

# Genetska raznolikost planinskog bora (Pinus mugo Turra) u Hrvatskoj procijenjena pomoću morfometrijskih i molekularnih metoda

---

Benić, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:108:850380>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-12**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE  
ŠUMARSKI ODSJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ ŠUMARSTVO**

**LUKA BENIĆ**

**GENETSKA RAZNOLIKOST PLANINSKOG BORA  
(*Pinus mugo* Turra) U HRVATSKOJ PROCIJENJENA POMOĆU  
MORFOMETRIJSKIH I MOLEKULARNIH METODA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ZAGREB, 2024.**

**FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE  
ŠUMARSKI ODSJEK**

**GENETSKA RAZNOLIKOST PLANINSKOG BORA  
(*Pinus mugo* Turra) U HRVATSKOJ PROCIJENJENA POMOĆU  
MORFOMETRIJSKIH I MOLEKULARNIH METODA**

**DIPLOMSKI RAD**

Diplomski studij: Šumarstvo – Uzgajanje i uređivanje s lovnim gospodarenjem

Predmet: Oplemenjivanje šumskoga drveća

Ispitno povjerenstvo: 1. izv. prof. dr. sc. Ida Katičić Bogdan  
2. izv. prof. dr. sc. Igor Poljak  
3. Antonio Vidaković, mag. ing. silv.

Student: Luka Benić

JMBAG: 0068234478

Datum odobrenja teme: 5. svibnja 2024.

Datum predaje rada: 20. rujna 2024.

Datum obrane rada: 25. rujna 2024.

**ZAGREB, RUJAN, 2024.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov	Genetska raznolikost planinskog bora ( <i>Pinus mugo</i> Turra) u Hrvatskoj procijenjena pomoću morfometrijskih i molekularnih metoda
Autor	Luka Benić
Adresa autora	Vladimira Nazora 32a, Veliki Grđevac 43270
Mjesto izrade	Fakultet šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentori	Izv. prof. dr. sc. Ida Katičić Bogdan Izv. prof. dr. sc. Igor Poljak
Asistent	Antonio Vidaković, mag. ing. silv.
Godina objave	2024.
Obujam	broj stranica: 48 broj slika: 10 broj tablica: 25 broj navoda literature: 80
Ključne riječi:	planinski bor, populacijska varijabilnost, morfometrijska analiza, anatomija iglica, morfologija češera, mikrosatelitni biljezi
Sažetak	<p>U ovom radu ispitana je morfološka, anatomska i genetska varijabilnost tri prirodne populacije planinskog bora u Hrvatskoj. Ukupno je analizirano sedam anatomsko-morfoloških značajki iglica i pet morfoloških značajki češera, dok je genetska raznolikost ispitana na temelju pet jezgrinih mikrosatelitnih biljega. Koeficijenti varijabilnosti na razini svih populacija zajedno kretali su se u rasponu od 8,71 % za debljinu iglica do 33,98 % za dužinu rukavca. Unutarpopulacijska varijabilnost bila je veća od međupopulacijske varijabilnosti za sve istraživane značajke. Statistički značajne pozitivne korelacije utvrđene su između mjerenih značajki iglica i češera. Multivarijatnim statističkim metodama utvrđeno je da se populacije planinskog bora u Hrvatskoj puno bolje mogu razlikovati na temelju anatomsko-morfoloških značajki iglica u odnosu na morfološke značajke češera. Općenito gledano, populacije s nižih nadmorskih visina u odnosu na one s viših imale su duže iglice, tanju epidermu i manji broj smolnih kanala. Molekularnim biljezima ustanovljena je srednja očekivana heterozigotnost od 0,54. Metode genetske diferencijacije razdvojile su populacije na statistički značajnoj razini. Trend grupiranja populacija bio je sličan kada se usporede multivarijatne analize u kojima su korištene morfološke značajke češera i mikrosatelitni biljezi. Općenito gledano, rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao temelj za buduća istraživanja i programe očuvanja ove zanimljive, ali gubitkom staništa sve ugroženije planinske vrste.</p>

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Title	Genetic diversity of mountain pine ( <i>Pinus mugo</i> Turra) in Croatia assessed using morphometric and molecular methods
Author	Luka Benić
Address of Author	Vladimira Nazora 32a, Veliki Grđevac 43270
Thesis performed at	The Faculty of Forestry and Wood Technology, University of Zagreb
Publication Type	Master thesis
Supervisor	Associate Professor Ida Katičić Bogdan, PhD Associate Professor Igor Poljak, PhD
Publication year	2024
Assistant	Antonio Vidaković, mag. ing. silv.
Volume	Number of pages: 48 Number of figures: 10 Number of tables: 25 Number of references: 80
Key words:	mountain pine, population variability, morphometric analysis, needle anatomy, cone morphology, microsatellite markers
Abstract	<p>In this study, the morphological, anatomical, and genetic variability of three natural populations of mountain pine in Croatia was examined. A total of seven anatomical-morphological characteristics of needles and five morphological traits of cones were analyzed, while genetic diversity was examined based on five nuclear microsatellite markers. The coefficients of variability at the level of all populations combined ranged from 8.71% for needle thickness to 33.98% for sheath length. Intra-population variability was greater than inter-population variability for all traits studied. Statistically significant positive correlations were found between the measured needle and cone traits. Multivariate statistical methods revealed that mountain pine populations in Croatia can be much better distinguished based on the anatomical-morphological needle traits compared to morphological cone traits. In general, populations at lower altitudes, compared to those at higher altitudes, had longer needles, thinner epidermis, and fewer resin canals. Molecular markers established an average expected heterozygosity of 0.54. Genetic differentiation methods separated the populations at a statistically significant level. The pattern of population grouping was consistent when comparing multivariate analyses based on morphological cone traits and microsatellite markers. Overall, the results of this study can serve as a basis for future research and conservation programs for this interesting but increasingly endangered mountain species due to habitat loss.</p>



# 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 koristio drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni“.

U Zagrebu, 25. rujna 2024. godine.

---

*vlastoručni potpis*

Luka Benić

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Rod <i>Pinus</i> L. ....	1
1.2. Morfologija i biologija istraživane vrste .....	2
1.3. Rasprostranjenost i ekologija istraživane vrste .....	4
1.4. Dosadašnja istraživanja .....	5
1.4.1. Morfometrijska i anatomska istraživanja iglica i češera .....	5
1.4.2. Istraživanja pomoću molekularnih biljega .....	6
2. CILJ RADA .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. Područje istraživanja .....	10
3.2. Biljni materijal .....	10
3.3. Morfološka analiza .....	11
3.3.1. Morfometrijska analiza iglica i češera .....	11
3.3.2. Anatomska analiza iglica .....	11
3.3.3. Statistička analiza morfoloških podataka .....	12
3.4. Analiza pomoću molekularnih biljega .....	13
3.4.1. Izolacija DNK .....	13
3.4.2. Molekularni biljezi .....	13
3.4.4. Statistička analiza molekularnih podataka .....	15
4. REZULTATI .....	17
4.1. Morfološka istraživanja .....	17
4.1.1. Deskriptivna statistika .....	17
4.1.2. Korelacijska analiza .....	19
4.1.3. Analiza varijance (ANOVA) .....	19
4.1.4. Analiza glavnih sastavnica (PCA) .....	22
4.1.5. Diskriminantna analiza .....	26
4.2. Molekularna istraživanja .....	32
4.2.2. Unutarpopulacijska raznolikost .....	33
4.2.3. Diferencijacija i struktura populacija .....	35
5. RASPRAVA .....	38
5.1. Morfološka analiza .....	38
5.2. Molekularna analiza .....	40
6. ZAKLJUČCI .....	42
7. LITERATURA .....	44

## **PREDGOVOR**

Prije svega, želim izraziti svoju zahvalnost mojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Idi Katičić Bogdan i izv. prof. dr. sc. Igoru Poljaku, za njihovo stručno vođenje, savjete i pomoć tijekom cijelog procesa izrade rada, kao i tijekom studiranja. Također, zahvaljujem prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću s Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći oko statističke obrade podataka.

Posebnu zahvalnost dugujem asistentu Antoniju Vidakoviću, mag. ing. silv., za njegovu posvećenost, strpljenje i sugestije koje su bile ključne za uspješan završetak ovog rada te za otvaranje prozora prema znanosti svojim zalaganjem.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, djevojci i prijateljima, koji su ostali uz mene i pružali mi podršku kroz cijelo studiranje.

U Zagrebu, 25. rujna 2024. godine.

Luka Benić



# 1. UVOD

## 1.1. Rod *Pinus* L.

Rod *Pinus* L. svrstavamo u porodicu Pinaceae te u potporodicu Pineoideae. Sa svojih 111 (Farjon 1984; Price i dr. 1998; Gernandt i dr. 2005), odnosno 119 (WFO 2024), poznatih vrsta čini najbrojniji rod unutar porodice borova, ali i golosjemenjača općenito. Osim toga, rod *Pinus* je ujedno i jedan od sistematski najmlađih rodova golosjemenjača, čije su vrste u stalnom razvoju. Borovi zauzimaju ekološki vrlo bitne niše borealnih, sub-alpinskih, umjerenih, tropskih te aridnih šuma. Njihova pojavnost je pretežno vezana uz sjevernu hemisferu, dok je vrsta *P. merkusii* Jungh. et de Vriese najjužnija vrsta, nalazeći se južno od ekvatora na otoku Sumatra (Mirov 1967; Gernandt i dr. 2005). Borovi se odlikuju iznimnom otpornošću pa često naseljavaju područja ekstremnih uvjeta, a poznato je da mogu biti i jako dugovječni, kao što je slučaj u primjerka vrste *Pinus longaeva* D.K.Bailey, čija se dob procjenjuje na oko 4850 godina. Borovi su najčešće heliofilne pionirske vrste koje na našem području naseljavaju vlažna stjenovita staništa visokih gorja ili aridnih obalnih krajeva.

Predstavnici roda *Pinus* su jednodomna i vazdazelena stabla, rjeđe grmovi (Vidaković i Franjić 2004; Poljak i dr. 2020). S obzirom na broj fibrovaskularnih žila unutar iglice, rod *Pinus* je moguće podijeliti na dva podroda: *Haploxyylon* (one koji imaju jednu žilu) i *Diploxyylon* (sa dvije žile unutar iglice) (Gernandt i dr. 2005). Podrod *Strobus* uključuje sekcije *Parrya* i *Quinquefoliae*, dok podrod *Pinus* uključuje sekcije *Pinus*, *Trifoliae* i *Contortae* (Gernandt i dr. 2005). Vrste iz podroda *Strobus* karakterizira mekše drvo i duže iglice, dok vrste iz podroda *Pinus* imaju tvrđe drvo i kraće iglice. Ove razlike su važne za ekološku prilagodbu i gospodarsku upotrebu različitih vrsta unutar roda.

Borovi u mladosti imaju pršljenast raspored grana, dok se u starosti ta karakteristika često gubi (Vidaković 1993). Osim toga, u dubokoj starosti pojedine bočne grane razvijaju se jače nego vrh pa krošnja izgleda sve nepravilnije. Pupovi su prekriveni većim brojem ljustica i često su smolavi. U borova razlikujemo duge i kratke izbojke (Herman 1971). Na osi kratkog izbojka razvija se čuperak od 2, 3 ili 5 iglica polukružnog ili trokutastog poprečnog presjeka. Iglice su pri osnovi obavijene rukavcem koji sačinjava više ljustica. Na dugim izbojcima nalazi se zavojito raspoređeno ljuskasto lišće.

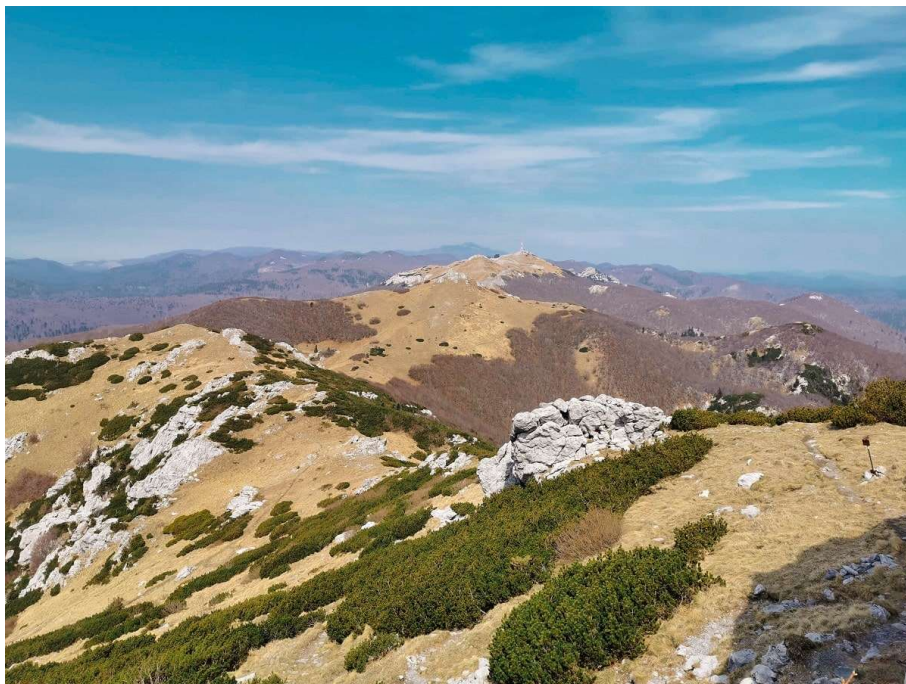
Borovi su jednodomne vrste jednospolnih cvjetova (Vidaković i Franjić 2004; Herman 1971). Cvjetanje je za vrijeme listanja, a oprašivanje vjetrom (anemofilne vrste). Muški cvjetovi (češeri) su sastavljeni od većeg broja zavojito raspoređenih prašničkih listova, od kojih svaki nosi po dvije polenovnice. Ženski cvatovi (češeri) su sitni, na bazi obavijeni ljusticama, a razvijaju se iz pupova na ovogodišnjim izbojcima, stoga su smješteni pri vrhu proljetnih izbojaka. Češeri dozrijevaju druge ili treće godine. Pokrovne ljustice su u svih vrsta i u svim stadijima razvoja sitnije od plodnih ljustica. Plodna ljustica ima zadebljali vanjski vršni dio, tzv. štitić ili apofizu na kojemu se nalazi grbica na kojoj može biti jedan šiljak (Herman 1971). Sjemenke su većinom okriljene.

Borovina je jedričava s mnogobrojnim smolnim kanalima (Herman 1971), što joj daje karakterističan miris i otpornost na štetnike. Komercijalno se koristi većinom kao meko drvo zbog svoje lakoće obrade i široke primjene u građevinarstvu, stolariji i proizvodnji papira. Osim

toga, vrste iz ovog roda čest su izbor za pošumljavanje i osnivanje šumskih kultura zbog brzog rasta i sposobnosti prilagodbe različitim staništima. Borovi također igraju važnu ulogu u ekosustavima, pružajući stanište za mnoge vrste divljih životinja i pomažući u očuvanju tla.

## 1.2. Morfologija i biologija istraživane vrste

Planinski bor, krivulj, klekasti bor ili klekovina (*Pinus mugo* Turra) obično je nizak, polegli grm (Slika 1), a rjeđe uspravno stablo do 12 m visine (Vidaković i Franjić 2004). U grmolikih formi pojedine bočne grane mogu ići do 10 m u širinu (Alexandrov i dr. 2019). Vazdazelena je vrsta, sivo smeđe ljuskave kore. Kora mladih izbojaka je zelenkasta do ljubičasto-smeđa, a kasnije sivkastosmeđa ili tamno siva i ljušti se u pravokutnim ljuskama. Izbojci su relativno debeli i jako elastični, otporni na oluje, snijeg, led i lavine. Sa svojim rastom od 2-3 cm godišnje, planinski bor je jedna od najsporije rastućih drvenastih vrsta u Europi (Alexandrov i dr. 2019). Kratki izbojci su poredani gusto, gušće nego u običnoga bora (*Pinus sylvestris* L.). Pupovi su jajasto-duguljasti, 6 mm dugi, pri vrhu šiljasti i jako smolavi (Vidaković i Franjić 2004). U svakom rukavcu nalaze se po dvije iglice. Igljice su 2-5 cm dugačke, srpasto zavijene, tamnozelenene, krute i tupe (Slika 2). Ostaju na izbojku od 5-10 (15) godina (Herman 1971).



**Slika 1.** Habitus – *Pinus mugo*.

<https://underdreamskies.com/2020/04/30/planiras-izlet-na-snjeznik-evo-zasto-trebas-posjetiti-i-guslicu/>

Planinski bor jednodomna je vrsta. Počinje cvjetati u starosti od 6 do 10 godina, a cvate od svibnja do srpnja za vrijeme listanja. Cvjetovi su jednospolni, anemofilni. Muški cvjetovi su valjkasti, žuti ili crvenkastožuti, 1-1,5 cm dugački, građeni od puno prašničkih listova zavojito

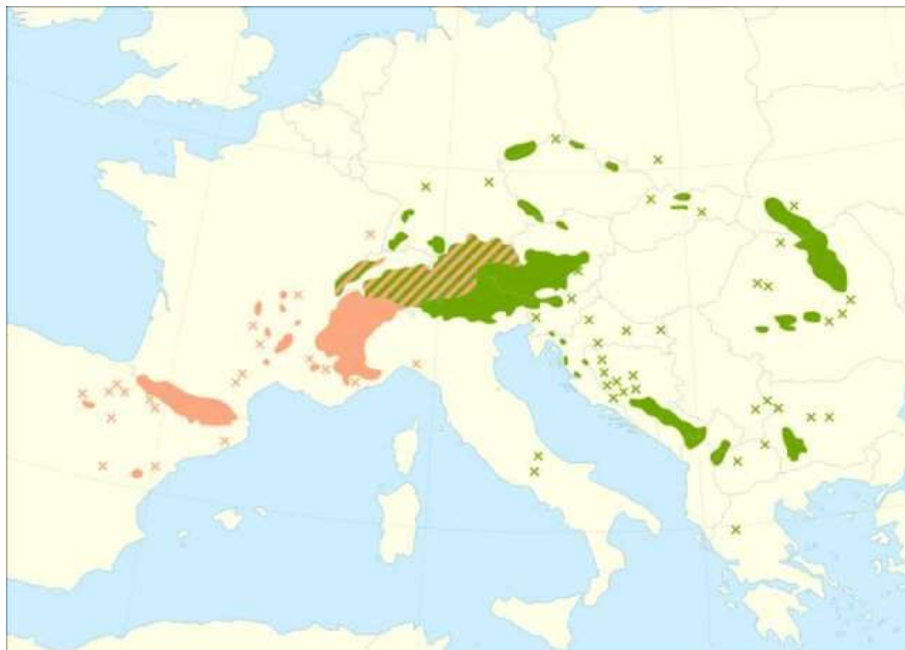
raspoređenih oko središnje osi (Idžojtić 2013). Ženski cvjetovi su u plavkastoljubičastim, crvenim do blijedo ružičastim, 5-10 mm dugačkim češerastim cvatovima. Cvatovi su uspravni, pojedinačni ili do četiri zajedno u pršljenu. Pozicionirani su na vrhovima ovogodišnjih dugih izbojaka. Plodni listovi raspoređeni su zavojito oko središnje osi, a s unutrašnje strane nose po dva sjemena zametka (Idžojtić 2013). Zreli češeri sjede na posve kratkim stapkama. Češeri su jajastog ili kuglastog oblika, simetrični, 2-5 cm dugački te 1,5-2,5 cm široki (Slika 2). Tijekom dozrijevanja mijenjaju boju od tamnoljubičaste do smeđe boje. Plodne ljuske su drvenaste, u gornjem dijelu imaju štitić. Na sredini štitića nalazi se velika smeđa grbica bez kukastog izbočenja. Sjemenke su anemohorne, tamnosmeđe do crne, više ili manje sjajne, 4-5 mm dugačke, okriljene s 12-14 mm dugačkim krilcem. Dozrijevaju u listopadu i studenom iduće godine. Plodne ljuske se otvaraju u proljeće treće godine i ispuštaju sjeme. Dobar urod je gotovo svake godine. Češeri nakon otvaranja ostaju još nekoliko godina na izbojcima.



