

Zmienność genetyczna jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) zachowanej na terenie Nadleśnictwa Katowice

Genetic variation of silver fir (*Abies alba* Mill.) preserved in the Katowice Forest District

Katarzyna Masternak^{1*}, Barbara Niebrzydowska², Katarzyna Głębocka¹

¹Institut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, ²Nadleśnictwo Katowice, ul. Kijowska 37b, 40-754 Katowice

*Tel. +48 81 4456675, e-mail: katarzyna.masternak@up.lublin.pl

Abstract. Environmental pollution greatly decreases a tree's health and results in dieback of forest stands. Due to increasing industrial activity in the 20th century, silver fir became almost totally extinct in the Katowice Forest District. Only 19 individuals have survived to this day. The aim of the present study was to analyze growth characteristics and polymorphisms of 25 inter-simple sequence repeats (ISSR) of the preserved trees.

The mean height of the inventoried silver firs was 19 m with a diameter at breast height (DBH) of 29 cm. Flowers were observed on few trees only. However, all trees were of high vitality without signs of fungal pathogen infections or insect outbreaks. Parameters of genetic variability, including mean effective number of alleles per locus and expected heterozygosity, were higher than described in the literature so far and they amounted to 1,659, 0,396 respectively.

Keywords: genetic diversity, ISSR markers, growth traits, industrial pollution

1. Wstęp i cel

Od połowy XVII do połowy XIX wieku udział jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) na terenie Górnego Śląska obniżył się z 41 do 32% (Nyrek 1975), czego główną przyczyną było stosowanie zrębowego sposobu zagospodarowania lasu prowadzącego do powstawania monokulturowych drzewostanów sosnowych i świerkowych oraz tzw. „lasu klas wieku”. W połowie XIX wieku zanotowano na Śląsku zamieranie z nieznanymi przyczynami gatunku *Abies alba* (Korpel, Vinš 1965). Dalszy spadek udziału jodły, obserwowany od połowy XIX wieku, był efektem znacznego zanieczyszczenia środowiska, które doprowadziło do rozwoju choroby spiralnej (Bernadzki 1983; Zientarski et al. 1994; Jaworski 1995). W efekcie długo trwających zmian w środowisku lasy w zasięgu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Katowicach składają się obecnie głównie z gatunków iglastych (78%), z czego jedynie 1,3% stanowi jodła. Całkowity udział gatunku *Abies alba* w Lasach Państwowych wynosi natomiast 2,2% (Wyniki aktualizacji stanu powierzchni leśnej 2013).

W ostatnich latach jodła dość licznie pojawia się na terenie Nadleśnictwa Katowice. Wprowadzana jest sukcesywnie od 2007 roku na nowo zakładane uprawy, tam gdzie są do

tęgo odpowiednie warunki siedliskowe i świetlne. Źródłem pozyskania leśnego materiału rozmnożeniowego są drzewostany kategorii I – ze zidentyfikowanego źródła – gospodarcze drzewostany nasienne (GDN), zlokalizowane w Nadleśnictwie Kłobuck (654. region pochodzenia), oraz w niewielkim stopniu także z GDN z Nadleśnictwa Limanowa (851. region pochodzenia). Najkorzystniejsze byłoby zapewne odnawianie materiałem roślinnym pochodzenia rodzimego, który jest najlepiej dostosowany do lokalnych warunków środowiska. Trwałość ekosystemów leśnych jest bowiem wynikiem ich zdolności adaptacyjnej uwarunkowanej genetycznie i przekazywanej następnym pokoleniom (Degen 1995). Ze względu na rozproszone występowanie jodły na obszarze Nadleśnictwa Katowice zachowane genotypy nie mogą posłużyć jako źródło pozyskania leśnego materiału rozmnożeniowego służącego do odtworzenia populacji. Nie jest bowiem możliwe zachowanie ich zasobów genowych w efekcie krzyżowania. W takim przypadku niezbędne jest utworzenie „klonowych archiwów genetycznych” lub „zachowawczych plantacji nasiennych”, które poprzez zgromadzenie drzew na jednym obszarze, umożliwią ich włączenie do procesów reprodukcyjnych poprzez zapylenie krzyżowe (Barzdajn 2000). Powrót jodły do śląskich lasów można również oprzeć

Wpłynęło: 26.09.2014 r., recenzowano: 27.10.2014 r., zaakceptowano: 18.05.2015 r.

na introdukcji proveniencji obcych. W tym przypadku sprowadzane populacje powinny odzwierciedlać zmienność populacji lokalnych, a w drzewostanach gospodarczych lepiej spełniać zadania hodowlane (Barzdajn 2006).

Celem podjętych badań jest inwentaryzacja jodły, która została zachowana na terenie Nadleśnictwa Katowice, a także określenie jej parametrów wzrostowych (wysokości, pierśnicy) oraz zmienności genetycznej przy zastosowaniu markerów ISSR. Efektem podjętych badań będzie ocena genotypu zachowanych drzew, by mogły posłużyć w przyszłości do introdukcji gatunku na tym obszarze.

2. Materiały i metody

Materiał badawczy

Wykonano inwentaryzację oraz pomierzono cechy wzrostowe jodeł zachowanych na obszarze Nadleśnictwa Katowice. Wysokość pomierzono za pomocą wysokościomierza Suunto z dokładnością do 1 m, a pierśnicę (na wysokości 1,3 m) średnicomierzem z dokładnością do 0,5 cm. Oceniono stopień porażenia przez owady i grzyby oraz obecność szyszek na poszczególnych drzewach. Lokalizację oraz charakterystykę jodeł z Nadleśnictwa Katowice przedstawiono w tabeli 1.

Analiza loci międzymikrosatelitarnych (ISSR)

Ekstrakcję genomowego DNA wykonano za pomocą metody podanej przez Rogersa i Bendicha (1988). Każdą reakcję amplifikacji wykonano w mieszaninie o objętości 10 μ l zawierającej wodę, 10 \times stężony bufor reakcyjny, 31 mM chlorku magnezu, 40 mM dNTP, 50 mM startera, 0,46 U Taq polimerazy i 40 ng genomowego DNA. Sekwencję użytych starterów zamieszczono w tabeli 2. Reakcje PCR wykonywano w termocyklerze „T1” firmy Biometra zaprogramowanym na 38 cykli amplifikacji, na które składała się denaturacja (95°C – 30 sekund), przyłączanie starterów (45 sekund w trzech pierwszych cyklach w temperaturze 54°C, w trzech kolejnych 53°C, w pozostałych 52°C) i powielanie DNA (72°C – 2 minuty). Wymienione cykle poprzedzała 7-minutowa denaturacja wstępna w temperaturze 95°C, natomiast kończyła 7-minutowa elongacja powstałych produktów w temperaturze 72°C. Po każdej reakcji przeprowadzano elektroforezę w 2% żelu agarozowym, a uzyskane wyniki wizualizowano w świetle UV i archiwizowano.

Analiza danych

Obliczono frekwencję poszczególnych alleli oraz średnią liczbę alleli w locus (N_a). Oszacowano efektywną liczbę al-

Tabela 1. Lokalizacja jodeł zachowanych na terenie Nadleśnictwa Katowice
Table 1. Location of firs preserved within the area of the Forest District Katowice

Nr drzewa Tree No.	Leśnictwo Forest Division	Oddział Compartment	Siedliskowy typ lasu Forest habitat type	Współrzędne geograficzne Geographical coordinates	
				Długość Longitude	Szerokość Latitude
1	Murcki	123b	Lw	19,048676	50,179996
2		97d	LMśw	19,064944	50,186631
3		96i	Lw	19,067455	50,184023
4		95a	LMw	19,071771	50,190207
5	Czułów	178h	LMw	19,046023	50,161480
6	Podlesie	107j	LMśw	19,014022	50,174835
7	Wesoła	41g	LMśw	19,099448	50,219373
8	Śmiłowice	79Ak	LMw	18,869625	50,211539
9		87Ag	LMw	18,880393	50,207601
10		87Am	LMśw	18,880679	50,206542
11	Górki	163Ac	LMw	19,115206	50,134240
12		163Bc	LMw	19,111439	50,113409
13		168Bg	LMśw	19,116242	50,099856
14		159g	LMśw	19,135601	50,117411
15	Panewnik	38k	BMśw	18,905517	50,238181
16		38k	BMśw	18,905234	50,238061
17		38k	BMśw	18,905273	50,238116
18		38k	BMśw	18,905283	50,238073
19		38k	BMśw	18,909523	50,238076

leli w locus (N_e), opisującą jaka część alleli zostanie przekazana kolejnemu pokoleniu (Bergmann, Gregorius 1979) oraz heterozygotyczność oczekiwaną (H_e), czyli taką jaka istniałaby w populacji będącej w stanie równowagi genetycznej Hardy’ego-Weinberga (Nei, Roychoudry 1974). Przy zastosowaniu programu NTSys ver. 5,1 (Rohlf 2001) obliczono podobieństwo genetyczne pomiędzy poszczególnymi osobnikami, a na tej podstawie wykonano drzewo dystansu genetycznego.

