

KONTROLA PODRIJETLA PANČIĆEVE OMORIKE (*Picea omorika* /Panč./ Purk.) IZ PLANTAŽE KOD KAKNJA POMOĆU ISOENZIMSKIH BILJEGA

CONTROLLING THE SERBIAN SPRUCE ORIGIN (*Picea Omorika* /Panč./ Purk.)
AT THE KAKANJ PLANTATION WITH ISOENZYME MARKERS

Dalibor BALLIAN¹

SAŽETAK: U ovom se istraživanju uporabom molekularnogenetičkih biljega i njihovom identifikacijom pokušalo odrediti podrijetlo Pančićeve omorike iz plantaže s područja Kaknja, čija je veličina 8,2 ha. Uporabili su se izoenzimski biljezi, koji su korišteni ranije u istraživanju genetičke varijabilnosti Pančićeve omorike (Ballian i sur. 2006). U ovom istraživanju kao i onom ranije, uporabilo se 12 enzimskih sustava s ukupno 16 genlokusa.

Rezultati do kojih se došlo pokazuju da podrijetlo plantaže ne možemo pripisati ni jednoj od identificiranih populacija Pančićeve omorike u Bosni i Hercegovini. Osnovni razlog leži u tome što smo u plantaži dobili alele koji su registrirani u više populacija omorike, dok je jedan od registriranih alela nije uopće registriran u prirodnim populacijama, već, vrlo vjerojatno, vodi podrijetlo iz neke od neistraženih populacija ili iz manje skupine stabala.

Ponudeni model identifikacije sa 12 enzimskih sustava, odnosno 16 genlokusa mogao bi se u budućnosti pokazati prihvatljivim, jer su početna istraživanja pokazala jako dobar rezultat.

Ključne riječi: *Picea omorika*, izoenzimi, plantaža, identifikacija.

1. UVOD – Introduction

Pančićeva omorika (*Picea omorika* /Panč./ Purk.) u prirodi ima malo i disjunktno područje rasprostiranja u istočnoj Bosni, u području srednjeg toka rijeke Drine (slika. 1). Raširena je pretežito na teško dostupnim kamenitim padinama, između 800 i 1550 m nadmorske visine. U Bosni i Hercegovini raste na 13 većih ili manjih lokaliteta. Najpoznatiji su lokaliteti na istočnim padinama Zelengore, na planini Viogor kod Čajniča, višegradskom, srebreničkom te miličkom području, kao i na planini Sjemeč (F u k a r e k, 1951, 1957, 1974). U Srbiji raste na više manjih lokaliteta, kao i skupinama stabala na planini Tari, te na jednom izoliranom lokalitetu u dolini Mileševske rijeke (T o š i ć, 1983).

Omorika se razmnožava generativno, pomoću sitnog sjemena relativno slabe klijavosti (K r s t i ć, 1950). Zaštićena je zakonom još od 1964. godine, pa zbog

svoje malobrojnosti zakonodavac dozvoljava sakupljanje sjemena za reprodukciju iz svih populacija bez ograničenja, bez obzira na to jesu li podesne kao sjemenski objekti ili nisu. Sama je ta činjenica doprinijela da se za mnoge plantaže koje su podignute širom Europe ne zna njihovo podrijetlo. Stoga su većinom miješanog podrijetla. Ipak, u većini slučajeva sjeme se sakupljalo na području Višegrada, gdje postoji samo pet vrlo značajnih populacija na oko 64 ha (Ballian i sur., 2004) i više manjih skupina stabala. Sakupljeno sjeme iz tog područja uvijek se deklariralo samo kao “provenijencija Višegrad”, što prema provedenim istraživanjima nije bilo ispravno.

Pančićeva omorika predstavlja vrlo vrijedan terciarni relik, odnosno makrofossil među vrstama smrekâ. Na temelju paleontoloških istraživanja koja su obavljena širom Europe, posebno u oligocenskim sedimentima u Alsasu (Lakowitz prema Burschel u, 1965) pronađeni su brojni fosilni ostaci omorike, što potvr-

¹ Dalibor Ballian, Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71000 Sarajevo, BiH.

