

Bilela Silvija¹, Ballian Dalibor^{2✉}

GENETSKA VARIJABILNOST OBIČNE JELE (*ABIES ALBA* MILL.) IZ SREDIŠNJEG DIJELA BOSNE I HERCEGOVINE NA TEMELJU ANALIZE BIOKEMIJSKIH BILJEGA

GENETIC VARIABILITY OF SILVER FIR (*ABIES ALBA* MILL.)
FROM THE CENTRAL PARTS OF BOSNIA AND HERZEGOVINA
BY ANALYSIS OF BIOCHEMICAL MARKERS

SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je genetska varijabilnost u četiri prirodne populacije obične jele (*Abies alba*) iz središnjeg dijela Bosne i Hercegovine (lokaliteta Igmán, Jahorina, Vlašić, Prusačka rijeka).

Varijabilnost je istraživana uporabom devet standardiziranih enzimskih sustava, sa 17 gen lokusa i ukupno 38 različitih alela.

Analizom je dobivena statistički značajna razlika između istraživanih populacija, a dobivena varijabilnost za neke gen lokuse i alele je klinalnog karaktera u smjeru jugoistok – sjeverozapad.

Najveći prosječni broj alela registriran je u populaciji Prusačke rijeke 2,11, dok je najmanji broj alela pronađen u populaciji Jahorine 1,94 koja je u neposrednoj blizini skijaškog centra i pod stalnim je utjecajem čovjeka.

Na temelju vrijednosti heterozigotnosti, koje su relativno velike, što govori da ove populacije posjeduju dovoljno genetičke varijabilnosti i da su kao takve vjerojatno adaptabilnije u odnosu na one iz središnje Europe. Najveću srednju heterozigotnost gen lokusa pokazuje lokus *Lap-B* sa 0,55 u populaciji Jahorine koja je najjužnije, pa je u sebi vjerojatno očuvala veliki dio izvornih balkanskih gena.

Genetska odstupanja su najveća između populacije Prusačke rijeke i ostalih populacija. Tako su genotipska odstupanja između populacija Prusačke rijeke i Jahorine veličine 0,0862. Najmanja vrijednost genetičkog odstupanja iznosi 0,0694 i registrirana je između populacija Jahorine i Igmána. Ovakvi rezultati su logični jer su i zemljopisno, populacije Prusačke rijeke i Jahorine najudaljenije, a Igmána i Jahorine najbliže jedna drugoj.

¹ GD Šume središnje Bosne, d.o.o. Donji Vakuf, Šumarija Kreševo

^{2✉} Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71000 Sarajevo, e-mail: ballian_dalibor@hotmail.com

Dobiveni rezultati pokazuju da naše prirodne populacije posjeduju značajnu genetsku varijabilnost. Međutim, radi održavanja genskog resursa trebalo bi uspostaviti mrežu banaka gena *in situ* i *ex situ*, nužnih za održanje genetičke raznolikosti populacija.

Ključne riječi: varijabilnost, izoenzimi, obična jela, *Abies alba*

UVOD

INTRODUCTION

Obična jela (*Abies alba* Mill.) je s gospodarskog i ekološkog stajališta jedna od najznačajnijih vrsta šumskog drveća u Bosni i Hercegovini. Nalazimo je na 562.237 ha (Uščuplić 1992) ili u oko 50 % svih visokih šuma, pretežito u mješovitim sastojinama.

Rod *Abies* obuhvaća oko četrdeset vrsta koje su prirodno rasprostranjene na sjevernoj hemisferi. Prema Vidakoviću (1982) i Krameru (1984a, 1984b, 1992) u Europi su rasprostranjeni *Abies alba*, *Abies cephalonica* i *Abies pinsapo* i dva spontana hibrida, križanca obične jele i grčke jele, *Abies borisii regis* i *Abies nebrodensis*. Dobra kvaliteta drveta, koje je imalo široku uporabu u gospodarstvu, djelomično je pridonijela nestajanju jele zbog velikih sječa, odnosno smanjenju površine šuma pod jelom u prošlosti. U novije vrijeme zagađivanje atmosfere i pedosfere glavni je razlog propadanja jelovih šuma. O obnovi jelovih šuma nije se dovoljno vodilo računa, jer je manipulacija sjemenom prilično komplicirana i skupa, kao i proizvodnja sadnog materijala. Ipak, u posljednje se vrijeme ulažu veliki naponi za očuvanje genofonda obične jele, kako bi se za buduće generacije sačuvala od potpunog nestajanja.

Zdravstveno stanje šuma obične jele neprestano se pogoršava, posebice u središnjoj Europi gdje je već desetljećima izložena propadanju i postepenom nestanku (Elling 1993; Elling i dr. 1999; Wentzel 1980). Ipak, propadanje je posljednjih godina ponešto usporeno, pa je čak primijećena i regeneracija stabala. Zdravstveno stanje u jelovim šumama Bosne i Hercegovine pogoršava se zbog neodgovarajućega gospodarenja, jer se ne uzimaju u obzir ekološke značajke obične jele. Time se narušava stabilnost jelovih šuma, što uzrokuje širenje imele *Viscum album* var. *abietis* Beck. (Uščuplić 1992), kao primarnog parazita, a zatim slijede mnogo opasniji sekundarni patogeni paraziti. Osim što imela fiziološki slabi običnu jelu i na taj način je čini podložnom za nastanjenje patogenog tipa *Armillaria*, ona smanjuje sposobnost njezine prirodne obnove, a zatim u šumske sastojine jele prodire agresivnija bukva, i s vremenom jela potpuno nestaje. Oštećenja i propadanje jelovih šuma u Bosni i Hercegovini zbog onečišćenja atmosfere, mogla su se prije rata uočiti ponegdje u sjeverozapadnoj Bosni uz velike zagađivače okoliša (termoelektrane, kemijsku industriju, željezare, autoceste, itd.), ali do tada propadanje nije poprimilo veće razmjere.

