

GENETIČKA VARIJABILNOST OBIČNE TISE (*Taxus baccata* L.) U BOSNI I HERCEGOVINI

GENETIC VARIABILITY OF COMMON YEW (*Taxus baccata* L.) IN BOSNIA AND HERZEGOVINA

Dalibor BALLIAN¹, Beatrix GIERSBERG², Ute TRÖBER²

SAŽETAK: Priznatim biokemijskim biljezima, analizirana je molekularno genetička struktura dijela prirodnih populacija obične tise (*Taxus baccata* L.) u Bosni i Hercegovini.

Za analizu smo uporabili materijal iz šest (6) populacija obične tise. Genetičku varijabilnost analizirali smo uporabom šest (6) enzimskih sustava. Uspješno je analiziramo šest (6) genskih lokusa koji su pokazali odgovarajući stupanj polimorfizma. Analizom je obuhvaćeno ukupno 16 alela.

Prosječan broj alela po lokusu kretao se od 1,83 do 2,33. Utvrđeno je i postojanje velike varijabilnosti unutar populacija, koja je pokazala diskontinuirani karakter. Potencijalna genotipska raznolikost kretala se od 162 do 1944, a broj potencijalnih polimorfni genskih lokusa kretao se od 66,6 % do 83,3 %. Gen pool raznolikost se kretala od 1,208 do 1,564, a prosječna stvarna heterozigotnost od 0,185 do 0,490, a ukupna prosječna stvarna heterozigotnost za sve populacije 0,281.

Dobiveni rezultati omogućit će propisivanje i provođenje odgovarajućih mjera na zaštiti i konzervaciji autohtonog genofonda tise u Bosni i Hercegovini.

ključne riječi: obična tisa, *Taxus baccata* L., izoenzimi, varijabilnost

UVOD – Introduction

Obična tisa (*Taxus baccata* L.) predstavlja tercijarni relikv, te vrlo rijetku i ugroženu vrstu Bosanskohercegovačke flore. Prema provedenim istraživanjima, procijenjeno je da se obična tisa u Europi pojavljuje od prije 150 milijuna godina (Scheeder 1994) i pripada grupi najstarijim četinjača. Nekada se rasprostirala od južne Europe do Danske i Estonije na sjever, Karpata i Zakarpatskih ravnica na sjeveroistoku, Kavkaza, malog Kavkaza u Turskoj i Mazandaranskog gorja u Iranu na istoku, te Maroka, Španjolske, Britanskih i Irskih otoka na zapadu, gdje je nalazimo u malim populacijama ili kao pojedinačna stabla (Korpel 1981; Paule i sur 1993).

U Bosni i Hercegovini raste u malim izoliranim populacijama, grupama ili kao pojedinačna stabla i grmovi. Razlog njezinom nestanku je visoka uporabna vrijednost drva, što se odrazilo kroz jaki antropogeni utjecaj tijekom povijesti, o čemu svjedoče brojni arheološki nalazi. Tako je vremenom dovedena na sami rub nestanka, a u mnogim područjima je već u potpunosti nestala. O njoj i njezinom postojanju još svjedoče određeni zemljopisni toponimi, da je nekad i tu rasla. Najčešći od toponima su Tisovica, Tisovac, Tisov do i sl.

Ovakva situacija s tisom nije samo kod nas, nego i širom Mediterana i Europe, gdje su većinom preostale male izolirane populacije (Scheeder 1994). Vrlo često su u pitanju samo pojedinačni stari primjerci obične tise velikih dimenzija.

Trenutno u prirodi običnu tisu nalazimo na teško dostupnim i zabačenim mjestima, gdje je bila nedostupna ili teško dostupna utjecaju čovjeka, ili je taj utjecaj bio neznatan.

¹ Prof. dr. Dalibor Ballian, balliand@bih.net.ba
Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71000 Sarajevo,
Bosna i Hercegovina

² Beatrix Giersberg, dr. sc. Ute Tröber
Zentrum für forstliches Vermehrungsgut, RFF, Saatsbetrieb
Sachsenforst, Bonnewitzer Straße 34, 01796 Pirna, Deutschland

Zbog male brojnosti u prirodnim nalazištima Bosne i Hercegovine zaštićena je zakonom još davne 1964. godine, a u mnogim zemljama Europe, je od 1997. godine uvrštena na crvenu listu zaštićenih vrsta (*IUCN Red List of Threatened Plants*).

Pojedini primjerci obične tise prisutni su u parkovima, kao i u dendrološkim zbirkama botaničkih vrtova. Kako je vrlo atraktivna i cijenjena kao ukrasna raslinje, prisutna je u brojnim vrtovima, kao i velikim europskim parkovima već stotinama godina.

Obična tisa je dvodomna biljka, koja se razmnožava sjemenom i reznicama, a ima ponekad i vrlo dobru izbojnu snagu iz panja, puno bolju iz položenih grana. Ipak, način njezinog generativnog razmnožavanja koje prati jako dormantno sjeme, otežava joj širenje u prirodi. Također i jako spori rast dodatno je pospješio njezin nestanku.

U području Dinarskih planina koje je vrlo specifično, s velikim brojem vrsta šumskog drveća i grmlja koje nalazimo na tom području, karakteristična je i obična tisa, koja se javlja u svim klimatskim zonama. Ona je bila stalni stanovnik šuma u tom području, i imala je svoje specifično mjesto u šumskim zajednicama, od sub-mediteranskog područja s izravnim utjecajem mediteranske klime, središnjih Dinarskih planina s izmiješano kontinentalnom klimom, do tipičnog Panonskog

područja s kontinentalnom klimom (Ballian, 2005), o čemu svjedoče i brojni fosilni ostaci peluda (Beug, 1961; Brande, 1973). Tako danas možemo naći pojedine primjerke u svim tipovima šuma, odnosno u svim klimatskim zonama u Bosni i Hercegovini, od Hercegovine do Posavine. Ipak, običnu tisu najčešće nalazimo u području bukovih šuma, šuma jele i bukve, te na nekim višim planinama u šumama smreke i jele. Obično raste na sjevernim ekspozicijama, odnosno na svježijim zaklonjenim mjestima, i svježim tipovima tala, na nadmorskim visinama od 200 do 1500 m.