đu je njezinu široku rasprostranjenost u tom razdoblju. U sedimentima kasnog tercijara i ranog pleistocena na više mjesta u Njemačkoj također su nađeni fosilni ostaci (Weber prema Burschelu, 1965, Mai i sur., 1963), kao i u središnjoj Rusiji (Glinka prema Burschelu, 1965). Prema istraživanjima Ravazzia (2002) nađeno je mnogo ostataka pretka Pančičeve omorike poznatog kao *Picea omoricoides* Weber, i to na mnogim mjestima u Europi, bilo da je riječ o fosilnoj peludi, češerima, bilo o nekom drugom dijelu stabla.

Velike klimatske promjene, posebno globalno zatopljenje, kao i mnoge promjene koje su nastale antropo-



Slika 1. Rasprostriranje pančičeve omorike u Bosni i Hercegovini
Figure 1 Distribution of Serbian Spruce in Bosnia and Herzegovina

genim djelovanjima u zadnjih 50 godina, podizanje hidroelektrana na rijeci Drini, s velikim akumulacijskim jezerima, dovele su do značajnih promjena u okolišu Pančičeve omorike. Te novonastale promjene nikako ne pogoduju omorici, pa te male geografski udaljene i rijetke prirodne populacije predstavljaju posebne genetičke specifikume u laganom nestajanju. Uz te promjene, praktično u svim prirodnim populacijama omorike u većoj ili manjoj mjeri ugrožen je njezin opstanak i djelovanjem prirodnih procesa sukcesije vegetacijskih formacija. Tako se smanjuju površine koje pogoduju njezinom rastu i razvoju, te posebno prirodnoj obnovi. Najveći problem kod sukcesije predstavlja pridolaženje agresivne bukve (*Fagus sylvatica* L.), smreke (*Picea abies* Karst.), crnog bora (*Pinus nigra* Arn.), običnog bora (*Pinus sylvestris* L.), kao i nekih drugih vrsta listača koje potiskujući omoriku onemogućuju njezinu prirodnu obnovu, te joj u konačnici prijete potpunim nestankom.

Trenutno jedina mogućnost zaštite ove vrijedne endemične vrste, u izmijenjenoj ekološkoj situaciji, leži u primjeni najsuvremenijih metoda molekularno-genetičkog identificiranja populacija, te na temelju dobive-

nih rezultata u hitnom formiranju arhiva *in situ* i *ex situ*. U tom slučaju bi i podignute plantaže širom Europe mogle poslužiti za njezino konzerviranje *ex situ*, a to ponajprije ovisi o stupnju poznavanja njezinoga genetičkog diverziteta.

Kako se radi o vrlo rijetkoj vrsti, vrlo malog i isprekidanog područja prirodnog rasprostriranja, sigurno je i prisutnost genetičkog drifta koji ostavlja značajni trag na ovim populacijama, a o tome se detaljno govori u radu Kuittinen i sur. (1991). Prema istraživanju Langnera (1959) Pančičevu omoriku karakterizira i pojava samooplodnje, te, prema njemu, ne postoje razlike u vitalnosti sjemena nastalog samooplodnjom i stranom oplodnjom, ali se kod mladih biljaka javlja depresija u rastu. Kasnijim se istraživanjem koje je proveo Geburek (1986) pojavila neočekivano visoka razina inbriding depresije, a istraživanje je proveo na 24-godišnje potomstvo Pančičeve omorike, te je to povezao istraživanjima Langnera (1959). Tako, prema istraživanjima Kuittinena i sur. (1991) pojava depresije u rastu mogla bi poslužiti za objašnjenje varijabilnosti Pančičeve omorike. Ipak su Kuittinen i Savolainen (1992) u svome istraživanju došli do rezultata da kod Pančičeve omorike imamo kombiniranu visoku vrijednost stranoplodnje i samooplodnje, što je specifikum među četinjačama, a pojavu rane inbriding depresije u rastu sama Pančičeva omorika eliminira. Savolainen i sur. (1991) ukazuju na pojavu relativno velike letalnosti embriona kod omorike, što je jedan od mehanizama eliminacije embriona (jedinki) nastalih samooplodnjom i eventualnog križanja u vrlo bliskom srodstvu. Sva ova saznanja mogu nam uveliko olakšati posao kod identifikacije populacija, ili određivanja podrijetla ranije podignutih plantaža.

