

Zárójelentés az OTKA K101600 azonosítójú pályázathoz

Cím:

Eltérő származású, szélsőséges élőhelyű közép-kelet európai erdeifenyő (*Pinus sylvestris* L.) populációk térbeli genetikai mintázatának vizsgálata, adaptív jellegek nyomon követése: vegetáció és tájtörténeti vonatkozások a klimatikus korlátok mentén

Eredményeinket a pályázatban felvetett hipotézisek sorrendjében kívánom bemutatni.

1. A Kárpát-medence és a Keleti-Kárpátok peremhelyzetű erdeifenyő populációit a faj kiterjedt areáját lefedő korábbi molekuláris alapú fajtörténeti munkákba nem vonták be, pedig ezek a reliktum populációk éppen a déli, kritikus klimatikus határvonalon élnek és a faj szempontjából fontos, eddig ismeretlen genetikai információt őrizhettek meg.

A vizsgálatok során összesen 20 eltérő származású és élőhelyű erdeifenyő populáció (421 egyed) genetikai variabilitását elemeztük, 4 kloroplasztisz és 8 nukleáris mikroszatellit (SSR) markerrel. A pályázatban tervezett 8 populáció helyett végül 18 populációt sikerült begyűjteni, lefedve ezzel a teljes Kárpáti-Pannon térséget. Két populációt gyűjtöttünk referenciaképpen a faj areájának északi (Észtország) és déli (Rila hegység, Bulgária) területeiről (1. táblázat). A populációk természetes állományokból, többnyire védett területekről származtak.

Eredményeink rámutattak arra, hogy a vizsgált populációk genetikai mutatói nagymértékben hasonlítottak más periferiális erdeifenyő populációk mutatóihoz. Bár az eltérő mintaszám és különböző számú marker miatt a számszerű összehasonlítás csak óvatosan kezelendő megállapítottuk, hogy a nukleáris SSR alapján a mutatók hasonlóan alakultak a balkáni hegységi populációkhoz (Naydenov 2011), de alacsonyabbak voltak azokhoz képest, melyet az Apenninekből és a Dél-Alpokból közöltek (Scalfi et al. 2009). A kloroplasztisz mintázat alapján meglepő módon az általunk vizsgált populációk alacsonyabb diverzitást őriztek meg, mint az olaszországi és spanyolországi perempopulációk (Scalfi et al. 2009 és Robledo-Arnuncio et al. 2005). Ezek az eredmények a populációink izoláltságára, és a populációk közötti alacsonyabb mértékű génáramlásra utalhatnak. Ugyanakkor néhány kivétellel beltenyésztésre vagy recens palacknyak effektusra utaló jeleket nem találtunk, bár tudjuk, hogy a fenyők hosszú életciklusa, lassú generációváltása az izoláció jeleinek késleltetését vonja maga után.

2. A korábbi kutatások rámutattak arra, hogy az európai reliktum jellegű, tajgaerdő-alkotó fenyőfajoknak (*Picea abies*, *Pinus cembra*) a Kárpáti-Pannon térségben jelentős refugiumai voltak. A luc bizonyítottan az utolsó glaciális maximum (LGM) idején reliktum populációkkal rendelkezett a Déli-Kárpátokban, és innen alig terjedt tovább. A cirbolyafenyő kloroplasztisz alapú populáció mintázata pedig jelentősen eltért az Alpok populációitól.