Tabela 2. Sekwencja zastosowanych starterów ISSR oraz liczba generowanych przez nie produktów

Table 2. Sequence of ISSR markers and the number of produced amplification products

Lp. No.	Sekwencja Sequence (5'-->3')	Liczba generowanych produktów Number of amplification products	Liczba produktów polimorficznych Number of polymorphic products
1	(AG) ₈ G	9	5
2	(GT) ₈ C	7	5
3	(AC) ₈ G	7	6
4	(GA) ₈ C	7	4
5	(GA) ₈ YC	10	9
6	(CA) ₈ G	4	2
7	(CA) ₈ GC	7	6
8	(TC) ₈ G	7	7
9	(TG) ₈ G	4	4
10	(AG) ₈ YT	7	3
11	(AC) ₈ C	5	3
12	(AG) ₇ A	9	7
13	(CA) ₈ A	9	3
14	(TC) ₉ A	5	4
15	(CT) ₉ T	7	5
16	(CTC) ₆ G	6	5
17	(ACC) ₆ T	4	2
18	(AC) ₉ G	5	4
19	(ATG) ₆ G	3	2
20	(ATG) ₈ C	5	2
21	(ATG) ₈ AC	5	3
22	(ATG) ₈ T	2	0
23	(AC) ₈ T	11	8
24	(AC) ₈ G	12	9
25	(AC) _{8Y} G	8	7

Y – oznacza T lub C

Y – specifies T or C

3. Wyniki

Najwyższą liczbę jodeł zinwentaryzowano na terenie leśnictwa Panewnik, natomiast najniższą w leśnictwach Czulów, Podlesie i Wesoła. Drzewa zachowane na terenie Nadleśnictwa Katowice charakteryzowały się średnią wysokością wynoszącą 19 m oraz pierśnicą równą 29 cm. Najniższe wartości cech wzrostowych zanotowano dla drzew: 17 – Panewnik oraz 18 – Panewnik. Osobniki o najwyższych wartościach wysokości oraz pierśnicy były zlokalizowane w leśnictwach Murcki (nr 2) i Czulów (nr 5). Wszystkie jodły charakteryzowały się wysoką żywotnością, brakiem porażenia przez patogeny grzybowe oraz brakiem oznak żerowania owadów. Większość drzew nie obradzała. Obecność szyszek zanotowano na drzewach zlokalizowanych w leśnictwach Czulów (nr 5), Podlesie (nr 6) oraz Śmiłowice (nr 9) (tab. 3).

Najwyższą wartością efektywnej liczby alleli w locus (N_e) oraz heterozygotyczności oczekiwanej (H_e) charakteryzowała się jodła z numerem 13 – Górki. Najniższe wartości wymienionych parametrów zanotowano dla drzew 9 – Śmiłowice oraz 17 – Panewnik. Średnia liczba alleli w locus (N_a) dla każdego drzewa wyniosła 1,000. Średnia efektywna liczba alleli badanej populacji 19 jodeł wyniosła 1,659, natomiast heterozygotyczność oczekiwana – 0,396.

Średni dystans genetyczny wyniósł 0,163. Nie zaobserwowano znacznego podobieństwa genetycznego jodeł pochodzących z tych samych leśnictw. Drzewa z odległych obszarów Nadleśnictwa Katowice, np. 6 – Podlesie i 14 – Górki są bowiem skupione w jednej grupie na dendrogramie. Z kolei duży dystans genetyczny zanotowano pomiędzy jodłami zlokalizowanymi w jednym leśnictwie, np. 1 – Murcki i 2 – Murcki. Najbardziej odległe od pozostałych jodeł okazało się drzewo z numerem 13 – Górki, które na dendrogramie utworzyło osobne skupienie (ryc. 1).

4. Dyskusja

Tworzenie monokulturowych drzewostanów świerkowych, stosowanie zrębowego sposobu zagospodarowania lasu oraz znaczne zanieczyszczenie powietrza doprowadziło do obniżenia udziału jodły pospolitej w Polsce, który obecnie szacuje się na 2,5% (Wyniki aktualizacji stanu powierzchni leśnej 2013). W Nadleśnictwie Katowice zachowało się jedynie 19 drzew. Źródło ich pochodzenia nie jest znane. Przypuszcza się, że zachowane osobniki mają co najmniej 50–65 lat. Przetrzywały zatem okres największych zagrożeń imisjami przemysłowymi, który przypadają na lata 80.

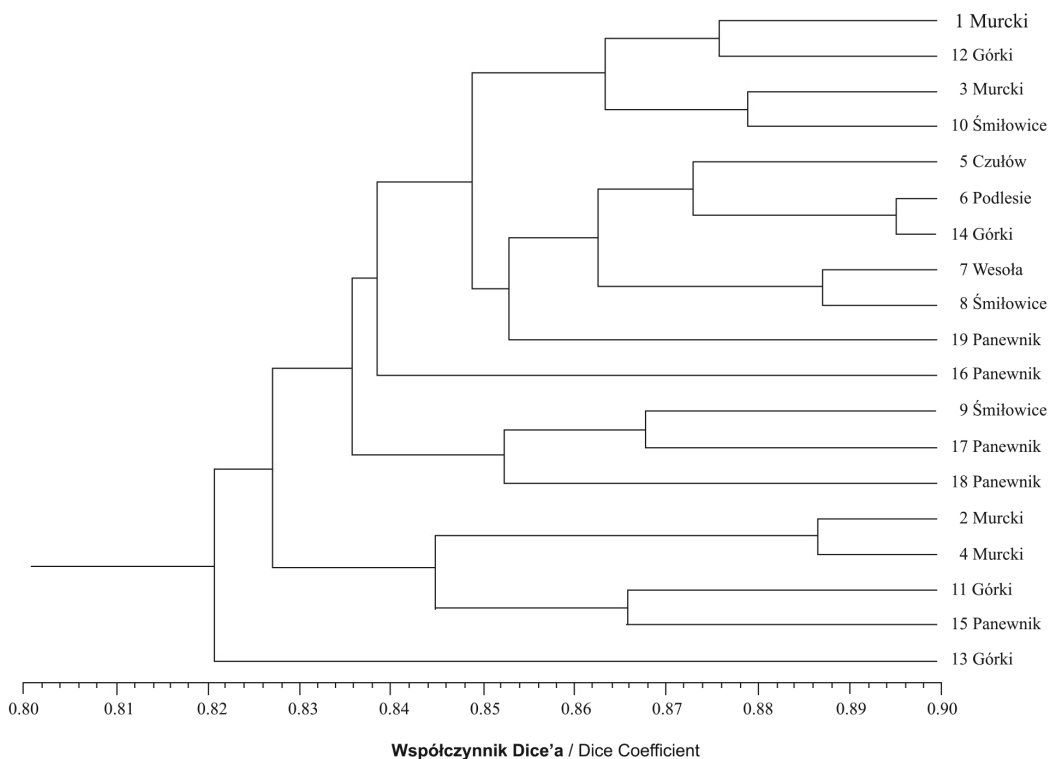
W pracy przedstawiono wyniki inwentaryzacji zachowanych jodeł oraz analizy ich zmienności genetycznej przy użyciu techniki ISSR. Metoda została opracowana przez Ziętkiewicz i in. (1994). Początkowo badania z jej wykorzystaniem dotyczyły gatunków roślin uprawnych (Wolfe, Liston 1998), jednak szybko została zaadoptowana do analiz w dziedzinie genetyki populacji (Qian et al. 2001; Smissen et al. 2003; Pérez-Collazos, Catalán 2007; Dantas et al. 2015). Mimo tego w dalszym ciągu istnieje niewiele

Tabela 3. Cechy wzrostowe oraz parametry zmienności genetycznej jodeł zachowanych na obszarze Nadleśnictwa Katowice
 Table 3. Growth characteristics and genetic variability parameters of firs preserved within the area of the Forest District Katowice