Cilj ovoga rada je određivanje mogućeg podrijetla plantaže Pančičeve omorike s područja Kaknja (veličine 8,2 ha) molekularno genetičkom metodom identifikacije, odnosno uporabom izoenzimskih biljega. Za identifikaciju su uporabljene ranije korišteni izoenzimski sustavi za genetičku identifikaciju Pančičeve omorike (Ballian i sur., 2006).

Na temelju dobivenih rezultata iz ovog istraživanja trebalo bi izvršiti i identifikaciju drugih plantaža Pančičeve omorike širom Europe, što bi moglo pomoći u njezinu očuvanju, jer bi na taj način identificirane plantaže mogle dobiti status genetičkih arhiva *ex situ*. Kod provođenja ovih aktivnosti treba paziti da se ne uključe plantaže s mješovitim podrijetlom, gdje se izmiješano uzgaja nekoliko genetičkih skupina, jer bi se na taj način došlo do gubitka specifičnog genetičkog diverziteta iz populacija, a koji je zapravo glavni cilj i svrha mjerâ zaštite.

Analiza izoenzimskih biljega predstavlja jednu od biokemijskih metoda preko koje se mogu utvrditi raz-

like između pojedinih vrsta, kao i svojstava pojedinačnih stabala, te populacijâ. Na toj osnovi oni omogućuju i kontrolu provenijencije sjemenskog i sadnog materijala, kao i ranije podignutih plantaža nepoznatog podrijetla. Zbog toga u zemljama s intenzivnim šumarstvom ova metoda nalazi svoju veliku primjenu. Ipak, koliko god ove metode mogu biti zanimljive za praksu, one pokazuju određene granice do kojih se može ići s ovim

stupnjem razvoja tehnike. Pa ipak, ova metoda daje rezultate s jako dobrom pouzdanosću. Temeljno načelo uporabe ove tehnike je takvo da se ono na isti način primijenjuje kod svih vrsta šumskog drveća, bilo da su posrijedi sastojine, sjeme, sadni materijal, ili ranije podignute plantaže.

1.1 IZOENZIMSKI MARKERI I NJIHOVA ANALIZA

Isoenzyme markers and their analysis

Prema Konnertovoj (1999) i Ballianu (2003), sve su vrste šumskog drveća diploidni organizmi, s dvostrukim brojem kromosoma ($2n$), te je na taj način i svaki gen u stanicama dvostruko prisutan. Ako su nizovi DNK na oba genska odsječka isti, govori se o istoj gen varijanti ili **alelima**, koji se označavaju kao homozigot. Ipak na određenom genloku mogu nastati jedna ili dvije varijante gena; te s većim brojem stabala u populaciji imamo pojavu više varijanti. Kao posljedica pojavljivanja različitih varijanti istog gena u stanicama se javljaju različite varijante određenog enzima, odnosno izoenzima, koji u fiziološkim procesima razmjene tvari imaju istu ulogu. Postojanje ovih izoenzima, a time i različitih gena može se dokazati analizom biokemijskih, odnosno izoenzimskih biljega.

Za analizu izoenzimskim biljega obično se rabe dijelovi biljnih tkiva iz sjemena ili dormantnih zimskih pupoljaka, iz kojih je pomoću pufernih rastvora mogu-

će izolirati bjelančevine (Konnert, 1995). Nakon što se izolirane bjelančevine postave u odgovarajući medij – nosac (gel), te u električno polje istosmjerne struje, zbog svojega različitog električnog naboja u mediju migriraju na različita rastojanja, što je uvjetovano različitim sastavom aminokiselina. Nakon nekoliko sati razdvajanja u električnom polju, kada su se molekule dovoljno razdvojile, mogu se kemijskim postupkom obojiti te postati vidljive uporabom fizioloških bojila. Kao konačan rezultat imamo obojene vrpce (linije), koje svojim različitim položajem mogu pokazati različite varijante istoga gena. Na temelju ovoga može se zaključiti kojoj genetičkoj varijanti pripada istraživani uzorak, odnosno stablo. Rutinska jednostavnost ovoga postupka, kao i laka uporaba kod svih vrsta šumskog drveća, omogućuju da se ove metode koriste u mnogim laboratorijima.

