

PROCJENA GENETIČKE VARIJABILNOSTI OBIČNE JELE (*Abies alba* Mill.) ANALIZOM cpDNA U DIJELU PRIRODNIH POPULACIJA BOSNE I HERCEGOVINE I HRVATSKE*

ASSESSMENT OF GENETIC VARIABILITY OF SILVER FIR (*Abies alba* Mill.)
WITH CP DNA ANALYSIS IN THE PART OF NATURAL POPULATIONS
OF BOSNIA AND HERZEGOVINA AND CROATIA

Dalibor BALLIAN¹

SAŽETAK: U ovom istraživanju utvrđivana je molekularnogenetička varijabilnost nekih populacija obične jеле u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini (Vranica, Meka brda, Gorski kotar – adultna, Gorski kotar – juvenilna, Crni vrh, Čabulja, Orjen). Varijabilnost se istraživala na molekularnoj razini, uz pomoć analize kloroplastne DNA (cpDNA).

Ovo je istraživanje značajno za dalje radove na oplemenjivanju obične jеле, odnosno u procesu obnove jelovih šuma (pošumljivanje i sjetva sjemeni), te za osnivanje banaka i arhiva gena metodama *in situ* i *ex situ*.

Pomoću analize kloroplastne DNA, točnije broja haplotipova (H), efektivnog broja haplotipova (Ne), haplotipske raznolikosti ($Hexp$ i Sw), vidljivo je da su prisutne razlike između istraživanih populacija, a napose između malih izoliranih i velikih populacija.

Ključne riječi: *Abies alba* Mill., varijabilnost, CpDNA

1. UVOD – Introduction

Obična je jela (*Abies alba* Mill.) jedna od najznačajnijih vrsta šumskog drveća s gospodarskog i ekološkog stajališta u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, a i u više srednjoeuropskih zemalja. U Hrvatskoj je zastupljena na 200 000 ha (Vukelić i Baričević, 2001), a u Bosni i Hercegovini na 562 237 ha (Ušćuplić, 1992) ili u oko 50 % svih visokih šuma.

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 otežana i skupa, kao i proizvodnja sadnog materijala jеле. Ipak u posljednje se vrijeme ulažu veliki naporci za očuvanje genofonda

obične jеле, kako bi se ona očuvala od potpunog nestajanja za buduće generacije.

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje molekularnogenetičke varijabilnosti nekih populacija obične jеле u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini. Osim velikih populacija, kao što su one Gorskog kotara, Vranice i Mekih brda, težište istraživanja bilo je i na malim populacijama iz submediteranskog područja (Biokova i Orjena), kako bi se ustanovilo kakva je njihova veza s populacijama iz središnjeg dijela prirodnog rasprostiranja u Bosni i Hercegovini i Hrvatskoj, a također jedne uvjetno rečeno panonske populacije (Crni vrh). Uz to utvrdila bi se razlika između adultne propadajuće populacije obične jеле iz Gorskog kotara i njezine juvenilne generacije koja pokazuje vitalnost.

Varijabilnost se istraživala na molekularnoj razini, uz pomoć analize kloroplastne DNA.

Krajnja je svrha istraživanja utvrditi postoji li značajna varijabilnost između populacija, što bi bilo važ-

* Doktorska disertacija obranjena na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, članovi povjerenstva – doc. dr. sc. Davorin Kajba, prof. dr. sc. Rifat Hadžiselimović i doc. dr. sc. Josip Franjić (skraćeno cpDNA istraživanje za Šumarski list)

¹ Dalibor Ballian, Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71 000 Sarajevo, BiH

no za gospodarenje u šumama obične jеле i u uzgojnim radovima.

Ovo je istraživanje značajno za dalje radove na oplemenjivanju obične jеле, odnosno u procesu obnove jelovih šuma (pošumljivanje i sjetva sjemena), te za osnivanje banaka i arhiva gena metodama *in situ* i *ex situ*.

1.1. Kloroplastna DNA i njezino značenje u populacijskoj genetici

Chloroplast DNA and its importance in population genetics

Za razliku od jezgrine DNA, kloroplastna DNA ne podliježe procesima rekombinacije, te joj to svojstvo daje veliku ulogu u istraživanjima postglacijskih seoba šumskog drveća (Slatkin 1994). Kloroplasti su citooplazmatske organele koje se nasljeđuju od jednog roditelja, a u rodu *Abies*, prema Salaaju i sur. (1998) nasljeđuju se od oca, zbog destrukcije majčinskih kloroplasta. Ziegenhagen i sur. (1996) zbog nepoznavanja te problematike dobili su slabe rezultate u istraživanju haplotipova kod makrogametofita, a za polen su dobili dobre rezultate. Zbog nasljeđivanja od jednog roditelja cpDNA se pokazala pogodnom za populacijskogenetička istraživanja, napose na razini rodova (genus) i podrodova (subgenus) te pri varijabilnosti unutar vrste (Bachmann, 1994). Ipak, ta metoda za sada pokazuje ograničene mogućnosti u ekološkim istraživanjima. Tako u jela možemo razdvojiti dvije faze pokretnosti gena. Prva ili gametofitna faza je i najpokretljivija, jer se polen (muška gameta) prenosi vjetrom na velike udaljenosti, do 35 km (60 km). Geni muškog roditelja brzo se prenose s jednog mjesto na drugo mjesto i odlučujući su za genetički tijek. Druga faza ili faza sporofita manje je pokretljiva, iako je sjemenka opskrbljena sjemenim krilcem koje omogućuje bolje raznošenje. Ipak sjemenka jеле razmjerno je teža od sjemena drugih četinjača, pa se za razliku od njih raznosi na manje udaljenosti, a pri-

jenos na veće udaljenosti povezan je sa zoohorijom ili hidrohorijom. Prema podacima koje navode Huntley i Birk's (1983) brzina kretanja obične jеле, dobivena na osnovi analiza polena, iznosila je od 40 od 300 m godišnje, ovisno o razdoblju, tako da je najbrže kretanje bilo prije 6 000 godina.