Polutanti fiziološki slabe drveće i čini ih neotpornima na štetočine (insekte) i patogene (gljive) koji u krajnjoj liniji dovode do sušenja i propadanja stabala. Zbog toga je potrebno proučiti zdrave, neoštećene primjerke jele, razmnožiti ih i osnovati banke i arhive gena s plus stablima, koje bi se osnovale metodama *in situ* i *ex situ*,

posebice na staništima koja za sada, ali ni u budućnosti ne bi bila izložena većim onečišćenjima (Larsen i Fridrich 1988; Ulrich 1989; Larsen i Mekić 1991; Ducci 1991). Potrebno raditi i na selekciji otpornih jedinki koje bi mogle podnijeti zagađenja.

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje genetske varijabilnosti nekih populacija obične jele u Bosni i Hercegovini. Bit će usmjereno na populacije u središnjoj Bosni: Igman, Jahorina, Vlašić i Prusačka rijeka, kako bi se ustanovila njihova povezanost, i utjecaj antropogenog djelovanja u istim. Varijabilnost se istražuje na molekularnoj razini, uz pomoć analize određenih izoenzimskih sustava. Krajnji cilj istraživanja je utvrditi postoji li značajna varijabilnost između populacija, što bi bilo važno za gospodarenje u šumama obične jele i u uzgojnim radovima. Ovo istraživanje je značajno i za radove na oplemenjivanju obične jele u procesu obnove jelovih šuma, te za osnivanje banaka i arhiva gena metodama *in situ* i *ex situ*.

MATERIJAL I METODE

MATERIALS AND METHODS

Materijal je sakupljen sa po 50 stabala na području planina Igman, Jahorina, Vlašić i Prusačke rijeke. Skupljene su grančice s pupovima u studenom 2005. godine i čuvane u ledenici nekoliko dana, do ekstrakcije.



Slika 1. Istraživani lokaliteti: Jahorina, Igman, Vlašić, Prusačka rijeka
Figure 1 Research localities: Jahorina, Igman, Vlašić, Prusačka rijeka

Igman, Jahorina i Vlašić su planine koje se nalaze u blizini urbanog područja. Zato su populacije na ovim planinama izložene stalnom zagađenju iz industrijskih postrojenja, i od plinova iz vozila. Populacija Prusačke rijeke korištena je kao kontrolna jer izolirana od antropogenih utjecaja i zagađenja (Slika 1.).

Prilikom uzorkovanja za izoenzimska istraživanja vodilo se računa da udaljenost između stabala bude najmanje 50 m, kako bi se smanjila mogućnost srodstva (Konnert 1992, 1995).

Istraživalo se 9 enzimskih sustava s ukupno 17 gen lokusa, odnosno 38 alela. Postupci maceracije, pripreme gela, elektroforeze i bojenja gela bili su prilagođeni primijenjenim enzimskim sustavima (Vallejos 1983; Cheliak i Pitel 1984; Wendel i Weeden 1989; Konnert 1992, 1995, 1999; Thormann i Stephan 1993; Hüssendorfer i dr. 1995). U Tablici 1. dani su primjenjivani enzimski sustavi, koji su u ovom istraživanju obične jele poslužili kao genetički biljezi.

Tablica 1. Enzimski sustavi, E.C. referentni broj, broj lokusa i broj alela
 Table 1 Enzyme systems, E.C. code, gene loci, number of alleles

Enzimski sustavi <i>Enzyme systems</i>	E.C. broj <i>E.C. code</i>	Gen lokus <i>Gene loci</i>	Broj alela <i>Number of alleles</i>
Phosphoglucose isomerase	5.3.1.9	<i>Pgi</i> –A, –B	2,1
Phosphoglucumutase	2.7.5.1	<i>Pgm</i> –A, –B	2,2,
Isocitratdehidrogenase	1.1.1.42	<i>Idb</i> –A, –B,	3,2,
Menadionreduktase	1.6.99.2	<i>Mnr</i> –B,	2,
Shikimatdehidrogenase	1.1.1.25	<i>Sdb</i> –A,	2,
Leucinaminopeptidase	3.4.11.1	<i>Lap</i> –A, –B	3,4,
Fluorescent esteraze	3.1.1.1	<i>Fest</i> –A, –B	1,1,
Glutamatoalacetattransminase	2.6.1.1	<i>Got</i> –A, –B, –C	3,1,4,
6-phosphoglucumatedehydrogenase	1.1.1.44	<i>6Pgdh</i> –A, –B	2,3,
Ukupno - <i>Total</i>	9	17	38

Analiza gelova i očitavanje zimograma obavljeno je prema proceduri koju je dala Konnert (2004).

Podaci se potom unesu u računalni program Excel, zatim se slažu u računalnom programu D-basis gdje se automatski kontroliraju, i na kraju obrađuju u statističkom programu SAS (Statistical Analysis System).

Statističkim programom izračunati su sljedeći parametri:

Genetska varijabilnost enzimskih sustava

Enzimska varijabilnost

Genetička raznovrsnost u populacijama

Raznolikost alela

Raznolikost genotipova

Heterozigotna raznolikost

Fiksacijski indeks (Wrightov koeficijent inbridinga)

Raznolikost

multilokusna raznolikost (v_{gen})

gene pool raznolikost (v_p).

Genotipska odstupanja između populacija

REZULTATI I RASPRAVA

RESULTS AND DISCUSSION

Genetska varijabilnost enzimskih sustava

Enzimska varijabilnost

Iz relativnih frekvencija alela analiziranih lokusa (Tablica 2.) vidljivo je da je od 17 analiziranih gen lokusa njih 13 polimorfno, dok su četiri monomorfna. Monomorfni su gen lokusi Fest-A, Fest-B, Got-B i Pgi-B, pa nisu prokomentirani u ovom radu.

