

GDK 182.23 : (497.12) : (497.13)

Prispelo / Received: 18.09.2003

Sprejeto / Accepted: 03.11.2003

Izvorni znanstveni članek

Original scientific paper

GENETSKA DIFERENCIACIJA AVTOHTONIH POPULACIJ SMREKE (*PICEA ABIES* (L.) KARST.) V SLOVENIJI, UGOTOVLJENA Z ANALIZO IZOENCIMOV

Gregor BOŽIČ*, Monika KONNERT**, Mitja ZUPANČIČ***, Hojka KRAIGHER*, Ivan KREFT****

Izvleček

Raziskava obravnava genetsko diferenciacijo 22 populacij smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) z njenih naravnih rastišč v Sloveniji in 4 na Hrvaškem z analizo izoencimskih genskih označevalcev. Razlike med populacijami smo ocenili z genetskimi razdaljami po Gregoriusu (1974) za 15 polimorfnih genskih lokusov. Vrednosti genetskih razdalj se gibljejo med 0,021 in 0,073 (v Sloveniji do 0,063). Izoencimska genetska diferenciranost smreke je razmeroma majhna. Rezultati hierarhične klasifikacije nakazujejo geografsko odvisno združevanje populacij v dve skupini: alpsko skupino s Trnovskim gozdom in osrednje dinarsko skupino. Skupini se na območju Snežnika tudi prekrivata.

Ključne besede: *Picea abies* (L.) Karst., izoencimi, genetska diferenciacija, varstvo gozdnih genskih virov, Slovenija, Hrvaška

GENETIC DIFFERENTIATION OF THE INDIGENOUS NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* (L.) KARST) POPULATIONS IN SLOVENIA INVESTIGATED BY MEANS OF ISOENZYME GENE MARKERS

Abstract

Genetic differentiation of 22 indigenous Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) populations from Slovenia and 4 from Croatia has been investigated by means of isoenzyme gene markers. The degree of differentiation among populations has been measured with genetic distances proposed by Gregorius (1974) for 15 polymorphic gene loci. Multilocus estimates of genetic distances range between 0.021 and 0.073 (in Slovenia up to 0.063). Norway spruce populations did not show a strong genetic differentiation by isozymes. The results of hierarchical classification indicated a geographically dependent pooling of populations into two distinct groups: Alpine group including Trnovski gozd and Central Dinaric group, with the two groups overlapping in the Snežnik area.

Key words: *Picea abies* (L.) Karst., isoenzymes, genetic differentiation, forest gene conservation, Slovenia,

* Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, SVN

** Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht, Forstamtsplatz, 83317 Teisendorf, D

*** SAZU, Novi trg 5, 1000 Ljubljana, SVN

**** Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, SVN

**VSEBINA
CONTENTS**

1	UVOD	21
	INTRODUCTION	
2	MATERIAL IN METODE	25
	MATERIALS AND METHODS	
3	REZULTATI	29
	RESULTS	
4	RAZPRAVA	34
	DISCUSSION	
5	SUMMARY	36
6	VIRI	37
	REFERENCES	

1 UVOD

INTRODUCTION

Smreka (*Picea abies* (L.) Karst.) je ena izmed najpomembnejših drevesnih vrst evropskega prostora tako z gospodarskega kot ekološkega vidika (KOSKI *et al.* 1997). Zanj je značilna velikopovršinska, skoraj sklenjena porazdelitev. Genetska struktura smrekovih populacij je odsev še ne tako daljnih dogodkov, povezanih z zadnjo poledenitvijo v evropskem prostoru. Študije populacijske strukture smreke na osnovi izoenemskega polimorfizma in morfološke variabilnosti kažejo, da ima *Picea abies* v Evropi relativno veliko genetsko variabilnost in majhno medpopulacijsko diferenciacijo (MUELLER-STARCK / BRADAT / BERGMANN 1992). Kot poudarja študija LANGERCRANTZ / RYMAN (1990), vse kaže, da je smreka še vedno v procesu diferenciacije in adaptacije. Tudi novejša raziskava analize variabilnosti kloroplastnega genoma v povezavi z možnimi rekolonizacijskimi procesi smreke po ledenih dobah (VENDRAMIN *et al.* 2000, BUCCI / VENDRAMIN 2000) so pokazale, da so zgodovinski dogodki igrali pomembno vlogo v oblikovanju smrekine dejanske porazdelitve haplotipske diverzitete. Z analizo kloroplastnih mikrosatelitov so preučili 97 populacij smreke iz 7 območij: Skandinavija, Sarmatska, Karpati, srednja Evropa, Alpe, južne Alpe, Balkan. Porazdelitev posameznih haplotipov je bila geografsko diferencirana in povezana z razpoložljivostjo različnih zatočišč v zadnji ledeni dobi. Ta študija je odkrila in hkrati potrdila obstoj 2 glavnih genskih skladov: i) sarmatsko-baltske skupine, ki vključuje populacije smreke iz Skandinavije in sarmatskih regij (Fenoskandija, baltske republike, Rusija, vzhodna Poljska) in ii) alpsko-srednjeevropske skupine, ki zajema populacije smreke iz glavnih alpskih območij (Italija, Švica, Avstrija, Slovenija). Obstoj dveh glavnih genskih skladov v evropskem prostoru pri smreki potrjujejo tudi obširne študije analiz izoenimov in morfoloških znakov (LANGERCRANTZ / RYMAN 1990) ter mitohondrijskih označevalcev (SPERISEN / BUCHLER / MATYAS 1998). Stopnja diferenciacije med genskima skladoma, ugotovljena z analizo kloroplastnih mikrosatelitov, je bila razmeroma nizka (R_{st} okoli 10 %), kar je značilnost drevesnih vrst z veliko razširjenostjo in vrst, na katere je močno vplival človek s svojimi posegi. Genetska diferenciacija se je lahko manjšala tudi zaradi morebitnega stika različnih genskih skladov po zadnji ledeni dobi (BERGMANN 1991). Raziskava VENDRAMINA *et al.* (2000) ne dokazuje obstoja dodatnih genskih skladov z Balkana in karpatskega ledenodobnega zatočišča, čeprav tudi ni mogoče izključiti genetske diskontinuitete znotraj vrste v