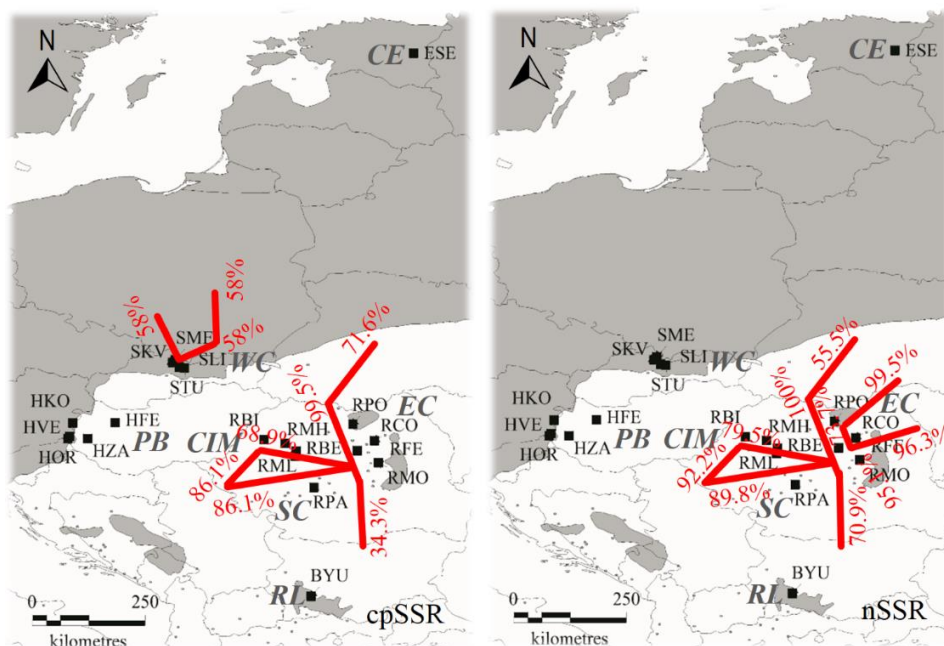
Erős genetikai barrieréket tudtunk kimutatni mindkét marker típussal, elsősorban a Kárpátok területén, ahol a Tatra és a Keleti-Kárpátok populációinak génanyaga szignifikánsan elkülönült (1. 2. és 3. ábrák). A filogeográfiai mintázat, mint ahogy várható volt, különbözött a kétféle marker alapján is. A fenyők esetében a kloroplasztisz DNS pollennel (apai úton) közvetített, míg a nukleáris DNS anyai úton, a mag által örökölt. Meglepő a Keleti-Kárpátok mintázata, ahol élőhelyi elkülönülést is tapasztaltunk, a Gyergyói havasok sziklai populációja szignifikáns különbséget mutatott a földrajzilag legközelebbi lápi populációktól. Bár további vizsgálatok kellene e tény tisztázásához, nem zárható ki, hogy az eltérő élőhely okozta elkülönülésről lehet szó (bár nem kódoló markereket alkalmaztunk, a kapcsoltan öröklődő DNS régiók miatt az adaptív elkülönülés jelei nem zárhatók ki). Az élőhelyi elkülönülés azonban a nagy területeken szóródó pollenek kloroplasztisz DNS-vel már nem volt kimutatható. A Keleti-Kárpátok tözegmoha lápjainak populációi, így a Mohos, a szentimrei Lucs vagy a Kelemen havasok északi peremén fekvő Poiana Stampei szignifikánsan hasonló volt az északi észt és a déli, bulgáriai populációkhoz. Nem zárható ki, hogy a Keleti-Kárpátok a dél-északi migrációs útvonal

egyik refugium állomásaként értelmezhető. A magyarországi erdeifenyő populációk egymástól nem különültek el, és a nukleáris markerek alapján (2. ábra), valamint a haplotípus frekvenciák eloszlásában (4. ábra) is a tátrai populációkkal mutattak hasonlóságot. A kloroplasztisz DNS variabilitásból számított BAPS analízis két nagy csoportot különített el. Ugyanakkor a szlovákiai Medzi bormi tőzegláp populációja a kloroplasztisz SSR alapján teljesen különállónak bizonyult, ami a lápból korábban jelzett *Pinus x rhaetica* (*Pinus mugo* és *P. sylvestris*) hibrid egyedek jelenlétét tárta föl. A vizsgált erdeifenyő populációk filogeográfiai eredményei megerősítik azt a differenciáltságot, amelyet korábban más hegyvidéki fajok esetében is jeleztek a Tátra és a Keleti-Kárpátok között, és felhívja a figyelmet arra, hogy a Kárpátok területén eltérő pleisztocéni refugiumok léteztek. Egyik refugium a Kelet-Alpok térség és a Pannon medence környékén valószínűsíthető, másik pedig a Keleti Kárpátok területén. Ezt a tényt palinológiai vizsgálatok is alátámasztják.

