

GENETIČKA VARIJABILNOST OBIČNE SMREKE (*Picea abies* /L./ H. Karst.) U BOSANSKOM DIJELU DINARIDA*

GENETIC VARIABILITY OF NORWAY SPRUCE
(*Picea abies* /L./ H. Karst.) IN THE BOSNIAN PART
OF THE DINARIC MOUNTAIN RANGE

Dalibor BALLIAN¹, Faruk BOGUNIĆ¹, Gregor BOŽIČ²

SAŽETAK: Priznatim izoenzimskim bilježima, izvršili smo molekularno genetičku identifikaciju dijela prirodnih populacija smreke u Dinaridima, na širem području Bosne i Hercegovine.

Uporabom izoenzimskih biljega analizirali smo 13 populacija smreke (*Picea abies* Karst.), dok smo varijabilnost analizirali uporabom 13 enzimske sustava, te proveli analize na 20 polimorfnih lokusa, sa 73 alela. Prosječan broj alela po lokusu kretao se od 1,80 do 2,60. Analizom smo utvrdili postojanje velike varijabilnosti unutar populacija, te za gen lokus GOT – C postojanje klinalne varijabilnosti. Genetički multilokusni diverzitet iznosio je od 27,5 do 37,0, a gen pool diverzitet od 1,277 do 1,380. Provedeno istraživanje pokazalo je da populacija Vlašić ne pripada autohtonim, prirodnim populacijama smreke u Bosni i Hercegovini. Dobivena srednja alelna udaljenost između analiziranih populacija kretala se od 0,18 % do 2,06 %, te postoji povezanost između genetičkih i zemljopisnih udaljenosti, s izuzetkom populacije Vlašić.

Ključne riječi: obična smreka (*Picea abies* /L./ H. Karst.), izoenzimi, varijabilnost, populacija

UVOD – Introduction

Obična smreka (*Picea abies* Karst.) predstavlja jednu vrlo značajnu vrstu šumskog drveća s gospodarskog i ekološkog gledišta, te najvećom varijabilnošću u Europi (Koski i sur. 1997), a, pa tako i u Bosni i Hercegovini. Zbog svoje važnosti zauzima jedno od prioritarnih mjesta u istraživanju genetičke strukture prirodnih populacija (Božič i sur. 2003; Geburek 1999, Longauer i sur. 2001), kao i utjecaja ekoloških čimbenika na strukturu populacija (Božič 2002, Longauer i sur. 2001), te utjecaja zagađivanja i propadanja smrekovih šuma (Bergmann i Hosius

1996; Hosius i Bergmann 1993; Longauer i sur. 2001, Pacalaj i sur. 2002).

Dinaridi imaju izmijenjeno kontinentalnu klimu, a smreka se u njima nalazi na granici svog prirodnog rasprostiranja. Tako se u Dinaridima nalazi između dvije kontrastne klimatske zone, tipične kontinentalne Pannonskog bazena i mediteranske Jadranskog primorja, što joj uz disjunkcijsko područje rasprostiranja vjerojatno daje specifičnu genetičku strukturu. Inače smreka pokazuje veliku osjetljivost na ekstremno kontinentalnu klimu, a posebno na zimske suše (Tranquillini, 1979, Sakai i Archer, 1987), te takva staništa u Dinaridima izbjegava. Inače prema nekim autorima (Huntley i Birks, 1983; Schmidt – Vogt, 1978, Ravazzi 2002) podrijetlo smreke iz područja Dinarida treba tražiti u Balkanskom glacijalnom pribježištu. Stoga bi populacije središnjih Dinarida trebale sadržavati visoku genetičku varijabilnost uz minimalno redu-

* Manji dio ovog istraživanja prezentiran je na skupu – IV simpozij poljoprivrede, veterinarstva i šumarstva – “Strategija razvoja domaće proizvodnje”, Zenica, 28–29. 9. 2006. i izaći će u zborniku radova kao prethodno priopćenje.

¹ Doc. dr. sc. Dalibor Ballian, mr. sc. Faruk Bogunić, Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu

² Dr. sc. Gregor Božič, Šumarski institut u Ljubljani

ciranje veličine populacija tijekom zadnje glacijacije (Lewandowski i sur. 1997).

U Bosni i Hercegovini obična smreka raste na površini od oko 585 000 ha ili u oko 21 % svih šuma (Matić i sur. 1970), u različitim biljnim zajednicama, ponajprije mješovitim s običnom jelom i bukvom. Ovi podaci ukazuju na to koliko je smreka važna za proizvodno šumarstvo, a i ekologiju, te je po važnosti odmah iza bukve i obične jele.