Numer drzewa Tree No.	Leśnictwo Forest Division	Wysokość Height [m]	Pierśnica DBH [cm]	Obecność szyszek Presence of cones	N_e	H_e
1	Murcki	22	34		1,645	0,392
2		31	65		1,634	0,388
3		26	47		1,667	0,400
4		28	42		1,645	0,392
5	Czułów	35	52	tak / yes	1,706	0,414
6	Podlesie	21	32	tak / yes	1,592	0,372
7	Wesoła	12	28		1,613	0,380
8	Śmiłowice	18	28		1,634	0,388
9		28	38	tak / yes	1,524	0,344
10		23	39		1,626	0,385
11	Górki	17	30		1,639	0,390
12		24	31		1,730	0,422
13		15	23		1,869	0,465
14		15	17		1,701	0,412
15	Panewnik	14	20		1,660	0,398
16		7	8		1,718	0,418
17		6	7		1,587	0,370
18		5,5	6		1,695	0,410
19		11	10		1,639	0,390
Średnia / Mean		19	29		1,659	0,396

N_e – efektywna liczba alleli w locus, H_e – heterozygotyczność oczekiwana

N_e – effective number of alleles at locus, H_e – expected heterozygosity



Rycina 1. Dendrogram podobieństwa genetycznego analizowanych jodeł
 Figure 1. Dendrogram of genetic similarity among tested firs

badań skupiających się na ocenie zróżnicowania genetycznego populacji różnych gatunków drzew leśnych za pomocą markerów ISSR (Tani et al. 1998; Mehes et al. 2007; Rubio-Moraga et al. 2012), w tym nieliczne dotyczące gatunków z rodzaju *Abies* (Tsumura et al. 1996; Woo et al. 2008). W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono wyniki zróżnicowania genetycznego jodły pospolitej uzyskane na podstawie metody ISSR. Należy podkreślić, że technika ta łączy w sobie prostotę markerów RAPD, umożliwiając przy tym uzyskanie większej ilości produktów podczas pojedynczej reakcji. Do amplifikacji stosuje się jeden starter, komplementarny do sekwencji mikrosatelitarnej. Sekwencje te występują powszechnie w genomach eukariotycznych (Tautz, Renz 1984; Fang, Roose 1997), dlatego w trakcie reakcji amplifikacji można uzyskać nawet kilkadziesiąt oflanowanych mikrosatelitami produktów, zazwyczaj więcej niż w reakcji ze starterami losowymi. Dzięki temu w krótszym czasie i przy mniejszym zużyciu odczynników uzyskuje się wyniki, które odzwierciedlają adekwatny poziom zmienności populacji. Ponadto startery ISSR są dłuższe niż startery RAPD, a to wymusza zastosowanie wyższej temperatury hybrydyzacji i powoduje, że przyłączają się one bardziej swoiście do matrycy. Efektem jest większa powtarzalność metody. Wadą tej techniki jest dominujący charakter uzyskanych produktów. Jednak w literaturze można spotkać wiele prac dotyczących zmienności genetycznej drzew leśnych przy użyciu markerów dominujących (Nkongolo et al. 2005; Vicario et al. 1995).

Zachowane w Nadleśnictwie Katowice jodły charakteryzowały się wysokim poziomem zmienności genetycznej. Ze względu na brak informacji na temat polimorfizmu loci międzymikrosatelitarnych (ISSR) gatunku *Abies alba* nie jest możliwe skonfrontowanie uzyskanych badań z wynikami otrzymanymi przez innych autorów. Natomiast biorąc pod uwagę wyniki analiz izoenzymowych tego gatunku, wyraźnie zaznacza się wyższa zmienność genetyczna jodeł z Nadleśnictwa Katowice w porównaniu z populacją ze Słowacji ($H_e=0,210-0,250$) (Kormutak et al. 2008), Włoch ($H_e=0,129-0,180$) (Parducci et al. 1996), Francji ($H_e=0,139-0,161$) (Fady et al. 1999) oraz Bałkanów ($H_e=0,119-0,184$) (Ballian et al. 2012). Na podstawie markerów izoenzymowych stwierdzono również, że oprócz niższej heterozygotyczności oczekiwanej, populacje jodeł z Włoch, Bułgarii, Macedonii, Rumunii oraz wschodnich i południowych Karpat charakteryzują się także niższą wartością efektywnej liczby alleli w locus ($N_e=1,114-1,03$, $H_e=0,102-0,188$) (Longauer et al. 2003). Zbliżone wartości heterozygotyczności oczekiwanej uzyskał natomiast Mejnartowicz (1980) ($H_e=0,416$) analizujący jedynie dwa loci izoenzymowe u polskich populacji jodły pospolitej.

Badania innych gatunków drzew leśnych markerami ISSR również wykazały ich niższą zmienność w porównaniu z polimorfizmem jodeł z terenu Nadleśnictwa Katowice. Niższymi wartościami parametrów efektywnej liczby alleli w locus i heterozygotyczności obserwowanej charakteryzowały się m.in. populacje jodły białokorej ($H_e=0,240$) (Woo et al. 2008), sosny czarnej ($N_e=1,228-1,410$, $H_e=0,123-0,242$) (Rubio

-Moraga 2012), jałowca fenickiego ($H_e=0,101-0,146$) (Meloni et al. 2006) czy krzyżówek świerka czarnego i świerka czerwonego ($N_e=1,22-1,34$) (Narendrula, Nkongolo 2012).

Na podstawie uzyskanego dystansu genetycznego nie można jednoznacznie stwierdzić, czy analizowane osobniki należą do jednej proveniencji gatunku *Abies alba*. Taką przynależność będzie można jedynie wykazać poprzez porównanie większej liczby pochodzeń z różnych regionów występowania w Polsce. Ponadto ze względu na brak informacji na temat pochodzenia zachowanych drzew istnieje duże prawdopodobieństwo, że stanowią one potomstwo rosnących tam niegdyś populacji jodły, a jako pojedynczo zachowane osobniki nie odzwierciedlają w pełni zróżnicowania pomiędzy tymi populacjami. Może to tłumaczyć brak uzyskanej zależności pomiędzy dystansem genetycznym a geograficznym.

Do prezentowanych odniesień do wyników badań innych autorów należy podchodzić ostrożnie. W trakcie interpretacji najbardziej prawidłowe i niebudzące zastrzeżeń jest bowiem porównanie uzyskanych parametrów zmienności genetycznej z innymi wynikami otrzymanymi dla tych samych gatunków oraz za pomocą tych samych markerów genetycznych. Jednak w literaturze dotychczas nie zanotowano informacji na temat zmienności genetycznej jodły pospolitej uzyskanej za pomocą techniki ISSR. Prezentowane odniesienie do wyników prac nad innymi systemami markerowymi u jodły pospolitej oraz do poziomu zmienności genetycznej innych gatunków drzew leśnych ma na celu wskazanie, że jodła zachowana na terenie Nadleśnictwa Katowice charakteryzuje się wysoką zmiennością genetyczną, która jest niezwykle cenna, warunkuje bowiem potencjał adaptacyjny drzew (Gregorius 1989; Hattemer et al. 1993). Zachowane na terenie nadleśnictwa jodły są najprawdopodobniej potomstwem proveniencji rodzimych, które przetrwały selekcję naturalną oraz selekcję przez czynniki pochodzenia antropogenicznego. Stanowią więc cenne genotypy, które mogą stać się materiałem badawczym dostarczającym informacji na temat odporności drzew na zanieczyszczenia przemysłowe oraz zależności tej cechy od zróżnicowania genetycznego drzew. Takie korelacje odkryto dotychczas na podstawie nielicznych markerów biochemicznych. Badania drzewostanów znajdujących się na obszarze zanieczyszczeń wykazują m.in. niższą zmienność izoenzymową u osobników z widocznymi uszkodzeniami w porównaniu z drzewami zdrowymi (Ziegenhagen et al. 1997). Udowodniono również korelację pomiędzy stopniem defoliacji jodeł a frekwencją genotypów i alleli w loci izoenzymowych biorących udział w szlakach metabolicznych (Konnert 1993). Polimorfizm genetyczny markerów izoenzymowych koreluje także z odpornością na stres środowiskowy u świerka (Bergmann, Scholz 1985) i buka (Müller-Starck 1989; Brus 1996). Przytoczone wyniki wskazują, że tego typu korelacje są możliwe do znalezienia zarówno na poziomie szlaków metabolicznych, jak i kwasu dezoksyrybonukleinowego, bowiem zmienność białkowa jest uwarunkowana zmiennością DNA.