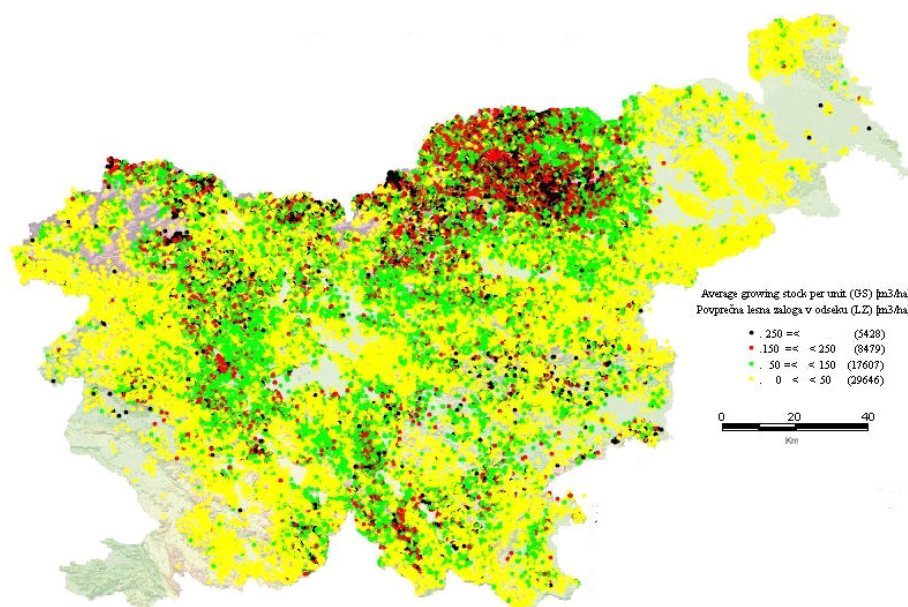
evropskem prostoru. Analizirane populacije smreke iz zahodnih Alp (Italija, Francija) ter severnih Apeninov se malce razlikujejo od tistih v alpsko-srednje evropski skupini, medtem ko populacije z Balkana po porazdelitvi haplotipov ležijo na ločnici med obema glavnima genskima skladoma. Tudi študija, ki je z metodo analize izoencimskih genskih označevalcev obravnavala populacijsko genetsko strukturo smreke jugozahodnega predela Alp v primerjavi z ustreznimi visokogorskimi srednjeevropskimi smrekovimi populacijami (BOŽIČ / KONNERT 2003), nakazuje sklep o geografsko odvisni genetski diferenciaciji med populacijami smreke z območja francoskih Alp (zahodne Alpe) ter populacijami smreke z bavarskega in slovenskega predela Alp (vzhodne Alpe) kot tudi populacijami smreke iz severozahodnega predela Dinarskega gorstva, ki so si med seboj genetsko bolj podobne. Rezultati raziskave nakazujejo možnost podobne razvojne zgodovine naših smrekovih populacij in populacij smreke iz bavarskih Alp ter možnost njihove različne razvojne zgodovine v primerjavi s smreko na zahodnem predelu Alp, še zlasti iz francoskih Alp. Po mnenju italijanskih raziskovalcev (MAGINI *et al.* 1980, BORGHETTI / GIANNINI / MENOZZI 1988, GIANNINI / MORGANTE / VENDRAMIN 1991, MORGANTE / VENDRAMIN 1991) naj bi ponovno naseljevanje zahodnih Alp s smreko potekalo iz izvirnih zatočišč v centralnem gorovju italijanskega polotoka. Po drugi strani pa so po mnenju KRALA (1977) populacije smreke na robnem jugozahodnem območju njenega areala v Evropi le zadnja stopnja v migracijski poti, z začetkom v Dinaridih in prehodom na zahod vzdolž južnega obrobja alpske verige.

1.1 EKOLOŠKO MESTO SMREKE V VEGETACIJI SLOVENIJE

ECOLOGICAL POSITION OF NORWAY SPRUCE IN THE VEGETATION OF SLOVENIA

Slovenija leži na skrajnem robu ogromne evrosibirsko-boreoameriške fitogeografske regije na prehodu v mediteransko območje, kjer se srečujeta dve geografski in flornogenetsko različni območji, srednjeevropsko in dinarsko (Šumarska enciklopedija 1987). To se kaže tudi v zgodovinskem razvoju flore in vegetacije. Smrekove združbe v centralnoalpski regiji so bolj zastopane s subarktičnimi in arktičnimi oziroma borealnimi flornimi elementi, medtem ko so mraziščne združbe našega dinarskega sveta bogatejše z jugovzhodnoevropsko-ilirskimi vrstami (ZUPANČIČ 1980). Klimatogeno se smreka pojavlja le v alpskem svetu, v višjih legah nad zaprtimi gorskimi planotami v združbah

Adenostylo glabrae-Piceetum na karbonatni in *Luzulo sylvaticae-Piceetum* na nekarbonatni podlagi (subalpinski asociaciji). Na vseh drugih rastiščih se je ohranila le zaradi posebnih edafskih ali lokalnih klimatskih razmer, kjer so pogosta in močna hladna obdobja (krajša vegetacijska doba in povprečno nizke temperature onemogočajo bolj termofilnim drevesnim vrstam naselitev, če pa se že naselijo, se ne morejo dlje časa obdržati), ali pa se ponovno uveljavlja v regresijah nekaterih gozdnih združb (ZUPANČIČ 1999). Smreka je naravno primešana na razmeroma širokem območju, vendar v količinsko majhnem deležu. Zaradi pogozdovanj s smreko v preteklosti je danes razširjena tudi na rastiščih bukke in v manjši meri hrasta in belega gabra.



Slika 1: Današnja razširjenost smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji (ŽITNIK 2001)

Figure 1: Present distribution of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Slovenia (ŽITNIK 2001)

Smreka v Sloveniji raste na 898.929 ha gozdnih površin (83,36 %). Podatek upošteva vse površine, ne glede na resnični delež smreke v posamezni enoti. Povprečna lesna zaloga

smreke v Sloveniji je 83,77 m³/ha. Njen delež v lesni zalogi slovenskih gozdov znaša 32,50 % (BOŽIČ *et al.* 2001; povzeto po letnem poročilu Zavoda za gozdove Slovenije 1998). Delež smreke presega njen ekološki optimum. Po potencialni avtohtoni vegetaciji, ki ustreza rastiščnim razmeram, ima smreka v celotni lesni zalogi slovenskih gozdov 8 % delež (Gozd ..., 1998).

Iz raziskav, ki so jih opravili sodelavci Biološkega inštituta Jovana Hadžija ZRC SAZU, Nacionalnega inštituta za biologijo in Oddelka za gozdarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani (CULIBERG *et al.* 1999) in so zajele preučevanja sestojev smreke na 23 vzorčenih lokacijah iz območij na Pokljuki, Pohorju in Goteniškem Snežniku na primarnih avtohtonih in sekundarnih smrekovih rastiščih, lahko povzamemo, da so bili na vseh raziskanih lokacijah gozdovi bolj ali manj antropozoogeno spremenjeni in so v fazi regeneracije, delno tudi degradacije. Glavni vzrok sprememb so posegi človeka, manj klimatske spremembe. Smreka je bila že od pleistocena naprej z 20 do 30 % graditeljica teh gozdov. Vztrajala je skozi vse razvojne faze, od pionirske borove, prek faze mešanega hrastovega gozda, faze leske, bukve in klimaksne jelovo-bukove faze, ki je nastopila že pred 7000 leti (CULIBERG / ŠERCELJ / ZUPANČIČ 1981, ŠERCELJ 1996). Na posekah prvotnih jelovo-bukovih gozdov, ki so postale tudi začasni pašniki, so se poleg smreke naselili pionirski rodovi, leska (*Corylus*), črni gaber (*Ostrya*), breza (*Betula*), hrast (*Quercus*), beli gaber (*Carpinus*) in jelša (*Alnus*), ki jih je smreka postopoma prerasla. Redno pojavljanje bukovega peloda nakazuje, da so od prvotnega gozda ponekod ostale še površine, porasle z bukvijo, ter da sečnja in oglarjenje nista bila zelo obsežna.

