

BIOLOŠKI ODSJEK
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

GLACIJALNI REFUGIJI BILJAKA U EUROPI

PLANT GLACIAL REFUGIA IN EUROPE

SEMINARSKI RAD

Ljudevit Luka Boštjančić

preddiplomski studij Molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Antun Alegro

Zagreb, 2018.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Tema	5
2.1. Refugiji	5
2.1.1. Glacijalni refugiji u Europi	5
2.1.2. Procesi i putevi rekolonizacije biljnih vrsta iz glacijalnih refugija	7
2.1.3. Metoda istraživanja biljnih glacijalnih refugija u Europi.....	10
2.2. Primjeri glacijalnog refugija biljaka u Europi.....	12
2.2.1. Obična bukva (<i>Fagus sylvatica</i>).....	12
2.2.1.1. Biologija obične bukve	12
2.2.1.2. Filogeografija bukve	13
2.2.2. Divlja jabuka (<i>Malus sylvestris</i>)	15
2.2.2.1. Biologija divlje jabuke	15
2.2.2.2. Filogeografija divlje jabuke	16
3. Zaključak.....	18
4. Literatura.....	19
Sažetak	20
Abstract.....	21

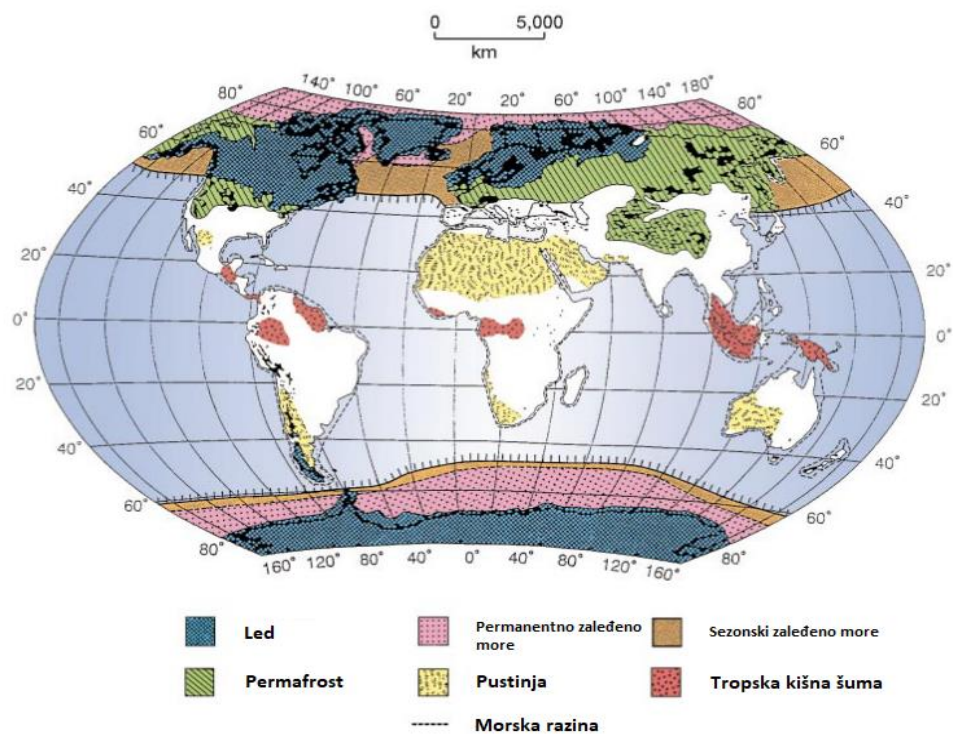
1. Uvod

Tijekom geološke prošlosti događale su se mnoge oscilacije u klimi na Zemlji. Takve promjene utjecale su na sav živi svijet na našem planetu. Budući da se slične promjene događaju i danas bitno je razumjeti kako su vrste odgovarale na klimatske promjene u prošlosti i u kojim područjima su preživljavale nepovoljne uvjete. Tako se može doprinijeti razvoju modela koji će predvidjeti utjecaj klimatskih promjena na živi svijet danas (Stewart i sur., 2010). U razdoblju kvartara, klimatske i okolišne promjene utjecale su na geografske raspone vrsta na sjevernoj Hemisferi. Oni su se mijenjali ciklički sukladno s klimatskim promjenama (Birks and Willis, 2008; Stewart i sur., 2010). Period kvartara podijeljen je na dvije epohe pleistocen i holocen. Prijelaz iz pleistocena u holocen obilježio je period posljednjeg glacijala i značajne promjene u klimi na Zemlji. U posljednjih milijun godina Zemljine prošlosti, prema dosadašnjim saznanjima, dogodilo se oko 10 velikih ledenih doba s toplim interglacijalima između njih (Hewitt, 2011).

Početak posljednjeg razdoblja glacijacije bio je prije 114 tisuća godina, a trajalo je sve do prije 11,6 tisuća godina. Razdoblje posljednjeg glacijala podijeljeno je na rani glacijal (prije 114-74 tisuće godina) i pleniglacial (prije 74-14,6 tisuća godina). Pleniglacial se sastoji od tri razdoblja: ranog (prije 74-59 tisuće godina), srednjeg (prije 59-24 tisuće godina) i kasnog (prije 24-14,6 tisuće godina). Kasni pleniglacial (engl. *Late pleniglacial*, LPG) predstavlja razdoblje ekstremnih uvjeta glacijacije bez velikih oscilacija u klimi, a podijeljen je na kasni glacijalni interstadijal (eng. *Lateglacial interstadial*, LGI) i razdoblje mlađeg drijasa (eng. *Younger Drias*, YD) (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). Razdoblje mlađeg drijasa posljednje je razdoblje pleistocena, a označava razdoblje zahlađenja koje je uslijedilo nakon zatopljenja u kasnom glacijalnom interstadijalu (LGI). Razdoblje mlađeg drijasa završava prije 11,6 tisuća godina, kad nastupa razdoblje holocena. Razdoblja poput mlađeg drijasa mogu se nazivati i milenijskim oscilacijama u temperaturi, koje također utječu na geografski raspon vrsta i njihovu ekspanziju i nakon završetka velikih ledenih doba (u ovom slučaju posljednjeg glacijalnog maksimuma) (Hewitt, 2011).

Pojam posljednji glacijalni maksimum (engl. *last glacial maximum*, LGM) odnosi se na razdoblje koje je počelo prije 25, a trajalo do prije 18 tisuća godina. To je ujedno najhladniji period