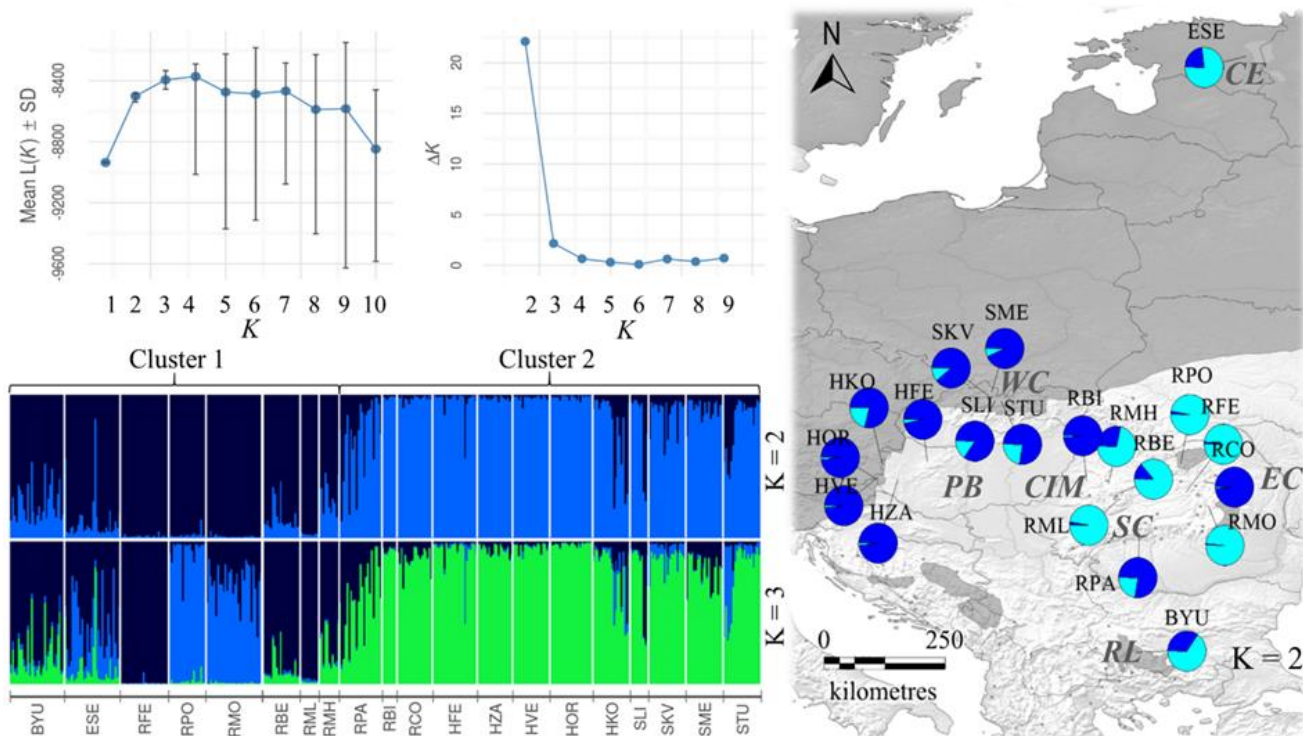
A filogeográfiai eredményeket egy kéziratban foglaltuk össze és a Tree Genetics and Genomes nevű Q1-es folyóirathoz nyújtottuk be. A kéziratot 2016-ban 'major revision'-re javasolták, amelyet már megtettünk, így várjuk a cikk végleges elfogadását. Eredményeink feldolgozása előtt az erdeifenyő filogeográfiai irodalmának kritikai feldolgozását is elvégeztük, melyről írt cikkünk a Journal of Forestry Research Q2-es lapban publikálás alatt van (Ref.: Ms. No. JFR-D-16-00388R1).

1. táblázat: A vizsgált erdeifenyő populációk paraméterei

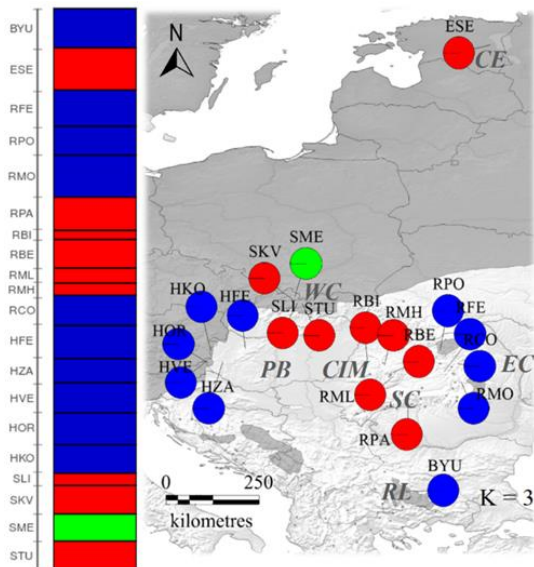
Code	Country	Region	Residential area	Latitude (°N)	Longitude (°E)	Altitude (m a.s.l.)	Est. area (km ²)	Samples	Comments
BYU	Bulgaria	RL	Yundola	42.07	23.83	1561	>5.00	29	Montane forest
ESE	Estonia	CE	Selgise	58.58	27.00	102	>5.00	30	Peatbog
HFE	Hungary	PB	Fenyőfő	47.35	17.77	252	4.49	24	Mixed forest
HVE	Hungary	PB	Pethőhenye	46.87	16.92	306	0.04	19	Mixed forest
HZA	Hungary	PB	Szalafő	46.87	16.30	231	0.08	20	Mixed forest
HOR	Hungary	PB	Csörötnék	46.93	16.35	296	0.10	23	Mixed forest
HKO	Hungary	PB	Kőszeg	47.34	16.45	468	0.24	20	Rock surface
SKV	Slovakia	WC	Kvacany	49.18	19.54	799	0.48	20	Rock surface
SME	Slovakia	WC	Zuberec	49.27	19.63	815	0.07	20	Peatbog
STU	Slovakia	WC	Svarin	49.02	19.91	1107	0.70	20	Rock surface
SLI	Slovakia	WC	Liptovszky						
SLI	Slovakia		Hrádok	49.04	19.74	729	0.02	10	Rock surface
RFE	Romania	EC	Fantana Brazilor	46.50	25.26	953	0.32	26	Peatbog
RPO	Romania	EC	Poiana Stampei	47.30	25.12	878	1.43	20	Peatbog
RMO	Romania	EC	Baile Tusnad	46.13	25.91	1052	0.58	29	Peatbog
RCO	Romania	EC	Lacu rosu, Bicz	46.80	25.79	981	0.04	19	Rock surface
RPA	Romania	SC	Voineasa	45.38	23.91	753	3.42	23	Rock surface
RBI	Romania	CIM	Biharrósa	46.84	22.37	393	0.13	8	Rock surface
RBE	Romania	CIM	Posaga de sus	46.49	23.36	524	0.84	20	Rock surface
RML	Romania	CIM	Ponor	46.33	23.34	925	0.10	10	Peatbog
RMH	Romania	CIM	Calatele	46.73	23.02	913	0.58	11	Peatbog



