

## GENETIČKA DIFERENCIRANOST SUBPOPULACIJA OBIČNE SMREKE (*Picea abies* (L.) KARST.) NA PLANINI IGMAN

THE ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY OF NORWAY SPRUCE  
(*Picea abies* (L.) KARST.) SUBPOPULATION AT THE IGMAN MOUNTAIN

D. BALLIAN<sup>1</sup>, F. BOGUNIĆ<sup>1</sup>, M. KONNERT<sup>2</sup>,  
H. KRAIGHER<sup>3</sup>, M. PUČKO<sup>3</sup>, G. BOŽIČ<sup>3</sup>

**SAŽETAK:** Uporabom 12 izoenzimskih sustava, te analizom 20 gen lokusa, uspoređivana je genetička struktura dviju subpopulacija s planine Igman. Prema ekološkim pokazateljima, a misli se na klimu i njeno djelovanje, postoje razlike između subpopulacija, jer jedna pripada mrazištu a druga tipičnoj planinskoj klimi. Rezultati analize izoenzimskih biljega upućuju na postojanje razlika između analiziranih subpopulacija.

**Ključne riječi:** *Picea abies* (L.) Karst., subpopulacije, izoenzimi

### UVOD – Introduction

Smreka (*Picea abies* (L.) Karst.) predstavlja jednu od najznačajnijih vrsta šumskog drveća s gospodarskog i ekološkog stajališta u Bosni i Hercegovini, a i u čitavom nizu europskih zemalja (Skroppa, 2003).

Mnoga istraživanja obične smreke na molekularnoj razini, analizom polimorfizma određenih izoenzimskih lokusa, ukazala su na veliku genetičku varijabilnost ove vrste u Europi, kao i na pojavu velike diferencijacije između populacija (Müller-Starck i sur., 1992). Neka od istraživanja potvrdila su (Langercrantz i Rymana 1990) da je obična smreka u stalnom procesu genetičke diferencijacije i adaptacije, u određenim ekološkim uvjetima. Drugi autori koji su se također bavili istraživanjem obične smreke (Goncharenko i sur., 1990; Goncharenko i Potenko, 1992; Kurtovski i Bergmann, 1995) uporabom izoenzimskih biljega analizirali su njenu genetičku strukturu i diferenciranost, na lokalnoj razini, a i šire.

U planinskom području središnjih Dinarskih Alpa, na vapnenačkim i dolomitnim planinama Bosne i Hercegovine, smreku nalazimo u specifičnim geomorfo-

loškim i klimatskim uvjetima, kao što su vrtače, male planinske doline i uopće veće i manje depresije, odnosno mjesta s pojavom ekstremno niskih temperatura. U takvim uvjetima nalazimo šume smreke mrazišnog tipa, *Piceetum montanum s.lat.* (Fuk. i Stef. 1958. emend. Horv. et al., 1974). Ovaj tip šume svojstven je za područja s pojavom inverzije temperatura, kao i intrazonalne specifične vegetacije unutar pojasa zajednice šuma obične jele i bukve (*Abieti-Fagetum*). Tako jednu od najljepših sastojina smreke, mrazišnog tipa, nalazimo na planini Igman u području Velikog i Malog polja (Slika 1).

Prema Stefanoviću (1977) ovakva smrekova staništa odlikuju se plićim zemljištima tipa crnice ili smeđih tala, a na planini Igman razvila su se na morenskim nanosima. Uslijed veće sklopljenosti sastojina i hladnog fitoklimata, imamo pojave usporene humifikacije, što dovodi do nastajanja sirovog humusa. To pogoduje smreci kao i brojnim acidofilnim vrstama koje ulaze u sastav ove šumske zajednice.

Kako se planina Igman nalazi oko 20 km južno od Sarajeva, u njoj je prisutan stalni antropogeni utjecaj. Tako suvremenim uvjetima razvoja, posebice u gospodarstvima zemalja u tranziciji kao što je naše, ovakve šumske zajednice zbog stalnih negativnih utjecaja na njih postaju vrlo labilne, te zahtijevaju poseban pristup u zaštiti i obnovi. Tako je na planini Igman, ova šumska zajednica već punih 25 godina izložena neprestanom

<sup>1</sup> D. Ballian, F. Bogunić  
Faculty of Forestry, University of Sarajevo

<sup>2</sup> M. Konnert  
Bayerisches Amt für forstliche Saat und Pflanzenzucht,  
Teisendorf, Germany

<sup>3</sup> H. Kraigher, M. Pučko, G. Božič  
Gozdarski Inštitut Ljubljana, Slovenia

negativnom utjecaju čovjeka. Negativni utjecaj ogleda se kroz otvaranje putova, izgradnju športskih terena za olimpijske igre, ratnim razaranjima, a zadnje vrijeme neplanskom sječom i uređenjem izletišta. Da bi se ova vrlo interesantna sastojina spasila od daljnjeg propadanja, potrebno je obnoviti njenu strukturu, uz uvažavanje svih relevantnih čimbenika koji je izdvajaju od okolnih sastojina smreke.

Prema dostupnoj literaturi, u svim dosadašnjim istraživanjima koja su provedena na smreci, postoje saz-



Slika 1. Smrekova šuma mrazišnog tipa *Piceetum montanum*  
Figure 1 Norway spruce forest frosty type *Piceetum montanum*

nanja koja nam govore da je to vrsta koja vrlo dobro svojom genetičkom strukturom populacije reagira na promjene ekoloških čimbenika, ponajprije u razlikama između tala (Božić 2002, Božić i Urbančić 2001 i 2003), kao i na brojna zagađenja atmosfere i tla (Bergmann i Scholz 1987, 1989; Hosius i Bergmann 1993; Bergmann i Hosius 1996; Longauer i sur., 2001).

Cilj ovog istraživanja je da uz primjenu suvremenih molekularno genetičkih metoda i njihove analize, pokažemo da je šumska zajednica smreke mrazišnog tipa vrlo specifična genetička tvorevina, i da se razlikuje od šuma bukve i jele ilirskog područja (*Abieti-Fagetum illlyricum*, Fuk. i Stef. 1958.) i šuma običnog bora i smreke (jele) (*Piceo-Pinetum Illyricum*, Stef. 1960) koje su raspoređene neposredno oko ove šumske zajednice. Dobiveni rezultati trebaju pokazati da su bilo kakve gospodarske intervencije ili aktivnosti na konzervaciji u mrazišnom tipu šume u cilju njene obnove ili očuvanja *in situ* vrlo zahtjevne i složene, zbog specifične genetičke strukture tog tipa šume, kao i uvjeta sredine koji su izravno utjecali na njeno formiranje. Stoga je prilikom obnove ovih tipova šuma (mrazišni tip) potrebno uporabljivati lokalni, autohtoni reprodukcijski materijal, koji se genetički neće razlikovati od autohtone populacije, a može pokazati značajne razlike spram susjednih populacija iste vrste.