**Slika 2.** Igljice i češeri – *Pinus mugo*.  
[https://sh.wikipedia.org/wiki/Pinus\\_mugo](https://sh.wikipedia.org/wiki/Pinus_mugo)

### 1.3. Rasprostranjenost i ekologija istraživane vrste

Planinski bor prirodno je rasprostranjen na višim nadmorskim visinama, u planinskim predjelima središnje i južne Europe (Slika 3) i to u Pirinejima, Alpama, sredogorju Njemačke, Sudetima, Karpatima, u planinama središnjih Apenina i planinama Balkana (Vidaković i Franjić 2004). Pojedinačne populacije mogu se pronaći na nadmorskim visinama od 150-200 m u južnoj Poljskoj i jugoistočnoj Njemačkoj, do iznad 2500 m u Alpama i 2700 m na Pirinu i Rili u Bugarskoj (Alexandrov i dr. 2019). U Hrvatskoj pridolazi na visinama višim od 1400 m, a na sjevernim ekspozicijama silazi i do visine od 1000 m (Vukelić 2012). Planinski bor favorizira južne i zapadne ekspozicije na kojima tvori guste i često neprohodne sastojine visine oko 2 m. Takve prostrane sastojine imaju karakter i funkciju zaštitnih šuma (Herman 1971). Planinski bor čini gornju granicu šumske vegetacije, raste na ekstremnim i nepovoljnim staništima vrlo oskudnima za razvitak ostalog šumskog drveća (Vidaković i Franjić 2004). Svojim habitusom prilagođen je na surove uvijete koji prevladavaju na takvim staništima. Otporan je na veće količine snijega, jak vjetar i sušu koja nastupa u ljetnim mjesecima. Na području prirodne rasprostranjenosti često pridolazi s drugim vrstama poput *Picea abies* (L.) H.Karst., *Pinus sylvestris*, *Larix decidua* Mill., *P. cembra* L., *Betula pendula* Roth., *Alnus alnobetula* (Ehrh.) K.Koch subsp. *alnobetula* i *Sorbus aucuparia* L. (Alexandrov i dr. 2019).



**Slika 3.** Rasprostranjenost vrste *Pinus mugo* (Caudullo i dr. 2017; Euforgen 2021). Zelene površine označavaju prirodno stanište vrste, zeleni križići izolirane populacije, narančaste površine unesene i naturalizirane populacije, a narančasti križići unesene i naturalizirane izolirane populacije.

## 1.4. Dosadašnja istraživanja

Varijabilnost blisko povezanih taksona unutar kompleksa *Pinus mugo* bila je predmet istraživanja tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Pregled tih istraživanja dali su Christensen (1987a, b), Businský (1999), Lewandowski i dr. (2000), Boratyńska i Bobowicz (2001) te Boratyńska i dr. (2003). Većina studija ispitivala je sjeverne dijelove rasprostranjenosti taksona, često u kontekstu istraživanja taksonomske pozicije *P. uliginosa* Neum. ex Wimm. (= *P. rotundata* Link), taksona uključenog u kompleks *P. mugo*. Pretpostavljeni protok gena iz *P. sylvestris* u taksone kompleksa *P. mugo* također je potvrđen u nekoliko studija. Protok gena ispitivan je na temelju morfoloških značajki (Christensen i Dar 1997; Lauranson-Broyer i dr. 1997; Boratyńska i dr. 2003), izoenzima (Neet-Sarqueda i dr. 1988; Neet-Sarqueda 1994; Siedlewska i Prus-Głowacki 1995; Lewandowski i dr. 2002) i DNK (Filppula i dr. 1992; Odrzykoski 2002; Wachowiak 2003). Informacije o morfološkoj i genetičkoj varijabilnosti populacija tipičnog planinskog bora (= *P. mugo* subsp. *mugo*) su fragmentarne, a u nastavku slijedi opis glavnih rezultata dosadašnjih istraživanja koja se bave tom tematikom.

### 1.4.1. Morfometrijska i anatomska istraživanja iglica i češera

Boratyńska (2002) istražuje varijabilnost iglica planinskog bora u zapadnim Tatrama. Za potrebe istraživanja autorica je prikupila uzorke iglica s prošlogodišnjih izbojaka s ukupno 57 jedinki između vrhova Grześ i Wołowiec. U istraživanju je analizirano 16 morfoloških i anatomskih značajki: duljina iglica; broj redova puči na konveksnoj strani iglice; broj redova puči na ravnoj strani iglice; broj puči na 2 mm dugom dijelu iglice na konveksnoj strani; broj puči na 2 mm dugom dijelu iglice na ravnoj strani; broj smolnih kanala; širina iglica; debljina iglica; udaljenost između vaskularnih snopova; širina epidermalnih stanica; debljina epidermalnih stanica; debljina hipodermalnih stanica; Marcetov koeficijent; omjer redova puči; omjer debljine i širine iglica; te omjer širine i debljine epidermalnih stanica. Najstabilnije značajke s najmanjom varijabilnošću bile su omjer debljine i širine iglica, debljina i širina iglica te širina epidermalnih stanica. S druge strane, najvarijabilnije značajke bile su udaljenost između vaskularnih snopova i Marcetov koeficijent. Općenito gledano, unutarpopulacijska varijabilnost istraživanih populacija bila je niska.

Istraživanje geografske diferencijacije planinskog bora temeljeno na karakteristikama iglica, koje provode Boratyńska i dr. (2004), obuhvatilo je analizu 17 uzoraka iz 15 populacija iz Alpa, Apenina, Sudeta, Karpata i Rodopa. Mjereno je 15 morfoloških i anatomskih karakteristika iglica, uključujući: duljinu iglica; broj redova puči na konveksnoj i ravnoj strani iglice; broj puči na 2 mm dugom dijelu iglice (konveksna i ravna strana); broj smolnih kanala; širinu i debljinu iglica; udaljenost između vaskularnih snopova; debljinu i širinu epidermalnih stanica; Marcetov koeficijent; omjer redova puči; omjer debljine i širine iglica; te omjer širine i debljine epidermalnih stanica. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da planinski bor ima srednju varijabilnost morfoloških značajki iglica na području Alpa, Sudeta, Karpata, Rodopa i Dinarida. Samo populacije uzorkovane u istočnim Karpatima značajno su se razlikovale od svih ostalih istraživanih populacija, što sugerira njihovu dulju separaciju tijekom posljednjeg



glacijalnog perioda i vjerojatno podrijetlo iz refugija crnogoričnih šuma na jugoistočnim padinama istočnih Karpatata.

Istraživanje Boratyńske i dr. (2005) obuhvatilo je analizu morfološke varijabilnosti planinskog bora u izoliranim apeninskim populacijama te usporedbu s populacijama iz sjeveroistočnog dijela rasprostranjenosti vrste. Navedeno područje Apenina bilo je predstavljeno s 33 jedinke, pri čemu je svaka jedinka bila predstavljena s 10 iglica i 10 češera. Drugim riječima, u analizu populacijske varijabilnosti planinskog bora iz Italije ukupno je uključeno 330 iglica i 330 češera. Uzorci populacija, koji su sadržavali 50 kratkih izbojaka i 50 češera, predstavljali su 25 jedinki iz šest drugih populacija vrste prikupljenih u Sudetskim i Karpatskim planinama, kao i iz objavljenih podataka (Boratyńska i Pashkevich 2001; Boratyńska 2002; Boratyńska i dr. 2004; Marcysiak 2004), korišteni su kao komparativni materijal. U istraživanju koje provode Boratyńska i dr. (2005) mjereno je 31 svojstvo iglica i češera, uključujući: duljinu iglica; broj redova puči na konveksnoj i ravnoj strani iglice; broj smolnih kanala; širinu i debljinu iglica; udaljenost između vaskularnih snopova; debljinu i širinu epidermalnih stanica; Marcetov koeficijent; omjer redova puči; omjer debljine i širine iglica; omjer širine i debljine epidermalnih stanica; duljinu češera; maksimalni promjer češera; broj ljsuki češera; duljinu, širinu i debljinu apofize ljsuke češera; udaljenost između umba i vrha ljsuke; promjer vrha češera; promjer sredine češera između vrha i maksimalnog promjera; mjerenje konveksne i konkavne strane češera od stapke do vrha; omjer duljine i širine češera; omjer duljine češera i broja ljsuki; omjer duljine i širine apofize ljsuke; omjer duljine i debljine apofize ljsuke; te asimetriju češera. Rezultati su pokazali da geografski izolirana populacija iz Apenina (*Abruzzian Apennines*) nije pokazala značajne razlike u usporedbi s jednom zapadno-karpatskom i dvije sudetske populacije. U svim analizama, druga zapadno-karpatska i sve istočno-karpatske populacije formirale su jednu grupu, različitu od svih ostalih populacija, uključujući i apeninsku populaciju. Nadalje, istraživanjem je utvrđeno da karakteristike češera razlikuju populacije mnogo više nego karakteristike iglica. Unutarpopulacijska varijabilnost apeninske populacije bila je najviša među svim populacijama uključenim u istraživanje.

#### **1.4.2. Istraživanja pomoću molekularnih biljega**

Heuertz i dr. (2010) istraživali su genetičku varijabilnost populacija planinskog bora (*Pinus mugo* kompleksa) u zapadnoj Europi. Uzorci za istraživanja bili su prikupljeni iz 29 prirodnih populacija, a glavni ciljevi istraživanja bili su: (1) testirati jesu li morfološke vrste planinskih borova genetski podržane u zapadnom dijelu rasprostranjenosti kompleksa vrste *Pinus mugo*; (2) utvrditi strukturiranost populacija planinskog bora; te (3) istražiti evolucijske procese koji djeluju na raznolikosti i strukturiranost populacija. Također, u istraživanje su uključene i četiri populacije običnoga bora (*P. sylvestris*) čiji su uzorci sakupljeni u blizini populacija kukastog bora (*P. uncinata* Ramond ex. DC.), s ciljem procjene *in situ* hibridizacije. Ukupno je genotipizirano 786 jedinki *P. mugo sensu lato* iz 29 prirodnih populacija i 85 jedinki *P. sylvestris* iz četiri populacije, koristeći tri kloroplastna mikrosatelita (cpSSRs). Identificirano je 100 haplotipova, a rezultati su pokazali jaču diferencijaciju između geografskih regija, nego između morfološki identificiranih taksona. BAPS analiza je identificirala Pirinejski i Alpski genski skup, uz nekoliko manjih genetskih klastera. Zaključeno je da geografija igra ključnu

ulogu u oblikovanju genetskih odnosa između vrsta planinskog bora, što ima važne implikacije za očuvanje i upravljanje ovim vrstama.

Dzialuk i dr. (2012) proučavali su genetsku raznolikost planinskog bora s planina središnje Europe. Genetska raznolikost unutar i između 12 populacija (379 jedinki) planinskog bora iz gorja Giant Mts., Karpata i Alpa analizirana je koristeći 10 kloroplastnih mikrosatelitskih markera. Utvrđena je visoka razina genetske raznolikosti u tri populacijske grupe. Populacije iz Giant Mts., Karpata i Alpa su snažno diferencirane jedna u odnosu na drugu, dok su diferencijacije između populacija unutar planinskih masiva bile znatno niže. Autori objašnjavaju ovu značajnu genetsku raznolikost između geografski izoliranih populacija kao rezultat pradavne fragmentacije i dugotrajne geografske izoliranosti između lokaliteta Giant Mts., Alpa i populacija iz Tatra.

Sannikov i dr. (2011) istražuju varijabilnost šest populacija vrste *Pinus mugo* i šest populacija vrste *P. sylvestris* na području Karpata i Alpa. U istraživanju su korišteni izoenzimski markeri, a uzorci biljnog materijala sakupljeni su s 18–48 grmova/stabala u svakoj od istraživanih populacija. Istraživanje je pokazalo veću raznolikost i međupopulacijsku diferencijaciju populacija planinskog bora s Karpata u usporedbi s alpskim populacijama. Također je utvrđena genetska diferencijacija za promatrane populacije koje su međusobno udaljene više od 1000 km. Ovi rezultati potvrđuju postojanje podvrste *P. mugo* subsp. *mugo* i *P. mugo* subsp. *uncinata* u Karpatima i Alpama. Postavljena je hipoteza da je prva podvrsta formirana na Balkanu, a druga u Pirenejima. Autori su također u svom radu dokazali kako su različite skupine vrste *P. sylvestris* manje diferencirane u odnosu na populacije vrste *P. mugo*.

Żukowska i Wachowiak (2017) analizirali su 21 populaciju vrste *Pinus mugo* iz cijelog pretpostavljenog autohtonog areala vrste u europskim državama (ne uključujući Hrvatsku) pomoću 13 jezgrinih mikrosatelitskih biljega. Našavši relativno malu genetsku diferencijaciju između većine analiziranih populacija, autori su zaključili da postoji velika vjerojatnost da sadašnje populacije planinskog bora potječu iz šire distribucije vrste. Najvjerojatnije su bile izolirane relativno kratko vrijeme, nedovoljno dugo da nastane izražena genetska diferencijacija među njima. Stoga, po autorima (Żukowska i Wachowiak 2017), lokacija drevnih refugijalnih populacija *P. mugo* ostaje slabo prepoznata. Većina istraživanih populacija dijelila je sličnu genetsku strukturu, osim grupacije poljskih populacija iz sudetskog planinskog masiva. Na temelju toga autori zaključuju da postoji potencijalno sjeverno kretanje planinskog bora tijekom postglacijalne rekolonizacije Europe. Konkretno, populacije u Sudetima možda su se uspostavile putem osnivačkog efekta migranata iz Alpa.

Sokołowska i dr. (2021) analiziraju sekvence kloroplastnih genoma triju najpoznatijih svojti kompleksa *Pinus mugo* (*P. mugo*, *P. rotundata* i *P. uncinata*) kako bi se dobio novi uvid u njihove filogenetske odnose. Dobiveni rezultati otkrili su visoku očuvanost kloroplastnih genoma u smislu duljine, strukture i broja gena. Autori su potvrdili vrlo bliske odnose između ova tri taksona koristeći inferenciju i topologiju filogenetskih stabala, pri čemu *P. mugo*, *P. rotundata* i *P. uncinata* tvore jednu zasebnu granu unutar roda *Pinus* s jakom podrškom. Identificirana su visoko varijabilna područja i različiti obrasci mikrosatelitskih lokusa u genomima kloroplastnih članova kompleksa *Pinus mugo*, koji bi se potencijalno mogli koristiti u budućnosti za razlikovanje i identifikaciju ovih taksona.

Komárková i dr. (2024) proveli su genetsko istraživanje na zajednicama planinskog bora u Nacionalnom parku Krkonoše. Zajednice planinskog bora u ovoj zaštićenoj regiji izuzetno su vrijedne za lokalni planinski ekosustav. S obzirom na to da na navedenom području postoje i prirodne populacije te one koje su sađene, namjera autora bila je detektirati koje točno populacije predstavljaju autohtonu vegetaciju. Kako bi to istražili, genotipizirali su ukupno 12 populacija iz Sudeta i dvije populacije iz Tatri, pri čemu su koristili mikrosatelitske biljege. U istraživanim populacijama ukupno su detektirali 146 alela. Analiza molekularne varijance pokazala je da većina ukupne varijabilnosti otpada na unutarpopulacijsku varijabilnost. Nadalje, istraživanjem su zabilježene niske razine genetske diferencijacije (prosječni  $F_{ST} = 0,023$ ). Rezultati analize STRUCTURE potvrdili su da su unesene populacije različite od autohtonih populacija. Neke od unesenih čeških sudetskih populacija imale su sličnu genetsku strukturu kao udaljenije autohtone populacije iz Tatra.



## 2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je ispitati morfološku, anatomsku i genetsku varijabilnost populacija planinskog bora na području Hrvatske. Istraživanje je provedeno na materijalu iz tri prirodne populacije planinskog bora: Učka, Snježnik i Zavižan. Analizirane su dvije morfološke karakteristike iglica, pet morfoloških karakteristika češera te pet anatomskih karakteristika iglica. Genetska raznolikost populacija ispitana je pomoću 10 mikrosatelitnih biljega.