Vidljivo je da kloroplastni genom, koji je podrijetlom od muškog roditelja, ima mogućnost brzog širenja unutar populacije i između populacija, a ženski je vezan za jezgru i ima manju mogućnost širenja.

Jezgrina DNA je pod snažnim utjecajem polena (DNA muškoga genoma), podložna mejotičnim diobama i krosingoveru, što dovodi do velike raznolikosti u potomstvu. Takvih utjecaja nema kod kloroplastnoga genoma, te se on pokazuje pogodnim za populacijskogenetičke studije šumskih vrsta drveća. Autori do sada objavljenih radova s cpDNA analizirali su većinom intergenetičke sekvene te proučavali varijabilnost haplotipova i polimorfizam kloroplastnih mikrosatelite (SSRs) u nekim vrsta šumskog drveća: jele (Ziegenhagen i sur. 1995; Vendramin i Ziegenhagen, 1997; Vendramin i sur. 1999; Liepelt i sur., 2001), smreke (Scott i i sur., 1998; Vendramin i sur. 2000), crvenih borova (Echt i sur., 1998), primorskog bora (Vendramin i sur., 1998), pitomog kestena (Finieschi i sur. 2000), hrasta (Slade, 2001).

2. MATERIJAL I METODE RADA – Material and working methods

2.1. Izbor i opis terenskih objekata – Choice and description of field sites

Tijekom studenoga 2000. godine selektirana su stabla obične jеле na području Hrvatske, u Gorskem kotaru (Šumarija Vrbovsko, Skrad, Fužine, Gerovo) i na Biokovu, te u Bosni i Hercegovini, na području Vranice, Čabulje, Orjena, Mekih brda i Crnog vrha (tablica 1 i karta 1). Pri odabiru populacija vodilo se računa da se odaberu podjednako velike i sa znanstvenog stajališta zanimljive male populacije. Vodilo se računa i o tome da populacije budu iz kontrastnih ekoloških uvjeta i da, po mogućnosti, pripadaju različitim fitocenozama i geološkim podlogama. Od populacija Gorskog kotara, za jednu populaciju izabrana su adultna stabla koja su u fazi sušenja, za drugu populaciju uzeta su mlada stabla i pomladak, odnosno juvenilni stadij koji pokazuje vitalnost, a biljke koje su uzete u uzorak rastu u neposrednoj blizini adultnih stabala prve populacije.



Karta 1. Raspored istraživanih populacija

2.2. Izbor stabala – Choice of trees

Za analizu cpDNA uzimao se jednak broj biljaka u uzorak populacije, tako da populaciju predstavlja 24 stabla. Inače se pri prikupljanju uzorka za tu analizu vodilo računa da uzorci budu sabrani sa stabala među-

sobno udaljenih najmanje 100 m. Zbog loših vremenskih prilika u vrijeme sabiranja uzorka, manji je broj jedinki u populaciji Biokova i Gorskog kotara A i J (tablica 1).

Tablica 1. Istraživane populacije obične jеле u Bosni i Hercegovini i Hrvatskoj

Broj	Populacija	Zemljopisna širina	Zemljopisna dužina	Broj uspješnih analiza cpDNA
1	Meka brda (Kalinovik)	18° 35'	43° 29'	24
2	Vranica (Fojnica)	17° 54'	43° 56'	24
3	Gorski kotar A adultna (Delnice)	14° 50'	45° 25'	21
4	Gorski kotar J juvenilna (Delnice)	14° 50'	45° 25	22
5	Biokovo (Makarska)	17° 08'	43° 08'	18
6	Crni vrh (Tešanj)	18° 00'	44° 34'	24
7	Orjen (Trebinje)	18° 33'	42° 38'	24
8	Čabulja (Posušje)	17° 35'	43° 32'	24
	Ukupno			181

2.3. Način skupljanja uzorka – Method of sample collection

S obzirom na to da je cpDNA analiza oslobođena učinka dominacije i fenotipskih interakcija (Borojević, 1985), pri sabiranju uzorka pazilo se da se uzmu samo živi dijelovi biljke.

Za analizu cpDNA iskorištene su jednogodišnje iglice. Sa stabala s kojih je grančicu bilo teško skinuti sa zemlje moralo se provesti otpucavanje iz gornjeg dijela, jer je to bilo najbrže i najjednostavnije.

2.4. Metoda izolacije ukupne DNK – Method of total DNA isolation

DNA je izolirana iz djelića jednogodišnje svježe iglice, težine 50 mg. Uporabljen je laboratorijski komplet za izolaciju ukupne DNA i procedura propisana uz njega (DNeasy Plant Mini Kit, DNeasy 96 Plant Protocol for Isolation of DNA from Plant Leaf Tissue od

QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Protokol je sličan onome koji predlaže Rogers (1997).

Uspješnost izolacije DNK kontrolirala se aparatom za mjerjenje koncentracije DNA "Hoefer" – DyNA Quant 200 fluorometer.

2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) – Chain reaction by polymerase (PCR)

Iskorišteni su primjeri sa 21 do 22 baze, dani u tablici 2.

Tablica 2. Parovi primera iskorišteni u procesu amplifikacije

Redni broj	Šifra Primeri Lokus	Broj baza	Sekvenca (3'-5')	Temperatura topljenja (Tm)	Temperatura nalijeganja (TA)*
1	P 30141 F	22	TTTTATGTCAGCAACAGAAGCC	50	62
	P 30141 R	22	GGGAACATAGAGATCAAATTAC	50	60
2	P 30249 F	22	GTAATTGATCTCTATGTTCCC	50	60
	P 30249 R	22	AATCAACTGGTTCGGATTGATC	50	62
3	P 71936 F	22	CCCGATCACATAAAGGTTACTT	58,1	62
	P 71936 R	21	CCCTTAGAGTACATGCCAAAAA	57,9	60

TA* = 4 (#G i C) + 2 (#A i T);
(#G i C) – broj baza G i C u primeru
(#A i T) – broj baza A i T u primeru

Za lančanu reakciju polimerazom rađen je reakcijski volumen od 25 µl za par primera, a sve potrebno za jednu analizu prikazano je u tablici 3. Kompletne priprava za lančanu reakciju polimerazom napravljena je

na robotnoj radnoj stanici Biomek 2000 (Beckman Instruments). Unatoč različitim temperaturama hibridizacije (TA) u pokusu je za sve primere uspješno je primijenjena temperatura TA = 55 °C.