Slika 1. Muški cvjetovi kod smreke
Picture 1 Norway spruce male flowers



Slika 2. Ženski cvijet kod smreke
Picture 2 Norway spruce female flowers

Kao i u mnogim europskim zemljama, zdravstveno se stanje smrekovih šuma Bosne i Hercegovine u zadnje vrijeme pogoršava. Razloge treba tražiti u neodgovarajućem gospodarenju, ali i u jakim klimatskim promjenama u zadnja dva desetljeća. Ponajprije tu su dugotrajne suše, praćene ekstremno visokim temperaturama, što je značajno narušilo stabilnost smrekovih šuma (Dautbašić, 1997). To se to jako odrazilo na umjetne nasade koje su podignute izvan optimalnih ekoloških uvjeta za smreku. Posebno je interesantno da smreka u odnosu na bukvu i običnu jelu ima smanjenu sposobnost prirodne obnove u mješovitim šumama, a to dovodi do toga da u šumama često prevlada agresivnija bukva, a ponekad i obična jela.

U proteklom stoljeću, način gospodarenja ostavio je velik trag na populacije smreke u Bosni i Hercegovini. Iako su se mnoge gospodarske mjere provodile prema

svim znanstvenim kriterijima, rezultati su izostajali. Razlog tomu ležao je u reprodukcijom materijalu, jer se u to vrijeme nije vodilo računa o njegovom podrijetlu. Tako, neplanski i nesvjesno provedene aktivnosti, mogu ostaviti nesagledive posljedice na autohtone genetičke izvore. Ipak u središnjim Dinaridima situacija nije još alarmantna, jer su strukture prirodnih šuma još dobre. Za razliku od područja zapadnog Balkana, u Europi se ulažu veliki napor za očuvanje genetičkih izvora smreke, posebno u okviru programa EUFORGEN, odnosno mrežnog plana zaštite genetičkih izvora (Skroppa 2003), a te aktivnosti pokušavaju se provesti i u Bosni i Hercegovini.

Cilj ovog istraživanja je da se priznatim izoenzimskim biljezima, izvrši molekularno genetička identifikacija dijela prirodnih populacija smreke u Dinaridima na širem području Bosne i Hercegovine.

MATERIJAL I METODA RADA – Material and methods

Istraživane su prirodne populacije smreke u Bosni i Hercegovini. Ukupno je analizirano trinaest populacija (Tablica 1) iz različitih ekoloških uvjeta, odnosno različitih biljnih zajednica. Tijekom siječnja 2005. godine sakupljene su grančice s dormantnim pupovima. Prilikom sabiranja uzoraka za izoenzimska istraživanja vo-

dilo 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. Za ovaj način istraživanja selekcionirano je 50 stabala.

Tablica 1. Istraživane populacije smreke u Bosni i Hercegovini
 Table 1 Investigated Norway spruce populations in Bosnia and Herzegovina

Broj No.	Populacija Population	Zemljopisna širina Longitude	Zemljopisna dužina Latitude	Broj analiziranih individua Number of the samples per population
1	Grmeč (Bos. Petrovac)	16°37'32"	44°39'43"	50
2	Preodac (Bos. Grahovo)	16°33'49"	44°09'44"	50
3	Busije (Glamoč)	16°49'13"	44°02'08"	50
4	Rasticevo (Kupres)	17°17'50"	44°03'52"	50
5	Vlasic (Turbe)	17°27'02"	44°19'35"	50
6	Bistrica (Gornji Vakuf)	17°40'53"	43°59'22"	50
7	Igman – a (mrzišna)	18°16'01"	43°44'48"	50
8	Igman – b (normalna)	18°16'19"	43°45'19"	50
9	Zelegora (Kalinovik)	18°37'32"	43°39'39"	50
10	Bijambare (Nišići)	18°29'39"	44°05'01"	50
11	Tibija (Olovo)	18°20'27"	44°20'37"	50
12	Romanija (Mokro)	18°39'45"	43°54'05"	50
13	Han Krame (Han Pijesak)	18°53'28"	44°02'17"	50
Ukupno Total				650

Tablica 2. Enzimski sustavi, E.C. referentni broj, gen lokus
 Table 2 Enzyme systems, E.C. code, gene loci

Enzimski sustavi Enzyme systems	E.C. broj E.C. no.	Analizirani gen lokusi Analysing gene loci
Isocitratdehidrogenase (IDH)	1.1.1.42	IDH-A, IDH-B
Malatdehidrogenase (MDH)	1.1.1.37	MDH-A, MDH-B, MDH-C
Leucinaminopeptidase (LAP)	3.4.11.1	LAP-B
Glutamatoxalacetattransminase (GOT)	2.6.1.1	GOT-A, GOT-B, GOT-C
Phosphoglucomutase (PGM)	2.7.5.1	PGM-A
Phosphoglucose isomerase (PGI)	5.3.1.9	PGI-B
Glutamatdehidrogenase (GDH)	1.4.1.2	GDH-A
Shikimic acid dehidrogenase (SKDH)	1.1.1.25	SKDH-A
6-phosphogluconatdehidrogenase (6-PGDH)	1.1.1.44	6-PGDH-B, 6-PGDH-C
Fluorescent esteraze (FEST)	3.1.1.1	FEST-B
Menadionreductase (MNR)	1.6.99.2	MNR-A, MNR-B
Acotinase (ACO)	4.2.1.3	ACO-A
Glucose-6-phosphat-dehidrogenase (6PDH)	1.1.1.49	6PDH-A

Za analizu genetičke strukture uporabljeni su izoenzimski biljezi (Tablica 2), a interpretacija zimograma načinjena je prema protokolu koji je dao M. K o n n e r t (1995, 2004).

