

Prethodno priopćenje
Preliminary notice

Prispjelo - *Received*: 16.12.2004.
Prihvaćeno - *Accepted*: 25.04.2004.

UDK: 630*12.135

Dalibor Ballian¹
Dušan Gömöry²
Roman Longauer³

RAZDIOBA POPULACIJA OBIČNE JELE (*Abies alba* Mill.) POMOĆU MITOHONDRIJALNOM DNK (mtDNK) I NJEZINA PRIMJENA U ŠUMARSTVU

THE DISTRIBUTION OF THE POPULATIONS OF COMMON FIR TREE

SAŽETAK

U ovom radu je prikazana mogućnost razdiobe populacija obične jele u Bosni i Hercegovini, na osnovi rada GÖMÖRYA i sur. (2003). Analizirana je mitohondrijalna DNK (mtDNK) u cilju UTVRĐIVANJA molekularno-genetičke varijabilnosti nekih populacija obične jele u Bosni i Hercegovini te određivanja povezanosti populacija iz Bosne i Hercegovine i Hrvatske, kao i onih iz srednje Europe. Također se željelo odrediti granice dodira i hibridizacije između populacija (haplotipova) podrijetlom iz apeninskog pribježišta te onih iz balkanskog pribježišta obične jele.

Na osnovi rezultata ovoga rada može se na znanstveno priznat način ispitati podrijetlo polaznog šumskog materijala, kao i porijeklo materijala koji služi u reproduktivne svrhe, kod obične jele.

Ključne riječi: obična jela (*Abies alba* Mill.), populacija, varijabilnost, mtDNK

UVOD

INTRODUCTION

Obična jela (*Abies alba* Mill.) jedna je od najznačajnijih vrsta šumskog drveća s gospodarskog i ekološkog stajališta u Bosni i Hercegovini gdje, pridolazi na 562 237 ha (UŠČUPLIĆ 1992) ili u oko 50 % svih visokih šuma.

¹ Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

² Technical University in Zvolen, T.G. Masaryka 24, SK-960 53 Zvolen, Slovakia

³ Forestry research Institute, T.G. Masaryka 22, SK-960 92 Zvolen, Slovakia

U posljednjih 13 000 godina obična jela je bila izložena stalnom dinamičnom kretanju, tj. seobi iz svojih pribježišta na jugu Europe, prema središnjoj, zapadnoj i istočnoj Europi. Te su seobe prouzročene velikim klimatskim promjenama koje su jedan od najvažnijih čimbenika seoba šumskog drveća. Nakon velike glacijacije koja je trajala oko 100 000 godina, a maksimum dosegla prije 15 000 godina, sve populacije šumskog drveća krenule su u širenje (MÄGDEFRAU i EHRENDORFER, 1997, SITTE i sur. 1998). Najbolji prikaz dinamike seoba šumskog drveća dobiven je analizom fosilnog polena te uspješno ukazuje i na smjerove kretanja obične jele u Europi (HUNTLEY I BIRKS 1983).

Te postavke dobivene su na osnovi polen analiza i potvrđene na molekularnoj razini istraživanjima BERGMANNA (1991), te KONNERT I BERGMANNA (1995) koji rade na zemljopisnom raščlanjivanju varijabilnosti obične jele, povezano sa seobom jele poslije zadnjeg ledenog doba. LONGAUER (1994) provodi istraživanje za šire područje istočne Europe, a HÜSSENDORFER (1996) za područje Švicarske. Sva su istraživanja potvrdila ranije rezultate dobivene analizom fosilnog polena. Očekivalo se veliko genetičko razilaženje između istraživanih populacija, posebno onih koje se nalaze blizu starih glacijalnih utočišta obične jele. To je pet utočišta obične jele gdje je ona opstala nakon posljednjeg ledenog doba i selila se na sjever samo iz triju utočišta, odnosno sadašnjem području rasprostiranja.

Svrha analize mitohondrijalne DNK (mtDNK) u istraživanjima GÖMÖRYA i sur. (2003) bilo je utvrđivanje molekularno-genetičke varijabilnosti nekih populacija obične jele u Bosni i Hercegovini te je to prikazano i u ovom radu. Ovim istraživanjem učinjen je pokušaj određivanja povezanosti populacija obične jele iz Bosne i Hercegovine s populacijama iz Hrvatske te onim iz srednje Europe, kao i određivanje granice dodira i hibridizacije između populacija (haplotipova) podrijetlom iz apeninskog pribježišta te onih iz balkanskog pribježišta obične jele.