Na trenutno rasprostiranje obične tise, u Bosni i Hercegovini, odlučujuću ulogu odigrao je čovjek nekontroliranim sječama tisovih stabala, i to već stotinama, možda i tisućama godina unazad. Razlog tomu je ponajprije u kvalitetnom i vrijednom drvu, koje je tamno smeđe srčike, lakoj mehaničkoj obradi, a proizvodi od njezinog drva imali su svoje mjesto u svakodnevnom životu čovjeka na ovim prostorima. Tu je još i *spiritualna* vrijednost obične tise, jer ju je čovjek koristio u određenim ritualima kao amajliju, koja daje dugovječnost i dobro zdravlje čovjeku i domaćim životinjama. Narodi je kroz povijest smatraju simbolom dugovječnosti i kao takvu su je koristili u određenim spiritualnim ritualima, koji su se u nekim područjima središnje Bosne zadržali do danas (Ballian, 2005). Tako stoljećima zauzima posebno mjesto u kulturi svih naroda koji



Slika 1. Obična tisa u selu Bukov dol
Figure 1 Common Yew in the village Bukov dol



Slika 2. Obična tisa u selu Pepelari
Figure 2 Common Yew in the village Pepelari

žive u Bosni i Hercegovini, a to ponajprije proističe iz njene sposobnosti da doživi veliku starost, i preko 1000 godina (Vidaković i Franjić 2004). Nedostatak drva obične tise bio je jedan od razloga što se uzgajala dugi niz godina u vrtovima oko kuća u Bosni. Kao primjer može poslužiti primjerak iz sela Bukov dol kod Olova, starosti oko 500 godina, koji je već dugi niz godina pod zaštitom (slika 1) i druga obična tisa iz sela Pelari kod Žepča, stara oko 750 godina (slika 2).

Suvremena istraživanja u Europi koja su se zadnjih godina počela provoditi na tisi, dala su povoda da se pokušaju iznaći populacije tise i u Bosni i Hercegovini. Na iznalaženju populacija tise pomoć je pružilo mnogo lokalnih stručnjaka, što je polučilo dobre rezultate. Većinom su registrirana pojedinačna stabla koja nalazimo širom Bosne i Hercegovine, ali ni male populacije tise nisu izostale. Do sada je registrirano osam populacija, gdje se brojnost mjeri od nekoliko desetina biljaka pa do

nekoliko tisuća. Ova saznanja usmjerila su nas k aktivnostima na njihovoj zaštiti. Kako svi oblici zaštite leže u prethodnom poznavanju genetičke strukture populacija određene vrste, na taj se način počelo raditi i s tison.

Cilj ovog istraživanja je da se priznatim biokemijским metodama odredi genetička struktura populacija i njihova međupopulacijska varijabilnost u Bosni i Hercegovini. Za populacijsku analizu rabile bi se alelne i genotipske učestalosti, kao i sama njihova struktura. Posebna pozornost posvetila bi se stvarnoj i očekivanoj heterozigotnosti, te genetičkom diverzitetu prema metodi koje je dao Thoma (1992), Lewadowskom i sur. (1992) i Hertelu i Kohlstocku (1996). Na temelju dobivenih rezultata dale bi se smjernice za njezino očuvanje metodama *in situ* i *ex situ*.

MATERIJAL I METODE – Material and methods

Tijekom studenoga 2004. godine selekcionirana su stabla obične tise na području Bosne i Hercegovine, na planini Plješevici, Prenju, širem području Olova, Bjelašnici, Ozrenu i Boriji (tablica 1 i slika 3). Kod odabira populacija nisu odabrane one s dovoljnim brojem individua za ovaj način analiza. Tako smo u nekim populacijama koje su male, objedinili sve raspoložive individue, dok u velikim populacijama kao što su Prenj, Olovo (slika 4), Borija, Ozren, uzeli smo samo uzorak koji je razmjeran veličini populacije. Ako se analizira područje iz kojega dolaze populacije, može se primijetiti da su iz kontrastnih ekoloških uvjeta i da pripadaju različitim fitocenzozama i geološkim podlogama.

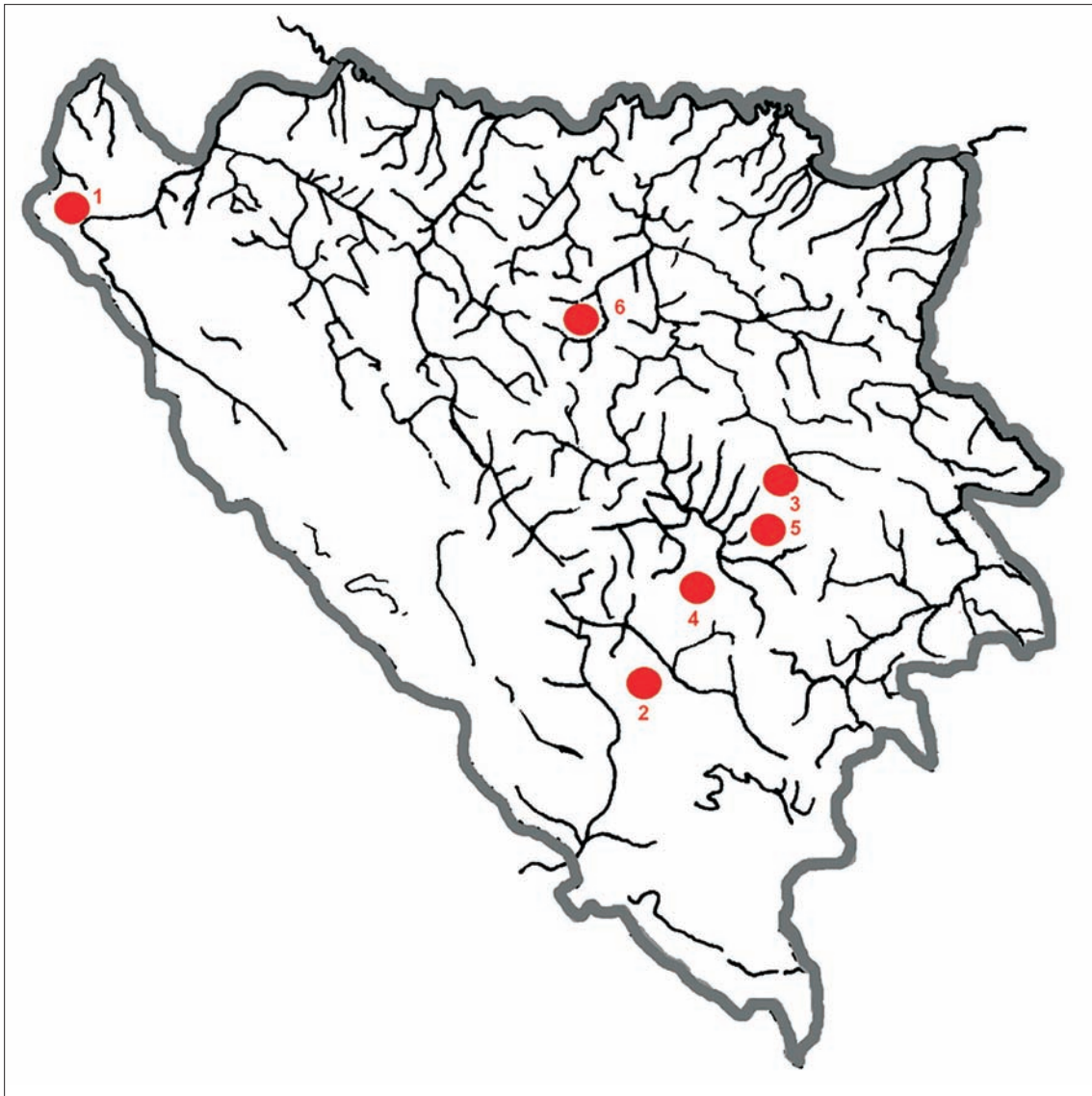
Prilikom sabiranja uzoraka za analizu, vodilo se računa da udaljenost između stabala bude minimalno

