

Srodstveni odnosi svojti roda *Pistacia* L. (Anacardiaceae) u Hrvatskoj primjenom AFLP molekularnih biljega

Šola, Zrinka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:045632>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM

ZRINKA ŠOLA

**Srodstveni odnosi svojiti roda *Pistacia* L. (Anacardiaceae) u Hrvatskoj
primjenom AFLP molekularnih biljega**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

**Srodstveni odnosi svojiti roda *Pistacia* L. (Anacardiaceae) u Hrvatskoj
primjenom AFLP molekularnih biljega**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim gospodarenjem

Predmet: Methods of plant taxonomy

Ispitno povjerenstvo: 1. doc. dr. sc. Martina Temunović (mentor)

2. prof. dr. sc. Željko Škvorc (član)

3. izv. prof. dr. sc. Daniel Krstonošić (član)

Student: Zrinka Šola

JMBAG: 0068221618

Datum odobrenja teme: 05. svibnja 2023.

Datum predaje rada: 04. srpnja 2023.

Datum obrane rada: 14. srpnja 2023.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov	Srodstveni odnosi svojiti roda <i>Pistacia</i> L. (Anacardiaceae) u Hrvatskoj primjenom AFLP molekularnih biljega
Autor	Zrinka Šola
Adresa autora	Bana Emerika Derenčina 6, 31400 Đakovo
Mjesto izrade	Fakultet šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	doc. dr. sc. Martina Temunović
Komentor	
Godina objave	2023.
Obujam	Broj stranica 61, slika 40, tablica 15, navoda literature 102
Ključne riječi	<i>Pistacia</i> , AFLP, taksonomija, molekularna sistematika, <i>P. calcivora</i> , <i>P. × saportae</i>
Sažetak	<p>U hrvatskoj flori rod <i>Pistacia</i> L. (Anacardiaceae) zastupljen je s četiri svojite: <i>P. lentiscus</i> L., <i>P. terebinthus</i> L., njihov križanac <i>P. × saportae</i> Burnat i kultivirana <i>P. vera</i> L.. Radić (1985) je dodatno opisao navodnu endemsku svojtu <i>P. calcivora</i> Radić na području Biokova. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi srodstvene odnose između četiri pretpostavljene autohtone svojite roda <i>Pistacia</i> u Hrvatskoj (<i>P. lentiscus</i>, <i>P. terebinthus</i>, <i>P. × saportae</i> i <i>P. calcivora</i>) upotrebom AFLP molekularnih biljega. Specifični ciljevi bili su utvrditi prisutnost hibridne svojite <i>P. × saportae</i> i utvrditi taksonomski status <i>P. calcivora</i>. U tu svrhu prikupljeni su uzorci potencijalno hibridnih jedinki <i>P. × saportae</i> s otoka Šolte, Korčule i Visa te tri populacije <i>P. calcivora</i> s planine Biokovo, a jedinke su identificirane na temelju morfologije listova. Također, na svakoj lokaciji uzorkovanja prikupljeni su uzorci obiju roditeljskih vrsta (<i>P. lentiscus</i> i <i>P. terebinthus</i>). Rezultati ovoga istraživanja ukazali su na dvije odvojene genetske grupe. Prva grupa uključuje sve jedinke svojiti <i>P. terebinthus</i> i <i>P. calcivora</i>, što ukazuje da na molekularnoj razini nema podrške za opisani takson <i>P. calcivora</i>. Druga grupa uključuje sve jedinke <i>P. lentiscus</i> i većinu navodnih hibridnih jedinki <i>P. × saportae</i>. Za četiri jedinke <i>P. × saportae</i> utvrđen je hibridni karakter, što potvrđuje prisutnost svojite <i>P. × saportae</i> u hrvatskoj flori i na molekularnoj razini.</p>

BASIC DOCUMENTATION CARD

Title	Phylogenetic relationships among <i>Pistacia</i> L. (Anacardiaceae) taxa in Croatia using AFLP molecular markers
Author	Zrinka Šola
Address of author	Bana Emerika Derenčina 6, 31400 Đakovo
Thesis performed at	Faculty of Forestry and Wood Technology, University of Zagreb
Publication tipe	Master thesis
Supervisor	Assistant Professor Martina Temunović, PhD
Assistant	
Publication year	2023.
Volume	Number of pages 61, figures 40, tables 15, references 102
Key words	<i>Pistacia</i> , AFLP, taxonomy, molecular systematics, <i>P. calcivora</i> , <i>P. × saportae</i>
Abstract	In the Croatian flora the genus <i>Pistacia</i> L. (Anacardiaceae) is represented with <i>P. lentiscus</i> L., <i>P. terebinthus</i> L., their hybrid <i>P. × saportae</i> Burnat and cultivated <i>P. vera</i> L. Additionally, in 1985, Radić described <i>P. calcivora</i> Radić as an endemic taxon from the Mt. Biokovo. Aim of this research was to determine genetic relationships between four putative indigenous taxa of the genus <i>Pistacia</i> in Croatia (<i>P. lentiscus</i> , <i>P. terebinthus</i> , <i>P. × saportae</i> and <i>P. calcivora</i>) using AFLP molecular markers. Specifically, aim was to confirm the presence of the hybrid <i>P. × saportae</i> and to determine the taxonomic status of <i>P. calcivora</i> . For this purpose, putative hybrid individuals of <i>P. × saportae</i> from the islands of Šolta, Korčula and Vis, as well as three populations of <i>P. calcivora</i> from the Mt. Biokovo were collected, identified based on leaf morphology. In addition, at each sampling site individuals of both parental species (<i>P. lentiscus</i> and <i>P. terebinthus</i>) were collected. Results indicate the presence of two separated genetic groups. First group included all individuals of <i>P. terebinthus</i> and <i>P. calcivora</i> , showing that there is no support for the described taxon <i>P. calcivora</i> at the molecular level. The second group included all individuals of <i>P. lentiscus</i> and the majority of individuals of the potential hybrid taxon <i>P. × saportae</i> . However, four individuals clearly showed a hybrid character, affirming the presence of the hybrid taxon <i>P. × saportae</i> in Croatian flora at the molecular level.

	IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI	OB FŠDT 05 07
		Revizija: 2
		Datum: 29.04.2021.

„Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni“.

U Zagrebu, 14. srpnja 2023. godine

vlastoručni potpis

Zrinka Šola

Predgovor

Istraživanje provedeno u ovome diplomskom radu dio je znanstveno-istraživačkog studentskog projekta „Primjena genetičkih biljega za utvrđivanje taksonomskih odnosa drvenastih vrsta (gentakso)“ u kojemu sam sudjelovala kao voditeljica projekta, akad. god. 2021./22., a koje je financirao Fakultet šumarstva i drvne tehnologije.

Ovo istraživanje nikako ne bih mogla provesti bez mentorice doc. dr. sc. Martine Temunović i prof. dr. sc. Sandra Bogdanovića koji su osmislili istraživanje i prikupili biljni materijal potreban za njegovu provedbu. Na tome im posebno zahvaljujem. Neizmjerne mi je žao što nisam mogla sudjelovati u prikupljanju biljnoga materijala, ali odlazak u „Herbar Biokovskog područja“ (MAKAR) fra Jure Radića radi boljeg uvida u holotip navodne vrste *P. calcivora* s oduševljenjem sam prihvatila kao vjerodostojni nadomjestak za propušteno iskustvo. Zahvaljujem fra Stanku, gvardijanu Franjevačkog samostana Blažene Djevice Marije na nebo uznesene u Makarskoj što nam je omogućio pristup Herbaru Biokovskog područja te prijateljici Kački što nas je ugostila na najsrdajni način.

S obzirom na dugo razdoblje studiranja, ili bolje rečeno prokrastinacije, sretna sam što napokon završava jedna faza mogega života. Sretna sam i što sam Martinu odabrala za mentoricu. Bila je mentorica u pravom smislu te riječi. Bila mi je uvijek na raspolaganju, a od osobina koje ju krasi bih istaknula stručnost, strpljenje i razumijevanje. Bilo mi je jako bitno da tijekom istraživanja što više toga odradim samostalno i mogu reći da sam u tom pogledu jako zadovoljna. Posvetila mi je jako puno vremena, dala jako puno podrške i poticala me na usavršavanje. Objektivno, Martina je bila najbolja mentorica i ne znam na koji način bih mogla izraziti zahvalnost koju osjećam jer osjećam kako bi „hvala“ bilo zaista premalo. Najboljoj mentorici zahvaljujem na ljubaznosti da svoje dragocjeno vrijeme potroši na ovo istraživanje te čitanje i prepravljanje brojnih verzija ovoga diplomskog rada.

Željela bih zahvaliti i prof. dr. sc. Zlatku Liberu koji mi je dozvolio pohađati nastavu iz kolegija „Filogenija i molekularna sistematika“, iako nisam uspjela upisati kolegiju u ISVU sustavu, te prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću na izvrsnom pojašnjavanju filogenetskih metoda i statistike. Bez materijala i softvera koje smo učili koristiti na kolegiju vrlo teško bih sama uspjela provesti analize podataka korištene u ovome istraživanju. Stoga im zahvaljujem na prenesenom znanju.

Zahvale upućujem i svojim roditeljima Peri i Sanji. Hvala im prije svega na financijskoj podršci tijekom studiranja, a mami Sanji i na prepravljanju gramatičkih pogrešaka. Hvala mojoj braći i sestrama Krešimiru, Viktoru, Josipi i Marti što su me poticali da ne odustanem i uveseljavali okrećući svaki razgovor na humor, ali i financijski mi pomagali kada je to bilo potrebno. Hvala mojoj dragoj prijateljici Vanji koja mi je uvijek bila podrška i satima sa mnom raspravljala o raznim stručnim i onim manje stručnim temama. Vanji zahvaljujem i na pomoći pri izolaciji DNA u laboratoriju te što me učila pipetirati. Hvala Emi na nezaboravnim avanturama na +40 °C. I hvala mojem dragom Iveku što me vraćao u realnost kada bih malo previše odlutala.

Zrinka Šola

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Rod <i>Pistacia</i> L.....	1
1.2. Svojte roda <i>Pistacia</i> u Hrvatskoj.....	4
1.2.1. <i>Pistacia terebinthus</i> L. – smrdljika.....	5
1.2.2. <i>Pistacia lentiscus</i> L. – tršlja.....	10
1.2.3. <i>Pistacia</i> × <i>saportae</i> Burnat – prijelazna tršlja.....	14
1.2.4. <i>Pistacia calcivora</i> Radić – vapnojed.....	18
1.2.5. <i>Pistacia vera</i> L. – prava tršlja.....	20
1.3. Taksonomska problematika svojti roda <i>Pistacia</i>	22
1.4. Molekularni biljezi u sistematici biljaka.....	27
1.4.1. AFLP (eng. <i>Amplified Fragment Lenght Polymorphism</i>) molekularni biljezi.....	29
2. Cilj istraživanja.....	31
3. Materijal i metode.....	32
3.1. Biljni materijal.....	32
3.2. Izolacija ukupne stanične DNA.....	33
3.2.1. Određivanje koncentracije izolirane DNA.....	34
3.3. Polimorfizam duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (AFLP).....	34
3.3.1. Restrikcija ukupne stanične DNA i ligacija adaptera.....	34
3.3.2. Preselektivna PCR amplifikacija.....	36
3.3.3. Selektivna PCR amplifikacija.....	38
3.4. Detekcija PCR umnoženih fragmenata DNA.....	40
3.5. Statistička analiza podataka i filogenetske analize.....	41
4. Rezultati.....	43
4.1. Identifikacija AFLP-alela i genetska raznolikost populacija.....	43
4.2. Genetska struktura i srodstveni odnosi istraživanih populacija.....	45
5. Rasprava.....	51
6. Zaključak.....	54
7. Literatura.....	55

POPIS SLIKA

Slika 1. Globalna rasprostranjenost roda <i>Pistacia</i>	2
Slika 2. Rasprostranjenost roda <i>Pistacia</i> u Sredozemlju i na Bliskom istoku.....	3
Slika 3. Rasprostranjenost roda <i>Pistacia</i> u Hrvatskoj.....	4
Slika 4. Morfološka obilježja smrdljike (<i>P. terebinthus</i>).....	6
Slika 5. Crvene šiške (entomocecidije) slične rogaču (tzv. „Judini rogači“) na lišću smrdljike (<i>P. terebinthus</i>) nastale ubodom kukca <i>Baizongia pistaciae</i>	7
Slika 6. Morfološka obilježja smrdljike (<i>P. terebinthus</i>) i tršlje (<i>P. lentiscus</i>).....	7
Slika 7. Rasprostranjenost smrdljike (<i>P. terebinthus</i>) u Sredozemlju i na Bliskom istoku	8
Slika 8. Rasprostranjenost smrdljike (<i>P. terebinthus</i>) u Hrvatskoj.....	9
Slika 9. Morfološka obilježja tršlje (<i>P. lentiscus</i>).....	11
Slika 10. Smolasti sok (mastiks) dobiven zarezivanjem kore tršlje (<i>P. lentiscus</i>) i sušenjem na suncu	11
Slika 11. Prirodna rasprostranjenost tršlje (<i>P. lentiscus</i>) u Sredozemlju, Africi i na Bliskom istoku	12
Slika 12. Rasprostranjenost tršlje (<i>P. lentiscus</i>) u Hrvatskoj	13
Slika 13. Listovi i sjemenke: a – <i>P. terebinthus</i> , b – <i>P. × saportae</i> , c – <i>P. lentiscus</i>	15
Slika 14. a) Listovi svojte <i>P. × saportae</i> s otoka Korčule b) Listovi <i>P. terebinthus</i> (lijevo), <i>P. × saportae</i> (sredina) i <i>P. lentiscus</i> (desno) s otoka Visa	15
Slika 15. Herbarijski primjerak svojte <i>P. × saportae</i> sakupljen na području Biokova 1985. godine iz herbarijske zbirke „Herbar Biokovskog područja“ (MAKAR) dr. fra Jure Radića u Makarskoj	16
Slika 16. Rasprostranjenost svojte <i>P. × saportae</i> na Mediteranu	17
Slika 17. Rasprostranjenost svojte <i>P. × saportae</i> u Hrvatskoj	17
Slika 18. Lijevo - listovi svojte <i>P. calcivora</i> koja raste u podnožju Biokova; desno – dobro uočljiva varijabilnost listova i raznolikost oblika liski na lokalitetu Kotišina (Biokovo).....	18
Slika 19. Holotip jadranskog smrdelja ili vapnojeda (<i>P. calcivora</i>) iz herbarijske zbirke „Herbar Biokovskog područja“ (MAKAR) dr. fra Jure Radića u Makarskoj.	19
Slika 20. Svojta <i>P. calcivora</i> na klisuri iznad Makra na Biokovu, nekada (1985. godine) i danas.	20
Slika 21. Ilustracija listova i plodova prave tršlje (<i>P. vera</i>).	21
Slika 22. Rasprostranjenost prave tršlje (<i>P. vera</i>)	22
Slika 23. Glavne taksonomske podjele roda <i>Pistacia</i> prema različitim autorima.	23
Slika 24. Sistematska podjela roda <i>Pistacia</i> prema AL-Saghir i Porter (2012).	23

Slika 25. Usporedba sistematske podjele roda <i>Pistacia</i> na sekcije prema Zohary (1952) i rezultata istraživanja Golan-Goldhirsh (2009) temeljenim na morfološkim analizama i molekularnim analizama upotrebom molekularnih biljega (RAPD i AFLP).	24
Slika 26. Rasprostranjenost 11 vrsta i jedne hibridne svojte roda <i>Pistacia</i> prema Yi i dr. (2008)	26
Slika 27. Shematski prikaz postupka provedbe AFLP tehnike.....	30
Slika 28. Karta lokaliteta populacija roda <i>Pistacia</i> u Hrvatskoj iz kojih je prikupljen biljni materijal.....	33
Slika 29. Određivanje koncentracije izolirane DNA na uređaju Nanophotometer P330 (Implen®)	34
Slika 30. PCR program za preselektivnu amplifikaciju na uređaju Mastercycler EP Gradient (Eppendorf AG).	37
Slika 31. PCR-pločica korištena za provedbu AFLP metode u Molekularno-biološkom laboratoriju na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije.....	39
Slika 32. Veličina fragmenata i visina pikova AFLP-alela korištenih raznih selektivnih početnica u programu GeneMapper 5.0.....	40
Slika 33. Binarna Excel (.xlsx) tablica identificiranih AFLP-alela u programu GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems).	43
Slika 34. Binarna Excel (.xlsx) tablica reduciranog finalnog skupa 584 polimorfnih AFLP-alela dobivenih pomoću funkcije scanAFLP u R programu.....	44
Slika 35. Analiza glavnih koordinata (PCoA) na temelju matrice udaljenosti po Diceu između svih jedinki provedena u programu PAST 3.22.....	46
Slika 36. Optimalan broj genetskih skupova (K) i pripadajuća ΔK vrijednost za svaki pretpostavljeni K izračunata i vizualizirana pomoću programa STRUCTURE i STRUCTURE HARVESTER v0.6.94.	47
Slika 37. Genetska struktura istraživanih jedinki i populacija temeljem programa STRUCTURE vizualizirana pomoću programa CLUMPAK za $K = 2$	47
Slika 38. Filogenetsko stablo na temelju matrice udaljenosti između jedinki po Diceu konstruirano metodom sparivanja susjeda (eng. <i>neighbour-joining</i> ; NJ) u programu PAST 3.22.	48
Slika 39. Nezakorijenjeno <i>neighbour-joining</i> (NJ) filogenetsko stablo konstruirano na temelju matrice udaljenosti između jedinki po Diceu u programu FigTree v1.4.4.....	49
Slika 40. Neighbor-net dijagram konstruiran na temelju matrice udaljenosti po Diceu u programu SplitsTree 4 koji prikazuje srodstvene odnose između istraživanih jedinki u obliku filogenetske mreže.	50

POPIS TABLICA

Tablica 1. Taksonomska klasifikacija roda <i>Pistacia</i>	1
Tablica 2. Popis prihvaćenih svojti roda <i>Pistacia</i>	2
Tablica 3. Broj populacije, svojta, lokalitet, broj jedinki (n) i koordinate populacija (x i y) roda <i>Pistacia</i> u Hrvatskoj iz kojih je prikupljen biljni materijal.	32
Tablica 4. Naziv i sekvenca adaptera za ligaciju korištenih u restriksijsko-ligacijskoj smjesi.	35
Tablica 5. Priprema smjese restriksijskih enzima (eng. <i>restriction enzyme mix</i>) za 140 uzoraka.	35
Tablica 6. Priprema EcoRI ligacijske smjese.	35
Tablica 7. Priprema TruII ligacijske smjese.	35
Tablica 8. Reagensi i njihove koncentracije te ukupne količine u restriksijsko-ligacijskoj smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.	36
Tablica 9. Naziv i sekvenca početnica za preselektivnu PCR amplifikaciju.	36
Tablica 10. Reagensi, njihove koncentracije i količine u preselektivnoj PCR smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.	36
Tablica 11. PCR program za preselektivnu amplifikaciju.	37
Tablica 12. Naziv, korištena fluorescentna boja i sekvenca početnica za selektivnu PCR amplifikaciju.	38
Tablica 13. Reagensi i njihove koncentracije te količine u selektivnoj PCR smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.	38
Tablica 14. PCR program za selektivnu PCR amplifikaciju.	39
Tablica 15. Parametri genetske raznolikosti istraživanih populacija temeljem AFLP biljega.....	45

1. Uvod

1.1. Rod *Pistacia* L.

Rod (lat. *genus*) *Pistacia* L. pripada porodici vonjača ili rujeva (lat. *familia Anacardiaceae*) (Tablica 1). Ovaj rod prvi puta je opisao Linné u poznatom djelu *Species Plantarum* (1753) te je tvrdio kako tome rodu pripada šest vrsta, od kojih su *P. lentiscus* L., *P. terebinthus* L. i *P. vera* L. do danas zadržale svoj taksonomski status vrste. Vrste ovoga roda disjunktno su rasprostranjene od Meksika do srednje Amerike, od Mediterana do srednje Azije, te od sjeveroistočnog do istočnog tropskog dijela Afrike (Slika 1). Trenutačno rod *Pistacia* prema „Plants of The World Online” bazi podataka (POWO 2023), koja se redovito ažurira, obuhvaća 13 prihvaćenih taksona, od toga 11 prihvaćenih vrsta, dvije podvrste i jednu hibridnu svojtu (Tablica 2). U ovome radu slijedit ćemo prihvaćene svojte i taksnomiju roda *Pistacia* prema POWO (2023).

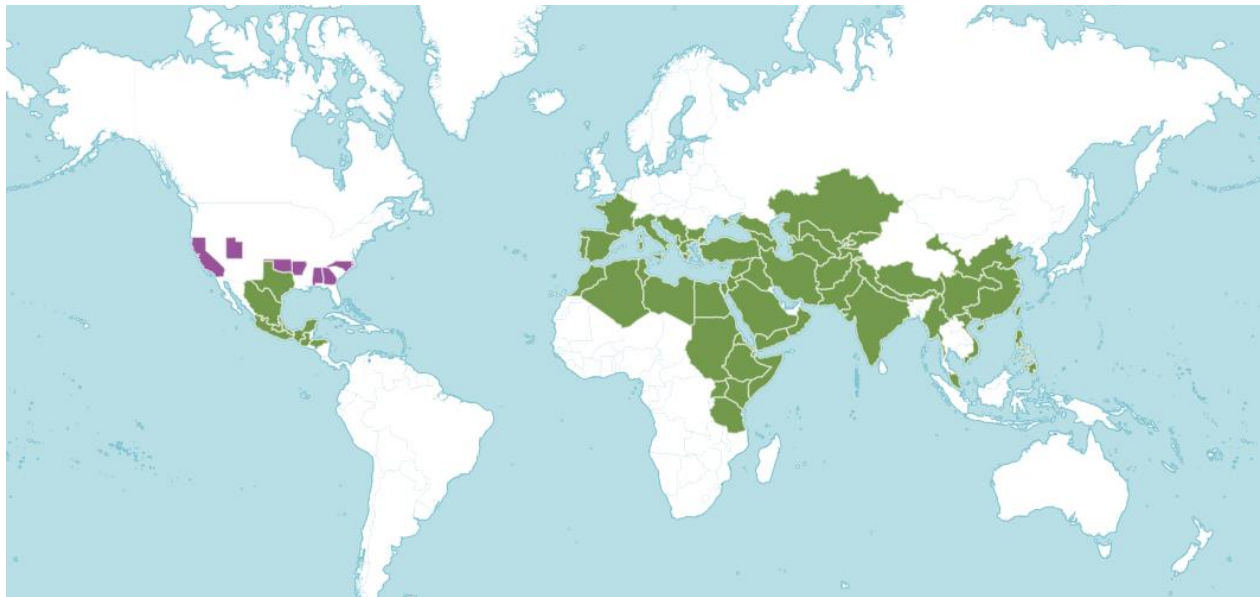
Svojte ovoga roda su dvodomna (diecijska), rijetko jednodomna (monecijska), listopadna ili vazdazelena, kserofitna stabla ili grmovi s dobro razvijenim smolnim kanalima (AL-Saghir 2010; AL-Saghir i Porter 2012). Lišće je naizmjenično raspoređeno, parno ili neparno perasto sastavljeno, ponekad troliskavo ili jednostavno, kutinizirano ili kožasto, bez palistića (lat. *stipulae*) (AL-Saghir i Porter 2012). Cvjetovi su sitni i neugledni, u grozdastim ili metličastim cvatovima, jednospolni ili dvospolni (Forenbacher 1990). Plodovi i sjemenke pojedinih vrsta jestivi su i hranjivi, ili služe kao začini (Giperborejski i Marković 1952). Iako rod ne broji puno vrsta, s obzirom na njegovu vrlo široku geografsku rasprostranjenost, neke od njih poput prave tršlje ili pistače (*P. vera*) imaju veliku ekonomsku važnost u zemljama s pogodnim klimatskim uvjetima za njezin komercijalni uzgoj (Sheibani 1995; AL-Saghir 2009; Pazouki i dr. 2010).

Tablica 1. Taksonomska klasifikacija roda *Pistacia* (prema Euro+Med PlantBase, 2006-2023).

<i>Taksonomska kategorija</i>	<i>Taksonomska jedinica</i>
Carstvo (regnum)	Plantae
Odjeljak (divisio)	Tracheophyta
Pododjeljak (subdivisio)	Spermatophytina
Razred (class)	Magnoliopsida
Nadred (superordo)	Rosanae
Red (ordo)	Sapindales Bercht. & J. Presl
Porodica (familia)	Anacardiaceae R. Br.
Rod (genus)	<i>Pistacia</i> L.

Tablica 2. Popis prihvaćenih svojti roda *Pistacia* (prema POWO, 2023).