V Sloveniji so smreko pogosto pospeševali s semeni in sadikami neznanega porekla. Vnesene populacije smreke so se deloma že križale z avtohtonimi in prej vnesenimi, neavtohtonimi. Zato je danes kljub njeni močni razširjenosti težko najti sled za avtohtonimi populacijami. Na večjih površinah imamo pogosto čiste smrekove sestoje antropogenega porekla, ki dajejo v višjih predelih našega gorskega sveta pogosto vtis naravnih gozdov. Znanih je 18 smrekovih asociacij, od katerih je 5 potencialno naravnih, 6 pogojno potencialno naravnih avtohtonih in 7 sekundarnih združb na rastiščih bukovih gozdov (ZUPANČIČ 1999).

1.2 NAMEN IN CILJI RAZISKAVE

PURPOSE AND AIMS OF THE RESEARCH

Namen te raziskave je spoznavanje gozdnih genskih virov smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji. Glede na razvojno preteklost in današnje stanje smrekovih gozdov smo želeli na populacijah smreke v območju jugovzhodnega obrobja Alp ugotoviti stopnjo genetske diferenciranosti domnevno avtohtonih populacij smreke v Sloveniji ter odgovoriti na vprašanje, ali se smrekove populacije alpskega in dinarskega porekla genetsko razlikujejo z izoencimi.

2 MATERIAL IN METODE

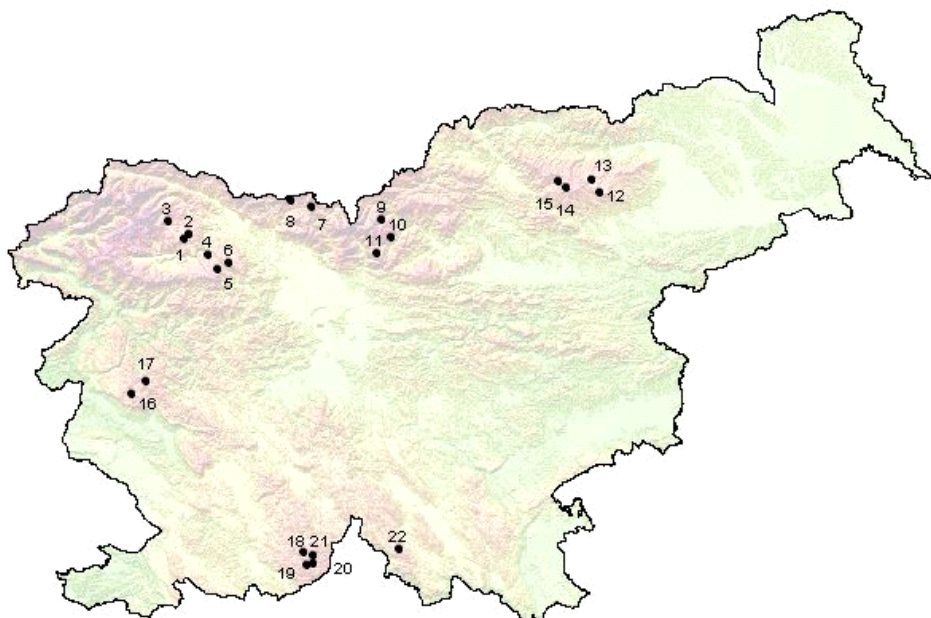
MATERIALS AND METHODS

Raziskovalne objekte smo izbrali v subalpinskem in zgornjem montanskem pasu na rastiščih, ki jih smreka gradi po svoji naravni razširjenosti. Material smo nabrali v 26 vzorčnih populacijah smreke na območju alpskega in dinarskega sveta, od tega 22 v Sloveniji in 4 na Hrvaškem. Raziskovalne objekte smo v alpskem fitogeografskem območju izbrali na Pokljuki in Jelovici, v Karavankah in Kamniško-Savinjskih Alpah, na Pohorju, dinarskem fitogeografskem območju, v Trnovskem gozdu, na Snežniku, Goteniškem Snežniku, v Gorskem Kotarju, Veliki Kapeli in na Velebitu. Izhodišča za izbiro raziskovalnih objektov so poleg zahteve po naravnih smrekovih rastiščih zajemala še praviloma čimvečjo homogenost rastiščnih razmer znotraj posamezne ploskve, obstoj dreves različne starosti in naravnega smrekovega mladja. Za vzorčene populacije smreke je sprejeto mnenje, da jih zaradi rasti na potencialno in pogojno potencialno naravnih avtohtonih smrekovih rastiščih lahko obravnavamo kot prilagojene rastišču in s tega vidika tudi avtohtone.

Preglednica 1: Raziskovalni objekti smreke v Sloveniji in na Hrvaškem

Table 1: Survey of site characteristics of analysed spruce populations in Slovenia and Croatia

Številka Populacije Population Number	Populacija Population	Območje Location	Nadmorska višina (m) Altitude (m)	Fitocenološka združba Phytocoenological association
1	Šijec	Pokljuka	1200	<i>Rhytidiadelpho lorei-Piceetum</i>
2	Tonetova bajta	Pokljuka	1150	<i>Rhytidiadelpho lorei-Piceetum</i> , <i>Sphagno-Piceetum</i>
3	Lipanca	Pokljuka	1400-1500	<i>Adenostylo glabrae-Piceetum</i>
4	Blatni greben	Jelovica	1050	<i>Sphagno-Piceetum</i>
5	Ledine	Jelovica	1150	<i>Rhytidiadelpho lorei-Piceetum</i> , <i>Sphagno Piceetum</i>
6	Lipniška planina	Jelovica	1300	<i>Rhytidiadelpho lorei Piceetum</i> , <i>Sphagno-Piceetum</i>
7	Veliki vrh	Karavanke	1400-1500	<i>Rhytidiadelpho lorei-Piceetum</i>
8	Planina Pungrat	Karavanke	1400-1500	<i>Adenostylo glabrae-Piceetum</i>
9	Robanov kot	Kam. – Sav. Alpe	800	<i>Laburno-Piceetum</i>
10	Dleškovaška planota -Veža	Kam. – Sav. Alpe	1500	<i>Adenostylo glabrae-Piceetum</i> <i>laricetosum</i>
11	Velika planina	Kam. – Savi. Alpe	1600	<i>Adenostylo glabrae-Piceetum</i>
12	Črno jezero	Pohorje	1200	<i>Rhytidiadelpho lorei-Piceetum</i> , <i>Sphagno-Piceetum</i>
13	Trije žebli	Pohorje	1300	<i>Sphagno-Piceetum</i>
14	Komisija	Pohorje	1300-1400	<i>Luzulo sylvaticae-Piceetum</i>
15	Skrivni hriber	Pohorje	1300-1400	<i>Luzulo sylvaticae-Piceetum</i>
16	Smrečje	Trnovski gozd	1050-1100	<i>Stellario montanae-Piceetum</i>
17	Smrekova draga	Trnovski gozd	1100-1150	<i>Lonicero caeruleae-Piceetum</i>
18	Grda draga	Snežnik	1150-1200	<i>Hacquetio-Piceetum</i>
19	Pod Tršarjevimi rastišči	Snežnik	1200	<i>Lonicero caeruleae-Piceetum</i>
20	Velika padežnica	Snežnik	1200	<i>Hacquetio-Piceetum</i>
21	Grčovec	Snežnik	1200-1250	<i>Lonicero caeruleae-Piceetum</i>
22	Goteniški Snežnik	Got. Snežnik	1250-1300	<i>Ribeso alpini-Piceetum</i>
23	Smrekova draga (HR)	Gorski Kotar	1100-1200	<i>Aremonio-Piceetum</i>
24	Matič poljana (HR)	Velika Kapela	900-1050	<i>Aremonio-Piceetum</i>
25	Štirovača (HR)	Velebit	1100-1250	<i>Aremonio-Piceetum</i>
26	Veliki Lom (HR)	Velebit	1300	<i>Adenostylo glabrae-Piceetum</i> <i>adenostyletosum alliariae</i>