50 m, a ponekad i veća, u ovisu o rasporedu biljaka na terenu, kako bi se što više smanjila mogućnost srodstva. Prilikom sabiranja za ovo istraživanje nisu razdvajana muška i ženska stabla, nego su analizirana zajedno.

Istraživalo se sedam (7) enzimskih sustava s ukupno sedam (7) gen lokusa, odnosno 16 alela. Postupci maceracije, pripreve gela, elektroforeze i bojenja gela bili su prilagođeni primijenjenim enzimskim sustavima (Hertel 1996; i Sächsischen Landesanstalt für Forsten 2000) (tablica 2).

Tablica 1. Istraživane populacije tise u Bosni i Hercegovini
Table 1. Investigated yew populations in Bosnia and Herzegovina

Broj populacije <i>Number of population</i>	Naziv populacije <i>The name of population</i>	Lokalitet <i>Locality</i>	Zemljopisna dužina i širina <i>Longitude and latitude</i>	Nadmorska visina <i>Altitude</i>	Broj analiziranih stabala <i>Sample size</i>
1	Plješivica	Kanjon Une	44°45'N 15°51'E	900 m	47
2	Prenj	Kula	43°30'N 17°59'E	660 m	115
3	Olovo	Ajdinovići	44°04'N 18°33'E	980 m	117
4	Bjelašnica	Mehina luka	43°44'N 18°06'E	700 m	53
5	Ozren	Vukinjača	43°58'N 18°27'E	1200 m	82
6	Borja	Gornji Ugodović	43°31'N 17°49'E	700 m	87



Slika 3. Raspored istraživanih populacija, 1. Plješevica, 2. Prenj, 3. Olovo, 4. Bjelašnica, 5 Ozren, 6. Borja.
 Figure 3 Distribution of yew population, 1. Plješevica, 2. Prenj, 3. Olovo, 4. Bjelašnica, 5 Ozren, 6. Borja.

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

Enzimski sustavi – Enzyme system	E.C. broj – E.C. No.	Genski lokus – Loci	Broj alela – No. alleles
Phosphoglucoseisomerase	5.3.1.9	<i>Pgi</i> –A,	1
Phosphoglucomutase	2.7.5.1	<i>Pgm</i> –A,	3
Isocitrat dehidrogenase	1.1.1.42	<i>Idh</i> –A,	3
Alkoholdehidrogenaze	-	<i>Adh</i>	3
Shikimatadehidrogenase	1.1.1.25	<i>Sdh</i> –A,	2
Glutamatoxalacetattransminase	2.6.1.1	<i>Got</i> –B,	2
6-phosphoglucomatedehydrogenase	1.1.1.44	<i>6-Pgdh</i> –A,	3
Ukupno – Total	7	7	17

Poslije bojenja provodi se fotografiranje i analiza zimograma, identificiraju se aleli za svaki genski lokus (Hertel 1996).

Podaci se unesu u pripremljeni formular, a kasnije se veličine unesu u računalni program i obrade sljedeći parametri:

1. alelna varijabilnost (A/L) i genotipska varijabilnost (G)
2. potencijalna genotipska varijabilnost (G_p)
3. broj polimorfnih alela (P)
4. genetička raznolikost (v)

5. genpool raznolikost (v_{pool})
6. genetička diferenciranost (δ_T), s genetičkim odsto-
janjima (d)
7. heterozigotnost, stvarna (H_{st}) i očekivana (H_{oc})



Slika 4. Populacija obične tise Olovo
Figure 4 Common Yew in the population Olovo

REZULTATI ISTRAŽIVANJA – Research results

Alelna i genotipska varijabilnost – Allele and genotype variability

Analizom alelnih učestalosti u istraživanim populacijama, možemo primijetiti da imamo prisutno od 11 do

14 od ukupno 16 alela (tablica 3). Tako u populaciji Plješivica i Bjelašnica imamo 11, dok kod Prenja, Olova i Borje imamo 13, a kod Ozrena 14 registriranih alela.

Tablica 3. Alelne učestalosti
Table 3 Alleles frequencies

Enzimski sustav <i>Enzyme system</i>	Alel <i>Allele</i>	Populacije – <i>Population</i>					
		Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
Got-B	1	0,000	0,013	0,000	0,294	0,226	0,244
	2	1,000	0,987	1,000	0,706	0,774	0,756
Pgm-A	1	0,022	0,123	0,327	0,141	0,009	0,018
	2	0,000	0,149	0,055	0,006	0,000	0,372
	3	0,978	0,728	0,618	0,853	0,991	0,610
Adh	1	0,000	0,000	0,073	0,000	0,000	0,110
	2	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000	0,037
	3	1,000	1,000	0,877	1,000	1,000	0,854
6-Pgdh-A	1	0,337	0,237	0,336	0,571	0,585	0,244
	2	0,641	0,759	0,664	0,429	0,415	0,756
	3	0,022	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Skdh-A	2	0,804	0,982	0,986	0,682	0,934	1,000
	3	0,196	0,018	0,014	0,318	0,066	0,000
Idh-A	1	0,087	0,132	0,068	0,112	0,028	0,500
	2	0,913	0,868	0,932	0,547	0,972	0,482
	3	0,000	0,000	0,000	0,341	0,000	0,018

Analizom podataka iz tablice 3 možemo primijetiti da enzimski sustav Adh pokazuje najveći monomorfizam, a on je registriran u četiri istraživane populacije. Kod genskog lokusa Got – B monomorfizam imamo u dvije populacije, dok je genski lokus Skdh – A monomorfizam u jednoj populaciji. Ostali enzimski sustavi pokazuju prisutnost većeg ili manjeg polimorfizma.