Tablica 2. Učestalost pojavljivanja alela
 Table 2 Allele frequencies

Gen lokus <i>Gene loci</i>	Alel <i>Allele</i>	Populacije - <i>Populations</i>				Srednje vrijednosti <i>Mean</i>
		Prusačka rijeka	Igman	Jahorina	Vlašić	
<i>Fest - A</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Fest - B</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Pgi - A</i>	1	0,05	0,01	0,03	0,01	0,03
	2	0,95	0,99	0,97	0,99	0,97
<i>Pgi - B</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Pgm - A</i>	2	0,98	0,97	0,99	1	0,98
	3	0,02	0,03	0,01	0	0,02
<i>Pgm - B</i>	1	0,07	0,17	0,14	0,14	0,13
	2	0,93	0,83	0,86	0,86	0,87
<i>Idb - A</i>	1	0,16	0,33	0,33	0,25	0,27
	3	0,65	0,52	0,49	0,66	0,58
	4	0,19	0,15	0,18	0,09	0,15
<i>Idb - B</i>	3	0,68	0,71	0,74	0,59	0,68
	4	0,32	0,29	0,26	0,41	0,32
<i>Mnr - B</i>	2	0,03	0,01	0	0,04	0,02
	3	0,97	0,99	1	0,96	0,98
<i>Sdb - A</i>	1	0,99	0,99	1	1	0,99
	2	0,01	0,01	0	0	0,01
<i>Lap - A</i>	2	0,05	0,05	0,1	0,04	0,06
	3	0,94	0,95	0,9	0,96	0,93
	5	0,01	0	0	0	0,01
<i>Lap - B</i>	1	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
	2	0,27	0,21	0,25	0,17	0,22
	3	0,34	0,53	0,37	0,33	0,39
	4	0,36	0,23	0,36	0,48	0,36
<i>Got - A</i>	1	0,05	0,07	0,03	0,02	0,04
	2	0,95	0,91	0,97	0,95	0,95
	3	0	0,02	0	0,03	0,01
<i>Got B</i>	2	1	1	1	1	1
	1	0,15	0,09	0,08	0,13	0,11
<i>Got - C</i>	2	0,81	0,88	0,91	0,77	0,84
	3	0,04	0,03	0,01	0,04	0,03
	4	0	0	0	0,06	0,02
	2	0,38	0,47	0,4	0,37	0,41
<i>6Pgdh - A</i>	3	0,62	0,53	0,6	0,63	0,59
	1	0,03	0	0,01	0	0,01
<i>6Pgdh - B</i>	2	0,95	0,96	0,84	0,99	0,94
	3	0,02	0,04	0,15	0,01	0,05

Gen lokus *Pgi-A* karakteriziraju dva alela, koji se diferenciraju u zoni brze segregacije na zimogramu. U ovom istraživanju nije dobivena visoka polimorfnost. Alel A1 ima prosječnu udaljenost za istraživane populacije 0,03, a najveću vrijednost u populaciji Prusačke rijeke (Tablica 2.). Alel A2 ima jednake i maksimalne vrijednosti 0,99 u populacijama Igmana i Vlašića, dok je prosječna udaljenost za ovaj alel 0,97. U istraživanjima Konnert i Bergmanna (1995) nađen je samo u južnim područjima rasprostiranja jele, kao što su južni Karpati i Dinaridi, što je, čini se, karakteristično samo za područja kao što je i Bosna i Hercegovina.

Gen lokus *Pgm-A* može se pojaviti u dvije varijante, odnosno u dva alela. On predstavlja brzu zonu segregacije na gelu kada se za ekstrakciju koriste pupovi, a na zimogramu imamo dvije vrpce, što znači da je ovaj gen lokus kontroliran od dva alela. U ovom istraživanju kod gen lokus *Pgm-A* nije registrirana varijabilnosti u populaciji Vlašić, gdje je registriran samo alel A2. U ostale tri populacije pronađeni su aleli A2 i A3, što ukazuje na varijabilnost. Prosječna udaljenost za alel A2 je 0,98, a za alel A3 je 0,02 (Tablica 2.). Ballian (2003) je u svojim istraživanjima populacija obične jele u Bosni i Hercegovini za gen lokus *Pgm-A* registrirao alel A2, a alel A1 je registriran samo u populaciji Mekih brda gdje je ujedno i pronađena varijabilnost s obzirom na ovaj gen lokus.

Gen lokus *Pgm-B* pokazuje monomernu strukturu, a na zimogramu označava zonu spore segregacije na gelu, koja se ponaša kao i ona lokusa *Pgm-A*. *Pgm-B* gen lokus u ovom istraživanju pokazuje veliki polimorfizam u svim istraživanim populacijama (Tablica 2.) Istraživanje pokazuje da se frekvencija alela B1 smanjuje od istoka prema zapadu, dok se vrijednosti alela B2 povećava od istoka prema zapadu, te predstavlja tipičnu klinalnu varijabilnost.

Gen lokus *Idh-A* pokazuje visoki polimorfizam u svim istraživanim populacijama. Prosječna udaljenost alela A3 je 0,58, a promjena njegove frekvencije je klinalna i smanjuje se idući od sjeverozapada k jugoistoku. S druge strane, alel A1 pokazuje obrnuto: opadanje vrijednosti frekvencije, sa srednjom vrijednosti 0,27. Alel A4 ima u svim populacijama, osim Prusačke rijeke, niže vrijednosti u odnosu na druga dva, što se očituje i u njegovoj srednjoj vrijednosti frekvencije 0,15 (Tablica 2).

Za gen lokus *Idh-B* svojstveno je da predstavlja sporu migracijsku zonu na gelu, koja se intenzivnije boji nego brza zona, i posjeduje pet varijanti jednostrukih vrpce. U ovom radu su iskorištene samo dvije varijante. Dobivena je velika varijabilnost u svim populacijama (Tablica 2.). Prosječna udaljenost za alel B3 je 0,68. Varijabilnost ovog alela se smanjuje od jugoistoka (Jahorina) gdje iznosi 0,74 prema sjeverozapadu i sjeveru (Vlašić) gdje iznosi 0,59. Za alel B4 dobivena je prosječna udaljenost od 0,32 i njegove vrijednosti opadaju u suprotnom smjeru.