XIX-wieczny sposób gospodarowania w lasach nie przewidywał ujmowania jodły w składach gatunkowych prowa-

dzonych odnowień, wskutek czego samoistne odtwarzanie się lokalnych populacji nie jest możliwe (Barzdajn 2012). Średnia liczba drzew na jednym stanowisku w Sudetach to około 15 sztuk, przy czym 75% obszarów liczy mniej niż 10 drzew (Filipiak, Barzdajn 2004). W samym Nadleśnictwie Katowice jest jedynie 19 osobników jodły. W celu odtworzenia gatunku tworzy się bazy nasienne, głównie w postaci archiwów klonowych, które obejmują materiał genetyczny pozyskany z rozproszonych drzew. Według „Programu zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew na lata 2011-2035” (2011) na terenie RDLP Katowice powierzchnia jodłowych wyselekcjonowanych (wyłączonych) drzewostanów nasiennych zostanie zwiększona z 76,69 ha do 96,69 ha, upraw pochodnych z 75,19 ha do 195,19 ha, a gospodarczych drzewostanów nasiennych obniży się z 584,05 ha do 560 ha. Liczba drzew matecznych zostanie zwiększona z 30 do 70 sztuk. Planowane jest również założenie 60 ha upraw zachowawczych, 5 ha plantacji nasiennych oraz 5 ha plantacyjnych upraw nasiennych, których obecnie na terenie RDLP Katowice nie ma. Obiekty te będą stanowiły bazę nasienną służącą podwyższeniu udziału jodły na tym obszarze.

Z wykonanych badań wynika, że drzewa zachowane na terenie Nadleśnictwa Katowice charakteryzują się wysokim poziomem zmienności genetycznej. Stanowią zatem cenne źródło drzew zachowawczych, służących do utworzenia plantacji klonowych. Nasiona uzyskane z takich plantacji mogłyby zostać wykorzystane w trakcie zakładania upraw na tym terenie. Za wprowadzaniem jodły do składu gatunkowego drzewostanów w Nadleśnictwie Katowice przemawia fakt, że jodła na tym terenie była obecna do lat pięćdziesiątych XX wieku. Obecność właściwych dla jodły siedlisk oraz ograniczenie zanieczyszczeń przemysłowych mogą sprzyjać powrotowi tak cennego gatunku drzewa do śląskich lasów.

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów.

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowania Panom Leśniczemu Nadleśnictwa Katowice za pomoc w inwentaryzacji jodeł oraz zbiorze materiału biologicznego do analiz genetycznych.

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako część badań statutowych (RGH/MN/5).

Literatura

- Ballian D., Boguni F., Bajrij M., Kajba D., Kraigher H., Konnert M. 2012. The genetic population study of Balkan Silver Fir (*Abies alba* Mill.). *Periodicum Biologorum* 114(1): 55–65.
- Barzdajn W. 2000. Strategia restytucji jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Sudetach. *Sylwan* 144(2): 63–77.
- Barzdajn W. 2006. Restytucja jodły pospolitej w Sudetach. Dotychczasowe osiągnięcia. *Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej* 1(11): 69–84.
- Barzdajn W., Kowalkowski W. 2012. Restytucja jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Sudetach. Charakterystyka drzew zachowawczych. *Forestry Letters* 103: 7–16.
- Bergmann F., Gregorius H.R. 1979. Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*), w: Proceedings of the Conference on Biochemical Genetics of Forest Trees (red. F. Rudin) Umea, 99–107.
- Bergmann F., Scholz F. 1985. Effects of selection pressure by SO₂ pollution on genetic structures of Norway spruce (*Picea abies*), w: Population genetics in forestry. Lecture notes in biomatematics (red. H. R. Gregorius). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 267–275.
- Bernadzki E. 1983. Zamieranie jodły w granicach naturalnego zasięgu, w: Jodła pospolita *Abies alba* Mill. Nasze drzewa leśne (red. S. Białobok). PWN, Warszawa-Poznań, 483–501.
- Brus R. 1996. Vpliv onesnazevanja ozracja na genetsko strukturo bukovih populacij v Sloveniji. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 49: 67–103.
- Degen B. 1995. Zum Einsatz der Systemanalyse zur Beurteilung der Stabilität und Anpassungsfähigkeit von Waldökosystem, w: Klimawirkungsforschungen Geschäftsbereich des BML (ed. H.J. Weigel, D. Dämmgen, F. Scholz). Angewandte Wissenschaft, Landwirtschaftsverlag, Münster, 442: 167–177.
- Dantas L.G., Esposito T., Barbarosa de Sousa A.C., Félix L., Amorim L.L.B., Benko-Iseppon A.M., Batalha-Filho H., Pedrosa-Harand A. 2015. Low genetic diversity and high differentiation among relict populations of the neotropical gymnosperm *Podocarpus sellowii* (Klotz.) in the Atlantic Forest. *Genetica* 143: 21–30. DOI: 10.1007/s10709-014-9809-y.
- Fady B., Forest I., Hochu I., Ribiollet A., de Beaulieu J.-L., Pastuszka P. 1999. Genetic differentiation in *Abies alba* Mill. Populations from Southeastern France. *Forest Genetics* 63: 129–138.
- Fang D.Q., Roose M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408–417. DOI: 10.1007/s001220050577.
- Filipiak M., Barzdajn W. 2004. Assessment of the natural resources of European silver fir (*Abies alba* Mill.) in the Polish Sudety Mts. *Dendrobiology* 51: 19–24.
- Gregorius H.R. 1989. The importance of genetic multiplicity for tolerance of atmospheric pollution, w: Genetic effects of air pollutants in forest tree populations (red. F. Scholz, H.-R. Gregorius, D. Rudin). Springer, Berlin-Heidelberg, 163–172.
- Hattemer H.H., Bergmann F., Ziehe M. 1993. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. J. D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main, 292.
- Jaworski A. 1995. Charakterystyka hodowlana drzew leśnych. Wyd. 2. Gutenberg, Kraków.
- Konnert M. 1993. Untersuchungen zum Einfluss genetischer Faktoren auf die Schädigung der Weißtanne. *Forstwissenschaftliche Centralblatt* 112: 20–26. 10.1007/BF02742125.
- Kormuták A., Kádasi-Horáková M., Vooková B., Gömöry D. 2008. Genetic structure of Silver fir Primeval Forest in Slovakia. *Leśnický Časopis – Forestry Journal* 54: 37–42.
- Korpel' Š., Vinš B. 1965. Pestovanie jedle. SVPL, Bratislava.
- Longauer R., Paule L., Andonoski A. 2003. Genetic diversity of Southern populations of *Abies alba* Mill. *Forest Genetics* 10(1): 1–10.