Za izračunavanje parametara genetičke varijabilnosti uporabili smo statistički program GSED (Gillet,

1998). Genetička udaljenost između populacija izračunata je prema N e i -ju (1972, 1978), a za crtanje dendrograma uporabili smo metodu UPGMA, modificiranu za NEIGHBOR proceduru kod programa PHYLIP Version 3.5.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA – Results and discussions

Alelna varijabilnost – Allels variability

Iz dobivenih alelnih frekvencija analiziranih lokusa vidljivo je da svi od 20 analiziranih gen lokusa pokazuju određeni stupanj polimorfnosti, iako postoje popula-

cije koje za određene gen lokuse pokazuju monomorfizam. Za istraživane polimorfne lokuse alelne veličine dane su u tablici 3.

Tablica 3. Alelne frekvencije u %
 Table 3 Allele frequencies in %

Gen lokusi <i>Gene loci</i>	Aleli <i>Allels</i>	Grnec	Preodac	Busije	Rastičevo	Vlasić	Bistrica	Igman – a	Igman – b	Zelegora	Bijambare	Tibija	Romanija	Han Krame
IDH	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	A2	6	2	6	7	0	12	3	6	9	6	4	4	8
	A3	94	97	93	93	100	87	95	94	90	90	95	96	91
	A4	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
	A5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
IDH	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1
	B3	96	100	100	98	100	98	100	100	100	98	98	100	97
	B4	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1
	B5	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1
MDH	A1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	A2	100	100	100	100	100	99	100	100	99	100	100	100	100
MDH	B1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	B2	100	100	100	99	100	100	98	97	99	100	100	99	100
	B3	0	0	0	1	0	0	2	2	0	0	0	1	0
MDH	C2	6	4	4	5	0	5	7	4	7	3	2	7	9
	C3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C4	94	94	95	95	100	95	93	96	93	97	98	93	91
	LAP	B1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
LAP	B2	0	3	1	1	5	1	0	1	2	0	2	3	0
	B3	19	12	24	26	2	26	18	21	16	17	2	24	13
	B4	70	79	73	68	92	71	76	76	81	81	67	70	78
	B5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	B6	8	5	2	5	0	2	6	0	1	2	11	3	9
	GOT	A1	3	2	3	5	0	0	2	1	1	0	1	0
GOT	A2	97	98	97	95	100	100	98	99	99	100	99	100	100
	B1	4	0	2	0	0	0	0	1	0	2	0	1	2
GOT	B2	96	100	98	100	99	96	99	99	100	95	100	99	98
	B3	0	0	0	0	1	4	1	0	0	3	0	0	0
	C2	52	46	51	42	25	37	29	34	39	36	38	38	33
GOT	C4	48	54	41	52	63	62	69	62	60	62	56	58	66
	C5	0	0	8	6	12	1	1	4	1	2	5	3	0
	C6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
	PGM	A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
PGM	A2	97	97	96	93	93	94	97	97	95	92	92	98	92
	A3	2	3	4	7	7	6	3	3	5	8	7	2	5
	A4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	PGI	B1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
PGI	B2	25	31	31	29	9	37	38	33	23	29	25	28	32
	B3	75	69	69	71	91	63	62	37	76	71	75	72	67
	GDH	A2	99	96	100	100	88	100	100	100	100	100	100	100
SKDH	A3	1	4	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	1
	A1	0	2	5	2	0	2	3	0	0	4	3	4	0
	A2	0	0	1	6	0	3	7	10	4	5	1	10	6
	A3	94	94	88	91	100	93	88	88	92	87	96	77	89
	A5	3	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2
	A6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0
	A7	2	4	4	0	0	1	2	2	3	4	0	4	3
6PGDH	B1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

	B2	55	70	61	63	64	66	67	71	69	63	64	64	58
	B3	1	1	0	0	0	2	0	0	0	4	1	0	0
	B5	43	29	39	37	36	32	32	28	30	32	34	36	42
	B6	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
6PGDH	C2	49	51	45	61	75	59	65	60	57	69	65	53	58
	C4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C5	51	48	55	39	25	41	35	40	43	31	35	47	42
FEST	B1	1	1	4	2	0	6	2	7	7	3	6	7	2
	B2	96	97	93	95	93	93	94	90	93	94	92	93	95
	B3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	B4	3	2	3	3	7	1	3	3	0	3	2	0	3
MNR	A1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	A2	37	37	48	41	32	33	40	40	33	32	27	42	34
	A3	62	63	52	56	68	66	60	57	66	65	67	57	64
	A5	1	0	0	2	0	1	0	3	1	3	6	1	1
MNR	C1	1	1	2	2	0	2	0	0	1	2	0	0	3
	C2	95	99	94	98	99	91	96	90	92	96	100	9	87
	C3	4	0	4	0	1	7	4	10	7	2	0	10	10
ACO	A1	26	36	34	3	28	31	30	27	29	31	37	29	24
	A2	74	63	66	69	72	68	67	73	71	69	62	71	75
	A3	0	1	0	1	0	1	3	0	0	0	1	0	1
6PDH	A1	1	0	0	2	0	1	0	4	2	2	0	0	2
	A2	93	93	94	92	77	96	97	90	90	95	96	92	95
	A3	6	7	6	2	23	3	2	6	8	2	4	7	3
	A4	0	1	0	4	0	0	1	0	0	1	0	1	0