Pored fundamentalnog značaja ovog istraživanja, ono je također primjenljivo u gospodarenju šumama, a prije svega značajno je za daljnje radove na oplemenjivanju obične jele, odnosno kod kontrole podrijetla sjemena i sadnog materijala bitnog za proces umjetne obnove jelovih šuma (pošumljavanje i sjetva sjemena) te za poslove vezane uz osnivanje banki i arhiva gena metodama *in situ* i *ex situ*.

Mogućnosti kontrole podrijetla sjemena i sadnog materijala mDNK analizom

Possibilities of controlling the origin of seed and planting material by mDNK analysis

Ako se za kontrolu sjemena koristi mtDNK analiza, u prvom redu treba odgovoriti na dva pitanja:

- jesu li se u dva ili više uzoraka prisutni isti haplotipovi, odnosno jesu li prisutni samo oni i
- je li učestalost haplotipova u uzorcima koji se uspoređuju ista

Za šumare je značajno da se na znanstveno priznat način ispita podrijetlo polaznog materijala, kao i porijeklo materijala koji služi u reproduktivne svrhe. To je

vrlo jednostavno kod kontrole klonskog materijala DNK analizama jer sve jedinke istog klona moraju pokazati iste vrpce na florogramu, kako kod ortete tako i kod rameta.

Daleko složenija situacija je kod materijala generativnog podrijetla. Pored već rečenog, ovdje se ne može jednostavno donijeti valjan zaključak jer imamo različit sastav partija sjemena jedne sastojine, probleme s veličinom uzorka, nepotpuno obuhvaćanje svih sastojina pa se stoga mogu utvrditi samo određene neujednačenosti u rezultatima i u tom se slučaju pristupa principima isključivanja kao što je kod analize izoenzimima dao GREGORIUS i sur. (1984).

Uspoređivanjem početnog materijala jedne sastojine, sa sjemenom koje je proizvedeno u istoj sastojini, kao i sadnica proizvedenih iz tog sjemena, konstatira se prisustvo stranih nasljednih svojstava te je to dokaz kako sjeme ne potječe iz dane sastojine. Ako se pak u sastojini javljaju isti haplotipovi, to još ne potvrđuje pripadnost istoj sastojini jer uvijek mogu postojati sastojine s istim haplotipovima, iz kojih potječe sjeme.

Tako, za sada, genetičkim istraživanjima, odnosno mtDNK analizama možemo samo reći kako sjeme ili sadni materijal potječu ili ne potječu iz sastojine.

Rezultati ovih istraživanja mogu dati korisne rezultate u kontroli sjemena i sadnica, identifikaciji klonova u plantažama za proizvodnju sjemena, kao i kod identifikacije već podignutih šumskih nasada za koje ne znamo točno podrijetlo sjemena.

Identifikacija populacija sa šireg područja

Identification of populations from a wider area

Obična jela u Bosni i Hercegovini zastupljena je na relativno velikom prostoru, s čitavim nizom različitih ekološki niša i tipova šuma. Odmah se postavlja pitanje razlikovanja provenijencija jele s tako širokog prostora.

Identifikacija je moguća u ovakvom slučaju ako je genetička varijabilnost u cijelom području rasprostiranja identificirana dovoljno velikim brojem uzoraka te ako su određene zemljopisno uvjetovane florografske slike.

Za običnu jelu iz BiH prvo treba razjasniti razlikuju li se provenijencije jasno i konstantno na najmanje jednom gen lokusu (haplotipu).

Problem može predstavljati mali broj uzoraka koji reprezentiraju populaciju. Od 5 do 24 uzorka relativno je mala vjerojatnost kako će biti obuhvaćeni svi haplotipovi u populaciji te ako se obuhvate to je samo slučajnost. Ispitivanja su obavljena na iglicama i dormantnim pupovima. To znači kako možemo procijeniti genetičku strukturu sljedeće generacije ne samo sjemenom nego i sadnim materijalom.