Na temelju postavljenog cilja provedene su sljedeće aktivnosti:

1. prikupljena je literatura o relevantnim istraživanjima;
2. prikupljeni su podaci o istraživanoj vrsti i području istraživanja;
3. napravljen je plan uzorkovanja i obrade uzoraka;
4. sakupljen je biljni materijal za morfometrijska, anatomska i genetska istraživanja;
5. izvršene su analize uzoraka u laboratoriju
6. odrađena je statistička obrada podataka i analizirani su dobiveni rezultati koji su interpretirani u skladu s ciljevima istraživanja;
7. izvedeni su zaključci na temelju dobivenih rezultata.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Područje istraživanja**

Za potrebe ovog istraživanja, prikupljen je materijal s tri lokaliteta (Slika 4): Učka, Snježnik i Zavižan. Sva tri lokaliteta dio su planinskog masiva Dinaridi koji se rasprostire u dužini od oko 645 km, od Slovenije na sjeveru do Albanije na jugu. Nazvani po planini Dinari, Dinaridi su jedni od najkrševitijih i najprostranijih planinskih područja u Europi. Formirani su uglavnom od mezozojskih i kenozojskih sedimentnih stijena, dolomita, vapnenaca, pješčenjaka i konglomerata formiranih od mora i jezera koja su nekoć prekrivala to područje. Glavna tektonska faza orogeneze na području Dinarida odvijala se u kenozoiku kao posljedica sudara Jadranske mikroploče s Europom, a proces je još uvijek aktivan (Korbar 2009).

Lokalitet Učka se nalazi u primorskom pojasu dinarskog krša. Klima Učke uvjetovana je geografskim položajem, blizinom mora i razvedenošću reljefa. Prema Köpenovoj klasifikaciji klime, viši dijelovi Učke imaju umjereno toplu kišnu klimu s toplim ljetom, a minimalna prosječna godišnja temperatura iznosi 8 °C. Padalina u višim dijelovima ima više nego u priobalju, a uglavnom su koncentrirane u hladnijem razdoblju godine te u kasnu jesen i proljeće, najčešće u obliku kiše, a zimi i snijega. Srednja godišnja razina oborina na Učkoj iznosi između 2000-2500 mm. Biljni materijali prikupljen je na samom vrhu Učke, na nadmorskoj visini od 1396 m.

Lokalitet Snježnik se nalazi istočno od Učke u sklopu Nacionalnog parka Risnjak. Na tom području količina oborina naglo se povećava s nadmorskom visinom. Najveće količine oborina izmjerene na Snježniku iznose 3302 mm. Podloga na višim nadmorskim visinama je pretežno vapnenačka i dolomitska, s brojnim krškim reljefnim oblicima. Nadmorska visina za ovaj lokalitet iznosi 1506 m.

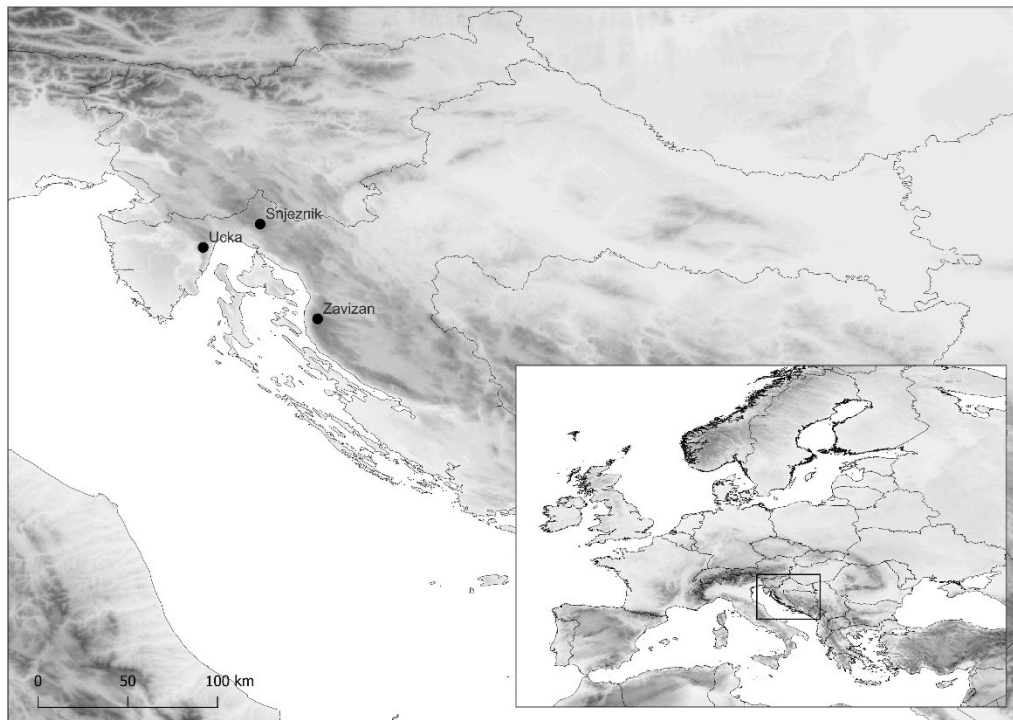
Lokalitet Zavižan smješten je u središnjem pojasu dinarskog krša te predstavlja jedan od vrhova Velebita. Nadmorska visina ovog lokaliteta iznosi 1678 m. Srednja godišnja temperatura zraka iznosi 3,5 °C, dok apsolutni minimum iznosi -24,5 °C. Na ovom lokalitetu je zabilježena i najveća razina snijega 320 cm 1984. godine. Srednja godišnja količina oborina iznosi 1899 mm. Na Zavižanu 45 % svih oborina čini snijeg. Prosječna relativna vlažnost zraka iznosi 81 %. Tlo na Zavižanu je pretežito planinska crnica te kamenjar vapnenačkog i dolomitskog porijekla (Klimatski atlas Hrvatske 1961-1990, 1971-2000, 2008).

### **3.2. Biljni materijal**

Biljni materijal za morfometrijsku, anatomsku i genetičku analizu sakupljen je tijekom jeseni 2023. godine. S obzirom na to da su istraživanja za potrebe ovog diplomskog rada provedena u dva nacionalna parka te u jednom parku prirode, dobivena je dozvola od Ministarstva zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva za sakupljanje uzoraka.

Na svakom lokalitetu sakupljen je materijal sa po 20 grmova. Sa svakog grma sakupljeno je po 40 potpuno razvijenih iglica s kratkih izbojaka s osunčanog dijela krošnje, kao i 20 potpuno razvijenih, ali neotvorenih češera za morfometrijsku analizu. Sa svakog grma 20 iglica je odvojeno za izradu preparata za anatomska mjerenja. Iglice sakupljene za genetsku

analizu odmah po sakupljanju su pohranjene u filter vrećice i slika gel. Sakupljene iglice su herbarizirane i pohranjene na Zavodu za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 4.** Područje istraživanja.

### **3.3. Morfološka analiza**

#### **3.3.1. Morfometrijska analiza iglica i češera**

Dužina iglica (NL) i dužina rukavca (NSL) izmjerene su ručno, pomoću digitalnog pomičnog mjerila (Alpha Tools®, Bahag AG, Njemačka), s točnošću mjerenja od 0,1 mm. Koristeći isto mjerilo izmjerene su i sljedeće morfološke karakteristike češera: dužina češera (CL), širina češera (CW), dužina štitića (AL) i širina štitića (AW). Manualno je određen i broj štitića (AN).

#### **3.3.2. Anatomska analiza iglica**

Privremeni preparati za anatomsku analizu iglica pripremljeni su u Molekularno-biološkom laboratoriju u Zavodu za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku. Sa svakog grma analizirano je po 20 iglica. Sa sredine svake iglice odrezan je tanki dio poprečnog presjeka koji je postavljen na predmetno stakalce, u kapljicu destilirane vode. Uzorak je potom pokriven pokrovnim stakalcem na način da nisu zaostali mjehurići zraka između dva stakalca. Tako pripremljen preparat postavljen je pod mikroskop na uvećanje od  $4\times 10$  (Olympus BX41TF, Olympus Corporation Tokyo, Japan). Nakon pronalaska željene slike, ista je snimljena kamerom (Olympus LC35; Exofocus-0.66X, Evident Technology Center, Münster, Njemačka)

te je potom pohranjena na računalo. Mjerenja anatomskih značajki iglica obavljena su u softveru PRECiV Capture (PRECiV v. 2.1 software, Evident, 2023). Na svakom preparatu izmjerene su sljedeće anatomske značajke: debljina iglice (NT), širina iglice (NW), razmak između žila u iglici (DVB) i debljina epiderme (ET). Osim toga, manualno je određen i broj smolnih kanala u svakoj iglici (NRC).

### 3.3.3. Statistička analiza morfoloških podataka

Za statističku analizu podataka korištene su standardne deskriptivne i multivarijatne metode (Sokal i Rohlf 1989; McGarigal i dr. 2000), uz upotrebu softverskog paketa Statistica for Windows (StatSoft, Inc. 2001).

Za svaku analiziranu karakteristiku određeni su sljedeći deskriptivni statistički pokazatelji: aritmetička sredina (M), standardna devijacija (SD), minimalna (Min) i maksimalna vrijednost (Max) i koeficijent varijacije (CV%). Povezanost između mjerenih karakteristika češera i iglica procijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije.

Analiza varijance (ANOVA) korištena je za testiranje razlika između i unutar istraživanih populacija, pri čemu je efekt „grm“ bio fiksiran unutar efekta „populacija“. Kako bi se utvrdilo koje se točno populacije međusobno signifikantno razlikuju, provedeno je dodatno testiranje Fisherovim multiplim testovima (LSD) za sve parove populacija. Također, je provedena i raspodjela ukupne varijance, alociranjem izračunate komponente varijabilnosti pripadajućem izvoru (između populacija, između grmova unutar populacije, ostatak) za sva analizirana svojstva. U tu svrhu korištena je REML metoda (*Restricted Maximum Likelihood Method*).

Na temelju istraživanih svojstava iglica i češera provedena je analiza glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*; PCA). Broj glavnih sastavnica određen je na temelju svojstvenih vrijednosti (*Eigenvalues*) glavnih sastavnica, korištenjem Kaiserovog kriterija koji zadržava sastavnice u kojih su svojstvene vrijednosti veće od 1 i Catellovog dijagrama (*Scree Plot*; Cattell 1966), kao i kumulativnog postotka objašnjene varijance.

Kako bi se utvrdilo koje značajke najbolje razlikuju istraživane populacije, provedena je diskriminantna analiza. Nezavisne varijable korištene za razlikovanje populacija unesene su u model sukcesivno, koristeći postupnu metodu prema naprijed (*Forward Stepwise Method*). Drugim riječima, varijable su unošene jedna po jedna, pri čemu je prednost dana onoj varijabli koja je imala najveći značajan doprinos razlikovanju grupa. Diskriminacijske funkcije dobivene su kanoničkom analizom. Diskriminantnom analizom za tri populacije dobivene su dvije diskriminacijske funkcije. Zatim je,  $\chi^2$  testom sa sukcesivnim isključivanjem kanoničkih korijena, određeno jesu li diskriminacijske funkcije signifikantne. Za svaku značajnu funkciju izračunati su standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli, i to za svaku varijablu pojedinačno. Ovi koeficijenti pokazuju veličinu i smjer doprinosa svake varijable svakoj od dobivenih diskriminacijskih funkcija. Što je veći apsolutni iznos standardiziranog koeficijenta, to je doprinos te varijable razlikovanju grupa, definiranih određenom diskriminacijskom funkcijom, veći. Na kraju, kako bi se utvrdilo između kojih grupa je postignuto razlikovanje pomoću dobivenih funkcija, određene su sredine funkcija za svaku grupu.

Kako bi se omogućila klasifikacija novih uzoraka u jednu od analiziranih grupa izračunate su klasifikacijske funkcije za svaku od tih grupa. Uzorak se uvrštava u onu grupu za

koju je klasifikacijski rezultat najveći. Nakon toga, izrađuje se klasifikacijska matrica pomoću koje se može vidjeti u koje bi grupe bili raspoređeni postojeći podaci pomoću dotičnih klasifikacijskih funkcija. Ukoliko se postojeći podaci sa zadovoljavajućom vjerojatnošću točno klasificiraju u grupe, utoliko je pretpostavka da će novi podaci s jednakom vjerojatnošću biti klasificirani u jednu od grupa.

### **3.4. Analiza pomoću molekularnih biljega**

#### **3.4.1. Izolacija DNK**

50 mg biljnog materijala po uzorku usitnjeno je pomoću uređaja Tissuelyser (Qiagen), uz prethodno zamrzavanje tekućim dušikom. Ukupna genomska DNK izolirana je pomoću DNeasy® Plant Pro Kit (250) (Qiagen) kompleta za izolaciju DNK iz biljnog tkiva, koji u svom sastavu ima i epruvetice za homogenizaciju uzoraka s posebnom kuglicom. Taj komplet za izolaciju namijenjen je izolaciji problematičnih uzoraka koji zbog sadržaja inhibirajućih spojeva poput polifenola daju slabi prinos DNA pri korištenju standardnog kompleta za izolaciju.

#### **3.4.2. Molekularni biljezi**

Za analizu korištena su dva multipleksa SSR (mikrosatelitnih) biljega, opisanih u Ganea i dr. (2015). Mikrosatelitski biljezi predstavljaju ulomke DNA u kojima se neki tzv. motiv (slijed nukleotida (1-6 baza)) ponavlja određeni broj puta (Katičić Bogdan 2012). Po svom sastavu razvrstavaju se po motivu kao: a) savršeni – ako su sazđani isključivo od jednog ponavljajućeg motiva; b) nesavršeni – ako se neki bazni par koji ne pripada motivu nalazi između ponavljanja; c) prekinuti – ako je slijed od nekoliko baznih parova ubačen u motiv; ili d) sastavljeni – ako se sastoje od nekoliko ponavljajućih motiva koji se izmjenjuju jedan uz drugoga. Njihova je značajka da su jako polimorfni, što znači da postoji veliki broj alela tj. velika raznolikost inačica jednog ulomka DNA između različitih jedinki. Zbog te su značajke izrazito prikladni za točnu genetsku identifikaciju jedinki (genotipizaciju), zajedničkom upotrebom više mikrosatelitskih lokusa (biljega). Također su idealni za istraživanje genetske raznolikosti unutar i između populacija i procese kao što migracije gena između populacija i obrasci razmnožavanja unutar populacija (Katičić Bogdan 2012; Poljak 2014), zbog velike primjenjivosti u roditeljskim analizama. Biljezi su prvenstveno razvijeni za primjenu u običnog bora (*Pinus sylvestris*), ali autori navode da su testirani na planinskom boru te da su primjenjivi i za analize te vrste. Značajke biljega prikazane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Molekularni biljezi korišteni u analizi, pripadajući multipleksi, koncentracija početnica, ponavljajući motivi i očekivani raspon alela.

Biljeg	Multipleks	Oznaka na F početnici	Koncentracija početnica (PCR)	Ponavljajući motiv	Očekivani raspon alela (kod <i>Pinus sylvestris</i> )
PtTx3013	1	6-FAM	0.4	GTT	90-120
PtTx3016	1	6-FAM	0.8	CAA	250-270
PtTx3020	1	VIC	0.8	A(CAA)	150-170
PtTx3049	1	VIC	0.8	TG	280-320
PtTx4011	1	NED	0.8	CA	260-270
Ctg4363	2	VIC	0,3	AT	90-120
SPAC12.5	2	6-FAM	0,8	(GT)(GA)	130-210
Ctg1376	2	6-FAM	0,8	AT	90-120
PtTx3107	2	NED	0,8	CAT	140-160
PtTx4001	2	VIC	1	CA	190-280

### 3.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za oba multipleksa korišten je komercijalni komplet za PCR (*Type-it Microsatellite PCR kit*, Qiagen) po uputstvima proizvođača. Koncentracije početnica u multipleksima prikazane su u Tablici 2. *Forward* početnice označene su fluorescentnim oznakama za kapilarnu elektroforezu koje su također navedene u Tablici 2. Ukupni volumen reakcije po pojedinom uzorku u PCR pločici za 96 uzoraka bio je 10  $\mu$ l, od čega 2,5  $\mu$ l Mastermix (*Type-it kit*), 0,2  $\mu$ l Q (*Type-it kit*), 0,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (*Type-it kit*), miks početnica i 3  $\mu$ l DNK. Za umnožavanje ulomaka korišten je „*Touchdown*“ protokol naveden u Ganea i dr. (2015), na uređaju MasterCycler gradient (Eppendorf).

#### PCR protokol

Inicijalna denaturacija (razdvajanje lanaca DNK) – 15 min / 95 °C

20 ciklusa:

1. denaturacija 30 sekundi – 95 °C
2. prijanjanje početnica (*annealing*) 90 sekundi – 62 °C (sa spuštanjem temperature za 0,5 °C u svakom ciklusu)
3. produljivanje lanaca (*elongation*) 1 min – 72 °C

15 ciklusa

1. denaturacija 30 sekundi – 95 °C
2. prijanjanje početnica (*annealing*) 30 sekundi – 52 °C
3. produljivanje lanaca (*elongation*) 1 min – 72 °C

Završna elongacija (ekstenzija) 10 min – 72 °C

Analiza fragmenata kapilarnom elektroforezom napravljena je u servisu MacroGen Europe. Duljine alela očitane su u programu GeneMapper™ Software 5 (Thermo Fisher).

### 3.4.4. Statistička analiza molekularnih podataka

#### 3.4.4.1. Raznolikost mikrosatelitskih biljega

Za svaki mikrosatelitski lokus, broj alela po lokusu ( $N_a$ ), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) i vjerojatnost identiteta (*Probability of Identity*) (PI) izračunati su koristeći Cervus v3.0 (Kalinowski i dr. 2007).

#### 3.4.4.2. Unutarpopulacijska raznolikost

Podaci su provjereni za pogrešna očitavanja alela zbog greške polimeraze, ispadanja dugih alela i prisustva nul-alela pomoću programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout i dr. 2004).

Unutarpopulacijska raznolikost je procijenjena pomoću programa HP-Rare (Kalinowski 2005). Izračunati su prosječni broj alela ( $N_{av}$ ), alelno bogatstvo ( $N_{ar}$ ) i bogatstvo privatnih alela ( $N_{par}$ ) unutar svake populacije, kontrolirajući razliku u brojevima uzoraka po populacijama metodom rarefakcije.