Lančana reakcija polimerazom napravljena je na termokrugu GENE Amp^R-PCR System 9700, uz korištenje sljedećih temperatura: početna od 94 °C u trajanju 5 min; slijedi 25 krugova (94 °C za 1 min, 55 °C za 1 min, 72 °C za 1 min), i završne temperature od 72 °C u trajanju 8 min. Poslije lančane reakcije polimerazom u termokrugu je temperatura čekanja 4 °C (tablica 4).

Nakon završene lančane reakcije polimerazom, kontrola uspješnosti provedena je elektroforezom na agarom gelu (Ultra pure grade agarose – Gibco BRL), uz bojenje ethidiumbromidom.

Tablica 3. Sastav otopine za odvijanje lančane reakcije polimerazom (amplifikacija)

Master-Mix za jednu analizu	
Tvar	Količina
H ₂ O (sterilna)	11,6 µl (9,1)
10 x Puffer	2,5 µl
dNTP's	0,4 µl
MgCl ₂	2,0 µl
Primer 1	2,0 µl
Primer 2	2,0 µl *
Taq (disolucija)	2,0 µl
Otopina DNA	2,5 µl (5)
Ukupno	25 µl

Tablica 4. Trajanje koraka amplifikacije za ispitivanje sekvenca

Vrsta temperature	Temperatura	Vrijeme	Broj krugova
početna temperatura	94 °C	5 min	
temperatura denaturacije	94 °C	1 min	25
temperatura hibridizacije	55 °C	1 min	25
temperatura elongacija	72 °C	1 min	25
završna temperatura	72 °C	8 min	
temperatura čekanja	4 °C	-	

2.6. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu – Electrophoresis on polyacrylamidic gel

Poslije uspješno završene lančane reakcije polimerazom priprema se smjesa za digestiju prema recepturi iz tablice 5, a obično se radi za 36 uzoraka po jednom krugu rada sekvencera. Zatim se provodi digestija, tako da se pripravak 3 do 5 min grije u termokrugu

GENE Amp^R-PCR System 9700 na 95 °C. Tada se uzorci brzo izvade i stave u led do postavljanja uzoraka na poliakrilamidni gel, da ne bi došlo do njihove ponovne hibridizacije..

Tablica 5. Priprava smjese za digestiju na sekvenceru

Tvar	Količina	Količina	Vanjski mjerac
mjerac 50	1µl	-	1µl
mjerac 100	-	1µl	1µl
mjerac 150	-	-	1µl
mjerac 196	1µl	1µl	1µl
produkt amplifikacije P 30141	1µl	-	-
produkt amplifikacije P 30249	1µl	-	-
produkt amplifikacije P 71936	-	2µl	-
loading dye	6µl	6µl	6µl
ukupno	10µl	10µl	10µl

Poliakrilamidni gel pripravljen je na temelju gotovih preparata koji se neposredno prije postavljanja gela izmiješaju i utisnu u odgovarajuću šablonu za gel, koja

se rabi na sekvenceru Pharmacia LKB-A.L.F. "Alf express DNA Sequencer". Rad sekvencera traje je oko 65 do 70 minuta.

2.7. Očitavanje gelova i statistička obrada podataka Reading of gels and statistical data analysis

Sekvencer je povezan s mikroprocesorom u kojem je instaliran program FRAGMENT MANAGER version 1.1 (Pharmacia) podešen za mjerjenje amplificiranih fragmenata. Vrijednosti se očitavaju automatski, uz prethodno poravnjanje uz pomoć vanjskih mjeraca.

Kao krajnji produkt dobije se florogram s veličinama određenih fragmenata. Pošto se završi sekvencioniranje svih uzoraka radi se cross-check, na osnovu kojih se provode 4 korekcije dobivenih vrijednosti. Te nove, korigirane vrijednosti unose se u računalni program

Excel, a zatim se podaci konvertiraju u statistički program ARLEQUIN ver 1.1 i statistički obrade.

Izračunati su sljedeći parametri: broj haplotipova (H), postotak specifičnih haplotipova (Ph), efektivni broj haplotipova (Ne), haplotipska raznolikost (Hexp), unutarpopulacijska haplotipska raznolikost (Sw), haploding test (HRI), srednja haplotipska diferencijacija

parova (Xij), genetička distanca metodom parova, genetička distanca linearom metodom parova, potpuna haplotipska distanca metodom parova, potpuna haplotipska distanca linearom metodom parova, komponentna analiza za ukupnu raznolikost, PCA analiza na temelju parova.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA – Research results and discussion

3.1. Genetička varijabilnost haplotipova – Genetic haplotypic variation

Uz pomoć triju kloroplastnih mikrosatelita (cpSSR), Pt 30141, Pt 30249 i Pt 71936, analiziran je polimorfizam u osam populacija iz Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Nakon uspješno urađenog sekvencioniranja amplificiranih uzoraka iz osam populacija i statističke obrade podataka, kao rezultat mikrosatelitske analize dobiveno je 116 različitih haplotipova. U tablica 6 dano je samo prvih 20 haplotipova, a njihov zemljopisni raspored prikazan je na karti broj 2, gdje svaka boja označava drugi haplotip, a frekvencije haplotipova prema učeštu boje na karti.

Za lokus Pt 30141 ustanovljene su četiri varijante, za lokus Pt 30249 osamnaest, a za lokus Pt 71936 četrnaest varijanti. U svom radu Vendramin i sur. (1999) za istraživane populacije, među kojima su bile i tri iz Hrvatske, ustanovili su osam varijanti, a u ovom ih radu ima četrnaest (tablica 8). Iz toga je vidljivo da u istraživanim populacijama postoji velika polimorfnost, što su ustanovili i Ziegenhagen i sur. (1995), odnosno velika genetička raznolikost, čak i u malim, izoliranim populacijama koje su se istraživale u ovom radu.