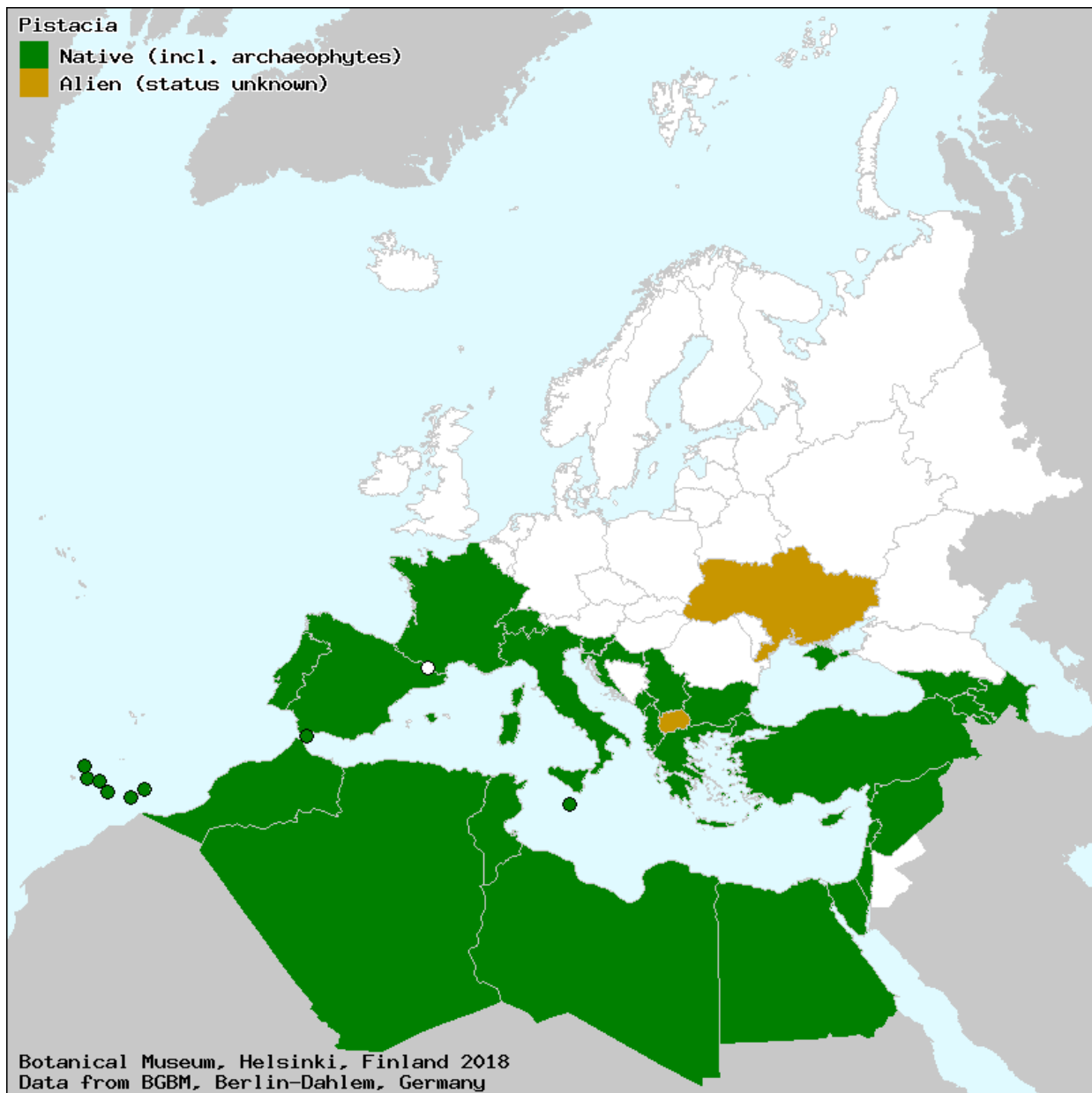
Taksonomska kategorija	Svojta
vrsta	1. <i>Pistacia aethiopica</i> Kokwaro
vrsta	2. <i>Pistacia atlantica</i> Desf.
vrsta	3. <i>Pistacia chinensis</i> Bunge
podvrsta	4. <i>Pistacia chinensis</i> subsp. <i>chinensis</i>
podvrsta	5. <i>Pistacia chinensis</i> subsp. <i>integerrima</i> (J.L.Stewart) Rech.f.
vrsta	6. <i>Pistacia eurycarpa</i> Yalt.
vrsta	7. <i>Pistacia falcata</i> Becc. ex Martelli
vrsta	8. <i>Pistacia khinjuk</i> Stocks
vrsta	9. <i>Pistacia lentiscus</i> L.
vrsta	10. <i>Pistacia mexicana</i> Kunth
vrsta	11. <i>Pistacia terebinthus</i> L.
vrsta	12. <i>Pistacia vera</i> L.
vrsta	13. <i>Pistacia weinmanniifolia</i> J.Poiss. ex Franch.
križanac	14. <i>Pistacia</i> × <i>saportae</i> Burnat



Slika 1. Globalna rasprostranjenost roda *Pistacia*; zeleno – područje prirodne rasprostranjenosti, ljubičasto – područje introdukcije (Izvor: Kew (2023) - International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants, *Pistacia* L. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:1883-1>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

Vrste ovoga roda svojstvene su flori Mediterana i Bliskog istoka (Slika 2), a prema najnovijim biogeografskim istraživanjima porijeklo roda seže u prijelazno razdoblje iz eocena u oligocen prije otprilike 37,6 milijuna godina (Xie i dr. 2014). Prema Golan-Goldhirsh (2009) rod je sporo evoluirao i vjerojatno sačuvao genetsku raznolikost neophodnu za dugovječnost i toleranciju na stresne okolišne uvjete (suša, plitko kamenito tlo, posolica i sl.). Svoje roda *Pistacia* neizostavan

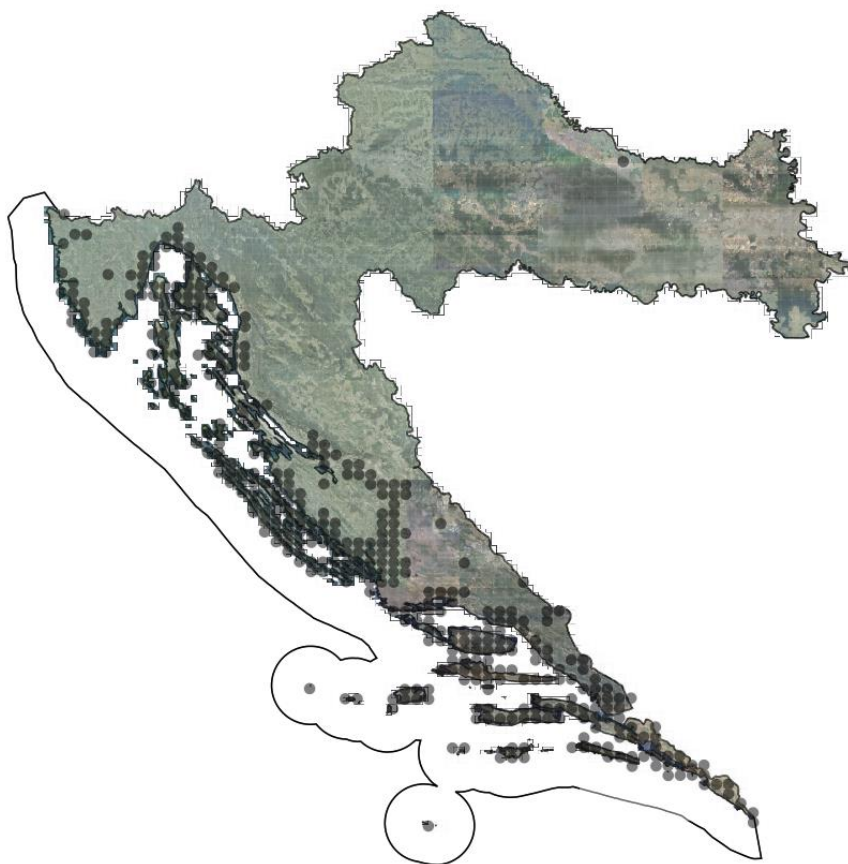
su dio sredozemne vegetacije gdje dolaze na suhim, toplim, kamenitim i stjenovitim staništima, te dobro podnose dugotrajne suše i visoke temperature. Također, drvo vrsta toga roda, posebno *P. terebinthus*, imalo je široku primjenu u stolarstvu i tokarstvu na području Mediterana zbog manjka svih drvnih sortimenata, a koristilo se i za izradu drvenih dijelova finog oruđa te za ogrjev jer sadrži smole koje prilikom izgaranja u prostoriji stvaraju ugodan miris (Tolić 2003).



Slika 2. Rasprostranjenost roda *Pistacia* u Sredozemlju i na Bliskom istoku; zeleno – područje prirodne rasprostranjenosti, žuto – područje introdukcije (Izvor: Euro+Med PlantBase (2006-2023), *Pistacia* L. https://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=435040&size=medium) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

1.2. Svojte roda *Pistacia* u Hrvatskoj

U Hrvatskoj su prisutne četiri svojte roda *Pistacia*: *P. lentiscus*, *P. terebinthus*, njihov križanac *P. × saportae* i *P. vera* koja je kultivirana. Rastu na sunčanim i stjenovitim staništima mediteransko-litoralnog i mediteransko-montanskog vegetacijskog pojasa od Istre do juga Dalmacije (Slika 3). U tim pojasevima velike površine nekadašnjih vrijednih visokih šuma nalaze se u nekom od degradacijskih stadija (makija, garig, pseudomakija, šikara) u kojima su vrste roda *Pistacia* prisutne kao važne irano-turske komponente sredozemne flore (Kovačić i dr. 2008; Vukelić 2012). Međutim, u šumarskoj struci one su zanemarene i njihove meliorativne osobine (razgranat korijenov sustav, dobro podnose sušu i hranjivima siromašna staništa, dobra izbojna snaga, dobro obnavljanje iz panja nakon požara) nisu dovoljno vrednovane (Tolić 2003). U nastavku slijedi detaljniji opis prisutnih svojti. Potrebno je naglasiti kako je uz spomenute svojte u Hrvatskoj, 1985. godine, na području Biokova opisana vrsta *P. calcivora* Radić temeljem morfoloških osobina, a njezin taksonomski status do danas nije razriješen. Stoga nije uvrštena na službene popise o flori određenog područja, primjerice ne navodi se u nacionalnoj bazi podataka o flori Hrvatske „Flora Croatica Database“ (FCD, Nikolić 2023).



Slika 3. Rasprostranjenost roda *Pistacia* u Hrvatskoj (Izvor: Nikolić T. ur. (2015 - 2023), FCD <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/map/search/7531-12380-27580-27579?criteria=>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

1.2.1. *Pistacia terebinthus* L. – smrdljika

Raste kao razgranat listopadni grm ili do 10 m visoko stablo do 1 m prsnog promjera (Slika 4.a), aromatična, smolasta mirisa (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008). Kora je sivkastosmeđa, u mladosti glatka, poslije raspucala u nepravilne, djelomično zaobljene ljuskice (Slika 4.c), sadrži oko 25 % tanina te se upotrebljava u kožarskoj industriji za štavljenje kože (Idžojtić 2005; Šilić 2005; Franjić i Škvorc 2020). Izbojci su debeli, goli, svjetlosmeđi do narančastosmeđi, uzdužno plitko raspucali sa spiralno raspoređenim pupovima koji su krupni, jajasti, tupo ušiljeni, pokriveni većim brojem ljusaka (Slika 4.d, Slika 6). Listovi su naizmjenični, kožasti, na dugim peteljka, dugi 9-16 cm, neparno perasto sastavljeni od 5 do 11 gotovo sjedećih, 3-6 cm dugih i 1-2 cm širokih, jajastih do široko kopljastih liski cijelog ruba, šiljastog ili tupog vrha, klinaste do zaobljene i nešto asimetrične osnove (Slika 4.b, Slika 6) (Idžojtić 2009). Liske su na licu tamnozeleno, gole i izrazito sjajne, a na naličju svjetlozelene (Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2009). Peteljka i lisna os su okruglaste, nisu okriljene. Protrljani listovi neugodnog su mirisa, a u jesen su zagasito crveni (Idžojtić 2009). Vrsta je dvodomna, anemofilna, ljekovita i medonosna, a cvjetovi su žućkasto zeleni, jednospolni, s crvenim prašnicama i njuškom tučka, u 5-15 cm dugim, uspravnim grozdastim cvatovima (Slika 4.d i e, Slika 6) (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2013; Franjić i Škvorc 2020). Cvjeta od travnja do srpnja, za vrijeme listanja (Forenbacher 1990; Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2013). Plod je okruglasta ili jajasta, ornitohorna koštunica, promjera do 8 mm (Slika 6), u početku zelena, u stadiju zriobe smeđa do grimiznomodra (Slika 4.b), a dozrijeva koncem listopada. Sjemenke su okruglasto plosnate, po jedna u koštunici, kliju druge godine nakon sjetve (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008). Koštunice su jestive u sirovom stanju, ali im je okus opor, gorkast, smolast i aromatičan, te sadrže oko 37 % masnog ulja. Na listovima se često pojavljuju crvene šiške slične rogaču, tzv. „Judini rogači“ (Slika 5), koje nastaju ubodom kukca *Baizongia pistaciae* L., a nekada su se upotrebljavale za dobivanje crvene boje (Šilić 2005; Franjić i Škvorc 2020). Smrdljika je također bila prvi poznati izvor terpentina (tekućine mirisa na aceton koja sadrži različite terpene), koji se dobiva destilacijom gustih smolastih sokova nekih stabala (izvorno smrdljike, a danas uglavnom različitih borova), a koristi se primjerice u industriji boja kao otapalo (Kovačić i dr. 2008). Između ostaloga, koristi se i kao podloga (hipobiont) za heterovegetativno razmnožavanje (cijepljenje, transplantaciju ili kalemljenje) prave tršlje (*P. vera*) (Franjić i Škvorc 2020).



Slika 4. Morfološka obilježja smrdljike (*P. terebinthus*); a – habitus, b – lišće i plodovi (koštunice), c – kora, d – izbojak s pupovima i muškim cvatovima, e – ženski cvatovi. Autori: Jozo Franjić (4.a, b, c), Sandro Bogdanović (4.d, e).



Slika 5. Crvene šiške (entomocecidije) slične rogaču (tzv. „Judini rogači“) na lišću smrdljike (*P. terebinthus*) nastale ubodom kukca *Baizongia pistaciae* (Izvor: Wildside Holidays, Turpentine tree – Pistacia terebinthus - Cornicabra <https://wildsideholidays.co.uk/turpentine-tree-pistacia-terebinthus-cornicabra>) (Pristupljeno 27. 3. 2023.).

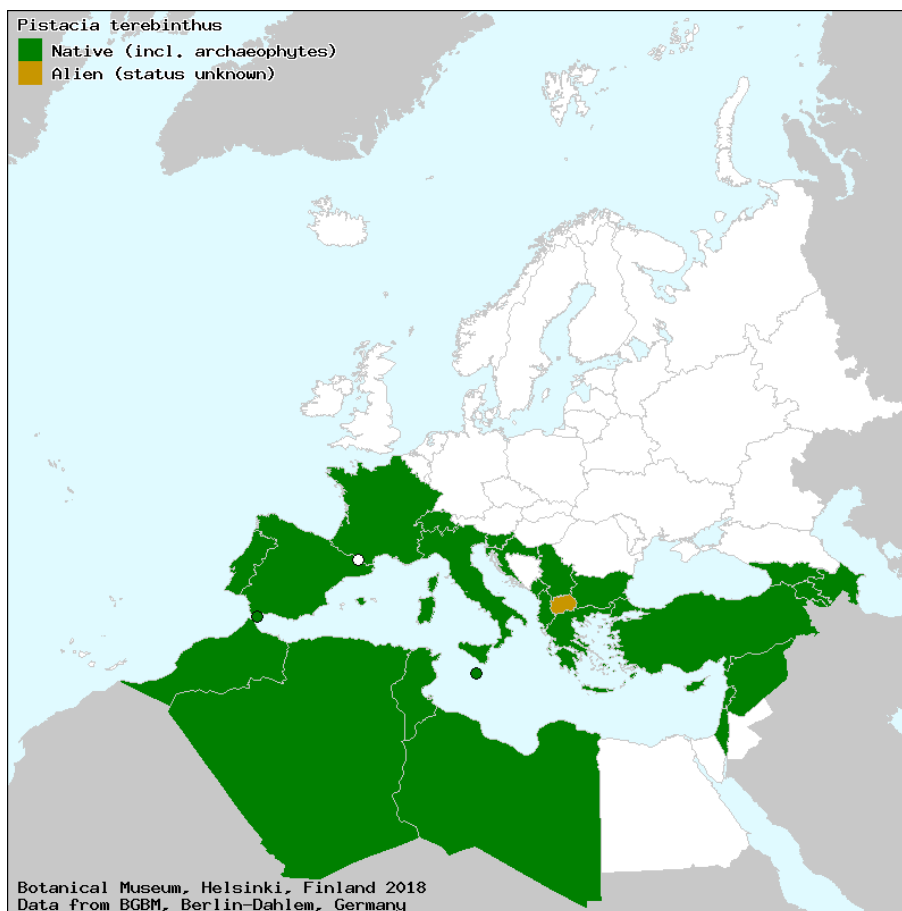


PISTACIJA

1. Smrdljika (*Pistacia terebinthus*): 1a. grančica s muškim cvjetovima, 1b. grančica s mladim listovima i ženskim cvjetovima, 1c. grančica s listovima i plodovima, 1d. grančica s pupovima, 1e. muški cvijet (5×), 1f. prašnik s dviju strana (5×), 1g. dio ženskog cvata (2×), 1h. i 1k. ženski cvijet (8×), 1m. koštunica (2×), 1n. koštica (2×); 2. tršlja (*P. lentiscus*): 2a. grančica s listovima i muškim cvjetovima, 2b. dio graničice s listovima i ženskim cvjetovima, 2c. grančica s listovima i plodovima, 2d. muški cvijet (5×), 2e. prašnik s triju strana (5×), 2f. ženski cvat u pazušcu lista (5/2×), 2g. ženski cvijet (10×), 2h. koštunica (5/2×), 2k. koštica s triju strana (5/2×)

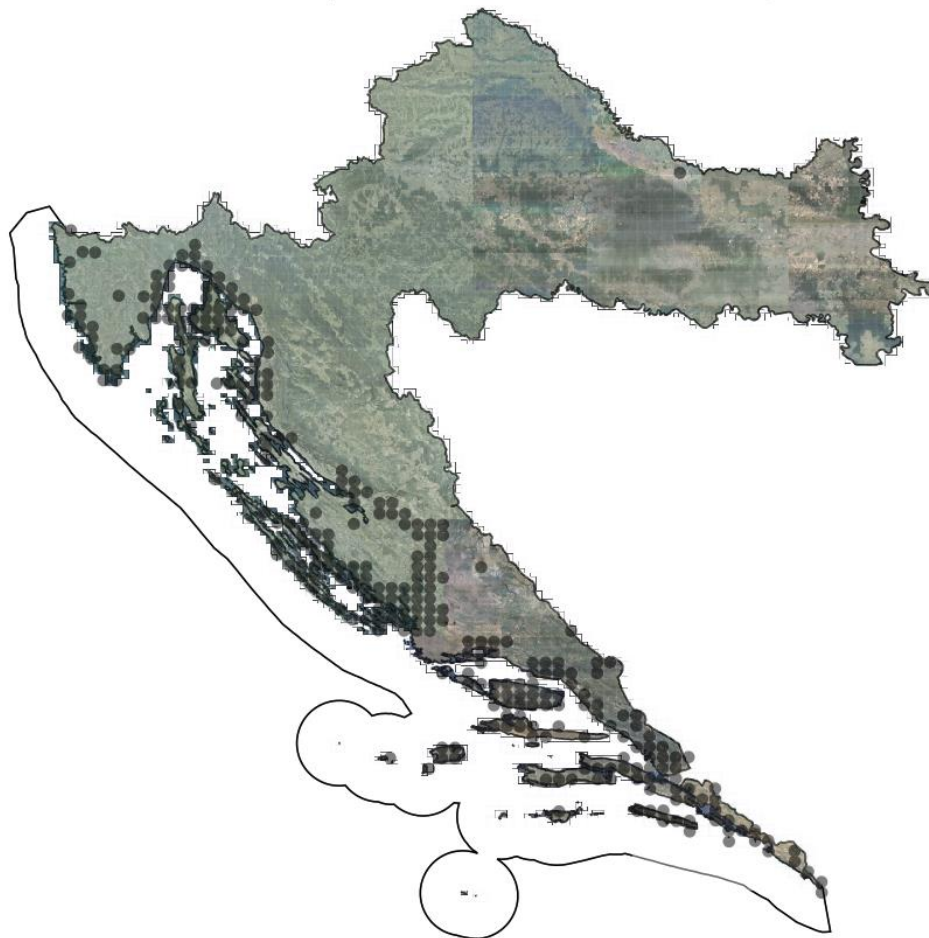
Slika 6. Morfološka obilježja smrdljike (*P. terebinthus*) i tršlje (*P. lentiscus*). Izvor: Šumarska enciklopedija II, 1983.

Smrdljika je prirodno rasprostranjena na području Mediterana, od Španjolske do Turske (Španjolska, Francuska, Italija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Cipar, Grčka, Maroko, Alžir, Tunis, Libija, Jordan, Palestina, Libanon, Saudijska Arabija, Sirija i Turska) (Slika 7) u rasponu od 225 do 1850 m n. v. (AL-Saghir i Porter 2012). U južnom Tirolu i u Istri mogu se naći pojedine jedinke smrdljike, ali samo na najpovoljnijim položajima i vapnenastoj podlozi (Petračić 1942).



Slika 7. Rasprostranjenost smrdljike (*P. terebinthus*) u Sredozemlju i na Bliskom istoku; zeleno – područje prirodne rasprostranjenosti, žuto – područje introdukcije (Izvor: Euro+Med PlantBase (2006-2023), *P. terebinthus* L. https://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=435045&size=medium) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

Najčešće raste u zoni vazdazelenih i listopadnih primorskih šuma i makija, na suhim, toplim, kamenitim i stjenovitim staništima (Kovačić i dr. 2008; Franjić i Škvorc 2020). U Hrvatskoj dolazi uz riječne tokove Neretve, Cetine, Zrmanje i prodire duboko u kopno u submediteranskoj vegetacijskoj zoni, penjući se mjestimično do 700 m n. v. (Slika 8) (Kovačić i dr. 2008; Franjić i Škvorc 2020). Na otoku Braču je česta do kojih 400 m n. v. Na južnijim otocima Korčuli i Mljetu također je dosta česta (Petračić 1942).



Slika 8. Rasprostranjenost smrdljike (*P. terebinthus*) u Hrvatskoj (Izvor: Nikolić T. ur. (2015 - 2023), FCD <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/map/distribution/12380>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

Pripada sredozemnom flornom elementu te je svojstvena vrsta primorskih šuma i šikara hrasta medunca s crnim i bijelim grabom (sveza *Ostryo-Carpinion orientalis* Horvat (1954) 1958) u šumskoj vegetaciji Hrvatske koje uspijevaju na neutrofilnim i bazičnim tlima, na vapnencima izraženog reljefa od Istre do Dubrovačkog zaleđa (Vukelić 2012). Dolazi u flornom sastavu šuma hrasta medunca i bijeloga graba (asoc. *Quercus pubescenti-Carpinetum orientalis* Horvatić 1939), koje predstavljaju najznačajniju klimazonalnu šumsku zajednicu submediteranske vegetacijske zone priobalnog pojasa sjevernog Hrvatskog primorja, većeg dijela Istre izgrađenoga od vapnenca, sjevernojadranskih otoka, sjevernog dijela Ravnih kotara i većega dijela kontinentalne Dalmacije do granice s Bosnom i Hercegovinom, odnosno na jugu s Crnom Gorom. Nastavljaju se na eumediteransku zonu šuma hrasta crnike te se uglavnom prostiru na velikim površinama različitih degradacijskih stadija obilježenih prevažno određene vrste, primjerice stadij s *P. terebinthus* (Vukelić 2012). Također, smrdljika dolazi i u drugim primorskim šumama i šikarama bijeloga graba čiji florni sastav ovisi o stupnju degradacije (asoc. *Cruciatu glabrae-Carpinetum orientalis* Šugar et Trinajstić 1988, *Phillyreo latifoliae-Carpinetum orientalis* Em 1962, *Arbuto unedonis-Carpinetum orientalis* Trinajstić 2002) (Trinajstić 2008; Vukelić 2012). Osim

spomenutih šuma i šikara medunca i bijeloga graba, smrdljika ima značajnu ulogu u sloju grmlja u šumama crnoga bora i crnoga graba na sjevernom Velebitu (asoc. *Ostryo-Pinetum nigrae* (Anić 1957) Trinajstić 1998), koje se rasprostiru na prijelazu iz mediteranske u eurosibirsku-sjevernoameričku vegetacijsku regiju, što naglašava miješanje sredozemne i kontinentalne klime. Uglavnom su to veći nagibi, različite ekspozicije te smeđe tlo na vapnencima i dolomitima. Tlo je dosta plitko, a na površini su uočljive velike kamene gromade i kamene ploče (Vukelić 2012).