Genetski parametri populacija, ostvarena ( $H_O$ ) i očekivana ( $H_E$ ) heterozigotnost te koeficijent inbridinga ( $F_{IS}$ ) izračunati su pomoću programa GENEPOP 4.0 (Raymond i Rousset 1995). Pomoću istog programa testirane su populacijske genotipske učestalosti na podudarnost s očekivanima pod uvjetima Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Za utvrđivanje nedavnog i davnog efekta uskog grla (*Bottleneck*) u populacijama planinskog bora, ostvarena heterozigotnost ( $H_O$ ) uspoređena je s očekivanom pri uvjetima ravnoteže mutacija i drifta ( $H_{EQ}$ ), tzv. test viška heterozigota (Cornuet i Luikart 1996), koristeći program INEST v. 2.2 (Chybicki i Burczyk 2009). Osim relativno nedavnog genetskog uskog grla (*Recent Bottleneck*) INEST računa i Garza-Williamsov M-omjer (*M-ratio*) (Garza i Williamson 2001) koji je test za genetsko usko grlo (*Past Bottleneck*) koje se je dogodilo u davnoj prošlosti. Test za višak heterozigota, koji ukazuje na nedavno smanjenje populacije, proveden je prema dvofaznom modelu (TMP) koristeći preporučene vrijednosti parametara prema Peery i dr. (2012): udio višekoračnih (*Multistep*) mutacija,  $pg = 0,22$  i prosječna veličina višekoračnih (*Multistep*) mutacija,  $\delta g = 0,31$ . M-omjer izračunat je kao prosječni omjer između ukupnog broja alela ( $k$ ) i ukupnog raspona veličine alela ( $r$ ) u svakoj populaciji. Značajna vrijednost M-omjera je snažan dokaz prošlog uskog grla. Značajnost oba testa određena je korištenjem Wilcoxonovog testa s rangiranim znakovima s  $P$ -vrijednostima temeljenim na 1.000.000 permutacija.

### 3.4.4.3. Diferencijacija i struktura populacija

Genetska diferencijacija između svih parova populacija procijenjena je izračunom  $F_{ST}$  vrijednosti (fiksacijski indeks) u programu FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 1995). Vrijednosti  $P$  određene su nakon 10.000 nasumičnih permutacija. Fiksacijski indeks ( $F_{ST}$ ) je mjera diferencijacije između populacija utemeljena na njihovoj genetskoj strukturi, najčešće analiziranoj pomoću molekularnih biljega.

Analiza molekularne varijance (AMOVA) napravljena je pomoću programa ARLEQUINv 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010), razdjeljivanjem ukupne raznolikosti mikrosatelitskih biljega između i unutar uzorkovanih populacija planinskog bora. Statistička značajnost  $JST$ -a ustanovljena je neparametrijskim testom randomizacije sa 10.000 permutacija.

Faktorijska korespondentna analiza (*Factorial Correspondence Analysis*; FCA) korištena je za vizualizaciju cjelokupne genetske strukture u programu GENETIX v4.05 (Excoffier i dr. 1992).

Genetska struktura populacija planinskog bora procijenjena je pomoću programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard i dr. 2000). Analiza je provedena u dvije inačice: (A) bez prethodnih informacija o populacijama kojima jedinke pripadaju; i (B) s prethodnim informacijama (opcija LOCPRIOR). U oba slučaja s trideset ciklusa, koji se sastoje od *burn-in* perioda od 200.000 koraka, s 10.000.000 MCMC replikacija, s brojem klastera prilagođenih od 1 do 11 ( $K = 1-11$ , *admixture* model, korelirane alelne učestalosti). Procjene prosjeka (i standardne devijacije) vjerojatnosti podataka,  $\ln[\Pr(X|K)]$  za svaku vrijednost  $K$  i *ad hoc* statistika  $DK$  korištene su za odabir optimalnog broja klastera pomoću programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl i dr. 2012). CLUMPAK (Kopelman i dr. 2015) je korišten za klasteriranje i uprosječivanje ciklusa.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Morfološka istraživanja

#### 4.1.1. Deskriptivna statistika

U Tablici 2 navedeni su rezultati deskriptivne statistike za mjerene morfološke i anatomske značajke iglica i češera. Podaci su prikazani individualno za svaku populaciju te ukupno za sve populacije. Za svaku značajku prikazana je aritmetička sredina (M), minimalna (Min) i maksimalna vrijednost (Max), standardna devijacija (SD) te koeficijent varijacije (CV%). Maksimalne vrijednosti označene su crvenom, a minimalne zelenom bojom.

Promatrajući sve populacije zajedno, prosječna dužina iglica (NL) iznosila je 36,3 mm, dok je prosječna dužina rukavca (NSL) iznosila 4 mm. Prosječna debljina iglice (NT) iznosila je 745  $\mu\text{m}$ , odnosno 0,7 mm, dok su iglice bile u prosjeku 1207,8  $\mu\text{m}$ , odnosno 1,2 mm široke (NW). Razmak između žila u iglici (DVB) iznosio je prosječno 186,8  $\mu\text{m}$  (0,2 mm), a debljina epiderme 41,6  $\mu\text{m}$  (ET). Prosječan broj smolnih kanala (NRC) u iglicama planinskog bora iznosio je 4. Promatrajući rezultate deskriptivne statistike za češere, vidljivo je da je prosječna dužina češera (CL) iznosila 30,9 mm, a prosječna širina češera (CW) 19,3 mm. Svaki je češer u prosjeku sadržavao 86,9 štitića (AN), koji su u prosjeku bili 4,9 mm dugački (AL) i 7,3 mm široki (AW). Dvije najvarijabilnije značajke bile su dužina rukavca iglice (CV = 33,98 %) i broj smolnih kanala u iglici (CV = 26,75 %), dok su se kao najmanje varijabilne značajke izdvojile debljina iglice (CV = 8,71 %), broj štitića (CV = 9,24 %) i širina iglice (CV = 9,38 %).

Prosječno najduže iglice (39,8 mm) s najdužim rukavcem (4 mm) imala je populacija Učka, koju osim toga karakteriziraju i najdeblje iglice (762  $\mu\text{m}$ ), ali i najduži štitići (5 mm). S druge strane, iglice u populaciji Učka bile su najuže (1200  $\mu\text{m}$ ), s najtanjom epidermom (38  $\mu\text{m}$ ) i s najmanjim brojem smolnih kanala u iglici (3,4). Osim toga, češeri su u ovoj populaciji bili najuži (18,8 mm) s najmanjim brojem štitića (84,1). Također, u populaciji Učka zabilježeni su i najniži koeficijenti varijabilnosti za debljinu i širinu iglice (7,23 i 7,67 %), kao i za dužinu iglica (16,97 %). S druge strane, dužina rukavca (37,91 %), broj štitića (10,6 %) i broj smolnih kanala u iglici (27,26 %) bili su najvarijabilniji upravo u ovoj populaciji.

Populaciju Snježnik karakterizirali su prosječno najveći češeri. Naime četiri od pet mjenjenih morfoloških značajki češera imalo je maksimalne vrijednosti upravo u ovoj populaciji: dužina češera (32,4 mm), širina češera (20,2 mm), širina štitića (7,7 mm) i broj štitića (89,5). S druge strane, štitići (4,8 mm) i iglice (734,6  $\mu\text{m}$ ) su bili najtanji u ovoj populaciji, a razmak između provodnih žila u iglici najkraći (181,1  $\mu\text{m}$ ). Populacija Snježnik pokazala se kao najmanje varijabilna, jer je čak osam od ukupno 12 značajki pokazalo najmanje koeficijente varijabilnosti (CL, CW, AL, AW, AN, DVB, ET, NRC).

Populacija Zavižan odlikovala se prosječno najkraćim iglicama (33,3 mm) i rukavcima (3,96 mm), kao i najkraćim češerima (29,5 mm) i najužim štitićima (6,7 mm). Međutim, iglice su u ovoj populaciji bile najšire (1219  $\mu\text{m}$ ), razmak između provodnih žila najveći (190  $\mu\text{m}$ ), epiderma najdeblja (44,8  $\mu\text{m}$ ), a smolni kanali najbrojniji (4,5). Osim toga, populacija Zavižan se pokazala i kao najvarijabilnija, s devet maksimalnih vrijednosti koeficijenta varijabilnosti (NL, CL, CW, AL, AW, NT, NW, DVB, ET).

**Tablica 2.** Rezultati deskriptivne statističke analize za mjerene morfološke značajke iglica i češera bora krivulja, pojedinačno po populacijama i ukupno za sve populacije zajedno. Mjerene morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici. Deskriptivni pokazatelji: M–aritmetička sredina; Min–minimalna vrijednost; Max–maksimalna vrijednost; SD–standardna devijacija; CV–koeficijent varijabilnosti (%).

Populacija	Deskriptivni pokazatelj	NL (mm)	NSL (mm)	CL (mm)	CW (mm)	AL (mm)	AW (mm)	AN	NT (µm)	NW (µm)	DVB (µm)	ET (µm)	NRC
Učka	M	39,83	4,02	30,66	18,84	5,03	7,43	84,10	761,96	1199,67	189,74	37,93	3,41
	Min	24,00	2,00	17,11	6,30	2,10	4,38	55,00	530,29	852,94	100,89	20,91	1,00
	Max	60,00	11,00	51,15	27,22	8,30	11,89	116,00	1015,20	1427,79	311,98	63,49	7,00
	SD	6,76	1,52	6,06	2,73	0,97	1,20	8,92	55,09	91,99	34,53	6,98	0,93
	CV	16,97	37,91	19,77	14,47	19,24	16,19	10,60	7,23	7,67	18,20	18,42	27,26
Snježnik	M	35,89	4,02	32,43	20,19	4,80	7,65	89,47	734,62	1204,71	181,07	42,06	4,12
	Min	20,00	2,00	18,19	5,13	2,76	4,89	74,00	564,97	802,59	80,31	24,44	2,00
	Max	55,00	8,00	47,85	26,64	7,40	10,26	116,00	1046,94	1727,82	280,71	78,24	6,00
	SD	6,52	1,31	5,12	2,02	0,86	0,94	6,37	57,83	119,08	32,62	7,32	0,89
	CV	18,17	32,51	15,77	10,01	17,99	12,26	7,12	7,87	9,88	18,01	17,40	21,56
Zavižan	M	33,29	3,96	29,50	18,95	4,92	6,70	86,84	739,05	1219,06	189,99	44,76	4,49
	Min	18,00	2,00	12,80	7,41	1,58	2,40	57,00	524,28	909,72	85,94	23,15	2,00
	Max	50,00	9,00	42,78	25,66	7,86	9,90	104,00	968,30	1610,98	345,30	78,74	8,00
	SD	6,36	1,23	6,10	3,11	1,15	1,32	7,74	76,67	125,21	37,82	8,65	1,10
	CV	19,10	31,18	20,68	16,42	23,40	19,69	8,91	10,37	10,27	19,91	19,32	24,55
Ukupno	M	36,33	4,00	30,89	19,34	4,91	7,27	86,85	745,03	1207,76	186,83	41,59	4,01
	Min	18,00	2,00	12,80	5,13	1,58	2,40	55,00	524,28	802,59	80,31	20,91	1,00
	Max	60,00	11,00	51,15	27,22	8,30	11,89	116,00	1046,94	1727,82	345,30	78,74	8,00
	SD	7,07	1,36	5,89	2,72	1,00	1,23	8,03	64,88	113,32	35,23	8,16	1,07
	CV	19,45	33,98	19,06	14,05	20,40	16,91	9,24	8,71	9,38	18,86	19,62	26,75

### 4.1.2. Korelacijska analiza

Rezultati korelacijske analize prikazani su u Tablici 3. Od ukupno 66 parova, statistički značajne korelacije utvrđene su između njih 20 i to sve pozitivne. Najviše značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu češera (NL, CW, AL, AW, AN) i širinu iglice (NL, NT, DVB, ET, NRC) zatim za dužinu iglica (NSL, CL, NT, NW), širinu češera (CL, AL, AW, AN) i za razmak između žila u iglici (NT, NW, ET, NRC). Najmanje značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu rukavca, samo jedna (NL). Jakih korelacija, s vrijednošću iznad 0,7 zabilježeno je tri: CL i CW NT i NW, NW i DVB.

### 4.1.3. Analiza varijance (ANOVA)

U Tablici 4 prikazani su rezultati analize varijance (ANOVA) za mjerene parametre iglica i češera. Crvenom bojom označene su statistički značajne  $p$ -vrijednosti. Analizirani faktori varijabilnosti bili su „populacija“ i „grm“, na način da je faktor „grm“ fiksiran unutar faktora „populacija“. Analizom je utvrđeno da se na istraživanom području grmovi planinskog bora statistički značajno razlikuju unutra populacija za sve mjerene morfološke značajke iglica i češera. S druge strane, statistički značajne razlike utvrđene su u svega pet značajki na međupopulacijskoj razini (NL, AW, AN, ET, NRC). Kod većine značajki najveći udio od ukupne varijabilnosti odnosio se na sastavnicu „ostatak“ (NSL, AL, AW, AN, DVB, ET, NRC), zatim na unutarpopulacijsku varijabilnost (NL, CL, CW, NT, NW), dok je najmanji udio od ukupne varijabilnosti bio pripisan međupopulacijskoj varijabilnosti, za neke značajke on je iznosio 0 % (NSL, AL, NL, DVB).

Nakon što je analizom varijance utvrđeno da se populacije statistički značajno razlikuju provedeno je testiranje pomoću Fisherovih multiplih testova (LSD) između svih parova populacija, s ciljem utvrđivanja značajki koje najbolje razlikuju pojedine populacije (Tablica 5). Najmanje razlika utvrđeno je između populacija Snježnik i Zavižan (AW, ET), dok su jednak broj značajnih razlika imale populacije Učka i Snježnik (NL, AN, ET, NRC) i Učka i Zavižan (NL, AW, ET, NRC).

**Tablica 3.** Rezultati korelacijske analize između istraživanih morfoloških značajki iglica i češera bora krivulja. Statistički značajke vrijednosti označene su crvenom bojom. Mjerene morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici. ns – nije statistički značajno; \* –  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\* –  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

	NL	NSL	CL	CW	AL	AW	AN	NT	NW	DVB	ET	NRC
NL		***	*	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns
NSL	0,506		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CL	0,284	0,157		***	***	***	***	ns	ns	ns	ns	ns
CW	0,045	0,066	0,741		***	***	**	ns	ns	ns	ns	ns
AL	0,045	0,207	0,587	0,443		***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AW	0,127	0,029	0,616	0,690	0,581		ns	ns	ns	ns	ns	ns
AN	0,096	0,112	0,607	0,427	0,186	0,177		ns	ns	ns	ns	ns
NT	0,364	0,116	0,079	0,031	0,105	0,088	-0,163		***	***	ns	ns
NW	0,263	0,093	0,103	0,056	0,016	-0,073	-0,056	0,785		***	**	***
DVB	0,194	0,174	0,007	-0,034	-0,032	-0,179	-0,049	0,677	0,742		**	**
ET	-0,193	0,020	-0,076	-0,007	-0,114	-0,213	0,121	0,236	0,427	0,386		**
NRC	-0,220	-0,037	0,034	0,047	0,015	-0,256	0,220	0,240	0,483	0,344	0,367	

**Tablica 4.** Rezultati analize varijance (ANOVA). Mjerene morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici. ns – nije statistički značajno; \* –  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\* –  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Značajke	Sastavnice varijance	df	% Varijabilnost	F	<i>p</i>
NL	Između populacija	2	17,27	6,89	**
	Unutar populacija	55	54,50	39,62	***
	Ostatak		28,23		
NSL	Između populacija	2	0,00	0,04	ns
	Unutar populacija	55	30,28	10,02	***
	Ostatak		69,72		
CL	Između populacija	2	3,17	2,03	ns
	Unutar populacija	55	57,69	30,49	***
	Ostatak		39,14		
CW	Između populacija	2	4,45	2,43	ns
	Unutar populacija	55	58,56	32,68	***
	Ostatak		36,99		
AL	Između populacija	2	0,00	0,55	ns
	Unutar populacija	55	44,28	17,16	***
	Ostatak		55,72		
AW	Između populacija	2	13,17	6,64	**
	Unutar populacija	55	42,90	20,53	***
	Ostatak		43,93		
AN	Između populacija	2	9,04	6,04	**
	Unutar populacija	55	31,90	11,81	***
	Ostatak		59,06		
NT	Između populacija	2	2,23	1,80	ns
	Unutar populacija	55	51,63	23,38	***
	Ostatak		46,14		
NW	Između populacija	2	0,00	0,24	ns
	Unutar populacija	55	58,79	30,34	***
	Ostatak		41,21		
DVB	Između populacija	2	0,08	1,02	ns
	Unutar populacija	55	36,49	12,51	***
	Ostatak		63,43		
ET	Između populacija	2	15,88	19,31	***
	Unutar populacija	55	12,94	4,64	***
	Ostatak		71,18		
NRC	Između populacija	2	22,10	12,16	***
	Unutar populacija	55	35,61	17,84	***
	Ostatak		42,29		

**Tablica 5.** Rezultati komparacije parova populacija za istraživa svojstva češera i iglica, korištenjem Fisherovog LSD testa.