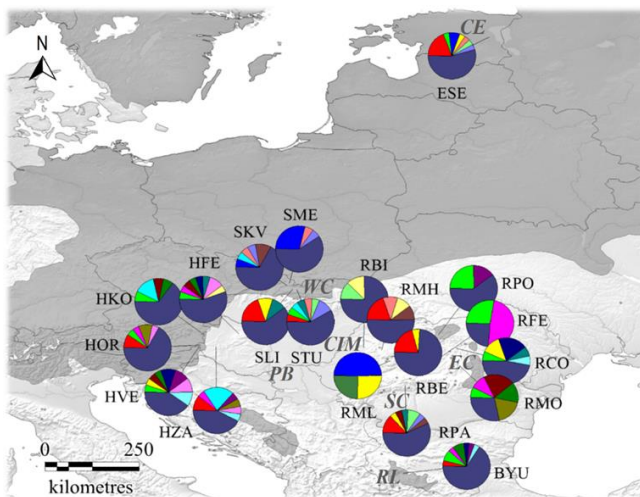
1. ábra: Legvalószínűbb genetikai barrierék kloroplasztisz (cpSSR) és nukleáris mikroszatellittekkel (nSSR) Barrier analízis alapján (Manni et al. 2004), rövidítések az 1. táblázat szerint. (a TGG folyóiratba benyújtott kéziratunk nyomán).



2. ábra: Nukleáris mikroszatellit alapú, STRUCTURE analízissel végzett csoportosítás (K=2, K=3,) 20 erdeifenyő populáció esetében a TGG folyóiratba benyújtott kéziratunk nyomán, (rövidítések az 1. táblázat szerint).