Promotrimo li mtDNK kod obične jele, imamo jako mali broj haplotipova, samo dva (LIEPELTI sur. 2002). Dobiveni haplotipovi pokazuju granicu hibridizacije između obične jele podrijetlom s Apeninskog pribježišta i one s Balkanskog poluotoka.

Na osnovi pokazanog moguće je primijeniti metodu isključivanja, odrediti porijeklo sjemena uz korištenje mtDNK metoda i obaviti diferenciranje na osnovi učešća određenog haplotipa.

Dobiveni rezultati samo su početna stanica u radu na identifikaciji naših provenijencija na širem prostoru, ali ipak dobiveni rezultati mogu pomoći u prvim radovima na identificiranju naših populacija.

MATERIJAL I METODA RADA

MATERIAL AND WORK METHOD

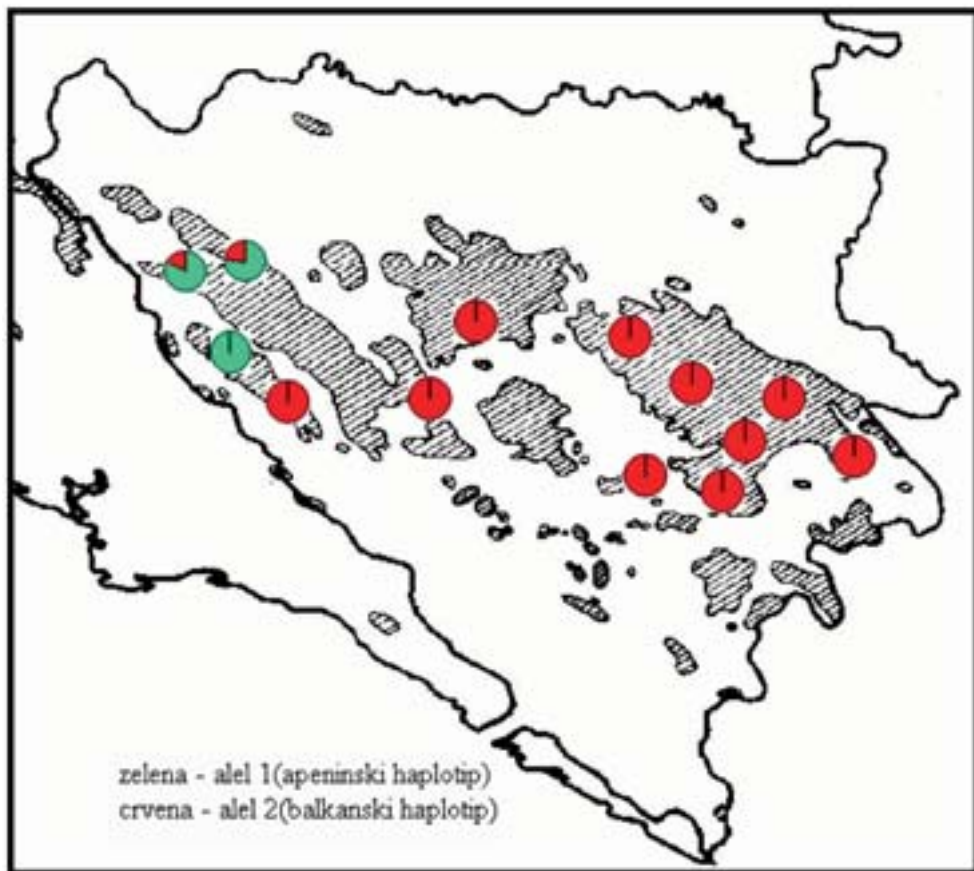
Uzorci su sakupljeni iz 13 populacija obične jele u Bosni i Hercegovini (Tablica 1. i Slika 1.). U svakoj je populaciji sakupljano po 10-15 uzoraka, sa stabala prosječno starih oko 80 godina. Za analizu su korištene u sika gelu osušene dvogodišnje iglice jele.

Izolacija ukupne DNK obavljena je iz 5-8 iglica, uz korištenje modificiranog CTAB protokola prema DUMOLINU i sur. (1995), a uspješnost izolacije DNK mjerena je spektrometrom.