Tablica 17. Prvih 20 haplotipova s markernim veličinama (bp) nađenih u istraživanim populacijama obične jеле

Haplotip	cpSSR lokus			Broj haplotipova
	Pt 30141	Pt 30249	Pt 71936	
H01	100	147	150	7
H02	100	140	150	5
H03	100	147	152	5
H04	100	144	151	4
H05	99	142	151	4
H06	100	153	150	4
H07	99	147	157	4
H08	100	146	152	3
H09	100	143	150	3
H10	100	147	149	3
H11	100	138	155	3
H12	100	148	155	3
H13	100	145	152	3
H14	100	147	155	3
H15	100	142	150	2
H16	100	138	152	2
H17	100	151	151	2
H18	100	147	153	2
H19	100	136	152	2
H20	99	141	153	2

Broj haplotipova (H) varirao je od populacije do populacije. Najveći broj haplotipova registriran je u populaciji Vranice i Gorski kotar J, po 21 haplotip (tablica 7), što se i očekivalo, s obzirom na to da su to dvije velike populacije s velikim protokom gena. Najmanje je haplotipova registrirano u populaciji Biokova, samo 16 različitih haplotipova. Glede činjenice da je to

mala, izolirana populacija, to se i očekivalo. Srednji je broj haplotipova za populacije 18,44, uz standardnu devijaciju od 1,8480. Rezultate koje su dobili Vendramin i sur. (1999) za tri populacije iz Hrvatske (Delnice, Našice i Požega) pokazuju da se broj haplotipova kreće od 5 do 34, s tim što je broj analiziranih uzoraka u populacijama različit. Za nas je zanimljiva

populacija Delnica koja je bila zastupljena sa 95 uzoraka i dala je 34 haplotipa. Naš uzorak iz populacije Gorskog kotara A ima 17 haplotipova, a iz populacije Gorskog kotara J 21 haplotip, što je ipak usporedivo s obzirom na broj analiziranih uzoraka. Parducci i Schmidt (1999) dobili su samo 5 haplotipova uz korištenje deset primera.

U ovom istraživanju postotak specifičnih haplotipova iznosio je od 12,50 % u populaciji Biokova do 61,90 % u populaciji Vranice. Srednji postotak specifičnih haplotipova iznosio je 43,81 %, sa standardnom

devijacijom 3,55 (tablica 7). Za populaciju Delnica u radu Vendramina i sur. (1999) postotak specifičnih haplotipova iznosio je oko 42 %, a u ovom istraživanju populacije Gorskog kotara A i Gorskog kotara J imaju veličine 23,50 % i 57,14 %.

U istraživanju Echta i sur. (1998) za *Pinus resinosa* postotak specifičnih haplotipova iznosio je 60,8 %, a u radu Vendramina i sur. (1998) na *Pinus piraster* 73,5 %. Bucci i sur. (1998) u istraživanju na *Pinus halepensis* dobili su 88,8 % specifičnih haplotipova.

Tablica 7. Populacije analizirane u istraživanju i dobiveni rezultati

Populacija	Broj analiziranih stabala (N)	Broj haplotipova (H)	Specifični haplotipovi (Ph)	Efektivni broj haplotipova (Ne)	Haplotipska raznolikost (Hexp)	Unutarpopulacijska varijabilnost (Sw)
Meka brda	24	18	8	13,71	0,96	3,58
Vranica	24	21	13	19,20	0,98	7,25
Gorski kotar A	21	17	4	12,60	0,96	4,82
Biokovo	18	16	2	14,72	0,98	6,38
Gorski kotar J	22	21	12	20,16	0,99	9,40
Crni vrh	24	17	9	12,52	0,96	7,43
Orjen	24	20	10	16,94	0,98	8,36
Čabulja	24	17	5	13,09	0,96	8,39
sr. vrijednost	22,81	18,44	8,08	15,38	0,97	6,98
Varijanca	1,92	1,84	3,55	2,85	0,0127	1,84

Iz toga je vidljivo da obična jela u istraživanjima s ovom grupom cpSSR markera nema velik udio specifičnih haplotipova. Inače, velik udio specifičnih haplo-

tipova iskorišteno je kod hrastova (Slade, 2001) i za određivanje migracija hrasta i drugih listača poslije ledenog doba.

Tablica 19. Dosad objavljeni radovi i rezultati analize cpSSR lokusa u populacijama različitih vrsta porodice Pinaceae

Vrsta	Autor	Broj analiziranih populacija	Broj analiziranih cpSSR lokusa	Broj varijanti	Broj haplotipova
<i>Pinus halepensis</i>	Morgante i sur. (1997)	10	12	28	37
<i>Pinus leucodermis</i>	Vendramin i sur. (1999)	7	10	29	48
<i>Pinus brutia</i>	Bucci i sur. (1998)	8	9	28	40
<i>Pinus sylvestris</i>	Provan i sur. (1998)	7	17	-	174
<i>Pinus pinaster</i>	Vendramin i sur. (1998)	10	9	24	34
<i>Pinus retinosa</i>	Echt i sur. (1998)	7	9	25	23
<i>Picea abies</i>	Vendramin i sur. (2000)	97	3	21	47
<i>Abies alba</i>	Vendramin i sur. (1999)	17	2	26	90
<i>Abies alba</i>	U ovom istraživanju	8	3	36	116

Najmanji efektivni broj haplotipova pokazuje populacija Crnog vrha, sa 12,52, i populacija Gorskog kotara A, s veličinom 12,60. Budući da je posrijedi jedna velika i jedna mala populacija, mali efektivni broj haplotipova mogao bi se objasniti na sljedeći način: Crni vrh je mala i izolirana populacija, a populacija Gorskog kotara A velika je ali ograničena samo na stara stabla u procesu sušenja i dugo je godina bila pod

velikim selekcijskim pritiskom, pa bi se i ona mogla uvjetno uzeti kao malena. Inače, populacija Gorskog kotara A već niz godina izložena je i neprestanoj selekciji koju uzrokuje čovjek određenim načinima gospodarenja, pa joj je i na taj način poremećena struktura, s obzirom na to da populacija Gorski kotar J pokazuje najveću vrijednost od 20,16 za ovo svojstvo, ali je ona predstavljena velikom populacijom mladih i vitalnih

biljaka. Slijedi populacija Vranice sa 19,20, što se i očekivalo, jer je to vrlo vitalna i velika populacija. Srednji efektivni broj haplotipova za to svojstvo iznosi 15,38, sa standardnom devijacijom od 2,85 (tablica 7).

