIEGENHAGEN, B. 1999. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. In *Molecular Ecology*, vol. 8, 1999, p. 1117 - 1126.

VENDRAMIN, G. G. – LELLI, L. – ROSSI, P. – MORGANTE, M. 1996. A set primers for the application of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. In *Mol. Ecol.*, vol. 5, 1996, p. 596 – 598.

VENDRAMIN, G. G. – ZIEGENHAGEN, B. 1997. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. In *Genome*, vol. 40, 1997, p. 857 – 864.

VICARIO, F. – VENDRAMIN, G. G. – ROSSI, P. – LIÓ, P. – GIANNINI, R. 1995. Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 90, 1995, p. 1012 – 1018.

WAKASUGI, T. – TSUDZUKI, J. – ITO, S. – SHIBATA, M. – SIGIURA, M. 1994. A physical map and clone bank of the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome. In *Plant Mol. Bio. Rep.*, vol. 12, 1994, p. 227 – 241.

WANG, X. R. – SZMIDT, A. E. 2001. Molecular markers in population genetics of forest tree. In *Scand. J. For. Res.*, vol. 16, 2001, p. 199- 220.

ZIEGENHAGEN, B. – FLADUNG, M. 1997. Variation in the *psbC* gene region of gymnosperms and angiosperms as detected by a single restriction site polymorphism. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 94, 1997, p. 1065 – 1071.

ZIEGENHAGEN, B. – KORMUŤÁK, A. – SCHAUERTE, M. – SCHOLZ, F. 1995. Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.). In *For. Genet.*, vol. 2, 1995, p. 99 – 107.

## **8 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S PROBLEMATIKOU**

### **Pôvodné vedecké práce uverejnené v časopisoch**

KORMUŤÁK, A. – KÁDASI HORÁKOVÁ, M. – GÖMÖRY, D. 2008. Chloroplast DNA variation in silver fir primeval forests in Slovakia. In *Phytopedon*, vol. 7, 2008, p. 138 – 142.

KORMUŤÁK, A. – KÁDASI HORÁKOVÁ, M. – VOOKOVÁ, B. - GÖMÖRY, D. 2008. Genetic structure of silver fir primeval forests in Slovakia. In *Forestry Journal*, vol. 54, 2008, p. 37 – 42.

### **Zoznam abstraktov z konferencií**

KÁDASI HORÁKOVÁ, M. – KORMUŤÁK, A. – GÖMÖRY, D. 2008. Porovnanie diverzity jedľových pralesov a obhospodarovaných jedľových lesov pomocou PCR – RFLP chloroplastovej DNA. In *Zborník abstraktov z medzinárodnej vedeckej konferencie: „ Dendrologické dni v Arboréte Mlyňany SAV 2008.* Vieska nad Žitavou : Arborétum Mlyňany SAV.p. 85. ISBN 978-80-970028-8-6.

KORMUŤÁK, A. – KÁDASI HORÁKOVÁ, M. – VOOKOVÁ, B. - GÖMÖRY, D. 2008. Genetic structure of silver fir primeval forests. In *Lesy a lesníctvo – riziká, výzvy, riešenia, Zborník abstraktov: Zvolen: Národné lesnícke centrum 2. – 4. september 2008,* s. 60 – 61. ISBN 978-80-8093-054-7.