Slika 2–4. Smreka mrazišnog tipa u fitocenozu *Piceetum montanum*  
Figure 2–4 Norway spruce of frosty type in fitocenosis *Piceetum montanum*



Slika 5–7. Šuma običnog bora i smreke (jele) (*Piceo-Pinetum Illyricum*)  
Figure 5–7 Norway spruce forest with randomly distributed white pine trees (silver fir) (*Piceo-pinetum Illyricum*)



## MATERIJAL I METODE – Materials and methods

Istraživane su dvije prirodne subpopulacije smreke s planine Igman, s tim da je jedna od subpopulacija smreke mrazišnoga tipa, a druga normalnog. Uzorci mrazišnog tipa smreke uzeti iz šumske zajednice (*Piceetum montanum*, s.lat. (Fuk. i Stef. 1958. emend. Horv. *et al.*, 1974) na 1198–1200 m nadmorske visine, u radu su predstavljene kao subpopulacija Igman – B. Druga grupa uzoraka za analizu pripada smreci koja je rasla u šumskoj zajednici smreke i običnog bora (*Piceo-Pinetum Illyricum*, Stef. 1960), s nadmorske visine koja je viša za oko 150 m, te udaljena oko 2000 metara sjeveroistočno od prve, te je predstavljena kao subpopulacija Igman – A.

Uzorci su sabrani tijekom siječnja 2005 godine. Uzimate su grančice s dormantnim pupovima. Prilikom sabiranja uzoraka za izoenzimska istraživanja vodilo se računa da udaljenost između stabala bude najmanje 50 do 100 m kako bi se isključila mogućnost srodstva, kao i da stabla budu starija od 80 godina. Po populaciju za ovaj način istraživanja selekcionirano je 50 stabala.

Za analizu genetičke strukture uporabljeni su izoenzimski genetički biljezi *Aco-A*, *F-Est-B*, *Gdh-A*, *Got-A*, *Got-B*, *Got-C*, *Idh-A*, *Idh-B*, *Lap-B*, *Mdh-A*, *Mdh-B*, *Mdh-C*, *Mnr-A*, *Mnr-C*, *Pgi-B*, *Pgm-A*, *Skdh-A*, *6-Pgdh-A*, *6-Pgdh-B*, *6-Pgdh-C*, a interpretacija zimograma je prema protokolu koji je dat od Konner (2004).

Rezultati izoenzimske analize vrednovani su preko alelnih i genotipskih frekvencija koje su obračunate iz razlika između gen lokusa. Genetička struktura prikazana je za sve gen lokuse u istraživanim subpopulacijama smreke koji su pokazali polimorfizam.

Genetička varijabilnost određena je preko parametara koji se odnose za subpopulacije, kao i između subpopulacija. Tako smo rabili alelni diverzitet ili genetičku višeznačnost, preko prosječnog broja alela u lokusu ( $A/L$ ). Za određenje genetičke varijabilnosti unutar subpopulacija rabili smo mjere alelnog diverziteta ( $V_k$ ,  $V_m$ , prema Gregoriusu 1978, 1987), genetič-

kog diverziteta ( $V_{gam}$ ), stvarne heterozigotnosti ( $H_{st}$ ) i očekivane heterozigotnosti ( $H_{tc}$ ), genetičke diferenciranosti između individua unutar subpopulacija ( $\delta T$ ). Za računanje tih parametara uporabili smo statistički program GSED (Gillet, 1998)

Provjera Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) urađena je za svaku subpopulaciju odvojeno. Provjerava se kako se u sastojini smreke pojavljuju frekvencije genotipova kod pojedinih gen lokusa i kako se slažu sa frekvencijama genotipova, prema očekivanoj Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, a uporabili smo “precizni Hardy-Weinbergov test vjerojatnosti”, prema statističkom programu POPGENE 3.2 (Yeh i sur. 1999). Nulta hipoteza, koju smo testirali je da je veza između gameta slučajna, te da vrijedi načelo panmiksije. Provjera HWE urađena je za svaki gen lokus u svakoj subpopulaciji. U slučaju nepotpunosti date nulte hipoteze, prihvaćali smo alternativnu hipotezu koja je definirana kao manjak ili višak broja heterozigota ( $F > 0$  ili  $F < 0$ ), za što smo rabili F-test za manjak i višak heterozigota po statističkom programu F-STAT.

Koeficijent inbridinga ( $F_{is}$ ) prema Wrightovoj statističkoj proceduri (Wright 1978) ukazuje u kojem se odnosu razlikuju dobivena i očekivana heterozigotnost u subpopulacijama, a koji nastaje kod panmiksičnih oplodnji. Koeficijent inbridinga (fiksacijski indeks) procijenili smo pomoću statističkog programa POPGENE 3.2.

Genetičku varijabilnost između subpopulacija smreke procijenili smo uporabom statističke homogenosti alelnih i genotipskih frekvencija u polimorfim lokusima i mjerama genetičke diferenciranosti. Homogenost alelnih i genotipskih distribucija po lokusu između subpopulacija testirali smo Fischerovim preciznim testom (Raymond i Rousset 1995) uporabom statističkog programa GENEPOP 3.2 (Yeh i sur. 1999). Stupanj genetičke diferenciranosti između subpopulacija prikazali smo s mjerom alelnog genetičkog odstojanja ( $d_0$ ) prema Gregoriusu (1974) uz pomoć statističkog programa GSED (Gillet 1998).

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA – Results

Alelnu raznolikost predstavljaju frekvencije alela koje su date u tablici 1a. Analizirano je 20 genskih lokusa, od kojih su 3 (*Gdh-A*, *Idh-B*, *Mdh-A*) pokazala monomorfizam u obje subpopulacije, gdje su dobivene konstantne veličine za od 100 % za alele *Gdh-A<sub>2</sub>*, *Idh-B<sub>3</sub>*, *Mdh-A<sub>2</sub>*. Kod drugih 17 polimorfimih lokusa imamo učestalost alela od 1 % do 99 %. Minimalni polimorfizam u obje subpopulacije uočen je kod lokusa *Got-A*, *Got-B*, *Idh-A*, *Mdh-B*, *Mdh-C*, *Pgm-A*, gdje su frekvencije najfrekventnijih alela uvijek jednake ili veće od 93 %. Kod subpopulacije “Igman – A” imamo pojavu minimalnog

polimorfizma i kod lokusa *Fest-B*, *Mnr-C*, *6-Pgdh-A*, dok u subpopulaciji “Igman – B” nemamo taj slučaj. Za drugih 9 lokusa karakterističan je jak polimorfizam, s uvijek istim prevladavajućim alelom u obje subpopulacije. Inače ove dvije subpopulacije karakterizira i pojava rijetkih alela u svakoj od njih, što daje posebnu značajnost svakoj od njih i to u lokusima *Fest-B*, *Got-C*, *Idh-A*, *Lap-B*, *Mdh-C*, *Mnr-A*, *Mnr-C*, *6-Pgdh-A*, *6-Pgdh-B*.