U svim istraživanim populacijama dobivene su visoke vrijednosti haplotipske raznolikosti. Vrijednosti iznose od 0,96 u populacije Crnog vrha do 0,99 u populacije Gorskega kotara J. Srednja vrijednost za haplotipsku raznolikost istraživanih populacija iznosi 0,97 (tablica 7).

Uspoređujući te rezultate sa rezultatom Vendramina i sur. (1999) primjećuje se da populacija iz Delnice ima visoku haplotipsku raznolikost, s vrijednostima 0,96. Populacija Požege ima vrijednost 0,95, a populacija Našica ima relativno nižu vrijednost, 0,76.

Dobiveni rezultati u oba istraživanja upućuju na veliku raznolikost i bogatstvo haplotipova u istraživanim populacijama. Prema istraživanju Vendramina i sur., populacija Pireneja (Španjolska) ima vrijednost samo 0,47, a populacija planine Palatian u Njemačkoj ima vrijednost 0,66.

Svojstvo unutarpopulacijske varijabilnosti s alelnim vrijednostima (S_w) u ovom istraživanju najviše pokazuje populacija Gorskega kotara J sa 9,40, a najmanju pokazuje populacija Mekih brda sa 3,58. Srednja je vrijednost za sve populacije 6,98, sa standardnom devijacijom 1,84. Iz toga je vidljivo da populacije Gorskega kotara J, Orjena, Čabulje, Vranice i Crnog vrha pokazuju visoku razinu unutarpopulacijske varijabilnosti (tablica 7), a populacije Mekih brda, Gorskega kotara A i Biokova pokazuju manje vrijednosti unutarpopulacijske varijabilnosti.

Za populaciju Biokova taj se rezultat očekivao s obzirom na njezinu veličinu i vjerojatno veću prisustnost inbridinge. Za populaciju Mekih brda ne bismo mogli donijeti valjan zaključak, osim da je, možda, na rezultat

utjecao izbor uzoraka za analizu. U populacije Gorskega kotara A na rezultat vjerojatno utječe neprestana selekcija, odnosno sve manji broj adultnih stabala koja čine tu populaciju.

Srednja vrijednost unutarpopulacijske varijabilnosti iznosi 6,98, sa standardnom vrijednošću 1,84, a za smreku su (Vendramin i sur. 2000) dobili dosta niže vrijednosti unutarpopulacijske varijabilnosti, tako da je srednja vrijednost iznosila 0,635, sa standardnom devijacijom 0,093, a razlog je to što nisu primjenili multimodalni pristup u analizi. U istraživanjima provedenima na *Pinus halepensis* (Bucci i sur., 1998) također su dobivene niže vrijednosti nego u ovom istraživanju, s vrijednošću 0,484.

Haperdingov test (indeks) daje visoke vrijednosti multimodalnih raspodjela nađenih klasa u populacijama koje su u razvoju. Dobivene su prilično niske vrijednosti testa, što pokazuje da populacije nisu stabilne i da nisu u ekspanziji. Prema dobivenim rezultatima najstabilnija je populacija Mekih brda, a najnestabilnija je populacija Čabulje.

Usporedimo li rezultate ovog istraživanja s rezultatima koje su Vendramin i sur. (2000) dobili za smreku, sa srednjom vrijednosti 0,275 i sa standardnom devijacijom 0,004, vidimo da su u ovom istraživanju dobivene vrlo male vrijednosti.

Najveća haplotipska diferencijacija između individua unutarpopulacije (X_{ij}), prisutna je u populaciji Gorskega kotara J, s vrijednošću diferenciranja među jedinkama populacije 9,19, što se i očekivalo s obzirom na broj prisutnih haplotipova i na broj efektivnih haplotipova. Najmanja diferencijacija registrirana je u populaciji Mekih brda, s vrijednošću diferencijacije 5,43.

Vrijednost srednje diferencijacije za istraživane populacije iznosi 7,29, uz standardnu devijaciju 1,0029.

3.2. Međupopulacijska varijabilnost – Between population variability

Međupopulacijska odstupanja dobivena metodom parova (FST/GST), najveća su između populacija Mekih brda i Gorskega kotara A, a potom Mekih brda i Crnog vrha, te između populacija Crnog vrha i Gorskega kotara A. Razlog je to što je populacija Mekih brda najudaljenija od populacije Gorskega kotara A, a uz to je populacija Gorskega kotara A bila pod velikim selecijskim utjecajem čovjeka zbog načina gospodarenja, a u posljednje vrijeme zbog propadanja kao posljedice utjecaja zagadivača.

Razlike između populacije Crnog vrha i Gorskega kotara A, odnosno Crnog vrha i Mekih brda vjerojatno su posljedica veličine i izoliranosti pripanonske populacije Crnog vrha, a koja je izrazito mala i vjerojatno

opterećena genetičkim driftom, za razliku od druge dvije koje pripadaju velikoj populaciji i u kojima je neometan protok gena između susjednih populacija.

Najmanja su odstupanja između populacija Vranice i Gorskega kotara J. S obzirom na to da obje pripadaju u velikim populacijama sa slobodnim protokom gena, moglo se i očekivati da će odstupanja biti relativno mala.

Međupopulacijska odstupanja ustanovljena linearnom metodom parova najveća su između populacija Crnog vrha i Mekih brda, a slijedi Gorski kotar A i Mekih brda, zatim Gorski kotar A i Crni vrh. Najmanja su odstupanja između populacija Gorskega kotara J i Vranice (tablica 21).