Svi analizirani gen lokusi pokazuju varijabilnost, iako u određenim populacijama varijabilnost nije registrirana. Takav slučaj imamo kod gen lokusa Idh – A za populaciju Vlašić, a kod Idh – B za populacije Preodac Vlašić, Igman a i b, Zelengoru i Romaniju. Kod gen lokusa Mdh – A kod jedanaest populacija imamo monomorfizam, dok se u dvije pojavljuje rijetki alel A1, a kod lokusa Mdh – B sedam populacija ne pokazuje varijabilnost, a šest pokazuje slabu varijabilnost, uz pojavu rijetkih alela B1 i B3. Za razliku od njih kod gen lokusa Mdh – C izostaje varijabilnost kod populacije Vlašić, dok je u svim ostalim populacijama registrirana uz pojavu rijetkog alela C3 u dvije populacije iz zapadne Bosne. Analiza gen lokusa Lap – B pokazala je pojavu visoke varijabilnosti u svim istraživanim populacijama, a registrirano je 6 alela. Inače za populaciju Vlašić interesantna je pojava visoke frekvencije alela B4. Kod gen lokusa Got – A, varijabilnost je izostala kod pet populacija iz istočne i središnje Bosne, dok je u zapadnom i jugoistočnom području primjetna pojava slabijeg polimorfizma. Nešto izmijenjenu situaciju imamo za gen lokus Got – B, gdje dvije populacije iz zapadne, te jedna iz istočne i jugoistočne Bosne ne pokazuju polimorfizam, dok istočne i grupa populacija središnje Bosne pokazuje mali stupanj varijabilnosti. Za gen lokus Got – C je svojstvena velika varijabilnost, kao i kod gen lokusa Lap – B, uz pojavu rijetkog alela C6 u jednoj središnjoj i tri istočne populacije. Za Got C prisutna je klinalna varijabilnost od zapada prema istoku gdje opadaju frekvencije

alela C2, a rastu frekvencije alela C4. Za Gen lokus Pgm – A svojstvena su četiri alela, od kojih su dva A1 i A4 rijetki, a sve populacije pokazuju polimorfizam. Na sličan način ponaša se i lokus Pgi – B, s prisutnom varijabilnošću u svim populacijama i rijetkim alelom B1 u dvije populacije, jednoj krajnje istočnoj i drugoj krajnje jugoistočnoj. Gen lokus Gdh – A ne pokazuje varijabilnost u devet populacija, dok su u dvije krajnje zapadne i jednoj istočnoj populaciji prisutan alel A3. U ovom slučaju se vrlo čudno ponaša populacija Vlašić s visokom frekvencijom alela A3. Gen lokusa Skdh – A predstavljen je sa šest alela, ali imamo pojavu monomorfizma u jednoj populaciji (Vlašić), dok ostale pokazuju polimorfizam. Za gen lokus 6Pgdh – B svojstven je visoki polimorfizam u svim populacijama uz pojavu rijetkih alela B1 i B6. Sličnu situaciju imamo i kod gen lokusa 6Pgdh – C s rijetkim alelom C4, koji je registriran u populaciji Preodac iz zapadne Bosne. Kod lokusa Fest – B također imamo pojavu polimorfizma uz pojavu jednog rijetkog alela B3 u populaciji Igman – a. Za lokus Mnr – A registrirali smo četiri alela i visoki polimorfizam, dok je alel A1 rijedak i imamo ga u samo dvije populacije. Kod lokusa Mnr – C imamo pojavu monomorfizma u populaciji Tibija, a interesantan je veći polimorfizam kod populacija iz istočnog dijela Bosne, za razliku od onog iz zapadnog dijela. Za lokus Aco – A registriran je visoki polimorfizam u svim populacijama, kao i kod lokusa 6Pdh – A uz značajno odstupanje frekvencija alela A2 i A3 u populaciji Vlašić od prosjeka.

Međupopulacijska varijabilnost – *Interpopulation variability*

Dobivene veličine za unutarpopulacijsku varijabilnost predstavljene su u tablici 4. Srednji broj alela po lokusu kretao se od 1,80 kod populacije Vlašić, do 2,60 kod populacije Han Krame. Inače ova veličina je u izravnoj vezi s brojem analiziranih individua, ali smo broj analiziranih individua u ovom istraživanju ujednačili na 50. Tako dobivene visoke veličine za populacije Han Krame i Grmeč ne možemo povezati s brojem analiziranih individua. Inače jedna je krajnja istočna populacija a druga zapadna, te su predstavnici visokovrijednih prirodnih šuma u tim područjima. Interesantna je veličina koja je dobivena za populaciju Vlašić, a što je izgleda izravno povezano s njenim podrijetlom koje nije autohtono, što potvrđuje ovo istraživanje. Ostale populacije iz ovoga istraživanja također pokazuju visoke vrijednosti ovog svojstva. Postotak polimorfnih lokusa prilično je visok u svim populacijama, osim u populaciji Vlašić, što povežemo s njenim podrijetlom.