Slika 2: Lokacije vzorčenih populacij smreke v Sloveniji

Figure 2: Location of Norway spruce populations sampled in Slovenia

V raziskave je bilo vključenih od 50 do 70 zrelih dreves s posamezne ploskve. Vzorec sestavljajo vitalna, nadrasla oziroma sorasla drevesa različne starosti (večinoma od 100 do 200 let). V vzorec smo zajeli naključna drevesa, večinoma na najmanj 30-metrski medsebojni oddaljenosti. Skupaj smo vzorčili 1432 dreves. Z vsakega od poskusnih dreves smo v zimskem obdobju odvzeli vejo s spečimi popki in le-te uporabili kot izhodiščni material za pripravo encimskih izvlečkov.

Populacije smreke smo analizirali z metodo izoencimske horizontalne elektroforeze na škrobnem gelu. Ekstrakcijski pufer za elektroforetske analize popkov smo pripravili po RHODES 1977 (modif. KONNERT / MAURER 1995). Elektroforezo, barvanje gelov in odčitavanje elektroforegramov smo opravljali po standardnih metodoloških postopkih za analizo smrekovih vzorcev (KONNERT / MAURER 1995). Analizirali smo 10 encimskih sistemov, ki so kodirani s petnajstimi v analizi polimorfnimi genskimi lokusi.

Kot polimorfen lokus smo upoštevali vsak genski lokus, na katerem smo ugotovili vsaj še en alel, ne glede na njegovo relativno pogostost v populaciji.

Preglednica 2: Analizirani genski lokusi

Table 2: Gene loci analysed

Encimski sistem <i>Enzyme system</i>	E.C. koda <i>E.C.number</i>	Analizirani genski lokusi <i>Analysed gene loci</i>
Fluorescenčne esteraze <i>Flourescent esterase (FEST)</i>	3.1.1.1	FEST-B
Glutamat dehidrogenaza <i>Glutamate dehydrogenase (GDH)</i>	1.4.1.2	GDH-A
Glutamat oksalacetat transaminaza <i>Glutamate oxalate transaminase (GOT, AAT)</i>	2.6.1.1	GOT-A, GOT-B, GOT-C
Izocitrat dehidrogenaza <i>Isocitrate dehydrogenase (IDH)</i>	1.1.1.42	IDH-A, IDH-B
Levcin aminopeptidaza <i>Leucine aminopeptidase (LAP)</i>	3.4.11.1	LAP-B
Malat dehidrogenaza <i>Malate dehydrogenase (MDH)</i>	1.1.1.37	MDH-B, MDH-C
Fosfoglukoza izomeraza <i>Phosphoglucose isomerase (PGI)</i>	5.3.1.9	PGI-B
Fosfoglukomutaza <i>Phosphoglucomutase (PGM)</i>	2.7.5.1	PGM-A
Šikimat dehidrogenaza <i>Shikimate dehydrogenase (SKDH)</i>	1.1.1.25	SKDH-A
6-Fosfoglukonat dehidrogenaza <i>6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)</i>	1.1.1.44	6-PGDH-B, 6-PGDH-C

Rezultate izoencimskih analiz smo vrednotili z relativnimi frekvencami alelov, ki smo jih na posameznih genskih lokusih izračunali na osnovi diploidnih genotipov dreves. Razlike v genskih (alelnih) strukturah posameznih populacij smreke smo kvantificirali s pomočjo genetske razdalje d_0 po GREGORIUS (1974), ki smo jo izračunali kot:

$$d_0 = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n |x_i^k - y_i^k|$$

Pri tem sta x_i in y_i relativni pogostosti i - genetskega tipa (alela) primerjanih populacij, n pa število alelov lokusa. Pri polni skladnosti alelnih struktur je genetska razdalja d_0 med populacijama enaka 0 in je 1 (ali 100 %) v primeru popolne različnosti.

Matriko genetskih razdalj, izračunanih po GREGORIUS (1974), smo interpretirali tudi s pomočjo hierarhičnega združevanja v skupine. Za interpretacijo smo uporabili Wardovo metodo, ki temelji na minimalni razliki variance znotraj posameznih skupin ali klastrov, in metodo neponderirane aritmetične sredine (UPGMA). Za izračun genetskih razdalj med populacijami smo uporabili program GSED (GILLET 1998). Hierarhično klastersko analizo smo napravili s programom STATISTICA.

3 REZULTATI

RESULTS

Diferenciacijo med posameznimi populacijskimi pari na vsakem posameznem lokusu merimo v deležu alelov, ki si jih populaciji med seboj ne delita in jih prikazujemo s povprečnimi genetskimi razdaljami za genski sklad 15 polimorfnih lokusov skupaj v preglednici št. 3.

Preglednica 3: Genetska diferenciacija med posameznimi populacijami smreke s prikazom povprečne alelne genetske razdalje d_0 za 15 polimorfni lokusov v %

Table 3: The average allelic genetic distances d_0 (%) between sampled spruce populations presented for a 15 loci gene pool