Obje prikazane metode daju sukladne rezultate, odnosno da su najveća odstupanja između populacija Mekih brda i Crnog vrha, te Mekih brda i Gorskog kotara A.

Cjelokupna haplotipska (Rts) odstupanja dobivena metodom parova, najveća su između populacije Gorskog kotara A i Mekih brda, s veličinom od 0,4829 ili 48,29 %, a slijede populacije Gorskog kotara J i Mekih brda sa 0,4015 ili 40,15 %. To nam pokazuje da se razlike između analiziranih populacija mogu pripisati razlikama u haplotipovima u 48,29 % i 40,15 % slučajeva, a ostalo se pripisuje drugim čimbenicima. Najmanju razliku pokazuju populacije Crnog vrha i Orjena sa 0,0004 ili 0,04 %.

Linearna cjelokupna haplotipska (Rts) odstupanja (-ln (1-Rst)), najveća su odstupanja između populacije Mekih brda i Gorskog kotara A, sa 0,6594 ili 65,94 %, a slijede populacije Mekih brda i Gorskog kotara J, sa 0,5134 ili 51,34 %. To nam pokazuje da se razlike između analiziranih populacija mogu pripisati razlikama u haplotipovima u 65,94 % i 51,34 % slučajeva, a ostalo drugim čimbenicima. Najmanju razliku pokazuju populacije Crnog vrha i Orjena, sa 0,0004 ili 0,04 %.

Za *Pinus halepensis* Bucci i sur. (1998), dobili su odstupanje između populacija od 0,212 i vrijednost haplotipske diferencijacije od 0,308. U istraživanju Echta i sur. (1998) vrijednosti su za crveni bor (*Pinus resinosa*) iznosile od 0,003 do 0,076, što su relativno male vrijednosti.

Kod svih metoda određivanja haplotipskih odstupanja između populacija vidljivo je da su uvjek prisutne najveće vrijednosti odstupanja između populacije Mekih brda i populacija Gorskog kotara. To se i očekivalo

s obzirom na najveću zemljopisnu udaljenost između tih populacija, ali i zbog utjecaja apeninskih populacija obične jеле na područje Gorskog kotara (Konnert i Bergmann 1995).

Analizom molekularne varijance dobivamo ukupnu genetičku raznolikost između populacija bilo pomoću haplotipske raznolikosti (Gst), bilo pomoću distance između populacija (Fst), a za vrijednost haplotipskog odstupanja (Rst) moramo još uključiti raznolikosti između haplotipova.

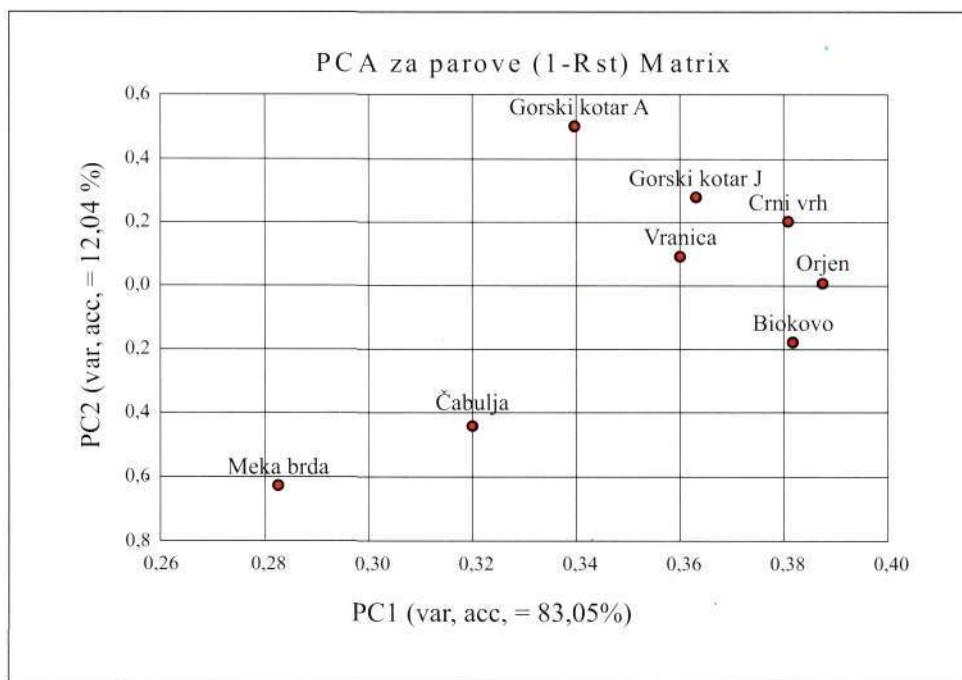
Vrijednost genetičke raznolikosti između istraživanih populacija određena je kao raznolikost putem haplotipskih frekvencija plus raznolikost između haplotipova. Dobivena je veličina (Rst) od 0,2979 ili 29,79 %. To je izrazito velika vrijednost s obzirom na to da vrijednost diferencijacije dobivena uz pomoć haplotipskih frekvencija (Fst) iznosi 0,0196 ili 1,96 %.

Iz toga zaključujemo da je raznolikost u istraživanim populacijama uvjetovana razlikama među haplotipovima u 29,79% slučajeva, a ostalo se pripisuje drugim neobuhvaćenim čimbenicima.

Usporedimo li rezultate s vrijednostima dobivenima u istraživanjima provedenima na crvenom boru (Echt i sur., 1998) koje su iznosile 0,154 (15,4 %) za haplotipsku raznolikost, te Vendramina i sur. (2000) koji su za smreku hijerarhijskom analizom dobili vrijednost od 9,97 %, vidimo da je u našim istraživanim populacijama prisutna veća raznolikost.

Bucci i sur. (1998) u istraživanju na *Pinus halepensis* dobili su vrijednosti Fst = 0,308 i Rst = 0,212.