Frekvencije alela i frekvencije genotipa koje su prikazane u tablici 1a i tablici 1b, ukazuju na postojanje alelne i genotipske raznolikosti između subpopulacija.

Alelna diferencijacija bila je najočitija na lokusih *Aco-A*, *Lap-B*, *Got-C*, *Mnr-C*, *6-Pgdh-A*. Genotipski se subpopulacije najjače diferenciraju na lokusima *Fest-B*, *Got-C*, *Lap-B*, *Mdh-C*, *Mnr-A*, *Mnr-C*, *Pgi-B*, *6-Pgdh-A*, *6-Pgdh-B*, *6-Pgdh-C*. Kad se uzorci subpopulacije Igman – A usporede s uzorcima iz subpopulacije Igman – B, dobije se od 8–14 % veća učestalost homozigotnosti za: *Got-C*<sub>44</sub>, *Fest-B*<sub>22</sub>, *Mnr-A*<sub>22</sub>, *Mnr-C*<sub>22</sub>, *6-Pgdh-A*<sub>22</sub>, *6-Pgdh-C*<sub>22</sub>, i od 10–14 % višu učestalost heterozigota za: *Lap-B*<sub>46</sub>, *Pgi-B*<sub>23</sub>, *6-Pgdh-B*<sub>25</sub>. Kod uspoređenja subpopulacije Igman – B s subpopulacijom Igman – A imamo 10 % veću učestalost homozigota: *Pgi-B*<sub>33</sub>, *6-Pgdh-B*<sub>22</sub> i od 8–14 % veću učestalost heterozigota: *Fest*<sub>12</sub>, *Mnr-A*<sub>24</sub>, *Mnr-C*<sub>23</sub>, *6-Pgdh-A*<sub>23</sub>, *6-Pgdh-C*<sub>25</sub>.

U subpopulaciji Igman – B primijećen je veći broj heterozigota kod svih lokusa, i za 7 % je veći nego kod subpopulaciji Igman – A.

Najveća moguća stopa heterozigotnosti ( $H_{te}$ ) je u subpopulaciji Igman – A sa 84,1 %, dok je kod subpopulacije Igman – B 81,9 %. Kao što je vidljivo razlike su male i praktično beznačajne. Izračunata veličina ( $H_{te}$ ) za subpopulacije ukazuje na pomanjkanje stvarne heterozigotnosti, što je vidljivo iz tablice 2b, jer je kod mnogih lokusa ta veličina od 100 %. Zbog nedostatka podataka o prethodnim razvojnim stadijima ovih subpopulacija ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je ovaj fenomen pod utjecajem reprodukcijanskog sustava ili raznih utjecaja selekcije.

Tablica 1a: Relativne alelne frekvencije za 20 gen lokusa smreke iz subpopulacije “Igman – A” i “Igman – B”  
Table 1a: Relative allele frequencies for 20 gene loci in sampled Norway spruce subpopulations  
“Igman – A” and “Igman – B”

Gen lokus	Aleli	“Igman – A”	“Igman – B”	Gen lokus	Aleli	“Igman – A”	“Igman – B”	
<b>Aco-A</b>	1	0,300	0,270	<b>Mdh-B</b>	1	-	0,010	
	2	0,670	0,730		2	0,980	0,970	
	3	0,030	-		3	0,020	0,020	
<b>F-Est-B</b>	1	0,020	0,070	<b>Mdh-C</b>	2	0,070	0,040	
	2	0,940	0,900		4	0,930	0,960	
	3	0,010	-	<b>Mnr-A</b>	2	0,400	0,400	
	4	0,030	0,030		3	0,600	0,570	
<b>Gdh-A</b>	2	1,000	1,000	5	-	0,030		
<b>Got-A</b>	1	0,020	0,010	<b>Mnr-C</b>	2	0,960	0,900	
	2	0,980	0,990		3	0,040	0,100	
<b>Got-B</b>	1	-	0,010		<b>Pgi-B</b>	2	0,380	0,330
	2	0,990	0,990	3		0,620	0,670	
	3	0,010	-	<b>Pgm-A</b>	2	0,970	0,970	
<b>Got-C</b>	2	0,290	0,340		3	0,030	0,030	
	4	0,690	0,620	<b>Skdh-A</b>	1	0,030	-	
	5	0,010	0,040		2	0,070	0,100	
	6	0,010	-		3	0,880	0,880	
<b>Idh-A</b>	2	0,030	0,060		7	0,020	0,020	
	3	0,950	0,940	<b>6-Pgdh-A</b>	1	-	0,040	
	4	0,010	-		2	0,970	0,900	
	5	0,010	-		3	0,020	0,060	
	<b>Idh-B</b>	3	1,000		1,000	4	0,010	-
<b>Lap-B</b>		1	-	0,010	<b>6-Pgdh-B</b>	1	0,010	-
		2	-	0,010		2	0,670	0,710
	3	0,180	0,210	3		-	-	
	4	0,760	0,760	5		0,320	0,280	
	5	-	0,010	6		-	0,010	
	6	0,060	-	<b>6-Pgdh-C</b>		2	0,650	0,600
<b>Mdh-A</b>	2	1,000	1,000		5	0,350	0,400	

Tablica 1b: Relativne genotipske frekvencije za 20 gen lokusa smreke iz subpopulacija "Igman – A" i "Igman – B"  
 Table 1b: Relative genotype frequencies for 20 gene loci in sampled Norway spruce subpopulations on the "Igman – A" and "Igman – B"