Također relativno nizak postotak imamo u populaciji Tibija (75 %), što bi se moglo povezati s povijesnim razvojem i povijesnim antropogenim utjecajem čovjeka na tu populaciju. Inače interesantna je jako visoka vrijednost dobivena za populaciju Grmeč iz zapadne Bosne.

Parametri genetičke varijabilnosti ukazuju na postojanje velike raznolikosti u učestalosti alela između 13 populacija smreke u Bosni i Hercegovini. Tako je najveća raznolikost nađena u populaciji Han Krame, koja je i najistočnija ($V_{gem} = 37,0$ i $n_e = 1,355$). Kod populacije Vlašić registrirana je jako mala veličina raznolikosti, značajno ispod prosjeka glede ostalih istraživanih populacija ($V_{gem} = 27,5$ i $n_e = 1,277$).

To može biti još jedan dokaz o neautohtonosti smreke u toj populaciji. Ostale populacije imaju veličine raznolikosti veće od $V_{gem} = 32,0$, koja je registrirana u populaciji Preodac i koja je najniža.

Tablica 4. Mjere genetičke varijabilnosti, raznolikosti i heterozigotnosti za 13 populacija smreke u Bosni i Hercegovini.

Table 4. Measures of genetic variability, diversity and heterozygosity on 13 populations of Norway spruce in Bosnia and Herzegovina

Populacija Populations	Varijabilnost Variability		Raznolikost Diversity		Heterozigotnost Heterozygosity	
	A/L	P (%)	V_{gem}	n_e	H_{st} (%)	H_{te} (%)
Grmeč	2,55	90	35,2	1,355	20,2	20,7
Preodac	2,35	80	32,0	1,330	18,4	19,2
Busije	2,30	80	35,6	1,378	21,7	21,5
Rastičevo	2,40	85	36,0	1,375	20,0	21,4
Vlašić	1,80	65	27,5	1,277	21,0	16,9
Bistrica	2,50	85	35,8	1,361	21,6	21,4
Igman - A	2,45	85	33,8	1,335	20,7	19,9
Igman - B	2,35	85	35,5	1,353	22,3	21,1
Zelegora	2,40	85	34,0	1,326	20,4	20,2
Bijambare	2,50	80	35,5	1,336	19,9	20,4
Tibija	2,40	75	33,6	1,352	19,8	19,7
Romanija	2,30	80	36,4	1,380	24,0	21,8
Han Krame	2,60	85	37,0	1,355	20,8	21,6

Također smo analizirali stvarnu i očekivanu heterozigotnost. Stvarana je varirala od 18,4 % kod populacije Preodac do 24,0 % kod populacije Romanija. Veličina očekivane heterozigotnosti je kod pet populacija veća od stvarne, što nam ukazuje na pojavu negativnih veličina fiksacijskog koeficijenta, odnosno inbridinga.

U drugih osam populacija našli smo na veću očekivanu heterozigotnost, što upućuje na prisutnost inbridinga u tim populacijama. Razlike između stvarne i očekivane heterozigotnosti pokazale su značajnost na razini od 95 % samo kod populacija Vlašić i Romanija.

Međupopulacijska diferencijacija – *Interpopulation differentiation*

U ovom istraživanju genetička odstupanja procijenjena su uz pomoć metode N_e i -ja (1972). Tako dobiveni rezultati, koji su prikazani u tablici 5, ukazuju da su najmanje razlike između populacija Igman – A i B s veličinom od 0,18 %, što je bilo i za očekivati, jer su to populacije s jednog užeg područja, no glede ekoloških

uvjeta između tih populacija prisutna je značajna razlika o čemu izvještava Ballian i sur. (2007). Dobiveni rezultat ukazuje na visoku genetičku sličnost između ove dvije populacije. Inače populacija Vlašić pokazuje veliko odstupanje u odnosu na sve ostale populacije, te time potvrđuje ranije navode da je ta populacija nastala

Tablica 5. Procjena genetičke udaljenosti na temelju parova kod populacije smreka iz Bosne i Hercegovine: srednja alelna odstojanja (Nei 1972)

Table 5. Estimates of genetic distances between pairs of Norway spruce populations in Bosnia and Herzegovina: mean allelic distances (Nei 1972)