1.2.2. *Pistacia lentiscus* L. – tršlja

Raste kao vazdazeleni grm ili do 5 m visoko stablo (Slika 9.c), karakterističnog smolastog mirisa (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008). Kora je zelenosiva, u mladosti glatka, no kako stari, postaje tamnozeleno i raspucala u sitne ljuste te sadrži mirisav smolasti sok (mastijs) (Kovačić i dr. 2008; Franjić i Škvorc 2020). Listovi su naizmjenični, kožasti, dugi 5-10 cm, parno perasto sastavljeni od 6 do 10 sjedećih, 2-4 cm dugih i 0,5-1 cm širokih, jajasto kopljastih do obrnuto jajastih liski cijelog ruba, tupog vrha i klinaste osnove (Slika 6, Slika 9.a) (Idžojtić 2009; Franjić i Škvorc 2020). Liske su na licu tamnozelene, sjajne, gole, a na naličju svjetlozelene. Peteljka i lisna os su plosnate, usko okriljene, žljebaste te često crvenkaste (Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2009). Protrljeni listovi karakterističnog su mirisa (Idžojtić 2009). Vrsta je dvodomna, anemofilna, ljekovita i medonosna, a cvjetovi su žućkastocrveni, jednospolni, s crvenim ili žućkastocrvenim prašnicama i crvenom njuškom tučka, sitni, skupljeni u klasaste cvatove u pazušcima listova (Slika 6) (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2013). Cvjeta od ožujka do svibnja, prije listanja (Idžojtić 2013). Plodovi su sitne (2-4 mm promjera), okruglaste, ornitohorne koštunice, zbijene u guste nakupine, u početku crvenkaste (Slika 6, Slika 9.a), a kada sazriju (u kasnu jesen) pocrne (Kovačić i dr. 2008; Idžojtić 2013). Sjemenke su jajasto-okruglaste, po jedna u koštunici (Franjić i Škvorc 2020). Iz prokuhanih plodova dobiva se masno ulje koje se u nekim arapskim zemljama koristi za jelo, a na nekim našim otocima se koristilo za vrijeme Drugog svjetskog rata. Mirisavi smolasti sok (mastijs), koji se dobiva zarezivanjem kore tršlje (Slika 10), smatra se najstarijim balzomom. Poznavali su ga i upotrebljavali stari Grci, Rimljani i Egipćani (oko 400. god. pr. Kr.) u medicini kao lijek, ali i za žvakanje umjesto žvakaće gume. Tršlja se koristi i u industriji (npr. listovi bogati taninima primjenjivani su za bojanje tkanina) i u proizvodnji alkoholnih pića (mastika) (Kovačić i dr. 2008). Drvo tršlje nema gospodarsku vrijednost, a grančice s listovima se koriste u cvjećarstvu za izradu cvjetnih buketa i aranžmana (Tolić 2003). Dobro podnosi sušu, veliku žegu, zasjenu, posolicu i zaslanjena tla (Šilić 2005; Kovačić i dr. 2008). Stoga je pogodna za korištenje u meliorativnim zahvatima i za ozelenjavanje prostora uz morsku obalu, ali i kao podloga (hipobiont) za heterovegetativno razmnožavanje (cijepljenje) prave tršlje (*P. vera*).

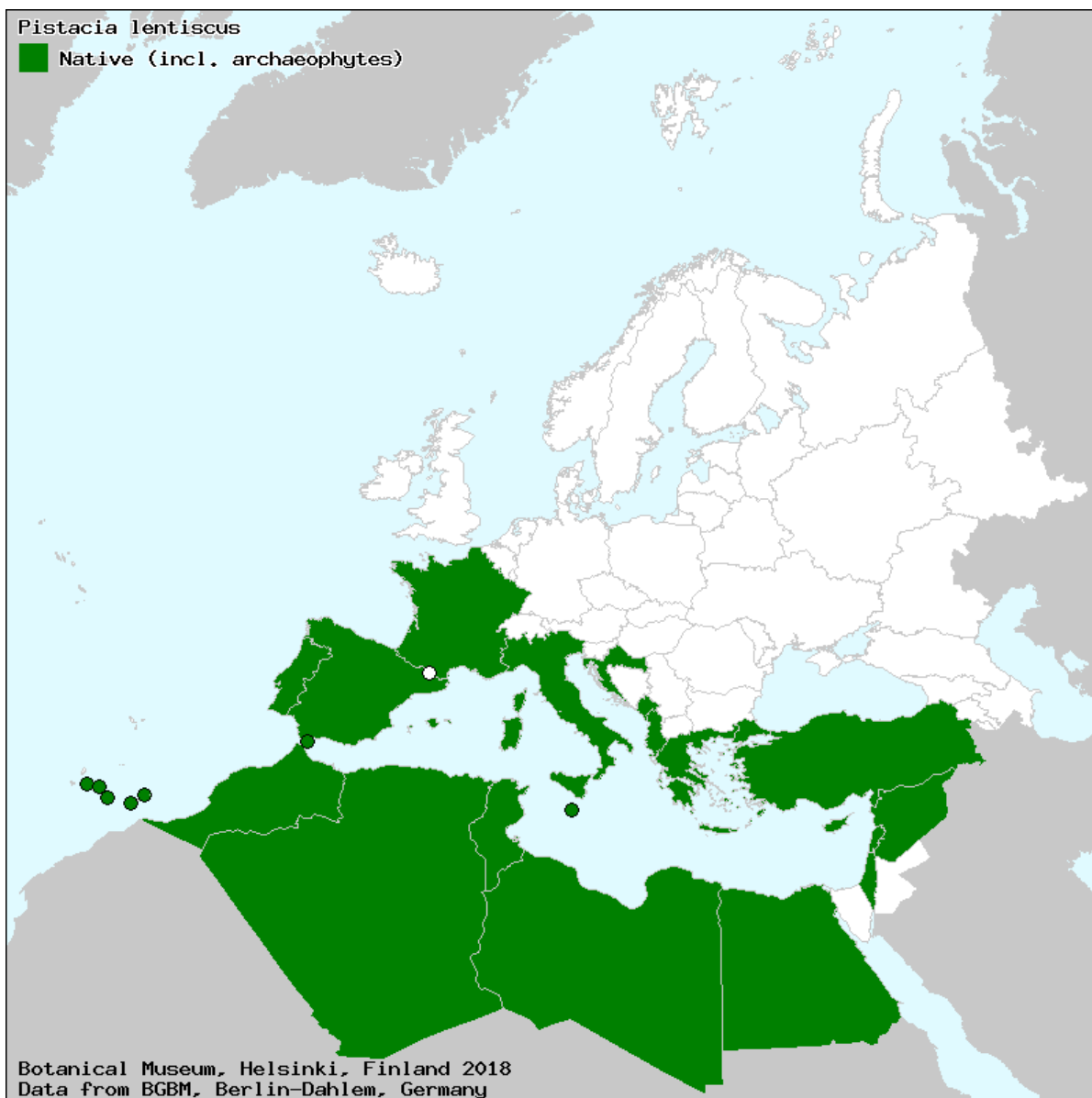


Slika 9. Morfološka obilježja tršlje (*P. lentiscus*); a – listovi i plodovi (koštunice), b – muški cvatovi, c – habitus. Autori: Jozo Franjić (9.a, c), Sandro Bogdanović (9.b).

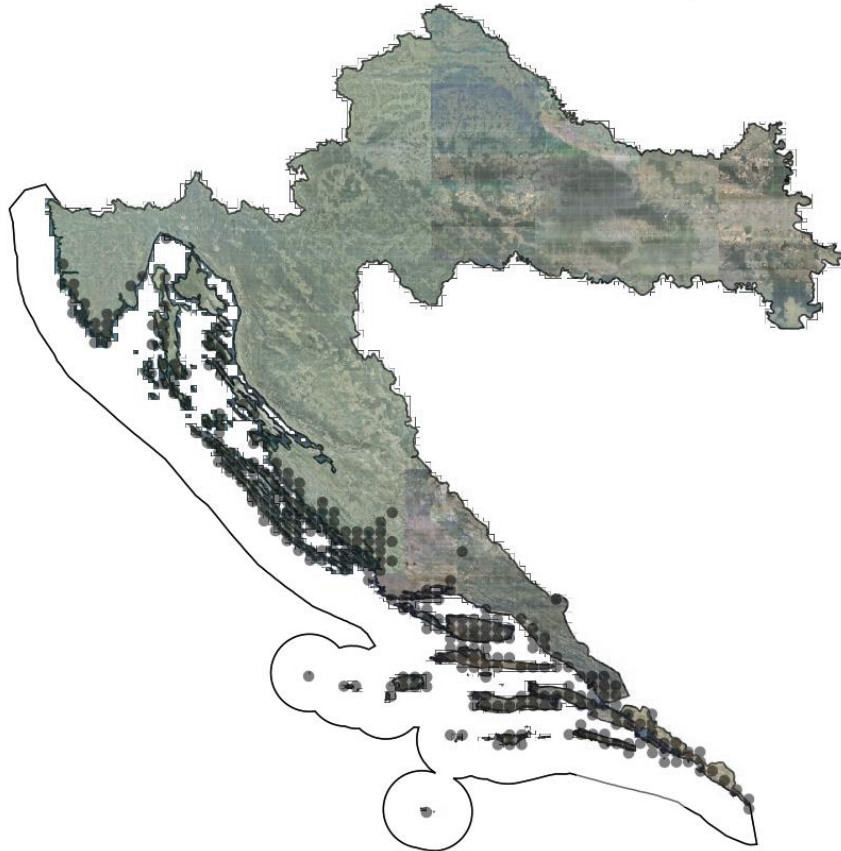


Slika 10. Smolasti sok (mastiks) dobiven zarezivanjem kore tršlje (*P. lentiscus*) i sušenjem na suncu (Izvor: Poupadou, Mastic of Chios <https://www.poupadou.com/blog/en/various-mastiha-mastic/>) (Pristupljeno 27. 3. 2023.).

Tršlja je prirodno rasprostranjena od Kanarskog otočja preko juga Europe, od Portugala do Grčke i Turske, u sjevernom dijelu Afrike od Maroka do Egipta i Bliskog istoka (Slika 11), u rasponu od 0 do 2000 m n. v. (AL-Saghir i Porter 2012). Raste na sunčanim, stjenovitim staništima eumediteranskog područja, na plitkim i skeletnim tlima te je vrlo raširena u mediteranskim makijama (Kovačić i dr. 2008; Franjić i Škvorc 2020). Voli silikatna tla, no raste vrlo dobro i na vapnenačkim tlima. Ima je na svim jadranskim otocima osim Krka (Slika 12) (Petračić 1942). Prema Adamoviću (1911) tršlja u Hrvatskoj raste tek južnije od Splita.



Slika 11. Prirodna rasprostranjenost tršlje (*P. lentiscus*) u Sredozemlju, Africi i na Bliskom istoku (Izvor: Euro+Med PlantBase (2006-2023), *Pistacia lentiscus* L. https://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=435042&size=medium) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).



Slika 12. Rasprostranjenost tršlje (*P. lentiscus*) u Hrvatskoj (Izvor: Nikolić T. ur. (2015 - 2023), FCD <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/map/distribution/7531>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

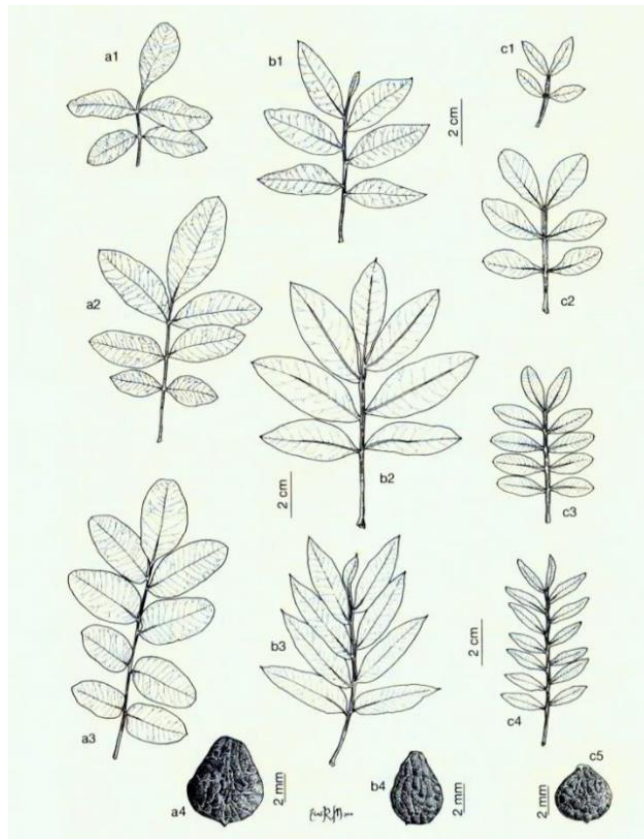
Pripada sredozemnom flornom elementu te je svojstvena vrsta kserotermnih stenomediteranskih šuma i makija hrasta crnike, divlje masline, rogača, alepskog bora i drugih vrsta (sveza *Oleo-Ceratonion* Br.-Bl. 1936), ali dolazi i u šumama i makijama hrasta crnike ili oštrike (sveza *Quercion ilicis* Br.-Bl. 1931 (1936)). Nadalje, dolazi u flornom sastavu šuma hrasta crnike i crnoga jasena (asoc. *Fraxino orn-Quercetum ilicis* Horvatić (1956) 1958) koje predstavljaju najznačajniju klimazonalnu šumsku zajednicu eumediteranske vegetacijske zone mediteransko-litoralnog vegetacijskog pojasa, a prostiru se od južne i jugozapadne Istre, preko Lošinja, južnih dijelova Cresa, Raba, Paga, Murtera i kopnom od Zadra do Prevlake (Slika 12) (Vukelić 2012). Također, značajna je kserotermna vrsta u sloju grmlja najtermofilnije zajednice hrasta crnike eumediteranske zone u kojoj uspijevaju samo vazdazelene vrste, šume hrasta crnike s mirtom (asoc. *Myrto-Quercetum ilicis* (Horvatić 1963) Trinajstić 1985), a koja je najčešće razvijena u degradacijskom stadiju makije ili je potpuno iskrčena (Trinajstić 2008; Vukelić 2012). Raste osobito na otocima od Unija i jugozapadnog dijela Lošinja na sjeveru do Lokruma, Lastova, Bobare i Mrkana na jugu, izuzevši sjeveroistočne (hladnije) padine Ugljana i Pašmana te više dijelove Hvara, Visa, Korčule, Mljeta i poluotoka Pelješca (Vukelić 2012). Tršlja je manje značajna u flornom sastavu šuma dalmatinskog crnog bora s crnikom (asoc. *Quercus ilici-Pinetum dalmaticae* Trinajstić 1986) koje rastu u mediteransko-montanskom vegetacijskom

pojasu na otoku Braču, Hvaru, Korčuli od 450 do 750 m n. v., na Pelješcu i više, te u šumama hrasta oštrike i crnoga jasena (asoc. *Fraxino orni-Quercetum cocciferae* H-ić 1958) koje u Hrvatskoj zauzimaju vrlo male, međusobno rascjepkane površine. Osim eumediteranske vegetacijske zone, tršlja je svakako prisutna i u stenomediteranskoj zoni gdje raste u šumskim zajednicama alepskog bora (asoc. *Quercu ilici-Pinetum halepensis* Loisel 1971, *Pistacio lentisci-Pinetum halepensis* De Marco, Veri et Caneva 1984, *Junipero phoeniceae-Pinetum halepensis* Trinajstić 1988), a posebno u zajednicama makije i gariga (asoc. *Oleo-Pistacietum lentisci* Br.-Bl. 1931, *Oleo-Euphorbietum dendroidis* Trinajstić 1973, *Pistacio lentisci-Juniperetum phoeniceae* Trinajstić 1987, *Oleo-Juniperetum phoeniceae* Bruno, Mossa et Scrugli 1983, *Erico arboreae-Arbutetum unedonis* Allier et Lacoste 1980, *Erico manipuliflorae-Calycotometum infestae* Horvatić 1958) (Trinajstić 2008; Vukelić 2012). Najzastupljenija je u šumama alepskog bora s tršljom (asoc. *Pistacio lentisci-Pinetum halepensis* De Marco, Veri et Caneva 1984) gdje je zastupljena u svim slojevima (sloj drveća, grmlja, prizemnog rašća) i ističe se kao svojstvena i razlikovna vrsta te asocijacije koja je indikator toplih i umjereno suhih ekoloških uvjeta (Vukelić 2012). Međutim, veliki udio zastupljenosti ima i u zajednicama makije (npr. *Oleo-Pistacietum lentisci*, *Pistacietum lentisci-Juniperetum phoeniceae*, *Oleo-Juniperetum phoeniceae*) gdje je uz divlju maslinu (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot. (FCD, Nikolić 2023)) jedna od najvažnijih vrsta u sloju grmlja.

1.2.3. *Pistacia* × *saportae* Burnat – prijelazna tršlja

Burnat (1896) je ovu svojtu izvorno opisao kao križanca između tršlje (*P. lentiscus*) i smrdljike (*P. terebinthus*). Međutim, neki botaničari su osporavali hipotezu o podrijetlu križanca. Tako je Zohary (1952) izdvojio ovu svojtu prvo kao zasebnu vrstu na temelju morfoloških obilježja, a kasnije ipak predložio da joj se dodijeli taksonomski status interspecijskog križanca s tršljom (*P. lentiscus*) i smrdljikom (*P. terebinthus*) kao roditeljskim svojutama (Zohary, 1972). Status križanca ove svojte podržan je istraživanjima anatomije drva (Grundwag i Weaker 1976) i molekularnim analizama primjenom raznih molekularnih biljega (Werner i dr. 2001; Yi i dr. 2008) kojima su potvrđene roditeljske vrste *P. lentiscus* i *P. terebinthus*.

Općenito, prijelazna tršlja ili zmaska (*P. × saportae*) pokazuje intermedijarna morfološka obilježja roditeljskih vrsta (Slika 13, 14 i 15). Raste kao zimzeleni grm ili do 8 m visoko stablo, sivkastosmeđe kore. Listovi su kožasti, 10 cm dugi, neparno perasto sastavljeni od (3) 5 do 11 (13) sjedećih, 5,8 cm dugih i 2,2 cm širokih, koso nasuprotnih, duguljastih, srpasto zakrivljenih liski, šiljastog do naglo šiljastog vrha (Werner i dr. 2001). Liske su na licu tamnozeleno, gole, a vršna liska manja je od postranih, linearno-sulicaasta (Werner i dr. 2001; AL-Saghir i Porter 2012). Glavna lisna os je usko okriljena. Cvjetovi su skupljeni u grozdaste ili metličaste cvatove, duge do 7,5 cm. Plod je zelenkasto-ružičasta, okruglasta koštunica, promjera 3 do 5 cm. Cvate od ožujka do svibnja, a plodovi dozrijevaju u veljači, rujnu i listopadu (AL-Saghir i Porter 2012).



Slika 13. Listovi i sjemenke: a – *P. terebinthus*, b – *P. × saportae*, c – *P. lentiscus*. Izvor: Castroviejo i dr., ur. 2015: Flora Iberica, Vol. IX.



Slika 14. a) Listovi svojte *P. × saportae* s otoka Korčule. Autor: Martina Temunović. b) Listovi *P. terebinthus* (lijevo), *P. × saportae* (sredina) i *P. lentiscus* (desno) s otoka Visa. Autor: Sandro Bogdanović.

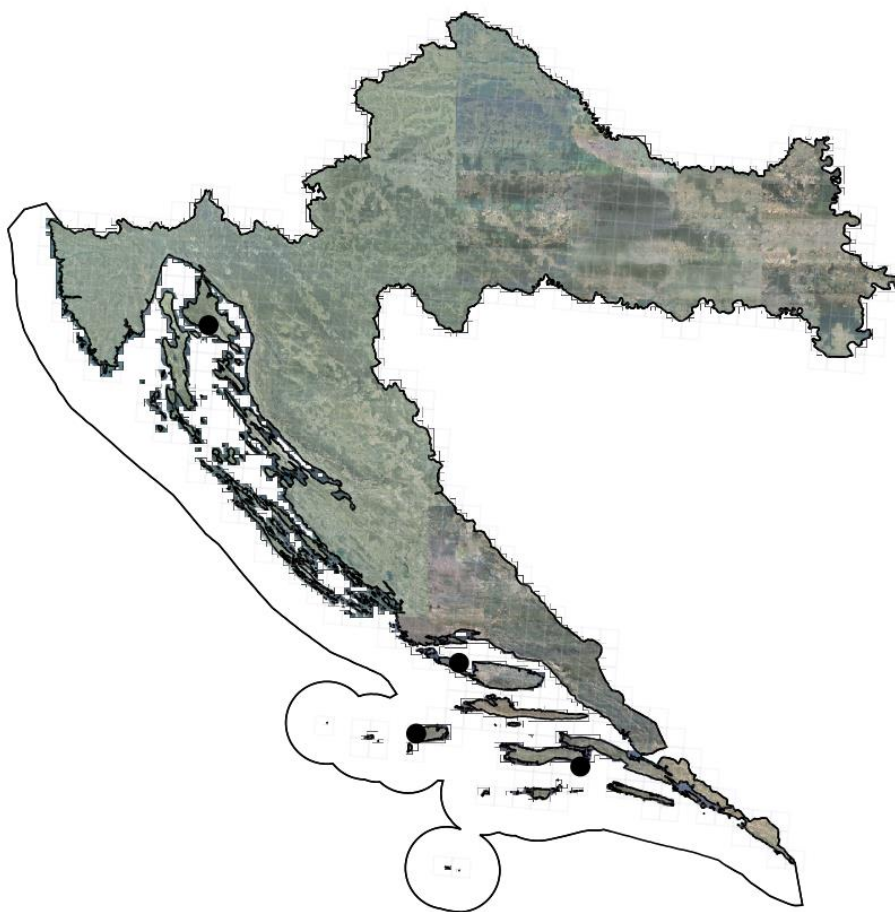


Slika 15. Herbarijski primjerak svojte *P. × saportae* sakupljen na području Biokova 1985. godine iz herbarijske zbirke „Herbar Biokovskog područja“ (MAKAR) dr. fra Jure Radića u Makarskoj. Autor: Martina Temunović.

Prirodno je rasprostranjena na Mediteranu (Cipar, Palestina, Alžir, sjeverni dio Maroka, Španjolska, Portugal, Francuska, Italija, Turska) na područjima gdje rastu tršlja i smrdljika (Slika 16). Raste u makijama, na vapnenačkoj podlozi, do 450 m n. v. (AL-Saghir i Porter 2012). U Hrvatskoj je prvi puta, na temelju morfoloških obilježja, zabilježena na Korčuli (Jeričević i dr. 2014) (Slika 14 i 17), iako je dr. fra Jure Radić zabilježio nekoliko primjeraka na području Biokova već i ranije (Radić 1985) (Slika 15).



Slika 16. Rasprostranjenost svojte *P. x saportae* na Mediteranu (Izvor: Kew (2022) - International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants, *P. x saportae* Burnat <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:70269-1>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).



Slika 17. Rasprostranjenost svojte *P. x saportae* u Hrvatskoj (Izvor: Nikolić T. ur. (2015 - 2023), FCD <https://hirc.botanic.hr/fcd/beta/map/distribution/27579>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

1.2.4. *Pistacia calcivora* Radić – vapnojed

Svojtta dvojbenaog taksonomskog statusa koju je dr. fra Jure Radić (1985) opisao kao endemsku vrstu za područje Biokova te joj dodijelio hrvatski naziv vapnojed ili vapnojeda tršlja. Još ju se naziva i jadranski smrdelj. Dr. fra Jure Radić je bio hrvatski svećenik, teolog, prirodoslovac i znanstvenik koji je utemeljio Biokovski botanički vrt „Kotišina“ te osnovao i vodio Malakološki muzej i Institut „Planina i more“ u Makarskoj. Bio je vrlo posvećen istraživanju biokovske flore te je tvrdio da je intraspecijska varijabilnost *P. calcivora* vrlo velika, pa je opisao čak dva varijeteta i 14 formi na temelju morfoloških obilježja. Međutim, kako je *P. calcivora* opisana na temelju morfoloških obilježja, ne može se sa sigurnošću smatrati novom vrstom, već je potrebno provesti molekularno-genetičke analize kako bi se eventualno potvrdilo postojanje endemske vrste *P. calcivora* u hrvatskoj flori.