Pop.		15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	14	3,5	3,6	4,3	4,9	4,4	4,6	4,4	4,6	5,2	5,2	6,7	5,9	
	15		3,7	5,0	3,2	3,1	3,5	2,8	3,9	3,3	3,6	4,7	3,9	
	16			5,0	4,2	4,5	5,9	3,7	5,4	4,8	6,2	5,1	5,5	
	1				17	4,1	5,6	5,8	4,6	5,2	6,0	4,6	7,3	6,8
2	2,1	2				18	4,6	4,2	2,5	4,1	4,5	4,7	5,8	5,0
3	4,0	4,2	3				19	4,1	3,8	3,9	3,8	4,9	5,8	4,5
4	3,1	3,6	3,0	4				20	4,3	3,6	3,7	3,7	5,6	3,8
5	3,2	3,9	4,6	2,9	5				21	3,3	3,7	4,5	5,0	4,9
6	3,9	4,6	4,6	3,7	4,5	6				22	4,2	3,0	6,6	4,0
7	4,1	4,3	3,9	3,5	3,2	4,6	7				23	4,3	4,7	3,4
8	4,0	4,1	4,9	4,0	4,4	4,4	4,7	8				24	5,7	3,7
9	5,0	4,9	3,1	3,2	4,1	5,0	4,1	4,8	9				25	5,4
10	3,3	3,8	3,7	2,8	2,7	3,7	2,9	4,9	3,8	10				26
11	3,3	3,2	4,8	3,7	3,9	4,4	4,4	3,2	4,6	3,8	11			
12	4,8	5,3	3,7	3,7	5,0	4,9	5,5	3,6	4,1	4,7	4,6	12		
13	4,1	4,1	5,1	4,4	4,3	3,9	4,3	3,8	4,7	4,2	3,6	4,1	13	
14	4,4	5,1	3,5	3,7	4,0	3,7	3,9	3,8	3,7	3,9	4,7	3,8	4,2	
15	3,6	3,6	3,7	3,4	2,8	3,9	3,1	4,1	4,1	3,2	3,8	4,1	3,0	
16	3,2	3,6	3,6	3,9	4,3	5,0	4,1	3,1	4,6	4,1	3,6	3,6	3,6	
17	4,4	4,8	3,5	2,8	4,6	3,6	4,1	4,8	3,1	3,5	4,2	4,9	4,6	
18	3,1	3,2	4,8	3,3	3,5	3,8	4,5	3,8	4,5	3,1	2,9	4,1	3,4	
19	4,4	4,8	4,7	4,2	4,3	5,3	3,4	5,1	5,0	4,0	5,0	5,5	4,6	
20	4,5	5,5	6,1	4,7	3,0	4,6	3,7	5,2	5,0	3,8	5,2	5,7	4,5	
21	3,4	3,5	3,7	3,0	3,7	4,1	3,8	4,4	4,1	2,9	3,3	3,8	3,5	
22	4,6	4,6	4,7	3,9	4,1	4,9	4,1	6,3	4,7	3,2	4,8	5,3	4,7	
23	3,9	4,6	5,5	4,3	3,9	4,5	4,1	5,0	5,6	4,1	5,0	5,5	4,1	
24	5,4	5,7	4,6	3,9	4,4	4,9	4,3	6,2	4,5	3,7	5,8	5,8	5,1	
25	5,0	5,3	6,3	5,7	5,0	6,8	4,9	6,5	6,8	5,1	5,3	7,1	5,4	
26	4,6	5,4	6,1	5,4	4,0	5,5	4,5	5,5	6,3	4,4	4,8	6,5	4,9	

Legenda: Pop. – populacije smreke (za opis populacij glej preglednico 1)

Legend: Pop. – spruce populations (for description of populations see Table 1)

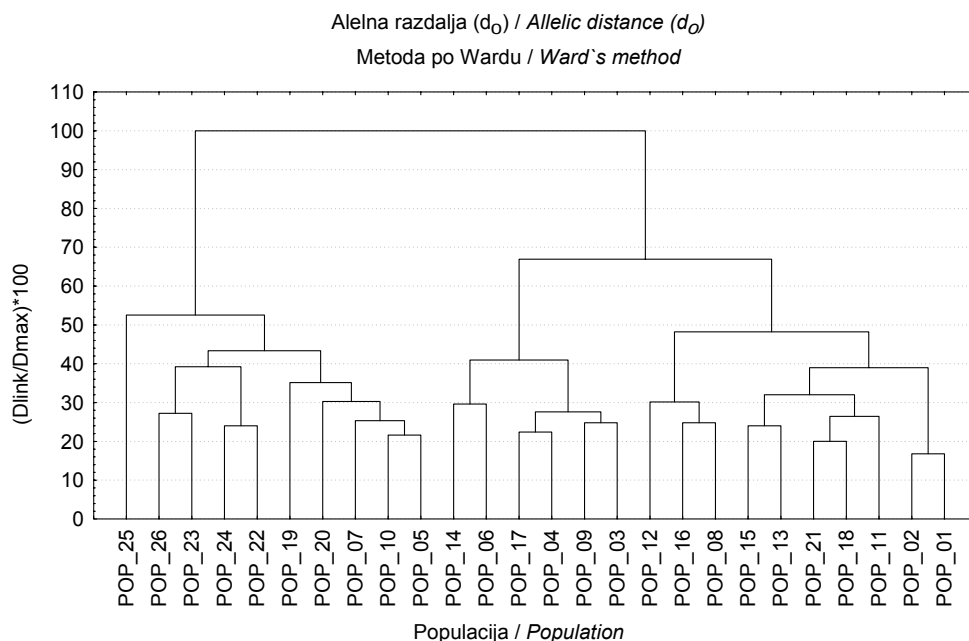
Vrednosti povprečnih genetskih razdalj genskega sklada 15 lokusov se sučejo med 2,1 % (par 1-2) in 7,3 % (par 17-25), pri tem je okoli 78 % teh vrednosti med 3 in 5, samo 3 % je manjših od 3 in okoli 19 % večjih kot 5. Stopnja genetske diferenciranosti med populacijami smreke je relativno majhna. Delež alelov, ki si jih populacije med seboj ne delijo, znaša od 2,1 % do 7,3 % (v Sloveniji do 6,3 %). Vrednosti nakazujejo precejšno homogenost genetskih razdalj na celotnem območju raziskovanja. V nasprotju z relativno nizkimi in homogenimi vrednostmi genetskih razdalj, ki smo jih pridobili z izračunom povprečnih vrednosti za vseh 15 polimorfnih genskih lokusov skupaj, ugotavljamo za posamezne lokuse tudi visoke in zelo heterogene vrednosti genetskih razdalj (d_0). Največje in najmanjše alelne genetske razdalje d_0 med posameznimi vzorčenimi populacijami smreke po genskih lokusih so prikazane v preglednici št. 4.

Preglednica 4: Največje in najmanjše alelne genetske razdalje d_0 med posameznimi vzorčenimi populacijami smreke po lokusih

Table 4: *Maximum and minimum allelic genetic distances d_0 between sampled spruce populations by loci*

Lokus	Najmanjša d_0	Npr.	Največja d_0	Npr.
<i>Locus</i>	<i>Minimum d_0</i>	<i>For example</i>	<i>Maximum d_0</i>	<i>For example</i>
LAP-B	0,015	(par / pair 1-2)	0,225	(par / pair 7-12)
GOT-C	0,001	(par / pair 7-8)	0,321	(par / pair 17-23)
PGM-A	0,000	(par / pair 2-8)	0,169	(par / pair 6-16)
PGI-B	0,002	(par / pair 4-16)	0,233	(par / pair 2-26)
SKDH-A	0,008	(par / pair 7-9)	0,186	(par / pair 3-19)
6PGDH-B	0,000	(par / pair 3-10)	0,278	(par / pair 11-24)
6PGDH-C	0,000	(par / pair 2-25)	0,205	(par / pair 8-20)
FEST-B	0,000	(par / pair 1-2)	0,280	(par / pair 21-25)

Matriko povprečnih genetskih razdalj (d_0) med populacijami smo interpretirali tudi s pomočjo metod hierarhične klastrske analize. Merilo za relativno podobnost oblikovanih skupin so vrednosti povprečnih genetskih razdalj, ki jih navaja preglednica št. 3.