Enzimski sustav *Mnr* je tetramerik (Hüssendorfer i dr. 1995), sa dva gen lokusa, s tim što lokus A ima jedan, a lokus B tri alela. U ovom su istraživanju promatrani aleli B2 i B3. Gen lokus *Mnr-B* pokazuje određenu zastupljenost oba alela, pa možemo reći da je polimorfan u svim populacijama, osim populacije Jahorine gdje izostaje alel B2, te je monomorfan. Vrijednosti alela B3 također opadaju od 1 do 0,96 idući od jugoistoka prema sjeverozapadu i sjeveru, što je uočeno i u ranijim

istraživanjima koja je proveo Ballian (2003). Prosječna udaljenost B3 iznosi 0,98, a B2 0,02. (Tablica 2.).

Gen lokus *Sdh-A* na zimogramu pokazuje samo jednu vrpcu. U većini populacija obične jele taj gen lokus ne pokazuje varijabilnost. U ovom istraživanju je uočen minorni polimorfizam sa rijetkim alelima u populacijama Prusačka rijeka i Igman. Alel A1 ima prosječnu udaljenost 0,99, a A2 0,01 (Tablica 2.). Ovo pokazuje da tu možemo tražiti granicu monomorfности za gen lokus *Sdh*, jer u srednjoj Europi pokazuje polimorfizam.

Lokus *Lap-A* pokazuje veliku polimorfnost. Vrijednosti alela A3 opadaju od juga prema sjeveru, što je uočeno i u istraživanjima koja je proveo Ballian (2003) u Bosni i Hercegovini. Alel A2 pokazuje iste osobine, a prosječna udaljenost mu je 0,06. Alel A4 je registriran samo u populaciji Prusačke rijeke. (Tablica 2.).

Gen lokus *Lap-B* karakterizira visoka polimorfnost i četiri alela. Vrijednost alela B1 iznosi 0,02 u populaciji Vlašić do 0,03 u populaciji Igmana, a prosječna udaljenost za sve populacije iznosi 0,03 (Tablica 2.). Od analiziranih alela, B1 pokazuje minimalne veličine za razliku od alela B2, B3 i B5.

Kôd gen lokusa *Got-A* na zimogramu je prikazan s tri jednostruke vrpce. Srednja veličina za alel A1 iznosi 0,04, za alel A2 iznosi 0,95, a za alel A3 iznosi 0,01. Za populacije Igman i Vlašić registriran je rijedak alel A3, koji izostaje u druge dvije populacije. Vrijednosti alela A2 opadaju idući od jugoistoka prema sjeverozapadu (Tablica 2.).

Zimogram na gelu kod lokusa *Got-C* prikazuje tri dvostruke strukture vrpce, koje predstavljaju alele na gen lokusu, sa izrazitim polimorfizmom. U ovom istraživanju vrijednost za alel C1 iznosi 0,11 i opada od zapada prema istoku. Za alel C2 iznosi 0,84 i opada od jugoistoka prema sjeverozapadu i sjeveru, a za alel C3 iznosi 0,03. Alel C4 je registriran samo u populaciji Vlašića u vrijednosti 0,06 (Tablica 2.), te predstavlja rijedak alel sa većom učestalošću, odnosno zatvoren je u ovoj populaciji.

Učestalost alela A2, kod gen lokus *6Pgdh -A*, smanjuje se od juga prema sjeveru od 0,37 do 0,47 sa srednjom vrijednost 0,41. Za alel A3 uočeno je suprotno kretanje veličine frekvencije alela, od sjevera ka jugu (Tablica 2.). U svom istraživanju Ballian (2003) za populacije Bosne i Hercegovine i Hrvatske, registrira tri alela, međutim u populacijama u ovom istraživanju alel A1 nije registriran.

Gen lokus *6Pgdh-B* na zimogramu predočava tri jednostruke vrpce u sporij zoni migracije izoenzimskog sustava. Alel B2 ima prosječnu udaljenost 0,94 i smanjuje se od sjeverozapada ka jugoistoku. Alel B3 predstavlja klinu, vrijednosti se smanjuju u suprotnom smjeru i prosječna udaljenost mu iznosi 0,05. Alel B1 je registriran samo u populacijama Prusačke rijeke i Jahorine (Tablica 2.), te predstavlja grupu rijetkih alela.

Genetička raznovrsnost u populacijama

Kada se govori o genetičkoj raznovrsnosti, obično se misli na varijabilnost nekih svojstava u populaciji, odnosno u populacijama, koje su izražene u određenim frekvencijama različitih svojstava unutar ili između populacija (Gregorius 1987).

Raznolikost alela

Radi ocjene alelne raznolikosti najprije se u svim populacijama izračunava srednji broj alela po lokusu (A/L), te se utvrđuju razlike među populacijama. Prema Gregoriusu (1980,1983), na to svojstvo utječe i broj individua koje su uzete slučajnim izborom. Stoga za postizanje veće točnosti treba povećavati radni uzorak.

U ovom istraživanju dobivena je vrijednost od 1,94 do 2,12. Najveću vrijednost ima populacija Prusačke rijeke, a najmanji broj alela po lokusu nalazimo u populaciji Jahorine. (Tablica 3.).

Možemo zaključiti da je veća varijabilnost alela kod zapadnih populacija, i smanjuje se idući prema istoku. Razlog leži možda u tome što je uzorak sa Jahorine uzet iz neposredne okoline skijališta, te je u toj zoni populacija pod jakim antropogenim utjecajem.