Populacija	Učka	Snježnik
Snježnik	NL–dužina iglice, AN–broj štitića, ET–debljina epiderme, NRC–broj smolnih kanala u iglici	
Zavižan	NL–dužina iglice, AW–širina štitića, ET–debljina epiderme, NRC–broj kanala u iglici	AW–širina štitića, ET–debljina epiderme

#### 4.1.4. Analiza glavnih sastavnica (PCA)

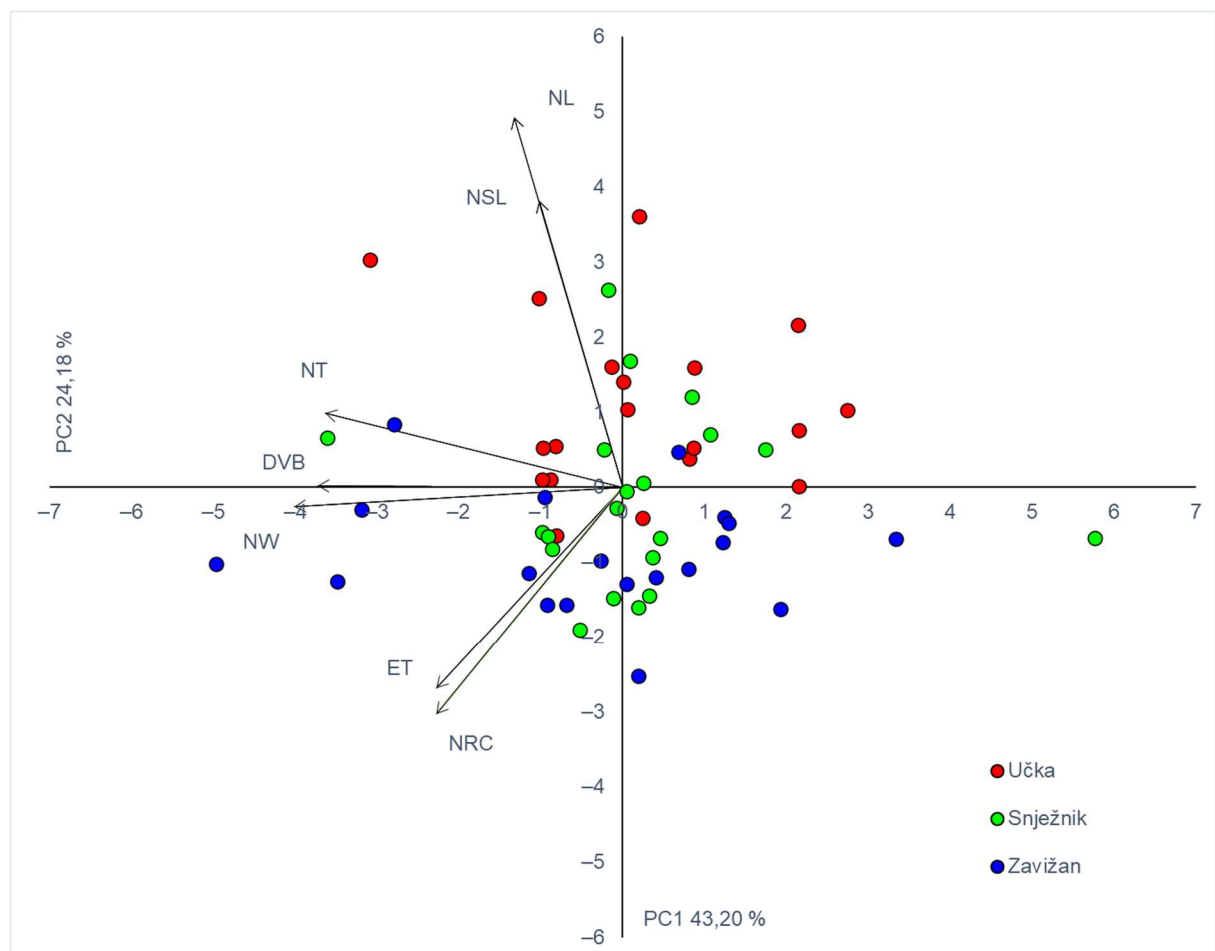
Analizom glavnih sastavnica (PCA) za morfološke značajke iglica utvrđeno je da prve dvije glavne sastavnice imaju svojstvenu vrijednost veću od jedan te da objašnjavaju 43,20 % odnosno 24,18 % ukupne varijabilnosti (Tablica 6). U Tablici 7 prikazane su korelacije između prvih sedam glavnih sastavnica i sedam morfoloških značajki iglica. Iz Tablice 7 i Slike 5 vidljivo je da je prva glavna sastavnica u visokoj negativnoj korelaciji s tri značajke (NT, NW, DVB), dok je druga glavna sastavnica u visokoj pozitivnoj korelaciji s jednom značajkom (NL). Projekcija istraživanih grmova u prostoru prvih dviju glavnih sastavnica prikazana je na Slici 5. Iako te projekcije čine kontinuirani oblak podataka, nazire se trend odvajanja zapadne populacije Učka i južne populacije Zavižan.

**Tablica 6.** Svojstvene vrijednosti i kumulativna varijabilnost sadržana u prvih sedam glavnih sastavnica za morfološke karakteristike iglica planinskog bora.

Glavna sastavnica	Svojstvena vrijednost	% Varijabilnosti	Kumulativna varijabilnost (%)
PC1	3,02	43,20	43,20
PC2	1,69	24,18	67,38
PC3	0,86	12,24	79,62
PC4	0,63	9,04	88,66
PC5	0,39	5,55	94,22
PC6	0,26	3,67	97,88
PC7	0,15	2,12	100,00

**Tablica 7.** Pearsonovi korelacijski koeficijent između sedam morfoloških značajki iglica i prvih sedam glavnih sastavnica. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici.

Značajka	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
NL	-0,306	0,854	0,049	-0,036	0,342	-0,224	-0,072
NSL	-0,237	0,662	-0,660	-0,087	-0,187	0,160	0,042
NT	-0,842	0,170	0,356	0,044	0,017	0,325	-0,165
NW	-0,930	-0,045	0,151	-0,044	0,101	0,023	0,311
DVB	-0,863	0,003	0,082	0,097	-0,404	-0,268	-0,068
ET	-0,528	-0,466	-0,445	0,504	0,220	-0,017	-0,056
NRC	-0,526	-0,525	-0,254	-0,597	0,121	-0,046	-0,095



**Slika 5.** Grafički prikaz analize glavnih sastavnica (PCA), na temelju sedam morfoloških značajki iglica planinskog bora iz tri prirodne populacije u Hrvatskoj. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici.

Analizom glavnih sastavnica (PCA) za morfološke značajke češera utvrđeno je da ukupnu varijabilnost od 100 % objašnjava prvih pet glavnih sastavnica, od kojih je samo prva imala svojstvenu vrijednost veću od jedan. Iz Tablice 8 i Slike 6 vidljivo je da je prva glavna sastavnica, koja objašnjava 61,67 % ukupne varijabilnosti, u visokoj pozitivnoj korelaciji s četiri morfološke značajke češera (CL, CW, AL, AW). Druga glavna sastavnica, koja objašnjava 19,09 % ukupne varijabilnosti, bila je u visokoj pozitivnoj korelaciji sa značajkom AN. Na Slici 6 je vidljivo da projekcija istraživanih grmova u prostoru prvih dviju glavnih sastavnica čini kontinuirani oblak podataka te da se nijedna populacija ne izdvaja od ostalih. Vidljivo je jedino značajno odvajanje jedne individue unutar populacije Zavižan s lijeve strane dijagrama.

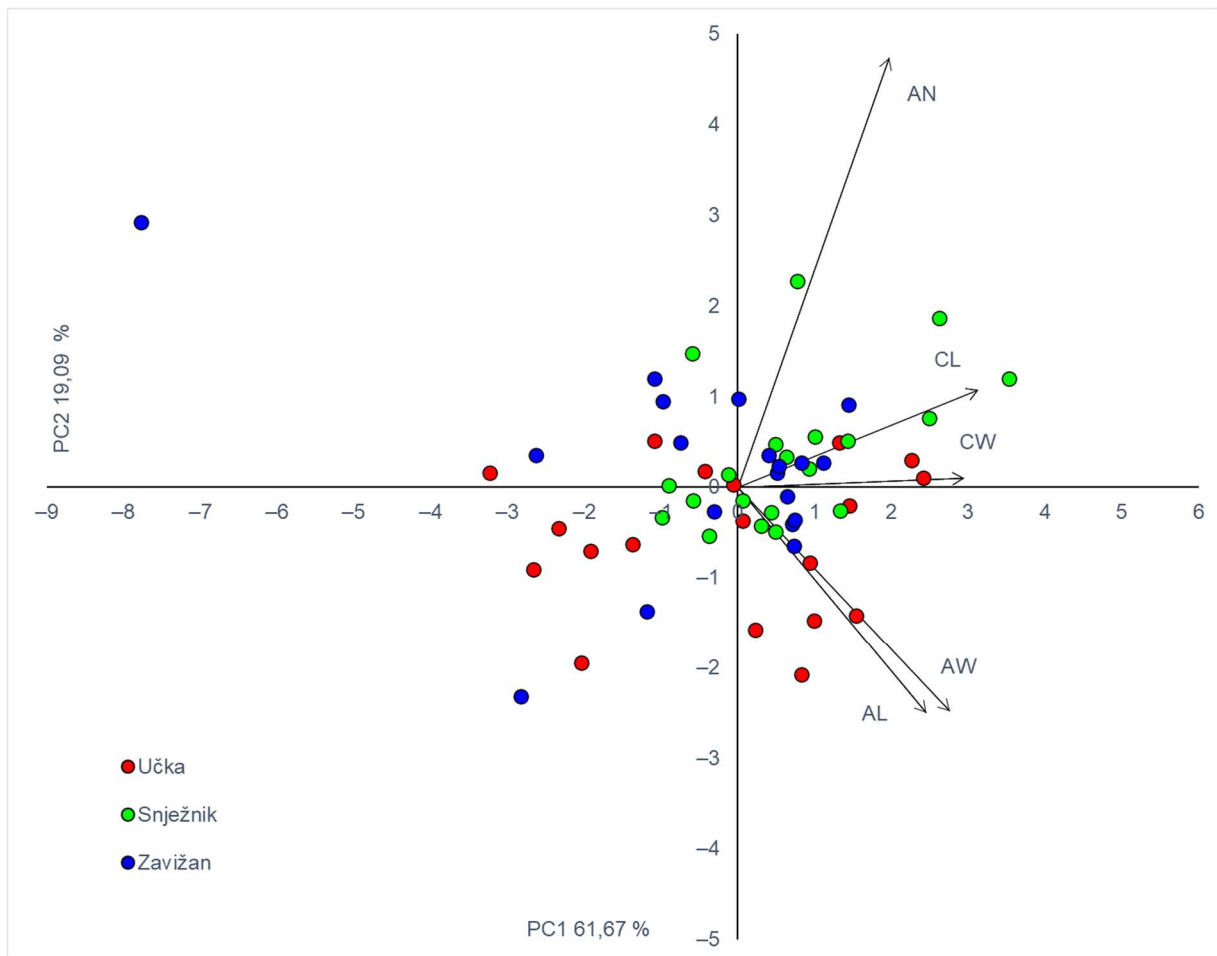
**Tablica 8.** Svojstvena vrijednost i kumulativna varijabilnost sadržana u prvih pet glavnih sastavnica za morfološke karakteristike češera planinskog bora.

Glavna sastavnica	Svojstvena vrijednost	% Varijabilnosti	Kumulativna varijabilnost
PC1	3,08	61,67	61,67
PC2	0,95	19,09	80,76
PC3	0,54	10,74	91,50
PC4	0,25	4,93	96,44
PC5	0,18	3,56	100,00

**Tablica 9.** Pearsonovi korelacijski koeficijenti između pet morfoloških značajki češera i prvih pet glavnih sastavnica. Morfološke značajke: CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
CL	0,916	0,174	0,063	0,127	0,333
CW	0,864	0,016	-0,385	0,264	-0,188
AL	0,718	-0,408	0,546	0,061	-0,125
AW	0,806	-0,404	-0,253	-0,350	0,024
AN	0,577	0,771	0,150	-0,185	-0,125





**Slika 6.** Grafički prikaz analize glavnih sastavnica (PCA), na temelju pet morfoloških značajki češera planinskog bora iz tri prirodne populacije u Hrvatskoj. Morfološke značajke: CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića.

#### 4.1.5. Diskriminantna analiza

Pokazatelji diskriminantne analize za morfometrijske značajke iglica prikazani su u Tablici 10. Prema *stepwise* diskriminantnoj analizi četiri značajke iglica izdvojene su kao one koje najbolje razlikuju istraživane populacije planinskog bora. Na temelju vrijednosti parcijalne Wilksove  $\lambda$  može se zaključiti da značajka ET (debljina epiderme) najbolje razlikuje istraživane populacije. Ostale značajke koje razlikuju populacije su broj smolnih kanala u iglici (NRC), razmak između žila u iglici (DVB) i debljina iglica (NT).

**Tablica 10.** Pokazatelji diskriminantne analize, po značajkama iglica. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici. Statistički značajne vrijednosti obilježene su crvenom bojom.

Značajka	Wilksova $\lambda$	Parcijalna $\lambda$	F	$p$
NL	0,231424	0,944925	1,42798	0,249596
NSL	0,229945	0,951003	1,26226	0,292052
NT	0,252732	0,865256	3,81533	0,028843
NW	0,225723	0,968791	0,78924	0,459877
DVB	0,254078	0,860672	3,96612	0,025324
ET	0,429977	0,508581	23,67325	0,000000
NRC	0,320862	0,681532	11,44840	0,000083

Za sedam značajki kanoničkom analizom dobivene su dvije diskriminacijske funkcije, od kojih je samo prva bila statistički značajna (Tablica 11). Prvi red u Tablici 11 sadrži test signifikantnosti za obje funkcije, a drugi za drugu funkciju nakon uklanjanja prve.

**Tablica 11.**  $\chi^2$  testovi za diskriminacijske funkcije sa sukcesivnim isključivanjem korijena za morfološke značajke iglica.

Isključeno korijena	Wilksova $\lambda$	$\chi^2$	Stupnjevi slobode	$p$
0	0,218678	79,04806	14	0,000000
1	0,934151	3,54207	6	0,738365

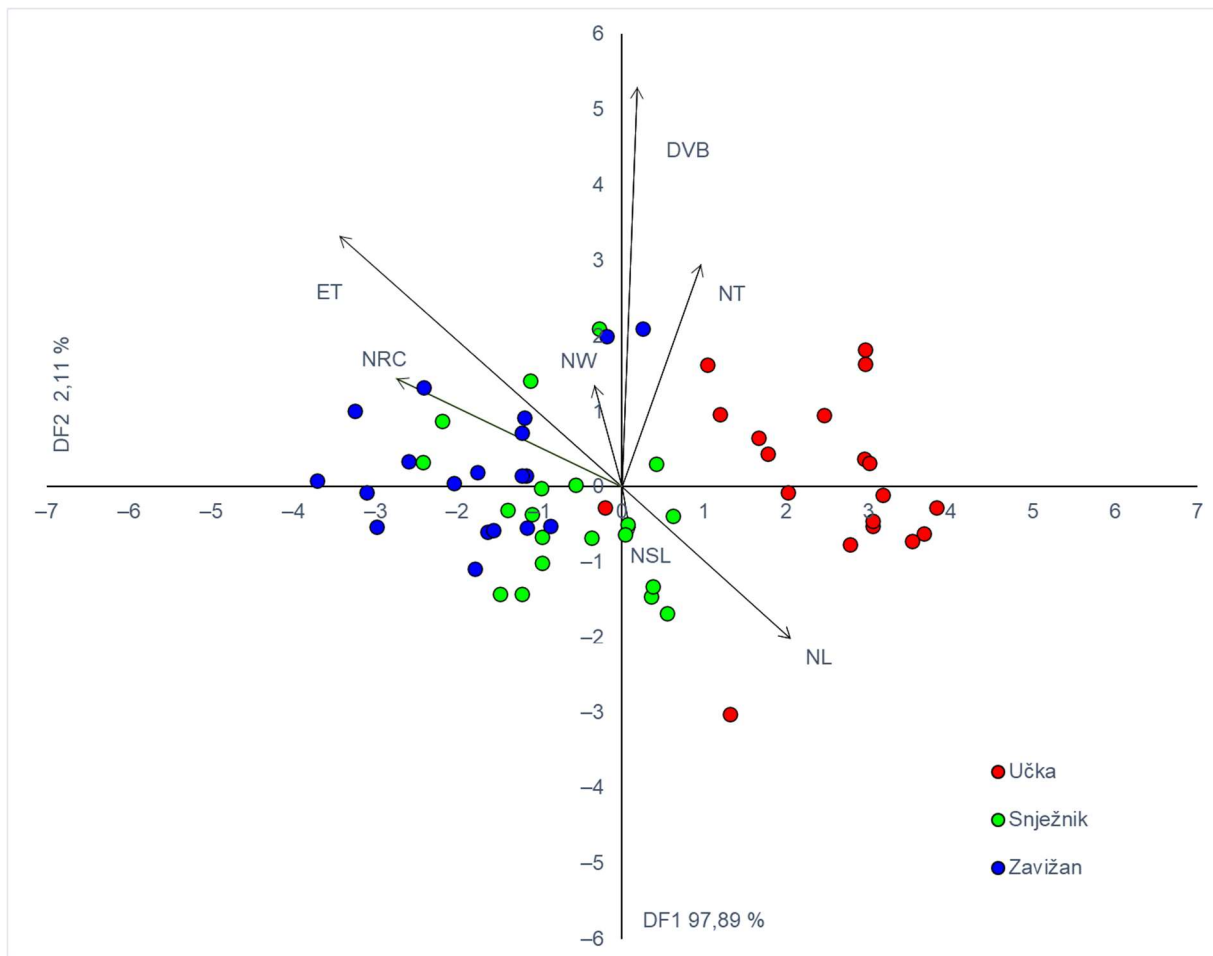
Određen je i doprinos svake pojedine značajke iglica razlikovanju definiranih grupa. Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli prikazani su u Tablici 12. Što je standardizirani koeficijent veći, to je veći i doprinos pripadajuće značajke razlikovanju grupa. Razlikovanje koje je definirano diskriminacijskom funkcijom 1 najviše je određeno značajkom ET, zatim slijede NRC, NT i DVB. Diskriminacijska funkcija 2 u najvećoj mjeri je uvjetovana značajkama DVB, NW i NT. Tablica 12 sadrži i svojstvene vrijednosti te kumulativni udio varijabilnosti za svaku funkciju. Vidljivo je da prva funkcija sadrži 97,89 % objašnjene varijabilnosti. Iz Tablice 13 i Slike 7 vidljivo je da prva diskriminacijska funkcija najbolje razlikuje populaciju Učka od populacija Zavižan i Snježnik.

**Tablica 12.** Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici.

Značajka	Diskriminantna funkcija 1	Diskriminantna funkcija 2
NL	0,34557	-0,24795
NSL	-0,31245	-0,12818
NT	0,75454	0,54740
NW	-0,27377	-1,17086
DVB	0,62133	1,19481
ET	-1,04525	0,14890
NRC	-0,83397	0,03883
Svojstvena vrijednost	3,27181	0,07049
Kumulativna proporcija	0,97891	1,00000

**Tablica 13.** Sredine kanoničkih varijabli za dvije diskriminacijske funkcije po populacijama za morfološke značajke iglica.

Populacija	Diskriminantna funkcija 1	Diskriminantna funkcija 2
Snježnik	-0,63162	-0,344106
Učka	2,43363	0,098014
Zavižan	-1,76877	0,264203



**Slika 7.** Grafički prikaz prve i druge diskriminacijske funkcije za morfološke značajke iglica. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici.

Osim razlikovanja unaprijed definiranih grupa, diskriminantna analiza se koristi i za klasifikaciju novih uzoraka u jednu od tih grupa, na način da za svaku grupu imamo klasifikacijsku funkciju (Tablica 14). Podaci postojećeg uzorka uvršteni su u klasifikacijske funkcije i to na način da su svrstani u onu grupu za koju je klasifikacijski rezultat najveći, a kao rezultat dobivena je klasifikacijska matrica (Tablica 15).

**Tablica 14.** Koeficijenti klasifikacijskih funkcija, po grupama. Morfološke značajke iglica – klasifikacijske funkcije. Morfološke značajke: NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NT–debljina iglice; NW–širina iglice; DVB–razmak između žila u iglici; ET–debljina epiderme; NRC–broj smolnih kanala u iglici.