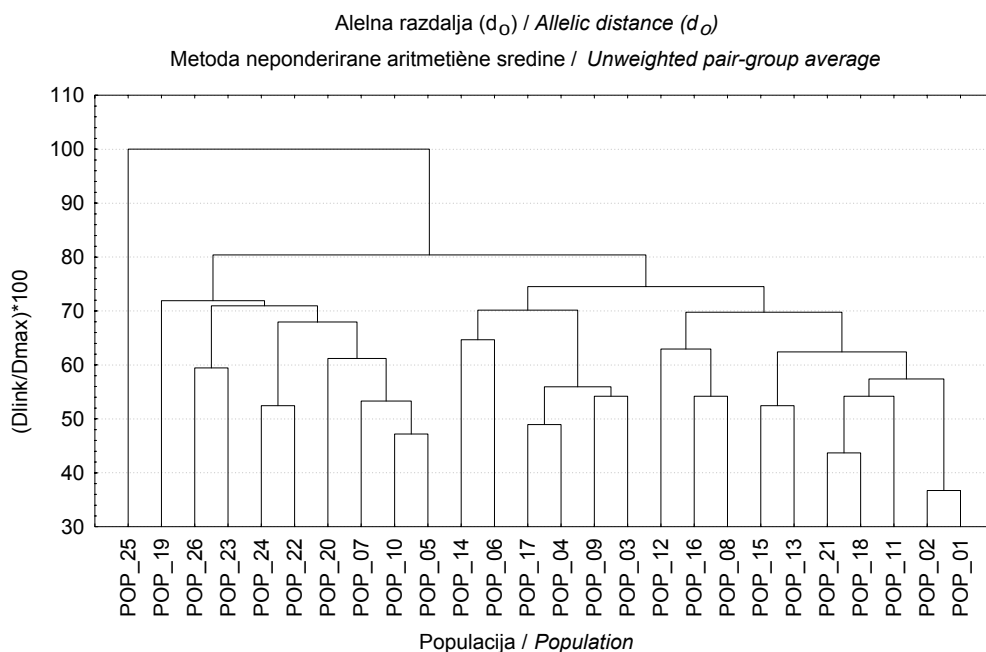
Slika 3: Prikaz rezultatov hierarhičnega združevanja v skupine z metodo po Wardu, izveden na osnovi povprečnih genetskih razdalj po Gregoriusu (1974), med 26 vzorčenimi populacijami smreke

Figure 3: Results of hierarchical cluster analysis with Ward's method based on the Gregorius (1974) genetic distances between sampled spruce populations

Iz dendrograma (slika 3) vidimo, da se populacije precej razločno združujejo v 3 večje skupine. Prvo skupino sestavljajo predvsem populacije iz osrednjega dinarskega fitogeografskega območja: Snežnik (19, 20) in Goteniški Snežnik (22) v Sloveniji, na Hrvaškem pa Gorski Kotar (23), Velika Kapela (24) in Velebit (25, 26). Poleg navedenih so v prvi skupini še posamezne populacije iz Karavank (7), Kamniško-Savinjskih Alp (10) in z Jelovice (5). Prva skupina se dalje razčleni v dve homogenejši podskupini in na populacijo 25 (Štirovača / Velebit), ki je izolirana ter se skupini pridruži najkasneje. To je lahko dokaz njene genetske različnosti. Populacije z alpskim poreklom (5, 7 in 10) gradijo skupinico, ki je znotraj podskupine povezana s snežniškimi populacijami. V drugo in tretjo večjo skupino se razvrščajo predvsem populacije iz alpskega fitogeografskega območja in Trnovskega gozda. V drugi skupini so populacije 3, 4, 6, 9, 14 ter populacija 17 (Smrekova draga / Trnovski gozd). Močno se razlikujeta populaciji 6

in 14. V tretji skupini so glede na geografsko lego zelo različne populacije. So z območja Pohorja (12, 13, 15), Kamniško-Savinjskih Alp (11), Karavank (8), Pokljuke (1, 2), Trnovskega gozda (16) ter Snežnika (18, 21). Obe dinarski populaciji s Snežnika sta si genetsko podobni. Enako velja tudi za obe poključki populaciji. V tretji skupini je opazna tudi izolacija populacij 6, 12, 16 od populacij 15, 13, 18, 21, 11, 1, 2. Podobnost med skupinami je bistveno manjša kot znotraj njih. Pri tem sta si druga in tretja skupina genetsko podobnejši, medtem ko se od obeh opazno razlikuje prva skupina.

Podobne rezultate smo pri klasterski analizi dobili tudi z metodo neponderirane aritmetične sredine (UPGMA).



Slika 4: Prikaz rezultatov hierarhičnega združevanja v skupine z metodo UPGMA, napravljen na osnovi povprečnih genetskih razdalj po Gregoriusu (1974), med 26 vzorčenimi populacijami smreke

Figure 4: Results of hierarchical cluster analysis by the UPGMA method based on the Gregorius (1974) genetic distances between 26 sampled spruce populations

Zgradba skupin (klastrov) je podobna, kot smo jo ugotovili s pomočjo metode po Wardu. Posebej je treba omeniti le razliko, ki je opazna pri dinarskih populacijah. Populacija Štirovača na Velebitu (25) je samostojna enota in se izrazito razlikuje od vseh drugih preučevanih populacij alpskega in dinarskega porekla.

4 RAZPRAVA DISCUSSION

Genetske razlike med populacijami smreke so za preučevani genski sklad razmeroma majhne. Vrednosti povprečnih genetskih razdalj d_0 , ki smo jih izračunali po GREGORIUS (1974), se sučejo med 2,1 % in 7,3 % (v Sloveniji do 6,3 %). Klastrska analiza je pokazala združevanje populacij v dve razmeroma dobro razpoznavni skupini. Prva obsega predvsem populacije iz osrednjega dinarskega območja in vključuje še nekaj populacij iz alpskega območja. Druga, večja skupina pa obsega predvsem populacije alpskega fitogeografskega območja in populaciji iz Trnovskega gozda. Rezultati kažejo določene genetske razlike med smreko iz osrednje-dinarskega območja in alpskega območja s Trnovskim gozdom. Med obema skupinama ni ostre delitve, saj se posamezne populacije alpskega območja prekrivajo s severno-dinarskimi z območja Snežnika. Med vsemi populacijami se najbolj izrazito genetsko razlikuje populacija Štirovača (25) na Velebitu.

Manjšo genetsko diferenciranost smrekovih populacij na celotnem območju raziskovanja smemo pojasniti z dejstvom, da so se v relativno majhnem geografskem prostoru populacije razvijale podobno, zlasti glede na gozdno-zgodovinske procese (isti genski sklad, poledenodobni razvoj). V primeru obravnave relativno majhnih regij je na splošno povezava med genetskimi in geografskimi razdaljami pri gozdnih drevesnih vrstah majhna. Kajti izrazit pretok genov prek intenzivne porazdelitve peloda in semena (kar je tipično za gozdna drevesa) nevtralizira genetsko diferenciacijo (GOVINDARAJU 1988).