Prema Radiću (1985), raste kao listopadni, poligamni ili dvodomni grm ili do 5 m visoko stablo. Listovi su dugi do 28 cm, jednostavni, dvoliskavi, troliskavi ili perasto sastavljeni. Liske su jajaste, okrugle, eliptične, bubrežaste, obrnuto jajaste, obrnuto sroljike, klinaste osnove, šiljastog, ušiljenog, šiljatog do tupog vrha, cijelog, narovašenog, izveruganog, smežuranog ili valovitog ruba (Slika 18 i 19). Peteljka i lisna os ponekad su usko okriljene, a kod mladih listova pahuljasto maljave. Cvjetovi su jednospolni, skupljeni u vršnim ili postranim metlicama. Ženski cvjetovi ponekad su pomiješani sa sterilnim u zbijenim grozdovima ili manjim nakupinama, rijetko pojedinačni. Plod je koštunica različitih oblika, 3-9 mm duga i 2-10 mm široka, ponekad 2- ili 3-režnjasta (Radić 1985). Na okomitim klisurama svojim razornim korijenom stvara rasjekline u kamenu, a među nagnutim kamenim blokovima razvija korijen u pukotinama stijena (Slika 20). Holotip ove vrste opisan je nad izvorom Vrutak u Makarskoj, na 200 m n. v. te je pohranjen u herbarijskoj zbirci dr. fra Jure Radića „Herbar Biokovskog područja“ indeksiran kao MAKAR (Slika 19), a koja se nalazi pri Malakološkom muzeju Franjevačkog samostana Blažene Djevice Marije na nebo uznesene u Makarskoj.



Slika 18. Lijevo - listovi svojte *P. calcivora* koja raste u podnožju Biokova; desno – dobro uočljiva varijabilnost listova i raznolikost oblika liski na lokalitetu Kotišina (Biokovo). Autor: MartinaTemunović.



Slika 19. Holotip jadranskog smrdelja ili vapnojeda (*P. calcivora*) iz herbarijske zbirke „Herbar Biokovskog područja“ (MAKAR) dr. fra Jure Radića u Makarskoj. Autor: Martina Temunović.



Slika 20. Svojtta *P. calcivora* na klisuri iznad Makra na Biokovu, nekada (1985. godine) i danas. Izvor: Radić, 1985; autor: Martina Temunović, 2021.

1.2.5. *Pistacia vera* L. – prava tršlja

Prava tršlja ili pistača (*P. vera*) je ekonomski najvažnija vrsta roda *Pistacia* zahvaljujući svojim jestivim sjemenkama koje su dovoljno velike da osiguraju komercijalnu isplativost njezinog uzgoja (Ferguson i dr. 2005). Također, jedina je vrsta unutar roda koja se uspješno uzgaja u trajnim poljoprivrednim nasadima (AL-Saghir 2006). U Hrvatskoj se kultivira u vrtovima, a može se uzgajati na staništima tršlje i smrdljike.

Raste kao listopadno, do 8 m visoko stablo (Šilić 2005; Franjić i Škvorc 2020). Listovi su naizmjenični, kožasti, neparno perasto sastavljeni od 3 do 5, 5-6 (3-9) cm dugih i 4-4,5 (2-7) cm širokih, jajastih do obrnuto jajastih liski cijelog ruba, naglo i kratko šiljastog do tupog vrha, klinaste do zaobljene, katkad asimetrične osnove (Slika 21) (Idžojtić 2009; Franjić i Škvorc 2020). Postrane liske su sjedeće, a vršna s kratkom peteljkom. Liske su u početku s obje strane dlakave, a kasnije gole (Idžojtić 2009). Cvjetovi su jednospolni, anemofilni, sa zelenkastožutim prašnicama i žućkastom njuškom tučka, skupljeni u 5-6 cm dugim, rahlim, postranim metlicama

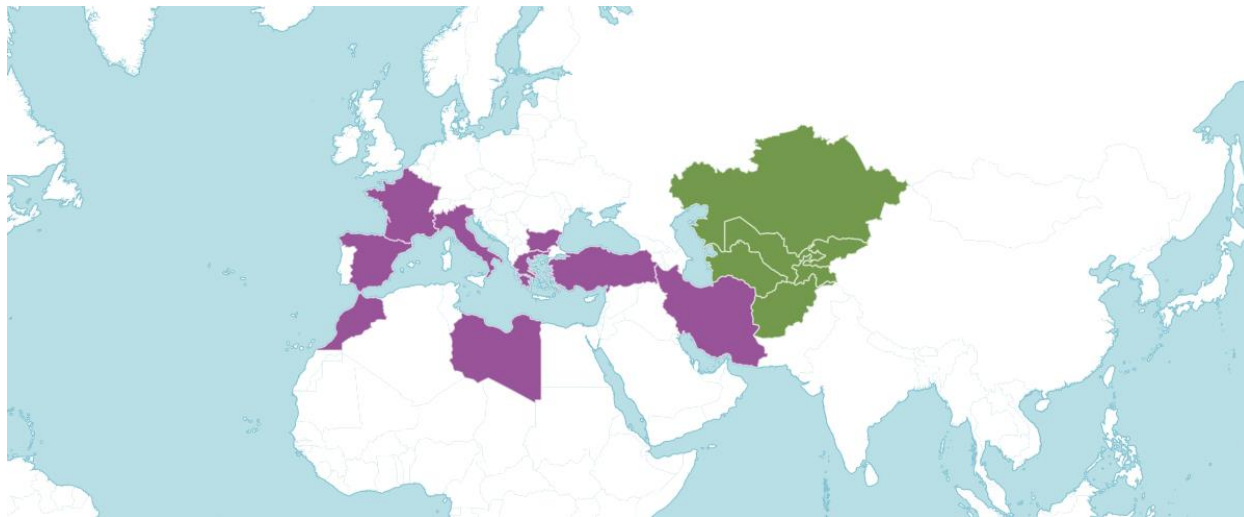
(Idžojić 2013). Dvodomna je vrsta, a cvjeta u travnju, prije listanja. Plodovi su jednosjemene, ornitohorne koštunice, na vrhu šiljaste, u početku zelene, kasnije crvenkaste (Slika 21). Endokarp je drvenast, a tijekom dozrijevanja se odvaja od mezokarpa i egzokarpa. Plodovi dozrijevaju u rujnu i listopadu, a kada sjemenka dozrije endokarp uzdužno raspucava od vrha prema osnovi (Idžojić 2013).



Slika 21. Ilustracija listova i plodova prave tršlje (*P. vera*). Izvor: Michaux i dr., 1819.

Prirodno je rasprostranjena u planinskim područjima Kazahstana, Uzbekistana, Kirgistana, Tadžikistana, Turkmenistana i zapadnog Afganistana (Onay 2005; Franjić i Škvorc 2020), a u Sredozemlje su je donijeli trgovci i to iz Sirije u Italiju, otprilike u 1. stoljeću (Slika 22). Iz Italije se dalje proširila u mediteranske krajeve južne Europe i sjeverne Afrike (Mandalari i dr. 2022).

Nadalje, američki trgovci su 1880-ih uvezli „pistacije“ prije svega za građane SAD-a podrijetlom s Bliskog istoka, a 50 godina kasnije, pa sve do danas, postale su popularna grickalica u SAD-u (Seeram i dr. 2008). Danas je SAD vodeći svjetski proizvođač „pistacija“ s približno 67 % ukupne svjetske proizvodnje, a slijede ih Iran (17 %) i Turska (11 %) (Statista 2023).



Slika 22. Rasprostranjenost prave tršlje (*P. vera*); zeleno – područje prirodne rasprostranjenosti, ljubičasto – područje introdukcije (Izvor: Kew (2022) – International Plant Names Index and World Checklist of Vascular Plants, *P. vera* L. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:70280-1>) (Pristupljeno 21. 3. 2023.).

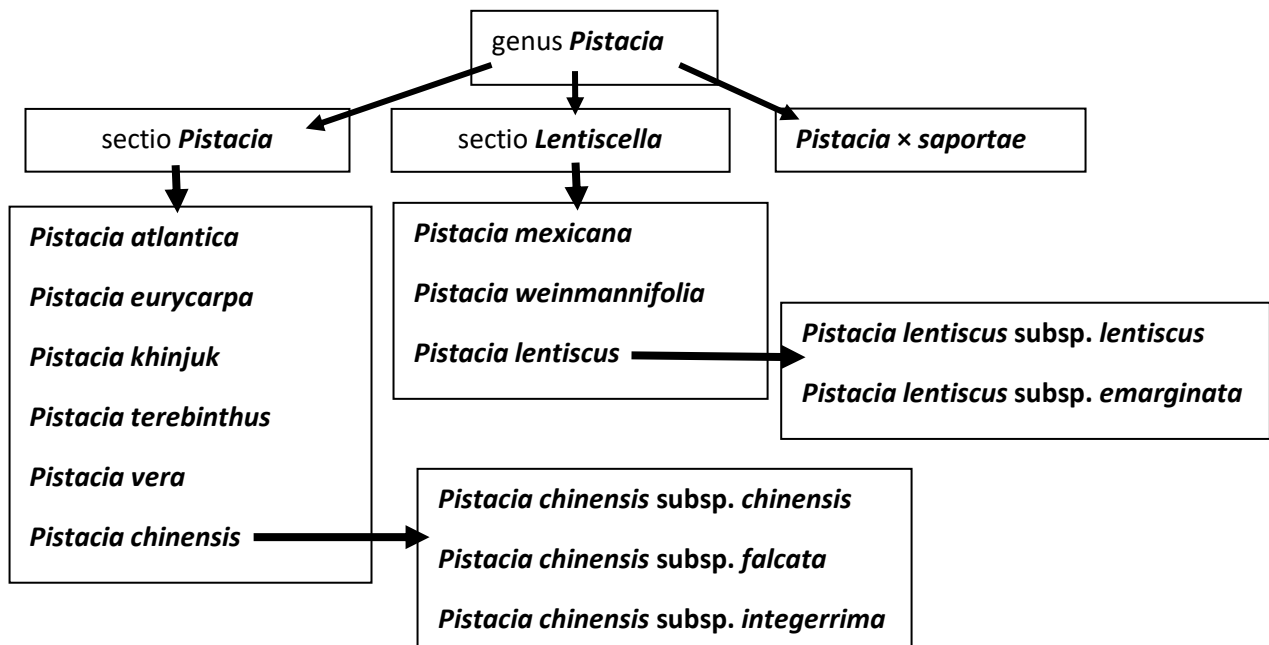
1.3. Taksonomska problematika svojti roda *Pistacia*

Smatra se da postoje tri glavne taksonomske podjele roda *Pistacia*: dvije na temelju morfologije cvijeta i lista (Engler 1936 i Zohary 1952) te podjela na temelju molekularnih biljega i analiza (Parfitt i Badenes 1997, Yi i dr. 2008; Xie i dr. 2014) (Slika 23). Prema posljednjoj dostupnoj taksonomskoj reviziji (AL-Saghir i Porter 2012) rod *Pistacia* obuhvaća 13 taxa: devet vrsta (lat. *species*; *P. atlantica* Desf., *P. chinensis* Bunge, *P. eurycarpa* Yalt., *P. khinjuk* Stocks, *P. terebinthus*, *P. vera*, *P. lentiscus*, *P. mexicana* Humb., Bonpl. & Kunth, *P. weinmannifolia* J. Poiss. ex Franch.), pet podvrsta (lat. *subspecies*; *P. chinensis* subsp. *chinensis*, *P. chinensis* subsp. *falcata* (Becc. ex Martelli) Rech.f., *P. chinensis* subsp. *integerrima* (J.L. Stew. ex Brandis) Rech.f., *P. lentiscus* subsp. *lentiscus*, *P. lentiscus* subsp. *emarginata* (Engl.) AL-Saghir) i jednu hibridnu svojtu (lat. *hybrida*; *P. × saportae* Burnat) (Slika 24).

a	b		c	
Species	Section	Species	Section	Species
<i>P. atlantica</i>	Lentiscella Zoh.	<i>P. mexicana</i> HBK	Lentiscus	<i>P. lentiscus</i>
<i>P. chinensis</i>		<i>P. texana</i> Swingle		<i>P. weinmannifolia</i>
<i>P. khinjuk</i>	Eu lentiscus Zoh.	<i>P. lentiscus</i> L		<i>P. mexicana</i>
<i>P. lentiscus</i>		<i>P. saportae</i> Burnat		<i>P. texana</i>
<i>P. mexicana</i>		<i>P. weinmannifolia</i> Poiss. Ex Franch.	Terebinthus	<i>P. chinensis</i>
<i>P. mutica</i>	Butmela Zoh.	<i>P. atlantica</i> Desf.		<i>P. integerrima</i>
<i>P. terebinthus</i>	Eu terebinthus Zoh.	<i>P. chinensis</i> Bunge		<i>P. terebinthus</i>
		<i>P. khinjuk</i> Stoks		<i>P. atlantica</i>
<i>P. vera</i>		<i>P. palaestina</i> Boiss		<i>P. khinjuk</i>
		<i>P. terebinthus</i> L		<i>P. vera</i>
		<i>P. vera</i> L		<i>P. palaestina</i>

a – Engler (1883); b – Zohary (1952); c – Parfitt and Badenes (1997) and Yi et al. (2008).

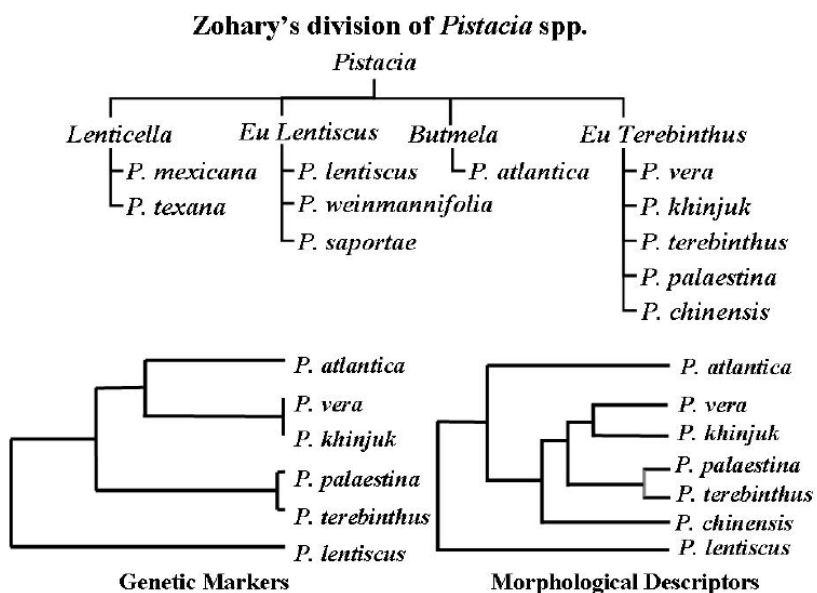
Slika 23. Glavne taksonomske podjele roda *Pistacia* prema različitim autorima. Izvor: Kozhoridze i dr. 2015.



Slika 24. Sistematska podjela roda *Pistacia* prema AL-Saghir i Porter (2012).

Prvu znanstvenu monografiju o rodu *Pistacia* napisao je Engler (1936), gdje je naveo osam vrsta i nekoliko varijeteta (lat. *varietates*). Međutim, Engler nije predlagao podjelu roda na sekcije, a neke vrste nije u potpunosti opisao on, već je to kasnije učinio Zohary (1952). Morfološki najpotpuniju sistematsku podjelu proveo je Zohary (1952). Na temelju morfologije lišća, liski, cvatova, cvjetova, plodova i sjemenki Zohary (1952) je podijelio rod *Pistacia* u četiri sekcije koje su uključivale ukupno 11 vrsta (Slika 23 i 25). Za vrstu *P. saportae* kasnije je predložio da se izdvoji kao interspecijski križanac na temelju intermedijarnih morfoloških obilježja između navodnih roditeljskih svojti *P. palaestina* Boiss. i *P. lentiscus* (Zohary 1972). Svoju *P. saportae* je izvorno opisao Burnat (1896) kao križanca između *P. lentiscus* i *P. terebinthus*. Budući da se pretpostavlja da je križanje (hibridizacija) uobičajeno između nekih

svoji roda *Pistacia* (Zohary 1952; Crane i Forde 1976; Crane i Iwakiri 1986.; Morgan i dr. 1992), Parfitt (2003) je umjetno križao neke svoje i uočio da između njih ne postoji genetska barijera. Kasnijim filogenetskim istraživanjima status križanca *P. × saportae* podržan je analizama anatomije drva (Grundwag i Weaker 1976), kao i molekularnim analizama upotrebom raznih genetskih biljega (Werner i dr. 2001; Yi i dr. 2008). Danas je *P. × saportae* Burnat prema POWO (2023) prihvaćena (validna) kao hibridna svojta *P. lentiscus* × *P. terebinthus* (POWO 2023, Tablica 2).

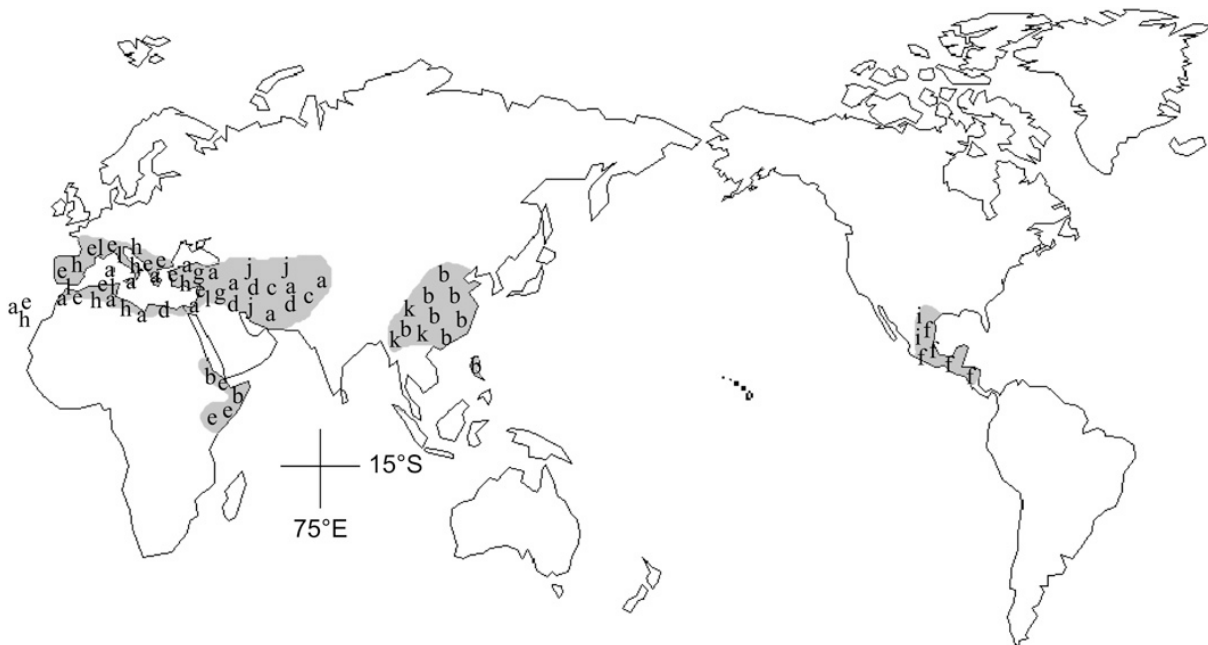


Slika 25. Usporedba sistematske podjele roda *Pistacia* na sekcije prema Zohary (1952) i rezultata istraživanja Golan-Goldhirsh (2009) temeljenim na morfološkim analizama i molekularnim analizama upotrebom molekularnih biljega (RAPD i AFLP). Izvor: Golan-Goldhirsh, 2009.

Slijedeći Zoharya, nekoliko drugih botaničara (Yaltirik 1967; Zohary 1972; Al Yafi 1978; Kokwaro i Gillett 1980) opisivalo je i predlagalo sistematsku podjelu roda *Pistacia* na temelju morfoloških obilježja. Primjerice, Yaltirik (1967) je proveo taksonomsku reviziju roda *Pistacia* u Turskoj i opisao novu vrstu *P. eurycarpa* Yalt. koju je prije njega Zohary (1952) smatrao svojtom *P. atlantica* var. *kurdica* Zohary. Prema POWO (2023) *P. atlantica* var. *kurdica* je sinonim za prihvaćenu vrstu *P. eurycarpa*. Također, Zohary (1952) je primjerice svojtu *P. palaestina* Boiss. smatrao zasebnom vrstom (Slika 25), dok ju je Yaltirik (1967) smatrao varijetetom vrste *P. terebinthus*. Kasnijim istraživanjima pomoću molekularnih biljega nisu utvrđene značajne razlike između svojti *P. palaestina* i *P. terebinthus* kako bi se podržalo odvajanje zasebne vrste *P. palaestina* (Kafkas i Perl-Treves 2002; Yi i dr. 2008), stoga se ona danas smatra sinonimom za *P. terebinthus* (POWO 2023). Nadalje, svojta *P. aethiopica* Kokwaro opisana je tek 1980. godine kao nova vrsta iz istočne Afrike (Kokwaro i Gillette 1980), ali su AL-Saghir i Porter (2012) predložili kako se zapravo radi o podvrsti *P. lentiscus* subsp. *emarginata* (Engl.) AL-Saghir. Međutim, prema POWO (2023) *P. aethiopica* je trenutačno prihvaćena kao zasebna vrsta, dok je *Pistacia lentiscus* subsp. *emarginata* njen sinonim.

U dosadašnjim filogenetskim istraživanjima pokazalo se kako rod *Pistacia* ima monofiletsko porijeklo (Parfitt i Badenes 1997; Kafkas i Perl-Treves 2002; Golan-Goldhirsh i dr. 2004; Yi i dr. 2008; AL-Saghir i Porter 2012; Xie i dr. 2014), a *P. vera* se smatra ishodišnom vrstom iz koje su se ostale vrste ovoga roda razvile (Zohary 1952; Parfitt i Badenes 1997). Sistematsku podjelu roda na molekularnoj razini prvi puta su predložili Parfitt i Badenes (1997). Oni su na temelju analize kloroplastne DNA molekule (cpDNA) i morfoloških obilježja predložili podjelu roda na dvije sekcije: sect. *Terebinthus* i sect. *Lentiscus* (Slika 23). *Pistacia* sensu Parfitt i Badenes (1997) tako obuhvaća 11 vrsta disjunktno rasprostranjenih na sjevernoj Zemljinoj polutki sa sedam vrsta raspoređenih od Mediterana do središnje Azije (*P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* i *P. vera*), dvije vrste u istočnoj Aziji (*P. chinensis* i *P. weinmannifolia*) te dvije vrste rasprostranjene od jugozapadnog dijela Sjedinjenih Američkih Država do Srednje Amerike (*P. mexicana* i *P. texana*). Svoju *P. integerrima* za koju je Zohary (1952) smatrao da je tada nedavno nastala podvrsta svojte *P. chinensis* (Zohary 1952) na temelju rezultata analize kloroplastne DNA (cpDNA) molekule i fenologije cvjetanja, Parfitt i Badenes (1997) izdvojili su kao zasebnu vrstu koja je trenutačno prema POWO (2023) sinonim za prihvaćenu podvrstu *P. chinensis* subsp. *integerrima*. Sekcija *Lentiscus* sensu Parfitt i Badenes (1997) uključuje Zoharyjeve sekcije *Lentiscella* i *Eu Lentiscus*, a obuhvaća vazdazelene vrste s parno perasto sastavljenim lišćem i sitnijim sjemenkama. Također su predložili da Zoharyjeve sekcije *Butmela* i *Eu Terebinthus* budu uključene u sekciju *Terebinthus* koja obuhvaća listopadne vrste s neparno perasto sastavljenim lišćem i krupnijim sjemenkama. Takva sekcija *Terebinthus* sensu Parfitt i Badenes podržana je molekularnim istraživanjima roda *Pistacia* na Mediteranu (Kafkas i Perl-Treves 2001, 2002; Golan-Goldhirsh i dr. 2004; Kafkas 2006). Međutim, u tim molekularnim istraživanjima način uzorkovanja biljnog materijala bio je ograničavajući za sekciju *Lentiscus* te su svojte te sekcije bile slabo zastupljene. Kafkas i Perl-Treves (2001) bavili su se taksonomijom roda *Pistacia* u Turskoj na temelju morfoloških i molekularnih analiza te su utvrdili kako je prethodno opisana svojta *P. eurycarpa* (Yaltirik 1967) zapravo svojta *P. khinjuk* Stocks. Kafkas i Perl-Treves (2002) nastavljaju svoja istraživanja primjenom RAPD molekularnih biljega te predlažu podjelu roda na dvije sekcije koje uključuju devet vrsta (*P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. eurycarpa*, *P. vera*, *P. integerrima*, *P. mexicana*, *P. palaestina*, *P. lentiscus*, i *P. khinjuk*). Također, utvrdili su kako je svojta *P. palaestina* Boiss. zapravo podvrsta svojte *P. terebinthus*. Nadalje, Yi i dr. (2008) u svojoj detaljnoj molekularnoj filogenetskoj analizi roda *Pistacia*, koristeći pet različitih setova molekularnih biljega, predložili su sljedeće svojte: *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. mexicana*, *P. palaestina*, *P. terebinthus*, *P. texana*, *P. vera*, *P. weinmannifolia* i *P. × saportae* (Slika 26). Njihove analize podudaraju se u velikoj mjeri s posljednjom taksonomskom revizijom roda *Pistacia* koju su proveli AL-Saghir i Porter (2012), izuzev za svojte *P. palaestina* i *P. texana*. AL-Saghir i Porter (2012) još jednom su potvrdili da je svojta *P. palaestina* usko srodna vrsti *P. terebinthus* te da bi se trebala smatrati sinonimom za *P. terebinthus*, što je i prihvaćeno od POWO (2023). Nadalje, potvrdili su i taksonomski status vrste *P. eurycarpa* Yalt. U svojoj taksonomskoj reviziji roda *Pistacia* predložili su podjelu roda u

dvije sekcije (sect. *Pistacia* i sect. *Lentiscella*) s devet vrsta i pet podvrsta te jednim hibridnim taksonom (*P. × saportae*) (Slika 24). Xie i dr. (2014), proveli su najnovije istraživanje filogenetskih odnosa i biogeografske povijesti prostorno-vremenske diversifikacije disjunktne linije roda *Pistacia* koristeći devet setova molekularnih biljega, a istraživanje je obuhvatilo 12 taksona. Njihovi rezultati ne podržavaju podjelu roda *Pistacia* na sekcije kao što su to predlagali Zohary (1952), Parfitt i Badenes (1997), AL-Saghir i Porter (2012), Kafkas i Perl-Treves (2001) te Golan-Goldhirsh i dr. (2004). No, u skladu s prethodnim istraživanjima (Golan-Goldhirsh i dr. 2004; Kafkas 2006; Pazouki i dr. 2010; Yi i dr. 2008) potvrdili su usku srodnost vrsta *P. khinjuk*, *P. vera* i *P. atlantica*, ali su i po prvi puta razriješili srodstvene odnose istočno-azijske vrste *P. chinensis* s vrstama *P. palaestina* i *P. terebinthus*. Zohary (1952) i AL-Saghir (2010) su predlagali kako bi se svojta *P. integerrima* J.L.Stewart trebala smatrati podvrstom svojte *P. chinensis* Bunge, međutim u istraživanju Xie i dr. (2014) pokazalo se kako su to dvije različite vrste, što je u skladu s dotadašnjim molekularnim istraživanjima roda *Pistacia* (Parfitt i Badenes 1997; Yi i dr. 2008). Prema POWO (2023), *P. integerrima* je sinonim za podvrstu *P. chinensis* subsp. *integerrima* (J.L.Stewart) Rech.f. Nadalje, molekularnim datiranjem i biogeografskim analizama procijenili su kako se rod *Pistacia* od svojih najbližih srodnika odvojio prije 37,6 mil. god., u razdoblju između eocena (prije 56 mil. god.) i oligocena (prije 33,9 mil. god.). Njihova procjena starosti podrijetla roda *Pistacia* pokazala je kako je rod znatno mlađi nego što su to prethodno pretpostavljali Zohary (1952), Parfitt i Badenes 1997, Kafkas i Perl-Treves (2001) i AL-Saghir (2009) koji su kritički nesagledavajući paleobotanička izvješća prihvaćali hipotezu da se rod *Pistacia* od svojih najbližih srodnika odvojio prije 80 mil. god. (u razdoblju krede).