Značajke	Klasifikacijske funkcije		
	Snježnik	Učka	Zavižan
NL	-0,193	-0,020	-0,293
NSL	6,455	5,195	6,800
NT	0,253	0,306	0,242
NW	0,066	0,051	0,061
DVB	-0,503	-0,394	-0,502
ET	2,674	1,754	3,049
NRC	3,482	-0,213	4,897
Konstanta	-160,864	-153,680	-167,929

Iz klasifikacijske matrice može se vidjeti u koje su grupe raspoređeni postojeći podaci pomoću klasifikacijskih funkcija, odnosno kolika je vjerojatnost točne klasifikacije za pojedine grupe. Prema navedenoj matrici, čiji rezultati su prikazani u Tablici 15, točnost klasifikacije za sve tri grupe je 82,76 %, dok mogućnost njihove pogrešne klasifikacije iznosi 17,24 %. Iz tablice je jasno vidljivo da su se najtočnije klasificirali grmovi iz populacije Učka. Dva grma iz naveden populacije krivo su klasificirana u populaciju Snježnik. Slijedi populacija Snježnik, s 80 % te u konačnici populacija Zavižan s 78,95 %.

**Tablica 15.** Klasifikacijska matrica – morfološke značajke iglica. Svi mjereni podaci su prema klasifikacijskim funkcijama razvrstani u grupe kojima najvjerojatnije pripadaju. U drugoj koloni je postotak točno klasificiranih podataka.

Populacija	Klasifikacijska matrica			
	%	Snježnik	Učka	Zavižan
Snježnik	80,00	16	0	4
Učka	89,47	2	17	0
Zavižan	78,95	4	0	15
Ukupno	82,76	22	17	19

Pokazatelji diskriminantne analize za morfometrijske značajke češera prikazani su u Tablici 16. Provedena *stepwise* diskriminantna analiza izdvojila je četiri značajke češera koje najbolje razlikuju istraživane populacije planinskog bora. Na temelju vrijednosti parcijalne Wilksove  $\lambda$  jasno se vidi da značajka AW (širina štitića) najbolje razlikuje istraživane populacije. Populacije se multivarijatno razlikuju i prema dužini štitića (AL), broju štitića (AN) i širini češera (CW). Dužina češera (CL) nije značajno doprinosila razlikovanju istraživanih populacija. Za pet značajki kanoničkom analizom dobivene su dvije diskriminacijske funkcije, obje statistički značajne (Tablica 17).

**Tablica 16.** Pokazatelji diskriminantne analize, po značajkama češera. Morfološke značajke: CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića. Statistički značajne vrijednosti obilježene su crvenom bojom.

Značajka	Wilksova $\lambda$	Parcijalna $\lambda$	F	$p$
CL	0,478899	0,915370	2,35760	0,104884
CW	0,505278	0,867581	3,89206	0,026725
AL	0,565581	0,775078	7,39991	0,001508
AW	0,635690	0,689597	11,47815	0,000077
AN	0,527364	0,831247	5,17681	0,008977

**Tablica 17.**  $\chi^2$  testovi za diskriminacijske funkcije sa sukcesivnim isključivanjem korijena za morfološke značajke češera.

Isključeno korijena	Wilksova $\lambda$	$\chi^2$	Stupnjevi slobode	$p$
0	0,438370	43,70873	10	0,000004
1	0,730316	16,65672	4	0,002253

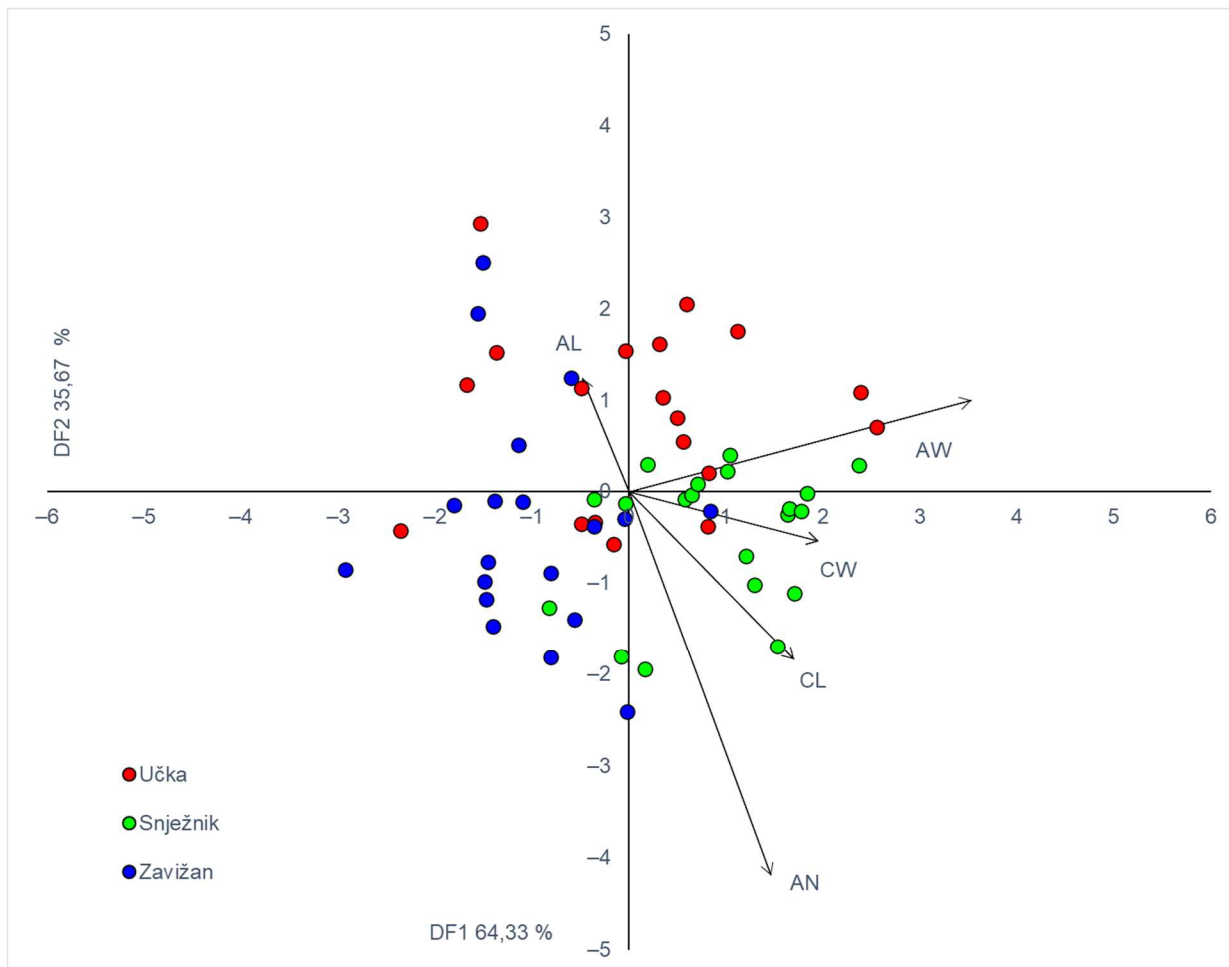
Određen je i doprinos svake pojedine značajke češera razlikovanju definiranih grupa. Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli prikazani su u Tablici 18. Razlikovanje po prvoj diskriminacijskoj funkciji najviše je određeno značajkom AW, iza koje slijede AL, CW i CL. Diskriminacijska funkcija 2 u najvećoj mjeri je uvjetovana značajkama AN, CW i CL. Prva diskriminacijska funkcija objasnila je 64,3 %, a druga 35,7 % ukupne varijabilnosti. Iz Tablice 19 i Slike 8 vidljivo je da prva diskriminacijska funkcija najbolje razlikuje populacije Zavižan i Snježnik, a druga populaciju Učka.

**Tablica 18.** Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli za morfološke značajke češera.

Značajka	Diskriminantna funkcija 1	Diskriminantna funkcija 2
CL	0,51041	0,92657
CW	-0,64604	-0,93043
AL	-1,13608	0,11169
AW	1,47361	0,37571
AN	0,23455	-1,02143
Svojevna vrijednost	0,66598	0,36927
Kumulativna proporcija	0,64330	1,00000

**Tablica 19.** Sredine kanoničkih varijabli za dvije diskriminacijske funkcije po populacijama za morfološke značajke češera.

Populacija	Diskriminantna funkcija 1	Diskriminantna funkcija 2
Snježnik	0,90264	-0,462123
Učka	0,08117	0,845646
Zavižan	-1,03132	-0,359201



**Slika 8.** Grafički prikaz prve i druge diskriminacijske funkcije za morfološke značajke češera. Morfološke značajke: CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića.

Klasifikacijske funkcije za morfološke značajke češera prikazane su u Tablici 20, a klasifikacijska matrica u Tablici 21. Iz klasifikacijske matrice možemo vidjeti da je točnost klasifikacije za sve tri grupe 68,96 %. Najpouzdanija i najtočnija mogućnost klasifikacije je za grmove iz populacije Snježnik. Grmovi populacije Učka najmanje su točno klasificirani. Od ukupnog broja grmova, polovica je bila klasificirana u populaciju Učka, dok je druga polovica podjednako bila raspoređena u populacije Snježnik i Zavižan.

**Tablica 20.** Morfološke značajke češera – klasifikacijske funkcije. Morfološke značajke: CL–dužina češera; CW–širina češera; AL–dužina štitića; AW–širina štitića; AN–broj štitića.

Značajka	Klasifikacijske funkcije		
	Snježnik	Učka	Zavižan
CL	-5,334	-5,161	-5,528
CW	3,308	2,987	3,847
AL	5,154	6,705	8,328
AW	13,401	12,552	10,082
AN	5,852	5,535	5,736
Konstanta	-273,381	-246,335	-259,367

**Tablica 21.** Klasifikacijska matrica – morfološke značajke češera. Svi mjereni podaci su prema klasifikacijskim funkcijama razvrstani u grupe kojima najvjerojatnije pripadaju. U drugoj koloni je postotak točno klasificiranih podataka.

Populacija	Klasifikacijska matrica			
	%	Snježnik	Učka	Zavižan
Snježnik	85,00	17	1	2
Učka	52,63	4	10	5
Zavižan	68,42	3	3	13
Ukupno	68,96	24	14	20

## 4.2. Molekularna istraživanja

### 4.2.1. Raznolikost mikrosatelitskih biljega

Od deset biljega korištenih za PCR reakcije, uspješno se amplificiralo pet. Ostali biljezi također su se amplificirali u brojnih uzoraka, ali su zbog previše nedostajućih podataka i potencijalnih nul-alela isključeni iz daljnjih analiza.

U Tablici 22 prikazani su parametri raznolikosti uspješno amplificiranih biljega u tri analizirane populacije. Samo dva biljega (Ctg4363 i PtTX3020) u ovom istraživanju imaju PIC veći od 0,7, što je granica iznad koje biljeg smatramo vrlo informativnim. Ostala tri se kreću u rasponu niske do srednje informativnosti. Nadalje, PI ili vjerojatnost identiteta je vjerojatnost da dvije jedinice iz populacije ili uzorka imaju isti genotip slučajno, a ne zbog srodstva. Kombinirano za sve lokuse ta je vjerojatnost vrlo niska ( $3,27E-04$ ).

MICRO-CHECKER je detektirao prisutnost nul-alela u biljega PtTX 3016, te Ctg4363 u učestalostima ( $f_{null}$ ) 0,12, odnosno 0,19. Vrijednosti iznad 0,19 ukazuju na značajno podcjenjivanje izračuna očekivane heterozigotnosti ( $H_E$ ), tako da je vrijednost  $f_{null}$  za Ctg4363 granična.



**Tablica 22.** Parametri raznolikosti mikrosatelitskih biljega. Raspon alela – raspon duljine alela ostvaren u ovom istraživanju,  $N_a$  - broj alela, PIC - informacijski sadržaj polimorfizma, PI - vjerojatnost identiteta (pod ukupno je vrijednost kombinirana za sve lokuse),  $f_{null}$  – učestalost nul-alela.

Br.	Biljeg	Raspon alela	$N_a$	PIC	PI	$f_{null}$
1	Ctg1376	75-87	3	0,367	0,384	-
2	PtTX3013	102-129	6	0,260	0,542	-
3	PtTX3016	244-259	5	0,367	0,392	0,12
4	PtTX3020	174-183	9	0,720	0,095	-
5	Ctg4363	82-136	12	0,825	0,042	0,19
	Prosijek		7	0,508		
	Ukupno		35		3,27E-04	

#### 4.2.2. Unutarpopulacijska raznolikost

Parametri genetske raznolikosti unutar analiziranih populacija prikazani su u Tablici 23. Vrijednosti prosječnog broja alela najviše su za populaciju Učka (5,20), a podjednake za populacije Snježnik i Zavižan (4,80). Učka i Snježnik imaju jednak broj privatnih alela (4), dok Zavižan ima samo 2 privatna alela. Najveća genetska raznolikost (očekivana heterozigotnost  $H_E$ ) zabilježena je u populaciji Zavižan (0,680), nešto manja u populaciji Snježnik (0,600), a najmanja u populaciji Učka (0,499). Ostvarene heterozigotnosti za Zavižan i Snježnik veće su od očekivanih heterozigotnosti, a u Učke je ostvarena nešto niža od očekivane heterozigotnosti.

Koeficijent inbridinga za Snježnik i Zavižan je negativan, što ukazuje na lagani višak heterozigota. Za te dvije populacije nije statistički značajna vjerojatnost ( $P$ ) da populacije nisu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. U slučaju populacije Učka, koeficijent inbridinga ukazuje na lagani višak homozigota i statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže na razini 0,01 do 0,05.

Vrijednosti vjerojatnosti  $P$ (TPM) koje ukazuju na pojavu nedavnog *bottlenecka*, kao i vjerojatnosti  $P$ (MR) za davnašnji *bottleneck* nisu signifikantne niti za jednu od populacija, što znači da pomoću korištenih biljega u ove tri populacije nije detektirana pojava, niti nedavnog, niti davnašnjeg *bottlenecka*.

**Tablica 23.** Parametri unutarpopulacijske raznolikosti.  $n$  – broj uzoraka po populaciji;  $N_{av}$  – prosječni broj alela;  $N_{pr}$  – broj privatnih alela;  $H_O$  – ostvarena heterozigotnost;  $H_E$  – očekivana heterozigotnost;  $F_{IS}$  – koeficijent inbridinga;  $P$  – vjerojatnost da populacija nije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži;  $H_{eq}$  – očekivana heterozigotnost u uvjetima ravnoteže mutacija i drifta prema Dvofaznom modelu (TPM); P(TPM) –  $P$ -vrijednost dobivena korištenjem Wilcoxonovog sign-rank testa temeljenog na 1.000.000 permutacija; MR – ostvareni Garza-Williamsonov M-omjer; Mreq – Očekivani Garza-Williamsonov M-omjer u uvjetima ravnoteže mutacija i drifta; P(MR) –  $P$ -vrijednost dobivena korištenjem Wilcoxonovog sign-rank testa temeljenog na 1.000.000 permutacija.

Populacija	$n$	$N_{av}$	$N_{pr}$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$	$P$	HEq	$P$ (TPM)	Sign	MR	MReq	P(MR)	Sign
Učka	20	5,20	4	0,470	0,499	0,058	*	0,596	0,781	ns	0,640	0,830	0,219	ns
Snježnik	20	4,80	4	0,600	0,550	-0,090	ns	0,572	0,782	ns	0,768	0,842	0,219	ns
Zavižan	20	4,80	2	0,650	0,581	-0,120	ns	0,561	0,406	ns	0,593	0,847	0,155	ns

ns – nije statistički značajno; \* –  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\* –  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

### 4.2.3. Diferencijacija i struktura populacija

#### 4.2.3.1. $F_{ST}$ (fiksacijski indeks)

U Tablici 24 prikazane su  $F_{ST}$  vrijednosti između parova populacija ispod dijagonale, a iznad je prikazana statistička značajnost te diferencijacije između parova populacija (za  $P$  vrijednost). Sve  $F_{ST}$  vrijednosti su značajne, što ukazuje na postojanje diferencijacije između populacija. Prosječna  $F_{ST}$  vrijednost između svih populacija je 0,026. Statistički je najznačajnija diferencijacija između populacija Zavižan i Snježnik, na razini 0,001 – 0,01.

**Tablica 14.**  $F_{ST}$  vrijednosti između parova populacija (dolje) i pripadajuća statistička značajnost  $P$  vrijednosti (gore). Boje pokazuju diferencijaciju ispod prosjeka (plava), jednaku prosjeku (bijela) i iznad prosjeka (crvena). ns – nije statistički značajno; \* –  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\* –  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

	Učka	Snježnik	Zavižan
Učka		*	*
Snježnik	0,032		**
Zavižan	0,020	0,026	

#### 4.2.3.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

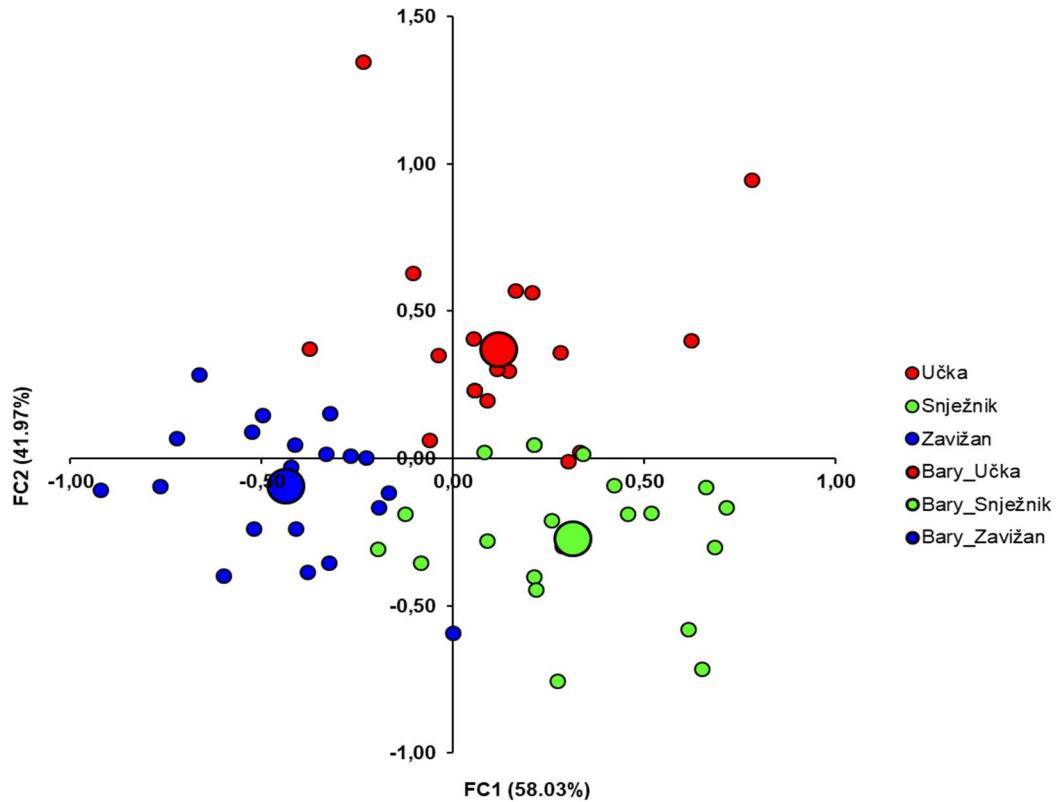
U Tablici 25 prikazana je analiza molekularne varijance između i unutar populacija. AMOVA potvrđuje postojanje diferencijacije između populacija jer je  $f_{ST}$  visoko statistički značajan ( $P < 0,0001$ ). Međutim, daleko najveći dio ukupne varijabilnosti (97,52 %) otpada na unutarpopulacijske razlike.