1.2 ŠUMSKA SASTOJINA – GENETIČKI VARIJABILNA POPULACIJA

Forest stand – genetically variable population

Svaka od šumskih sastojina predstavlja jednu populaciju, koja se sastoji od većeg broja stabala, s različitim fenotipskim izgledom. Pojava varijabilnosti u ovom slučaju nije samo posljedica utjecaja okoliša, nego je posljedica različitih genetičkih struktura pojedinih članova sastojine. Genetička raznolikost individuala jedne populacije označava se pak kao individualna genetička varijabilnost. Prema tome, jedna populacija šumskog drveća pokazuje genetički utoliko veću varijabilnost ukoliko se u njoj nalazi više različitih alela. Inače, genetička varijabilnost se ne smije izjednačavati sa brojnošću vrste. Tako i kod umjetno podignutih nasada, tzv. monokultura možemo imati veliku genetičku varijabilnost, ako se pojedinačna stabla razlikuju po svojim nasljednim obilježjima.

Svako stablo na jednom genloku ima dvije jednake ili različite gen varijante, odnosno alela. Prema zastupljenosti alela u jednoj populaciji, a što je iskazano u postocima, dobivamo genetičku strukturu populacije. Struktura nam pokazuje koliko se alela može naći u sastojini i s kojom su učestalošću zastupljeni pojedini

aleli. Tako se mogu razlikovati sastojine, posebno po tome što nedostaju neki od alela u populaciji, a nalazimo ih u drugoj populaciji, a s druge strane, razlika je i u samoj učestalosti pojedinih alela.

Budući da istraživanje svih stabala u jednoj sastojini zahtijeva mnogo vremena i sredstava, genetičku strukturu populacije procjenjujemo na temelju uzorka koji treba da predstavlja sastojinu. U znanstvenim krugovima postoje točni proračuni koliko treba uporabiti uzorka da bi oni reprezentirali sastojinu, odnosno populaciju. Na temelju toga može se s odgovarajućom vjerojatnošću doći do pokazatelja genetičke varijabilnosti, odnosno do učestalosti pojedinih alela.

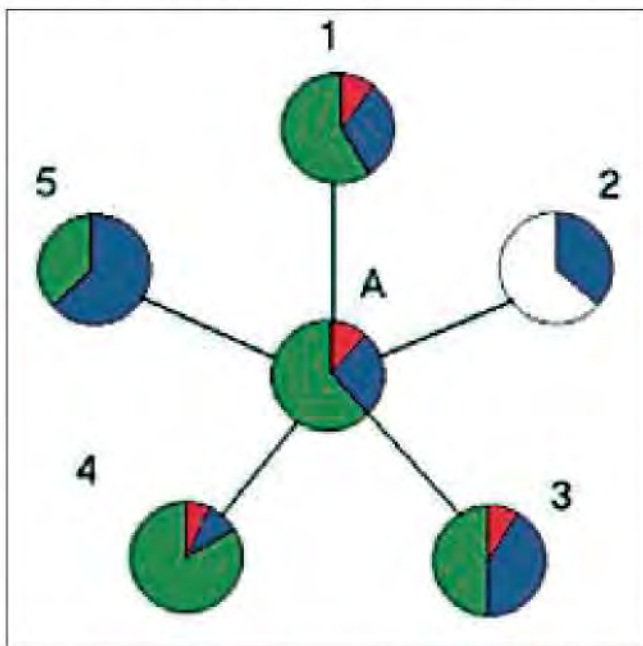
1.3 MOGUĆNOSTI KONTROLE PODRIJETLA SJEMENA, SADNOG MATERIJALA ILI PLANTAŽA POMOĆU ANALIZE IZOENZIMSKIH BILJEGA – PO NAČELU ISKLJUČIVANJA

The possibility of controlling the origin of seed, plant material or plantations with the analysis of isoenzyme markers using the exclusion principle

Prema Gregoriusu i sur. (1984), ako se za kontrolu biljnog materijala rabi analiza izoenzimskih biljega, potrebno je ponajprije odgovoriti na dva pitanja:

- Da li su u dva ili više uzoraka prisutni iste aleli, odnosno jesu li su samo oni prisutni?
- Da li je učestalost alela u uzorcima koji se uspoređuju ista?