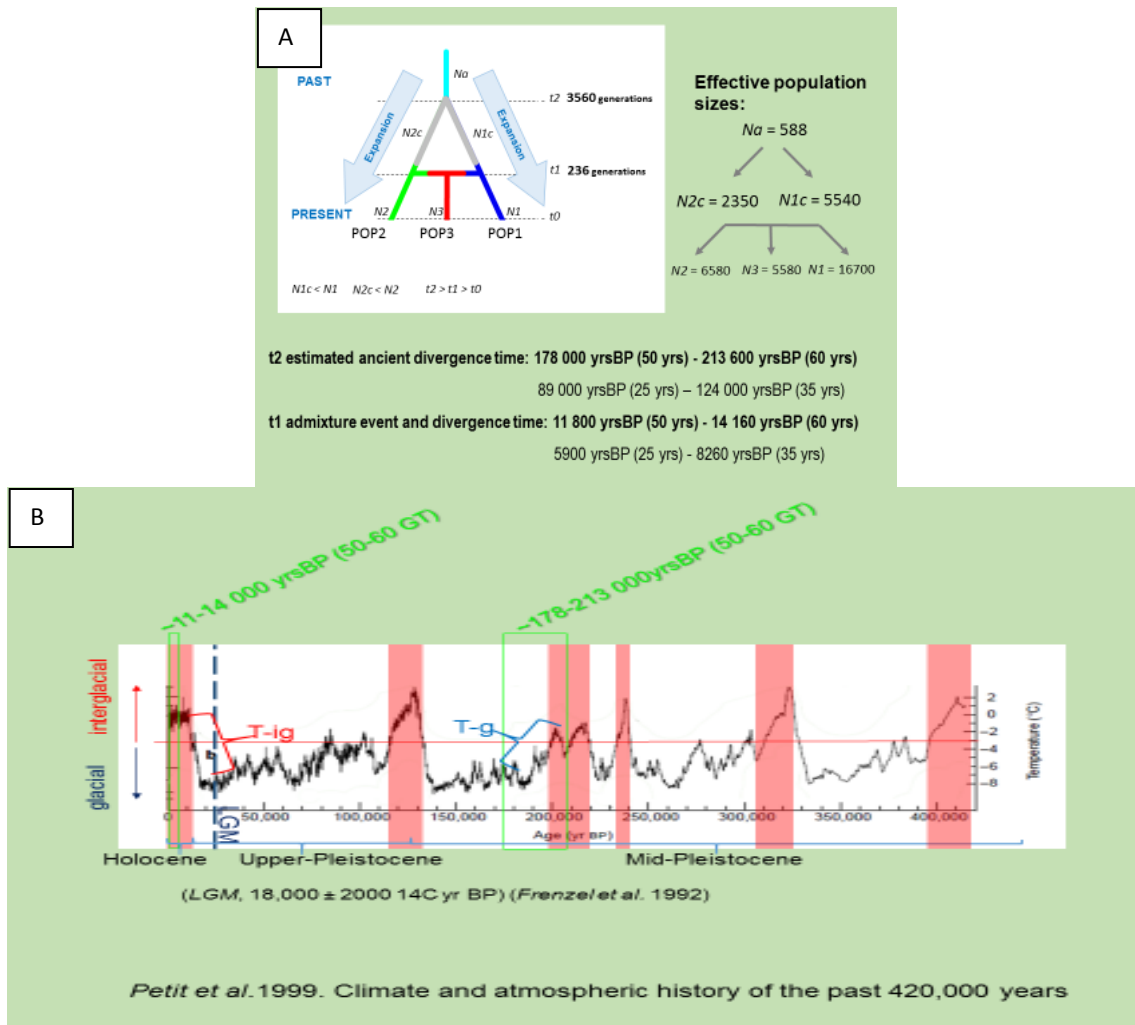


3. ábra Kloroplasztisz mikroszatellit alapú BAPS analízissel végzett legvalószínűbb csoportosítás (K=3) 20 erdeifenyő populáció esetében, a TGG folyóiratba benyújtott kéziratunk nyomán. (rövidítések az 1. táblázat szerint)



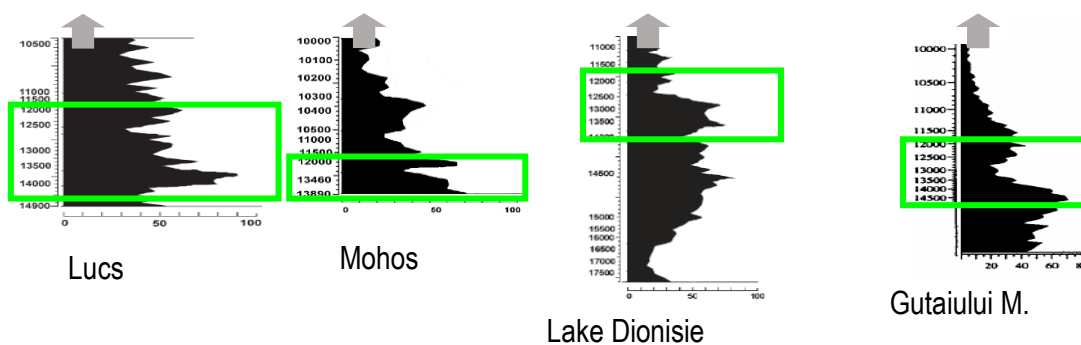
4. ábra: A leggyakoribb 20 kloroplasztisz SSR haplotípus eloszlása és részesedése az egyes populációkban, a TGG folyóiratba benyújtott kéziratunk nyomán. (rövidítések az 1. táblázat szerint)

A nukleáris mikroszatellitokkal feltérképezett mintázat felhasználásával a STRUCTURE csoportanalízis által felállított csoportokból DIY ABC (Approximate Bayesian Computation) modellkísérletet végeztünk (Cornuet et al 2014). A standard mikroszatellit mutációs ráta (10^{-3} – 10^{-4}) és az irodalmi adatokból vett generációs idő (MGT 5-100év) figyelembevételével 27 demográfiai modellt alkottunk és teszteltünk. A 93,9% valószínűségű modell alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált állományok divergenciája 3560 generációval korábban (t_2) a középső pleisztocén idejében mehetett végbe. Ettől az időponttól kezdve az erdeifenyő expanziója mutatható ki, amely a kedvező klímaviszonyok következtében, a korai holocén idején ($\sim 12\,000$ yBP) a jelenleg térben távoli populációk keveredéséhez vezethetett (t_1). Ez a késői keveredés és az ezt követő areadisjunkció egy jelenleg is zajló, recens feldarabolódás és izoláció jeleit sugallja (5A. ábra). A modell alapján valószínűsített demográfiai változásokat rávetítettük egy rendelkezésre álló makroklíma görbével (5B. ábra).



5. ábra: Nukleáris mikroszatellit alapú, ABC analízissel becsült demográfiai események: **A:** t1 és t2 időben a vizsgált erdeifenyő populációknál (50-60 év generációs idő és az Arabidopsis esetében becsült mikroszatellit mutációs ráta alapján), **B:** rávetítve egy publikált klímátörténeti változást bemutató ábrára.