Veza između haplotipova na plohi PC1 ima vrijednost 83,05 %, a na plohi PC2 vrijednost 12,04 % od to-



Slika 1. PCA

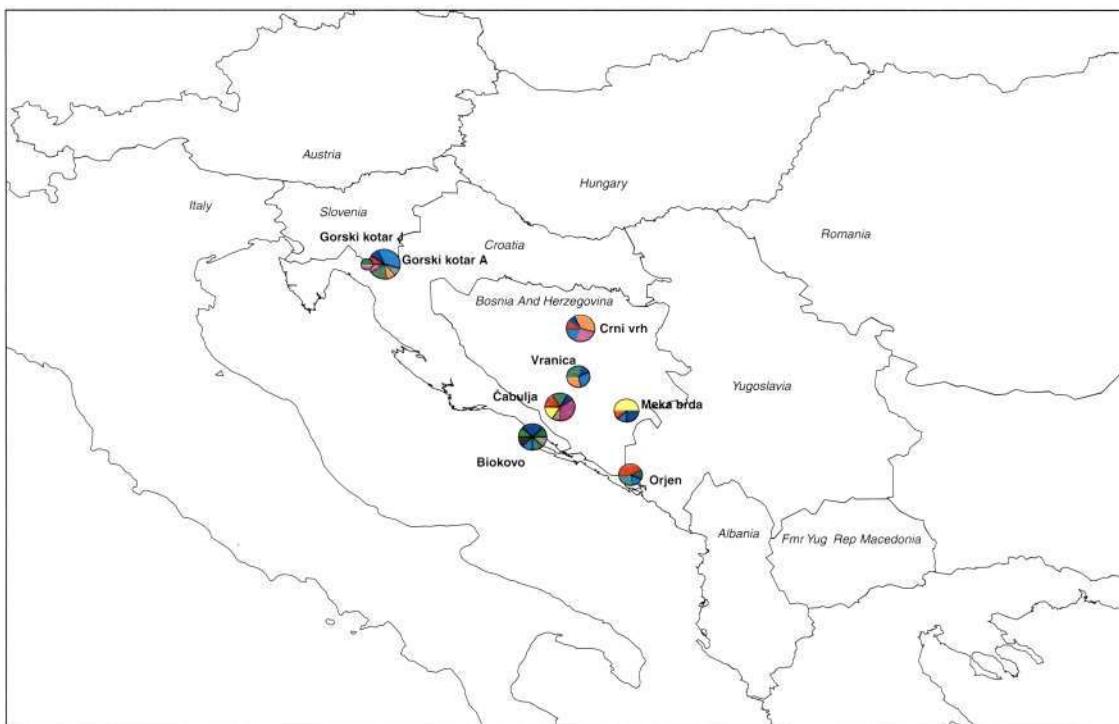
talnog variranja. Grupiranjem populacija dobivenih na temelju PCA (Principal Component Analysis) (slika 1) posebno se razlike uočavaju između populacija Mekih brda i Čabulje s jedne strane, te ostalih populacija s druge strane, tako da u istraživanju imamo dvije skupine gene poola. To upućuje na prisutnu zemljopisnu diferencijaciju između tih populacija.

Diferencijacija je napose jaka prema populacijama Gorskog kotara A, Gorskog kotara J, i Crnog vrha (slika 1). Ostale populacije pokazuju manju diferencijaciju. S obzirom na to da su populacije Mekih brda i Čabulje u vidu neke spone s malim i izoliranim populacijama Orjena i Biokova, te s obzirom da se populacije Čabulje i Biokovo dogledaju, razlike bi, eventualno,

trebalo tražiti u veličini uzorka, jer bi se vjerojatno s povećanjem uzorka smanjile i te razlike. Inače, pri postavljanju ovog zadatka očekivalo se da bi se populacije Orjena i Biokova mogle ponašati kao i populacije Mekih brda i Čabulje.

Promatrajući sliku PCA možemo primijetiti i blagu klinalnu varijabilnost između populacija Orjena i Biokova s jedne strane i Gorskog kotara A, Gorskog kotara J, Vranice i Crnog vrha s druge strane, što odgovara putu seobe poslije ledenog doba od juga prema sjeverozapadu.

U istraživanju na smreki (Vendramin i sur., 2000) PCA je omogućila da se izdiferenciraju četiri važne skupine gene poola.



Karta 2. Raspored od 1 do 20 haplotipa u populacijama obične jеле

LEGENDA: Svaka boja označava jedan haplotip, s tim što veća obojena površina pokazuje i veću frekvenciju tog haplotipa u populaciji

4. ZAKLJUČCI – Conclusions

- Analizom cpDNA istraživala se haplotipska varijabilnost obične jеле, a dobivene su znatne razlike u broju haplotipova između populacija.
- Pomoću analize kloroplastne DNA, točnije broja haplotipova (H), efektivnog broja haplotipova (Ne), haplotipske raznolikosti (Hexp i Sw), vidljivo je da su prisutne razlike između istraživanih populacija, a napose između malih izoliranih i velikih populacija.
- Između adultne i juvenilne populacije Gorskog kotara (A i J) nisu utvrđene velike razlike, tako da se

među tim populacijama praktički ne može govoriti o razlikama, jer su njihova genetička odstupanja vrlo mala. Ipak dobiveni rezultati pokazuju da bi tu trebalo suptilnije prići istraživanjima na molekularnoj razini.

- Radi održavanja genskog resursa trebalo bi uspostaviti što gušću mrežu banki gena *in situ* i *ex situ*, nužnih za održanje genetičke raznolikosti populacija. To znači da bi svaka ekološka niša važna za običnu jelu trebala imati svoju banku gena, s odgovara-

- jućim brojem jedinki, kako bi se očuvala ekološko-fiziološka osobnost populacija.
5. U gospodarenju prirodnim resursima i njihovoj obnovi, prednost uvjek treba dati prirodnoj obnovi, uz stalno praćenje genetičke strukture, kako bi se pravodobno mogle poduzeti mјere za održanje genetičke raznolikosti koja karakterizira svaku populaciju.
 6. Buduća istraživanja treba usmjeriti na ostale populacije obične jele u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini,

te utvrditi optimalan broj jedinki u uzorku. Neprestano treba pratiti gospodarske zahvate na obnovi obične jele te ih usmjeravati na održanje genetičke raznolikosti lokalnih populacija. Uz to trebalo bi provesti čitav niz pokusa s različitim provenijencijama radi istraživanja ekološkofizioloških osobitosti obične jele.