Procjena mtDNK varijabilnosti obavljena je metodologijom koju su dali LIEPELT i sur. (2002), uz manje modifikacije. Lokacija PCR amplifikat fragmenata je na četiri introna mitohondrijalne NAD dehydrogenase subunit 5 gene (*nad5-4*). Za lančanu reakciju polimerazoma pripremljen je reakcijski volumen prema LIEPELT i sur. (2002), a analiza je obavljena na 1,2% agarom gelu, u trajanju od 2 sata i 4,5 V/cm.

Tablica 1. Istraživane populacije obične jele
Table 1. Investigated populations of common fir tree

| Populacija <i>Population</i> | Lokalitet <i>Locality</i> | Zemljopisna dužina <i>Geographic longitude</i> | Zemljopisna širina <i>Geographic latitude</i> |
|---------------------------------|------------------------------|---|--|
| Glamoč | Busije | 16° 50' | 44° 01' |
| Sarajevo | Igman | 18° 16' | 43° 47' |
| Olovo | Klisa | 18° 44' | 44° 10' |
| Bosan. Grahovo | Tičevo | 16° 24' | 44° 12' |
| Zavidovići | Kamenica | 18° 09' | 44° 22' |
| Rogatica | Sjemeč | 19° 10' | 43° 49' |
| Podromanija | Romanija | 18° 42' | 43° 56' |
| Bosan. Petrovac | Oštrelj | 16° 24' | 44° 28' |
| Pale | Jahorina | 18° 36' | 43° 44' |
| Travnik | Vlašić | 17° 41' | 44° 20' |
| Donji Vakuf | Prusačka rijeka | 17° 17' | 44° 04' |
| Ključ | Grmeč (Mijačica) | 16° 39' | 44° 35' |
| Očevlje | Zvijezda | 18° 28' | 44° 13' |



Slika 1. Rasprostranjenje obične jele (*Abies alba* Mill.) u Bosni i Hercegovini s rasporedom mitohondrijalnih haplotipova (GÖMÖRY i sur. 2003)

Figure 1. The distribution of common fir tree (*Abies alba* Mill.) in Bosnia and Herzegovina and the division of the mitochondrial haploid types (Gömörya et. al., 2003)

REZULTATI I DISKUSIJA

RESULTS AND DISCUSSION

Istraživanjem su identificirane dvije varijante (haplotipa) kao i kod istraživanja koja su obavili LIEPELT sur. (2002). Tako imamo alel 1. ili dugu distancu na gelu (zeleni) koji je karakterističan za središnju Europu i Apenine, te alel 2. ili kratku distancu na gelu (crveni) koji je karakterističan za Balkansko pribježište.

Po pitanju jele na zapadnom Balkanu, HORVAT–MAROLT i KRAMER (1982) pretpostavljaju kako je ona stigla migracijom duž Dinarida iz južne Makedonije. KRAL (1980) pretpostavlja kako je jela iz područja Gorskog kotara, Dalmacije i Slavonije podrijetlom sa Apeninskog glacijalnog pribježišta. M. KONNERT i BERGMANN (1995) ukazuju na hibridnu zonu u Gorskom kotaru, ali

je u svom istraživanju nisu uspjeli definirati. Sve ovo dovelo je u pitanje bilo koje poslove vezane uz očuvanje genetičkih izvora metodama *in siti* i *ex situ*.

Za Bosnu i Hercegovinu možemo reći kako prevladava alel 2 (Slika 1.) koji karakterizira Balkansko pribježište, osim područja zapadne Bosne gdje se javljaju zone hibridizacije između apeninskog i balkanskog haplotipa, odnosno područja gdje se javlja sam apeninski haplotip. Interesantan je primjer u Zapadnoj Bosni gdje planina Šator koja se nalazi u jednom kompaktnom području rasprostiranja obične jele, dijeli to područje te tu imamo dva različita haplotipa; jedan u sjeverozapadnom dijelu (alel 1) i drugi u jugoistočnom (alel 2). Na području planina Grmeč i Oštrej imamo hibridne populacije.