Locus	Genotype	"Igman-A"	"Igman-B"	Locus	Genotype	"Igman – A"	"Igman – B"	
<b>Aco-A</b>	<b>11</b>	0,080	0,060	<b>Mdh-A</b>	<b>22</b>	1,000	1,000	
	<b>12</b>	0,420	0,420		<b>Mdh-B</b>	<b>12</b>	-	0,020
	<b>13</b>	0,020	-			<b>22</b>	0,960	0,940
	<b>22</b>	0,460	0,520			<b>23</b>	0,040	0,040
	<b>33</b>	0,020	-			<b>Mdh-C</b>	<b>24</b>	0,140
<b>F-Est-B</b>	<b>12</b>	0,020	0,140	<b>44</b>	0,860		0,920	
	<b>14</b>	0,020	-	<b>Mnr-A</b>	<b>22</b>	0,120	0,040	
	<b>22</b>	0,900	0,800		<b>24</b>	0,560	0,700	
	<b>23</b>	0,020	-		<b>25</b>	-	0,020	
<b>24</b>	0,040	0,060	<b>44</b>		0,320	0,200		
<b>Gdh-A</b>	<b>22</b>	1,000	1,000	<b>45</b>	-	0,040		
	<b>Got-A</b>	<b>12</b>	0,040	0,020	<b>Mnr-C</b>	<b>22</b>	0,940	0,820
<b>22</b>		0,960	0,980	<b>23</b>		0,040	0,160	
<b>Got-B</b>	<b>12</b>	-	0,020	<b>33</b>		0,020	0,020	
	<b>22</b>	0,980	0,980	<b>Pgi-B</b>	<b>22</b>	0,120	0,120	
	<b>23</b>	0,020	-		<b>23</b>	0,520	0,420	
<b>Got-C</b>	<b>22</b>	0,120	0,160		<b>33</b>	0,360	0,460	
	<b>24</b>	0,320	0,320	<b>Pgm-A</b>	<b>22</b>	0,940	0,940	
	<b>25</b>	-	0,040		<b>23</b>	0,060	0,060	
	<b>26</b>	0,020	-	<b>Skdh-A</b>	<b>13</b>	0,060	-	
	<b>44</b>	0,520	0,440		<b>23</b>	0,140	0,200	
	<b>45</b>	0,020	0,040		<b>33</b>	0,760	0,760	
<b>Idh-A</b>	<b>22</b>	-	0,060		<b>37</b>	0,040	0,040	
	<b>23</b>	0,060	-	<b>6-Pgdh-A</b>	<b>12</b>	-	0,080	
	<b>33</b>	0,900	0,940		<b>22</b>	0,940	0,800	
	<b>34</b>	0,020	-		<b>23</b>	0,040	0,120	
	<b>35</b>	0,020	-		<b>24</b>	0,020	-	
<b>Idh-B</b>	<b>33</b>	1,000	1,000		<b>6-Pgdh-B</b>	<b>15</b>	0,020	-
	<b>Lap-B</b>	<b>14</b>	-	0,020		<b>22</b>	0,400	0,500
<b>24</b>		-	0,020	<b>25</b>		0,540	0,400	
<b>33</b>		0,040	0,040	<b>26</b>		-	0,020	
<b>34</b>		0,280	0,340	<b>55</b>		0,040	0,080	
<b>44</b>		0,560	0,560	<b>6-Pgdh-C</b>	<b>22</b>	0,420	0,300	
<b>45</b>		-	0,020		<b>25</b>	0,460	0,600	
<b>46</b>		0,120	-		<b>55</b>	0,120	0,100	

Unutarpopulacijsku varijabilnost predstavljaju veličine genetičkih parametara koje predstavljaju subpopulacije i njihove vrijednosti su prikazane u tablici 2. Prosječan broj alela po lokusu, za 17 polimorfni lokusa pokazao je da postoje minimalne razlike između subpopulacija.

Tako smo dobili veću veličinu kod subpopulacije Igman – A, a koja iznosi 2,71, dok kod subpopulacije Igman – B imamo 2,59. Obrnut slučaj imamo kad je u pitanju učinkovit broj alela subpopulacijama, jer veću veličinu imamo kod subpopulacije Igman – B (Tablica 2).

Tablica 2a: Prosječan broj alela u lokusu, postotak polimorfnih lokusa, stvarna heterozigotnost ( $H_{st}$ ) i teoretska heterozigotnost ( $H_{te}$ ), raznolikost ( $V_{gam}$ )

Table 2a: An average number of allele in the locus, the percentage of polymorphous loci, observing heterozygosity ( $H_o$ ) and theoretic heterozygosity ( $H_e$ ), diversity ( $V_{gam}$ )

Subpopulacija <i>Subpopulation</i>	Prosječan broj alela u lokusu <i>Average number of allele in the locus</i>	Efektivni broj alela u subpopulaciji <i>The percentage of polymorphous loci</i>	Diferencijacija unutar subpopulacija <i>Differentiation in subpopulation</i>	Stvarna heterozigotnost* <i>Observing heterozygosity*</i>	Teoretska heterozigotnost* <i>Theoretic heterozygosity*</i>	Genetička raznolikost <i>Diversity</i>
	<b>A/L</b>	<b>v</b>	<b><math>\delta T</math></b>	<b><math>H_{st}</math> %</b>	<b><math>H_{te}</math> %</b>	<b><math>V_{gam}</math></b>
<b>Igman – A</b>	2,71	1,307	0,237	24,4	84,1	162,125
<b>Igman – B</b>	2,59	1,332	0,252	26,2	81,9	215,830

\* heterozigotnosti su izračunate samo za polimorfne lokuse – *heterozygosity only for the polymorphic loci*

Razlike između subpopulacija jače se izražavaju s parametrom  $V_{gam}$ , odnosno hipotetskom gametskom veličinom lokusne raznolikosti, koja je rezultat pojedinih učinkovitih alelnih raznolikosti. Ovaj parametar inače se jako podudara s diferenciranjem između uzoraka glede gensko (alelne) raznolikosti i s time pokazuje

na potencijalnu sposobnost za proizvodnju genetički različitih gameta. To bi značilo da smreka sa mrazišta ima veću potencijalnu sposobnost proizvodnje genetički različitih gameta, za razliku od smreke koja potječe iz normalnog tipa šume.