- Mehes M.S., Nkongolo K.K., Michael P. 2007. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers. *Plant Systematics and Evolution* 267: 47–63. DOI: 10.1007/s00606-007-0534-1.
- Mejnartowicz L. 1980. Polymorphism at the LAP and GOT loci in *Abies alba* Mill. populations. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Serie des Sciences Biologiques*. C1. V., 27(12): 1063–1070.
- Meloni M., Perini D., Filigheddu S., Binell G. 2006. Genetic Variation in Five Mediterranean Populations of *Juniperus phoenicea* as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Annals of Botany* 97: 299–304. DOI: 10.1093/aob/mcj024.
- Müller-Starck G. 1989. Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L., w: Genetics effects of air pollutants in forest tree populations (red. F. Scholz, H. R. Gregorius, D. Rudin) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 127–142.
- Narendrula R., Nkongolo K.K. 2012. Genetic Variation in *Picea mariana* × *P. rubens* Hybrid Populations Assessed with ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 731–737. DOI: 10.4236/ajps.2012.36088.
- Nei M., Roychoudry A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379–390.
- Nkongolo K. K., Michael P., Demers T. 2005. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome* 48(2): 302–11. DOI: 10.1139/G04-118.
- Nyrek A. 1975. Gospodarka leśna na Górnym Śląsku od połowy XVII w. do połowy XIX w. Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wrocław, 234.
- Parducci L., Szmidt A.E., Villani F., Wang X-R., Cherubini M. 1996. Genetic variation of *Abies alba* in Italy. *Hereditas* 125: 11–18. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1996.00011.x.
- Pérez-Collazos E., Catalán P. 2007. Genetic diversity analysis and conservation implications for the Iberian threatened populations of the irano-turanian relict *Krascheninnikovia ceratoides* (Chenopodiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 419–429. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2007.00882.x
- Qian W., Ge S., Hong D-Y. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 440–449. DOI: 10.1007/s001220051665.
- Rogers S.O., Bendich A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue, w: Plant Molecular Biology Manual (S.B. Glewin, R.A. Schilperoot). Kluwer, Dordrecht.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd., Setauket, N.Y. DOI: 10.1086/416356.
- Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñebla B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. 2012. Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles. *International Journal of Molecular Science* 13. DOI: 10.3390/ijms13055645.
- Sabor J., Barzdajn W., Blonkowski S., Chałupka W., Fonder W., Giertych M., Korczyk A., Matras J., Potyrański A., Szeląg Z., Zajączkowski S. 2011. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew na lata 2011–2035. CILP, Warszawa.
- Smissen R.D., Breitwieser I., Ward J.M., McLenachan P.A., Lockhart P.J. 2003. Use of ISSR profiles and ITS-sequences to study the biogeography of alpine cushion plants in the genus *Raoulia* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 239: 79–94. DOI: 10.1007/s00606-002-0249-2.
- Tani N., Tomaru N., Tsumura Y., Araki M., Ohba K. 1998. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regel) population on Mt. Aino-Dake in central Honshu, Japan. *Journal of Plant Research* 111: 7–15. DOI: 10.1007/BF02507145.
- Tautz D., Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: DOI: 4127–4138. 10.1093/nar/12.10.4127.
- Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92(1): 40–45. DOI: 10.1007/BF00222949.
- 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*. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1012–1018. DOI: 10.1007/BF00222915.
- Wolfe A.D., Liston A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology, w: Plant molecular systematics (red. D. E. Soltis, P. E. Soltis, J. J. Doyle) Kluwer, 43–86.
- Woo L.S., Hoon Y.B., Don H.S., Ho S.J., Joo L.J. 2008. Genetic variation in natural populations of *Abies nephrolepis* Max. in South Korea. *Annals of Forest Science* 65(3): 302. DOI: 10.1051/forest:2008006.
- Wyniki aktualizacji stanu powierzchni leśnej i zasobów drzewnych w Lasach Państwowych na dzień 1 stycznia 2011 roku. Praca wykonana przez Biuro Urządzenia Lasu i Geodezji Leśnej na zamówienie Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych. Warszawa.
- Ziegenhagen B., Gómez L.L., Bergmann F., Braun H., Scholz F. 1997. Protection of genetic variability in polluted stands. A case study with silver fir (*Abies alba* Mill.) *Forest Biocoena* 7: 357–365.
- Zientarski J., Ceitel J., Szymański S. 1994. Zamieranie lasów – dynamika i prognozy, w: Protection of forest ecosystems, selected problems of forestry in Sudety Mountains. (eds. P. Paschalis, S. Zajączkowski) Warszawa, 10–28.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183. DOI: 10.1006/geno.1994.1151.

Wkład autorów

K.M. – koncepcja badań, inwentaryzacja i zbiór materiału biologicznego, analizy genetyczne, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu; B.N. – koncepcja badań, inwentaryzacja i zbiór materiału biologicznego, napisanie manuskryptu; K.G. – analizy genetyczne, opracowanie wyników, napisanie manuskryptu.

Genetic variation of silver fir (*Abies alba* Mill.) preserved in the Katowice Forest District

Katarzyna Masternak^{1*}, Barbara Niebrzydowska², Katarzyna Głębocka¹

¹University of Life Sciences in Lublin, Faculty of Agrobiotechnology, Institute of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, ul. Akademicka 15, 20–950 Lublin, Poland, ²Katowice Forest District, ul. Kijowska 37b, 40-754 Katowice, Poland

*Tel. +48 81 4456675, e-mail: katarzyna.masternak@up.lublin.pl

Abstract. Environmental pollution greatly decreases a tree's health and results in dieback of forest stands. Owing to increasing industrial activity in the 20th century, silver fir became almost totally extinct in the Katowice Forest District. Only 19 individuals have survived to this day. The aim of the present study is to analyse growth characteristics and polymorphisms of 25 inter-simple sequence repeats (ISSR) of the preserved trees.

The mean height of the inventoried silver firs was 19 m with a diameter at breast height (DBH) of 29 cm. Flowers were observed on few trees only. However, all trees were of high vitality without signs of fungal pathogen infections or insect outbreaks. Parameters of genetic variability, including mean effective number of alleles per locus and expected heterozygosity, were higher than that described in the literature so far and they amounted to 1.659 and 0.396, respectively.

Keywords: genetic diversity, ISSR markers, growth traits, industrial pollution

1. Introduction

During 200 years (from the mid-17th century to the mid-19th century), silver fir (*Abies alba* Mill.) share in Upper Silesian forests decreased from 41% to 32% (Nyrek 1975). The main reason for this was forest management practice at that time, that is, clearcut logging, planting monoculture pine and spruce stands and forming the so-called 'forest of age classes'. In the mid of 1800s, in the region of Silesia, there was noted *A. alba* dieback for unknown reasons (Korpel, Vinš 1965). Further silver fir decline in the region was due to extensive environmental pollution that stimulated a spiral disease development (Bernadzki 1983; Zientarski et al. 1994; Jaworski 1995). Nowadays, as a result of long-lasting environmental changes, Silesian forests under administration of the Katowice Regional Directorate of State Forests (RDLP Katowice) comprise mainly coniferous species (78%), and silver fir proportion is no more than 1.3%. The total share of silver fir in Poland's forests administered by the State Forests is 2.2% (Wyniki aktualizacji stanu powierzchni leśnej 2013 – *Status of Forest Area in the State Forests – Update 2013*).

In recent times, a noteworthy silver fir proportion has been observed in forests administered by the Katowice Forest

District. Since 2007, the species has been gradually introduced into reforestation areas, anywhere with suitable site and light conditions. Forest breeding material has been obtained from known sources, such as managed seed orchards (1st-category stands), located in the Forest District Kłobuck (654, region of origin) and the Forest District Limanowa (851). On the other hand, it would be preeminent to breed native plant material which is best adapted to local environmental conditions, as sustainability of forest ecosystems relies on their adaptation capability handed down from generation to generation (Degen 1995). In view of considerable silver fir dispersion (no cross-breeding) within the area of the Katowice Forest District, preserved genotypes cannot be used as forest breeding material for population restitution. In this instance, there should be established 'clone genetic archives' or else 'safeguarding seed plantations', which through accumulation of trees within a certain area would allow to include chosen specimens into cross-breeding processes (Burzdajn 2000). The return of silver fir into Silesian forests can also be based on the introduction of foreign provenances. In that case, the populations introduced should reflect variability of those local and also even better support fulfilment of silviculture tasks in managed stands (Barzdajn 2006).

Submitted: 26.09.2014, reviewed: 27.10.2014, accepted after revision: 18.05.2015.

The aim of the present study is to list silver fir trees preserved within the area of the Katowice Forest District, to assess their growth parameters (height and diameter at breast height (DBH)) as well as to evaluate fir genetic variation using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. The results of research undertaken will allow for genotype appraisal in preserved fir trees with the purpose of using them in future fir reintroduction programs.

2. Materials and Methods

Study material

The inventory and assessment of tree growth parameters were carried out on silver firs preserved within the area of the Forest District Katowice. Tree height was measured using a Suunto clinometer (to the nearest 1 m) and DBH (at 1.3 m) – with a forestry caliper (to the nearest 0.5 cm). Additionally, in each tree, there were evaluated levels of insect infestation and fungi colonisation as well as the presence of cones. Information on the locality of fir trees within the area of the Katowice Forest District and their characteristics is presented in Table 1.

Analysis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci

Genomic DNA was extracted following the methodology by Rogers and Bendich (1988). Each amplification was conducted in 10 µl mixture of water, 10× concentrated reaction buffer, 31 mM magnesium chloride, 40 mM dNTP, 50 mM primer, 0.46 U Taq polymerase and 40 ng genomic DNA. The sequences of ISSR markers used are presented in Table 2. The polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a Biometra Thermocycler (T-Personal) at 38 amplification cycles, which included denaturation (95°C for 30 sec), primer annealing (45 sec in first three cycles at 54°C, subsequent 3 cycles at 53°C, and then at 52°C) and DNA amplification (at 72°C for 2 min). The cycles described were preceded by 7-min initial denaturation at 95°C and finished with 7-min elongation of amplification products obtained at 72°C. After each reaction, electrophoresis in 2% agarose gel was carried out and next the results achieved were analysed under UV light and then archived.