A modell kiválóan illeszkedik a Kárpáti-Pannon térség területén feltárt pollenmintázatokhoz is, (6. ábra, Feurdean 2004, 2007, Tantau et al. 2006).



6. ábra: Az *Pinus* fajok korolt palinogramjához illesztett, az ABC modell alapján t1-időben történt populáció demográfiai esemény (~14000-12000yrBP)

Az eredmények első bemutatására 2015-ben, Firenzében került sor a nemzetközi IUFRO konferencián, de ezt követően leadott cikkünket eddig sajnos, visszautasították. A kézirat javítása a kritikai megjegyzések alapján jelenleg is folyamatban van.

3. Az újabb, erdeifenyőnél is vizsgált genetikai markerek (ESTs) közül néhányról bizonyították, hogy pozitív szelekciós nyomás alatt állnak, így a populációk ökológiai adaptációjában játszhatnak szerepet. Mivel az általunk vizsgálandó populációk igen különböző ökológiai háttérű, (láp, homok, szikla) izolált ökoszisztémákban maradtak fenn és valószínűleg eltérő történetük van, ezen markerek alkalmazása új eredményeket hozhat.

Az ökológiai háttér vizsgálatához a populációk élőhelyének ektomikorrhiza-közössége fajspektrumát molekuláris taxonómiai módszerekkel tervezzük összehasonlítani.

A fajtörténeti, filogeográfiai eredmények mellett az ESTs-szakaszok vizsgálatával epigenetikai és fenotípus expressziós hatások kimutatását várjuk. A klímaváltozás idején ezek az eredmények új vegetáció- és tájtörténeti ismeretekkel szolgálhatnak, amelyek segíthetik az erdészeti és tájtervezési feladatok megoldását is.

A periferián élő izolált populációk genetikai differenciáltsága nemcsak sztochasztikus események, mint például alapító hatás, drift vagy bottleneck láncolataként jöhet létre, hanem az adaptív variabilitáson bekövetkező természetes szelekció hatására is.

10 elszigetelt és extrém helyzetű (tőzeglápi és sziklai) természetes erdeifenyő (*Pinus sylvestris* L.) állomány populációgenetikai mintázatát és a lokális adaptációra utaló jelet stressztoleranciában szerepet játszó génjelöltek egy pontos nukleotid-polimorfizmusának (SNP) elemzésével vizsgáltuk. A génjelöltek kiválasztása, majd a gének tesztelése korábbi kutatók tapasztalatai alapján történt, Tóth Endre György doktorandusz munkájának eredményeként. A populációk SNP vizsgálata során 10 populációban (9-10 egyed/populáció) és a 12 kiválasztott génjelöltben (7. ábra), egyedenként 6128 bázis szűrésével 260 szubsztitúciós pozíciót sikerült detektálni.

BAYESCAN és ARLEQUIN szoftverekkel kiugró F_{ST} értékek, ún. outlierok analízise összesen 32 (21 és 23) szignifikáns frekvenciájú SNP-t határozott meg 11 génjelöltben. A génszintű szelekció tesztelésére alkalmazott neutralitási tesztek (Tajima D., Fu és Li D, valamint F), többségükben negatív értékeket mutattak. Az *erd3* és *rd21A* géneknél az érték szignifikáns volt, ami a tisztító, kiegyenlítő szelekcióra utal. Négy gén esetében tapasztalt pozitív értékek az adaptív nyomásra történő differenciáltság jelei lehetnek. A szignifikáns kiugró értéket mutató SNP-k STRUCTURE elemzése részben alátámasztotta a korábbi nem-kódoló SSR markerek eredményét, és elkülönített két tőzeglápi populációt, melyek mikroszatellit alapon is differenciáltságot mutattak. Ezek a szlovákiai Medzi bormi és az erdélyi Fenyőkút populációk voltak. Az F_{ST} outlierok értékelése jelenleg is folyamatban van. A vizsgálat hosszadalmas, költségigényes volt, a több mint 2300 szekvencia kiértékelése és illesztése a becsülnél nagyobb időt vett igénybe. A teljes vizsgálatot a firenzei IGV CNR intézettel, Dr G. G. Vendramin szakmai és pénzügyi támogatásával végeztük el. A hibás szekvenciák kiszűrését követően összesen 1895 értékelhető szekvencia maradt. A következőkben elemezni kell a génekből detektált outlierként mutakozó SNP-k helyzetét. Ha az SNP-k kódoló szakaszba esnek és így nem szinonim szubsztitúciót okoznak, akkor az adott génnél a lokális adaptációt jelezhetik. Reményeink szerint ezen eredmények publikálása 2017 második felében valósulhat meg.