Slika 26. Rasprostranjenost 11 vrsta i jedne hibridne svojte roda *Pistacia* prema Yi i dr. (2008): a = *P. atlantica*, b = *P. chinensis*, c = *P. integerrima*, d = *P. khinjuk*, e = *P. lentiscus*, f = *P. mexicana*, g = *P. palaestina*, h = *P. terebinthus*, i = *P. texana*, j = *P. vera*, k = *P. weinmannifolia*, l = *P. saportae*. Izvor: Yi i dr. 2008.

1.4. Molekularni biljezi u sistematici biljaka

Sistematika je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem biološke raznolikosti s ciljem kako bi se identificirala i razvrstala sva živa bića na svijetu na temelju njihovih srodstvenih odnosa kroz vrijeme, odnosno na temelju njihove evolucijske povijesti. Filogenija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem srodstvenih odnosa između vrsta (ili kategorijama iznad razine vrste) s ciljem rekonstrukcije evolucijske povijesti vrsta, viših taksonomskih kategorija, te u konačnici evolucijske povijesti života na zemlji. Filogenija zajedno s taksonomijom, znanstvenom disciplinom koja se bavi opisom, imenovanjem (nomenklaturom), identifikacijom i razvrstavanjem (klasifikacijom) organizama u hijerarhijske kategorije, čini sistematiku. Srodstveni odnosi najčešće se prikazuju pomoću filogenetskog stabla, a modernu sistematiku biljaka danas je gotovo nemoguće zamisliti bez molekularnih metoda i biljega, odnosno bez molekularne filogenije i taksonomije, pa tada govorimo o molekularnoj sistematici.

Genetskim biljegom (eng. *genetic marker*) se smatra bilo koji ulomak DNA koji pokazuje neki oblik uočljivog polimorfizma između analiziranih jedinki (Šatović 1999). Genetski biljezi predstavljaju bilo koje fenotipsko svojstvo koje je determinirano malim brojem alela koji se nasljeđuju prema Mendelovim principima ili fragmente DNA molekule različitih veličina. Razlikuju se tri osnovne grupe genetskih biljega: morfološki biljezi (tzv. mendelovska fenotipska svojstva), biokemijski biljezi (npr. izoenzimi) i DNA biljezi. DNA biljezi otkrivaju genetsku varijabilnost izravno na razini molekule DNA. Istraživanja genetske raznolikosti šumskog drveća i grmlja putem genetskih biljega u prošlosti su se temeljila isključivo na analizama biokemijskih biljega – izoenzima. Međutim, primjena izoenzima je bila ograničena njihovom relativno malom varijabilnošću unutar nekih populacija. Danas se za procjenu genetske raznolikosti najviše upotrebljavaju različiti DNA biljezi (Franjić i Liber 2001).

Neke od važnijih primjena DNA biljega uključuju njihovu uporabu za: opis sustava razmnožavanja, razine srodnosti, odnosno križanja u bliskom srodstvu (eng. *inbreeding*), prostorne i vremenske obrasce genetske raznolikosti unutar i između populacija, opis geografskih obrazaca genetske raznolikosti, zaključke o taksonomskim i srodstvenim (filogenetskim) odnosima među vrstama i populacijama, procjene utjecaja gospodarenja i oplemenjivanja na genetsku raznolikost šumskog drveća i grmlja, stvaranje genetskih mapa, očuvanje i uporabu biljnih genetskih izvora, u sistematici i populacijskoj genetici, u identifikaciji roditelja za buduća križanja i u identifikaciji čistih linija i kultivara (Šatović 1999; Franjić i Liber 2001; Kajba i Ballian 2007; White i dr. 2007; Besse 2014; Liber i dr. 2023).

Razvoj molekularnih biljega u šumarskoj genetici pratio je općeniti razvoj molekularne biologije. Prvi korak u razvoju molekularnih biljega u šumarstvu bio je uvođenje RFLP biljega (polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata, eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) u 1980-ima. Ta tehnika omogućila je identifikaciju genetske varijabilnosti između jedinki i populacija na temelju različitih duljina fragmenata DNA primjenom restrikcijskih enzima endonukleaza koje prepoznaju specifične fragmente dužine četiri do šest parova baza omeđene mjestima restrikcije (Šatović 1999). Otkriće lančane reakcije polimerazom

(eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR; Mullis i dr. 1986; Saiki i dr. 1988) i automatskog Sangerovog sekvenciranja (Smith i dr. 1986) omogućili su brzu i preciznu amplifikaciju malih fragmenata DNA te uključivanje genetičke informacije u filogenetske analize i ujedno razvitak nove discipline poznate kao molekularna filogenija (Liber i dr. 2023).

Za oplemenjivanje šumskog drveća i grmlja primjena molekularnih biljega ima veliki značaj jer je omogućila brže i preciznije utvrđivanje genetske varijabilnosti, a samim time ubrzala i poboljšala proces oplemenjivanja. Genetska raznolikost dio je ukupne biološke raznolikosti, a zapravo predstavlja bogatstvo različitih alela unutar jedinki, populacija, odnosno vrsta. Veća razina genetske raznolikosti omogućava bolju prilagodbu jedinki, populacija, odnosno vrsta u promjenjivom okolišu. Gubitak genetske varijabilnosti značio bi smanjenje dugoročne prilagodljivosti populacija odnosno vrsta na promjenjive uvjete okoliša. Poznavanje razine, obrasca i uzroka genetske raznolikosti neke vrste nužna je informacija za njen uzgoj, oplemenjivanje, izradu programa očuvanja genetske raznolikosti ili pak za taksonomska, evolucijska ili ekološka istraživanja vrste (Morić 2016).

Kao što je već spomenuto, za procjenu genetske raznolikosti i u molekularnoj sistematici biljaka najviše se upotrebljavaju različiti DNA biljezi, a najčešće korišteni su (Šatović 1999; Ballian i Kajba 2011; Liber i dr. 2023):

- 1) Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (**RFLP**),
- 2) Slučajno amplificirana polimorfna DNA (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA* – **RAPD**),
- 3) Ponavljajuće jednostavne sekvence (eng. *Simple Sequence Repeats* – **SSR**),
- 4) Polimorfizam duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – **AFLP**),
- 5) Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, - **SNP**).

Također, u molekularnoj sistematici se često koriste i sekvence DNA, odnosno sekvenciranje određenih DNA regija pri čemu se određuje točan redoslijed nukleotida (A, T, G, C) odnosno primarna struktura nekog DNA fragmenta. Najčešće se za potrebe molekularne sistematike biljaka i za utvrđivanje filogenetskih odnosa sekvenciraju različite intergenske regije poput *rbcL*, *trnK*, *trnL*, *trnH-psbA* i *ndhF* regija kloroplastne cpDNA, te ITS regija jezgrine DNA (Dong i dr. 2012; Alvarez i Wendel 2003). U novije vrijeme popularne su i tzv. barkoding regije, kao što je primjerice *trnH-psbA* kloroplastna cpDNA regija predložena za filogenetska istraživanja kritosjemenjača (Kress i dr. 2005). U pravilu, DNA biljezi se koriste za utvrđivanje srodstvenih odnosa između populacija iste vrste ili između blisko srodnih vrsta, dok se DNA sekvence najčešće koriste za utvrđivanje srodstvenih odnosa između vrsta i između viših taksonomskih kategorija (iznad razine vrste), iako naravno postoje iznimke.

1.4.1. AFLP (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) molekularni biljezi

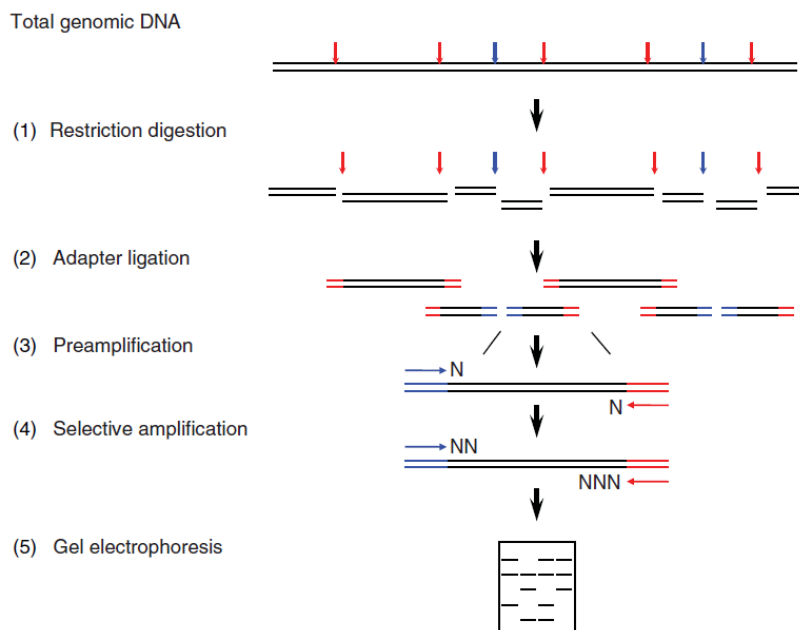
Polimorfizam duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (AFLP) je molekularna metoda koja se temelji na kombinaciji RFLP i RAPD tehnike, a uključuje detekciju izrezanih dijelova (fragmenata) DNA molekula koji su naknadno umnoženi lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Ulomci DNA, odnosno restrikcijski fragmenti, dobivaju se rezanjem (restrikcijom) ukupne genomske DNA pomoću najčešće dva različita restrikcijska enzima. Za AFLP tehniku potrebna je veća količina DNA (0,3 – 1 g po reakciji) nego kod RAPD i RFLP tehnike, a i sam postupak je tehnički nešto kompliciraniji te iziskuje više laboratorijske opreme i stručnosti (Vos i dr. 1995). AFLP postupak su po prvi puta opisali Vos i dr. (1995), a uključuje četiri glavna koraka (Slika 27) (Vos i dr. 1995; Šatović 1999; Kamenjak 2015):

- 1) Restrikcija (rezanje) DNA uz pomoć dva različita restrikcijska enzima i ligacija (spajanje) oligonukleotidnih adaptera na krajeve dobivenih fragmenata,
- 2) Preselektivna amplifikacija (umnažanje) restrikcijskih fragmenata (tzv. preselektivni PCR),
- 3) Selektivna amplifikacija restrikcijskih fragmenata (tzv. selektivni PCR),
- 4) Razdvajanje umnoženih fragmenata DNA kapilarnom elektroforezom.

Cjelokupna genomska DNA se obično reže uz pomoć dva različita restrikcijska enzima te je potrebna visoka čistoća izolirane DNA jer zaostali polisaharidi mogu spriječiti potpuno rezanje DNA i time uzrokovati pogreške pri interpretaciji rezultata (Kamenjak 2015). Dvije osnovne skupine restrikcijskih enzima koje se koriste za rezanje su: rijetki rezač (eng. *rare cutter* – restrikcijski enzim čija se mjesta restrikcije rijetko javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje manji broj fragmenata veće molekularne težine, npr. EcoRI) i česti rezač (eng. *frequent cutter* – restrikcijski enzim čija se mjesta restrikcije često javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje veći broj fragmenata manje molekularne težine, npr. MseI (=TruII)) (Šatović 1999). Nakon restrikcije slijedi ligacija (spajanje) adaptera (fragmenti DNA dužine petnaestak parova baza poznate sekvence) na krajeve izrezanih fragmenata DNA upotrebom enzima ligaze. Pomoću početnica komplementarnih dodanim adapterima i restrikcijskim mjestima, izvodi se preselektivna amplifikacija. Svaka preselektivna početnica na 3' kraju, uz nukleotide restrikcijskog mjesta, sadržava jedan dodatni nukleotid po izboru. Nakon toga provodi se selektivna amplifikacija (selektivni PCR) uz pomoć selektivnih početnica od kojih svaka sadrži najčešće tri dodatna nukleotida na 3' kraju. Na kraju se izvodi razdvajanje fragmenata kapilarnom elektroforezom, a detekcija se najčešće osigurava upotrebom fluorescentno označene selektivne početnice na 5' kraju i laserskog detektora fluorescencije prisutnog u uređaju za kapilarnu elektroforezu, odnosno uređaju za automatsko sekvenciranje. Dodavanjem nukleotida na 3' krajeve početnica smanjuje se broj umnoženih fragmenata kako bi se mogli detektirati kapilarnom elektroforezom, a što je broj dodanih nukleotida veći amplificirat će se manji broj fragmenata (Vos i dr. 1995; Šatović 1999). Uobičajeno se istovremeno može analizirati 50-100

restrikcijskih fragmenta (Vos i dr. 1995; Kamenjak 2015).

Ova tehnika se pokazala učinkovitom za najrazličitija genetska istraživanja, a pouzdanija je (visoka ponovljivost rezultata) i zahtjeva manje rada od RFLP i RAPD tehnike te nije potrebno unaprijed poznavati određene sekvence genoma kao što je slučaj u SSR tehnici (Šatović 1999). Također, relativno je povoljna metoda u odnosu na druge dostupne biljege. Često je vrlo uspješno korištena kod utvrđivanja srodstvenih odnosa blisko srodnih svojti ili za analize hibridizacije između populacija i svojti (Belaj i dr. 2003; Sardaro i dr. 2012; Jug-Dujaković i dr. 2020; Rešetnik i dr. 2020; Wu i dr. 2020). Kao nedostatak možemo navesti dominantnost AFLP biljega, što znači da se ne mogu razlikovati homozigoti od heterozigota.



Slika 27. Shematski prikaz postupka provedbe AFLP tehnike. Izvor: Vuylsteke i dr., 2007.

2. Cilj istraživanja

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti srodstvene odnose četiri svojte roda *Pistacia* u Hrvatskoj primjenom AFLP molekularnih biljega: *P. terebinthus*, *P. lentiscus*, *P. × saportae* i *P. calcivora*. Specifični ciljevi bili su:

- 1) Utvrditi taksonomski status navodne opisane endemske vrste *P. calcivora* Radić (jadranski smrdelj ili vapnojed),
- 2) Istražiti hibridizaciju između *P. lentiscus* i *P. terebinthus*, odnosno utvrditi prisutnost hibridne svojte *P. × saportae* (prijelazna trišlja ili zmaska) u Hrvatskoj na molekularnoj razini.

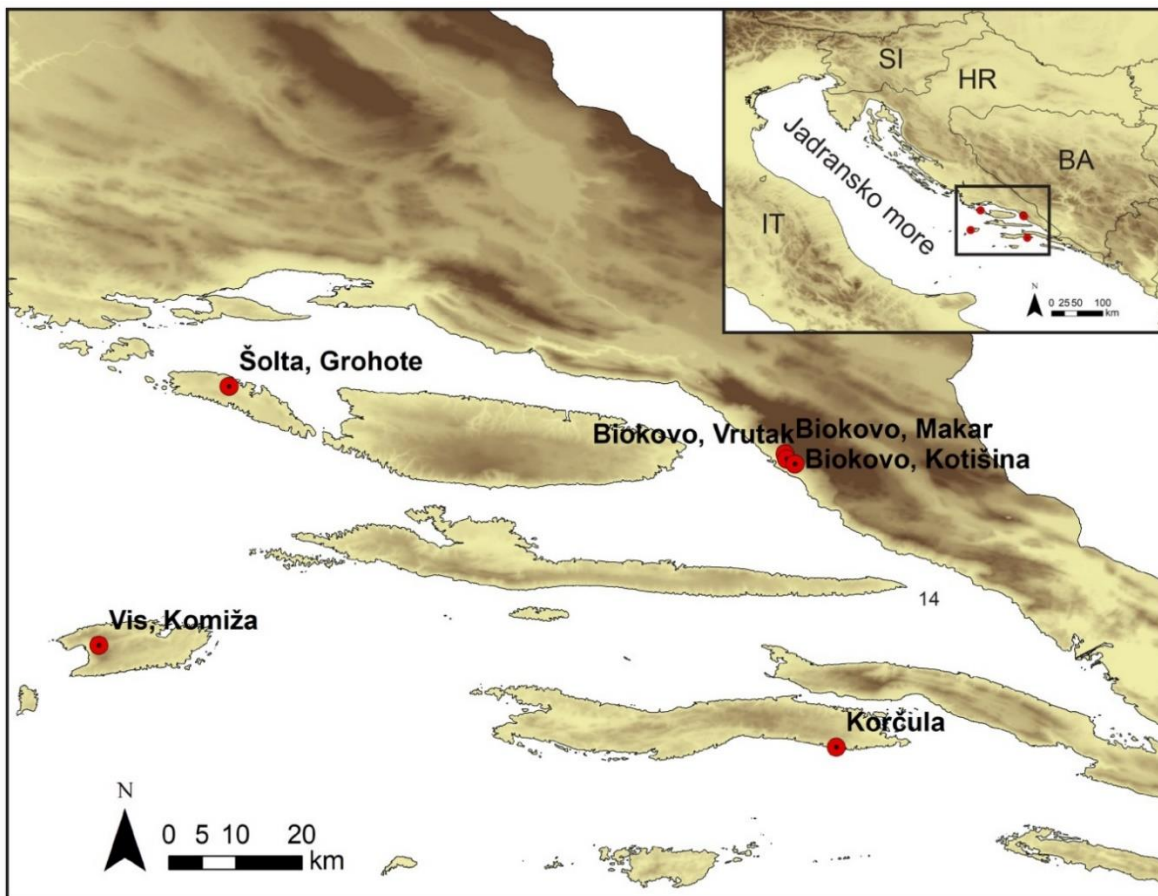
3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal

Za potrebe ovoga istraživanja prikupljeni su uzorci iz 13 populacija roda *Pistacia* (ukupno 116 jedinki) koje rastu na području Republike Hrvatske (Tablica 3). Sakupljeni su listovi potencijalnih križanaca *P. × saportae* s otoka Šolte, Korčule i Visa te također tri populacije navodne endemske vrste *P. calcivora* s Biokova s tri različita lokaliteta (Makar, Vrutak i Kotišina) (Slika 28). Jedinke svojti *P. × saportae* i *P. calcivora* identificirane su prilikom prikupljanja materijala na temelju morfologije listova. Na svakom lokalitetu sakupljanja *P. × saportae* dodatno su prikupljeni uzorci listova iz populacija roditeljskih svojti *P. lentiscus* i *P. terebinthus* (Tablica 3). Listovi pojedinih jedinki su tijekom sakupljanja pohranjeni u papirnatu filter vrećice te zbog što bolje konzervacije DNA u listovima odmah dodatno pohranjeni u plastične vrećice sa silika-gelom do postupka izolacije DNA.

Tablica 3. Broj populacije, svojta, lokalitet, broj jedinki (n) i koordinate populacija (x i y) roda *Pistacia* u Hrvatskoj iz kojih je prikupljen biljni materijal.

Populacija	Svojta	Lokalitet	n	x (°)	y (°)
P1	<i>P. lentiscus</i>	Šolta, Grohote	10	16,2827	43,39435
P2	<i>P. × saportae</i>	Šolta, Grohote	11	16,2827	43,39435
P3	<i>P. terebinthus</i>	Šolta, Grohote	10	16,2827	43,39435
P4	<i>P. lentiscus</i>	Korčula	12	17,10212	42,91128
P5	<i>P. × saportae</i>	Korčula	2	17,10212	42,91128
P6	<i>P. terebinthus</i>	Korčula	10	17,10212	42,91128
P7	<i>P. × saportae</i>	Vis, Komiža	8	16,10715	43,04736
P8	<i>P. lentiscus</i>	Vis, Komiža	10	16,10715	43,04736
P9	<i>P. terebinthus</i>	Vis, Komiža	10	16,10715	43,04736
P10	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Makar	10	17,03287	43,30384
P11	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Vrutak	11	17,03515	43,29695
P12	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Kotišina	9	17,0463	43,29023
P13	<i>P. lentiscus</i>	Biokovo, Kotišina	3	17,0463	43,29023
Ukupno jedinki			116		



Slika 28. Karta lokaliteta populacija roda *Pistacia* u Hrvatskoj iz kojih je prikupljen biljni materijal.

3.2. Izolacija ukupne stanične DNA

Ukupna stanična DNA je izolirana iz listova koji su prethodno osušeni u silika-gelu (odmah na terenu pri sakupljanju) pomoću komercijalnog kompleta za izolaciju DNA - DNeasy® Plant Mini Kit (250)(Qiagen). Na početku same izolacije izvagano je približno 20 mg suhog lisnog tkiva pojedinog uzorka pri čemu se pazilo kako bi se izbjeglo uzorkovanje primarne žile i sekundarnih postranih žila lista. Nakon vaganja suho lisno tkivo je stavljeno u plastične epruvetice (2 ml) s oznakama za populaciju i jedinku unutar pojedine populacije te je u svaku epruveticu dodana po jedna kuglica od nehrđajućeg čelika kako bi se lisno tkivo usitnilo do praškaste teksture u uređaju TissueLyser (Qiagen). Izolacija je provedena prema pripadajućem protokolu proizvođača DNeasy® Plant Mini Kit kompleta (Qiagen 2020) uz nekoliko preinaka. Naime, u sedmom koraku pripadajućeg protokola puferu AP1 (otopina deterdženta i proteinaze koja razgrađuje membrane) je dodan 2-merkaptoetanol (sprječava oksidaciju) i 1 %-tni polivinilpirolidon (PVP; inhibitor fenola). Također, u sedamnaestom koraku DNeasy Mini kolonice su dodatno centrifugirane (30 sec; 14000 rpm) nakon bacanja filtrata koji je prošao kroz

membranu kako bi se membrana kolonice što bolje prosušila, odnosno kako ne bi zaostao etanol (u sastavu AW2 pufera) na membrani. I na kraju, u osamnaestom koraku nakon dodavanja AE pufera uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min, a ne 5 min kao što stoji u protokolu.