Daljnjom analizom dobivenih rezultata primjetna je prisutnost uvjetno rečeno relativno rijetkog alela u području Bosne i Hercegovine, a koji je registriran s malom učestalošću samo u populaciji Plješivica i Prenj. To se odnosi na alel A3 kod genskog lokusa 6-Pgdh s učestalošću 0,022 i 0,004. Analizom genotipova možemo primijetiti da je prisutan samo u heterozigotnom stanju (tablica 4). Analizom ostalih genskih lokusa situacija je nešto drukčija, te su analizirani aleli prisutni obično u dvije ili više populacija, a imaju relativno veću učestalost.

Analizom alelne dominantnosti prema genskim lokusima evidentno je da kod genskog lokusa Got – B dominira alel B2. Kod genskog lokusa 6-Pgdh dominira alel A2, a kod Pgm – A alel A3. Analizom genskog lokusa Skdh – A vidljiva je dominantnost alela A2, a kod Adh alela 3. Kod genskog lokusa Idh – A dominira alel A2.

Analizom genotipskih učestalosti nemamo drukčiju situaciju nego što smo imali kod analize alela. Tako smo ukupno registrirali 24 genotipa, što je prikazano u tablici 4. Interesantno je da je najviše genotipova registrirano kod genskog lokusa Pgm – A, ukupno šest, iako u i drugi gen lokusi imali iste predispozicije i isti broj alela kao i lokus Pgm – A. Ovo ukazuje na specifične procese koji vladaju u istraživanim populacijama tise, a koji su dosta konzervativni i usmjeravaju populacije u određenom smjeru, bilo da se favoriziraju homozigoti ili heterozigoti kod određenih genskih lokusa.

Genetička raznolikost – Genetic variability

Analizom broja alela prema genskim lokusima (tablica 5) može se primijetiti da između populacija postoje određene razlike, o čemu je već bilo riječi ranije. Ako pak analiziramo potencijalnu genotipsku raznolikost možemo primijetiti da dobivena vrijednost od 1944 za populaciju Ozren (tablica 5) znatno odstupa od svih ostalih, a razlog tomu treba tražiti u dobroj strukturi, broju i rasporedu alela po genskim lokusima. Ovo ukazuje da je populacija Ozren vrlo vjerojatno i najprikladnija za razliku od drugih. U suprotnosti s Ozrenom je populacija Plješivica koja ima jako malu vrijednost, koja iznosi 162, na što je vjerojatno utjecao i broj

Tablica 4. Relativna genotipska učestalost
Table 4 Relative genotype frequencies

Enzimski sustav <i>Enzyme system</i>	Genotip <i>Genotyp</i>	Populacija – <i>Populacija</i>					
		Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
Got-B	11	0,000	0,000	0,000	0,059	0,000	0,000
	12	0,000	0,026	0,000	0,471	0,453	0,488
	22	1,000	0,974	1,000	0,471	0,547	0,512
Pgm-A	11	0,000	0,000	0,091	0,000	0,000	0,000
	12	0,000	0,000	0,027	0,012	0,000	0,037
	13	0,043	0,246	0,445	0,271	0,019	0,000
	22	0,000	0,035	0,009	0,000	0,000	0,000
	23	0,000	0,228	0,064	0,000	0,000	0,707
	33	0,957	0,491	0,364	0,718	0,981	0,256
Adh-A	12	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073
	13	0,000	0,000	0,145	0,000	0,000	0,146
	23	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000
	33	1,000	1,000	0,755	1,000	1,000	0,780
6-Pgdh-A	11	0,000	0,000	0,173	0,388	0,358	0,000
	12	0,674	0,474	0,327	0,365	0,453	0,488
	22	0,283	0,518	0,500	0,247	0,189	0,512
	23	0,043	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
Skdh-A	22	0,609	0,965	0,973	0,447	0,868	1,000
	23	0,391	0,035	0,027	0,471	0,132	0,000
	33	0,000	0,000	0,000	0,082	0,000	0,000
Idh-A	12	0,174	0,263	0,136	0,141	0,057	0,963
	13	0,000	0,000	0,000	0,082	0,000	0,037
	22	0,826	0,737	0,864	0,282	0,943	0,000
	23	0,000	0,000	0,000	0,388	0,000	0,000
	33	0,000	0,000	0,000	0,106	0,000	0,000

analiziranih biljaka. Ovo pak ukazuje na slabu alelnu strukturu populacije Plješivica, te time i na slabu prilagodbu ako dođe do kakvih promjena koje bi se mogle odigrati u toj populaciji. Također je interesantno da tri populacije, Prenj, Olovo i Borija, imaju iste veličine

potencijalne genotipske raznolikosti, odnosno isti broj alela, ali nešto drukčije raspoređenih unutar genskih lokusa (tablica 5), što ukazuje na slične selekcijske procese koji vladaju u tim populacijama.

Tablica 5. Genetička varijabilnost
Table 5 Genetics variability

Populacija <i>Population</i>	Broj alela prema genskim lokusima <i>Number of alleles according to gene loci</i>						Potencijalna genotipska varijabilnost <i>Potential genotypes variability</i>	Prosječan broj alela po lokusu <i>Average number of allele per locus</i>	Broj polimorfni alela <i>Number of polymorphic alleles</i>
	Got-B	Pgm-A	Adh-A	6-Pgdh-A	Skdh-A	Idh-A	G(p)	A/L	P (%)
Plješivica	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	3	2	<u>2</u>	162	1,83	66,6
Prenj	2	3	<u>1</u>	3	2	<u>2</u>	972	2,16	83,3
Olovo	<u>1</u>	3	3	<u>2</u>	2	<u>2</u>	972	2,16	83,3
Borja	2	3	<u>1</u>	<u>2</u>	2	3	972	2,16	83,3
Bjelašnica	2	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	2	<u>2</u>	243	1,83	83,3
Ozren	2	3	3	<u>2</u>	<u>1</u>	3	1944	2,33	83,3

Ako analiziramo prosječan broj alela (A/L), ponovo populacija Ozren prednjači s vrijednošću 2,33, što je bilo i za očekivati na temelju prethodnih rezultata.

Broj polimorfni lokusa u ovom istraživanju, koji izražen u procentima, pokazuje da imamo iste vrijed-

nosti u pet populacija (tablica 5), dok samo kod populacije Plješivica imamo manju vrijednost, a koja iznosi 66,6 %. Ovo je pak uvjetna vrijednost i ovisna je o broju alela i njihovoj strukturi, kao i broju analiziranih individua.