Locus	Candidate gene function
<i>abaR</i>	abscisic acid responsive protein
<i>ccaomt</i>	caffeoyl CoA O-methyltransferase
<i>chcs</i>	chalcone synthase
<i>cpk3</i>	Calcium-dependent protein kinase
<i>dhn3</i>	dehydration stress response
<i>dhn7</i>	dehydration stress response
<i>dhy2PP</i>	dehydration stress response
<i>erd3</i>	early response to dehydration 3 protein
<i>pal1</i>	Phenylalanine ammonia-lyase 1
<i>ppap12</i>	Uncertain, possible wall-associated protein kinase
<i>rd21A</i>	Cysteine protease (Pseudotain), similar to rd21A in <i>Arabidopsis</i>
<i>sod</i>	Cu/Zn superoxide dismutase, nuclear gene for chloroplast product
TOTAL	

7. ábra: A tesztelt 12 stressztoleranciában felelős génjelölt

A közös kerti kísérletünk, amelyben a természetes élőhelyekről és a származási kísérletből származó maganyag fenotípusos megfigyelését végeztük volna egy közös csíráztatási kísérlet során, sajnálatosan sikertelen volt. A 2014-es aszályos ősz miatt a fenyők maghozama elmaradt, így a csíráztatott egyedszám annyira alacsony volt, hogy annak további feldolgozása és statisztikai értékelése értelmetlen volt. A kísérletet 2016-ban újraindítottuk és remélhetőleg néhány éves adatok alapján a fenotípusos összehasonlítást el tudjuk végezni. A közös kerti kísérletbe egyetemi BSc és MSc-s hallgatókat vontunk be, így a fenotípusos mérések és az adatsorok kiértékelése az ő diplomamunkájuk részeként kerül elemzésre.

A mikorrhiza vizsgálatokat nem folytattuk le, ennek oka részben a szekvenálási költségek túlfutása volt, részben pedig az, hogy a senior kutató nem készített olyan egyértelmű tervet, amely alapján a vizsgálatok időzítése és elvégzése kellően tervezhető lett volna.

A populációk fenotípusos különbségei

A különböző szélsőséges élőhelyekről származó populációk fenotípusos differenciáltságát vizsgáltuk tobozok morfológiai bélyegei, tűlevelek anatómiai és mikromorfológiai paramétereinek elemzésével. Meglepően sok hasonlóságot fedeztünk fel a molekuláris alapú eredményeinkkel. Így például a Keleti-Kárpátok erdeifenyői ezen vizsgálatok alapján is szignifikánsan elkülönültek a tátrai populációktól. Utóbbiak viszont, ahogyan azt a molekuláris mintázatuk is jelezte a nyugat-magyarországi populációkhoz voltak hasonlóak. A Tatra és a Déli-Kárpátok populációi közötti morfo-anatómiai hasonlóságot a korábban a cirbolyafenyőnél publikált adatok ismeretében értelmezhetjük (Höhn et al. 2009, 2010). A fenotípusos differenciáltság és mintázatelemzés eredményeit az IF-es Dendrobiology lapba küldtük el. A cikket 2016 decemberében elfogadták, jelenleg in-press állapotban van.

A morfo-anatómiai vizsgálatokat Köbölkúti Zoltán Attila egyetemi hallgatók közreműködésével végezte el. Az eredmények feldolgozását követően két sikeres tudományos diákköri dolgozat is készült. Zahorecz Anett környezetgazdálkodási agrármérnök hallgatónk, 2015-ben az Országos Tudományos Diákköri Konferencia Erdészeti szekciójában, dolgozatával II.- ik helyezést ért el. Következő évben Tóth Krisztina kertészmérnök hallgató folytatta a munkát és a morfo-anatómiai eredmények mellett scanning elektrómkroszkópos felvételeket készítve összehasonlította a tűlevél felületek mintázatát (sejtsorok, sztóma paraméterek, sztómasűrűség). Az eredmények egyértelműen felhívták a figyelmet a magyarországi fenyőfői populáció egyediségére, mely mind tűlevélanatómiai, mint mikromorfológiai szempontból szignifikánsan eltérő volt. A fenotípusos adatok alapján a lápi és sziklai populációk elkülönülése egyértelmű volt. Tóth Krisztina dolgozatával II. helyezést ért el a 2016-os TDK helyi fordulójában, ily módon a 2017. április 6-9-én részt vehet országos fordulón.