Data analysis

The mean numbers of allele per locus (N_a) and allele frequencies were calculated. Additionally, the effective number of

Table 1. Location of firs preserved within the area of the Forest District Katowice

Tree No.	Forest Division	Management unit	Forest habitat type	Geographical coordinates	
				Longitude	Latitude
1	Murcki	123b	Lw	19.048676	50.179996
2		97d	LMśw	19.064944	50.186631
3		96i	Lw	19.067455	50.184023
4		95a	LMw	19.071771	50.190207
5	Czułów	178h	LMw	19.046023	50.161480
6	Podlesie	107j	LMśw	19.014022	50.174835
7	Wesoła	41g	LMśw	19.099448	50.219373
8	Śmiłowice	79Ak	LMw	18.869625	50.211539
9		87Ag	LMw	18.880393	50.207601
10		87Am	LMśw	18.880679	50.206542
11	Górki	163Ac	LMw	19.115206	50.134240
12		163Bc	LMw	19.111439	50.113409
13		168Bg	LMśw	19.116242	50.099856
14		159g	LMśw	19.135601	50.117411
15	Panewnik	38k	BMśw	18.905517	50.238181
16		38k	BMśw	18.905234	50.238061
17		38k	BMśw	18.905273	50.238116
18		38k	BMśw	18.905283	50.238073
19		38k	BMśw	18.909523	50.238076

alleles per locus (N_e) was estimated so as to determine the number of alleles that can be passed to the next generation (Bergmann, Gregorius 1979). The expected heterozygosity (H_e) that would exist in the population in Hardy–Weinberg equilibrium was assessed (Nei, Roychoudry 1974). Genetic similarity amongst observed specimens was evaluated by means of NTSys version 5.1 software (Rohlf 2001), and then a tree diagram of genetic distance (dendrogram) was prepared.

3. Results

The highest number of fir trees was recorded within the area of the Panewniki Forest Division, and the lowest in the Czulów, Podlesie and Wesola Forest Divisions. Within the entire area

Table 2. Sequence of ISSR markers and the number of amplification products

No.	Sequence (5'→3')	Number of ampli- fication products	Number of poly- morphic products
1	(AG) ₈ G	9	5
2	(GT) ₈ C	7	5
3	(AC) ₈ G	7	6
4	(GA) ₈ C	7	4
5	(GA) ₈ YC	10	9
6	(CA) ₈ G	4	2
7	(CA) ₈ GC	7	6
8	(TC) ₈ G	7	7
9	(TG) ₈ G	4	4
10	(AG) ₈ YT	7	3
11	(AC) ₈ C	5	3
12	(AG) ₇ A	9	7
13	(CA) ₈ A	9	3
14	(TC) ₉ A	5	4
15	(CT) ₉ T	7	5
16	(CTC) ₆ G	6	5
17	(ACC) ₆ T	4	2
18	(AC) ₉ G	5	4
19	(ATG) ₆ G	3	2
20	(ATG) ₈ C	5	2
21	(ATG) ₈ AC	5	3
22	(ATG) ₈ T	2	0
23	(AC) ₈ T	11	8
24	(AC) ₈ G	12	9
25	(AC) _{8Y} G	8	7

Y – specifies T or C

of the Katowice Forest District, preserved fir trees showed on an average 19 m height and 29 cm DBH. The lowest values of growth parameters were observed in the trees numbered 17 and 18 in the Forest Division Panewniki. The specimens with the highest values of growth parameters were found in the Forest Divisions: Murcki (No. 2) and Czulów (No. 5). All the fir trees showed high vitality and no signs of either fungal pathogen colonisation or insect feeding. Most of the trees had no cones except for those growing in the Forest Divisions: Czulów (No. 5), Podlesie (No. 6) and Śmiłowice (tree No. 9) (Table 3).

The highest values of the effective allele number (N_e) and the highest expected heterozygosity (H_e) showed the following silver fir trees: No. 9 in Śmiłowice and 17 in Panewniki. The lowest values were observed in the trees: No. 9 in Śmiłowice and No. 17 in Panewniki. The mean number of alleles (N_a) per tree was 1.000. In the population of 19 silver fir trees tested, the mean effective allele number was 1.659 and the expected heterozygosity was 0.396.

The mean genetic distance was 0.163. Generally, no considerable genetic similarity was observed in silver fir trees growing on the area of a given forest division. In the Katowice Forest District taken as a whole, silver fir trees growing far away from each other, for example, No. 6 in Podlesie and No. 14 in Górkki, were grouped in one cluster. On the other hand, quite large genetic distance was observed amongst fir trees growing in the Forest Division Murcki, for example, No. 1 in Murcki and No. 2 in Murcki. Fir tree No. 13 in Górkki was genetically most distant (placed in a separate cluster) (Fig. 1).

4. Discussion

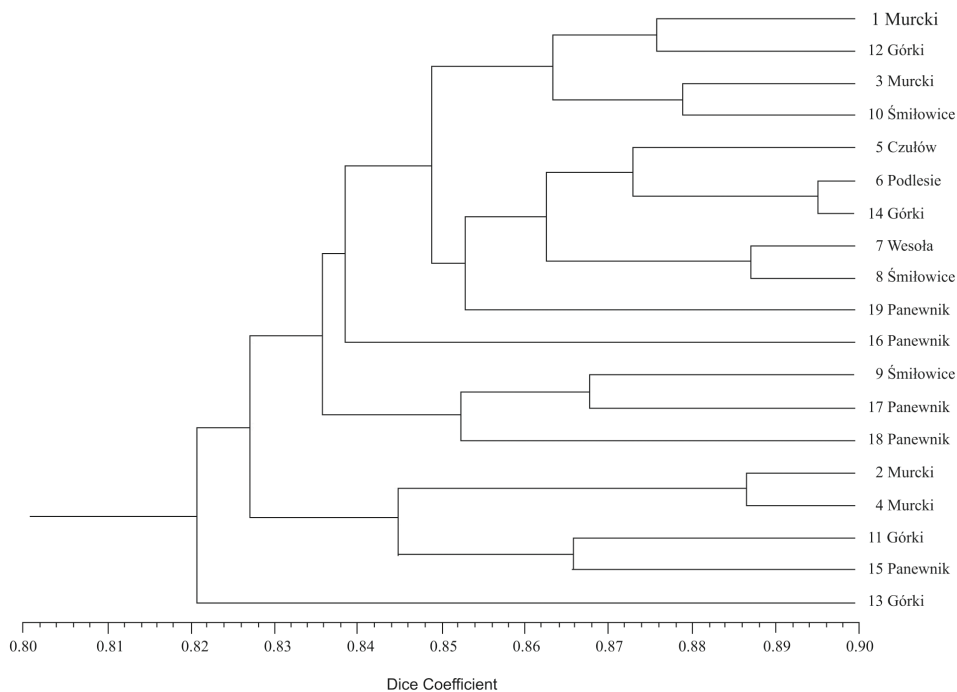
Former forest management activities, that is, formation of monoculture spruce stands, clearcut logging as well as considerable air pollution resulted in a substantial decrease in silver fir populations in Poland's forests. Now, consistent with the results of *Status of Forest Area in the State Forests – Update 2013*, silver fir proportion is estimated to 2.5%. In the Katowice Forest District, only 19 silver fir specimens with unknown source of origin are preserved. The preserved trees are roughly 50–65 years old; they apparently endured the period of hard-hitting industrial emissions in the 1980s.

The study presents the results of silver fir inventory carried out in the Katowice Forest District as well as the analysis of genetic variation performed with the use of the ISSR-PCR method (Ziętkiewicz et al. 1994). Initially, the method was used to examine agriculture plant species (Wolfe, Liston 1998), and soon it was implemented in research on population genetics (Qian et al. 2001; Smissen et al. 2003; Pérez-Collazos, Catalán 2007; Dantas et al. 2015). Yet, not many studies has been conducted on evaluation of genetic diversity of forest tree populations with ISSR markers (Tani et al. 1998; Mehes et al. 2007; Rubio-Moraga et al. 2012) and hardly any have been focused on the genus

Table 3. Growth characteristics and genetic variability parameters of firs preserved within the area of the Katowice Forest District

Tree No.	Forest Division	Height [m]	DBH [cm]	Presence of cones	N_e	H_e
1	Murcki	22	34		1.645	0.392
2		31	65		1.634	0.388
3		26	47		1.667	0.400
4		28	42		1.645	0.392
5	Czułów	35	52	yes	1.706	0.414
6	Podlesie	21	32	yes	1.592	0.372
7	Wesoła	12	28		1.613	0.380
8	Śmiłowice	18	28		1.634	0.388
9		28	38	yes	1.524	0.344
10		23	39		1.626	0.385
11	Górki	17	30		1.639	0.390
12		24	31		1.730	0.422
13		15	23		1.869	0.465
14		15	17		1.701	0.412
15	Panewnik	14	20		1.660	0.398
16		7	8		1.718	0.418
17		6	7		1.587	0.370
18		5,5	6		1.695	0.410
19		11	10		1.639	0.390
Mean		19	29		1.659	0.396