Populacije Populations	Grmeč	Preodac	Busije	Rastičevo	Vlašić	Bistrica	Igman – a	Igman – b	Zelegora	Bijambare	Tibija	Romanija	Han Krame
Grmeč	-												
Preodac	0,35	-											
Busije	0,26	0,36	-										
Rastičevo	0,30	0,33	0,34	-									
Vlašić	1,58	1,26	2,06	1,34	-								
Bistrica	0,52	0,37	0,60	0,27	1,56	-							
Igman – a	0,77	0,43	0,84	0,33	1,33	0,22	-						
Igman – b	0,61	0,39	0,60	0,28	1,24	0,21	0,18	-					
Zelegora	0,40	0,25	0,59	0,32	0,92	0,24	0,37	0,19	-				
Bijambare	0,64	0,43	0,84	0,30	0,92	0,23	0,21	0,27	0,23	-			
Tibija	0,52	0,38	0,75	0,25	1,05	0,32	0,42	0,48	0,34	0,25	-		
Romanija	0,39	0,40	0,36	0,27	1,54	0,34	0,37	0,19	0,28	0,45	0,54	-	
Han Krame	0,44	0,49	0,76	0,40	1,26	0,26	0,26	0,30	0,26	0,29	0,51	0,34	-

od introduciranog sjemena nepoznatog podrijetla. Najveću udaljenost pokazuje u odnosu na populacije Busije (2,06 %), a najmanje u odnosu na populacije Bijambare i Zelegora (0,92 %). Ova odstupanja ne mogu se objasniti zemljopisnom udaljenošću, kao što je slučaj između populacija Busije i Bijambare, te Busije i Igman – a, s veličinom od 0,84 %. Interesantne su veličine odstupanja koje pokazuje populacija Bistrica, relativno niske vrijednosti udaljenosti u odnosu na deset istraživanih populacija, a razlog treba tražiti u njenom zemljopisno gledajući, središnjem položaju u Bosni i Hercegovini, a slično se ponašaju i populacije Igman – a i b.

Srednja veličina diferencijacije ima prilično nisku vrijednost $D_j = 1,91$. Ova veličina upućuje na to da visoka proporcija ukupnog diverziteta (koja može biti procijenjena s oko 98 %), može to zahvaliti genetičkoj varijabilnosti između individua unutar populacijama. Inače ako analiziramo lokuse (Tablica 6), možemo primijetiti da lokus Gdh – A pokazuje najveći diferenciranost, što se može povezati s pojavom monomorfizma u devet populacija, te jako slabog polimorfizma u četiri populacije. Sljedeći lokusi 6Pdh – A, Mnr – C, Lap – B također prema svojim veličinama imaju važan udio u diferencijaciji, ali razlog tome treba potražiti u velikom broju registriranih alela (Tablica 3). Za razliku od njih, kod lokusa Got – C imamo pojavu klinalne varijabilnosti za alele C2 i C4 (Tablica 3).

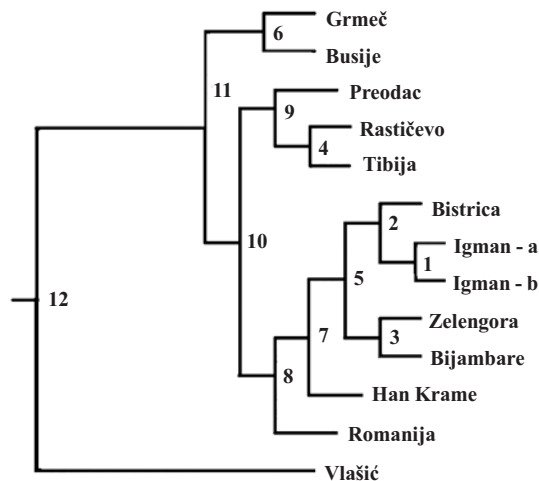
Iz dendrograma (Slika 3 i 4) vidljivo je da se populacije mogu grupirati u tri grupe. Jednu od grupa predstavlja populacija Vlašić, koja je u cijeloj analizi pokazivala odstupanje. Druge dvije grupe dijele se prema zemljopisnoj pripadnosti populacija. Tako imamo grupu populacija zapadne Bosne (Grmeč, Busije, Preodac i

Tablica 6. Populacijska diferenciranost (Nei 1978)

Table 6. Population differentiation (Nei 1978)

Gen - lokus Gen lokus	Diferenciranost (D _j) Differentiation (D _j)
Idh - A	1,68
Idh - B	1,47
Mdh - A	0,85
Mdh - B	1,26
Mdh - C	1,14
Lap - B	2,51
Got - A	1,64
Got - B	1,80
Got - C	2,40
Pgm - A	0,97
Pgi - B	2,42
Gdh - A	7,72
Skdh - A	2,70
6Pgdh - B	0,89
6Pgdh - C	2,63
Fest - B	1,01
Mnr - A	1,12
Mnr - C	2,87
Aco - A	0,66
6Pdh - A	3,76
Sredina - Average	1,91

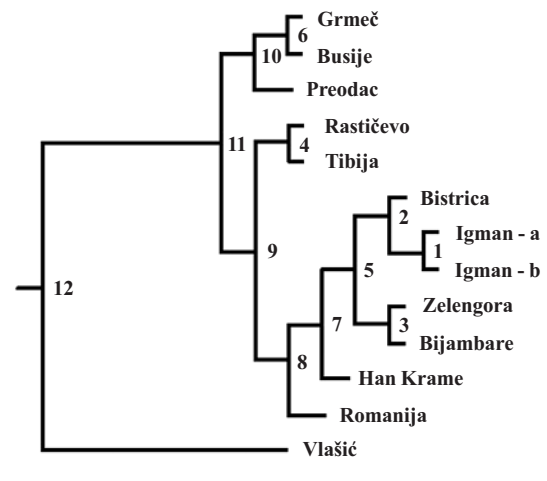
Rastičevo), što je bilo i za očekivati s obzirom na zemljopisnu udaljenost između njih. Izuzetak čini populacija Tibija (Olovo) koja se pridružuje njima, a što može biti posljedica broja individua u uzorku, odnosno povijesnog antropogenog djelovanja u njoj kroz selektivne sječe. U drugoj grupi su populacije istočne jugoistočne Bosne (Bijambare Romanija, Han Krame, Igman – a i b,