Tablica 2b: Stvarna heterozigotnost ( $H_{st}$ ) i očekivana heterozigotnost ( $H_{te}$ ) promatrana prema gen lokusima u subpopulacijama

Table 2b: Observing heterozygosity ( $H_o$ ) and theoretic heterozygosity ( $H_e$ ) at the loci in subpopulations

Gen lokus	Stvarna heterozigotnost <i>Observing heterozygosity</i> <b><math>H_{st}</math> (u %)</b>		Očekivana heterozigotnost <i>Theoretic heterozygosity</i> <b><math>H_{te}</math> (u %)</b>	
	<b>Igman – A</b>	<b>Igman – B</b>	<b>Igman – A</b>	<b>Igman – B</b>
<i>Idh-A</i>	10,0	0,0	100	0,0
<i>Mdh-B</i>	4,0	6,0	100	100
<i>Mdh-C</i>	14,0	8,0	100	100
<i>Lap-B</i>	40,0	40,0	83,3	83,3
<i>Got-A</i>	4,0	2,0	100	100
<i>Got-B</i>	2,0	2,0	100	100
<i>Got-C</i>	36,0	40,0	58,1	52,6
<i>Pgm-A</i>	6,0	6,0	100	100
<i>Pgi-B</i>	52,0	42,0	68,4	63,6
<i>Skdh-A</i>	24,0	24,0	100	100
<i>6-Pgdh-B</i>	56,0	42,0	84,8	72,4
<i>6-Pgdh-C</i>	46,0	60,0	65,7	75,0
<i>Fest-B</i>	10,0	20,0	83,3	100
<i>Mnr-A</i>	56,0	76,0	70,0	88,4
<i>Mnr-C</i>	4,0	16,0	50,0	80,0
<i>Aco-A</i>	44,0	42,0	66,7	77,8
<i>6-Pgdh-A</i>	6,0	20,0	100	100
Ukupno – Total	24,4	26,2	84,1	81,9

Prosječna heterozigotnost za subpopulaciju Igman – A iznosila je 24,4 %, a najveći doprinos toj veličini daje visoka heterozigotnost lokusa *6Pgdh-C* i *Mnr-A* s veličinom od 56 %, dok lokus *Got-B* ima najmanji udio sa 2 % (Tablica 2b). Prosječna heterozigotnost kod subpopulacije Igman – B je 26,2 s najvećim udjelom u njoj

lokusa *Mnr-A* sa 76 %, dok je kod lokusa *Got-A* i *Got-B* najmanja veličina i iznosi 2 % (Tablica 2b).

Unutarnja alelna raznolikost pokazuje visok stupanj sličnosti s veličinom od 0,237 kod Igman – A i 0,252 kod Igman – B subpopulacije.

Najveći udio u raznolikosti kod subpopulacije Igman – A daje lokus *Got-C* sa 70,71 %, dok kod Igman – B subpopulacije gen lokus *Mnr-A* sa veličinom od 79,21 % i *Got-C* sa 79,19 %.

### Koeficijent inbreedinga (Fis):

Za provjeru kako se u subpopulacijama ponašaju frekvencije genotipova kod promatranih lokusa i frekvencije alela, prikazali smo prema HWE, te uporabili Likelihood ratio test za HWE u programu POPGENE 32. Nulta hipoteza koju testiramo je da je veza između gameta slučajna. Provjerom HWS-a izdvajamo lokuse prema značajnosti u svakoj od subpopulacija uporabom simbola.

Tablica 3. Precizni Hardy-Weinbergov test vjerojatnosti

Table 3 Likelihood ratio exact test for HWE

Gen lokusi	Igman – A	Igman – B
<i>Idh-A</i>	ns	***
<i>Idh-B</i>	-	-
<i>Mdh-A</i>	-	-
<i>Gdh-A</i>	-	-
<i>Mdh-B</i>	ns	ns
<i>Mdh-C</i>	ns	ns
<i>Lap-B</i>	ns	ns
<i>Got-A</i>	ns	ns
<i>Got-B</i>	ns	ns
<i>Got-C</i>	ns	ns
<i>Pgm-A</i>	ns	ns
<i>Pgi-B</i>	ns	ns
<i>Skdh-A</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-B</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-C</i>	ns	ns
<i>Fest-B</i>	ns	ns
<i>Mnr-A</i>	ns	**
<i>Mnr-C</i>	*	ns
<i>Aco-A</i>	*	ns
<i>6Pgdh-A</i>	ns	ns

Subpop. Analizirane subpopulacije smreke

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

ns.  $p \geq 0,05$  (niska razina razlika)

- Nije provedeno testiranje (jedan od genskih lokusa je monomorfan te testiranje nije moguće)

Na temelju dobivenih rezultata, primjetno je značajno odstupanje frekvencija genotipova prema HWE kod lokusa: *Mnr-C* i *Aco-A* (za Igman – A), te *Idh-A* i *Mnr-A* (za Igman – B) (Tablica 3).

Na temelju dobivenih rezultata došli smo i do ocjene koeficijenta inbreedinga prema Wrightu, te se subpopulacije razlikuju prema učestalosti pojavljivanja heterozigotnosti u njima, a što je izravna posljedica panmiksije (HWE) (Tablica 4).

Tablica 4. Fiksacijski indeks (Fis)

Table 4 Fixation indeks (Fis)

Gen lokusi	Igman – A	Igman – B
<i>Idh-A</i>	-0,0373	1,0000
<i>Idh-B</i>	-	-
<i>Mdh-A</i>	-	-
<i>Gdh-A</i>	-	-
<i>Mdh-B</i>	-0,0204	-0,0239
<i>Mdh-C</i>	-0,0753	-0,0417
<i>Lap-B</i>	-0,0352	-0,0582
<i>Got-A</i>	-0,0204	-0,0101
<i>Got-B</i>	-0,0101	-0,0101
<i>Got-C</i>	0,1811	0,1974
<i>Pgm-A</i>	-0,0309	-0,0309
<i>Pgi-B</i>	-0,1036	0,0502
<i>Skdh-A</i>	-0,0939	-0,1152
<i>6pgdh-B</i>	-0,2483	-0,0062
<i>6pgdh-C</i>	-0,0110	-0,2500
<i>Fest-B</i>	0,1304	-0,0858
<i>Mnr-A</i>	-0,1667	-0,4780
<i>Mnr-C</i>	0,4792	0,1111
<i>Aco-A</i>	0,0439	-0,0654
<i>6Pgdh-A</i>	-0,0239	-0,0823
Srednja veličina	-0,0025	0,0059

Tablica 5. Test za manjak heterozigota

Table 5 F-Stat – Test for heterozygote insufficiency

Gen lokusi	Igman – A	Igman – B
<i>Idh-A</i>	ns	***
<i>Idh-B</i>	-	-
<i>Mdh-A</i>	-	-
<i>Gdh-A</i>	-	-
<i>Mdh-B</i>	ns	ns
<i>Mdh-C</i>	ns	ns
<i>Lap-B</i>	ns	ns
<i>Got-A</i>	ns	ns
<i>Got-B</i>	ns	ns
<i>Got-C</i>	ns	ns
<i>Pgm-A</i>	ns	ns
<i>Pgi-B</i>	ns	ns
<i>Skdh-A</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-B</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-C</i>	ns	ns
<i>Fest-B</i>	ns	ns
<i>Mnr-A</i>	ns	ns
<i>Mnr-C</i>	ns	ns
<i>Aco-A</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-A</i>	ns	ns
Ukupno – Total	ns	ns

Fiksacijski indeks u subpopulaciji Igman – A za 17 polimorfnih lokusa ukupno je -0,0025 te pokazuje da



je populacija stabilna, dok je kod subpopulacije Igman – B pozitivna veličina 0,0059 i ukazuje na moguću manju nestabilnost (Tablica 4). Unatoč dobivenim razlikama između subpopulacija, a s obzirom da su obje veličine bliske nuli, to nam može ukazivati da su obje vrlo bliske uravnoteženom stanju prema Hardy-Weinbergovom zakonu ravnoteže.