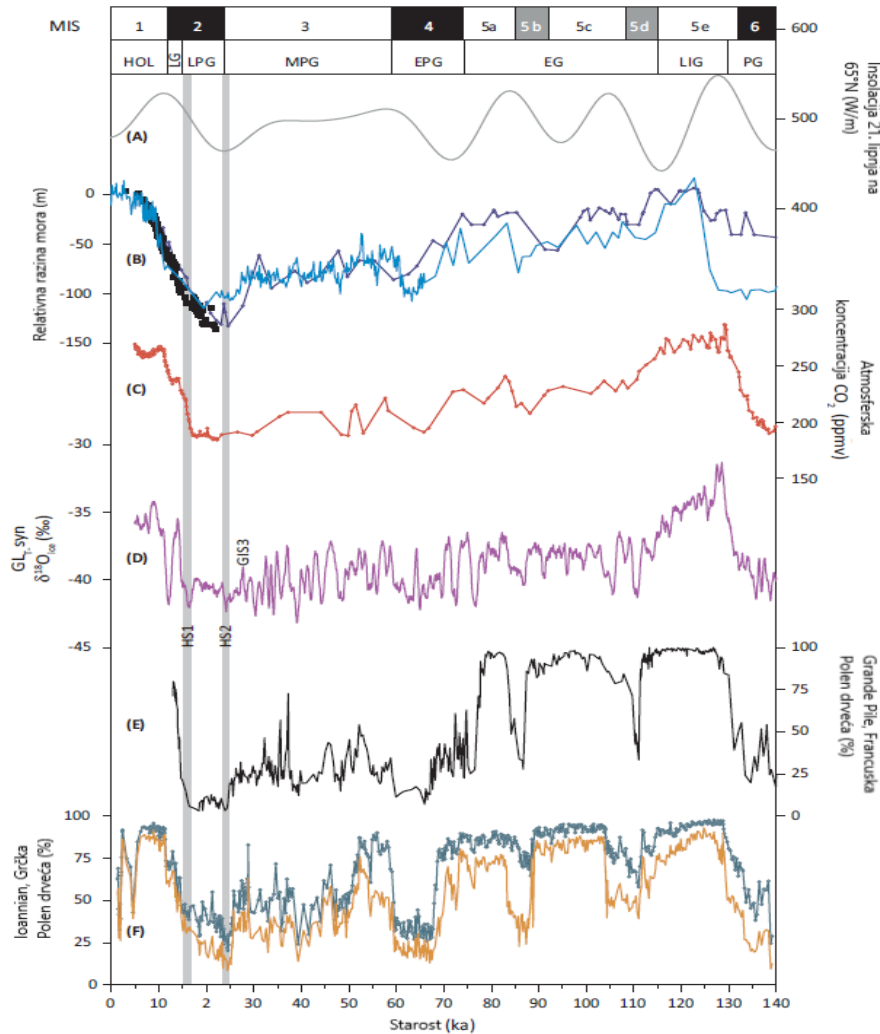
posljednjeg glacijala u Europi (Birks and Willis, 2008). U vrijeme LGM uvjeti za većinu danas široko rasprostranjenih vrsta su bili veoma nepovoljni, a njihovi areali maksimalno smanjeni (Hewitt, 2011). Kao što je vidljivo na slici 1, klima i uvjeti na Zemlji za vrijeme posljednjeg glacijalnog maksimuma uvelike se razlikuju od uvjeta koji vladaju na Zemlji danas. Tijekom velikih glacijala polarne ledene kape su se drastično povećavale i većina područja sjeverno do 40° N bila je prekrivena ledom i permafrostom, s temperaturama 10-25° C nižim nego danas. Vegetacijske zone bile su potisnute prema ekvatoru, a visoki planinski masivi su također bili zarobljeni u ledu (npr. Alpe, Ande, Stjenjak). Morska razina je bila smanjena za oko 120 metara zbog velike akumulacije leda, što je dovelo do nastanka kopnenih mostova u nekoliko dijelova svijeta. Također, došlo je i do promjena morskih struja, koncentracije CO₂ bile su snižene i iznosile su oko 180 ppm tijekom faza glacijacije, dok su u interglacijalima iznosile 280 ppm. Površine tropskih kišnih šuma su bile smanjene, a došlo je i do ekspanzije pustinja i savana (Hewitt, 2000; Birks and Willis, 2008).



Slika 1. Granica leda i permaforsta na karaju posljednjeg ledenog doba (LGM) prije 20 tis. godina. Smanjena razina mora, velike pustinje i tropske šume su naznačene. Preuzeto i prilagođeno iz Hewitt, 2000.

Takve globalne promjene u klimi u razdoblju kvartara mogu se pratiti pomoću uzoraka ledenih jezgri (engl. *ice core*), najčešće s Grenlanda (Artik) ili Vostoka (Antartika), a koje

sadržavaju zarobljene plinove, izotope, pH, čestice prašine i polen iz razdoblja kada je nastao određeni sloj unutra njih. U današnje vrijeme ledene jezgre mogu davati uvid u klimu od prije više od 400 tisuća godina. Fosilni uzorci, bilo makrofosili ili mikrofosili, mogu dati uvid u paleokoliš i paleoklimu. Također, uzorci morskog sedimenta i sedimenta jezera te drugi biološki i fizički otisci omogućuju praćenje klimatskih promjena u prošlosti (Hewitt, 2000).



Slika 2. Klimatske primjene i odgovori vegetacije u posljednjih 140 tisuća godina. Graf prikazuje (A) vrijednosti insolacije 21. lipnja na 65°N, (B) rekonstrukcije morske razine (svijetlo plave linije, tamno plave linije i crni kvadratići), (C) koncentracije atmosferskog CO₂ iz Antarktičkih ledenih jezgri, (D) rekonstrukciju δ¹⁸O sastava leda u sintetičkom zaopisu s Greenlanda (GL_{T-syn}), (E) promjene u arborealnom postotku polena iz zapisa Grande Pile, Vosges planine, Francuska, (F) promjene u postotku umjerenog (narančasto) i pionirskog (*Pinus*, *Betula*, and *Juniperus*) polena iz Ioannina 284 zapisa, sjeverozapadna Grčka. Označeni su stadiji izotopa kisika u moru (MIS), klimato- i kronostratigrafske jedinice: preposljednji glacial (PG), posljednji interglacial (LIG), raniglacial (EG), ranipleniglacial (EPG), srednji pleniglacial (MPG), kasni pleniglacial (LPG), kasni glacial (LG), i holocen (HOL). Preuzeto i prilagođeno iz Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013.

Cikličke primjene koje zapažamo u klimi kvartara mogu se objasniti teorijom Milankovićevih ciklusa koja se još naziva i teorijom glacijalnih perioda. Ona podrazumijeva da varijacije u Zemljinoj orbiti oko Sunca uzrokuju pojavu ledenih doba. Postoje tri komponente koje mogu varirati s različitom periodičnošću. To su ekscentričnost Zemljine orbite koja varira u periodu od 100 tisuća godina, varijacije u nagibu zemljine osi koja varira u periodu od 41 tisuće godina i osna precesija koja varira u periodu od oko 20 tisuća godina. Glavni utjecaj tih varijacija očituje se u promjeni insolacije na Zemlji tj. količini sunčeve energije koju primi, a ona utječe na promjene klime (Hewitt, 2000; Birks and Willis, 2008; Nieto Feliner, 2014). Na slici 2 možemo vidjeti na koji način promjene u insolaciji utječu na klimatske parametre u posljednjih 140 tisuća godina te odgovor vegetacije (promjene u koncentraciji polena) u Europi.