Következtetések és összefoglalás:

A pályázatban felvetett hipotézisekre a munkánk során választ tudtunk adni. A kitűzött célok az ektomikorrhiza kapcsolatok vizsgálatát kivéve, megvalósultak. 20 természetes erdeifenyő populáció mikroszatellit alapú eredményei alapján jellemeztük a Kárpáti-Pannon térség erdeifenyő populációinak molekuláris mintázatát, a populációk közötti filogeográfiai kapcsolatokat és refugium területekre következtettünk. ABC-DYC modell segítségével múltbéli demográfiai eseményekre világítottunk rá, melyet összevetettünk rendelkezésre álló paleoklimatikus adatokkal is, és rekonstruálni próbáltuk a térségre jellemző recens erdeifenyő populációk paleotörténeti és demográfiai változásait. 10 eltérő, szélsőséges élőhelyű populáció esetében 12 stresszgén mintegy 2300 szekvenciájának elemzését végeztük el. A génekben talált SNP variabilitásából számított kiugró F_{ST} értékek alapján szelekciós nyomásra utaló jeleket kerestünk. A génszintű szelekció tesztelésére alkalmazott neutralitás tesztek többségükben negatív értékeket mutattak, ami a tisztító, kiegyenlítő szelekciót jelzik. Négy gén esetében pozitív értékeket észleltünk, ami az adaptív nyomásra történő elkülönülésre utalhat. Az SNP-k pozíciójának és ezáltal az adaptációban játszott szerepének vizsgálata azonban jelenleg is folyamatban van. Hallgatók bevonásával morfo-anatómiai és mikromorfológiai bélyegeket tanulmányoztunk, melyek statisztikai kiértékelésével szignifikáns különbségeket detektáltunk. Az eredmények rávilágítottak az eltérő élőhelyű populációk fenotípusos differenciáltságára.

Összességében elmondható, hogy kutatási eredményeink a Kárpátok és a Pannon térség peremhelyzetű erdeifenyő populációinak egyediségére hívják fel a figyelmet, melynek természetvédelmi és diverzitásbiológiai jelentősége számottevő.

A pályázat öt éve alatt eredményeinket konferenciákon és munkaértekezleteken mutattuk be, így a szakmai közönségtől folyamatos visszajelzést kaphattunk. A 2012-ben alakult AForGen (Alpine Forest Genomics, www.aforgen.org) kutatócsoport munkájában doktorjelölt és doktorandusz kollégáimmal veszünk részt, én magam alapító és vezetőségi tagként. Az AForGen csoport 2016-ban csatlakozott a IUFRO (International Union for Forest Research Organization) szervezetéhez, ahol a 2. divízió, 04.11. munkacsoportjának hivatalos koordinátora lettem (<http://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20400/20411/>).

A pályázat ideje alatt témavezetőként két PhD hallgató munkáját koordináltam, Tóth Endre György doktorjelölt jelenleg házi védelem előtt áll, dolgozatának címe: „*Eltérő környezeti adottságú erdeifenyő (Pinus sylvestris L.) állományok populációgenetikai vizsgálata és adaptív jellegek változatosságának nyomon követése*”. A témát Köbölkúti Zoltán Attila folytatja, jelenleg III. éves doktorandusz hallgató. Két egyetemi hallgató szakdolgozata készült el a témában, mindkettő tudományos diákköri konferenciákon helyezést ért el.

Irodalomjegyzék:

Cornuet JM, Pudlo P, Veyssier J, et al (2014) DIYABC v2.0: a software to make Approximate Bayesian Computation inferences about population history using Single Nucleotide Polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30/8:1187–1189.

Feurdean A, Bennike O (2004) Late Quaternary palaeoecological and palaeoclimatological reconstruction in the Gutaiului Mountains, northwest Romania. *J Quaternary Sci* 19:809-827.

Feurdean A, Wohlfarth B, Björkman L, et al (2007) The influence of refugial population on Lateglacial and early Holocene vegetational changes in Romania. *Rev Palaeobot Palyno* 145:305-320.

Höhn M, Gugerli F, Abran P, et al (2009) Variation in the chloroplast DNA of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) reflects contrasting post-glacial history of populations from the Carpathians and the Alps. *J Biogeogr* 36:1798-1806.

Höhn M, Hufnagel L, Cseke K, et al (2010) Current range characteristics of Swiss Stone pine (*Pinus cembra* L.) along the Carpathians characterized by chloroplast SSR markers. *Acta Biol. Hung.* 61(suppl): 61-68.

Manni F, Guerard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biol* 76:173-190.

Naydenov KD, Naydenov MK, Tremblay F, et al (2011) Patterns of genetic diversity that result from bottlenecks in Scots Pine and the implications for local genetic conservation and management practices in Bulgaria. *New Forest* 42:179-193.

Petit R, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, et al (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399:429-436.

Robledo-Arnuncio JJ, Collada C, Alia R, et al (2005) Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *J Biogeogr* 32:595-605.

Scalfi M, Piotti A, Rossi M, et al (2009) Genetic variability of Italian southern Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations: the rear edge of the range. *Eur J For Res* 128:377-386.

Tantau I, Reille M, de Beaulieu JL et al (2006) Late Glacial and Holocene vegetation history in the southern part of Transylvania (Romania): pollen analysis of two sequences from Avrig. *J Quaternary Sci* 21:49-62.