Razloge za genetsko diferenciacijo osrednje-dinarskih populacij od alpskih populacij in Trnovskega gozda, ki ima v fitogeografskem oziru prehodno lego med dinarskim in alpskim svetom (ZUPANČIČ 1980), je težko opredeliti. Do določene mere gotovo vplivajo tudi rastiščne razmere, ki se v alpskem in dinarskem svetu izrazito razlikujejo. S

tem so povezani tudi različni selekcijski dejavniki, vse to pa lahko vodi h genetsko različnemu razvoju populacij.

Posebnost večje genetske diferenciranosti populacije Štirovača iz Velebita lahko pojasnimo kot možno posledico razmeroma majhnega vzorca (50 osebkov) in/ali kot morebitno posledico osamljenosti oziroma izolacije in specifičnih selekcijskih procesov, ki jih je doživela smreka na tej lokaciji. Lokalna genetska diferenciranost populacij je lahko posledica genetskega drifta, ki je nastal zaradi zmanjševanja prvotne velikosti populacije, vplivov človeka pri gospodarjenju z gozdom, različnih rastiščnih vplivov in s tem povezanih različnih selekcijskih dejavnikov kakor tudi povezanosti preučevanih encimskih sistemov s prilagoditvenimi procesi v populaciji. Katera razlaga je v našem primeru pravilna, ne moremo zagotovo reči. Vseh teh možnosti oziroma vzrokov namreč ni mogoče podrobneje spoznati ter oceniti njihove vplive brez novih poglobljenih študij.

Pri oblikovanju zaključkov v zvezi z oceno genetske diferenciranosti smreke v Sloveniji je potrebna določena mera previdnosti. Pri preučevanju stopnje medpopulacijske genetske variabilnosti imajo analize izoencimov namreč omejeno uporabno vrednost. Omejitev izhaja iz dejstva, da lahko v laboratoriju histokemijsko obarvamo le manjše število encimov. Število izoencimskih lokusov, ki jih za genom posameznega drevesa lahko preučujemo le v redkih primerih, presega 25 (ERIKSSON / EKBERG 2001). Za celoten genom posameznega drevesa lahko z izoencimskimi analizami podajamo le grobe ocene. Trditev NAMKOONGA (1989), cit. po FINKELDEY (1993), da z izoencimskimi raziskavami ni mogoče popolnoma zajeti celotnega prostorskega porazdelitvenega vzorca genetske variacije gozdnih drevesnih vrst, je pri smreki v celoti potrjena. Raziskave variabilnosti kvantitativnih znakov so namreč potrdile, da je genetska variabilnost tako znotraj populacij kot tudi med populacijami smreke velika, če se obravnava nanaša na celotno območje razširjenosti (SCHMIDT-VOGT 1977, VIDA KOVIČ 1982). Nasprotno pa so do sedaj na encimskih genskih lokusih ugotovili veliko genetsko variabilnost znotraj populacij, medtem ko so bile razlike med populacijami v glavnem majhne (FINKELDEY 1993). Čeprav s pomočjo izoencimskih genskih označevalcev dobimo vpogled v le majhen del celotne genske informacije, pa so tako pridobljene informacije zelo pomembne za opredeljevanje genskih virov. Interpretacija genetske strukture na ravni populacije že omogoča spoznanja o vplivanju celovitih sprememb okolja na populacijo.

Odločitve, ki bi jih oblikovali na osnovi spoznanj te raziskave, bi pri varstvu gozdnih genskih virov smreke v Sloveniji *in situ* morale predvsem upoštevati, da je treba populacije osrednjega dinarskega fitogeografskega prostora obravnavati ločeno od populacij alpskega fitogeografskega območja. V izbiro ohranitvenih jeder je treba vključevati tudi populacije s krajevnimi značilnostmi, čeprav vzroki za njihovo genetsko diferenciacijo še niso natančno ugotovljeni.

5 SUMMARY

*The aim of the study was to evaluate the genetic differentiation of the indigenous Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) populations in Slovenia and to consider the following question: can we reveal, with the use of isoenzymes, the genetic differentiation between Alpine and Dinaric spruce populations?*

*Within the natural range of Norway spruce, 22 indigenous populations from Slovenia and 4 from Croatia were chosen. Each population was represented by a randomly selected 50 to 70 adult trees. The genetic differentiation of the Norway spruce populations was analysed by means of isozyme gene markers using starch electrophoresis as separation method. Enzyme extraction from buds was performed according to RHODES (1977). Electrophoresis conditions, staining, and genotyping followed KONNERT / MAURER (1995). The 10 enzyme systems with the following 15 coding gene loci were investigated: Glutamate dehydrogenase (*Gdh-A*), Glutamate oxalate transaminase (*GOT* or *AAT*, *Got-A*, *Got-B*, *Got-C*), Fluorescent esterase (*FEst-B*), Isocitrate dehydrogenase (*Idh-A*, *Idh-B*), Leucine aminopeptidase (*Lap-B*), Malate dehydrogenase (*Mdh-B*, *Mdh-C*), Phosphoglucose isomerase (*Pgi-B*), Phosphoglucomutase (*Pgm-A*), Shikimate dehydrogenase (*Skdh-A*), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (*6-Pgdh-B*, *6-Pgdh-C*). The genetic differences between populations were quantified by allelic genetic distances (d_0) after GREGORIUS (1974), calculated with the GSED-programme (GILLET 1998). The matrix of the average genetic distances between populations was interpreted with the aid of hierarchical cluster analysis after Ward, and by the method of un-weighted pair-group arithmetic average (UPGMA). The hierarchical cluster analysis was carried out by the STATISTICA programme.*

The results of the genetic study refer to the genotypes of 1432 trees at 15 polymorphic gene loci. The genetic differences between the populations of spruce are relatively small for the gene pool studied. The values of the average genetic distances d_0 , as calculated after GREGORIUS (1974) oscillate between 2.1 % and 7.3 % (in Slovenia up to 6.3 %). The indigenous Norway spruce populations from frost pockets and alti montane vegetation zone of Slovenia and Croatia did not show a strong genetic differentiation by isozyme gene markers. The results indicated a geographically dependent pooling of populations into two relatively well recognisable groups. The first includes populations from the Central Dinaric region and a few populations from the Alpine region. The second larger group includes, in particular, populations from the Alpine phytogeographical region and Trnovski gozd. However, there is no sharp division, since there are populations showing characteristics of both regions. The reasons for genetic differentiation of the Central Dinaric and Alpine populations with Trnovski gozd which, from the phytogeographical aspect has an intermediate position between the Dinaric and the Alpine regions (ZUPANČIČ 1980), is difficult to qualify. Specific site conditions, which greatly differ between the two regions, can have a certain impact. Among all the populations, the population from Štirovača on Velebit differs most. Higher genetic differentiation of the Štirovača / Velebit population may be a consequence of the relatively small sample size (50 trees), or isolation and specific selection processes to which spruce has been exposed on this particular location. Geographically based genetic differences between the populations of spruce from the Alpine and Dinaric regions in Slovenia and Croatia has implications for the protection of gene conservation units in both phytogeographical regions.