U razdoblju kvartara samo su 20% vremena vladali uvjeti kakve danas poznajemo na Zemlji. To su bile faze interglacijala, dok 80% vremena otpada na faze glacijala (Birks and Willis, 2008). U takvim uvjetima, mnoge vrste su izumrle na velikom dijelu svojeg geografskog opsega, neke su bile prisiljene migrirati na nova područja, a neke su preživjele u refugijima i ponovno se proširile kad su uvjeti bili opet povoljni, što je kod nekih vrsta dovelo do nove specijacije (Hewitt, 2000; Stewart i sur., 2010)

2.Tema

2.1.Refugiji

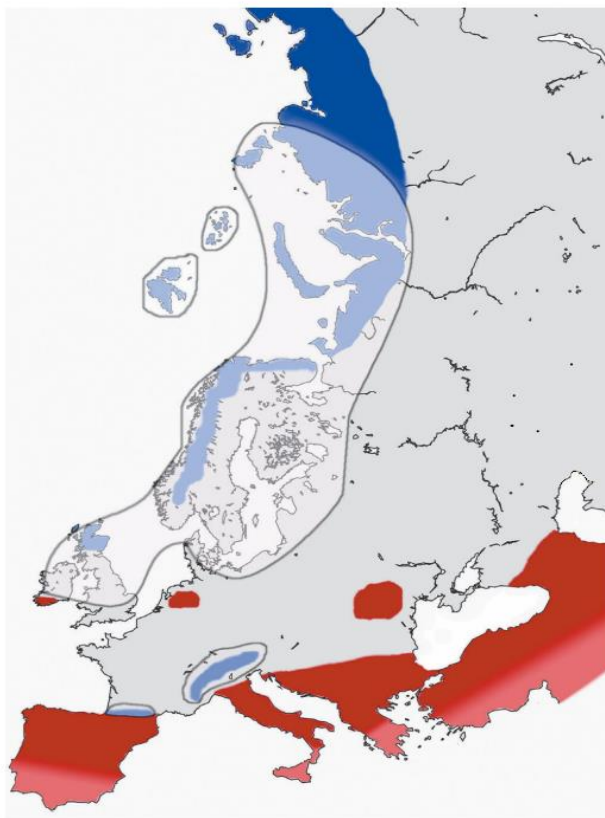
Iako je danas poznato više kategorija i tipova refugija, njihov zajednički nazivnik je da su refugiji geografska područja koje vrsta nastanjuje tijekom perioda unutar ciklusa glacijala/interglacijala u kojemu je njen geografski raspon najsuženiji (Stewart i sur., 2010; Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). To su područja u kojima su biljke i životinje mogle preživjeti nepovoljne i teške klimatske uvjete u okolišu, a kasnije su bili izvori rekolonizacije kada su klimatski uvjeti u okolišu postali povoljniji (Birks and Willis, 2008). Stoga ona predstavljaju „puferske“ zone u kojima se održavaju povoljni uvjeti za preživljavanje vrsta. Prema današnjem shvaćanju kvartarne refugije u Europi možemo podijeliti na glacijalne i interglacijalne. Glacijalni refugiji obuhvaćaju refugije u kojima su preživljavale vrste prilagođene na umjerenu klimu, dok interglacijalni refugiji obuhvaćaju područja na kojima su preživljavale vrste prilagođene na hladnu klimu. Izvan širokog područja na jugu koje obuhvaćaju glacijalni refugiji postoje i kriptični sjeverniji refugiji koji podrazumijevaju izolirana područja koja se nalaze izvan granica (geografskih širina) u kojima su vladali klimatski uvjeti u kojima su vrste prilagođene umjerenu klimi mogle preživjeti. Takva područja imala su vlastitu povoljnu mikroklimu i predstavljaju „otoke“ okružene nepovoljnim uvjetima za preživljavanje vrste. Isto tako postoje i kriptični južni refugiji, u kojima su preživljavale vrste prilagođene na hladnu klimu (slika 3). Svojstvo ekspanzije i kontrakcije areala vrsta iz i u refugije, bitno je za njihovu evoluciju, specijaciju i gensku varijabilnost (Birks and Willis, 2008; Stewart i sur., 2010; Nieto Feliner, 2014).

2.1.1. Glacijalni refugiji u Europi

Glacijalni refugiji na jugu Europe pružili su utočište vrstama umjerene klime u vrijeme glacijala. U Europi se genska raznolikost, u smislu raznolikosti vrsta i raznolikosti alela smanjuje s povećanjem geografske širine, tj. od europskog juga prema sjeveru (Hewitt, 2000). Žarišta genske raznolikosti u Europi nalaze se na tri područja Mediterana. Na Pirinejskom poluotoku, Apeninskom poluotoku i na području Balkana. Područje Mediterana koje obuhvaća ova tri refugija sadržava 80% svih europskih biljnih endema. Upravo su to područja glacijalnih refugija europskih vrsta iz kojih je kretala glavna rekolonizacija sjevera Europe (Nieto Feliner, 2014). Bitno je

spomenuti da su unutar refugija morali postojati povoljni uvjeti za preživljavanje drvenastih biljnih vrsta (drveća), kao što su povoljne razine vlage u tlu, dovoljno visoke temperature koje su dozvoljavale rast, zaštita od jakih vjetrova i odsutnost permaforosta i periglacialne aktivnosti (Birks and Willis, 2008).

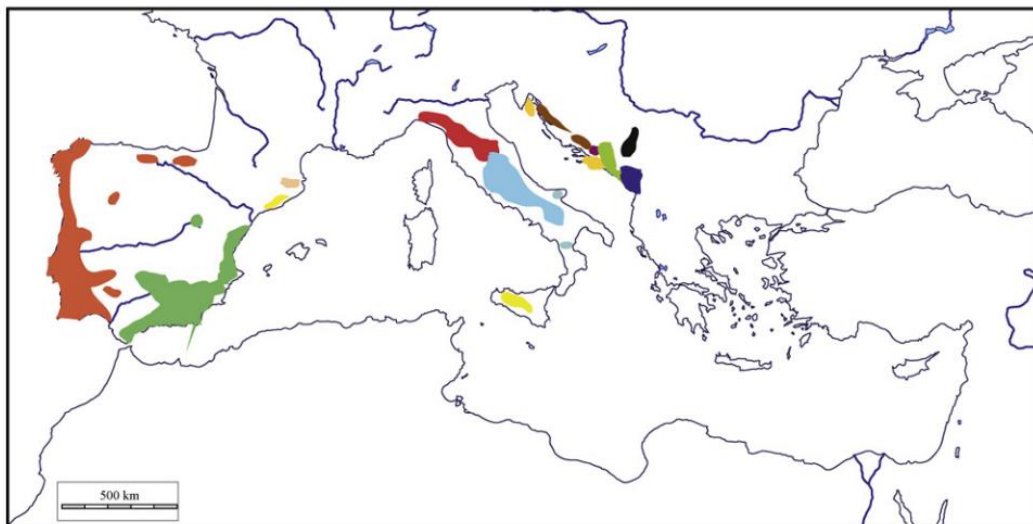
Putevi rekolonizacije iz južnih refugija u razdoblju postglacijala razlikuju se između vrsta. Doprinos pojedinog refugija u rekolonizaciji je također različit, iako se pokazalo da su Balkanske linije dominantne u mnogima od njih, a doprinos linija s Pirinejskog i Apeninskog poluotoka je manji. To može biti posljedica postojanja planinskih barijera poput Alpa (koje su bile prekrivene ledenim pokrovom) i Pirineja. Takve barijere usporavale su procese rekolonizacije (migracije) vrsta prema sjeveru (Hewitt, 2011).



Slika 3. Shematski prikaz tipova refugija u Europi. Crveno su označeni glacialni refugiji na jugu Europe i kriptični sjeverniji glacialni refugiji. Plavo su označeni interglacialni refugiji na sjeveru Europe i kriptični interglacialni refugiji na jugu. Ledeni pokrov iz posljednjeg glacialnog maksimuma je prikazan zasjenjeno. Preuzeto i prilagođeno iz Stewart i sur., 2010.