Dakle, u Bosni imamo daleko jednostavniju situaciju nego što je to slučaj s Hrvatskom gdje je situacija poprilično kompleksna, posebice u zoni Gorskog kotara. Stvar komplicira spoznaja kako balkanski haplotip pridolazi u populacijama duž zone Jadranskog mora, prolazi kroz jugozapadnu zonu Gorskog kotara gdje stvara hibridne zone i kao takav dostiže do južnog Tirola (LIEPELT i sur. 2002). Sličan rezultat povezanosti populacija Gorskog kotara s južnim populacijama (Orijen) dobili su i BALLIAN (2002 i 2003) te BALLIAN i KAJBA u svojim istraživanjima, a posebice za populaciju Fužine. Ovakva situacija za naše područje ne bi se mogla vezati uz uvjete reljefa ili slične prepreke, već prije svega odgovor treba tražiti u pravcima i učestalosti vjetrova u zoni rasprostiranja obične jele u Bosni i Hercegovini, a posebice u Hrvatskoj glede složene situacije u Gorskom kotaru.

Dobiveni rezultati za Bosnu i Hercegovinu vrlo su jednostavni za praktičnu primjenu jer iz Slike 1. vidimo kako ne bismo trebali prenositi sjeme iz zapadne Bosne u istočnu, nego samo u zoni javljanja određenog haplotipa. U Hrvatskoj je situacija komplicirana te glede rajonizacije gdje je Gorski kotar izdvojen kao sjemenska jedinica-rajon (GRAČAN i sur. 1999), a situacija pokazuje kako bi se rajone trebalo raščlaniti na manje jedinice koje odgovaraju pojedinim provenijencijama te sjeme koristiti samo na tim lokalnim područjima, a što je vidljivo iz rada LIEPELT i sur. (2002).

ZAKLJUČCI

CONCLUSIONS

Dosadašnji rezultati korištenja mtDNK metoda pokazuju kako su naše trenutačne mogućnosti potvrde podrijetla sjemena obične jele vrlo male, a kod drugih vrsta šumskog drveća još se nije počelo ni raditi na ovom planu. Ponuđeni sustav identifikacije na širem području, pomoću ove haplotipske metode mogao bi se u budućnosti pokazati prihvatljivim jer su početna istraživanja pokazala dobre rezultate. Trebalo bi nastaviti s istraživanjima u cilju stvaranja čitave mreže istraženih populacija u BiH, što je dugotrajan i skup posao.

Rezultati dobiveni analizom mtDNK mogu pomoći u formiranju sjemenskih zona, ali zbog jakog selekcijskog pritiska neplanskim sječama i introdukcijom biljnog materijala nepoznatog podrijetla, treba naći dovoljan broj autohtonih jedin-

ki, odnosno populacija, istraživane vrste, kao i nove pogodne markere za njihovu karakterizaciju.