Raznolikost genotipova

Srednji broj genotipova po lokusu (G/L) uz srednji broj alela po lokusu služi za prikazivanje raznolikosti unutar populacija, kao i između populacija. U usporedbi s alelnom raznolikošću, mora se obratiti pažnja na veći broj i količinu mogućih genotipova (Gm), a time i broj mogućih klasa, nego kod alela. To ima smisla ako se radi o rijetkim genotipovima (alelima). Obzirom na to da je broj realiziranih genotipova u jednoj populaciji stvarno veći od broja alela, to pri ocjeni genotipske raznolikosti u odnosu prema alelnoj raznolikosti ima i više pogrešaka (Gregorius 1980,1983; Hattemer i dr. 1982).

U ovom istraživanju vrijednosti su iznosile od 2,41 kod populacije Vlašića do 2,76 u populaciji Prusačke rijeke (Tablica 3.).

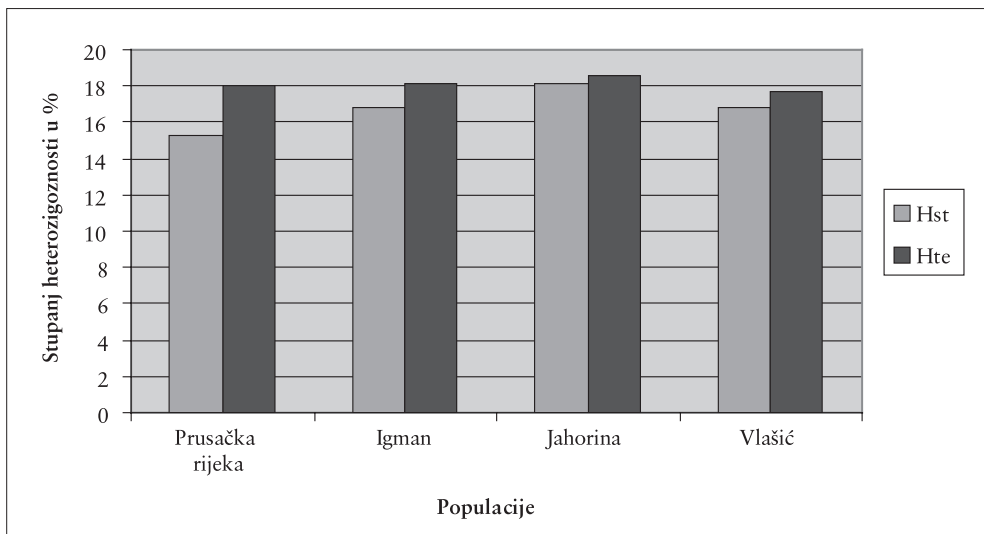
Tablica 3. Mjere genetičke varijabilnosti i heterozigotnosti
Table 3 Measures of genetic variability and heterozygosity

Populacija	Prosječan broj alela u lokusu A/L	Prosječan broj genotipova u populaciji G/L	Stvarna heterozigotnost H_{st}	Teoretska heterozigotnost H_{te}
Prusačka rijeka	2,12	2,76	0,1529	0,1806
Igman	2,06	2,76	0,1676	0,1816
Jahorina	1,94	2,56	0,1818	0,1854
Vlašić	2	2,47	0,1861	0,1764

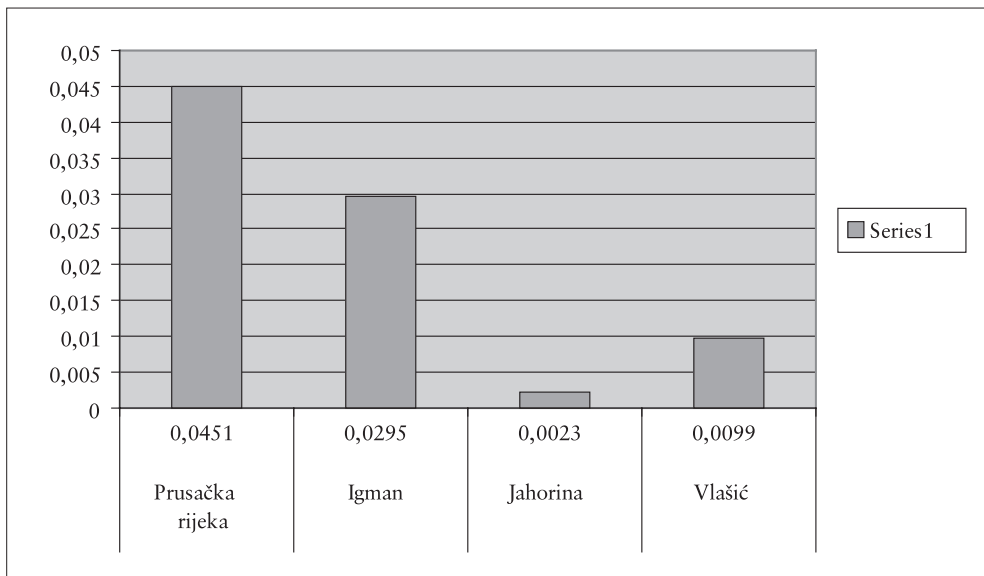
Heterozigotna raznolikost

Najveću srednju heterozigotnost gen lokusa pokazuje lokus *Lap-B*, koja iznosi 0,5 a najveća je heterozigotnost tog lokusa u populacije Jahorine i iznosi 0,55. Slijedi gen lokus *6Pgdh-A* sa srednjom veličinom 0,49, a najveća heterozigotnost tog lokusa je kod populacije Vlašić i iznosi 0,58. Najmanju heterozigotnost pokazuje gen lokus *Sdh-A*, sa srednjom veličinom 0,01 gdje populacije Vlašića i Jahorine ne pokazuju nikakvu heterozigotnost.

Očekivana heterozigotnost pokazuje nam veličinu kada je populacija, prema Hardy Weinbergovu zakonu, u stanju ravnoteže (ekvilibrija). Očekivane heterozigotnosti ponašaju se sukladno stvarnima. Moguće razlike pokazuju odstupanje stvarnog stanja od stanja ravnoteže što se vidi iz Tablice 3. i Slike 2.