Unutar refugija prema modelu „refugij-unutar-refugija“ (eng. „refugia-within-refugia“) postoje filogeografske pukotine koje ukazuju na manjkavost modela prema kojemu Apeninski poluotok, Balkan i Pirinejski poluotok predstavljaju jedinstveni refugij (slika 4). To je vidljivo kod mnogih biljnih i životinjskih grupa, a potvrđeno na istraživanjima zeljastih vrsta i drveća na Pirinejskom poluotoku, ali i na Apeninskom poluotoku te Balkanu. Takav uzorak pojavljuje se i drugdje u svijetu (npr. u južnoj Australiji) (Nieto Feliner, 2014).

Također, važno je spomenuti i doprinos kriптиčnih sjevernih refugija u rekolonizaciji Europe u razdoblju nakon LGM. Hipoteza takvih refugija dokazana je u nekoliko biljnih vrsta umerenih područja kao što su paprati i šaševi (lat. *Cyperaceae*), te u životinjskih vrsta: malih sisavaca, puževa, slatkovodnih riba, gmazova i vodozemaca. No, populacije koje nastanjuju kriптиčne sjeverne refugije sklonije su izumiranju, te više ne mogu biti izvor za rekolonizaciju (Stewart i sur., 2010).



Slika 4. Primjeri modela "refugija-unutar-refugija" temeljeni na informacijama o biljnim grupama s tri poluotoka: (i) hipotetskim lokacijama refugija tijekom LGM za vrste *Quercus* spp. na Pirinejskom poluotoku, genetske grupe vrste *Arabidopsis alpina* na Apeninskom poluotoku i taksonomsko-genetske grupe kompleksa *Cardamine maritima* na Balkanu. Preuzeto i prilagođeno iz Nieto Feliner, 2014.

2.1.2. Procesi i putevi rekolonizacije biljnih vrsta iz glacijalnih refugija

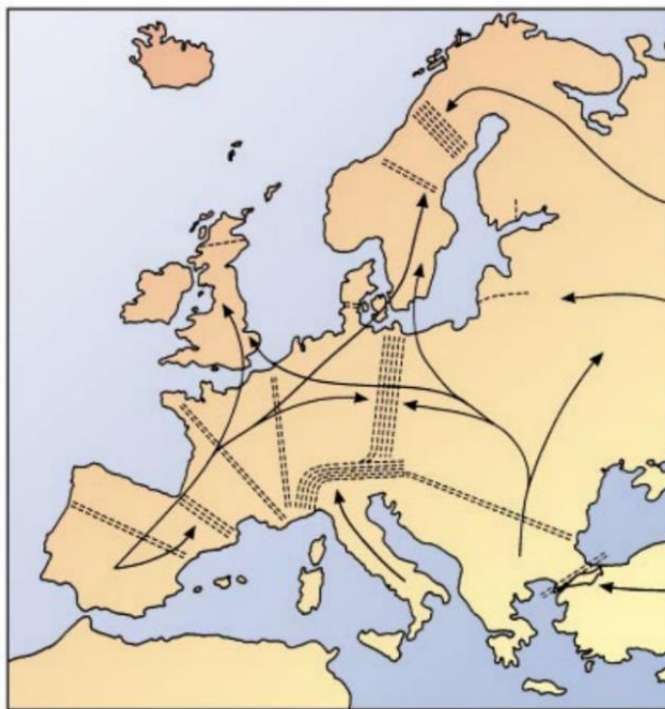
Prema dosadašnjim istraživanjima do izumiranja populacija koje se nalaze izvan područja glacijalnih refugija dolazi u trenutku kada nastupe klimatske promjene koje uzrokuju glacijaciju. Nema fizičkog povlačenja vrste u refugij tijekom pogoršanja okolišnih uvjeta. To je moguće vidjeti

iz podataka o paleokoncentraciji polena mnogih populacija drveća u sjevernoj Europi. Budući da se ekspanzija i kontrakcija areala biljnih vrsta iz i u glacijalne refugije događa ciklički to znači da samo jedinke koje ostaju unutar dugoročnih refugija (onih koje vrsta nastanjuje tijekom barem jednog cijelog ciklusa glacijala/interglacijala) daju svoj doprinos dugoročnoj evoluciji vrste (Stewart i sur., 2010).

Proces rekolonizacije iz refugija odvija se prema modelu vodeće linije. Događa se rapidna kolonizacija koja je eksponencijalnog tijeka i tijekom koje (najčešće najsjevernije) populacije neke vrste prve migriraju s juga prema sjeveru. Takva nagla kolonizacija pogodnog teritorija moguća je zbog toga što su se klimatske oscilacije događale naglo te se u kratkom vremenu oslobađalo mnogo nenastanjenog pogodnog područja. To znači da je samo nekoliko genotipova, onih koji su se nalazili na sjevernoj granici ili najbliže područjima koja su bila pod ledom, sudjelovalo u rekolonizaciji sjevera Europe (Nieto Feliner, 2014). Osnivački događaji su stoga često dovodili do gubitka alela i homozigotnosti novonastale populacije, a uz to je i kolonizacija za populacije koje su se nalazile iza vodećih bila otežana jer su ispunjavale prostor koji je već bio ispunjen kolonistima. Na taj je način otežan protok gena između juga i sjevera areala neke vrste. Uz ekspanziju areala, događala se i selekcija i adaptacija vrsta na drugačije okolišne uvjete i nove susjedne vrste. Primjer za to vidljiv je u reproduktivnoj biologiji mnogih biljnih vrsta koje su uzduž svog areala od juga prema sjeveru, prilagođene različitim uvjetima osvjetljenja i temperature. To je posljedica postglacijalne kolonizacije (Hewitt, 2000). Upravo zbog toga dolazi i do tolike razlike između raznolikosti vrsta i alela na sjeveru i jugu Europe, a slični obrasci uočeni su i istraživani i u drugim dijelovima svijeta, poput Sjeverne Amerike (Stewart i sur., 2010).

Zbog toga što se migracija nekih vrsta prema sjeveru događala iz više refugija na kontaktu areala dvaju divergentnih genoma nastajale su uske zone hibridizacije (slika 5). Takve hibridizacijske zone opisane su na kontaktu španjolskih i francuskih te talijanskih i francuskih/austrijskih linija uzduž Pirineja i Alpa. Uzrok njihova nastanka je razlika u brzini rekolonizacije između Balkanskog refugija i Apeninskog/Pirinejskog refugija. Ona je posljedica geografskih barijera koje su kočile inicijalnu sjevernu ekspanziju vrsta. Uz hibridne zone oko Alpa i Pirineja postoje hibridna zona u srednjoj Europi te hibridizacijska zona u središnjoj Švedskoj. Prva je nastala pri susretu kolonista istočnih i zapadnih linija, a druga je nastala kao posljedica otapanja skandinavske ledene kape i susreta zapadnih i istočnih kolonista na području

Skandinavskog poluotoka. Hibridizacija i introgresija gena između dvije evolucijski mlađe, pa time i bliskije linije je mnogo vjerojatnija nego kod linija čije je odvajanje starije, a upravo ti procesi mogu značajno utjecati na biljnu evoluciju (Hewitt, 2000, 2011; Nieto Feliner, 2014).



Slika 5. Relativni položaji hibridizacijskih zona u Europi. Hibridizacijske zone su označene iscrtkano, mogući putevi migracije su označeni sa strelicama. Značajne hibridizacijske zone formiraju se u Skandinaviji, srednjoj Europi i Alpama. Preuzeto i prilagođeno iz Hewitt, 2000.