N_e – effective number of alleles at locus, H_e – expected heterozygosity

**Figure 1.** Dendrogram of genetic similarity among tested firs

Abies (Tsumura et al. 1996; Woo et al. 2008). The present study refers to the original results on genetic variation in silver fir obtained with the use of the ISSR method. It is worth stressing that the method combines the simplicity of RAPD markers with a possibility of obtaining a large number of products during an individual reaction. Just one primer is used in amplification – complementary to the microsatellite sequence. Microsatellite sequences commonly occur in eukaryotic organisms (Tautz, Renz 1984; Fang, Roose 1997); therefore, even several dozens of amplification products flanked by microsatellite genomic information can be obtained, which is generally more when compared to the reaction carried out with the use of random primers. Consequently, in a relatively short time and using lesser amounts of reagents, the results that adequately reflect a level of variability in a population can be achieved. Furthermore, ISSR primers are longer than RAPD and require higher hybridisation temperature, which enhances more specific primer binding to the template. As a result, the method is more reliable because of its repeatability and precision. On the other hand, however, the products obtained by means of this technique show dominant characteristics. In any case, many studies on genetic variability of forest trees are carried out with the use of dominant markers (Nkongolo et al. 2005; Vicario et al. 1995).

Silver fir trees preserved in the Katowice Forest District indicated a high level of genetic variation. Owing to the lack of information on polymorphism of ISSR loci in *A. alba*, it was not possible to compare the results obtained in this study with those of other authors. Then again, in view of the results of *A. alba* isoenzyme analyses, one can state that the fir trees from the Katowice Forest District clearly indicated higher genetic variation when compared with fir populations from Slovakia ($H_e = 0.210–0.250$) (Kormutak et al. 2008), Italy ($H_e = 0.129–0.180$) (Parducci et al. 1996), France ($H_e = 0.139–0.161$) (Fady et al. 1999) and the Balkans ($H_e = 0.119–0.184$) (Ballian et al. 2012). On the basis of isoenzyme markers, it was also observed that when compared to the trees investigated in the present study, fir populations from Italy, Bulgaria, Macedonia and Romania as well as those from Eastern and Southern Carpathians showed lower expected heterozygosity values and lower effective allele numbers per locus ($N_e = 1.114–1.03$, $H_e = 0.102–0.188$) (Longauer et al. 2003). The expected heterozygosity ($H_e = 0.416$) which was similar to that obtained in this study was reported by Mejnartowicz (1980), who analysed just two isoenzyme loci in Polish silver fir populations.

Other studies carried out on different forest tree species also showed lower genetic variation when compared with polymorphism of the firs tested in the present study. Lower values of the effective allele numbers and observed heterozygosity were found in populations of Manchurian fir (*Abies nephrolepis*) ($H_e = 0.240$) (Woo et al. 2008), black pine (*Pinus nigra*) ($N_e = 1.228–1.410$, $H_e = 0.123–0.242$) (Rubio-Moraga 2012), Phoenician juniper (*Juniperus phoenicea*) ($H_e = 0.101–0.146$)

(Meloni et al. 2006) or else red spruce (*Picea rubens*) × black spruce (*Picea mariana*) hybrid populations ($N_e = 1.22–1.34$) (Narendrula, Nkongolo 2012).

Genetic distance analyses gave no clear answer whether the observed trees originated from an individual *A. alba* provenance. This could be determined after comparative analyses of the larger number of provenances from different regions of Poland. Furthermore, taking into account the lack of information on derivation of the fir trees preserved in the Katowice Forest District, there is a possibility that the fir trees observed are the progeny of silver fir populations once growing within the region and now as individually preserved specimens, they represent genetic diversity amongst previous populations. If so, no relationships found between genetic distance and geographical distance could be explained.

Nevertheless, the reference to the results of other authors should be treated with caution. The comparison of the results obtained in this study with those reported by other researchers would be most trustworthy if genetic variation parameters were measured using equivalent genetic markers. Then again, in subject literature, there is no information available on silver fir genetic variation investigated with the use of the ISSR method. The reference to the results on silver fir obtained using different marker systems as well as to genetic variation levels observed in other forest tree species aims to pointing out that silver fir growing in the Katowice Forest District is characteristic of high genetic variation, which is a valuable feature in the view of tree adaptation potential (Gregorius 1989; Hattemer et al. 1993). The fir trees preserved on the territory of the forest district observed are probably the progeny of native provenances that endured natural and anthropogenic selection. Hence, these are valuable genotypes, especially taking into consideration the exploring mechanisms of tree resistance to industrial pollution and their relationships with tree genetic variation. The relationships of this kind have been so far observed using a small number of biochemical markers. The results of the studies carried out on tree stands growing in polluted areas showed amongst others, lower isoenzyme variability in specimens with visible damages when compared to healthy trees (Ziegenhagen et al. 1997). Correlation between fir defoliation levels and genotype frequency and isoenzyme loci alleles involved in metabolic pathways was proved by Konnerth (1993). Genetic polymorphism of isoenzyme markers is also correlated with environmental stress resistance in Norway spruce (Bergmann, Scholz 1985) and beech (Müller-Starck 1989; Brus 1996). In view of the fact that protein variability relies on DNA sequence, the abovementioned results indicate that correlations are possible at a level of metabolic pathways and DNA as well.

Forest management practice commonly applied in the 1800s in Poland did not include introducing silver fir in reforestation areas, and for that reason, natural regeneration of local fir populations has not been possible (Barzdajn 2012).

The recommended average number of trees at one site in the Sudety Mts. is 15 specimens. Nonetheless, 75% of areas comprise less than 10 trees (Filipiak, Barzdajn 2004). In the Katowice Forest District, there are only 19 fir specimens. In order to restore this species, seed banks are created, and these are mainly clone archives that consist of genetic material of dispersed specimens. According to Poland's Program on Preservation of Forest Resources and Tree Breeding for the years 2011–2035, within the territory administered by the Katowice Regional Directorate of State Forests (RDLP Katowice), the area of selected seed fir stands will be increased from 76.69 to 96.69 ha, that of progeny plantations will be increased from 75.19 to 195.19 ha and the area of managed seed stands will be decreased from 584.05 to 560 ha. At the same time, the number of maternal trees will be increased from 30 to 70 specimens. Additionally, it is planned to establish second-generation stands on the area of 60 ha. On the area of 5 ha, there will be established seed plantations (which have not so far existed in RDLP Katowice). All these objects are to form the seed base for increasing a fir proportion in forests under administration of RDLP Katowice.

High genetic variation observed in fir trees preserved within the area of the Katowice Forest District indicates that they constitute most valuable source of genetic material that can be used in establishing clone plantations. The seeds obtained from such plantations could be used in reforestation carried out in the district. Silver fir was commonly present in the area of the Katowice Forest District until the 1950s; therefore, the reintroduction of this species is by all means beneficial. Appropriate sites and reduction of air pollution can certainly support the return of this valuable forest tree species back to Silesian forests.

Conflict of interests

No potential conflicts are declared by the authors.

Acknowledgements and financial support

The authors would like to thank very much Foresters from the Katowice Forest District for their remarkable help in conducting silver fir inventory and collecting plant material for genetic analyses.

The study was financed by the Ministry of Science and Higher Education (grant No. RGH/MN/5).