Tablica 6. Test za višak heterozigota

Table 6 *F-Stat – Test for heterozygote surplus*

Gen lokusi	Igman – A	Igman – B
<i>Idh-A</i>	ns	ns
<i>Idh-B</i>	-	-
<i>Mdh-A</i>	-	-
<i>Gdh-A</i>	-	-
<i>Mdh-B</i>	ns	ns
<i>Mdh-C</i>	ns	ns
<i>Lap-B</i>	ns	ns
<i>Got-A</i>	ns	ns
<i>Got-B</i>	ns	ns
<i>Got-C</i>	ns	ns
<i>Pgm-A</i>	ns	ns
<i>Pgi-B</i>	ns	ns
<i>Skdh-A</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-B</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-C</i>	ns	ns
<i>Fest-B</i>	ns	ns
<i>Mnr-A</i>	ns	***
<i>Mnr-C</i>	ns	ns
<i>Aco-A</i>	ns	ns
<i>6Pgdh-A</i>	ns	ns
Ukupno – Total	ns	ns

Na temelju testiranja kod subpopulacije Igman – B, za gen lokus *Mnr-A* dobili smo značajna odstupanja, odnosno do pojave viška heterozigota (\*\*\*) (Tablica 6). Objašnjenje za takvo povećanje heterozigotnosti gen lokusa *Mnr-A* mogli bismo potražiti u specifičnim selekcijskim pritiscima koji vladaju na mrazištu, a koji favoriziraju heterozigote za ovaj gen lokus. Ostali gen lokusi ne pokazuju signifikantne razlike. Također dolazi do pojave značajnog nedostatka heterozigota kod gen lokusa *Idh – A* (\*\*\*) (Tablica 5), što bi se moglo povezati sa selekcijskim pritiscima ili pak s jako bliskom srodničkom vezom.

### Genetička varijabilnost između subpopulacija

Značajnost razlika između alelnih i genotipskih frekvencija testirana je Fischerovim testom homogenosti u statističkom programu GENEPOP (Version 3.4). Rezultati su prikazani u tablici 7.

Rezultati Fisherovog testa pokazali su značajne razlike u alelnim i genotipskim frekvencijama između istraživanih subpopulacija Igman – A i Igman – B, i to od 17 polimorfnih lokusa samo na dva lokusa (*Lap-B* i *6Pgdh-A*, s razinom od 5 %), što upućuje na lokalno značajnu diferencijaciju tih dvaju subpopulacija. Kod te dvije subpopulacije značajne razlike bile su isključivo na lokusu *Lap-B* i *6-Pgdh-A*, i to u pojavi određenih alela koji su svojstveni za jednu ili drugu subpopulaciju, kao i u frekvencijama genotipova. Tako kod subpopulacije Igman – A imamo pojavu alela  $A_4$ , a kod subpopulacije Igman – B alela  $A_7$ , za gen lokus *6-Pgdh-A* (Tablica 1b). Isto se ponašaju i genotipovi (Tablica 1b).

Tablica 7. Fisherov precizni test homogenosti alelnih i genotipskih (GT) frekvencija između subpopulacija Igman – A (A) i Igman – B (B)

Table 7 *Fisher's exact test of the homogeneity of allele and genotype (GT) frequency between subpopulations Igman – A (A) and Igman – B (B)*

Subpopulacije Subpopulation	<i>Aco-A</i>	<i>Fest-B</i>	<i>Got-A</i>	<i>Got-B</i>	<i>Got-C</i>	<i>Idh-A</i>	<i>Lap-B</i>	<i>Mdh-B</i>	<i>Mdh-C</i>	<i>Mnr-A</i>	<i>Mnr-C</i>	<i>Pgi-B</i>	<i>Pgm-A</i>	<i>Skdh-A</i>	<i>6-Pgdh-A</i>	<i>6-Pgdh-B</i>	<i>6-Pgdh-C</i>
A-B (aleli)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
A-B (GT)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns

Subpop. Analizirane subpopulacije smreke

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

ns.  $p > 0,05$  (niska razina razlika)

- Nije provedeno testiranje (jedan od genskih lokusa je monomorfan te testiranje nije moguće)

Diferencijaciju između subpopulacija na svakom pojedinačnom gen lokusu određujemo preko alelnih genetičkih odstojanja, koje se u subpopulaciji među-

sobno ne dijele i koje prezentiramo s poprečnim genetičkim odstojanjima za gen pool 17 polimorfnih gen lokusa. Srednje alelno genetičko odstojanje  $d_0$  (%)



između subpopulacija Igman – A i Igman – B za gene pool 17 polimorfni lokusa iznosi 4,1 %.

Ako analiziramo alelnu genetičku bliskost i genetičko odstojanje ( $d_0$ ), možemo primijetiti da je bliskost vrlo visoka te da su razlike relativno male. Tako smo dobili da je alelna bliskost s veličinom od 0,959, a uda-

ljenost 0,041 prema Gregoriusu (1974), što je u našem slučaju jako velika veličina s obzirom na to da su subpopulacije udaljene oko 2 km. Obično su neke normalne udaljenosti, gdje se dobije takvo odstojanje za autohtone populacije smreke oko 100 km, ali samo u njenom prirodnom prostiranju.

## RASPRAVA I ZAKLJUČCI – Discussion and conclusions

Uspoređivali smo genetičku strukturu dvije subpopulacije s jedne, u ekološkom pogledu interesantne planine, za koju je svojstvena pojava mrazišta. To ovom istraživanju daje posebnu specifičnost, jer ukazuje na mogućnost da se izvrši razdioba jedne veće populacije na manje subpopulacije, prema lokalnim klimatskim uvjetima koji vladaju na jednom užem području, kao i da se ukaže na moguću primjenu tih rezultata u praksi.