3.2.1. Određivanje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija izolirane ukupne stanične DNA svakog uzorka izmjerena je korištenjem spektrofotometra Nanophotometer P330 (Implen®) dodatkom 2 μ l otopine DNA na vrh kivete za mjerenje (Slika 29).



Slika 29. Određivanje koncentracije izolirane DNA na uređaju Nanophotometer P330 (Implen®).

3.3. Polimorfizam duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (AFLP)

AFLP metoda provedena je na ukupno 116 uzoraka prema protokolu Vos i dr. (1995) uz nekoliko preinaka prema Carović-Stanko i dr. (2011). U AFLP analizu je bilo također uključeno osam ponavljajućih uzoraka i četiri slijepe probe (ultračista voda bez DNA uzorka).

3.3.1. Restrikcija ukupne stanične DNA i ligacija adaptera

Restrikcija (rezanje) ukupne stanične DNA je provedena pomoću endonukleaza EcoRI i TruI (=MseI), a ligacija koristeći oligonuklotidne adaptere EcoRI i TruI (Tablica 4, 6 i 7). Ukupna stanična DNA svakog uzorka razrijeđena je s ultračistom vodom (eng. *nuclease-free water*) na koncentraciju od 100 ng genomske DNA/16,5 μ L što čini 6,06 ng/ μ l. Tako pripremljen uzorak ukupnog volumena 16,5 μ l pomiješamo sa 16,5 μ l restriksijsko-ligacijske smjese (Tablica 8), koja je pripremljena u nekoliko koraka:

- A) RESTRIKCIJSKI ENZIM MIX – priprema smjese restrikcijskih enzima (Tablica 5),
- B) LIGACIJSKI MIX – priprema EcoRI i TruI adaptera (Tablica 4, 6 i 7),
- C) RESTRIKCIJSKO-LIGACIJSKI MIX – restrikcijsko-ligacijska smjesa (Tablica 8).

Tako pripremljeni uzorci inkubirani su 2 h na 37 °C te ostavljeni preko noći (14 h) na sobnoj temperaturi (22-23 °C).

Tablica 4. Naziv i sekvenca adaptera za ligaciju korištenih u restrikcijsko-ligacijskoj smjesi.

Naziv adaptera		Sekvenca adaptera
EcoRI	EcoRI F	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	EcoRI R	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
TruI	TruI F	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	TruI R	5'-TACTCAGGACTCAT-3'

Tablica 5. Priprema smjese restrikcijskih enzima (eng. *restriction enzyme mix*) za 140 uzoraka.

Reagens/koncentracija	Korištena količina (µl)
T4 buffer (10x)	42,00
NaCl (0,5 M)	42,00
BSA (1 mg/ml)	21,00
EcoRI HC (50 U/µL)	42,00
TruI HC (50 U/ µl)	8,40
T4 ligaza HC (30 U/µl)	14,00
H ₂ O	250,60
Ukupni volumen	420,00

Tablica 6. Priprema EcoRI ligacijske smjese.

Reagens/koncentracija	Korištena količina (µl)
EcoRI F adapter (2,5 µM)	10,40
EcoRI R adapter (2,5 µM)	10,40
H ₂ O	399,20
Ukupni volumen	420,00

Tablica 7. Priprema TruI ligacijske smjese.

Reagens/koncentracija	Korištena količina (µl)
TruI F adapter (25 µM)	52,40
TruI R adapter (25 µM)	52,40
H ₂ O	315,20
Ukupni volumen	420,00

Tablica 8. Reagensi i njihove koncentracije te ukupne količine u restrikcijsko-ligacijskoj smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.

Reagens/koncentracija	Korištena količina (μl)
T4 pufer (10x)	420,00
NaCl (0,5 M)	420,00
BSA (1 mg/ml)	210,00
EcoRI ligacijska smjesa	420,00
TruII ligacijska smjesa	420,00
Smjesa restrikcijskih enzima	420,00

3.3.2. Preselektivna PCR amplifikacija

Nakon restrikcije i ligacije uslijedio je postupak preselektivne PCR amplifikacije u kojemu su korištene početnice EcoRI i TruII s po jednim dodatnim nukleotidom (Tablica 9). Svakom uzorku dodano je po 4 μl inkubirane restrikcijsko-ligacijske smjese razrijeđene 8x (s 28 μl ultračiste vode). Preselektivna amplifikacija pojedinog uzorka provedena je u ukupnom volumenu od 20 μl (16 μL preselektivne PCR smjese i 4 μL razrijeđene restrikcijsko-ligacijske smjese), a korišteni reagensi i njihove količine za preselektivnu PCR smjesu prikazani su u Tablici 10.

Tablica 9. Naziv i sekvenca početnica za preselektivnu PCR amplifikaciju.

Naziv preselektivne početnice	Sekvenca početnice
EcoRI	5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3'
TruII	5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C-3'

Tablica 10. Reagensi, njihove koncentracije i količine u preselektivnoj PCR smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.

Reagens/koncentracija	Korištena količina (μl)
H ₂ O	1386,00
PCR pufer (10x)	280,00
dNTP	224,00
EcoRI preselektivna početnica (5 μM)	168,00
TruII preselektivna početnica (5 μM)	168,00
Taq HS polimeraza	14,00
Ukupni volumen	2240,00

Tako pripremljeni uzorci promiješani su na laboratorijskoj miješalici vortex L023 (Kisker Biotech) te centrifugirani u laboratorijskoj centrifugi 5804 R (Eppendorf AG). Nakon toga

provedena je lančana reakcija polimerazom (PCR) u uređaju Mastercycler EP Gradient (Eppendorf AG) (Slika 30) prema PCR programu prikazanom u Tablici 11.

Tablica 11. PCR program za preselektivnu amplifikaciju.

Temperatura (°C)	Trajanje (min)	Broj ciklusa
94	2:00	1
94	0:20	20
56	0:30	
72	2:00	
60	30:00	1
12	∞	1



Slika 30. PCR program za preselektivnu amplifikaciju na uređaju Mastercycler EP Gradient (Eppendorf AG).

3.3.3. Selektivna PCR amplifikacija

Po završetku preselektivne PCR amplifikacije 4 µl svakog preselektivnog PCR produkta je razrijeđeno 24x (s 92 µl ultračiste vode), kako bi se moglo dalje nastaviti s postupkom selektivne amplifikacije. Za selektivnu PCR amplifikaciju korištene su četiri kombinacije EcoRI selektivnih početnica koje su označene fluorescentnim bojama (FAM, NED, VIC i PET) na 5' kraju kako bi bila moguća odvojena detekcija dobivenih fragmenata te jedna kombinacija TruII (Tablica 12).

Tablica 12. Naziv, korištena fluorescentna boja i sekvenca početnica za selektivnu PCR amplifikaciju.

Naziv selektivne početnice	Fluorescentna boja	Sekvenca početnice
EcoRI + ACA	Fam	5'-GACTGCGTACCAATTC+ACA-3'
EcoRI + AGA	Ned	5'-GACTGCGTACCAATTC+AGA-3'
EcoRI + ACG	Vic	5'-GACTGCGTACCAATTC+ACG-3'
EcoRI + ACC	Pet	5'-GACTGCGTACCAATTC+ACC-3'
TruII + CGA		5'-GATGAGTCCTGAGTAA+CGA-3'

Selektivna amplifikacija provedena je u ukupnom volumenu od 20 µl (4 µl razrijeđenog preselektivnog PCR produkta i 16 µl selektivne PCR smjese), a korišteni reagensi i njihove količine prikazani su u Tablici 13.

Tablica 13. Reagensi i njihove koncentracije te količine u selektivnoj PCR smjesi pripremljenoj za 140 uzoraka.

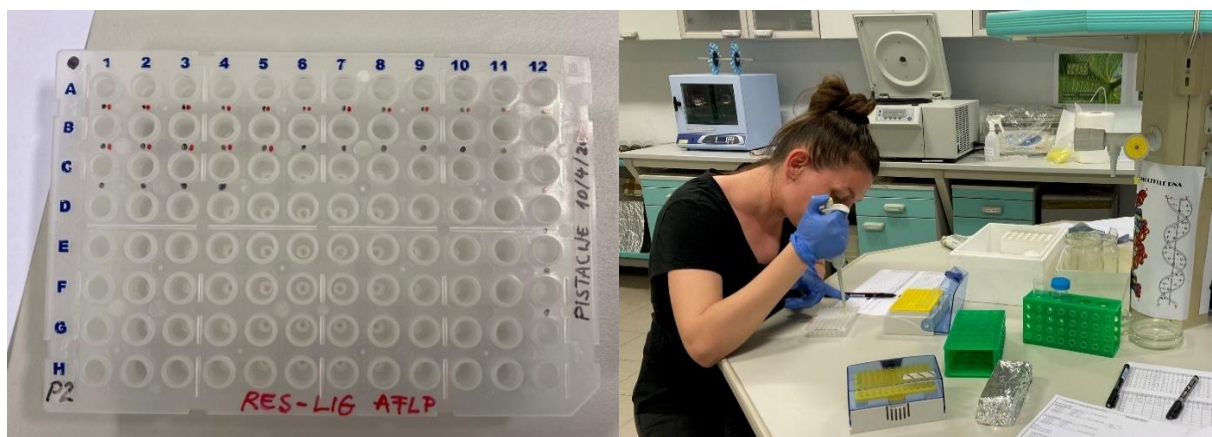
Reagens/koncentracija	Korištena količina (µl)
H ₂ O	952,00
PCR pufer (10x)	280,00
dNTP	224,00
EcoRI + ACA Fam (5 µM)	154,00
EcoRI + AGA Ned (5 µM)	154,00
EcoRI + ACG Vic (5 µM)	154,00
EcoRI + ACC Pet (5 µM)	154,00
TruII + CGA (5 µM)	154,00
Taq HS polimeraza	14,00
Ukupni volumen	2240,00

Uzorci su isto kao i u preselektivnoj amplifikaciji promiješani na laboratorijskoj miješalici te centrifugirani, a nakon toga podvrgnuti PCR reakciji prema PCR programu prikazanom u Tablici 14.

Tablica 14. PCR program za selektivnu PCR amplifikaciju.

Temperatura (°C)	Trajanje (min)	Broj ciklusa
94	2:00	1
94	0:20	10
66-56	0:30	
72	2:00	
94	0:20	20
56	0:30	
72	2:00	
60	30:00	1
12	∞	1

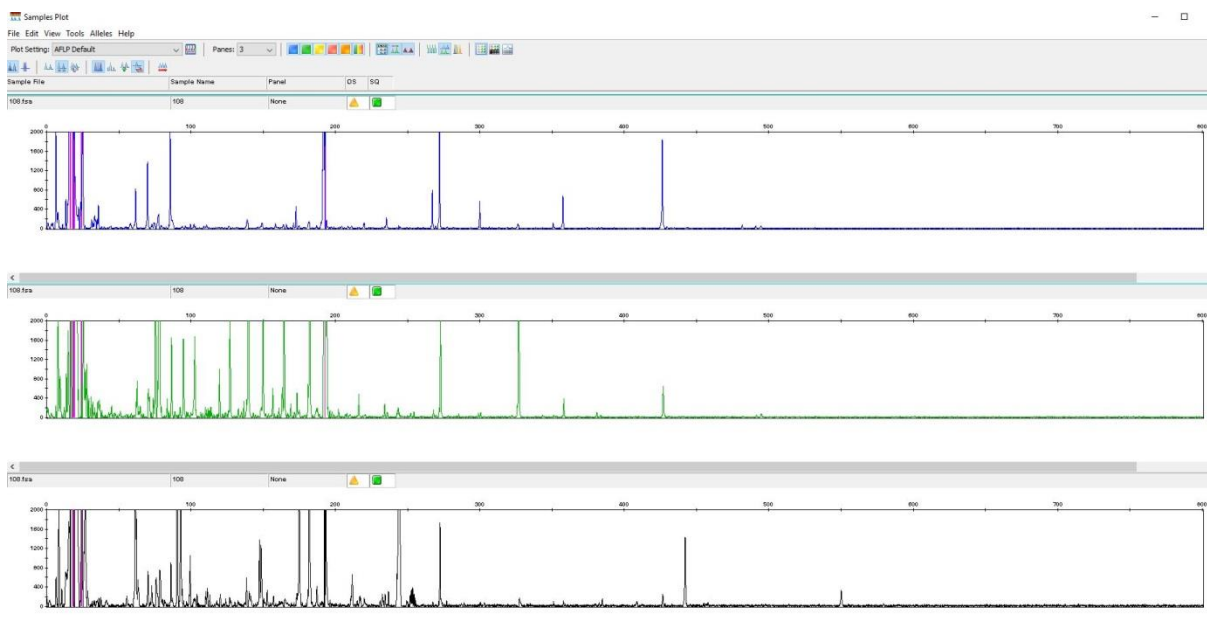
Sve reakcije provedene su u PCR-pločicama s 96 epruveta (Slika 31), a po završetku selektivne amplifikacije PCR-pločice s produktom pohranjene su u zamrzivač u Molekularno-biološkom laboratoriju na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije, do otpremanja u komercijalni servis za sekvenciranje i genotipizaciju – Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) gdje je provedena detekcija umnoženih AFLP fragmenata.



Slika 31. PCR-pločica korištena za provedbu AFLP metode u Molekularno-biološkom laboratoriju na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije. Autor: Martina Temunović.

3.4. Detekcija PCR umnoženih fragmenata DNA

Detekcija umnoženih AFLP fragmenata izvršena je pomoću kapilarne elektroforeze na automatskom DNA sekvenceru ABI3730 XL (Applied Biosystems). Fragmenti su razdvojeni pomoću standarda za veličinu fragmenata GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems). Kapilarna elektroforeza provedena je u komercijalnom servisu MacroGen Europe (Amsterdam, Nizozemska), a detektirani i razdvojeni AFLP fragmenti pristigli su elektroničkom poštom u obliku .fsa datoteka. Nadalje, detektirani i razdvojeni AFLP fragmenti (.fsa format podataka) vizualizirani su i analizirani (veličina fragmenata i visina pikova fragmenata) za svaku kombinaciju selektivnih početnica u programu GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems) (Slika 32). U GeneMapper programu korištene su sljedeće postavke za određivanje konačnog skupa AFLP fragmenata (AFLP-alela) u „Analysis Method Editor-u“: Analysis Range (bps) u rasponu od 50 do 500 ili 600 (analizirani su fragmenti od 50 do 500 ili 600 bp), Threshold za visinu pika 50, 75 ili 100 rfu jedinica, ovisno o kombinaciji selektivnih početnica (nisu detektirani fragmenti s visinom pika manjom od 50, 75 ili 100 rfu, ovisno o upotrjebljenoj selektivnoj početnici). Također, uzeti su u obzir samo polimorfni AFLP-aleli (fragmenti) koji su statistički informativni. Tako dobiven skup AFLP-alela (tzv. genotipovi svih jedinki) izvezen je iz GeneMapper programa kao binarna tablica (.txt format) koja je korištena kao ulaz za daljnje statističke analize. Na temelju kvalitete izolirane stanične DNA i umnoženih AFLP fragmenata, 113 od 116 jedinki je ušlo u daljnju statističku analizu.



Slika 32. Veličina fragmenata i visina pikova AFLP-alela korištenih raznih selektivnih početnica u programu GeneMapper 5.0.

3.5. Statistička analiza podataka i filogenetske analize

Dobivena binarna tablica podataka (AFLP-aleli) iz programa GeneMapper služila je kao ulazna tablica za program scanAFLP v1.3 R (Herman i dr. 2010) pomoću kojeg je provjerena pouzdanost dobivenih AFLP-alela. Za tu svrhu korišteno je osam ponavljajućih uzoraka i četiri slijepe probe (voda bez DNA uzorka). R Funkcije scanAFLP korištene su u programskom paketu R ver. 2.12 (R Development Core Team, 2010), te je tako dobiven reducirani finalni skup AFLP-alela (binarna matrica) za daljnje analize. Također, izračunata je razina pogreške (eng. *error rate*).

Binarna matrica dobivena nakon scanAFLP-r služila je kao ulazna datoteka za izračunavanje parametara genetske raznolikosti svake populacije u programu AFLPdat (Ehrich 2006). Izračunat je udio polimorfnih AFLP-alela (%P), učestalost rijetkih AFLP-alela (*frequency down-weighted marker* vrijednost, DW) prema Schönswetter i Tribsch (2005) te genetska raznolikost (H_E) prema Nei (1987). Također, pomoću R funkcije *Structure.D* iz programa AFLPdat pripremljena je ulazna datoteka za program STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i dr. 2000) kojim je analizirana genetska struktura istraživanih jedinki i populacija.

STRUCTURE analiza je Bayesovska analiza populacijske strukture pri kojoj se jedinke na temelju odabranog genetskog modela razvrstavaju u optimalni broj genetskih skupova, odnosno genetskih grupa/skupina (K), pretpostavljajući Hardy-Weinbergovu razvnotežu i ravnotežu vezanosti gena unutar grupe (Liber i dr. 2023). Prilikom STRUCTURE analize korišteni su slijedeći parametri: za svaki broj izvornih genetskih grupa (K) od 1 do 10 korišteno je 10 ponavljanja, faza zagrijavanja (eng. *burn-in period*) Markovljevih lanaca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*; MCMC) iznosila je 10000 koraka, a broj MCMC ponavljanja nakon zagrijavanja iznosio je 90000 koraka. Korišten je model mješovitog podrijetla jedinki (eng. *admixture model*) te korelirane alelne učestalosti (eng. *correlated allele frequencies*). Izbor optimalnog K broja temeljio se na ΔK metodi (Evanno i dr. 2005), te predstavlja broj izvornih populacija na temelju kojih je moguće objasniti genetsku strukturu uzorkovanih populacija. Također, moguće je utvrditi koje jedinke pripadaju kojoj genetskog grupi (izvornoj populaciji) te postoje li jedinke koje imaju hibridno (mješovito) podrijetlo iz dvije ili više grupa (Liber i dr. 2023). Hibridnim jedinkama smatrane su one čiji je udio pripadnosti bilo kojoj od genskih grupa bio manji od 0,7 ($Q < 0,7$). STRUCTURE rezultati su naknadno obrađeni (uprosječivanje ponavljanja) i vizualizirani pomoću programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl i dr. 2012) i CLUMPAK (Kopelman i dr. 2015).

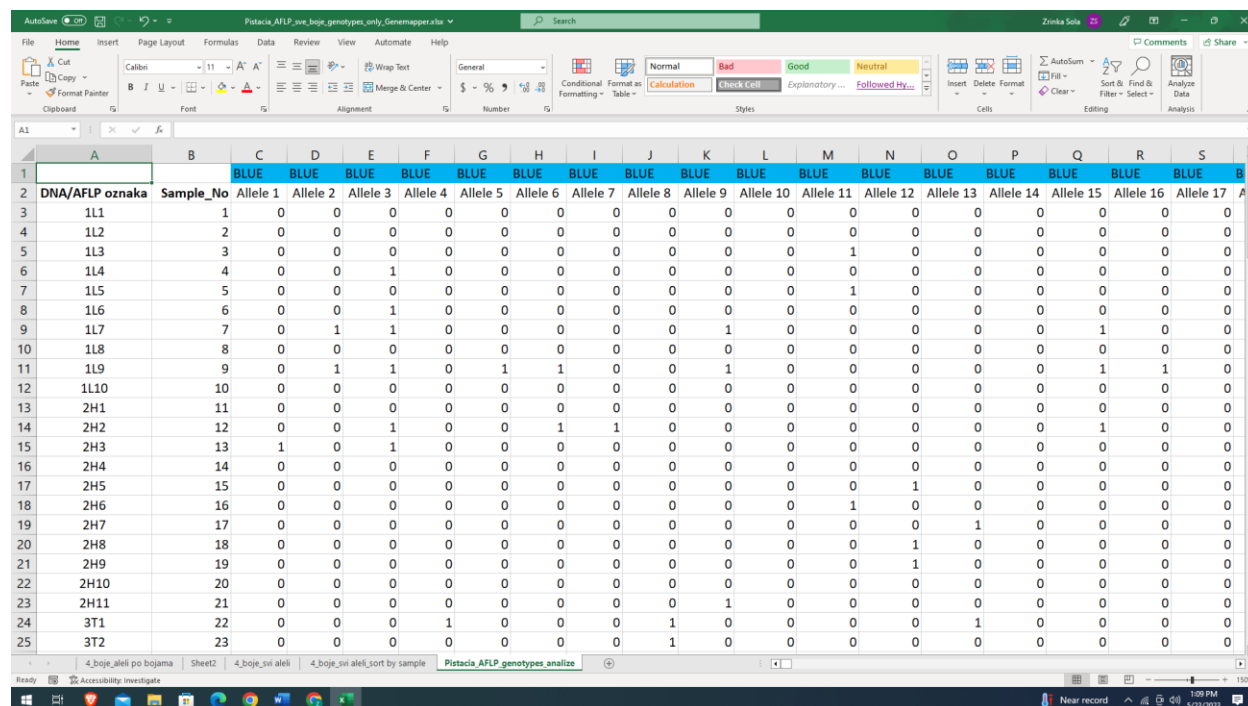
Binarna matrica dobivena nakon scanAFLP-r služila je također i kao ulazna datoteka za program PAST 3.22 (Hammer i dr. 2001) u kojem je izračunata genetska udaljenost između jedinki po Diceu (Dice 1945; Nei i Li 1979). Na temelju dobivene matrice udaljenosti između svih parova jedinki provedena je analiza glavnih koordinata (eng. *Principal Coordinate Analysis*; PCoA) i konstruirano je filogenetsko stablo metodom sparivanja susjeda (eng. *neighbour-joining*; NJ). Pouzdanost stabla procijenjena je *bootstrap* metodom s 1000 ponavljanja (Felsenstein 1985). Takvo NJ stablo je izvezeno iz PAST programa kao nexus datoteka (.nex), te učitano u program FigTree v1.4.4 u kojemu je vizualizirano. Također, iz programa PAST

izvezena je matrica udaljenosti po Diceu, te je zatim na temelju nje konstruiran Neighbor-net dijagram (Bryant i Moulton 2004) u programu SplitsTree 4.14.8 (Huson i Bryant 2006) koji prikazuje srodstvene odnose između analiziranih jedinki u obliku filogenetske mreže.

4. Rezultati

4.1. Identifikacija AFLP-alela i genetska raznolikost populacija

U programu GeneMapper® 5.0 očitani su AFLP-aleli svih 113 jedinki koje su uzete u daljnju statističku analizu nakon provjere kvalitete izolirane stanične DNA i umnoženih AFLP fragmenata. Identificirano je ukupno 1502 AFLP-alela u rasponu veličine od 50 do 600 bp. Nakon identifikacije alela u programu GeneMapper izvezena je binarna tablica (genotipovi svih jedinki) gdje je prisutnost svakog alela označena s 1, a odsutnost s 0 (Slika 33).



DNA/AFLP oznaka	Sample_No	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5	Allele 6	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10	Allele 11	Allele 12	Allele 13	Allele 14	Allele 15	Allele 16	Allele 17
1L1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1L2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1L3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1L4	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1L5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1L6	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1L7	7	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1L8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1L9	9	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1L10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H1	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H2	12	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2H3	13	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2H6	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2H7	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2H8	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2H9	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2H10	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2H11	21	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3T1	22	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3T2	23	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Slika 33. Binarna Excel (.xlsx) tablica identificiranih AFLP-alela u programu GeneMapper® 5.0 (Applied Biosystems).

Binarna tablica AFLP-alela izvezena iz programa GeneMapper® korištena je za provjeru pouzdanosti identificiranih AFLP-alela u R programskom paketu korištenjem funkcije scanAFLP kojom su dodatno filtrirani dobiveni aleli. Tako je dobiven reducirani finalni skup od ukupno 584 polimorfnih AFLP-alela korišten za daljnje statističke analize (Slika 34) uz prosječnu razinu pogreške od 1,79 %.

	M001	M002	M003	M004	M005	M006	M007	M008	M009	M010	M011	M012	M013	M014	M015	M016	M017	M018	M0
1																			
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	9	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
12	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
18	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
20	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
22	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
23	22	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24	23	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	24	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Slika 34. Binarna Excel (.xlsx) tablica reduciranog finalnog skupa 584 polimorfnih AFLP-alela dobivenih pomoću funkcije scanAFLP u R programu.