Utjecaj oscilacije klime u kvartaru vidljiv je i na razini razlike u raznolikosti između istočne i zapadne Europe. Prostor Balkana predstavlja glavno žarište za rekolonizaciju sjeverne i centralne Europe. To je posljedica kompleksne geološke prošlosti područja, a također i blizina Azijske flore i faune. Takav trend vidljiv je kod rodova *Abies*, *Cedrus*, *Cupressus* i *Pinus* kod kojih se genska raznolikost smanjuje od istoka prema zapadu Europe uzduž Mediteranskog bazena. To je posljedica razlike u klimi na istoku koja je bila topla i vlažna i klimi na zapadu koja je bila hladna i suha za vrijeme LGM. No, postoje i mnogi drugi primjeri na razini vrste koji govore suprotno i iako je ideja da Istočni Mediteran (Balkan) predstavlja kolijevku biljne evolucije i diversifikacije, potrebni su novi dokazi kako bi se razumio razmjer i uzroci takvog obrasca (Nieto Feliner, 2014).

Kao što je već spomenuto, za vrijeme glacijacije morska razina pala je i do 120 metara zbog toga što je voda bila nakupljena u velikim ledenim kapama (Hewitt, 2000). Takav pad morske razine doveo je do promjene obalne linije, ali i povezivanja kopnenih masa koje su prije bile nepovezane i na taj način je bio omogućen protok vrsta i gena između kopnenih masa koje su prije bile odvojene tjesnacima. Primjer za to je povezivanje Sicilije i Tunisa te mnogih otoka u Sredozemlju (Malta, Pantelleria, Lampedusa, Liparskih i Egejskih otoka) koje je utjecalo na raznolikost unutar refugija (Nieto Feliner, 2014).

2.1.3. Metoda istraživanja biljnih glacijalnih refugija u Europi

Istraživanja glacijalnih refugija biljaka temelji se najčešće na podacima dobivenim iz analiza fosilnih ostataka kao što su polen i biljni makrofosili te iz filogeografskih rekonstrukcija temeljenih na molekularnim markerima. Na temelju samo jednog od ovih izvora teško je donijeti valjane zaključke o rasponu i prisutnosti biljnih populacija na nekom području, a za to postoji nekoliko razloga. Kod analiza polena teško je interpretirati dobivene rezultate kada se radi o malenim koncentracijama polena, budući da je teško razlikovati je li prisutnost polena na nekom manjem izoliranom području posljedica toga što je donesen vjetrom ili postojanje male populacije na tom području. Fosilni polen može biti i pretaložen iz jednog sloja u drugi što može dovesti do krivih interpretacija dobivenih rezultata (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). Također, na proizvodnju polena u nekih drvenastih vrsta utječu temperatura i smanjene koncentracije CO₂ i suhoća zraka, a takvi uvjeti su vladali u vrijeme LGM. To znači da su mogle postojati populacije koje su se vegetativno razmnožavale, nisu proizvodile polen te njihova prisutnost nije mogla biti zabilježena u polenskom zapisu (Birks and Willis, 2008). Primjena polena u analizama prisutnosti biljnih vrsta koje se ne oprašuju vjetrom je ograničena (Nieto Feliner, 2014).

Biljni makrofosilni ostaci u Europi najčešće su ostaci fosilnog ugljena, a oni mogu nedvojbeno pokazati prisutnost vrste na nekom području. Problemi se javljaju prilikom datiranja takvih ostataka. Naime, većina ostataka je datirana tako da je pridružena sloju u kojem su pronađeni, no takav način datiranja nije precizan zbog toga što se fosilni ostaci mogu pretaložiti iz starijeg u mlađi sloj ili pomaknuti tijekom iskapanja. Nedvojbeno određivanje starosti daju rezultati dobiveni analizom izotopa ugljika ¹⁴C (radiokarbonske analize) (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). Kombinacijom rezultata dobivenih analizom polena i biljnih makrofosila

predloženo je postojanje kriptičnih refugija umjerenih biljnih vrsta sjevernije i istočnije od područja glacijalnih refugija na jugu (Balkanskog, Pirinejskog i Apeninskog) (Magri i sur., 2006; Birks and Willis, 2008).

Primjena klasičnih mitohondrijskih genetskih markera (mtDNA), koji se koriste kod drugih vrsta za genetičke analize kod biljaka nije informativna za filogeografske rekonstrukcije. Razlog tome su spore rate mutacije u mtDNA u biljaka te se stoga u rekonstrukciji biljne filogeografije najčešće koristi kloroplastna (cp) DNA. Uz nju koriste se još i metode cp-PCR-RFLP, cp-mikrosateliti i mitohondrijski mikrosateliti izozima kako bi se povećala genska varijabilnost istraživanih uzoraka. U analizi genskih markera kod biljaka teško je pratiti njihovu evoluciju. Oni ne daju dovoljno informacija o odnosima između izvorne (refugijalne) i odredišne (rekolonizirane) populacije. Stoga je potrebno analizirati veće dijelove biljnog genoma koji su mutacijski informativniji kako bi se mogli objasniti kompleksni evolucijski procesi. Važno je spomenuti da vjerodostojnost dobivenih rezultati uvelike ovise i o napretku programa za analizu setova podataka polenskih zapisa, makrofosila i genetskih markera te podudarnosti između rezultata dobivenih na temelju različitih izvora (Hewitt, 2000; Nieto Feliner, 2014). Filogeografske rekonstrukcije na temelju genskih markera i podataka o današnjim populacijama mogu dati samo uvid u poleogeografsku prošlost neke vrste, a definitivne rezultate o prisutnosti nekih haplotipova na određenom području moguće je dobiti samo DNA analizom biljnih fosilnih ostataka, a ona predstavlja veliki izazov za znanstvenike danas (Magri i sur., 2006).

2.2. Primjeri glacijalnog refugija biljaka u Europi

2.2.1. Obična bukva (*Fagus sylvatica*)

2.2.1.1. Biologija obične bukve

Obična bukva je listopadna drvenasta vrsta koja može narasti do visine od 50 metara, a pripada istoimenoj porodici bukvi (Fagaceae). Oprašuje se vjetrom. Rasprostranjena je diljem Europe, od Skandinavije na sjeveru pa do Sicilije na jugu i Pirinejskog poluotoka na zapadu do Turske na istoku (slika 6). Na današnju rasprostranjenost utjecale su klimatske oscilacije tokom razdoblja kvartara, a posebno prijelaz iz pleistocena u holocen. Može podnijeti jake zime, ne zahtjeva poseban tip tla, ali joj je potrebna zračna vlaga i kiša tijekom cijele godine uz dobru drenažu tla. Na jugu svog areala nastanjuje područja viša od 1000 metara. Osjetljiva je na kasni mraz. U kontinentalnoj klimi prema istoku Europe (Turska) vrstu *Fagus sylvatica* zamjenjuje srodnik *Fagus orientalis* s kojom često hibridizira na području preklapanja areala. Ekonomski je jako važna jer je njeno drvo visoko kvalitetno i široko uporabljivo. Upravo iz ovih razloga nije neobično da je bukva jedno od najistraženijih europskih vrsta drveća. Istraživanja bukve provode se na poljima ekologije, paleoekologije i genetike. (Magri i sur., 2006; Brus, 2010; Houston Durrant, de Rigo and Caudullo, 2016).



Slika 6. Karta rasprostranjenosti bukve (*Fagus sylvatica*) na području Europe. Preuzeto i prilagođeno iz Houston Durrant, de Rigo and Caudullo, 2016.