**Tablica 25.** Analiza molekularne varijance (AMOVA). ns – nije statistički značajno; \* –  $0,01 < p < 0,05$ ; \*\* –  $0,001 < p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Izvor varijabilnosti	ss	Sastavnice varijance	% Ukupne varijabilnosti	$f_{ST}$	$P$
Između populacija	2	0,035	2,48	0,025	$< 0,0001$
Unutar populacija	117	1,360	97,52		

### 4.2.3.3. Faktorijalna korespondentna analiza (FCA)

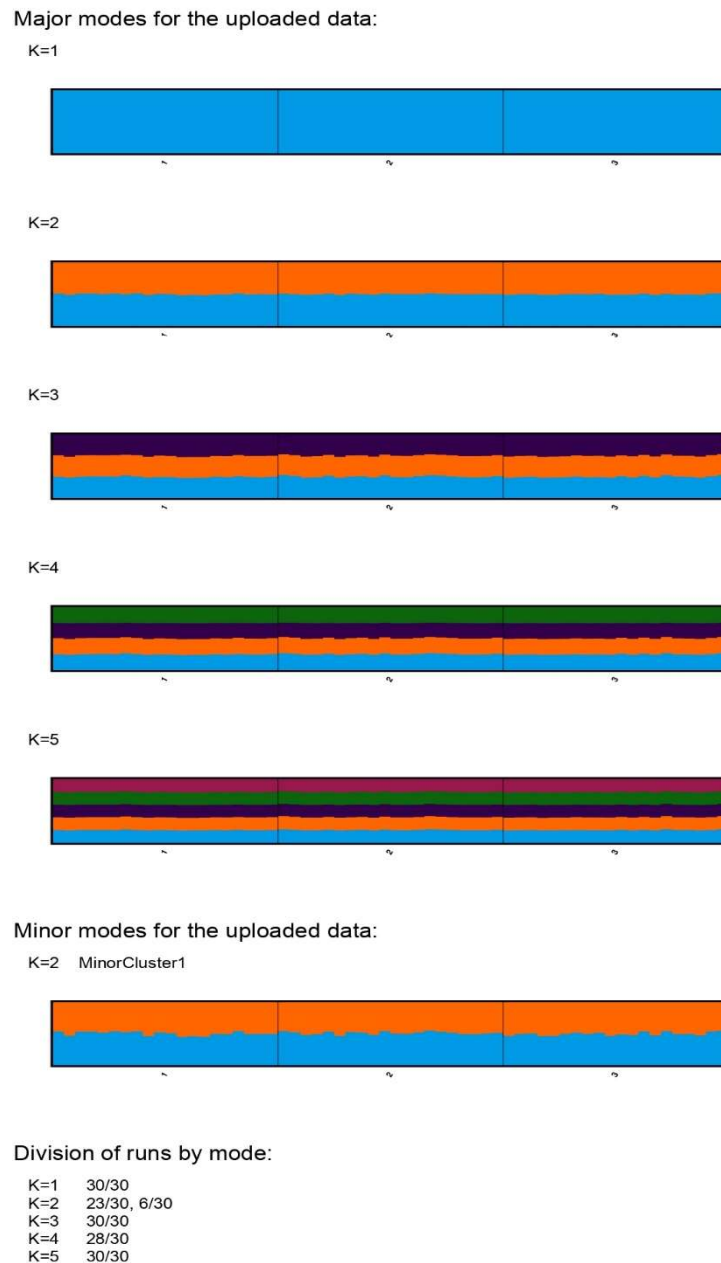
Na Slici 9 prikazan je grafikon FCA analize na kojem se vidi izdvajanje populacija Učka, Snježnik i Zavižan u zasebne skupine, s jasno odijeljenim baricentrima.



Slika 9. Grafikon faktorijalne korespondentne analize (FCA).

#### 4.2.3.4. Genetska struktura (STRUCTURE)

Za razliku od ostalih metoda diferencijacije, programom Structure nije pronađena nikakva razlika u genetskoj strukturi između analiziranih populacija, niti u jednoj verziji analize. Na Slici 10 prikazani su rezultati programa CLUMPAK za odabrane K vrijednosti. Iz slike se vidi da pri nijednoj K vrijednosti nije detektirana genetska struktura u analiziranih populacija planinskog bora.



Slika 10. Prikaz genetske strukture triju populacija planinskog bora za K 1-5.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Morfološka analiza

Provedenim istraživanjem utvrđena je umjerena varijabilnost u većine morfoloških značajki iglica i češera planinskog bora, dok je u nekih anatomskih značajki iglica varijabilnost bila vrlo niska. Najvarijabilnije značajke bile su dužina rukavca (NSL) i broj smolnih kanala u iglici (NRC), a potom i debljina epiderme (ET), dužina iglica (NL) i dužina češera (CL), dok su najmanje varijabilne značajke bile debljina iglice (NT), broj štitića (AN) i širina iglice (NW). Sličnu raspodjelu varijabilnosti za usporedive značajke iglica planinskog bora dobili su i Boratyńska i Pashkevich (2001) i Boratyńska (2002). Naime, u njihovim radovima broj smolnih kanala u iglici i dužina iglice bile su među najvarijabilnijim značajkama, dok su debljina i širina iglice bile najmanje varijabilne značajke. Dužina iglice se i u drugih vrsta borova pokazala kao visoko varijabilna značajka (Urbaniak i dr. 2003; Androsiuk i dr. 2011; Poljak i dr. 2020). Varijabilnost morfoloških značajki češera bila je slična onoj u običnog bora (Poljak i dr. 2020).

Populacije planinskog bora obuhvaćene ovim istraživanjem imale su u prosjeku 3,6 cm dugačke i 1,2 mm široke iglice. Dužina iglica kretala se u rasponu od 1,8 do 6 cm, što je u skladu s rasponima navedenim u botaničkoj literaturi (Herman 1971; Šilić 2005; Idžojtić 2009). S druge strane, širina iglica nešto je manja u odnosu na raspon od 1,5 do 2 mm naveden od Šilića (2005) i Idžojtić (2009). Prosječna dužina i širina češera populacija planinskog bora u ovom istraživanju bile su 3,1 i 1,9 cm, a kretale su se u rasponima od 1,3 do 5,1 cm, odnosno 0,5 do 2,7 cm. Donje granice navedenih raspona negativno odstupaju od do sada navedenih podataka u literaturi (Herman 1971; Šilić 2005; Idžojtić 2013).

U usporedbi s ostalim europskim populacijama planinskog bora, hrvatske populacije imale su nešto kraće iglice od onih u ukrajinskim Karpatima (Boratyńska i Pashkevich 2001), Tatrama (Boratyńska 2002) te Alpama, Karpatima i južnom Balkanu (Boratyńska i dr. 2015), gdje su iglice prosječno bile 1,5, 0,8, odnosno 1 cm duže. Isti trend prisutan je i u nekih anatomskih značajki iglica. Naime, debljina i širina iglica također su bile manje u hrvatskim populacijama u odnosu na gore navedene, no najbližnje su bile onim ukrajinskim (Boratyńska i Pashkevich 2001). S druge strane, vrijednosti dobivene u ovom istraživanju za razmak između provodnih žila, kao i debljinu epiderme, bile su veće u odnosu na gore navedene populacije, pogotovo na ukrajinske, gdje su razmak između provodnih žila i debljina epiderme bili dvostruko manji. Broj smolnih kanala u iglici bio je sličan (Boratyńska 2002; Boratyńska i dr. 2015), odnosno nešto manji u odnosu na prethodna istraživanja (Boratyńska i Pashkevich 2001). Češeri su dimenzijama, ali i brojem štitića bili gotovo identični onima iz populacija sa Sudetskog gorja (Sobierajska i dr. 2010).

Istraživanjem su utvrđene i statistički značajne pozitivne korelacije između 20 parova značajki iglica i češera. Najviše značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu češera, širinu iglica, dužinu iglica, širinu češera i za razmak između žila u iglici. Najmanje značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu rukavca, koji je bio u statistički značajnoj korelaciji samo s dužinom iglica, što je ranije potvrđeno i za obični bor (Poljak i dr. 2020). Zabilježena je samo jedna

značajna korelacija između morfoloških značajki iglica i češera, ona između dužine iglice i dužine češera. Koreliranost između te dvije značajke nije potvrđena u običnog bora (Jasińska i dr. 2014; Poljak i dr. 2020).

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike na unutarpopulacijskoj razini za sve mjerene značajke, dok su na međupopulacijskoj razini značajne razlike utvrđene za samo pet značajki (NL, AW, AN, ET, NRC). Za većinu istraživanih značajki utvrđeno je da je unutarpopulacijska varijabilnost veća od međupopulacijske varijabilnosti, a do sličnih rezultata dolaze i drugi autori koji istražuju morfološku varijabilnost primorskoga bora (Wahid i dr. 2006), munjike (Ballian i dr. 2005) i običnoga bora (Jasińska i dr. 2014; Poljak i dr. 2020).

Na temelju diskriminantne analize utvrđeno je da od značajki iglica debljina epiderme (ET) najbolje razlikuje istraživane populacije, dok od značajki češera to najbolje čini širina štitića (AW). Ostale značajke koje razlikuju populacije su broj smolnih kanala u iglici (NRC), razmak između žila u iglici (DVB), debljina iglica (NT), dužina štitića (AL), broj štitića (AN) i širina češera (CW). Diskriminantna analiza morfoloških značajki iglica razdvojila je populaciju Učka s jedne strane, a populaciju Zavižan s druge strane. Populacija Učka imala je najduže i najtanje iglice, s najtanjom epidermom i najmanjim bojem smolnih kanala, dok je populacija Zavižan imala najkraće i najšire iglice s najdebljom epidermom i najvećim brojem smolnih kanala. Razlog tomu vjerojatno leži u nadmorskoj visini, koja je na Zavižanu skoro 300 m viša. Naime, ranije je potvrđeno da je dužina iglica u borova u negativnoj, a širina iglica u pozitivnoj korelaciji s nadmorskom visinom (Tiwari i dr. 2013; Ergül Bozkurt i dr. 2021). Poznato je da mnogi faktori utječu na dužinu iglica, a mnogi od njih ovise upravo o nadmorskoj visini, poput trajanja vegetacijskog razdoblja, dostupnosti vode, temperature i UV zračenja (Popović i dr. 2022). Nadalje, deblja epiderma u populacijama na višim nadmorskim visinama može također biti rezultat prilagodbe hladnijim uvjetima, kroz mehanizme optimizacije transpiracije i čuvanja topline (Liu i dr. 2021). S druge strane, prema morfološkim značajkama češera nije postojala jasna strukturiranost populacija. Ipak, iz diskriminantne analize koja se temeljila na morfološkim značajkama češera, duž prve diskriminacijske osi nazirao se trend razdvajanja grmova iz populacija Zavižan i Snježnik, dok se duž druge osi nazirao trend razdvajanja grmova populacije Učke od grmova populacija Zavižan i Snježnik. Isti trend grupiranja jedinki po populacijama, u ovom istraživanju, dobiven je i molekularnim metodama. Općenito gledano, generativni dijelovi su dominantno uvjetovani genetikom te su pod vrlo slabim utjecajem okoliša, zbog čega su obično manje varijabilni (Xu i dr. 2016).

## 5.2. Molekularna analiza

U ovom istraživanju, premda su u konačnici korišteni podaci za samo pet molekularnih biljega, dobiveni rezultati dosta su podudarni s dosadašnjim istraživanjima vrste *Pinus mugo*. Najveća genetska raznolikost ( $H_E$  0,581) nađena je u populaciji Zavižan. Slijedila ju je populacija Snježnik ( $H_E$  0,550), a najniža je raznolikost prisutna u populaciji Učka ( $H_E$  0,499). U populaciji Učka također je ustanovljeno značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, te višak homozigota. Takav rezultat podudaran je sa stanjem na terenu, jer je populacija Učka znatno manja od druge dvije populacije i time potencijalno smanjene efektivne veličine populacije, što s vremenom može rezultirati značajnim povećanjem koeficijenta inbridinga.

Dosadašnja istraživanja vrste *Pinus mugo* većinom su koristila kloroplastne biljege i postoji tek nekoliko istraživanja genetske raznolikosti i strukture populacija pomoću jezgrinih mikrosatelitskih biljega. Jedno od tih istraživanja proveli su Żukowska i Wachowiak (2017), analizirajući 21 prirodnu populaciju pomoću 13 jezgrinih mikrosatelitskih biljega. Genetska raznolikost tj. očekivana heterozigotnost ( $H_E$ ) u tom je istraživanju varirala u rasponu 0,35 do 0,53 (prosječna 0,44). U ovom istraživanju dobivene su slične, prosječno nešto više vrijednosti ( $H_E$  0,54), što je povezano i sa izborom biljega, jer autori su koristili veći raspon biljega, od kojih su neki slabije polimorfni. Premda u tom istraživanju autori nisu uzorkovali hrvatske populacije, prisutne su populacije iz Slovenije i BiH, koje su se, između ostalih uzorkovanih populacija, odlikovale najvišim ili vrlo visokim vrijednostima genetske raznolikosti ( $H_E$  0,53, odnosno  $H_E$  0,49). Vrijednosti dobivene ovim istraživanjem uklapaju se u točno te vrijednosti. Kao i često u istraživanjima genetske raznolikosti, i u populacijama planinskog bora primjećuje se povećana raznolikost na području Slovenije, Hrvatske i BiH zbog geografskog položaja na raskrižju više rekolonizacijskih puteva.

Vrlo slične vrijednosti ( $H_E$  0,53) dobivene su i u istraživanju 12 čeških populacija (Komárková i dr. 2024) pomoću 12 jezgrinih mikrosatelitskih biljega. U tom je istraživanju dobiveno ukupno 146 alela za 12 biljega i 12 populacija, dok je u ovom istraživanju dobiveno 35 alela za pet biljega i tri populacije.

Uspoređujući rezultate ovog istraživanja s primjenom istih biljega na šest populacija običnog bora (*P. sylvestris*) (Vuković 2023) i na klonsku sjemensku plantažu crnog bora (*P. nigra* J.F.Arnold) (Stipetić 2024), vidimo da je u planinskog bora prosječna raznolikost nešto niža, nego u običnog bora ( $H_E$  0,603) ili crnog bora ( $H_E$  0,646). Djelomično je to rezultat prisustva nekih polimorfnijih biljega u analizama crnog i običnog bora, koji se nisu uspješno amplificirali u planinskog bora, ali i za neke zajedničke biljege (PtTX3013) znatno je veći PIC za obični (0,534) i crni bor (0,700), nego za planinski (0,260). Jedino je u biljega Ctg4363 veći PIC za planinski bor (0,875) u usporedbi s običnim (0,710). Uspoređujući prirodne populacije planinskog bora s populacijama običnog bora (Vuković 2023), primjećuje se značajnija diferencijacija, premda su  $F_{st}$  vrijednosti slične (0,026 planinski bor; 0,022 obični bor). Među populacijama običnog bora nije bilo statistički značajnih  $F_{st}$  vrijednosti između šest analiziranih populacija, niti statistički značajnih razlika po analizi molekularne varijance (AMOVA), dok su se populacije planinskog bora statistički značajno razlikovale i po  $F_{st}$  vrijednostima i po rezultatima AMOVA-e. Razlika je najuočljivija kad se promatraju rezultati faktorijalne korespondentne analize (FCA), gdje su se populacije planinskog bora jasno razgraničile u



zasebne skupine s odvojenim baricentrima, a u običnog bora FCA nije razdvojila populacije. Ovi se rezultati podudaraju s rezultatima istraživanja Sannikov i dr. (2011) koji su također u svom radu dokazali kako su različite skupine vrste *Pinus sylvestris* manje diferencirane u odnosu na populacije vrste *Pinus mugo*. Općenito obični bor ima puno raširenije populacije i zauzima znatno širu ekološku nišu od planinskog bora, pa takav rezultat nije neočekivan. Međutim, u istraživanju hrvatskih populacija STRUCTURE nije ustanovio postojanje značajne genetske strukture, niti u populacija planinskog, niti u običnog bora.

Kao što je spomenuto, tri su metode ( $F_{st}$ , AMOVA i FCA) ustanovile postojanje značajne genetske diferencijacije između tri analizirane populacije, ali STRUCTURE nije pokazao postojanje jasne genetske strukture. U prilog tome ide i činjenica da daleko najveći udio varijabilnosti (97,52 %) otpada na varijabilnost unutar populacija, kao i rezultati drugih istraživanja koji također spominju nepostojanje jasno definirane genetske strukture populacija planinskog bora. Żukowska i Wachowiak (2017) na temelju najvećeg dosadašnjeg istraživanja prirodnih populacija to pripisuju pretpostavci da postoji velika vjerojatnost da sadašnje populacije planinskog bora potječu iz šire distribucije vrste, te da su bile izolirane nedovoljno dugo da nastane izražena genetska diferencijacija među njima. Kao što je vidljivo na Slici 3, hrvatske populacije planinskog bora spadaju u izolirane populacije i ne pripadaju većim kompleksima ove vrste, pa se u tom smislu može očekivati njihova daljnja diferencijacija zbog specifičnog staništa i smanjenog potencijalnog protoka gena između populacija.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu analizirana je morfološka varijabilnost iglica i češera te genetska raznolikost na temelju jezgrinih mikrosatelitskih biljega triju populacija planinskog bora u Hrvatskoj. Iz provedenog istraživanja donosimo sljedeće zaključke:

Iglice planinskog bora u Hrvatskoj prosječno su dugačke 36,3 mm, s prosječnom dužinom rukavca od 4 mm, debljinom od 745  $\mu\text{m}$  (0,7 mm) i širinom od 1207,8  $\mu\text{m}$  (1,2 mm). Razmak između žila u iglici iznosio je prosječno 186,8  $\mu\text{m}$  (0,2 mm), a debljina epiderme 41,6  $\mu\text{m}$ . U iglicama istraživanih populacija prosječno se nalaze četiri smolna kanala.