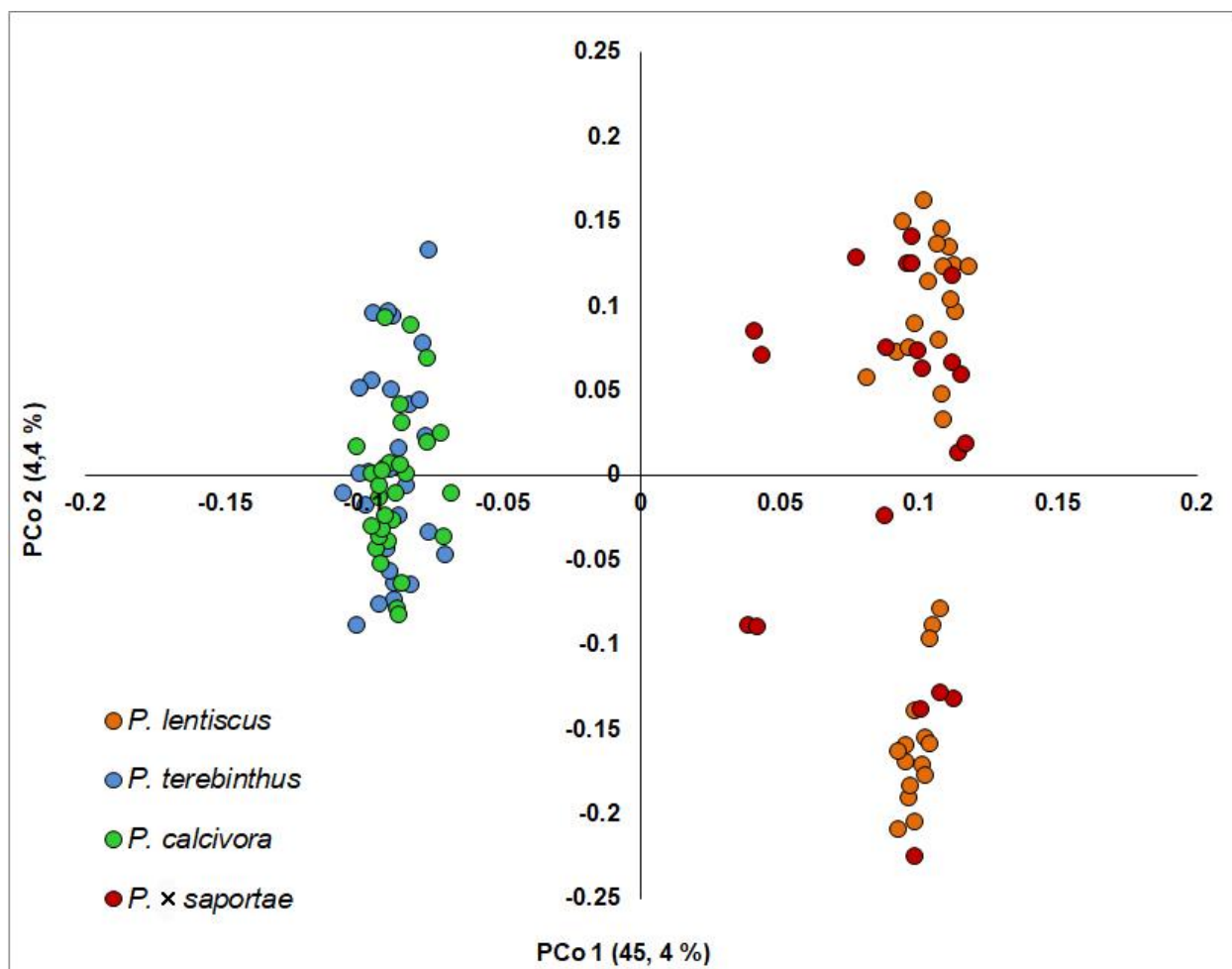
Parametri genetske raznolikosti za svaku populaciju pokazivali su sličan trend. Udio polimorfnih AFLP-alela (%P) po populaciji kretao se od 1,37 % (populacija P5) do 26,71 % (populacija P6), te je u prosjeku iznosio 18,81 % (Tablica 15). Također, najvišu genetsku raznolikost (H_E) prema Nei (1987) imala je populacija P6, dok je najmanju imala populacija P5. DW vrijednost je u prosjeku iznosila 566,718, pri čemu je najviša vrijednost zabilježena kod populacije P7, a najmanja ponovo kod populacije P5 (Tablica 15). Sveukupno, populacije P6 (*P. terebinthus*, Korčula; %P = 26,71, H_E = 0,085), P9 (*P. terebinthus*, Komiza; %P = 25,68, H_E = 0,083) i P3 (*P. terebinthus*, Šolta; %P = 23,97, H_E = 0,076) imale su najveću genetsku raznolikost u usporedbi s drugim istraživanim populacijama, dok su populacije P7 (*P. × saportae*, Vis), P13 (*P. lentiscus*, Biokovo) i P2 (*P. × saportae*, Šolta) imale najveću učestalost rijetkih alela (DW). Sveukupno, najmanju genetsku raznolikost imala je populacija P5 (*P. × saportae*, Korčula).

Tablica 15. Parametri genetske raznolikosti istraživanih populacija temeljem AFLP biljega; broj populacije, svojta, lokalitet, broj jedinki (n), udio polimorfnih AFLP-alela (%P), genetska raznolikost (H_E) i učestalost rijetkih alela (DW) istraživanih populacija. Najviše vrijednosti su podebljane.

Populacija	Svojta	Lokalitet	n	%P	H_E	DW
P1	<i>P. lentiscus</i>	Šolta, Grohote	8	17,47	0,065	535,859
P2	<i>P. × saportae</i>	Šolta, Grohote	11	21,58	0,059	697,055
P3	<i>P. terebinthus</i>	Šolta, Grohote	10	23,97	0,076	540,638
P4	<i>P. lentiscus</i>	Korčula	12	19,52	0,060	527,211
P5	<i>P. × saportae</i>	Korčula	2	1,37	0,014	335,780
P6	<i>P. terebinthus</i>	Korčula	10	26,71	0,085	622,109
P7	<i>P. × saportae</i>	Vis, Komiža	8	22,60	0,075	773,008
P8	<i>P. lentiscus</i>	Vis, Komiža	10	15,41	0,049	546,442
P9	<i>P. terebinthus</i>	Vis, Komiža	10	25,68	0,083	688,819
P10	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Makar	10	21,40	0,071	454,733
P11	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Vrutak	10	20,55	0,072	453,376
P12	<i>P. calcivora</i>	Biokovo, Kotišina	9	19,52	0,071	469,006
P13	<i>P. lentiscus</i>	Biokovo, Kotišina	3	8,73	0,058	723,293
Srednja vrijednost				18,81	0,064	566,718

4.2. Genetska struktura i srodstveni odnosi istraživanih populacija

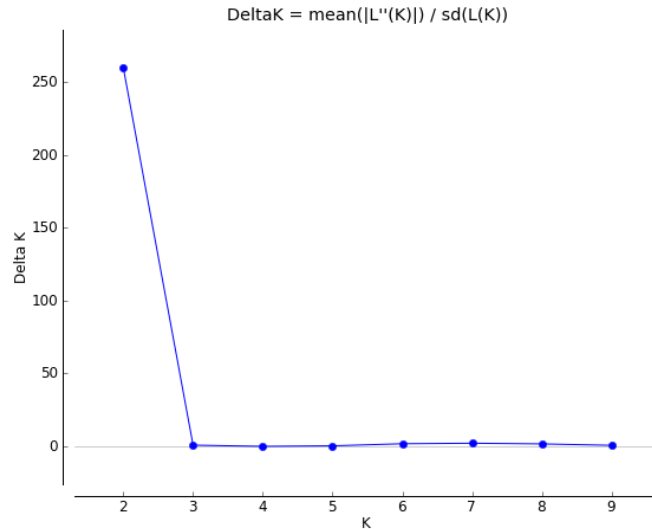
Analiza glavnih koordinata (PCoA) u programu PAST provedena je na temelju matrice udaljenosti po Diceu između svih parova jedinki. Rezultati PCoA analize pokazali su dvije odvojene grupe jedinki (Slika 35). Jednu grupu čine jedinke svojte *P. terebinthus* i sve jedinke navodne svojte *P. calcivora*, a drugu grupu jedinke svojte *P. lentiscus* i jedinke koje su prvobitno prema morfologiji određene kao svojta *P. × saportae*. Unutar grupe *P. lentiscus* i *P. × saportae* jasno se izdvojilo nekoliko potencijalno hibridnih jedinki (5H1, 5H2, 7H1 i 7H2) (Slika 35).



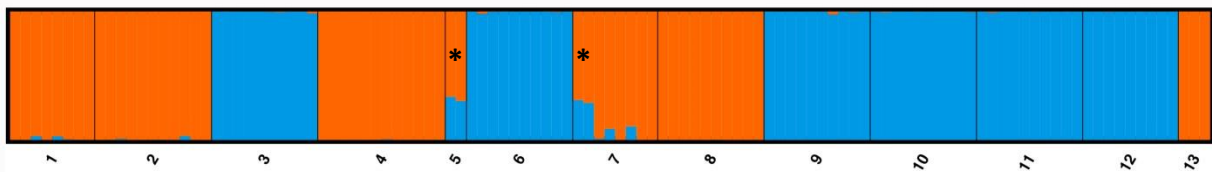
Slika 35. Analiza glavnih koordinata (PCoA) na temelju matrice udaljenosti po Diceu između svih jedinki provedena u programu PAST 3.22. Jedinke su obojane prema prvobitnoj identifikaciji temeljem morfologije: plava – *P. terebinthus*, narančasta – *P. lentiscus*, zelena – *P. calcivora*, tamno crvena – *P. x saportae*.

Optimalni broj genetskih skupova (K) utvrđen je pomoću programa STRUCTURE i izračunom ΔK vrijednosti za svaki K (K = 1 do K = 10). Najviša vrijednost ΔK utvrđena je za K = 2 (dvije izvorne populacije) (Slika 36). Prvi genetski skup odgovara svojiti *P. terebinthus* te uključuje sve jedinke i populacije svojite *P. terebinthus* (P3, P6 i P9), ali i sve jedinke koje su prvobitno određene kao potencijalni takson *P. calcivora* (Slika 37). Sve jedinke i populacije navodne svojite *P. calcivora* (P10, P11, P12) pokazale su jasnu pripadnost genetskom skupu *P. terebinthus* s udjelom genoma Q > 99 % (Slika 37). Drugi genetski skup odgovara svojiti *P. lentiscus* i uključuje sve jedinke i populacije ove svojite (P1, P4, P8 i P13), ali i većinu pretpostavljenih hibridnih jedinki svojite *P. x saportae*. Naime, sve jedinke iz populacije P2 sa Šolte, identificirane na temelju morfologije kao *P. x saportae*, pokazale su pripadnost genetskom skupu *P. lentiscus* (Slika 37). Međutim, nekoliko jedinki iz populacije P5 (*P. x saportae*, Korčula) i P7 (*P. x saportae*, Vis) pokazalo je hibridni karakter između dvije izvorne populacije,

odnosno hibridni karakter između dva genetska skupa roditeljskih svojiti *P. terebinthus* i *P. lentiscus* (Slika 37). U populaciji P7 dvije od osam jedinki pokazale su pripadnost genetskom skupu *P. lentiscus* s udjelima genoma $Q = 71 \%$, odnosno $Q = 69 \%$, dok su ostale jedinke te populacije pokazale pripadnost izvornoj populaciji *P. lentiscus* sa $Q > 90 \%$ (Slika 37). U populaciji P5 obje sakupljene jedinke pokazale su pripadnost genetskom skupu *P. lentiscus* s udjelom genoma $Q < 70 \%$, a pripadnost genetskom skupu *P. terebinthus* iznosila je $Q = 30 \%$, odnosno $Q = 34 \%$ (Slika 37).



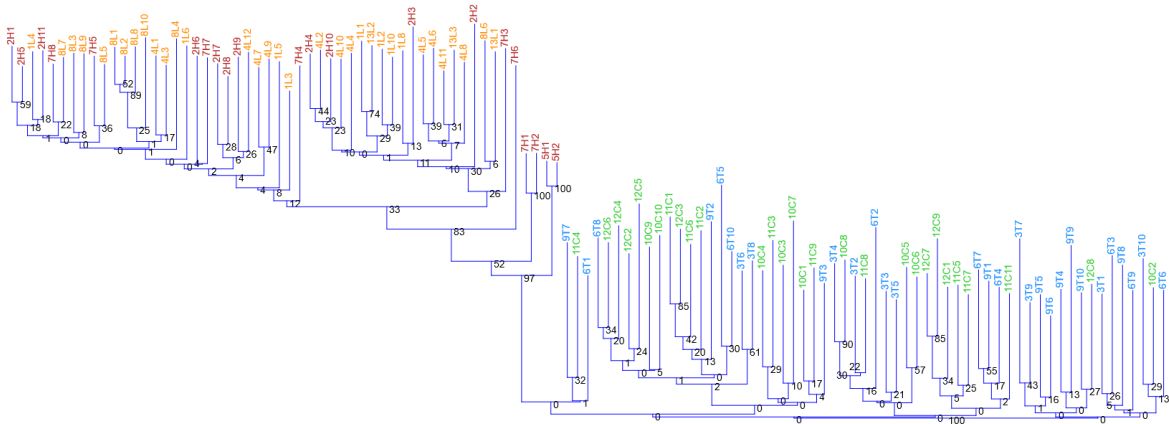
Slika 36. Optimalan broj genetskih skupova (K) i pripadajuća ΔK vrijednost za svaki pretpostavljeni K izračunata i vizualizirana pomoću programa STRUCTURE i STRUCTURE HARVESTER v0.6.94.



Slika 37. Genetska struktura istraživanih jedinki i populacija temeljem programa STRUCTURE vizualizirana pomoću programa CLUMPAK za $K = 2$. Svaki stupac predstavlja jedinku za koju je prikazan postotni udio pripadnosti svakom od dva genetska skupa: narančasta – genetski skup *P. lentiscus*, plava – genetski skup *P. terebinthus*. Zvezdicama su označene hibridne jedinke *P. × saportae*. Brojevi populacija odgovaraju Tablici 3 i Tablici 15.

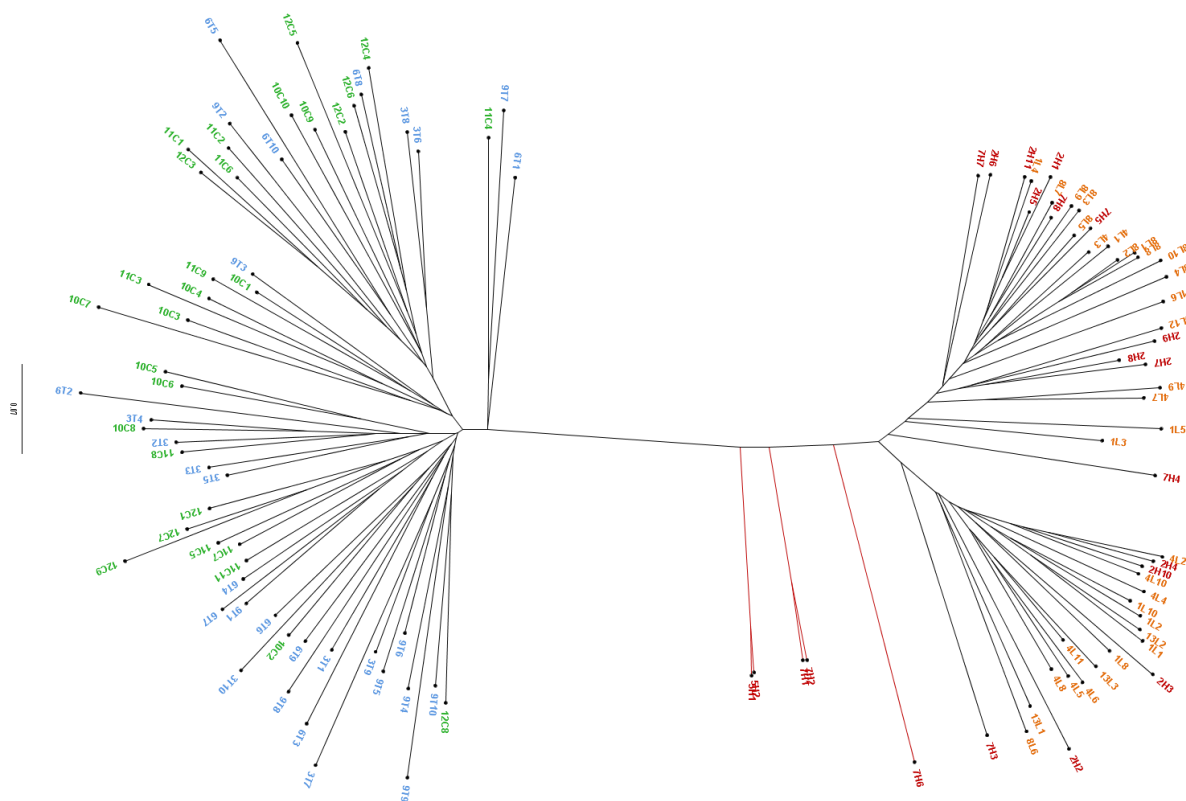
U programu PAST 3.22, na temelju matrice udaljenosti po Diceu između svih parova jedinki, konstruirano je filogenetsko stablo metodom sparivanja susjeda (NJ) uz procijenjenu pouzdanosti bootstrap metodom s 1000 ponavljanja. Isto kao i u prethodnim analizama, na stablu je uočeno odvajanje dvije glavne skupine. Jedinke navodne svojite *P. calcivora* grupirale su se na stablu sa

svojom *P. terebinthus*, a većina pretpostavljenih jedinki *P. × saportae* na stablu se grupiralo s jedinkama svoje *P. lentiscus* (Slika 38). Četiri hibridne jedinke *P. × saportae* (5H1, 5H2, 7H1 i 7H2) izdvojile su se u zasebne grane uz vrlo visoku pouzdanost (bootstrap vrijednost 100 %) (Slika 38). Također, potencijalno hibridna jedinka 7H6 izdvojila se u zasebnu granu, ali uz nižu pouzdanost (bootstrap vrijednost 83 %).



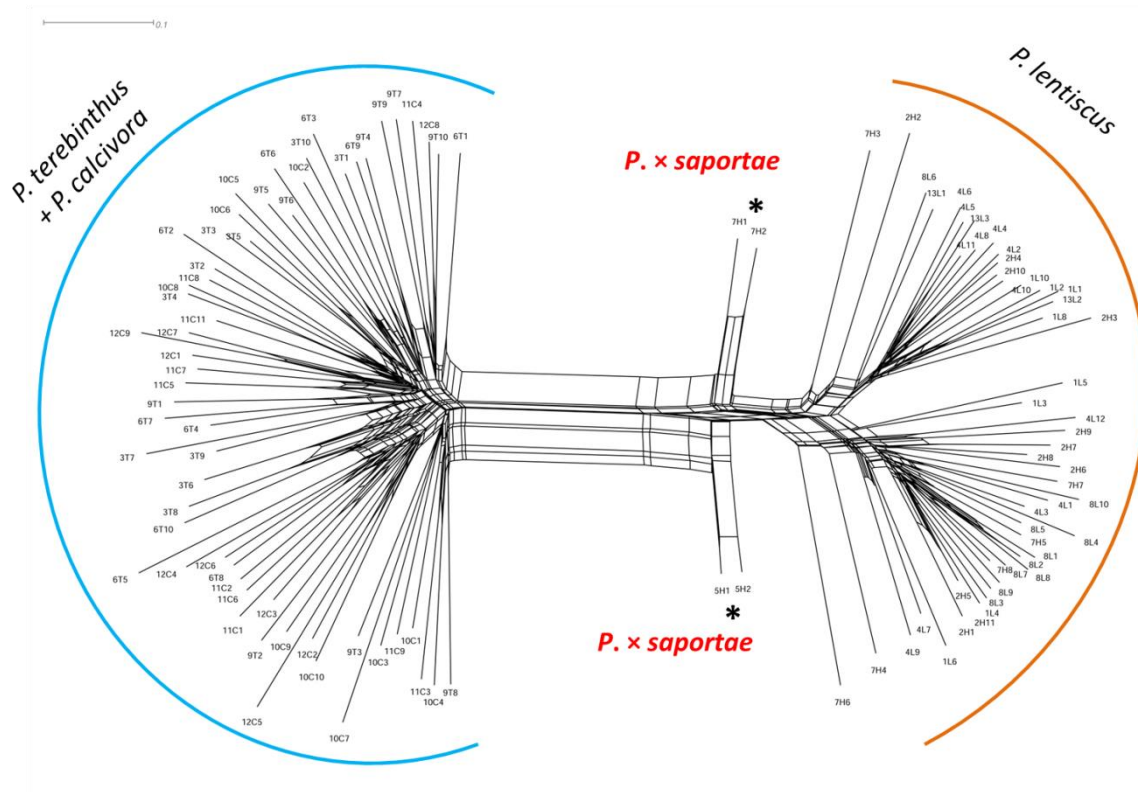
Slika 38. Filogenetsko stablo na temelju matrice udaljenosti između jedinki po Diceu konstruirano metodom sparivanja susjeda (eng. *neighbour-joining*; NJ) u programu PAST 3.22. Pouzdanost je procijenjena bootstrap metodom s 1000 ponavljanja, a dobivene bootstrap vrijednosti označene su na granama. Jedinke su obojane kao na slici 35: Plava – *P. terebinthus*, zelena – *P. calcivora*, narančasta – *P. lentiscus*, tamno crvena – *P. × saportae*.

Konstruirano filogenetsko stablo također je naknadno vizualizirano u programu FigTree v1.4.4 i pokazuje odvajanje pet potencijalno hibridnih jedinki *P. × saportae* (5H1, 5H2, 7H1, 7H2 i 7H6) (Slika 39).



Slika 39. Nezakorijenjeno *neighbour-joining* (NJ) filogenetsko stablo konstruirano na temelju matrice udaljenosti između jedinki po Diceu u programu FigTree v1.4.4. Jedinke su obojane kao na slici 35: plava – *P. terebinthus*, zelena – *P. calcivora*, narančasta – *P. lentiscus*, tamno crvena – *P. × saportae*. Pet potencijalno hibridnih jedinki *P. × saportae* označeno je crvenim granama.

Naposljetku, u programu SplitsTree konstruiran je Neighbor-net dijagram na temelju matrice udaljenosti po Diceu koji prikazuje srodstvene odnose između analiziranih jedinki u obliku filogenetske mreže (Slika 40). Na filogenetskoj mreži je uočljivo, kao i na filogenetskim stablima, jasno odvajanje dvije glavne grupe koje odgovaraju svojcima *P. terebinthus* i *P. lentiscus* te jasno odvajanje četiri hibridne jedinke *P. × saportae* (5H1, 5H2, 7H1 i 7H2) koje su srodstveno bliže roditeljskoj svojci *P. lentiscus* (Slika 40).



Slika 40. Neighbor-net dijagram konstruiran na temelju matrice udaljenosti po Diceu u programu SplitsTree 4 koji prikazuje srodstvene odnose između istraživanih jedinki u obliku filogenetske mreže. Zvjezdicama su označene četiri hibridne jedinke *P. × saportae*.

5. Rasprava

Rezultati svih provedenih analiza pokazali su prisutnost dvije odvojene grupe jedinki. Prva grupa uključuje sve jedinke svojiti *P. terebinthus* i jedinke koje su početno identificirane kao potencijalni takson *P. calcivora*. Druga grupa uključuje sve jedinke svojite *P. lentiscus* i većinu uzorkovanih jedinki potencijalne hibridne svojite *P. × saportae*. Međutim, za četiri jedinke *P. × saportae*, smještene između dvaju roditeljskih taksona *P. lentiscus* i *P. terebinthus* utvrđen je hibridni karakter s većim udjelom genoma *P. lentiscus* nego *P. terebinthus*. Na temelju dobivenih rezultata ovim je istraživanjem potvrđena prisutnost hibridne svojite *P. × saportae* u Hrvatskoj, dok za opisani takson *P. calcivora* nema podrške na molekularnoj razini.

Prema dostupnoj literaturi ovo je prvo molekularno istraživanje taksonomskih odnosa autohtonih svojiti roda *Pistacia* na istočnom Jadranu. Primjerice, Katsiotis i dr. (2003) su istraživali srodstvene odnose između nekih vrsta roda *Pistacia* u Grčkoj na molekularnoj razini primjenom RAPD i AFLP biljega. Od autohtonih svojiti na tome području u svoja istraživanja su uključili samo *P. lentiscus* i *P. terebinthus*, dok je puno veći naglasak stavljen na kultivare (npr. *P. vera*, *P. lentiscus* var. *chia*), što je i za očekivati jer je puno veći znanstveni interes za vrstama ovoga roda koje se koriste u komercijalnoj proizvodnji plodova, smole i sl. Također, uzorke *P. lentiscus* i *P. terebinthus* su prikupili na području Grčke i to s jedinki iz Botaničkog vrta Diomedes u Ateni, što može biti problematično pri interpretaciji dobivenih rezultata. Rod *Pistacia* na Mediteranu, na molekularnoj razini, istraživali su i Kafkas i Perl-Treves (2002), Golan-Goldhirsh i dr. (2004), Kafkas (2006), Yi i dr. (2008), Vendramin i dr. (2009) te Xie i dr. (2014). Svi oni su u svoja istraživanja od autohtonih svojiti istočnog Jadrana uključili *P. lentiscus* i *P. terebinthus* te kultiviranu svojitu *P. vera* (uključujući razne kultivare *P. vera*), a samo su Yi i dr. (2008) i Xie i dr. (2014) uključili i potencijalno hibridnu svojitu *P. × saportae*.