Slika 3. Dendrogram baziran na genetičkim odstojanjima prema Nei (1972)

Picture 3 Dendrogram of genetic distances Nei (1972)

Zelengora), te tako grade jedinstveno područje. Izuzetak u ovom slučaju je populacija Bistrica, koja bi, ako izvršimo zemljopisnu analizu, trebala biti bliska sa zapadno bosanskim populacijama, ali i populacijama Igman – a i b s kojima je relativno blizu. Analizirajući primarne dendrograme, interesantna je grupa 3, s populacijama



Slika 4. Dendrogram baziran na genetičkim odstojanjima prema Nei (1978)

Picture 4 Dendrogram of genetic distances Nei (1978)

Biambare i Zelengora, te grupa 4, Rastičevo i Tibija, koje su iz oprečnih ekoloških uvjeta, a pokazuju genetičku bliskost. Za populacije Igman, iako su pokazale odstupanja, a glede zemljopisne bliskosti, ovakav rezultat se i očekivao. I ovdje je izuzetak populacija Bistrica.

ZAKLJUČAK – Conclusion

- Analizom 20 izoenzimskih gen-lokusa utvrdili smo postojanje statistički značajnih razlika između istraživanih populacija, a utvrđena varijabilnost smreke kod nekih gen lokusa klinalnog je karaktera na ovom dijelu rasprostriranja.
- Između populacija Igman – A i B utvrđene su razlike, tako da je među njima prisutna vertikalna diferencijacija, jer su njihova genetička odstupanja značajna.
- Smreka iz mrazišnih populacija specifična je po sadržaju rijetkih alela u svojim populacijama.
- Populacija Vlašić svojom genetičkom strukturom ukazuje da je alohtona, te do detaljnih analiza koje bi se trebale provesti na tom području, reproduktivski se materijal ne bi smio koristiti ni u kakvom obliku, a posebnim mjerama gospodarenja spriječiti daljnje širenje neželjenih gena iz te populacije.
- Veća vrijednost heterozigotnosti istraživanih populacija u odnosu na populacije smreke iz zapadne Europe, pokazuje da istraživane populacije nisu mnogo izgubile od svoga genetičkog potencijala za adaptaciju, te vjerojatno nisu previše udaljene od svoga pribježišta. Stoga su te populacije puno otpornije na
- propadanje i sušenje od populacija sa zapada, jer posjeduju dovoljno genetičke varijabilnosti.
- Radi održavanja prirodnih genetičkih resursa smreke u Bosni i Hercegovini trebalo bi uspostaviti što gušću mrežu banki gena *in situ* i *ex situ* (sjemenske sastojine, sjemenske zone i sjemenske plantaže), nužnih za održanje genetičke raznolikosti u populacija. Na temelju provedenih istraživanja, to znači da bi svaka važna ekološka niša za smreku trebala imati svoju banku gena s odgovarajućim brojem jedinki, kako bi se očuvala ekološko-fiziološka osobnost populacija.
- U gospodarenju prirodnim šumama smreke, te u njihovoj obnovi, uvijek treba prednost dati prirodnoj obnovi, uz stalno praćenje genetičke strukture, kako bi se mogle poduzeti pravodobno mjere za održanje optimalne prirodne genetičke raznolikosti, koja je svojstvena za svaku populaciju.
- Primijenjene metode daju dobru sliku genetičke strukture populacija, na temelju koje se mogu preporučiti potrebne mjere za održavanje genetičkih izvora u istraživanim populacijama.

Zahvala – Acknowledgement

Ovo istraživanje realizirano je uz financijsku potporu Federalnog ministarstva za poljoprivredu, vodu, privredu i šumarstvo, odnosno Federalne uprave za šumarstvo, Bosne i Hercegovine, u okviru projekta “Istraživanje genetičke strukture, genetičkog diverziteta i

genetičke diferenciranosti prirodnih populacija smreke (*Picea abies* Karst.) u dijelu prirodnog rasprostriranja u Bosni i Hercegovini”, pa kolegama iz Ministarstva dugujem veliku zahvalnost, posebno direktoru Omeru Pašaliću, dipl. ing. šum.