Tablica 6. Genetička (v) i genpool raznolikost (v_{pool}), za šest (6) enzimskih sustava
Table 6 Genetics (v) and gene pool diversity (v_{pool}), for the six (6) enzyme system

Enzimski sustav <i>Enzyme system</i>	Populacija – <i>Population</i>					
	Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
GOT-B	1,000	1,026	1,000	1,710	1,538	1,585
PGM-A	1,045	1,763	2,033	1,338	1,018	1,958
ADH	1,000	1,000	1,287	1,000	1,000	1,346
6-PGDH-A	1,905	1,582	1,806	1,960	1,944	1,585
SKDH	1,460	1,037	1,028	1,766	1,141	1,000
IDH-A	1,189	1,297	1,145	2,336	1,058	2,072
Genpool	1,198	1,222	1,285	1,564	1,208	1,501

Provedenom analizom genetičke (v) i gen pool (v_{pool}) raznolikosti, dobili smo rezultat da populacija Borija pokazuje najveću gen pool raznolikost, te genetičku raznolikost za genske lokuse Idh – A, 6-Pgdh – A i Skdh (tablica 6). Druga je populacija Ozren, dok smo najmanju vrijednost gen pool raznolikosti dobili kod populacije Plješivica, što je bilo i za očekivati na temelju prethodnih rezultata. Ipak za populaciju Plješivica interesantn je genski lokus 6-Pgdh-A s visokom vrijednošću od 1,905. Ako se zna da se obično veličina tog gen lokusa kod četinjača povezuje za otpornost vrsta prema zagađivanju (Hosius i Bergmann 1993; Bergmann i Hosius 1996), možemo smatrati da i populacija obične tise s planine Plješivice pokazuje visoki stupanj otpornosti spram određenih zagađenja.

Populacijska diferenciranost – Population differentiation

Ako analiziramo rezultate genetičke diferenciranosti dane u tablici 7, možemo primijetiti da se kod genskih lokusa diferenciranost kreće od 0,000 do 0,579 za genski lokus Idh – A kod populacije Borja, što je najveći raspon kod analiziranih populacija. Ako se analiziraju ukupne srednje vrijednosti diferenciranosti, populacija Borja pokazuje najveću s vrijednošću od 0,365, a najmanja je kao što je i očekivano kod populacije Plješivica. Populaciju Borja s nešto nižom vrijednosti slijedi populacija Ozren.

Tablica 7. Populacijska genetička diferenciranost (δ_T)Table 7 Population genetics differentiation (δ_T)

Enzimski sustav <i>Enzyme system</i>	Populacija – Population					
	Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
GOT-B	0,000	0,026	0,000	0,420	0,357	0,373
PGM-A	0,044	0,437	0,513	0,255	0,018	0,495
ADH	0,000	0,000	0,225	0,000	0,000	0,260
6-PGDH-A	0,486	0,371	0,450	0,496	0,495	0,373
SKDH	0,322	0,036	0,028	0,439	0,126	0,000
IDH-A	0,162	0,231	0,128	0,579	0,055	0,524
minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
maksimum	0,486	0,437	0,513	0,579	0,495	0,524
sredina	0,169	0,184	0,224	0,365	0,175	0,338

Heterozigotnost – Heterozygosity

Najveću prosječnu stvarnu heterozigotnost imamo kod populacije Ozren, dok je najveća očekivana heterozigotnost kod populacije Borja (tablica 8). Najmanja stvarna heterozigotnost je dobivena kod populacije Bjelašnica. Kod analize heterozigotnosti prema genskim lokusima, najveću stvarnu heterozigotnost pokazuje lokus Pgm – A kod populacije Ozren, s vrijednošću od 0,744, odnosno ovaj lokus ima i najveće učešće u prosječnoj stvarnoj heterozigotnosti. Ovaj genski lokus slijedi 6-Pgdh – A kod populacije Plješivica, s vrijednošću od 0,717.

Također je interesantno da su dobivene srednje veličine za stvarnu heterozigotnost veće od očekivanih, osim kod populacije Olovo, gdje imamo da je očekivana heterozigotnost veća. Razlog tomu treba tražiti u velikoj homozigotnosti koja je prisutna u populaciji. Inače ove dobivene vrijednosti ukazuju nam na to da u populacijama imamo malo prisutnosti inbridinga, osim kod populacije Olovo. Također kod ovih rezultata treba imati na umu da je tisa dvodoma vrsta, odnosno da imamo muške i ženske individue, što može biti jedan od razloga za visoku heterozigotnost u istraživanim populacijama.

Tablica 8. Stvarna heterozigotnost (H_{st}) i očekivana heterozigotnost (H_{oc})Table 8 Observed heterozygosity (H_{st}) and expected heterozygosity (H_{oc})

Enzimski sustav <i>Enzyme system</i>	Heterozigotnost <i>Heterozygosity</i>	Populacija – Population					
		Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
GOT-B	H_{st}	0,000	0,026	0,000	0,471	0,453	0,488
	H_{oc}	0,000	0,026	0,000	0,415	0,350	0,369
PGM-A	H_{st}	0,043	0,474	0,536	0,282	0,019	0,744
	H_{oc}	0,043	0,433	0,508	0,252	0,018	0,489
ADH	H_{st}	0,000	0,000	0,245	0,000	0,000	0,220
	H_{oc}	0,000	0,000	0,223	0,000	0,000	0,257
6-PGDH-A	H_{st}	0,717	0,482	0,327	0,365	0,453	0,488
	H_{oc}	0,475	0,368	0,446	0,490	0,486	0,369
SKDH	H_{st}	0,391	0,035	0,027	0,471	0,132	0,000
	H_{oc}	0,315	0,035	0,028	0,434	0,123	0,000
IDH-A	H_{st}	0,174	0,263	0,136	0,612	0,057	1,000
	H_{oc}	0,159	0,229	0,127	0,572	0,054	0,000
Prosječna heterozigotnost	H_{st}	0,220	0,213	0,211	0,366	0,185	0,490
	H_{oc}	0,165	0,181	0,222	0,360	0,171	0,247

Genetička odstojanja – Genetic distances

Najmanje genetičko odstojanje na temelju srednjih alelnih parova je registrirano između populacije Olovo i Prenj, a najveće između populacija Ozrena i Borja. Ako analiziramo koja od populacija ima najveće udaljenosti spram drugih populacija, odmah možemo pri-

mijetiti da je to populacija Ozren, a potom slijedi populacija Borja. Razlog ovome leži u alelnom bogatstvu tih populacija.