Subpopulacije s Igmana pokazale su nisku razinu varijabilnosti, odnosno alelnog diverziteta, dok su prisutne značajne razlike u frekvencijama alela. Neki od nađenih alela su rijetki i pokazuju svojstvenost samo za odgovarajuću subpopulaciju, kao i heterozigotnost pojedinih alela. Genetička varijabilnost unutar subpopulacija ponaša se slično heterozigotnosti, gdje pojedini gen lokusi pridonose znatno više varijabilnosti od drugih, kao i između subpopulacija. Kod subpopulaciju Igman – A visoka heterozigotnost lokusa *6Pgdh-C* i *Mnr-A* upućuje na to da selekcijski procesi djeluju pozitivno na te lokuse, dok je kod *Got-B* suprotan učinak, što je vidljivo iz male heterozigotnosti ovog lokusa. Za subpopulaciju Igman – B može se potvrditi da imamo moguće selekcijske pritiske koji favoriziraju visoku heterozigotnost lokusa *Mnr-A*, dok je kod lokusa *Got-A* i *Got-B* taj tip selekcije izostao. Tako dobivene heterozigotnosti upućuju nas na različite selekcijske pritiske koji djeluju u te dvije subpopulacije te na njihove razlike.

Analizom genetičkih odstojanja ( $d_0$ ) možemo primijetiti da su jako mala, čak znatno manja nego što je dobio Božič (2002) za razlike između smreke sa tresetišta i tipičnog staništa na Pokljuki u Sloveniji. Razlog za manje razlike može biti u slabijem selekcijskom pritisku koji nastaje klimatskim djelovanjem od onoga koji nastaje djelovanjem različitih tipova tala. Inače u

mnogim radovima potvrđuje se vertikalna izdiferenciranost smreke (Müller-Starck 1989; Krajmerová i Longauer 2000; Pacalaj i sur. 2002).

U Norveškoj su provedena istraživanja sa smrekom prema njenom vertikalnom (visinskom) rasprostranjenju (Barner i Willan, 1995), te je na temelju rezultata iz tih pokusa izdijeljena na visinske oblasti, odnosno napravljena je vertikalna rajonizacija. Ova razdioba temelji se u biti na zemljopisno klimatskim čimbenicima, a oni pak grade elemente koji ograničavaju distribuciju šumskih zajednica. Stoga oni tu razdiobu rabe kod distribucije reprodukcijanskog materijala, sjemena i sadnica, te koriste materijal samo unutar regije u kojemu su sakupljeni. Inače, za običnu smreku određene su i visinske regije, uz one u horizontalnom smislu, unutar kojih se može prenositi reprodukcijanski materijal, a da ne dođe do većih problema koji nastaju tijekom procesa prilagodbe. Tako se u visinskom pogledu materijal može prenositi do nekoliko stotina metara prema gore ili dole (250 m) od mjesta sabiranja.

Dobiveni rezultati iz ovog istraživanja također ukazuju na to da se vertikalnoj rajonizaciji sjemenskih objekata treba posvetiti dužna pozornost i kod nas. Prenošenje materijala treba biti suptilnije nego je to slučaj kod Norveške, jer su granice između diferenciranih populacija jako uske, a u ovom istraživanju su već na oko 100 m visinske razlike. Ukoliko želimo napraviti intervenciju na mrazištu, potrebno je koristiti samo autohtoni materijal mrazišne smreke, koji je sakupljan na tom staništu i koji će biti uporabljen samo na mrazištima. Stoga reprodukcijanski materijal smreke koja raste izvan mrazišta, treba uporabiti samo na staništima izvan mrazišta koja su propisana prema molekularno genetičkoj rajonizaciji.

## ZAHVALA – Acknowledgement

Ovo istraživanje realizirano je uz financijsku potporu Federalnog ministarstva za poljoprivredu, vodoprivredu i šumarstvo, odnosno Federalne uprave za šume, Bosne i Hercegovine, u okviru projekta "Istraživanje genetičke strukture, genetičkog diverziteta i genetičke diferenciranosti prirodnih populacija smreke (*Picea abies* Karst.) u dijelu prirodnog rasprostranjenja u Bosni i Hercegovini", pa kolegama iz Ministarstva

dugujem veliku zahvalnost, posebice direktoru Omeru Pašaliću, dipl. ing. šum.

## LITERATURA – References

- Barner, H., R. L. Willan, 1995: Seed Collection Units: 1. Seed Zones. Danida Forest Seed Center, Humlabaek: DK, Technical Note. 16:36 p.
- Bergmann, F., F. Scholz, 1987: The impact of air pollution on the genetic structure of Norway spruce. *Silvae Genetica*, 36 (2): 80–83.
- Bergmann, F., F. Scholz, 1989: Selection effects of air pollution in Norway spruce (*Picea abies*) populations. In: Scholz, F., Gregorius, H.R., Rudin, D. (ed.): Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations, Springer Verlag, 143–160, Berlin.
- Bergmann, F., B. Hosius, 1996: Effects of heavy-metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water, Air and Soil Pollution*, 89: 363–373.
- Božič, G., 2002: Subpopulation differentiation under different forest site conditions within autochthonous Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) population. *Razprave IV. Razreda SAZU*, XLIII-3: 95–109, Ljubljana.
- Božič, G., M. Urbančič, 2001: Influences of the soils on the morphological characteristics of an autochthonous Norway spruce on the Pokljuka plateau. *Glas. Šum. Pokuse*, 38: 137–147, Zagreb.
- Božič, G., M. Urbančič, 2003: The morphological and genetical characterisation of native Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) population in the area of Pokljuka mire. *Acta Biologica Slovenica*. 46 (1): 17–25, Ljubljana.
- Crow, J. F., M. Kimura, 1970: Introduction to Population Genetics Theory, Harper and Row, New York.
- Gillet, E. M., 1998: GSED – Genetic Structures from Electrophoresis Dana. Version 1.1. Institut fuer Forstgenetik und Forstpflanzenzuechtung, Universitaet Gottingen, str. 48.
- Goncharenko, G. G., V. Potenko, J. N. Slobodyan, A. I. Sidor, 1990: Genetic and taxonomic relations between *Picea abies* (L.): *montana* Schur and *P. obovata* Ledeb. *Doklady Akademii Nauk BSSR*, 34: 361–364.
- Goncharenko, G. G., V. Potenko, 1992: Genetic variability and differentiation in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.) populations. *Soviet Genetics*, 27: 1235–1246.
- Gregorius, H. R., 1974: Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica*, 23: 22–27.
- Gregorius, H. R., 1978: The concept of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 74, 397–401.
- Gregorius, H. R. 1987: The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* 74: 397–401.
- Hosius, B., F. Bergmann, 1993: Adaptation of Norway spruce to heavy metal contaminated soil. In: Rone, V. (ed.): Norway spruce Provenances and Breeding. Latvian Forest Research Institute 'Silva', 200–207, Riga.
- Konnert, M. 2004: Handbücher für Isoenzymanalyse. [www.genre.de/fgrdeu/blag/iso-handbuecher](http://www.genre.de/fgrdeu/blag/iso-handbuecher).
- Krajmerová, D., R. Longauer, 2000: Genetická diverzita smreka obyčajného na Slovensku. *Forestry Journal*, 46 (3):273–286.
- Krutovskii, V. K., F. Bergmann, 1995: Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *Picea obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*, 74: 464–480.
- Langercrantz, U., N. Ryman, 1990: Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution*, 44: 38–53.
- Longauer, R., D. Gömöry, L. Paule, D. F. Karnosky, B. Maňkovská, G. Müller-Starck, K. Percy, R. Szaro, 2001: Selection effects of air pollution on gene pools of Norway spruce, European silver fir and European beech, *Environmental Pollution*, 115: 405–411.
- Müller-Starck, G., 1989: Genetic implications of environmental stress in adult forest stands of *Fagus sylvatica* L. In Scholz, F. Gregorius, H.R., Rudin, D. (Ed.), Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations. Springer Verlag, 127–142, Berlin.
- Müller-Starck, G., P. H. Baradat, F. Bergmann, 1992: Genetic variation within European tree species. In: Adams, W.T., Strauss, S.H., Copes, D.L. (ed.): Population Genetics of Forest Trees, Kluwer Academic Publishers, str. 23–47, Amsterdam.
- Pacalaj, M., R. Longauer, D. Krajmerová, D. Gömöry, 2002: Effect of site altitude on growth and survival of Norway spruce (*Picea abies* L.) provenances on the Slovak plots of IUFRO experiment 1972, *J. For. Sci.*, 48 (1): 16–26.
- Raymond, M., F. Rousset, 1995: GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, 86: 248–249.