Slika 2. Stvarna(Hst) i teoretska (Hte) heterozigotnost
 Figure 2 The observed (Hst) and theoretical (Hte) heterozygosity



Slika 3. Srednji fiksacijski indeks za populacije, za polimorfne lokuse.
 Figure 3 The mean fixation index for the polymorphic loci

Najveću očekivanu heterozigotnost pokazuje populacija Jahorine, s 0,18, što je vrijednost veća od stvarne heterozigotnosti. Najveća je razlika između stvarne i teoretske heterozigotnosti kod populacije Prusačke rijeke, za koju je ustanovljeno i jače odstupanje od Hardy Weinbergove ravnoteže, a karakteristika je te zapadne populacije vrlo mala heterozigotnost.

Fiksacijski indeks (Wrightov koeficijent inbridinga)

Fiksacijski indeks upućuje na križanje u rodstvu, i to tako da negativne i nulte vrijednosti pokazuju heterozigotnost gen lokusa. Promatramo li fiksacijski indeks kao kvocijent razlike između očekivane i stvarne heterozigotnosti i očekivane heterozigotnosti, primijetiti ćemo da sve četiri populacije imaju pozitivan srednji fiksacijski indeks, što upućuje na veliko opterećenje inbridinga (Tablica 3. i Slika 3.).

Gen lokusi *Lap-A* i *Pgi-A* imaju u svim istraživanim populacijama negativan fiksacijski indeks, a slijede *Got-A*, *Mnr-B* i *6Pgdh-B* s trima populacijama, pa se može primijetiti da su ti gen lokusi glavni nositelji heterozigotnosti u istraživanim populacijama. Kako se za ovo svojstvo analizira prosječna udaljenost, ako je uzorak malen, lako se može doći do pogrešnih rezultata.

Raznolikost

Raznolikost je kompleksno svojstvo, obzirom na to da ga grade alelna i genotipska vrijednost, odnosno najbolji je pokazatelj multilokusna raznolikost (v_{gen}) i gene pool raznolikost (v_p). Tako multilokusna raznolikost (v_{gen}) pokazuje da populacija Jahorine s veličinom 75,92 daje veću raznolikost od populacije Vlašića s veličinom 57,23. To potvrđuje veliki polimorfizam, odnosno veliku raznolikost u populaciji Jahorine. Populacije Igmana i Prusačke rijeke zauzimaju intermedijalne položaje (Tablica 4.).

Tablica 4. Mjere genetičke raznolikosti (v_{gen}) i gen pool raznolikosti (v_p).
Table 4 Measures of genetic diversity (v_{gen}) and gene pool diversity (v_p)

Populacije	Raznolikosti	
	v_p	v_{gen}
Prusačka rijeka	1,22	62,97
Igman	1,22	64,55
Jahorina	1,23	75,92
Vlašić	1,21	57,23

Vrijednosti gene pool raznolikosti dobivene su kao harmonijska sredina, a ponašaju se jednako kao i multilokusna raznolikost. Vrijednosti iznose od 1,21 u populaciji Vlašića do 1,23 u populacije Jahorine.

Genotipska odstupanja među populacijama

Genotipska odstupanja između populacija (d_o) izračunata su za svaki gen lokus i populacije.

Za gen lokus *Pgi-A* najveće odstupanje registrirano je između populacije Igmana i populacije Prusačke rijeke s veličinom od 0,08. Između populacija Igmana i Vlačića uopće nema odstupanja. Gen lokus *Pgm-A* pokazuje najveće odstupanje upravo između populacija Igmana i Vlačića 0,06 dok se između ostalih populacija odstupanje kreće od 0,02 do 0,04. Najveće odstupanje gen lokusa *Pgm-B* je između populacija Prusačke rijeke i Igmana i iznosi 0,18 a između populacija Jahorine i Vlačića odstupanje nije registrirano. Za gen lokus *Idh-A* najveće je odstupanje između populacija Prusačke rijeke i Jahorine s veličinom 0,3345. Za gen lokus *Idh-B* najveće je odstupanje između Jahorine i Vlačića 0,18. Populacija Vlačića za ovaj gen lokus ima veća odstupanja od svih populacija. Najveće odstupanje gen lokusa *6Pgdh-A* je između populacija Jahorine i Igmana i iznosi 0,18, dok je najmanje između Jahorine i Vlačića 0,04. S druge strane, između ovih dviju populacija najveće je odstupanje za gen lokus *6Pgdh-B* i iznosi 0,2596. Gen lokus *Mnr-B* ima najveće odstupanje između Jahorine i Vlačića i iznosi 0,08. Gen lokus *Lap-A* ima najveće genetičko odstupanje 0,04 između populacija Vlačića i Prusačke rijeke, a *Lap-B* između Prusačke rijeke i Igmana 0,3155.

Tablica 5. Srednja genotipska odstupanja između populacija obične jele u Bosni i Hercegovini
Table 5 Mean genotype distances between silver fir populations in Bosnia and Herzegovina

Populacije	Prusačka rijeka	Igman	Jahorina	Vlačić
Prusačka rijeka	-			
Igman	0,0820	-		
Jahorina	0,0868	0,0694	-	
Vlačić	0,0765	0,0848	0,0807	-

Kod gen lokusa *Got-A* najveće odstupanje pokazuju populacije Igmana i Jahorine, s veličinom 0,1. U usporedbi s ostalim populacijama najveća odstupanja za gen lokus *Got-C* pokazuje populacija Vlačića, a najveće odstupanje ima s populacijom Jahorine 0,2571. Genetičko odstupanje između populacija za gen lokus *Sdh* ima jednaku veličinu (0,02) između populacija Jahorine, Prusačke rijeke i Igmana. Između populacija Prusačke rijeke i Igmana, Jahorine i Vlačića nije registrirano odstupanje. Dobivena genetička odstupanja između populacija (Tablica 4.) najveća su između populacije Prusačke rijeke s jedne, i ostalih populacija s druge strane. Najveća su genotipska odstupanja između populacija Prusačke rijeke i Jahorine veličine 0,0862. Najmanja vrijednost genetičkog odstupanja iznosi 0,0694 a registrirana je između populacija Jahorine i Igmana. Najveća su genotipska odstupanja između populacija za gen lokus *Idh-A* veličine 0,3345, i to između populacija Prusačke rijeke i Jahorine.