2.2.1.2. Filogeografija bukve

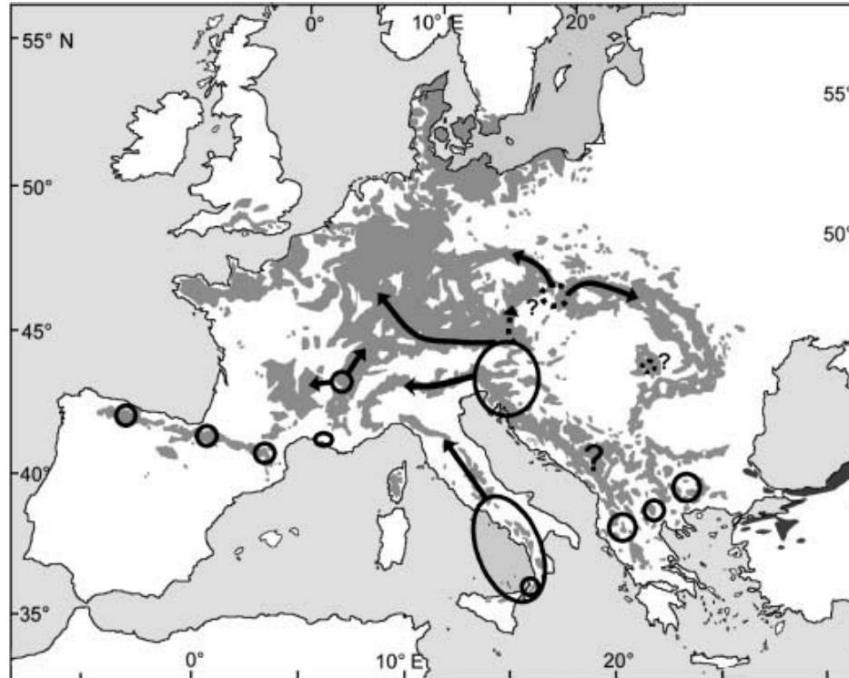
Kao što je već spomenuto, najveći utjecaj na današnju rasprostranjenost bukve imale su klimatske oscilacije u razdoblju Kvartara. Prijelazi između razdoblja glacijala i interglacijala djelovali su na sužavanje i proširivanje areala bukve u Europi. Poznato je da je najveća genska raznolikost bukve na području južnih glacijalnih refugija (Apeninskom poluotoku, Pirinejskom poluotoku i Balkanu). Zanimljivo je da prema dosadašnjim istraživanjima ti refugiji nisu značajno pridonijeli rekolonizaciji sjevernih dijelova Europskog kontinenta nakon LGM. To je suprotno od očekivanih rezultata.

U rekolonizaciji su ponajviše sudjelovale vrste koje su nastanjivale srednjoeuropske refugije koji su se nalazili na tri područja. Prva refugijalna populacija nalazila se u francuskim zapadnim Alpama i odgovorna je za kolonizaciju većine južne Francuske, a dio njenog areala susreće se i s južnijom populacijom u dolini rijeke Rhône čija ekspanzija nije bila toliko značajna. Druga populacija nalazila se na području istočnih Alpa, Slovenije i Istre a njena ekspanzija išla je u dva smjera. Zapadno uzduž Alpa prema Vogezi, sjevernoj Francuskoj i Engleskoj te sjeverno uzduž doline rijeke Po prema sjeveru Italije. Južni i centralni dio Italije kolonizirala je populacija koja je preživjela na području apeninskog glacijalnog refugija ali se nikada nije proširila sjeverno od doline rijeke Po. Treća populacija koja se nalazila na području južne Moravske bila je značajna za rekolonizaciju područja Karpata. Njena prisutnost dokazana je uz pomoć foslnih ostataka a genski markeri koji ju povezuju s populacijom istočnih Alpa, Slovenije i Istre mogu biti ostatak kada su te populacije bile povezane, u vrijeme starije ekspanzije šuma vjerojatno prije 130 – 70 tisuća godina. U kolonizaciji Karpata mogao je sudjelovati i još jedan refugij koji se nalazio na području Apusena, a čija prisutnost je dokazana visokim bogatstvom alela koji ga definitivno razlikuju od ostatka Balkanskog refugija (Slika 7). Sve tri populacije nalaze se na 45° i 49° geografske širine, a to upućuje da su upravo sjeverni (kriptični) refugiji najviše doprinijeli u rekolonizaciji Europe. Takav rezultat neočekivan je za bukvu koja pripada vrstama koje prevladavaju u umjerenim šumama. Populacije koje su preživjele u glacijalnim refugijima na području Pirinejskog poluotoka i Balkana nisu se značajno proširile nakon LGM iako pokazuju veliku gensku raznolikost zajedno s populacijama juga Francuske i Apeninskog poluotoka. Za

razliku od njih populacije koje se nalaze u sjevernoj, istočnoj i srednjoj Europi imaju veoma homogenu gensku strukturu (Magri i sur., 2006; Brus, 2010).

Važnu ulogu u formiranju refugija imali su planinski lanci. Oni su predstavljali područja s zaštićenim i vlažnim uvjetima, koja nisu bila izložena oštrim vjetrovima te permafrostu i periglacialnoj aktivnosti, a bila su povoljna za preživljavanje vrste tijekom razdoblja glacijacije. Također su bili važni i za postglacialno širenje bukve. Također, planinska područja pokazala su se kao povoljan okoliš za diferencijaciju i održavanje genske strukture vrste, gdje se genska diferencijacija bukve povećava sa nadmorskom visinom. To je suprotno od prijašnjih mišljenja da planinski lanci predstavljaju geografske barijere koje uzrokuju izolaciju populacija (Magri i sur., 2006; Birks and Willis, 2008).

Postoje kritike vezano uz istraživanje glacialnih refugija bukve koje su proveli Margi i sur, 2006. Naime, rezultati koje su oni dobili temelje se na podacima makrofosila, fosilnog polena i molekularnim podacima (cp-PCR-RFLP, cp mikrosateliti i nuklearnim markerima), ali za najsjeverniji glacialni refugij (u južnoj Moravskoj) nema paleobotaničkih dokaza za vrijeme LPG. Iz tih razloga je nemoguće utvrditi prisutnost bukve u tom refugiju u vrijeme LGM, te postojanje te populacije prije devet tisuća godina može biti posljedica efekta osnivača na velikoj udaljenosti (engl. *Long distance founding event*) (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). Treba napomenuti i da u vrijeme glacijacije kod nekih biljnih vrsta, posebno onih koje se nalaze sjevernije, nema proizvodnje polena te njihovu prisutnost nije lako detektirati (Birks and Willis, 2008). Također, upotrijebljeni genski markeri nisu otkrili veliku raznolikost u srednjoj i sjevernoj Europi, a to može ići u prilog i teoriji da su kolonizacija dogodila samo iz Balkanskog i Pirinejskog refugija. Kao što je već spomenuto, definitivne rezultate moguće je dobiti samo izu podataka dobivenih na temelju drevne DNA, iako i kod uporabe drevne DNA postoji mogućnost kontaminacije DNA (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013).