- Stefanović, V., 1977: Fitocenologija sa pregledom šumskih fitocenoza Jugoslavije. Zavod za udbenike str. 283, Sarajevo.
- Skrøppa, T., 2003: EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Norway spruce (*Picea abies*). International Plant Genetic Resources Institute, pp. 6, Rome.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. B. J. Boyle, Z. H. Ye, J. X. Mao, 1999: POPGENE 3.2, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton.
- Wright, S., 1978: Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4: Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press.

**SUMMARY:** In this study we analyzed the genetic structure of two autochthonous subpopulations of Norway spruce in the Mountain of Igman by usage of isoenzyme markers. We collected the material for the analysis in two separate plant communities. The subpopulation Igman – A is represented by fir-tree and spruce forest with randomly distributed white pine trees (*Abieti-Piceetum illyricum* Stef. 1960) while the Igman – B subpopulation is represented through the spruce tree of frosty type in the mountain area (*Piceetum montanum* s.lat. (Fuk. et Stef., 1958, emend. Horv. et al., 1974)). Between the subpopulations there is a 150 m difference in altitude. We analyzed the following systems of Acotinase (Aco-A), Glutamate dehydrogenase (Gdh-A), Glutamate oxaloacetate transaminase (Got-A, Got-B, Got-C), Isocitrate dehydrogenase (Idh-A, Idh-B), Leucine aminopeptidase (Lap-B), Malate dehydrogenase (Mdh-A, Mdh-B, Mdh-C), Menadione reductase (Mnr-A, Mnr-C), Phosphoglucose isomerase (Pgi-B), Phosphoglucomutase (Pgm-A), Shikimate dehydrogenase (Skdh-A), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-Pgdh-A, 6-Pgdh-B, 6-Pgdh-C) and Fluorescentesterase (Fest-B).

The frequency of the allele and the frequency of genotypes show diversity between subpopulations. The Allele differentiation was most evident at loci Got-C, 6-Pgdh-A. In the sample of the Igman – A subpopulation the frequency of the allele Aco-A<sub>2</sub> was 7 % lower, and the frequency of 6-Pgdh-A<sub>2</sub> 7 % higher than in the sample from Igman – B subpopulation. The genotype subpopulations are most explicitly differentiated at loci Fest-B, Got-C, Lap-B, Mdh-C, Mnr-A, Mnr-C, Pgi-B, 6-Pgdh-A, 6-Pgdh-B, 6-Pgdh-C. If the Igman – A subpopulation is compared with Igman – B subpopulation, we have 8–14% higher frequency of homozygote: Got-C<sub>44</sub> (52 % vs. 44 %), Fest<sub>22</sub> (90 % vs. 80 %), Mnr-A<sub>22</sub> (12 % vs. 4 %), Mnr-C<sub>22</sub> (94 % vs. 82 %), 6-Pgdh-A<sub>22</sub> (94 % vs. 80 %), 6-Pgdh-C<sub>22</sub> (42 % vs. 30 %) and from 10–14 % higher heterozygote frequency for gene loci: Lap-B<sub>46</sub> (12 % vs. 0 %), Pgi-B<sub>23</sub> (52 % vs. 42 %), 6-Pgdh-B<sub>25</sub> (54 % vs. 40 %). In Igman – B subpopulation versus Igman – A subpopulation has 10 % higher homozygote frequency, as follows: Pgi-B<sub>33</sub> (46 % vs. 36 %), 6-Pgdh-B<sub>22</sub> (50 % vs. 40 %) and between 8–14 % heterozygote frequency Fest-B<sub>12</sub> (14 % vs. 2 %), Mnr-A<sub>24</sub> (70 % vs. 56 %), Mnr-C<sub>23</sub> (16 % vs. 4 %), 6-Pgdh-A<sub>23</sub> (12 % vs. 4 %), 6-Pgdh-C<sub>25</sub> (60 % vs. 46 %).

By statistical calculation we obtained an average number of allele per locus, thus in the subpopulation A the number of allele per locus was 2,71, and the effective was 1,307, and in the subpopulation B it was 2,59, while the effective number was 1,332. The actual heterozygosity in subpopulation A was 24,4 %, and expected was 84,1 %, and in the subpopulation B the actual was 26,2 %, and expected 81,9 %. The number of polymorphous loci in both populations was 17, and the percentage of polymorphous loci was 85,00%.

Through the analysis of the allele genetic closeness and genetic distance ( $d_0$ ), we can conclude that the closeness is very high, and differences are relatively small. Thus we determined that the allele closeness has the value of 0,959, and the distance is 0,041 according to Gregorius (1974), which in our case is an extremely high value taking into account the distance between subpopulations of approximately 2 km.

Applied statistical parameters for comparison of populations did not show major differences, but the analysis of the direct comparison of the allele presence and their frequency points at the existence of differences, that is, the influence of diverse selection pressures at populations.