LITERATURA

REFERENCES

- BALLIAN, D., 2002: Procjena genetičke varijabilnosti obične jele (*Abies alba* Mill.) analizom cpDNA i izoenzima u dijelu prirodnih populacija Bosne i Hercegovine i Hrvatske. Doktorska disertacija, str. 152 Zagreb.
- BALLIAN, D., 2003: Procjena genetičke varijabilnosti obične jele (*Abies alba* Mill.) analizom izoenzima u dijelu prirodnih populacija Bosne i Hercegovine i Hrvatske. Šum. list br. 3-4, 135-151, Zagreb.
- BALLIAN, D., D., KAJBA, 2003: Estimation of the isoenzyme genetic variability of the silver fir (*Abies alba* Mill.) from the area of Gorski kotar (Croatia). 8. Hrvatski biološki kongres, (u tisku).
- BERGMANN, F., 1991b: Causes and Consequences of Species Specific Genetic Variation Patterns in European Forest Trees Species: Examples with Norway Spruce and Silver Fir. In: Müller-Starck, G., Ziehe, M. (ed.): Genetic Variation in European Population of Forest Trees. J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt, 67-78.
- DUMOLIN, S., B., DEMESURE, R.J., PETIT, 1995: Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91(8): 1253–1256
- DUMOLIN-LAPEGUE, S., M.H., PEMONGE, R.J., PETIT, 1998: Association Between Chloroplast and Mitochondrial Lineages in Oaks. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10):1321-1331.
- GÖMÖRY, D., D., LONGAUER, R., LIEPELT, S., BALLIAN, D., BRUS, R., KRAIGHER, H., PARPAN, I.V., PARPAN, T.V., PAULE, L., STUPAR, V.I., BIRGIT ZIEGENHAGEN, 2004: Variation patterns of mitochondrial DNA of *Abies alba* Mill. in structure zone of postglacial migration in Europe. (u tisku)
- GRAČAN, J., A., KRSTINIĆ, S., MATIĆ, Đ., RAUŠ, Z., SELETKOVIĆ, 1999: Šumski sjemenski rajoni (jedinice) u Hrvatskoj, Rad. Šumar. inst., 34 (1): 55-93, Jastrebarsko.
- GREGORIUS. H.R., H.H., HATTEMER, F., BERGMANN, 1984: Über Erreichtes und kaum Erreichbares bei der "Identifikation" forstlichen Vermehrungsguts; Bericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Georg-August-Universität Göttingen.
- Horvat-Marolt, S., W., Kramer, 1982: Die Weisstanne (*Abies alba* Mill.) In Jugoslawien. *Forstarchiv* 53: 172–180.
- Huntley, B., H.J.B., Birks, 1983: An atlas of past and present pollen maps for Europe 0-13000 years ago, Cambridge University Press, Cambridge, 73-90.
- HUSENDÖRFER, E., 1996: Untersuchungen über die genetische Variation der Weißtanne (*Abies alba* Mill.) unter dem Aspekt der in situ Erhaltung genetischer Ressourcen in der Schweiz. Disertacija, Zurich, ETH.
- KRAL, F., 1980: Walgeschichtliche Grundlagen für die Ausscheidung von Ökotypen bei *Abies alba*. In: Mayer, H. (ed.): 3. Tannensymposium. Österreichischer Agrarverlag, Wien, p. 158–168.
- LIEPELT, S., R., BIALOZYT, B., ZIEGENHAGEN, 2002: Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22): 14590–14594.
- LONGAUER, R., 1994: Genetic differentiation and diversity of European silver fir in Eastern part of its natural range. Published 7-IUFRO Tannensymposiums, Baden – Württemberg.

- MÄGDEFRAU, K., F., EHRENDORFER, 1997: Botanika, sistematika, evolucija i geobotanika. Školska knjiga, str. 443, Zagreb.
- SITTE, P., H., ZIEGLER, F., EHRENDORFER, A., BRESINSKY, 1998: Strasburger Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-Lubeck-Ulm. str. 1007.
- UŠĆUPLIĆ, M., 1992: Uticaj sistema gazdovanja na pojavu imele (*Viscum album* L.), Glasnik šumarskog fakulteta u Beogradu, 7-18.

THE DISTRIBUTION OF THE POPULATIONS OF COMMON FIR TREE (*Abies alba* Mill.) BY MITOCHONDRIAL DNA (*mtDNK*) AND ITS APPLICATION IN FORESTRY

Summary

The aim of the analysis of mitochondrial DNA (*mtDNK*) in an investigations carried out by Gömöry et al. (2003) was to determine the molecular and genetic variability of some populations of common fir tree in Bosnia and Herzegovina. This investigation was an attempt to determine the correlation of populations from Bosnia and Herzegovina and Croatia, as well as those from Middle Europe, and to define the tangential borders and hybridization between the populations (haploid types) of common fir tree, originating from Apennine and the Balkan habitats.

Apart from the fundamental significance of this investigation, it is also important for further practical work on engrafting of the common fir tree, primarily in the control of seed and seedlings over a broader area. It is also significant for the process of artificial renovation of fir tree woods (foresteing and planting of seeds), as well as for setting up banks and archives of genes by *in situ* and *ex situ* methods.

To date the results of *mtDNK* methods show that the current possibilities of determining the origin of fir tree seed are modest, and in other types of forest trees no similar investigations have been started. Based on the results of the investigation the system of identification by the haploid type method could in the future prove acceptable. Further investigations are necessary with the aim of creating a whole network of investigated populations in Bosnia and Herzegovina, which is a lengthy and expensive procedure.

The obtained results with the application of *mtDNK* method can help in the formation of seed zones. However, due to strong selection pressure of unplanned logging, and introduction of herbal material of unknown origin, it is necessary to find a sufficient number of autochthonous entities, i. e. populations of the investigated sort, as well as new suitable markers for their characterization.

Key words: common fir, (*Abies alba* Mill.), population, variability, *mtDNK*