U ovome istraživanju najveću genetsku raznolikost imala je svojita *P. terebinthus* (H_e i %P), a najmanju genetsku raznolikost je imala svojita *P. lentiscus*. Međutim, *P. lentiscus* je imala višu učestalost rijetkih AFLP-alela (DW). Druga recentnija istraživanja genetske raznolikosti divljih svojiti roda *Pistacia* uglavnom se temelje na SSR biljezima (Vendramin i dr. 2009; Založlu i dr. 2015; Motalebipour i dr. 2016; Topçu i dr. 2016; Kafkas 2019; Karci i dr. 2020; Güney i dr. 2021), stoga nisu direktno usporediva što se tiče vrijednosti parametara genetske raznolikosti. Ipak, Motalebipour i dr. (2016) i Karci i dr. (2020) su utvrdili veću genetsku raznolikost *P. terebinthus* u odnosu na *P. lentiscus*, što je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja. Visoka zabilježena genetska raznolikost *P. terebinthus* u odnosu na ostale svojite ovoga roda (Motalebipour i dr. 2016; Karci i dr. 2020) može biti posljedica činjenice kako je *P. terebinthus* vjerojatno najmlađa vrsta roda *Pistacia* (Parfitt i Badenes 1997; Vendramin i dr. 2009). S druge pak strane, najudaljenija vrsta od ishodišne svojite *P. vera* smatra se upravo *P. lentiscus* (Parfitt i Badenes 1997; Kafkas 2006; Motalebipour i dr. 2016; Karci i dr. 2020), što bi moglo objasniti višu učestalost rijetkih alela.

Uz *P. terebinthus*, potencijalna endemska svojita *P. calcivora* također je pokazala visoku razinu genetske raznolikosti u usporedbi s drugim svojitama uključenim u ovo istraživanje.

Međutim, rezultati provedenih analiza pokazali su kako jedinke prvobitno identificirane na temelju morfologije kao *P. calcivora* pripadaju genetskoj grupi *P. terebinthus*, pa tako visoka genetska raznolikost može dodatno potvrditi pripadnost navodne *P. calcivora* svojiti *P. terebinthus*. Fra Jure Radić koji je opisao *P. calcivora* kao novu vrstu biokovskog područja na temelju morfoloških obilježja i tvrdio da je intraspecijska varijabilnost *P. calcivora* vrlo velika (opisao je čak dva varijeteta i 14 formi na temelju morfoloških obilježja) zapravo je indirektno zamijetio tu veliku genetsku raznolikost na morfološkoj razini, a koja je vjerojatno uvjetovana različitim specifičnim mikrostanišnim uvjetima na području Biokova. Također, u istraživanju morfološke varijabilnosti listova autohtonih svojiti roda *Pistacia* u Hrvatskoj (Jakšić 2021), u koje su bile uključene iste populacije kao i u ovome istraživanju, istraživane svojite (*P. terebinthus*, *P. lentiscus*, *P. calcivora* i *P. × saportae*) klasificirane su u grupe pri čemu je 34,4 % jedinki prvobitno identificiranih kao *P. calcivora* pokazalo pripadnost svojiti *P. terebinthus* na temelju izmjerenih morfoloških karakteristika listova. Takvo morfološko preklapanje u skladu je s rezultatima ovoga istraživanja te potvrđuje kako ne postoji značajna razlika na molekularnoj i morfološkoj razini između *P. calcivora* i *P. terebinthus*.

Osim svojite *P. calcivora* naglasak u ovome istraživanju stavljen je i na potencijalno hibridnu svojitu *P. × saportae* koja je u Hrvatskoj prvi puta zabilježena na Korčuli (Jeričević i dr. 2014) na temelju morfoloških obilježja. Prema bazi podataka FCD (2023), *P. × saportae* je također zabilježena na Šolti i Visu, gdje su i prikupljeni uzorci za ovo istraživanje, te na otoku Krku. Osim Hrvatske, na području Mediterana *P. × saportae* je zabilježena u Italiji, Francuskoj, Španjolskoj, Portugalu, Maroku, Alžiru, Palestini, Turskoj te na Cipru (POWO 2023). Potencijalno hibridnu svojitu *P. × saportae* do sada je istraživalo nekoliko znanstvenika (Werner i dr. 2001; Yi i dr. 2008; Xie i dr. 2014). Na području Španjolske hibridnu svojitu *P. × saportae* istraživali su Werner i dr. (2001) primjenom RAPD molekularnih biljega i usporedbom morfoloških karakteristika. To je ujedno i prvo molekularno istraživanje te svojite u koje su, uz četiri populacije *P. × saportae*, bile uključene i populacije roditeljskih jedinki *P. lentiscus* i *P. terebinthus*. Iako su Werner i dr. (2001) potvrdili hibridizaciju između *P. lentiscus* i *P. terebinthus*, Yi i dr. (2008) su dodatno potvrdili taksonomski status *P. × saportae* u svojoj detaljnoj molekularnoj filogenetskoj analizi roda *Pistacia* koristeći dvije jezgrine (ITS and NIA-i3) i tri plastidne (cpDNA) regije (ndhF, trnC-trnD, and trnL-F). Utvrdili su da je majčinska svojita vjerojatno *P. lentiscus*, a očinska *P. terebinthus*. Prema rezultatima ovoga istraživanja dvije jedinke iz populacije s Korčule i dvije jedinke s Visa pokazale su hibridni karakter s većom pripadnošću genetskom skupu *P. lentiscus*, što je u skladu s rezultatima Yi i dr. (2008). Populacija sa Šolte koja je prema inicijalnoj identifikaciji na temelju morfologije lista svrstana u *P. × saportae*, pokazala je pripadnost svojiti *P. lentiscus*. Jakšić (2021) je diskriminantnom analizom na temelju izmjerenih morfoloških karakteristika listova populacija u Hrvatskoj utvrdio 88,24 %-tnu točnost prvobitne klasifikacije jedinki svojite *P. × saportae*, što je značajno veći postotak jedinki nego što se pokazalo u ovome istraživanju na temelju molekularnih biljega. Ovaj rezultat potvrđuje kako nije moguće sa sigurnošću identificirati *P. × saportae* isključivo na temelju morfoloških karakteristika lista, kao što je i prethodno spomenuto (Werner i dr. 2001).

Prema posljednjoj dostupnoj taksonomskoj reviziji roda *Pistacia* (AL-Saghir i Porter 2012) provedenoj na temelju morfologije potvrđen je status hibridne svojte *P. × saportae* proučavanjem herbarskih primjeraka iz Palestine, Španjolske te s Cipra, a rezultati posljednjeg filogenetskog istraživanja roda upotrebom molekularnih biljega (Xie i dr. 2014) pokazali su odvajanje *P. × saportae* s *P. lentiscus*, što je također u skladu s rezultatima ovoga istraživanja.

Iako je svojta *P. calcivora* opisana na području Biokova, do sada nije postojao znanstveni interes za utvrđivanje taksonomskog statusa te navodne endemske vrste. Stoga ovo istraživanje daje doprinos u istraživanju nacionalne autohtone flore. Također, svojta *P. × saportae* nije do sada istraživana na području istočnog Jadrana gdje se može pretpostaviti njezina prisutnost, budući da su na tome području prirodno rasprostranjene roditeljske vrste *P. lentiscus* i *P. terebinthus*. Prisutnost *P. × saportae* se može očekivati i u Crnoj Gori, Albaniji i Grčkoj, međutim u tim zemljama ona još uvijek nije službeno potvrđena.

6. Zaključak

Ovim istraživanjem utvrđeno je kako ne postoji razlika između istraživanih populacija navodne opisane endemske vrste *P. calcivora* i vrste *P. terebinthus* u Hrvatskoj na molekularnoj razini. Stoga nema podrške kako bi se *P. calcivora* izdvojila kao zasebna vrsta, već se treba smatrati sinonimom za svojtu *P. terebinthus*. Osim toga, potvrđena je prisutnost hibridne svojte *P. × saportae* u hrvatskoj flori, na otocima Korčuli i Visu. Njezina rasprostranjenost na istočnoj obali Jadrana u budućnosti tek treba biti istražena, a svakako je preporučljivo u budućim molekularnim filogenetskim istraživanjima ponovno uključiti populacije sa Šolte prikupljene na nekim drugim lokalitetima toga otoka. Budući da u Crnoj Gori, Albaniji i Grčkoj prisutnost *P. × saportae* još nije službeno potvrđena, to svakako ostavlja prostora za uključivanje populacija roda *Pistacia* iz tih zemalja u buduća molekularna filogenetska istraživanja toga roda, kako bi se potvrdila eventualna prisutnost ove hibridne svojte i na tome području.

7. Literatura

- Adamović, L., 1911: Die Pflanzenwelt Dalmatiens, Leipzig W Klinkhardt, Leipzig.
- AL-Saghir, M.G., Porter, D.M., 2012: Taxonomic Revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). American Journal of Plant Sciences, 3: 12–32. doi:10.4236/ajps.2012.31002
- AL-Saghir, M. G., 2010: Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L.(Anacardiaceae) based on morphological data. Asian Journal of Plant Sciences, 9: 28.
- AL-Saghir, M. G., 2009: Evolutionary history of the genus *Pistacia* (Anacardiaceae). International Journal of Botany, 5: 255-257.
- AL-Saghir, M. G., 2006: Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* (Anacardiaceae) (Doktorska disertacija). Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Álvarez, I. J. F. W., Wendel, J. F., 2003: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular phylogenetics and evolution, 29: 417-434. doi: 10.1016/s1055-7903(03)00208-2.
- Al-Yafi, J., 1978: New characters differentiating *Pistacia atlantica* subspecies. Candollea, 33: 201–208.
- Ballian, D., Kajba, D., 2011: Oplemenjivanje šumskog drveća i očuvanje njegove genetske raznolikosti, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Sarajevu, Sarajevo, 77-81 str.
- Belaj, A., Šatović, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I., 2003: Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theoretical and applied genetics, 107: 736-744. doi: 10.1007/s00122-003-1301-5.
- Besse, P., 2014: Molecular Plant Taxonomy. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Bryant, D., Moulton, V., 2004: Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. Mol Biol Evol, 21: 255-265. doi: 10.1093/molbev/msh018.
- Burnat, E., 1896: Flores des Alpes maritimes on catalogue Raisonné, Vol. II, Georg & Cie., Lyon, 54 str.
- Carović-Stanko, K., Liber, Z., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Miloš, M., Šatović, Z., 2011: Molecular and chemical characterization of the most wide spread *Ocimum* species. Plant Syst Evol, 294: 253–262. doi:10.1007/s00606-011-0471-x.
- Castroviejo, S., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Quintanar, A., Buirra, A., 2015: Flora Iberica, Vol. IX, Rhamnaceae – Polygalaceae, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 99–106 str.
- Crane, J. C., Forde. H. I., 1976: Effects of four rootstocks on yield and quality of pistachio nuts. Journal of the American Society for Horticultural Science, 101: 604–606.

- Crane, J. C., Iwakiri, B. T., 1986: Pistachio yield and quality as affected by rootstock. *HortScience*, 21: 1139–1140.
- Dice, L. R., 1945: Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297–302.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., Zhou, S., 2012: Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PloS one*, 7: e35071. doi: 10.1371/journal.pone.0035071.
- Earl, D.A., von Holdt, B.M., 2012: STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ehrich, D., 2006: AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Mol. Ecol. Notes*, 6, 603-604.
- Engler, A., 1936: Syllabus der Pflanzenfamilien, Vol. 11, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Felsenstein, J., 1985: Confidence Limits in Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- Ferguson, L., Polito, V., Kallsen, C., 2005: The pistachio tree. Botany and physiology and factors that affect yield. U: Pistachio Production Manual, 4. izdanje, University of California, Fruit & Nut Research Information Center, Davis, California.
- Forenbacher, S., 1990: Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga, Zagreb, 484 str.
- Franjić, J., Liber, Z., 2001: Molekularna biologija u šumarstvu. *Šum. list*, 9-10: 495–500.
- Franjić, J., Škvorc, Ž., 2020: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske, 2. izdanje, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 308–311 str.
- Giperborejski, B., Marković, T., 1952: Dendrologija, Svjetlost, Sarajevo.
- Golan-Goldhirsh, A., 2009: Bridging the gap between ethnobotany and biotechnology of *Pistacia*. *Isr. J. Plant Sci.*, 57: 65–78.
- Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Wang, Z. S., Khadka, D. K., Saunders, J. A., Kostjukovsky, V., Rowland, L. J., 2004: Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. *Pl. Syst. Evol.*, 246: 9–18. doi:10.1007/s00606-004-0132-4
- Grundwag, M., Weaker, E., 1976: Comparative wood anatomy as an aid to identification of *Pistacia* L. species. *Israel Journal of Botany*, 25: 152–167.
- Güney, M., Kafkas, S., Zarifikhosroshahi, M., Gundesli, M. A., Ercisli, S., Holubec, V., 2021: Genetic Diversity and Relationships of Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) Genotypes Growing Wild in Turkey. *Agronomy*, 11: 671. doi: 10.3390/agronomy11040671

- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001: PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontolo Electron* 4, 9.
- Herrmann, D., Poncet, B.N., Manel, S., Rioux, D., Gielly, L., Taberlet, P., Gugerli, F., 2012: Selection criteria for scoring amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) positively affect the reliability of population genetic parameter estimates. *Genome*, 53: 302-310. doi: 10.1139/g10-006. PMID: 20616861.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006: Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*, 23: 254-267. doi: 10.1093/molbev/msj030.
- Idžojtić, M., 2013: Dendrologija – cvijet, češer, plod, sjeme, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatske šume d.o.o., Zagreb, 430–431 str.
- Idžojtić, M., 2009: Dendrologija – list, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatske šume d.o.o., Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, 583–585 str.
- Idžojtić, M., 2005: Listopadno drveće i grmlje u zimskom razdoblju, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatske šume d.o.o., Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, 153 str.
- Jeričević, M., Jeričević, N., Jaspirica, N., 2014: Floristic novelties from the island of Korčula and peninsula of Pelješac (South Croatia). *Natura croatica*, 23: 241–253.
- Jug-Dujaković, M., Ninčević, T., Liber, Z., Grdiša, M., Šatović, Z., 2020: *Salvia officinalis* survived in situ Pleistocene glaciation in ‘refugia within refugia’ as inferred from AFLP markers. *Plant systematics and evolution*, 306: 1-12. doi: 10.1007/s00606-020-01665-9.
- Kafkas, S., 2019: SSR Markers in the Genus *Pistacia*. U: M. Hasanuzzaman, M. C. M. Teixeira Filho, M. Fujita, T. A. Rodrigues Nogueira (Ed.): Sustainable Crop Production. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.89966
- Kafkas, S., 2006: Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* by AFLP markers. *Plant Systematic and Evolution*, 262: 113–124. doi:10.1007/s00606-006-0460-7
- Kafkas, S., Perl-Treves, R., 2002: Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. *HortScience*, 37: 168–171.
- Kafkas, S., Perl-Treves, R., 2001: Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 908–915.
- Kajba, D., Ballian, D., 2007: Šumarska genetika, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šumarski fakultet Sveučilišta u Sarajevu, Sarajevo, 223-248 str.
- Kamenjak, K., 2015: Analiza unutar-sortne varijabilnosti sorte Kleščec bijeli (*V. vinifera* L.) AFLP markerima (Diplomski rad). Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Karç1, H., Paizila, A., Topçu, H., Ilikçioğlu, E., Kafkas, S., 2020: Transcriptome Sequencing and Development of Novel Genic SSR Markers From *Pistacia vera* L.. *Front. Genet.*, 11: 1021. doi: 10.3389/fgene.2020.01021

- Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., Loukas, M., 2003: Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica*, 132: 279-286. doi: 10.1023/A:1025027323184
- Kokwaro, J. O., Gillett, J. B., 1980: Notes on the Anacardiaceae of Eastern Africa. *Kew Bull.*, 34: 745–760.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I., 2015: Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour.*, 15: 1179-1191. doi: 10.1111/1755-0998.12387.
- Kovačić, S., Nikolić, T., Ruščić, M., Milović, M., Stamenković, V., Mihelj, D., Jaspirica, N., Bogdanović, S., Topić, J., 2008: Flora jadranske obale i otoka (250 najčešćih vrsta), Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga d.d., Zagreb, 118–121 str.
- Kozhoridze, G., Orlovsky, N., Orlovsky, L., Blumberg, D. G., Golan-Goldhirsh, A., 2015: Geographic distribution and migration pathways of *Pistacia* – present, past and future. *Ecography*, 38: 1141-1154. doi: 10.1111/ecog.01496.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., Janzen, D. H., 2005: Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 8369-8374. doi: 10.1073/pnas.0503123102.
- Liber, Z., Šatović, Z., Pejić, I., 2023: Analiza genetske raznolikosti. U: Molekularno oplemenjivanje bilja, Pejić, I., Šatović, Z. (ur.): Agronomski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 30–42.
- Linnaeus, C., 1753: *Species Plantarum, Laurentii Salvii*, 2: 1025-1026.
- Mandalari, G., Barreca, D., Gervasi, T., Roussel, M. A., Klein, B., Feeney, M. J., Carughi, A., 2022: Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.): Production, Nutrients, Bioactives and Novel Health Effects. *Plants*, Basel, 11: 1–21. doi: 10.3390/plants11010018. PMID: 35009022; PMCID: PMC8747606.
- Michaux, F. A., Redouté, P. J., Besse, P., 1819: *The North America Sylva; Or, A Description of the Forest Trees of the United States, Canada and Nova Scotia: To which is Added a Description of the Most Useful of the European Forest Trees, Illustrated by 156 Engravings*, Vol. 3. Paris, C. D'Hautel: 7. str.
- Morgan, D. P., Epstein, L., Ferguson, L., 1992: *Verticillium* wilt resistance in pistachio rootstock cultivars: Assays and an assessment of two interspecific hybrids. *Plant Disease*, 76: 310–313.
- Morić, M., 2016: Genetska raznolikost hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u pokusnim nasadima s potomstvom iz odabranih sjemenskih sastojina (Doktorska disertacija). Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Motalebipour, E. Z., Kafkas, S., Khodaeiaminjan, M., Çoban, N., Gözel, H., 2016: Genome survey of pistachio (*Pistacia vera* L.) by next generation sequencing: Development of novel SSR markers and genetic diversity in *Pistacia* species. *BMC Genom.*, 17: 998. doi: 10.1186/s12864-016-3359-x

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51: 263–273. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Nei, M., 1987: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Nei, M., Li, W.H., 1979: Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269–5273. doi: 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Onay, A., 2005: Pistachio (*Pistacia vera* L.). U Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, M. S., Gupta, P. K. (ur.); Springer, Nizozemska, 289–300.
- Parfitt, D. E., 2003: 'Bonsai' ornamental pistachio. *HortScience*, 38: 1260–1261.
- Parfitt, D. E., Badenes, M. L., 1997: Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7987–7992.
- Pazouki, L., Mardi, M., Shanjani, P.S., Hagidimitriou, M., Pirseyedi, S. M., Naghavi, M. R., Avanzato, D., Vendramin, E., Kafkas, S., Ghareyazie, B., Ghaffari, M. R., Khayam Nekoui, S. M., 2010: Genetic diversity and relationships among *Pistacia* species and cultivars. *Conserv Genet* 11: 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9812-5>
- Petračić, A., 1942: Šumski i dendrogeografski odnosi na otoku Braču. *Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis*, 8: 179–237.
- Potočić, Z. (ur.), 1983: *Šumarska enciklopedija*, 2. izdanje, svezak II, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 668–669 str.
- POWO 2023: Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/> (Pristupljeno 20. 4. 2023.)
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P.J., 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Qiagen 2020: DNeasy Plant Handbook. <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=f6455f80-dc4f-4ff2-b2de-ae7a3e6c91e0&lang=en> (Pristupljeno 22. 4. 2023.)
- R Development Core Team 2010: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Radić, J., 1985: Biokovski živi fosili vapnojed i prodornik. *Acta Biokovica*, 3: 3–140.
- Rašić, D., 2020: Genetička raznolikost i struktura populacija vrste *Gymnocalycium monvillei* (Lem.) Britton & Rose (Cactaceae) duž visinskog gradijenta u planinskom području pokrajine Córdoba (Argentina) (Diplomski rad). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Rešetnik, I., Temunović, M., Liber, Z., Šatović, Z., Bogdanović, S., 2020: Phylogeography of *Campanula fenestrellata* sl (Campanulaceae) in the northern Adriatic. *Plant Systematics and Evolution*, 306: 42. doi: 10.1007/s00606-020-01668-6.

- Rosenberg, N.A., 2003: The shapes of neutral gene genealogies in two species: probabilities of monophyly, paraphyly, and polyphyly in a coalescent model. *Evolution*, 57: 1465–1477. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00355.x.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491. doi: 10.1126/science.2448875.
- Sardaro, M. L. S., Atallah, M., Picarella, M. E., Aracri, B., Pagnotta, M. A., 2012: Genetic diversity, population structure and phylogenetic inference among Italian Orchids of the *Serapias* genus assessed by AFLP molecular markers. *Plant systematics and evolution*, 298: 1701-1710. doi: 10.1007/s00606-012-0671-z.
- Schönswetter, P., Tribsch, A., 2005: Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon*, 54: 725-732.
- Seeram, N. P., Zhang, Y., Boerman, S., 2008: Phytochemicals and health aspects of pistachio (*Pistacia vera* L.). U *Tree Nuts Composition and Health Effects*, Alasalvar, C., Shahidi, F. (ur.); *Nutraceutical Science and Technology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, SAD.
- Sheibani, A., 1995: Pistachio production in Iran. *Acta Hort.* 419, 165-174. doi: 10.17660/ActaHortic.1995.419.27
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., Hood, L. E., 1986: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674–679. doi: 10.1038/321674a0.
- Statista 2023: Production share of pistachios worldwide in 2021/2022, by country. <https://www.statista.com/statistics/933042/global-pistachio-production-by-country/> (Pristupljeno 23. 3. 2023.)
- Šatović, Z., 1999: Genetic markers and their application in plant genetics, breeding and seed production. *Sjemenarstvo*, 16: 73-95.
- Šilić, Č., 2005: Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine, Matica hrvatska: Franjevačka kuća Masna luka, Čitluk, 300–302 str.
- Tolić, I., 2003: Gospodarske i druge vrijednosti vrsta roda *Pistacia*. *Šum. list*, 9-10: 501-508.
- Topçu, H., Çoban, N., Kafkas, S., 2016: Novel microsatellite markers in *Pistacia vera* L. and their transferability across the genus *Pistacia*. *Sci. Hortic.*, 198: 91–97. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.012
- Trinajstić, I., 2008: Biljne zajednice Republike Hrvatske, Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, 95–140 str.
- Vendramin, E., Dettori, M. T., Verde, I., Micali, S., Giovanazzi, J., Mardi, M., Avanzato, D., Quarta, R., 2009: Molecular characterization of *Pistacia* genus by microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 825: 55 – 62. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.825.5

- Vos, P., Hogers, L., Bleeker, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407–4414.
- Vukelić, J., 2012: Šumska vegetacija Hrvatske, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 216–322 str.
- Vuylsteke, M., Peleman, J. D., van Eijk, M. J., 2007: AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nat Protoc.*, 2: 1387–1398. doi: 10.1038/nprot.2007.175.
- Werner, O., Sánchez-Gómez, P., Guerra, J., Martínez, J. F., 2001: Identification of *Pistacia × saportae* Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters. *Scientia Horticulturae*, 91: 179–186.
- White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B., 2007: *Forest Genetics*. CAB International, UK.
- Wu, X., Duan, L., Chen, Q., Zhang, D., 2020: Genetic diversity, population structure, and evolutionary relationships within a taxonomically complex group revealed by AFLP markers: A case study on *Fritillaria cirrhosa* D. Don and closely related species. *Global Ecology and Conservation*, 24: e01323. doi: 10.1016/j.gecco.2020.e01323.
- Xie, L., Yang, Z.Y., Wen, J., Li, D.Z., Yi, T.S., 2014: Biogeographic history of *Pistacia* (Anacardiaceae), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions. *Mol Phylogenet Evol.*, 77: 136-146. doi: 10.1016/j.ymp.2014.04.006.
- Yaltirik, F., 1967: Anacardiaceae. U *Flora of Turkey*, Vol. 2, Davis, P. H. (ur.), Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 544–548.
- Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A., Parfitt, D.E., 2008: Phylogenetic and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95: 241-251. doi:10.3732/ajb.95.2.241
- Zaloğlu, S., Kafkas, S., Döğan, Y., Güney, M., 2015: Development and characterization of SSR markers from pistachio (*Pistacia vera* L.) and their transferability to eight *Pistacia* species. *Sci. Hortic.*, 189: 94–103. doi: 10.1016/j.scienta.2015.04.006
- Zohary, M., 1972: *Flora Palestina* 2, Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, Israel, 297–300 str.
- Zohary, M., 1952: A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany*, 5: 187-228.