Za šumare je važno da se na znanstveno priznat način ispita podrijetlo polaznog materijala, kao i podrijetlo materijala koji služi u reproduktivne svrhe. To je vrlo jednostavno kod kontrole klonskog materijala analizom izoenzimskih biljega, jer sve jedinice istog klona moraju pokazati iste vrpce na zimogramu kako kod roditelja (ortete), tako kod potomstva (rameta).



Slika 2. Sustav isključivanja pet populacija prema Gregoriusu i sur. (1984)

Figure 2 System of exclusion of five populations according to Gregorius et al. (1984)

Daleko složenija situacija je kod materijala generativnog podrijetla. Uz već rečeno, ovdje se ne može jed-

nostavno 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. U tom se slučaju pristupa načelima isključivanja, kako je predložio Gregorius i sur. (1984).

Uspoređivanjem početnog materijala jedne sastojine, sjemena koje je proizvedeno u istoj sastojini, kao i sadnica proizvedenih iz tog sjemena, može se samo zaključiti prisutnost stranih nasljednih svojstava, te je to dokaz da sjeme ne potječe iz dane sastojine. Ako se, pak, u sastojini javljaju isti aleli, to još ne potvrđuje pripadnost istoj sastojini, odnosno populaciji, jer uvijek mogu postojati sastojine s istim alelima, iz kojih potječe biljni reprodukcijski materijal.

Tako genetičkim istraživanjima, odnosno analizom izoenzimskih i DNK biljega možemo samo reći da reprodukcijski materijal potječe ili ne potječe iz određene sastojine, što je detaljno opisano u radu Gregoriusa i sur. (1984) i Konnertove (1999).

Tako dolazimo do vrlo ilustrativnog primjera koji je dan u radu Gregoriusa i sur. (1984) i Konnertove (1999). Prema tomu, partija sjemena ili sadnica (A) sa sigurnošću ne potječe iz populacija 2 i 5, ali se ne može isključiti da one ne vode podrijetlo iz populacija 1, 3 i 4 (slika 2). Ovo pak ne znači da se analiza izoenzima kao kontrolni instrument ne može uključiti u poslove kontrole. Pravilnim poznavanjem genetičke varijabilnosti jedne vrste, kao i mehanizama nasljeđivanja, te pravilnim izborom uzoraka za uspoređivanje analiza izoenzimskih biljega može dati značajne spoznaje o podrijetlu vrste.

Suvremene statističke metode ponekad vrlo uspješno omogućavaju da se odredi pripadnost uzoraka određenoj populaciji, a imamo slučajeve da to ostaje sakriveno u masi statističkih podataka. Kao vrlo pouzdane rabe se metode SAS analize (Statistic Analysis Sistem), klasteranalize ili PCA analize (Principal Component Analysis), kao i neki slični računalni programi.

2. MATERIJAL I METODA RADA – Materials and methods of work

Kao osnova za analizu iskorišteni su podaci prezentirani u istraživanjima Balliana i sur. (2004 i 2006). Za identifikaciju Pančičeve omorike u plantaži s područja Kaknja, selekcionirano je 50 stabala, kao što je ranije urađeno i u 12 prirodnih populacija Pančičeve

omorike (tablica 1). Tako je prema ranije priznatoj metodologiji sabrano 50 grančica s dormantnim pupovima, sa slučajno izabranih stabala, ali ipak ravnomjerno raspoređenih u plantaži.

Uz to i relativno visok broj alela koji je nađen u plantaži kod Kaknja (tablica 4) ukazuje na to da su u plantaži prisutni svi istraživani aleli iz prirodnih populacija. Taj rezultat dodatno upućuje na to da je plantaža vjerojatno osnovana od materijala koji vodi podrijetlo iz različitih prirodnih populacija Pančičeve omorike.

Ovo ipak moramo uzeti s rezervom, ako znamo da za analizu nije korišten velik broj uzoraka, odnosno možda veličina uzorka nije bila optimalna, te da u ovom slučaju možda imamo pojavu rijetkih alela u malom uzorku. Na pojavu tih problema upozorava Hüssendorf (1996) kod istraživanja koje je proveo s običnom jelom, kada se bavi problematikom određivanja optimalnog broja uzoraka koji će predstavljati populaciju.