Ovi rezultati prilično su proturječni, ako se zna kojim klimatskim zonama pripadaju istraživane populacije, kao i kakva je njihova zemljopisna udaljenost, te

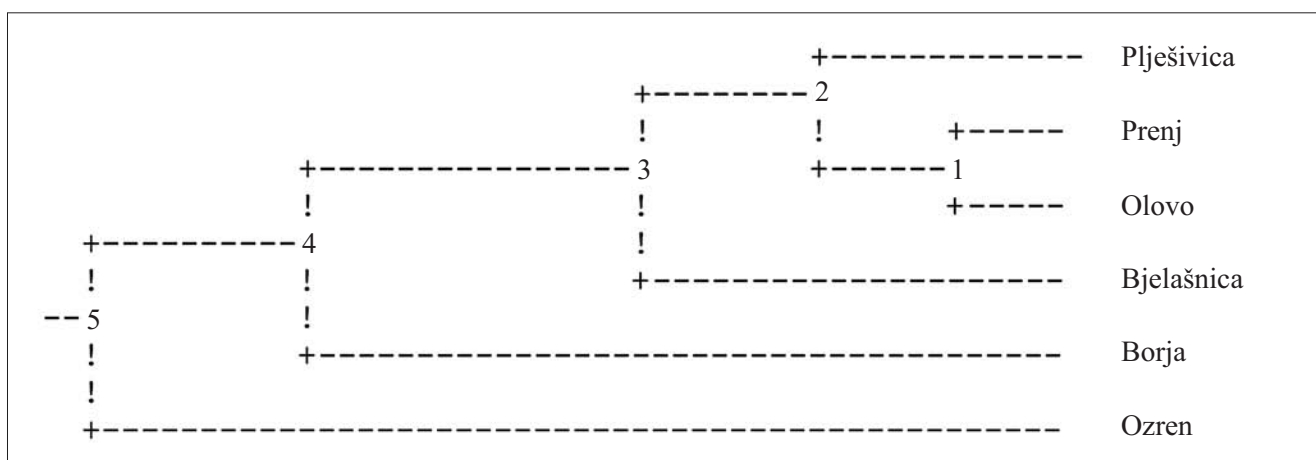
ih s tim čimbenicima ne možemo povezati. Ako bi postojala povezanost s klimom ili zemljopisnom pripadnošću, tada se moglo očekivati da populacije Olovo i Ozren, te Ozren i Bjelašnica budu prilično bliske, a ne populacije Olovo i Prenj. Ipak se mora poštivati dobi-

veni rezultat, a objašnjenje treba tražiti u veličinama populacija, kao i genetički specifičnim procesima koji postoje u malim i izoliranim populacijama (Savolainen i Kuittinen 2000).

Table 9. Procjena genetičkog odstojanja (d) parovima srednjih alelnih odstojanja (Nei 1972)

Table 9. Estimates of genetic distances (d) with pair of mean allelic distances (Nei 1972)

Populacija <i>Population</i>	Populacija – <i>Population</i>					
	Plješivica	Prenj	Olovo	Borja	Bjelašnica	Ozren
Plješivica	---					
Prenj	0,101	---				
Olovo	0,118	0,085	---			
Borja	0,190	0,233	0,262	---		
Bjelašnica	0,112	0,163	0,177	0,149	---	
Ozren	0,251	0,169	0,192	0,266	0,240	---



Slika 5. Dendrogram na temelju genetičkih odstojanja

Figure 5 Dendrogram based of genetic distances

Ako se dobiveni rezultati za alelna genetička odstojanja predstave u obliku dendrograma (slika 5) dobit će se nešto jasnija slika o genetičkim vezama između istraživanih populacija. Postoji pet razina povezivanja prema genetičkoj srodnosti, odnosno genetičkoj blis-

kosti. Najbliže, kao što je već rečeno su populacije Prenj i Olovo, s njima je povezana Plješivica koja je zemljopisno najviše udaljena, slijedi Bjelašnica, Borja te u konačnici kao peta veza populacija Ozren.

RASPRAVA – Discussion

U ovom istraživanju sa šest populacija obične tise u Bosni i Hercegovini dobivena je nešto niža prosječna alelna vrijednosti nego u sličnim istraživanjima koja su provedena u Europi (tablica 10). Razlog tomu treba tražiti u broju analiziranih genskih alela, broju populacija ili broju uzoraka koji su predstavljali populacije. U istraživanju je stvarna prosječna heterozigotnost prilično niska, a razlog može ležati u grupiranju analiziranih individua iz naših populacija na jednom manjem prostoru, gdje postoji stalno zatvoreno kretanje gena. Također se treba osvrnuti i na uporabljene genske lokuse, koji su samo istovjetni lokusima koje je uporabila Tröber (2004) u središnjem i istočnom dijelu Njemačke. Ipak kada se usporede dobiveni rezultati komplementarnih genskih lokusa, može se primijetiti da postoje specifični

aleli koji su samo svojstveni za bosanskohercegovačke populacije. To tim više, što su naše populacije bliže potencijalnom glacijalnom pribježištu od onih iz srednje i sjeverne Europe, a koje su na svom migracijskom putu izgubile dio stare, odnosno, prvobitne genetičke strukture koju su imale nakon zadnje glacijacije.

O razvojnem putu obične tise, kao i njezinim populacijama nemamo mnogo podataka, kako onih iz tercijara i kvartara, tako i u postglacijalnom razdoblju, posebice u kome smjeru je tekao njihov razvoj. Zato je vrlo važno poznavati da li su u malim i izoliranim populacijama vladali specifični selekcijski procesi i mutacijske promjene genoma, koje bi dovele do diferencijacije populacija, a o čemu detaljno piše Savolainen i Kuittinen (2000). Kao primjer djelovanja selekcije

možemo se poslužiti primjerom vrste *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei gdje prirodna selekcija u maloj i izoliranoj populaciji sustavno favorizira heterozigote (Vicario i sur. 1995), a s tim problemom susreće se i

kod munike (*Pinus leucodermis* Ant.) Boscherini i sur. (1994). O sličnom problemu izvještava kod smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) na planini Pokljuka u Sloveniji Božič i Urbančič (2003).

Tablica 10. Dosadašnji rezultati genetičkog istraživanja obične tise
Table 10 Some presents genetics research of Common Yew

Vrsta <i>Species</i>	Broj istraživanih populacija <i>N. of researched populations</i>	Broj enzimskih sustava <i>N. of enzymes system</i>	A/L	H _{st} (u %)	Referenca <i>References</i>
<i>Taxus baccata</i>	6	6	2,1	28,1	U ovom istraživanju
<i>Taxus baccata</i>	4	8	2,9	38	Thoma (1992)
<i>Taxus baccata</i>	1	18	2,2	28,6	Lewandowski i sur. (1995)
<i>Taxus baccata</i>	8	7	2,2	41	Hertel i Kohlstock (1996)
<i>Taxus baccata</i>	6	6	2,6	34	Cao i sur. (2004)
<i>Taxus baccata</i>	13	5	2,5	30,2	Tröber (2004)

Dobiveni rezultati na temelju biokemijskih analiza provedeni s ukupno šest enzimskih sustava (gen lokusa), ukazuju da obična tisa iz Bosne i Hercegovine pokazuje razlike na biokemijskoj razini glede tise iz središnje i sjeverne Europe.