Dobivene veličine ukazuju da je između istraživanih populacija prisutan jak proces diferenciranja o čemu za zapadnu Europu izvještava Bergmann i dr. (1990). Ako kažemo da su sve navedene lokacije zemljopisno prilično bliske, to još više pojačava njihovu raznolikost. Ovo nas upućuje da sa svakom od ovih populacija treba raditi sa posebnom pažnjom da ne bi izgubile svoju genetičku strukturu. Kroz aktivnosti na konzervaciji *in situ* i *ex situ*, za svaku od njih treba odvojeno planirati sprovedi aktivnost, kako bi se u svakoj od njih očuvao autohtoni izvor gena.

ZAKLJUČCI CONCLUSIONS

Analizom 17 izoenzimskih gen lokusa vidljive se razlike između istraživanih populacija, a utvrđena varijabilnost za neke gen lokuse i alele je klinalnog karaktera tj. alelna učestalost u nekim gen lokusima opada ili raste u pravcu jugoistok – sjeverozapad.

Najveći prosječni broj alela registriran je u populaciji Prusačke rijeke 2,11 zato što je ova populacija najzaštićenija od antropogenog utjecaja, dok s druge strane najmanji broj alela je pronađen u populaciji Jahorine 1,94 koja je u neposrednoj blizini skijaškog centra i pod stalnim je utjecajem čovjeka.

Visok stupanj polimorfnosti pronađen je za gen lokuse *Lap-B*, *Idh-A*, *Idh-B* i *6Pgdh-A*. Najveću prosječnu udaljenost ima *Idh-B3* 0,68. Gen lokusi *Fest-A*, *Fest-B*, *Got-B* i *Pgi-B* su monomorfni, dok su ostali gen lokusi intermedijalni. *Sdh-A* pokazuje minorni polimorfizam, jer je alel A2 registriran samo u populacijama Prusačke rijeke i Igmana i to u vrijednosti od 0,01. Kod drugih dviju populacija je monomorfan.

Na osnovu vrijednosti heterozigotnosti koje su relativno velike, može se zaključiti da ove populacije vjerojatno posjeduju veću otpornost u odnosu na one iz srednje Europe. Najveću srednju heterozigotnost gen lokusa pokazuje lokus *Lap-B* 0,55 u populaciji Jahorine koja je najjužnije, te se pretpostavlja da je očuvala veliki dio izvornih balkanskih gena i iznosi 0,55.

Pozitivan fiksacijski indeks ukazuje na opterećenje populacija inbridingom, što znači da su jedinke koje čine pojedine populacije u velikom stupnju srodne. Međutim, pozitivne vrijednosti fiksacijskog indeksa u ovom istraživanju su male, blizu nuli, što nam govori da su populacije ipak genetički uravnotežene. Gen lokusi *Lap-A* i *Pgi-A* imaju u svim istraživanim populacijama negativan fiksacijski indeks. Slijede *Got-A*, *Mnr-B* i *6Pgdh-B* sa tri populacije, pa se može primijetiti da su ti gen lokusi glavni nositelji heterozigotnosti.

Genotipska odstupanja su najveća između populacija za gen lokus *Idh-A* veličine 0,3345, a dobiveno je između populacija Prusačke rijeke i Jahorine, te nam ovaj gen lokus može poslužiti diferenciranju populacija prema zemljopisnoj udaljenosti.

Genetička odstupanja između populacija najveća su između populacije Prusačke rijeke s jedne i svih ostalih populacija s druge strane. Tako genotipska odstupanja između populacija Prusačke rijeke i Jahorine imaju veličinu 0,0862. a najmanja vrijednost genetičkog odstupanja iznosi 0,0694 i registrirana je između populacija Jahorine i Igmana. Ovakvi rezultati su i logični, jer su i zemljopisno populacije Prusačke rijeke i Jahorine najudaljenije, a Igmana i Jahorine najbliže.

Dobiveni rezultati pokazuju da naše prirodne populacije nisu izgubile mnogo od svoje genetičke varijabilnosti i adaptacijskog potencijala, što jamči da će se moći uspješno oduprijeti svim nepovoljnim utjecajima. Stoga, radi održavanja genskog resursa trebalo bi uspostaviti gušću mrežu banaka gena *in situ* i *ex situ*, nužnih za održanje genetičke raznolikosti populacija.