5. LITERATURA – References

- Borojević, K., 1985: Geni i populacija, Novi Sad, str. 545.
- Bucci, G., M. Andzidei, A. Madaghiele, G. G. Vendramin, 1998: Detection of haplotypic variation and natural hybridization in *halepensis*-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. Molecular Ecology, 7: 1633-1643.
- Echt, C. S., L. De Verno, M. Anzidei, G. G. Vendramin, 1998: Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, (*Pinus retinosa* Ait.), Molecular Ecology, 7: 307-316.
- Fineschi, S., D. Taurchini, F. Villani, G. G. Vendramin, 2000: Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (*Fagaceae*) throughout southern European countries, Molecular Ecology, 9: 1495-1503.
- Konnert, M., F. Bergmann, 1995: The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, *Pinaceae*) in relation to a migration history. Plant systematics and Evolution, 196 (1-2): 19-30.
- Liepelt, S., V. Kuhlenkamp, M. Anzidei, G. G. Vendramin, B. Ziegenhagen, 2001: Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. Technical note, Molecular Ecology Notes (2001).
- Morgante, M., N. Felice, G. G. Vendramin, 1997: Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: Karp, A., Issac, P. G. Ingram, D. S. (ed.): Molecular Tools for Screening Biodiversity-Plants and Animals Chapman & Hall, London: 407-412.
- Parducci, L., A. E. Szmidt, 1999: PCR – RFLP analysis of cp DNAs in the genus *Abies*. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 98 (5), 802-808.
- Provan, J., N. Soranzo, N. J. Wilson, 1998: Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats, Proceedings of the Royal Society of London B, 265: 1-9.
- Scotti, I., M. Troggio, N. Soranzo, G. G. Vendramin, G. Bucci, 1998: A new set of PCR-based, locus-specific markers for *Picea abies* (L.) Karst., Molecular Ecology, 7: 783-792.
- Slađe, D., 2001: Distribucija haplotipova hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj, magistrski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 87.
- Slatkin, M., 1994: Cladistic Analysis of DNA Sequence Data from Subdivided Populations. In: Real, A.L. (ed.): Ecological Genetics. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, str. 18-34.
- Ušćuplić, M., 1992: Uticaj sistema gazdovanja na pojavu imele (*Viscum album* L.), Glasnik šumarskog fakulteta u Beogradu, str. 7-18.
- Vendramin, G. G., B. Ziegenhagen, 1997: Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*, Genome, 40: 857-864.
- Vendramin, G. G., M. Anzidei, V. A. Autino, A. Madaghiele, M. Morgante, C. Sperisen, B. Ziegenhagen, S. Scannerini, A. Baker, B. W. Charlwood, C. Damiano, C. Franz, S. Gianinazzi, 1998: Chloroplast microsatellites reveal high levels of genetic diversity in conifers: a new tool for biodiversity analysis in forest ecosystems, Acta Horticulturae, 457: 395-401.
- Vendramin, G. G., B. Degen, R. J. Petit, M. Anzidei, A. Madaghiele, B. Ziegenha-

- gen, 1999: High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe, Molecular – Ecology, 8 (7): 1117-1126.
- Vendramin, G. G., M. Anzidei, A. Madaghie, C. Sperisen, G. Bucci, 2000: Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* Karst.), Genome, 43: 68-78.
- Vukelić, J., D. Baričević, 2001: Šumske zajednice obične jеле u Hrvatskoj, ed. Obična jela u Hrvatskoj, Zagreb, 162-186.
- Ziegenhagen, B., A. Kormut'ák, M. Schauererte, F. Scholz, 1995: Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.), Forest Genetics, 2 (2): 99-107.
- Ziegenhagen, B., M. Schauerete, A. Kormut'ák, F. Scholz, 1996: Plastid DNA polymorphism of megagametophytes and pollen in two *Abies* species, Silvae Genetica, 45 (5-6): 355-358.

SUMMARY: This research was aimed at establishing the molecular-genetic variability of some populations of silver fir in Croatia and Bosnia & Herzegovina (Vranica, Meka Brda, Gorski Kotar – adult, Gorski Kotar – juvenile, Crni Vrh, Čabulja, Orjen). Variability was shown using the analysis of cp DNA, or more accurately, the number of haplotypes (H), effective number of haplotypes (Ne), and haplotype differential (H_{exp} & Sw).

The cp DNA analysis was used to study the haplotype variability of the silver fir. The obtained results show considerable differences among populations.

With the use of chloroplast DNA, the number of haplotypes (H), the effective number of haplotypes (Ne), and the haplotype differential (H_{exp} & Sw), differences were found between the studied populations, and particularly between small, isolated and large populations.

No major differences were established between adult and juvenile populations of Gorski Kotar (A & A). Since their genetic variability is insignificant, there are practically no differences in these populations. However, the results point to the need for a more detailed study at the molecular level.

In order to set up and maintain genetic resources, a dense network of gene databases should be established both in situ and ex situ necessary for the preservation of genetic differences among populations. Accordingly, every ecological niche important for the silver fir should have its own genetic database with a corresponding number of units so that the eco-physiological characteristics of each population could be preserved.

In managing natural resources and their renewal, natural regeneration should always be favoured, combined with constant monitoring of the genetic structure, so that proper measures could be undertaken to ensure the genetic variability that characterises every population.

Future research should be directed at other populations of silver fir in Croatia and Bosnia and Herzegovina. An optimal number of individuals should be established in a sample. Management and regeneration of the silver fir should constantly be monitored and directed towards the maintenance of genetic differences within local populations. Moreover, numerous experiments should be conducted with different provenances in order to investigate eco-physiological properties of the silver fir.