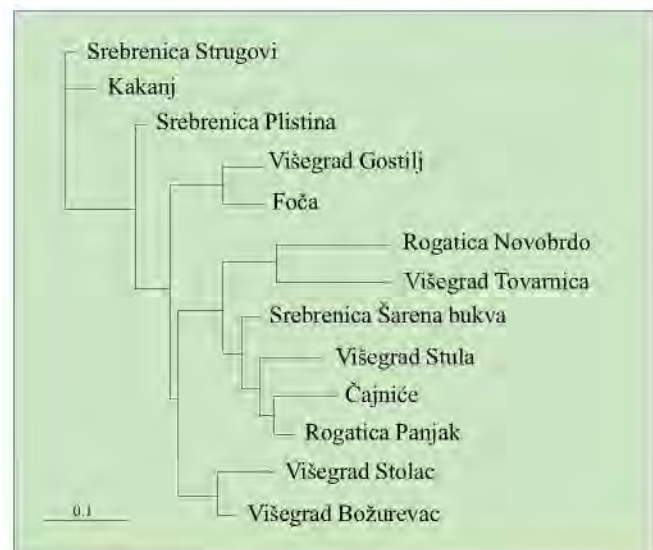
Tablica 4. Genetička varijabilnost
Table 4 Genetic variability

Broj No.	Populacija Population	Ukupni broj alela Total no. of alleles	Broj alela po lokusu No. of alleles by loci	Postotak polimornih lokusa Percentage of polymorphous loci	Stvarna heterozigotnost Actual heterozygosity	Očekivana heterozigotnost Expected heterozygosity
1.	Strugovi	20	1,3	25,0	0,047	0,082
2.	Šarena bukva	21	1,3	31,3	0,018	0,017
3.	Vigor	20	1,3	25,0	0,096	0,092
4.	Stolac	19	1,2	18,8	0,060	0,047
5.	Božurevac	19	1,2	18,8	0,107	0,069
6.	Tovarnica	18	1,1	12,5	0,058	0,046
7.	Karaula štula	21	1,3	25,0	0,111	0,106
8.	Gostilj	19	1,2	18,8	0,044	0,055
9.	Panjak	19	1,2	18,8	0,132	0,083
10.	Novo brdo	21	1,3	25,0	0,100	0,085
11.	Govza	20	1,3	25,0	0,074	0,081
12.	Pliščina	18	1,1	12,5	0,024	0,046
13.	Kakanj	23	1,4	37,5	0,070	0,093



Slika 3. Dendrogram 1 baziran je na genetičkim rastojanjima prema Neiu (1978)

Figure 3 Dendrogram 1 is based upon genetic distance as determined by Nei (1978)



Slika 4. Dendrogram 2 baziran je na genetičkim rastojanjima prema klaster metodi Pritcharda i sur. (2000)

Figure 4 Dendrogram 2 is based upon cluster method of Pritchard et al. (2000)