LITERATURA

REFERENCES

- Ballian, D. 2003. Procjena genetičke varijabilnosti obične jele (*Abies alba* Mill.) analizom izoenzima u dijelu prirodnih populacija Bosne i Hercegovine i Hrvatske. Šum. list 3-4: 135-151.
- Bergmann, F., Gregorius, H.R., Larsen, J.B. 1990. Levels of genetic variation in European silver fir (*Abies alba* Mill.) are they related to the species decline. *Genetica*, 82 (1): 1-10.
- Cheliak, W.M., Pitel, J.A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canada: 1-49.
- Ducci, F. 1991. Morphological variation in silver fir (*Abies alba* Mill.) seedlings from provenances in central and southern Italy. *Annali del 'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura* 22: 53-73.
- Elling, W. 1993. Immissionen im Ursachenkomplex von Tannenschädigung und Tannensterben. *Allgemeine Forst-Zeitschrift* 48: 87-95.
- Elling, W., Bretschneider, M., Schwarzfischer, C. 1999. Zuwachsdpression an Tannen durch Schwefel-Emissionen. *Allgemeine Forst-Zeitschrift* 54: 896-898.
- Gregorius, H.R. 1980. The probability of losing an allele when diploid genotypes are sampled, *Evolution Theory* 6: 143-162.
- Gregorius, H.R. 1983. Klonanzahl in Samenplantagen und genetische Vielfalt. Arbeitstagung Forum Genetik Wald Forstwirtschaft, Göttingen.
- Gregorius, H.R. 1987. The relationship between the concept of genetic diversity and differentiation, *Theor. Appl. Genet.* 74: 397-401.
- Hattemer, H.H., Gregorius, H.R., Ziehe, M., Müller-Starck, G. 1982. Klonanzahl forstlicher Samenplantagen und genetische Vielfalt, *Allgemeine Forst und Jagdzeitung* 153 : 183-191.
- Hussendörfer, E., Konnert, M., Bergmann, F. 1995. Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.), *Forest Genetics* 2 (1): 29-40.
- Konnert, M. 1992. Genetic studies in damaged silver fir (*Abies alba*) stands in southwest Germany. Freiburg, Germany Mitteilungen der forstlichen Versuch und forschungsanstalt Baden Wurttemberg 167: 119.
- Konnert, M. 1995. Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Weißtanne (*Abies alba* Mill.) – Anleitung zur Treunmethodik und Auswertung der Zymogramme, Teisendorf.
- Konnert, M. 1999. Herkunftsüberprüfung mit biochemisch-genetischen Methoden. *Der Weih-nachtsbaum* 5: 4-9.
- Konnert, M. 2004. Handbücher für Isoenzymanalyse. www.genre.de/fgrdeu/blag/iso-handbuecher.
- Konnert, M., Bergmann, F. 1995. The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, *Pinaceae*) in relation to a migration history. *Pl. Syst. Evol.* 196 (1-2): 19-30.
- Kramer, W. 1984a. Die Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Kalabrien Beobachtungen und Eindrücke *Forstarchiv* 55 (3): 96 – 99.
- Kramer, W. 1984.b. Die Weißtanne (*Abies alba* Mill.) in Kalabrien Beobachtungen und Eindrücke *Forstarchiv*, 55 (3): 150 – 155.
- Kramer, W. 1992. Die Weißtanne in Ost und Südeuropa, 6 IUFRO Tannensymposium, Zagreb, 101 – 108.
- Larsen, J.B., Fridrich, J. 1988. Growth reactions of different provenances of silver fir (*Abies alba* Mill.) after SO₂ fumigation during the winter, *European yurnal of forst patology*, 18: 3 - 4, 190 – 199. Göttingen.
- Larsen, J.B., Mekić, F. 1991. The geographic variation in European silver fir (*Abies alba* Mill.) gas exchange and needle cast in relation to needle age, growth rate dry matter partitioning and wood density by 15 different – provenances at age 6, *Silvae – Genet.*, 40:5 – 6: 118 – 198.

- Thormann, R., Stephan, B.R. 1993. Interpretation of isozyme patterns of malate dehydrogenase in Scots pine using two different standing methods, *Silvae Genet.* 42: 5-8.
- Uščuplić, M. 1992. Uticaj sistema gazdovanja na pojavu imele (*Viscum album* L.), *Glas. šum. Fak. u Beogradu.* 7-18.
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme Activity Staining. U: S.D. Tanksley, T.J. Orton, (ur.): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding (part A).* Elsevier, Amsterdam. 516.
- Vidaković, M. 1982. Četinjače - morfologija i varijabilnost, JAZU i Sveuč. nakl. Liber, Zagreb.
- Wendel, J.F. Weeden, N.F. 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isoenzymes. (ed.) Soltis, D.E., Soltis, P.S.: *Isozymes in Plant Biology*, London, 5- 45.
- Wentzel, K.F. 1980. Weißstanne = immissionsempfindlichste heimische Baumart. *Allgemeine Forst-Zeitschrift* 35:373-374.

**GENETIC VARIABILITY OF SILVER FIR (*ABIES ALBA* MILL.)
FROM THE CENTRAL PARTS OF BOSNIA AND HERZEGOVINA
BY ANALYSIS OF BIOCHEMICAL MARKERS**

Summary

*The genetic variability in four natural populations of Silver fir (*Abies alba* Mill.), from the central part of Bosnia and Herzegovina (localities Igman, Jahorina, Vlačić, Prusačka rijeka) was analysed in this research.*

For the molecular analysis we used nine standardized enzyme systems with 17 gene loci and 38 different alleles.

The molecular analysis shows differences between the populations, and the variability of several gene loci and alleles is clinal in direction southeast to northwest.

The largest mean number of alleles was registered in the Prusačka rijeka population - 2.11, whereas the smallest number (1.94) were found in the Jahorina population. This population is located near the local ski-center and is under direct human influence.

A relatively high value of heterozygosity, therefore high genetic variability, suggests that these populations are more adaptive than those in central Europe. The gene locus Lap – B with 0,55 in the most southern Jahorina population showed the highest average heterozygosity, therefore probably preserving a major part of the original Balkan genes.

Genetic distances between the populations were the largest between the population of Prusačka rijeka, on one side, and all other populations on the other. The largest genotype distance was determined between Prusačka rijeka and Jahorina populations (0,0862). The smallest genetic distance is 0,0694, between populations of Jahorina and Igman. These results are logical because Prusačka rijeka and Jahorina are geographically most distant from each other, and Igman and Jahorina are the closest.

These results show that our populations did not lose much of their genetic variability and adaptation potential. Therefore, in order to preserve the genetic resources it would be necessary to establish a network of gene banks in situ and ex situ, required for the maintenance of genetic differences of our populations.

Key words: *variability, iso-enzyme, Silver fir (*Abies alba* Mill.)*