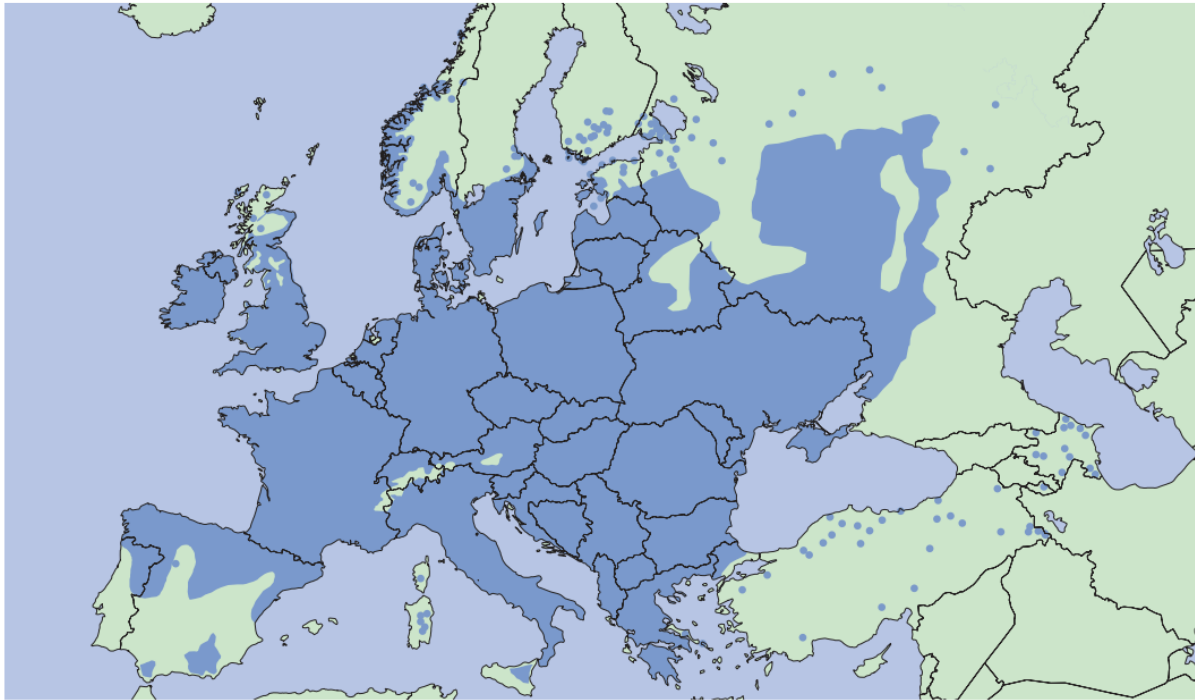


Slika 7. Moguće lokacije glacijalnih refugija bukve (*Fagus sylvatica*) tijekom posljednjeg glacijalnog maksimuma i glavni putevi kolonizacije tijekom postglacijalnog perioda. Svijetlo sivo označen je današnji areal vrste *F. sylvatica*, a tamno sivo vrst *F. orientalis*. Preuzeto i prilagođeno iz Magri i sur., 2006.

2.2.2. Divlja jabuka (*Malus sylvestris*)

2.2.2.1. Biologija divlje jabuke

Divlja jabuka (*Malus sylvestris*) pripada porodici ružovki (Rosaceae). Za razliku od bukve koja se oprašuje vjetrom, divlja jabuka oprašuje se pomoću kukaca, najčešće opnokrilaca. To je drvenasta vrsta koja može narasti do 10 metara visine i živjeti 80 – 100 godina. Divlja jabuka najčešće se nalazi na rubovima šuma zbog svoje niske kompetitivne sposobnosti, a često raste na mjestima s ekstremnim uvjetima (jako suhim ili jako vlažnim). Mnoge divlje životinje hrane se plodovima divlje jabuke, a njihov utjecaj na njenu rasprostranjenost nije poznat. Divlja jabuka raste u populacijama niske gustoće, a rasprostranjena je diljem Europe (slika 8). Genom divlje jabuke doprinio je genomu kultivirane jabuke, *Malus domestica*, s kojom često hibridizira. Iz tog razloga je teže detektirati „čiste“ divlje jabuke. Postoje morfološke karakteristike po kojima se divlja jabuka razlikuje od kultivirane: naličje listova bez dlaka i širina plodova (Stephan, Wagner and Kleinschmit, 2003; Cornille i sur., 2013).



Slika 8. Rasprostranjenost divlje jabuke (*Malus sylvestris*) na području Europe. Preuzeto i prilagođeno iz Stephan, Wagner and Kleinschmit, 2003.

2.2.2.2. *Filogeografija divlje jabuke*

Tijekom posljednjeg glacijala areal divlje jabuke bio je sužen i fragmentiran između istočnoeuropskih i zapadnoeuropskih populacija. Nakon završetka LGM dolazi do postglacijalne rekolonizacije divlje jabuke. U današnjoj rasprostranjenosti divlje jabuke u Europi sudjeluju tri različite populacije. Zapadna populacija koja zauzima široko područje od Francuske do Norveške, i dvije istočne populacije. Jugoistočna koja se nalazi na sjeveroistočnom dijelu Balkana i sjeveroistočna koja se nalazi u Karpatima. Takva distribucija zajedno s predviđanjima na temelju klimatskih podataka upućuje na postojanje tri glacijalna refugija divlje jabuke u vrijeme LGM. Prvi se nalazio na području Pirinejskog poluotoka ili južne Francuske, drugi na području Balkana, a treći u istočnoj Europi (Karpatima). Pomoću ABC (engl. *Approximate Bayesian Computation*) analiza i ENM (engl. *Ecological Niche Models*) analize pokazana je mogućnost postojanja sjevernog glacijalnog refugija divlja jabuke na višim geografskim širinama od očekivanih

(Karpatima). Takav uzorak pojavljuje se i kod bukve, te ide u prilog postojanju kriптиčnog glacijalnog refugija za vrste drveća umjerenih šuma (Magri i sur., 2006; Cornille i sur., 2013).

Zapadnu Europu kolonizirale su populacije divlje jabuke iz refugija na Pirinejskom poluotoku ili refugija na jugu Francuske. Istočnu Europu kolonizirale su populacije iz refugija u istočnoj Europi (Karpatima), dok doprinos kolonizaciji nisu dale linije iz Balkanskog refugija. Postoji mogućnost postojanja i refugija na području Apeninskog poluotoka no zbog ranog miješanja divlje jabuke s kultiviranom prisutnost takve populacije nije moguće utvrditi. Iako su populacije u refugijima bile odvojene tijekom rekolonizacije, stupale su u kontakt što je uzrokovalo nastanak hibridizacijskih zona na granici dvaju areala. Nastanak takvih zona na kontaktu istočne i zapadne populacije očekivan je i događao se i kod drugih vrsta drveća šuma umjerene klime, dok je nastanak hibridizacijskih zona između sjeveroistočne i jugoistočne populacije nije ranije uočen. Ovakva otkrića stavljaju naglasak na korisnost jezgrinih mikrosatelitnih markera u istraživanjima demografske prošlosti populacija i stupnja miješanja između populacija u filogenetskim istraživanjima. Tok gena između populacija potvrđen je i na temelju ABC modela (Cornille i sur., 2013; Nieto Feliner, 2014).

Zbog brzine kojom se događala postglacijalna kolonizacija divlje jabuke možemo reći da ona spada u brze kolonizatore s visokim kapacitetom pionirske vrste. Treba napomenuti i da rezultate dobivene analizom ENM treba uzeti uz rezervu zbog nepreciznosti samih modela. Ona je uzrokovana ograničenjem samog programa jer se smatra da je ekološka niša vrste definirana samo faktorima temperature i padalinama, a ne i procesima širenja vrste, biotskim interakcijama, i sukcesijskim fazama unutar šuma. Ovakvi modeli podrazumijevaju očuvanost i stabilnost ekološke niše neke vrste tokom vremena, no ona se može i mijenjati (Cornille i sur., 2013).