LITERATURA – Reference

- Bergmann, F., B. Hosijs, 1996: Effects of heavy-metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water, Air and Soil Pollution*, 89: 363–373.
- Ballian, D., F. Bogunić, M. Konnert, H. Kraigher, M. Pučko, G. Božič, 2007: Genetička diferenciranost subpopulacija obične smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) na planini Igman. *Šumarski list*, 1–2: 13–24.
- Božič, G., 2002: Genetske raziskave naravnih populacij smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji. Doktorska disertacija, Univ. v Ljubljani, BF, Odd. za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, 2002.
- Božič, G., M. Konnert, M. Zupančič, H. Kraigher, 2003: Genetska diferencijacija avtohtonih populacij smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) v Sloveniji, ugotovljena z analizo izoenzimov. [Genetic differentiation of the indigenous Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) populations in Slovenia investigated by means of isoenzyme gene markers]. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 71: 19–40.
- Dautbašić, M. 1997: Pračenje pojave i jačine rasprostranjenosti potkornjaka (Coleoptera: *Scolytidae*) na smrči sa feromonima. Magistarski rad, Sarajevo, str. 57.
- Geburek, T., 1999: Genetic variation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) populations in Austria. III. Macrospatial allozyme patterns of high elevation populations. *Forest Genetics*, 6, 3: 201–211.
- Gillet, E. M., 1998: GSED – Geneti Structure from Electrophoresis Dana, Version 1.1e. Institut fuer Forstgenetik und Forstpflanzenzuechtung Universitaet Gettingen.
- Hosijs, 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', Riga, str. 200–207.
- Huntley, B., H. J. B. Birks, 1983: *An atlas of past and present pollen maps for Europe 0–13000 years ago*, Cambridge University Press, Cambridge, str. 73–90.
- Konnert, M., 1995: Isozymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Weißtanne (*Abies alba* Mill.) – Anleitung zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme, Teisendorf.
- Konnert, M. 2004: Handbücher für Isoenzymanalyse. www.genre.de/fgrdeu/blag/iso-handbuecher.
- Koski, V., T. Skrøppa, L. Paule, H. Wolf, J. Turok, 1997: Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). EUFORGEN, IPGRI, Rome: str. 42.
- Lewandowski, A., J. Butczyk, W. Chalupka, 1997: Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66: 197–200.
- Longauer, R., D. Gömöry, L. Paule, D. F. Karnosky, B. Maňková, 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.
- Matić, V., P. Drinić, V. Stefanović, M. Čirić, i sur. 1971: Stanje šuma u SR Bosni i Hercegovini, prema inventuri na velikim površinama u 1964–1968 godini. *Šum. fak. i inst. za šum. posebna izdanja br. 7*, Sarajevo, Bosna i Hercegovina. str. 639.
- Nei, M. 1972: Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283–292.
- Nei, M. 1978: *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia Press, str. 159–164.
- 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.
- Ravazzi, C., 2002: Late Quaternary history of spruce in southern Europe. *Rev. of Palaeobotany and Palynology* 120: 131–177.
- Sakai, A., W. Larcher, 1987: *Frost Survival of Plants*. Ecological Studies 62. Springer, Berlin, str. 321.
- Schmidt - Vogt, H., 1978. Genetics of *Picea abies* (L.) Karst. Anali za šumarstvo, Razred za prirodne znanosti, JAZU, 7, 5, Zagreb: 147–186.
- Skrøppa, T., 2003: EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Norway spruce (*Picea abies*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. str. 6.
- Tranquillini, W., 1979: *Physiological Ecology of the Alpine Timberline*. Springer, Berlin, str. 137.

SUMMARY: In this study we have carried out the molecular genetic identification of a part of natural populations of spruce in Central Dinaric Alps, in a broader area of Bosnia and Herzegovina, with the approve isoenzyme markers.

By usage of 13 enzyme systems we studied the genetic variability at the level of biochemical markers. In the studied populations we obtained high values of heterozygosis which proves that the studied populations, over the adaptation period in diverse ecological circumstances, have not lost much of their adaptability. Therefore, the populations from this area showed better adaptability than the populations from central European area, since they possess higher genetic variability, with the exception of the population of Vlačić, which by its genetic structure shows it does not belong to the autochthonous genetic resources of spruce from Bosnia and Herzegovina.

We carried out the analysis at 20 polymorphous loci, with 73 allele, and we obtained an average number of analyzed allele per locus, which varied between 1,80 and 2,60. The analysis thus confirmed the existence of major variability within populations, and for gene locus GOT – C the existence of clinal variability.

The genetic multi-loci diversity varied between 27,5 and 37,0, and the gene pool diversity from 1,277 to 1,380, while a mean allele distance varied from 0,18 % to 2,06 %, thus confirming that there exists the relationship between genetic and geographic distances between the studied populations, with the exception of Vlačić.

In order to preserve the natural genetic resources of spruce in Bosnia and Herzegovina it would be necessary to establish a dense network of gene banks in situ and ex situ (seed systems, seed zones and seed plantations), necessary to preserve the genetic diversity within populations. Based on the studies that were carried out, it would mean that each significant ecological niche for spruce should have its gene bank with corresponding number of units, in order to preserve ecological and physiological identity of the populations.

In management of natural spruce forests, and their renovation, an advantage should, however, be given to their natural renewal, with constant monitoring of the genetic structure, which would enable us to undertake timely measures in preservation of optimal natural genetic diversity which is typical for each population.

Key words: Norway spruce (Picea abies /L./ H. Karst.), isoenzyme, populations, variability