U idućem razdoblju daljnja istraživanja trebalo bi usmjeriti ka korištenju DNK molekularnih metoda, uz obvezno uključivanje novih cpDNA i mtDNA početnica, da bi se mogao u potpunosti riješiti njen status u Europi.

Mjere očuvanja obične tise na temelju dobivenih rezultata – Measures of preserving yew based on obtained results

Sva područja u Bosni i Hercegovini gdje raste obična tisa su pod trajnom zaštitom, te je zaštićena metodom *in situ*, koja isključuje bilo kakvo djelovanje čovjeka. Taj način prirodnog dinamičkog očuvanja trenutno nikako ne odgovara običnoj tisi, iz razloga što se ona sustavno povlači pred agresivnom prirodnom vegetacijom u procesima prirodne sukcesije, iako kao izrazita skiofilna vrsta odlično podnosi visoki stupanj zasjene. Tako glavnu prijetnju predstavljaju agresivne vrste kao što je obična bukva u kombinaciji s običnom jelom i smrekom. Čest razlog je nestručnost u provođenju određenih aktivnosti na gospodarenju šumom, ponajprije naglim otvaranjem sklopa, te dovođenja jačeg svjetla. Time se pospješuje pojava sukcesije s agresivnom termofilnom vegetacijom, a razlog leži u nestručnim ljudskim aktivnostima.

Sama izrada strategije i davanje uputa za genetičko očuvanje ovisi o poznavanju genetičke strukture vrste, a u ovom slučaju je ona poznata. Tako kod obične tise u ovom slučaju za cilj imamo očuvanje sadašnje genetičke strukture, odnosno prirodnih populacija, kao i da se osigura potrebni materijal za buduće aktivnosti na njezinoj reintrodukciji u područja iz kojih je nestala. Drugi razlog za očuvanje sadašnje genetičke strukture leži u mišljenju da je prirodna selekcija stvorila jedinke

koje su savršeno adaptirane na prevladavajuće uvjete okoliša, iako u praksi, to vrlo često nije slučaj. Trenutni genetički ustroj samo je jedan od mogućih, a ipak je kratkotrajan, jer populacija vrlo brzo i često mijenja svoju genetičku strukturu, iako u ovom istraživanju i uz relativno male udaljenosti između populacija imamo određeni stupanj diferenciranost, odnosno konzervativizma u populacijama. Tako ovaj trenutni genetički sastav treba biti temelj za budućnost, a ne cilj konzerviranja gena, nego tek početni materijal za dinamičko genetičko očuvanje.

Ključ za očuvanje obične tise, kao rijetke i ugrožene vrste je u učinkovitom očuvanju sadašnjeg stanja i proširenju populacija, kako bi se na taj način izbjegao, odnosno smanjio na najmanju mjeru inbriding, koji je prisutan u nekim populacijama. Najskuplji pak način je prikupljanje reznica i proizvodnja klonova za klonske arhive. Kako su dobivene razlike između populacija, ne bi trebalo miješati klonove iz različitih ekozemljopisnih područja. U većini slučajeva, ova metoda ne može biti primijenjena, jer iziskuje visoke troškove, i umjesto nje preporuča se proizvodnja sadnica lokalnog podrijetla, kako bi se time povećala površina populacija.

Mnoge od rijetkih ili ugroženih vrsta ovise o određenom staništu za svoje preživljavanje, pa tako i obična tisa. Stoga je značajno što suptilnije pristupiti dizajniranju očuvanja gena, tako da u populacijama budu prisutni svi stupnjevi razvoja drveća, od juvenilnog do adultnog stupnja. Nadalje, svaka od populacija koja bude uzeta u program očuvanja, mora široko pokrivati određeno područje, odnosno treba biti ciljana, koliko god je to moguće. Inače postoje primjeri kako bi mnoge vrste nestale da nisu provedene ljudske aktivnosti na formiranju populacija s njihovim autohtonim genetičkim izvorima (Eriksson i Ekberg 2001; Eriksson i sur. 2006).

Posebna pogodnost u radu s običnom tisom je i to da se može naći u mnogim botaničkim vrtovima i par-

kovima. Oni uglavnom sadrže jedno ili više stabala i može se postaviti pitanje treba li ih smatrati genetičkim izvorom? Kako neki botanički vrtovi provode aktivno genetičko očuvanje jednogodišnjih ili trajnih vrsta biljaka, to nam može olakšati aktivnosti na očuvanju, posebice kroz primjenu *ex situ* metode. Ako pak imamo veći broj botaničkih vrtova ovo se ne bi trebalo zane-mariti. Kako je iz naših rezultata vidljivo da obična tisa

ima unutarvrstu diferenciranost, kao i međupopulacij-sku, to nam može znatno otežati ovaj način očuvanja.

Na temelju iznesenog, kombinacija metoda *in situ* i *ex situ* u ovom slučaju dala bi odgovarajući rezultat, te bi smo s malim brojem očuvanih individua mogli očuvati genetički potencijal obične tise u Bosni i Hercegovini.

ZAKLJUČCI – Conclusions

1. Analizom šest (6) izoenzimskih gen lokusa, s 16 alela utvrdili smo postojanje razlika između istraživanih populacija, a dobivena varijabilnost obične tise pokazala je diskontinuitet, koji je svojstven za male i izolirane populacije.
2. Između populacije Ozren i ostalih populacija ustanovljene su razlike, tako da je među njima prisutna znatna diferencijacija, a njihova genetička odstojanja su značajna.
3. Analizirane populacije obične tise iz Bosne i Hercegovine potvrdile su prisutnost specifičnih alela, za razliku od populacija iz središnje i sjeverne Europe, te stoga vjerojatno nisu suviše udaljene od svoga glacialnog pribježišta. Istraživane populacije vjerojatno su prilično otpornije na propadanje i sušenje od populacija sa zapada i sjevera, jer posjeduju dovoljno genetičke varijabilnosti, što potvrđuje prisutnost velike polimorfnosti kod u genskog lokusa 6-PGDH-A.
4. Manja vrijednost heterozigotnosti istraživanih populacija glede populacija obične tise iz središnje Europe, pokazuje da su bile pod jakim antropogenim djelovanjem, ali da ipak nisu mnogo izgubile od svoga genetičkog potencijala za prilagodbu. Ako se analizira heterozigotnost genskog lokusa 6-Pgdh – A, a koja je prilično visoka, ukazuje na viši stupanj otpornosti istraživanih populacija obične tise.
5. Radi održavanja prirodnih genetičkih izvora obične tise u Bosni i Hercegovini trebalo bi osnovati banke gena *in situ* i *ex situ*, nužne za održanje njezine genetičke raznolikosti.
6. Prednost treba dati prirodnoj obnovi, uz stalno praćenje genetičke strukture, kako bi se mogle poduzeti pravodobno mjere za održanje optimalne prirodne genetičke strukture koja je svojstvena za svaku populaciju.