6 VIRI REFERENCES

- BERGMANN, F. 1991. Causes and consequences of species-specific genetic variation patterns in European forest tree species: Example of Norway spruce and silver fir. V: MUELLER-STARCK G./ ZIEHE, M. (ur.). Genetic variation in European populations of forest trees. – Frankfurt am Main, J. D. Sauerlaender's Verlag, s. 192-204.
- BORGHETTI, M. / GIANNINI, R./ MENOZZI, P. 1988. Geographic variation in cones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica*, 3: 178-184.

- BOŽIČ, G. / BRUS, R. / GOLOB, A. / GRECS, Z. / ROBIČ, D./ SMOLEJ, I./ ŽITNIK, S. / KRAIGHER, H. 2001. Management of mountain forests in Slovenia. V: TUROK, J. / MATYAS, CS. / FADY, B. / BORELLI, S. (ur.). EUFORGEN Conifers Network, Report of the First Meeting, 22-24 March, 2000, Brdo/Kranj, Slovenia. – Rome, EUFORGEN, International Plant Genetic Resource Institute, s. 25-33.
- BOŽIČ, G. / KONNERT, M. 2003. Population genetic differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in the Alps. V: JAVORNIK, B. / LUTHAR, Z. (ur.). Proceedings of Genetika 2003, 3rd Congress of the Genetic Society of Slovenia, Bled, May 31 – June 4, 2003. – Ljubljana, s. 90-91.
- BUCCI, G. / VENDRAMIN, G. G. 2000. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. -Molecular Ecology, 9: 923-934.
- CULIBERG, M. / ŠERCELJ, A. / ZUPANČIČ, M. 1981. Palinološke in fitocenološke raziskave na Ledinah na Jelovici. -Razprave, SAZU, IV, 23/6: 175-193
- CULIBERG, M. / DRUŠKOVIČ, B. / KOTAR, M. / LOVKA, M. / ŠERCELJ, A. / ZUPANČIČ, M. / ŽAGAR, V. 1999. Smreka (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji. – Ljubljana, Biološki inštitut Jovana Hadžija ZRC SAZU, 180 s.
- ERIKSSON, G. / EKBERG, I. 2001. An introduction to Forest Genetics. - Uppsala, SLU, 166 s.
- FINKELDEY, R. 1993. Die Bedeutung allelischer Profile fuer die Konservierung genetischer Ressourcen bei Waldbaeumen. - Goett. Forstgenet. Bericht, 14, 176 s.
- GIANNINI, R. / MORGANTE, M. / VENDRAMIN, G. G. 1991. Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. - Silvae Genetica, 40: 160-166.
- GILLET E. M. 1998. GSED – Genetic Structures from Electrophoresis Data. Version 1.1. – Goettingen, Institut fuer Forstgenetik und Forstpflanzenzuechtung, Universitaet Goettingen, 48 s.
- GOVINDARAJU, D. R. 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. - Oikos, 52: 31-35.
- Gozd in gozdarstvo Slovenije. 1998. – Ljubljana, Zveza gozdarskih društev Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike slovenije, Zavod za gozdove Slovenije, 23 s.
- GREGORIUS, H. R. 1974. Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. - Silvae Genetica, 23: 22-27.

- KONNERT, M. / MAURER, W. 1995. Isozymic Investigations on Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European Silver Fir (*Abies alba* Mill.). A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation. –Teisendorf, Bayerische Landesanstalt fuer forstliche Saat- und Pflanzenzucht, 79 s.
- KOSKI, V./ SKROPPA, T. / PAULE, L. / WOLF, H. / TUROK, J. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). – Rome, EUFORGEN, International Plant Genetic Resource Institute, 42 s.
- KRAL, F. 1977. Vebreitungsgeichte der Fichte in Alpenraum. V: SCHMIDT-VOGT H. (ur.). Die Fichte. Taxonomie, Verbreitung, Morphologie, Okologie, Waldgesellschaften, Band 1: 180-186.
- LANGERCRANTZ, U. / RYMAN, N. 1990. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morfological and allozymic variation. *Evolution*, 44: 38-53.
- Letno poročilo. 1998. – Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, 36 s.
- MAGINI, E. / PELIZZO, A. / PROIETTI PLACIDI, A. M. / TONARELLI, F. 1980. La picea dell'Alpe delle Tre Potenze. Areale-Caratteristiche-Posizione sistematica. - *Annali Accademia Italiene Scienze Forestali*, XXIX: 107-210.
- MORGANTE M., VENDRAMIN G. G. 1991. Genetic variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. and *Pinus leucodermis* Ant. V: MÜLLER-STARCK G., ZIEHE M. (ur.). Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. - Frankfurt am Main, J. D. Sauerländer's Verlag: 205-227.
- MUELLER-STARCK, G. / BRADAT, P. / BERGMANN, F. 1992. Genetic Variation within European tree species. - *New Forests*, 6: 27-47
- RHODES, M. J. C. 1977. The extraction and purification of enzymes from plant tissues. - *Proceedings of the Biochemical Society*, 14: 254-248.
- SPERISEN, C. / BUCHLER, U. / MATYAS, G. 1998. Genetic variation of mitochondrial DNA reveals subdivision of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). V: KARP, A. / ISAAC, G. / INGRAM, D. (ur.). Molecular tools for screening biodiversity. Plant and animals. – London, Chapman and Hall: 413-417.
- SCHMIDT-VOGT, H. 1977. Die Fichte. Taxonomie, Verbreitung, Morphologie, Okologie, Waldgesellschaften, 1, 674 s.
- ŠERCELJ, A. 1996. Začetki in razvoj gozdov v Sloveniji. - Ljubljana, Slovenska akademija znanosti in umetnosti, IV, 35, 142 s.
- Šumarska enciklopedija. 1987. Šumske zajednice Jugoslavije. – Drugo izdanje, Zagreb, Jugoslavenski leksikografski zavod Miroslav Krleža, 372-430.

- VENDRAMIN, G. G. / ANZIDEI, A. / MADAGHIELE, A. / SPERISEN C. / BUCCI, G. 2000. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 43: 68-78.
- VIDAKOVIĆ, M. 1982. Četinjače - morfologija i varijabilnost. – Zagreb, Biblioteka znanstvenih radova, JAZU, Sveučilišna naklada Liber, 705 s.
- ZUPANČIČ, M. 1980. Smrekovi gozdovi v mraziščih dinarskega gorstva Slovenije. – Ljubljana, Dela, 4.r., SAZU, 24/7, 262 s.
- ZUPANČIČ, M. 1999. Smrekovi gozdovi Slovenije. – Ljubljana, Dela, 4. r., SAZU, 36, 222 s.
- ŽITNIK, S. 2001. *Picea abies* Karst. (Norway spruce / smreka). Karta. - Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije, Gozdarski inštitut Slovenije, 1 s. (dosegljiva pri Žitnik S., Gozdarski inštitut Slovenije)