3. Zaključak

Glacijalni refugiji u Europi predstavljaju žarišta genetske raznolikosti biljnih i drugih vrsta u Europi i svijetu (Hewitt, 2011). To se posebice očituje na području Balkana koje se može smatrati kolijevkom diversifikacije Europskih vrsta. Iako je genetska raznolikost veća u južnim refugijima, najveći doprinos postglacijalnoj kolonizaciji sjevera Europe dale su linije koje su se nalazile na sjevernom rubu tih refugija i unutar kriptičnih sjevernih refugija. Takva kolonizacija uzrokovala je pojavu genske homozigotnosti vrsta na sjeveru Europe i velike raznolikosti na jugu (Magri i sur., 2006; Cornille i sur., 2013; Nieto Feliner, 2014). Upravo iz tih razloga potrebno je uložiti daljnje napore kako bi se područja glacijalnih refugija (južnih i kriptičnih) zaštitila.

Postoji nužnost za detaljnijim paleobotaničkim istraživanjima na području glacijalnih refugija u Europi, jer detaljnija slika o fosilnim ostatcima (makrofoslili, fosili ugljena, polen i sl.) može dati bolji uvid u prisutnost vrsta na nekom području u vrijeme LGM. Također, buduća istraživanja moraju se temeljiti na kombiniranim paleobotaničkim i genetičkim istraživanjima, jer ona zajedno daju detaljniji uvid u paleogeografsku prošlost neke vrste (Tzedakis, Emerson and Hewitt, 2013). Važnost uporabe genskih markera koji pokazuju recentnija odvajanja pokazana je i na primjeru divlje jabuke (*Malus sylvestris*). Pomoću njih je potvrđeno postojanje dvije zasebne linije u istočnoj Europi, što nije dokazano kod bukve (*Fagus sylvatica*). Buduća istraživanja će nam omogućiti bolje razumijevanje procesa koji su se događali u vrijeme LGM i nakon njega, a to je posebno bitno u kontekstu klimatskih promjena koje se događaju danas i njihovog utjecaja na život na Zemlji.

4. Literatura

- Birks, H. J. B. and Willis, K. J. (2008) 'Alpines, trees, and refugia in Europe', *Plant Ecology and Diversity*, 1(2), pp. 147–160. doi: 10.1080/17550870802349146.
- Brus, R. (2010) 'Growing evidence for the existence of glacial refugia of European beech (*Fagus*)', 112(3), pp. 239–246.
- Cornille, A., Giraud, T., Bellard, C., Tellier, A., Le Cam, B., Smulders, M. J.M., Kleinschmit, J., Roldan-Ruiz, I., Gladioux, P. (2013) 'Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple', *Molecular Ecology*, 22(8), pp. 2249–2263. doi: 10.1111/mec.12231.
- Hewitt, G. M. (2000) 'The genetic legacy of the Quarternary ice ages', *Nature*, 405, pp. 907–913. doi: 10.1038/35016000.
- Hewitt, G. M. (2011) 'Biodiversity Hotspots', pp. 123–147. doi: 10.1007/978-3-642-20992-5.
- Houston Durrant, T., de Rigo, D. and Caudullo, G. (2016) 'Fagus sylvatica and other beeches in Europe: distribution, habitat, usage and threats', *European Atlas of Forest Tree Species*, pp. 130–131. doi: 10.2788/038466.
- Magri, D., Vendramin, G. G., Comps, B., Dupanloup, I., Geburek, T., Gömöry, D., Latałowa, M., Litt, T., Paule, L., Roure, J. M., Tantau, I., Knaap, Van Der O., W., Petit, R. J., De Beaulieu, J.-L., Van Der Knaap, W. O (2006) 'A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences', *New Phytologist*, 171(1), pp. 199–221. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01740.x
- Nieto Feliner, G. (2014) 'Patterns and processes in plant phylogeography in the Mediterranean Basin. A review', *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. Elsevier GmbH., 16(5), pp. 265–278. doi: 10.1016/j.ppees.2014.07.002.
- Stephan, B. R., Wagner, I. and Kleinschmit, J. (2003) 'Wild apple and pear', *Euforgen*, (maximum 130), p. 6. doi: citeulike-article-id:13495795.
- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., Dalén, L. (2010) 'Refugia revisited: Individualistic responses of species in space and time', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1682), pp. 661–671. doi: 10.1098/rspb.2009.1272.
- Tzedakis, P. C., Emerson, B. C. and Hewitt, G. M. (2013) 'Cryptic or mystic? Glacial tree refugia in northern Europe', *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 28(12), pp. 696–704. doi: 10.1016/j.tree.2013.09.001.

Sažetak

Izmjene glacijala i interglacijala u razdoblju Kvartara utjecale su na geografsku rasprostranjenost vrsta u Europi danas. Vrste koje su bile bolje prilagođene na umjerenu klimu bile su ograničene na područja refugija u vrijeme glacijala dok su vrste koje su bile prilagođene na hladnu klimu bile ograničene na područja refugija u interglacijalima. Poseban utjecaj na geografski raspon vrsta imao je posljednji glacijalni maksimum. Glacijalni refugiji nalazili su se na jugu Europe (Apeninskom poluotoku, Pirinejskom poluotoku i Balkanu). Postojanje kriptičnih refugija za vrste umjerene klime koji su se nalazili sjevernije još uvijek je predmet mnogih znanstvenih rasprava. U ovom radu pokazana je mogućnost postojanja takvih refugija na primjeru obične bukve (*Fagus sylvatica*) i divlje jabuke (*Malus sylvestris*). Također, cilj ovog rada bio je dati uvid u kompleksne procese koji su se događali u refugijima tijekom posljednjeg glacijanog maksimuma i procese kolonizacije koji su uslijedili nakon njega. Naglašena je uloga glacijalnih refugija kao žarišta genske raznolikosti Europe te potreba za zaštitom tih područja. Potrebna su daljnja, detaljnija paleobotanička i genetička istraživanja kako bi se dobio detaljniji uvid u prošlost biljnih i drugih vrsta na Europskom kontinentu. Razumijevanje prošlosti glacijalnih refugija omogućit će bolja predviđanja utjecaja trenutnih klimatskih promjena na živi svijet.

Abstract

Changes between glacial and interglacial periods in Quaternary have influenced the geographical species distribution in Europe. Temperate-adapted species were confined to refugial areas during glacial periods while cold-adapted species were confined to refugial areas during the interglacial. Last glacial maximum had a significant influence on the today's species distribution. Glacial refugia were located in the Iberian, Italian and Balkan Peninsula. The existence of cryptic, more northern glacial refugia for temperate species is still questioned by many scientists. In this paper, the possibility of existence for such refugia is demonstrated on examples of European beech (*Fagus sylvatica*) and wild apple (*Malus sylvestris*). The aim of this review was to give insights on the complex processes that happened in the glacial refugia during last glacial maximum and postglacial colonization. The role of glacial refugia as "hotspots" of genetic diversity in Europe and the need for their protection has been emphasized. Further paleobotanical and genetic research is needed to get a more precise insight in plant and other species' history on European continent. Better understanding of the history of glacial refugia could give better predictions on influence of current climatic change on today's species.