References

- Ballian D., Boguni F., Bajrij M., Kajba D., Kraigher H., Konnert M. 2012. The genetic population study of Balkan Silver Fir (*Abies alba* Mill.). *Periodicum Biologorum* 114(1): 55–65.
- Barzdajn W. 2000. Strategia restytucji jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Sudetach. *Sylvan* 144(2): 63–77.
- Barzdajn W. 2006. Restytucja jodły pospolitej w Sudetach. Dotychczasowe osiągnięcia. *Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej* 1(11): 69–84.
- Barzdajn W., Kowalkowski W. 2012. Restytucja jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Sudetach. Charakterystyka drzew zachowawczych. *Forestry Letters* 103: 7–16.
- Bergmann F., Gregorius H.R. 1979. Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*). in: Proceedings of the Conference on Biochemical Genetics of Forest Trees (red. F. Rudin) Umea. 99–107.
- Bergmann F., Scholz F. 1985. Effects of selection pressure by SO₂ pollution on genetic structures of Norway spruce (*Picea abies*). in: Population genetics in forestry. Lecture notes in biomathematics (ed. H. R. Gregorius). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Tokyo. 267–275.
- Bernadzki E. 1983. Zamieranie jodły w granicach naturalnego zasięgu. in: Jodła pospolita *Abies alba* Mill. Nasze drzewa leśne (ed. S. Białobok). PWN. Warszawa-Poznań. 483–501.
- Brus R. 1996. Vpliv onesnazevanja ozracja na genetsko strukturo bukovih populaciji v Sloveniji. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 49: 67–103.
- Degen B. 1995. Zum Einsatz der Systemanalyse zur Beurteilung der Stabilität und Anpassungsfähigkeit von Waldökosystem. in: Klimawirkungsforschungen Geschäftsbereich des BML (eds. H.J. Weigel, D. Dämmgen, F. Scholz). Angewandte Wissenschaft. Landwirtschaftsverlag. Münster. 442: 167–177.
- Dantas L.G., Esposito T., Barbarosa de Sousa A.C., Félix L., Amorim L.L.B., Benko-Iseppon A.M., Batalha-Filho H., Pedrosa-Harand A. 2015. Low genetic diversity and high differentiation among relict populations of the neotropical gymnosperm *Podocarpus sellowii* (Klotz.) in the Atlantic Forest. *Genetica* 143: 21–30. 10.1007/s10709-014-9809-y.
- Fady B., Forest I., Hochu I., Ribiollet A., de Beaulieu J.-L., Pastuszka P. 1999. Genetic differentiation in *Abies alba* Mill. Populations from Southeastern France. *Forest Genetics* 63: 129–138.
- Fang D.Q., Roose M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408–417. 10.1007/s001220050577.
- Filipiak M., Barzdajn W. 2004. Assessment of the natural resources of European silver fir (*Abies alba* Mill.) in the Polish Sudety Mts. *Dendrobiology* 51: 19–24.
- Gregorius H.R. 1989. The importance of genetic multiplicity for tolerance of atmospheric pollution. in: Genetic effects of air pollutants in forest tree populations (eds. F. Scholz, H.-R. Gregorius, D. Rudin). Springer. Berlin-Heidelberg. 163–172.
- Hattemer H.H., Bergmann F., Ziehe M. 1993. Einführung in die Genetik für Studierende der Forstwissenschaft. J. D. Sauerländer's Verlag. Frankfurt am Main. 292.
- Jaworski A. 1995. Charakterystyka hodowlana drzew leśnych. Wyd. 2. Gutenberg. Kraków.
- Konnert M. 1993. Untersuchungen zum Einfluss genetischer Faktoren auf die Schädigung der Weißtanne. *Forstwissenschaftliche Centralblatt* 112: 20–26. 10.1007/BF02742125.
- Kormuták A., Kádasi-Horáková M., Vooková B., Gömöry D. 2008. Genetic structure of Silver fir Primeval Forest in Slovakia. *Leśnický Časopis – Forestry Journal* 54: 37–42.
- Korpel' Š., Vinš B. 1965. Pestovanie jedle. SVPL. Bratislava.

- Longauer R., Paule L., Andonoski A. 2003. Genetic diversity of Southern populations of *Abies alba* Mill. *Forest Genetics* 10(1): 1–10.
- Mehes M.S., Nkongolo K.K., Michael P. 2007. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers. *Plant Systematics and Evolution* 267: 47–63. 10.1007/s00606-007-0534-1.
- Mejnartowicz L. 1980. Polymorphism at the LAP and GOT loci in *Abies alba* Mill. populations. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences. Serie des Sciences Biologiques*. C1. V. 27(12): 1063–1070.
- Meloni M., Perini D., Filigheddu S., Binell G. 2006. Genetic Variation in Five Mediterranean Populations of *Juniperus phoenicea* as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Annals of Botany* 97: 299–304. 10.1093/aob/mcj024.
- Müller-Starck G. 1989. Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L. in: Genetics effects of air pollutants in forest tree populations (eds. F. Scholz, H. R. Gregorius, D. Rudin) Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 127–142.
- Narendrula R., Nkongolo K.K. 2012. Genetic Variation in *Picea mariana* × *P. rubens* Hybrid Populations Assessed with ISSR and RAPD Markers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 731–737. 10.4236/ajps.2012.36088.
- Nei M., Roychoudry A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379–390.
- Nkongolo K. K., Michael P., Demers T. 2005. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome* 48(2): 302–11. 10.1139/G04-118.
- Nyrek A. 1975. Gospodarka leśna na Górnym Śląsku od połowy XVII w. do połowy XIX w. Zakład Narodowy im. Ossolińskich. Wrocław. 234.
- Parducci L., Szmidt A.E., Villani F., Wang X-R., Cherubini M. 1996. Genetic variation of *Abies alba* in Italy. *Hereditas* 125: 11–18. 10.1111/j.1601-5223.1996.00011.x.
- Pérez-Collazos E., Catalán P. 2007. Genetic diversity analysis and conservation implications for the iberian threatened populations of the irano-turanian relict *Krascheninnikovia ceratoides* (Chenopodiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 419–429. 10.1111/j.1095-8312.2007.00882.x
- Qian W., Ge S., Hong D-Y. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 440–449. 10.1007/s001220051665.
- Rogers S.O., Bendich A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue. in: Plant Molecular Biology Manual (S.B. Glevin, R.A. Schilperoort). Kluwer. Dordrecht.
- Rohlf F.J. 2001. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 5.1. Exeter Publishing Ltd.. Setauket. N.Y. 10.1086/416356.
- Rubio-Moraga A., Candel-Perez D., Lucas-Borja M. E., Tiscar P. A., Viñeola B., Linares J. C., Gómez-Gómez L., Ahrazem O. 2012. Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By Inter-Simple Sequence Repeat Profiles. *International Journal of Molecular Science* 13. 10.3390/ijms13055645.
- Sabor J., Barzdajn W., Blonkowski S., Chałupka W., Fonder W., Giertych M., Korczyk A., Matras J., Potyrański A., Szelaż Z., Zajązkowski S. 2011. Program zachowania leśnych zasobów genowych i hodowli selekcyjnej drzew na lata 2011-2035. CILP. Warszawa.
- Smitsen R.D., Breitwieser I., Ward J.M., McLenachan P.A., Lockhart P.J. 2003. Use of ISSR profiles and ITS-sequences to study the biogeography of alpine cushion plants in the genus *Raoulia* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 239: 79–94. 10.1007/s00606-002-0249-2.
- Tani N., Tomaru N., Tsumura Y., Araki M., Ohba K. 1998. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regel) population on Mt. Aino-Dake in central Honshu. Japan. *Journal of Plant Research* 111: 7–15. 10.1007/BF02507145.
- Tautz D., Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127–4138. 10.1093/nar/12.10.4127.
- Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphism in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92(1): 40–45. 10.1007/BF00222949.
- Vicario F., Vendramin G. G., Rossi P., Liö 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. 10.1007/BF00222915.
- Wolfe A.D., Liston A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. in: Plant molecular systematics (eds. D. E. Soltis, P. E. Soltis, J. J. Doyle) Kluwer. 43–86.
- Woo L.S., Hoon Y.B., Don H.S., Ho S.J., Joo L.J. 2008. Genetic variation in natural populations of *Abies nephrolepis* Max. in South Korea. *Annals of Forest Science* 65(3): 302. 10.1051/forest:2008006.
- Wyniki aktualizacji stanu powierzchni leśnej i zasobów drzewnych w Lasach Państwowych na dzień 1 stycznia 2011 roku. Praca wykonana przez Biuro Urządzenia Lasu i Geodezji Leśnej na zamówienie Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych. Warszawa.
- Ziegenhagen B., Gómez L.L., Bergmann F., Braun H., Scholz F. 1997. Protection of genetic variability in polluted stands. A case study with silver fir (*Abies alba* Mill.) *Forest Biocoena* 7: 357–365.
- Zientarski J., Ceitel J., Szymański S. 1994. Zamieranie lasów – dynamika i prognozy. in: Protection of forest ecosystems. selected problems of forestry in Sudety Mountains. (eds. P. Paschalis. S. Zajązkowski) Warszawa. 10–28.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183. 10.1006/geno.1994.1151.

Author's contribution

K.M. – research conception, inventory works and collection of biological material, genetic analyses, result analyses, preparation of manuscript; B.N. – research conception, inventory works and collection of biological material, preparation of manuscript; K.G. – genetic analyses, result analyses, preparation of manuscript.