Češeri hrvatskih populacija planinskog bora prosječno su dugački 30,9 mm, a široki 19,3 mm. Svaki češer u prosjeku sadrži oko 87 štitića, koji su prosječno 4,9 mm dugački i 7,3 mm široki.

Najvarijabilnije značajke u ovom istraživanju bile su dužina rukavca iglice (CV = 33,98 %) i broj smolnih kanala u iglici (CV = 26,75 %), a najmanje varijabilne značajke bile su debljina iglica (CV = 8,71 %), broj štitića (CV = 9,24 %) i širina iglica (CV = 9,38 %).

Između 66 parova morfoloških značajki iglica i češera utvrđeno je ukupno 20 statistički značajnih pozitivnih korelacija. Najviše značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu češera (NL, CW, AL, AW, AN) i širinu iglice (NL, NT, DVB, ET, NRC), zatim za dužinu iglica (NSL, CL, NT, NW), širinu češera (CL, AL, AW, AN) i za razmak između žila u iglici (NT, NW, ET, NRC). Najmanje značajnih korelacija utvrđeno je za dužinu rukavca, samo jedna (NL).

Analizom varijance je utvrđeno da se na istraživanom području grmovi planinskog bora statistički značajno razlikuju unutra populacija za sve mjerene anatomske i morfološke značajke iglica i češera. Statistički značajne razlike između populacija utvrđene su za svega pet značajki (NL, AW, AN, ET, NRC). Unutarpopulacijska varijabilnost bila je veća od međupopulacijske varijabilnosti.

Multivarijatnim statističkim metodama utvrđeno je da se populacije planinskog bora u Hrvatskoj mogu puno bolje razlikovati na osnovi anatomske-morfoloških značajki iglica u odnosu na morfološke značajke češera.

Na temelju diskriminantne analize utvrđeno je da debljina epiderme iglica (ET) i širina štitića češera (AW) najbolje razlikuju istraživane populacije. Populacija Učka imala je najduže i najtanje iglice, dok je populacija Zavižan imala najkraće i najšire iglice. Ove razlike vjerojatno su povezane s nadmorskom visinom, koja utječe na morfološke značajke iglica. Deblja epiderma u populacijama na višim nadmorskim visinama može biti rezultat prilagodbe hladnijim uvjetima.

Molekularnom analizom na temelju pet uspješno amplificiranih mikrosatelitskih biljega ustanovljena je prosječna genetska raznolikost (očekivana heterozigotnost  $H_E$ ) 0,54. Najvišu  $H_E$  imala je populacija Zavižan (0,681). Slijedila je populacija Snježnik sa 0,550 i populacija Učka sa 0,499.

U populacijama Snježnik i Zavižan utvrđen je lagani višak heterozigota, ali nije bilo odstupanja od Hardy-Weinberove ravnoteže, U populaciji Učka koeficijent inbridinga  $F_{IS}$  bio je statistički značajan i pokazivao lagani višak homozigota, što može biti povezano s veličinom populacije, jer populacija Učka sadrži najmanje jedinki.

Najinformativniji su bili biljezi PtTX3020 sa PIC 0,875, te biljeg Ctg4363 sa PIC 0,720.

Populacije su se značajno diferencirale pomoću tri metode;  $F_{st}$ , analizom molekularne varijance (AMOVA), te pomoću faktorijalne korespondentne analize (FCA), koja ih je razvrstala u tri jasno odijeljena klustera. Pomoću programa STRUCTURE nije nađena jasna genetska struktura populacija.

Morfološka analiza češera i genetska analiza pomoću mikrosatelitnih biljega pokazale su vrlo sličan trend grupiranja jedinki po populacijama. Drugim riječima, utvrđena je povezanost između morfoloških značajki češera i genetičkih udaljenosti između istraživanih populacija.

Informacije o morfološkim karakteristikama i genetičkoj raznolikosti pomoći će nam razumjeti biološke i ekološke karakteristike ove vrste te mehanizme kojima će se ona boriti sa sve izraženijim klimatskim promjenama. Osim toga, rezultati ovog istraživanja mogu nam poslužiti kao temelj za buduća istraživanja i programe očuvanja ove vrijedne, ali gubitkom staništa sve ugroženije planinske vrste.

## 7. LITERATURA

- Alexandrov, A., von Wühlisch, G. Vendramin, G., 2019: EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for mountain pine (*Pinus mugo*). European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN), European Forest Institute. 6 str.
- Androsiuk, P., Kaczmarek, Z., Urbaniak, L., 2011: The morphological traits of needles as markers of geographical differentiation in European *Pinus sylvestris* populations. *Dendrobiology*, 65: 3–6.
- Ballian, D., Škvorc, Ž., Franjić, J., Kajba, D., Bogdan, S., Bogunić, F., 2005: Procjena nekih morfoloških značajki munjike (*Pinus heldreichii* Christ.) u dijelu areala. *Šumarski List*, 29 (9-10): 475–480.
- Boratyńska, K., Bobowicz, M. A., 2001: *Pinus uncinata* Ramond taxonomy based on needle characters. *Plant Systematics and Evolution*, 227: 183–194.
- Boratyńska, K., Boratyński, A., Lewandowski, A., 2003: Morphology of *Pinus uliginosa* (*Pinaceae*) needles from populations exposed to and isolated from direct influence of *Pinus mugo*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 142: 83–91.
- Boratyńska, K., Muchewicz, E., Drojma, M., 2004: *Pinus mugo* geographic differentiation based on needle characters. *Dendrobiology*, 51: 9–17.
- Boratyńska, K., Pashkevich, N. A., 2001: Variability in needle traits of *Pinus mugo* Turra in the Ukrainian Carpathians. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70: 181–186.
- Boratyńska, K., 2002: Needle variability of *Pinus mugo* Turra in the west Tatra Mts. *Dendrobiology*, 48: 3–8.
- Boratyńska, K., Jasińska, A. K., Boratyński, A., 2015: Taxonomic and geographic differentiation of *Pinus mugo* complex on the needle characteristics. *Systematics and Biodiversity*, 13: 581–595.
- Boratyńska, K., Marcysiak, K., Boratyński, A., 2005: *Pinus mugo* (*Pinaceae*) in the Abruzzi Mountains: high morphological variation in isolated populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147: 309–316.
- Businský, R., 1999: Taxonomic assay in the *Pinus mugo* complex and its hybrid populations [Taxonomická studie agregátu *Pinus mugo* a jeho hybridních populací]. *Acta Prùhoniciana*, 68: 123–143.
- Cattell, R. B., 1966: The scree test for the number of factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1 (2): 245–276.
- Caudullo, G., Welk, E., San-Miguel-Ayanz, J., 2017: Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief*, 12: 662–666.
- Christensen, K. I., Dar, G. H., 1997: A morphometric analysis of spontaneous and artificial hybrids of *Pinus mugo* × *sylvestris* (*Pinaceae*). *Nordic Journal of Botany*, 17: 77–86.
- Christensen, K. I., 1987a: A morphometric study of the *Pinus mugo* Turra complex and its natural hybridization with *P. sylvestris* L. (*Pinaceae*). *Feddes Repertorium*, 98: 623–635.
- Christensen, K. I., 1987b: Taxonomic revision of the *Pinus mugo* complex and *P. × rhaetica* (*P. mugo* × *sylvestris*) (*Pinaceae*). *Nordic Journal of Botany*, 7: 383–408.
- Chybicki, I. J., Burczyk, J. 2009: Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100: 106–113.

- Cornuet, J.M., Luikart, G. 1996: Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 1119–1127.
- Dzialuk, A., Boratyński, A., Boratyńska, K., Burczyk, J., 2012: Geographic patterns of genetic diversity of *Pinus mugo* (*Pinaceae*) in Central European mountains. *Dendrobiology*, 68: 31–41.
- Earl, D. A., VonHoldt, B. M., 2012: STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2): 359–361.
- Ergül Bozkurt, A., Coskuncelebi, K., Terzioglu, S., 2021: Population variability of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Turkiye according to the needle morphology. *Šumarski list*, 145 (7-8): 347–353.
- Euforgen (2021) European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN). Available at <http://www.euforgen.org/>
- Excoffier, L., Lischer, H. E., 2010: Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10 (3): 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J., 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2): 479–491.
- Farjon, A., 1984: Pines: Drawings and Descriptions of the Genus *Pinus*. E.J. Brill and W. Backhuys, Leiden.
- Filppula, S., Szmidt, A. E., Savolainen, O., 1992: Genetic comparison between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* using isozymes and chloroplast DNA. *Nordic Journal of Botany*, 12: 381–386.
- Ganea, S., Ranade, S. S., Hall, D., Abrahamsson, S., García-Gil, M. R., 2015: Development and transferability of two multiplexes nSSR in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Journal of Forestry Research*, 26: 361–368.
- Garza, J., Williamson, E. 2001: Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305–318.
- GeneMapper® Software 5, 2012: Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts.
- Gernandt, D. S., López, G. G., García, S. O., Liston, A., 2005: Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54: 29–42.
- Goudet, J., 1995: FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86 (6): 485–486.
- Herman, J., 1971: Šumarska dendrologija. Stanbiro, Zagreb, Hrvatska, 470 str.
- Heuertz, M., Teufel, J., González-Martínez, S. C., Soto, A., Fady, B., Alía, R., Vendramin, G. G., 2010: Geography determines genetic relationships between species of mountain pine (*Pinus mugo* complex) in western Europe. *Journal of Biogeography*, 37: 541–556.
- Idžojtić, M., 2009: Dendrologija – List. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 903 str.
- Idžojtić, M., 2013: Dendrologija – Cvijet, češer, plod, sjeme. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 671 str.

- Jasińska, A. K., Boratyńska, K., Dering, M., Sobierajska, K. I., Ok, T., Romo, A., Boratyński, A., 2014: Distance between south-European and south-west Asiatic refugial areas involved morphological differentiation: *Pinus sylvestris* case study. *Plant Systematics and Evolution*, 300: 1487–1502.
- Kalinowski, S. T., 2005: HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, 5: 187–189.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C., 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
- Katičić Bogdan, I., 2012: Genetska raznolikost hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u klonskim sjemenskim plantažama u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Klimatski Atlas Hrvatske, 1961-1990, 1971-2000, 2008: DHMZ. Dostupno na [https://meteo.hr/proizvodi.php?section=publikacije&param=publikacije\\_publicacije\\_dhmz&el=atlas](https://meteo.hr/proizvodi.php?section=publikacije&param=publikacije_publicacije_dhmz&el=atlas).
- Komárková, M., Čáp, J., Trčková, O., Dostál, J., Máchová, P., 2024: Comparison of population genetic structure of *Pinus mugo* Turra forest stands in the Giant Mountains by analysis of nSSR molecular marker data. *Forestry: An International Journal of Forest Research: cpa042*.
- 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. *Molecular Ecology Resources*, 15 (5): 1179–1191.
- Korbar, T., 2009: Orogenic evolution of the external dinarides in the ne adriatic region: a model constrained by tectonostratigraphy of upper cretaceous to paleogene carbonates. *Earth-Science Reviews*, 96 (4): 296–312.
- Lauranson-Broyer, J., Krzakowa, M., Lebreton, P., 1997: Reconnaissance chimiosystematique du pin de tourbiere *Pinus uliginosa* (Neumann). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Serie III, Sciences de la Vie*, 320: 557–565.
- Lewandowski, A., Boratyński, A., Mejnartowicz, L., 2000: Allozyme investigations on the genetic differentiation between closely related pines – *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata* and *P. uliginosa* (*Pinaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 221: 15–24.
- Lewandowski, A., Samoćko, J., Boratyńska, K., Boratyński, A., 2002: Genetic differences between two Polish populations of *Pinus uliginosa*, compared to *P. sylvestris* and *P. mugo*. *Dendrobiology*, 48: 51–57.
- Liu, X., Chen, H., Sun, T., Li, D., Wang, X., Mo, W., Wang, R., Zhang, S., 2021: Variation in woody leaf anatomical traits along the altitudinal gradient in Taibai Mountain, China. *Global Ecology and Conservation*, 26: e01523.
- Marcysiak, K., 2004: Interpopulational variability of *Pinus uncinata* (*Pinaceae*) on the basis of cone features. *Dendrobiology*, 51: 43–51.
- McGarigal, K., Cushman, S., Stafford, S., 2000: *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*, Springer Verlag, New York, 283 str.
- Mirov, N. T., 1967: *The genus Pinus*. The Ronald Press Company, New York.

- Neet-Sarqueda, C., Plumettaz Clor, A. C., Becholey, I., 1988: Mise en evidence de l'hybridation introgressive entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* DC. en Valais (Suisse) par deux methods multivariées. *Botanica Helvetica*, 98: 161–169.
- Neet-Sarqueda, C., 1994: Genetic differentiation of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* aggr. populations in Switzerland. *Silvae Genetica*, 43: 207–215.
- Odrzykoski, I. J., 2002: Investigations on the genetic variation of *Pinus mugo* using biochemical and molecular markers [Badania nad zmienno ci genetyczn kosodrzewiny (*Pinus mugo*) z wykorzystaniem markerów biochemicznych i molekularnych. University of Adam Mickiewicz, Poznanj, 1–129.
- Poljak, I., 2014: Morfološka i genetska raznolikost populacija i kemijski sastav plodova europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Poljak, I., Vukelić, J., Vidaković, A., Vuković, M., Idžojtić, M., 2020: Varijabilnost populacija običnoga bora (*Pinus sylvestris* L.) na području sjeverozapadnoga dijela Male Kapele prema morfološkim obilježjima iglica i češera. *Šumarski list*, 144 (11-12): 539–549.
- Popović, V., Nikolić, B., Lučić, A., Rakonjac, Lj., Šešlija Jovanović, D., Miljković, D., 2022: Morpho-anatomical trait variability of the Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) needles in natural populations along elevational diversity gradient. *Trees*, 36: 1131–1147.
- Price, R. A., Liston, A., Strauss, S. H., 1998: Phytogeny and systematics of *Pinus*. U: Richardson, D. M. (Ed): *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 49–68.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945–959.
- Raymond, M. and Rousset, F., 1995: GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- Sannikov, S. N., Petrova, I. V., Schweingruber, F., Egorov, E. V., Parpan, T. V., 2011: Genetic differentiation of *Pinus mugo* Turra and *P. sylvestris* L. populations in the Ukrainian Carpathians and the Swiss Alps. *Russian Journal of Ecology*, 42: 270–276.
- Siedlewska, A., Prus-Głowacki, W., 1995: Genetic structure and taxonomic position of *Pinus uliginosa* Neumann population from Wielkie Torfowisko Batorowskie in Stołowe Mts. (locus classicus). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64: 1–8.
- Sobierajska, K., Boratyńska, K., Marcysiak, K., 2010: Variation of cone characters in *Pinus mugo* (*Pinaceae*) populations in the Giant Mountains (Karkonosze, Sudetes). *Dendrobiology*, 63: 33–41.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1989: *Biometry*, Freeman and CO, San Francisco.
- Sokołowska, J., Fuchs, H., Celiński, K., 2021: New insight into taxonomy of european mountain pines, *Pinus mugo* complex, based on complete chloroplast genomes sequencing. *Plants*, 10: 1331.
- StatSoft, Inc. 2001: STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
- Stipetić, R. 2023: Genetska raznolikost u klonskoj sjemenskoj plantaži crnog bora (*Pinus nigra* J.F. Arnold) procijenjena morfometrijskim i molekularnim metodama, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije.
- Šilić, Č., 2005: Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine. Matica Hrvatska Čitluk, Franjevačka kuća Masna Luka, Široki Brijeg, BiH, 578 str.

- Tiwari, S. P., Kumar, P., Yadav, D., Chauhan, D. K., 2013: Comparative morphological, epidermal, and anatomical studies of *Pinus roxburghii* needles at different altitudes in the North-West Indian Himalayas. *Turkish Journal of Botany*, 37: 65–73.
- Urbaniak, L., Karliński, L., Popielarz, R., 2003: Variation of morphological needle characters of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in different habitats. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72: 37–44.
- Vidaković, M., 1993: Četinjače - morfologija i varijabilnost. Grafički zavod Hrvatske & Hrvatske šume, Zagreb, 744 str.
- Vidaković, M., Franjić, J., 2004: Golosjemenjače, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 824 str.
- Vukelić, J., 2012: Šumska vegetacija Hrvatske, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb, 403 str.
- Vuković, M., 2022: Genetička i morfološka raznolikost populacija običnoga bora (*Pinus sylvestris* L.) u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije.
- Wachowiak, W., 2003: Hybridization processes in the sympatric populations of *Pinus sylvestris* and the *P. mugo* complex examined with DNA markers [Procesy hybrydyzacji w sympatrycznych populacjach *Pinus sylvestris* i *P. Mugo* complex badane markerami DNA]. PhD thesis. Genetics Laboratory of Adam Mickiewicz University, Poznań, 1–124.
- Wahid, N., González-Martínez, S. C., El Hadrami, I., Boulli, A., 2006: Variation of morphological traits in natural populations of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Morocco. *Annals of Forest Science*, 63: 83–91.
- Van Oosterhout, W.F., Hutchinson, D. P. M., Shipley W. P., 2004: MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538.
- WFO 2024: The World Flora Online, <https://www.worldfloraonline.org/> (Pristupljeno 10.09.2024.)
- WinFolia TM, 2005: Regent Instruments Inc., Quebec, Canada, version PRO 2005b.
- Xu, Y., Woeste, K., Cai, N., Kang, X., Li, G., Chne, S., Duan, A., 2016: Variation in needle and cone traits in natural populations of *Pinus yunnanensis*. *Journal of Forestry Research*, 27: 41–49.
- Žukowska, W. B., Wachowiak, W., 2017: Nuclear microsatellite markers reveal the low genetic structure of *Pinus mugo* Turra (dwarf mountain pine) populations in Europe. *Plant Systematics and Evolution*, 303: 641–651.