- Burschel, P., 1965: Die Omorikafichte. Forstarchiv 36 (6/7): 113–131.
- Fukarek, P., 1951: Današnje rasprostranjenje Pančićeve omorike (*Picea omorika* Pančić) i neki podaci o njenim sastojinama. Godišnjak Biol. Instituta u Sarajevu, br. 1–2: 141–198.
- Fukarek, P., 1957: Neke starije i novije rasprave o Pančićevoj omorici. Šumarstvo: 245–257.
- Fukarek, P., 1974: Neke vrste drveća i grmlja koje su pogrešno navedene u flori Bosne i Hercegovine i susjednih krajeva. [Einige Baum- und Straucharten die irrtümlich in die Flora von Bosnien, der Herzegovina und der benachbarten Gebieten eingetragen wurden]. Akad. nauka i umjetnosti BiH, radovi LIV, knjiga 15: 45–60.
- Geburek, T. H. 1986: Some results of inbreeding depression in Serbian spruce (*Picea omorika* /Pančić/ Purk.). Silvae Genet. 35: 169–172.
- 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.
- Hussendörfer, 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.
- Konnert, M., 1995: Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies* /L./ Karst.) und Weißtanne (*Abies alba* Mill.) – Anleitung zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme, Teisendorf.
- Konnert, M., 1999: Herkunftsüberprüfung mit biochemisch-genetischen Methoden; Der Weihnachtsbaum, No 5, pp 4–9, Gudensberg.
- Krstić, M., 1950: Morfološke i biometričke pojedinsti fruktifikacije *Picea omorika* Panč. – Kvaliteta sjemena. Ins. Za naučna istraživanja u šum. NRS, Beograd: 1–23.
- Kuittinen, H., O. Muona, K. Kärkkäinen, Ž. Borzan, 1991: Serbian spruce, a narrow endemic, contains much genetic variation. Can. J. For. Res. Vol. 21: 363–367.
- Kuittinen, H., O. Savolainen, 1992: *Picea omorika* is self-fertile but outcrossing conifer. Heredity, 68: 183–187.
- Lagercrantz, U., N. Ryman, G. Stahl, 1988: Protein loci in diploid tissue of Norway spruce (*Picea abies* K.): description and interpretation of electrophoretic variability patterns. Hereditas 108: 149–158.
- Langner, W., 1959: Selbstfertilität und Inzucht bei *Picea Omorika* (Pančić) Purkyne. Silvae Genet. 8: 84–93.
- Mai, D. H., J. Majewski, K. P. Unger, 1963: Pliozän und Altpleistozän von Rippersroda in Thüringen. Geologie 765–815.
- Muona, O., R. Yazdani, G. Lindqvist, 1987: Analysis of linkage in *Picea abies*. Hereditas 106: 31–36.
- Nei, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583–590.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, P. Donnelly, 2000: Inference of population structure from multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
- Poulsen, H. D., V. Simonsen, H. Wellendorf, 1983: The inheritance of six isozymes in Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). Forest Tree Improvement 16: 12–33.
- Ravazzi, C., 2002: Late Quaternary history of spruce in southern Europe. Review of Palaeobotany and Palynology 120: 131–177.
- Savolainen, O., K. Kärkkäinen, H. Kuittinen, 1992: Estimating numbers of embryonic lethals in conifers. Heredity, 69: 308–314.
- Savolainen, O., H. Kuittinen, 2000: Small Population Processes. In: Young, A., Boshier, D., Boyle, T., Ed. Forest Conservation Genetics – Principles and Practice, CABI – Publishing, Wallingford 91–100.
- Swofford, K. N. Selander, 1981: Boisys 1 – a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Her., 72: 281–283.
- Tošić, M., 1983: O jednom novom nalazištu Pančićeve omorike (*Picea omorika* Pančić) u Srbiji [On a new locality of the Pančić spruce (*Picea omorika* Pančić) in Serbia]. Akad. nauka i umjetnosti BiH, radovi LXXII, knjiga 21: 267–274.

SUMMARY: In this study we tried to identify and determine the origin of the Serbian spruce from the Kakanj plantation, covering the space of 8,2 ha, with the means of molecular genetic analysis. We applied the isoenzyme markers analysis to verify the obtained data from the molecular genetic identification of natural populations of Serbian spruce, and those from the said plantation. A total of 12 enzyme systems with 16 gene loci have been used, with 24 alleles analyzed.

Based on the statistical analysis in the computer program BIOSYS-1 (Swofford & Selander 1981), according to Ballian et. al (2006), the genetic variability of 12 natural populations, where 16 isoenzyme loci were studied, strong differentiation was obtained ($F_{st} = 0,261$), but with exclusion of the Kakanj plantation which exhibited a rather low differentiation. Here we cannot speak about the presence of geographic genetic differentiation in the cline form. It was determined that alleles with the studied populations had randomly distributed frequencies. Out of the obtained results it is apparent that Serbian spruce plantation in Kakanj is poorly differentiated, and this supports the opinion of its mixed origin (according to Ballian et. al. 2006). If we take a more detailed look at the obtained dendrogram, which was obtained on the basis of genetic distance between the studied populations, where the Kakanj plantation occupies a totally unexpected position, this can additionally confirm its mixed origin.

The results obtained through this study, by isoenzyme markers analysis, show that our present possibilities to confirm the origin of Serbian spruce are relatively limited. The offered system of identification by this method might in the future prove acceptable as the initial studies exhibited good results, even though we still cannot entirely systemize the analyzed plantation to certain population or populations. We should therefore continue with basic studies with the aim to create a more detailed genetic picture of the spruce populations, with larger number of enzyme systems, that is, gene loci, which would encompass all natural populations, and groups of trees in Bosnia and Herzegovina and Serbia, which is a long lasting and expensive effort.