LITERATURA – References

- Ballian, D. 2005: The Status of Yew Tree (*Taxus baccata* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Der Eibenfreund*, 12: 169–172.
- Bergmann, F., B. Hosius, 1996: Effects of heavy-metal polluted soils on the genetic structure of Norway spruce seedling populations. *Water, Air and Soil Pollution*, 89: 363–373.
- Beug, H. J. 1961: Beiträge zur postglazialen Floren- und Vegetationsgeschichte in Süd-dalmatien: Der See “Malo Jezero” auf Mljet, I, II. *Flora* 150: 600–656, Jena.
- Boscherini, G., M. Morgante, P. Rossi, G. G. Vendramin, (1994) Allozyme and chloroplast DNA variation in Italian and Greek population of *Pinus leucodermis*. *Heredity* 73: 284–290.
- Božič, G., M. Urbančić, (2003) The morphological and genetical characterisation of native Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) population in the area of Pokljuka mire. *Acta Biologica Slovenica*, 46 (1): 17–25.
- Brande, A. 1973: Untersuchungen zur postglazialen Vegetationsgeschichte im Gebiet der Neretva – Niederungen (Dalmatien, Herzegowina). *Flora* 162: 1–44, Jena.
- Cao, C. P., L. Leinemann, M. Ziehe, R. Finkeldey, 2004: Untersuchungen zur genetischen Variation und Differenzierung von Eibenbeständen mit Hilfe von Isoenzym- und DNS- Markern. *Allg. Forst und Jagdzeitung* (175): 21–28.
- Eriksson, G., I. Ekberg, 2001: An Introduction to Forest Genetics. SLU Repo, Uppsala.
- Eriksson, G., I. Ekberg, D. Clapham, 2006: An Introduction to Forest Genetics. SLU Repo, Uppsala.
- Hertel, H., N. Kohlstock, 1996: Genetische Variation und geographische Struktur von Eibenvorkommen (*Taxus baccata* L.) in Mecklenburg-Vorpommern. *Silvae Genetica* 45 (5–6): 290–294.
- Hertel, H. 1996: Vererbung von Isoenzymmarkern bei Eibe (*Taxus baccata* L.). *Silvae Genetica* 45 (5–6): 284–290.
- Hosius, B., F. Bergmann, 1993: Adaptation of Norway spruce to heavy metal contaminated

- soil. In: Rone, V. (ed.): Norway spruce Provenances and Breeding. Latvian Forest Research Institute 'Silva', Riga, 200–207.
- Korpel, S. 1981: Das größte Eibenvorkommen in Europa. AFZ 1981, S. 218–221.
- Lewandowski, A., L. Burczyk, L. Meinartowicz, 1992: Inheritance and Linkage of some Allozymes in *Taxus baccata* L.. *Silvae Genetica* 41 (6): 342–347.
- Paule, L., D. Gömöry, R. Longauer, 1993: Present distribution and ecological conditions of the English yew (*Taxus baccata* L.) in Europe. Yew resources conference, Berkeley, CA, p. 189–196.
- Savolainen, O., H. Kuittinen, (2000) Small population processes. In: Young A., Boshier D., Boyle T. (eds.) Forest conservation genetics, principles and practice, CABI Publishing, Oxon, pp. 91–100.
- Scheeder, T. 1994: Die Eibe (*Taxus baccata* L.) Hoffnung für ein fast verschwundenes Waldvolk. IHW- Verlag. 124 S.
- Thoma, S. 1992: Genetische Variation an Enzymloci in Reliktbeständen der Eibe (*Taxus baccata* L.). Diplomarbeit Forstl. Fakultät Uni Göttingen Abt. für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, 88 S.
- Tröber, U. 2004: Ergebnisse biochemisch-genetischer Untersuchungen an ausgewählten Eibenvorkommen Thüringens und Sachsens. LFP-Sachsen. Unveröffentlicht.
- Vicario, F., G. G. Vendramin, P. Rossi, P. Liò, R. Giannini, (1995) Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*, *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (7–8): 1012–1018.
- Vidaković, M., J. Franjić, (2004): Golosjemenjače. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. str. 823.

Summary: By biochemical markers, we analyzed the molecular genetic structure of a part of natural populations of Common Yew (Taxus baccata L.) in Bosnia and Herzegovina.

For this analysis we used the material from 6 Yew populations. The genetic variability was analyzed by usage of 6 enzyme systems, and we successfully analyzed 6 gene loci who exhibited an adequate level of polymorphism. The analysis included a total of 16 allele.

The average number of allele per locus varied between 1,83 and 2,33. By the analysis we determined that the presence of significant variability within the populations, that showed a discontinued character. A potential genotype diversity varied between 162 and 1944, and the number of potential polymorphous genetic loci varied between 66, 6 % and 83, 3 %. Gen pool diversity varied between 1,208 and 1,564, and average real heterozygosis between 0,185 and 0,490, while the overall average realistic heterozygosis was 0,281 for all populations.

Based on the obtained results as a result we can make numerous remarks that are significant for carrying out the activities at protection of the autochthonous gene fund of the Yew.

Thus, by the analysis of 6 isoenzyme gene loci there was determined the existence of statistically significant differences among the studied populations, and variability of the Common Yew that was determined have indicated discontinued variability.

The differences were determined between the populations of Ozren and other populations, including significant differentiation among them, and their genetic distances were also considerable.

The results of the analysis of the Yew from Bosnia and Herzegovina indicated the existence of specific allele in the studied populations, as opposed to the larch from central and northern Europe, which means that our larch could not be too far from its glacial stand. The populations are thus more resis-

tant and less susceptible to degradation and drying, than the populations from the west as they possess sufficient genetic variability.

Lower value of heterozygosis of the studied populations as opposed to the populations of the Yew from Central Europe show that the studied populations were under strong anthropogenic influence, however, they did not lose much of its adaptation genetic potential. If we analyze the heterozygosis of the gene loci 6-Pgdh – A, that is quite high, points at higher level of resistance of our Yew populations.

In order to preserve natural genetic resources of Common Yew in Bosnia and Herzegovina, it is necessary to establish gene banks in situ and ex situ, which are necessary for preservation of the genetic diversity.

In the activities with larch, and in its restoration, advantage should be given to its natural rejuvenation, with permanent monitoring of its genetic structure, in order to allow timely measures for preservation of optimal natural genetic structure that is typical for each separate population.