

# Genetička, morfološka i kemijska karakterizacija hrvatskih kultivara europskoga pitomoga kestena (Castanea sativa Mill.)

---

Tumpa, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:942028>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Fakultet šumarstva i drvne tehnologije

Katarina Tumpa

**GENETIČKA, MORFOLOŠKA I KEMIJSKA  
KARAKTERIZACIJA HRVATSKIH  
KULTIVARA EUROPSKOGA PITOMOGA  
KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Fakultet šumarstva i drvne tehnologije

Katarina Tumpa

**GENETIČKA, MORFOLOŠKA I KEMIJSKA  
KARAKTERIZACIJA HRVATSKIH  
KULTIVARA EUROPSKOGA PITOMOGA  
KESTENA (*CASTANEA SATIVA* MILL.)**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

doc. dr. sc. Igor Poljak  
izv. prof. dr. sc. Vibor Roje

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Forestry and Wood Technology

Katarina Tumpa

**GENETIC, MORPHOLOGICAL AND  
CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE  
CROATIAN CULTIVARS OF SWEET  
CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA* MILL.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assistant Professor Igor Poljak, PhD

Associate Professor Vibor Roje, PhD

Zagreb, 2023.

## INFORMACIJE O MENTORIMA

Doktorski rad izrađen je pod dvojnim mentorstvom doc. dr. sc. Igora Poljaka, sa Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku te izv. prof. dr. sc. Vibora Roje, sa Zavoda za ekologiju i uzgajanje šuma, na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

### DOC. DR. SC. IGOR POLJAK

Doc. dr. sc. Igor Poljak rođen je u Ogulinu 29. ožujka 1983. godine. Diplomirao je 2008. godine na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku te stekao stručni naziv diplomirani inženjer šumarstva.

Dana 2. veljače 2009. godine zapošljava se kao znanstveni novak u suradničkom zvanju asistenta u Zavodu za Šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku. 5. prosinca 2014. godine obranio je doktorski rad pod naslovom „Morfološka i genetska raznolikost populacija i kemijski sastav plodova europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj“ te stekao akademski stupanj doktora znanosti iz područja biotehničkih znanosti. U suradničko zvanje i odgovarajuće radno mjesto poslijedoktorand izabran je dana 1. siječnja 2015. godine.

Od 2009. godine kontinuirano organizira i izvodi vježbe, terensku nastavu i surađuje u nastavi u Zavodu za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku u svojstvu suradnika na predmetu Dendrologija. U znanstveno-nastavno zvanje docent iz područja biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, za predmet Dendrologija, izabran je 5. prosinca 2018. godine. Danas radi kao nastavnik na više predmeta na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije.

Uže područje znanstvenog interesa usmjereno mu je na dendrofluoru, populacijsku genetiku, morfološku i kemijsku varijabilnost populacija i konzervacijsku biologiju. Do danas, kao istraživač aktivno je sudjelovao na više od deset znanstvenih projekata te na 40 međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Doc. dr. sc. Igor Poljak, u koautorstvu ili samostalno, objavio je 45 znanstvenih i stručnih radova te tri poglavlja u znanstvenim knjigama. Prema bazi Web of Science radovi su mu citirani više od 300 puta (h-indeks: 11).

Član je Hrvatskog šumarskog društva, Istočnoalpsko-dinarskog društva za istraživanje vegetacije i Hrvatskog botaničkog društva. Od 2015. godine voditelj je Dendrološke sekcije Hrvatskog botaničkog društva, a od 2021. godine Molekularno-biološkog laboratorija Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije. Od 2022. godine član je Uredničkog odbora časopisa Šumarski list (za dendrologiju).

## IZV. PROF. DR. SC. VIBOR ROJE

Izv. prof. dr. sc. Vibor Roje rođen je u Zagrebu, gdje je pohađao te završio osnovnu i srednju školu. Titulu inženjera kemije stekao je 1998. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, dok je diplomski studij anorganske kemije završio 2004. godine. Titulu doktora znanosti u polju analitičke kemije stekao je 2008., također na Sveučilištu u Zagrebu. Svoju znanstvenu karijeru započeo je na Prirodoslovni-matematičkom fakultetu te na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Od 2010. godine, zaposlen je na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije, gdje je nositelj kolegija “Osnove kemije”, na prvoj godini preddiplomskih studija odsjeka Šumarstva. Započevši s akademskom godinom 2022./2023., također je nositelj kolegija “Okolišna kemija” te “Dokumentacija i informatologija u znanstveno-istraživačkom istraživanju”, na diplomskom studiju odsjeka Šumarstva. Također, izv. prof. dr. sc. Roje bio je voditelj Ekološko-pedološkog laboratorija Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije u razdoblju od 2012. do 2019. godine.

U svojem znanstvenom radu, usmjeren je na istraživanja u polju analitičke kemije elemenata u tragovima, u uzorcima iz okoliša (voda, tlo, biljni materijal); prvenstveno, determinaciju metala i polumetala tehnikama ICP-a, kao i metodama pripreme uzoraka korištenjem mikrovalnih sustava digestije (razaranja).

Izv. prof. dr. sc. Vibor Roje autor je i koautor 33 originalna znanstvena članka, objavljenih u različitim znanstvenim časopisima, registriranim u Web of Science. Prema podacima iste baze, ti su radovi neovisno citirani preko 700 puta (h-indeks: 16). Također, autor je ili koautor 35 konferencijskih prezentacija, od kojih je šest objavljeno u priopćenjima različitih konferencija.

## PREDGOVOR

Najljepše zahvaljujem mojim mentorima, doc. dr. sc. Igoru Poljaku te izv. prof. dr. sc. Viboru Roje na pomoći i vodstvu kroz četiri godine doktorskog istraživanja te podršci u objavljivanju znanstvenih radova i izradi ove disertacije. Veliko hvala i voditeljici projekta u okviru kojeg sam izradila svoje doktorsko istraživanje, prof. dr. sc. Marileni Idžojtić, čiji je nadzor nad cijelim projektom bio okosnica uspješno obavljenog istraživanja.

Također, zahvaljujem i bliskim suradnicima, prof. dr. sc. Zlatku Liberu, prof. dr. sc. Mirni Ćurković-Perica te doc. dr. sc. Marinu Ježiću s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, prof. dr. sc. Nadi Vahčić s Prehrambeno-tehnološkog fakulteta te prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću s Agronomskog fakulteta, na nesebičnoj pomoći s uzorcima te statističkoj obradi – prvome i posljednjem koraku rukovanja podacima. Zahvale upućujem i članovima Zavoda za ekologiju i uzgajanje šuma, prof. dr. sc. Darku Bakšiću, izv. prof. dr. sc. Damiru Drvodeliću, prof. dr. sc. Nikoli Pernaru te izv. prof. dr. sc. Ivanu Perkoviću, čija je pomoć i podrška u pedološkim i rasadničkim istraživanjima bila neizostavna.

Velika hvala svim tehničarima i nastavnome osoblju koje je sudjelovalo u ovome istraživanju, posebice zaposlenicima Šumskog vrta na NPŠO Zagreb, tehničkim suradnicama Dujak i Škaper, suradnicima Močibobu, Kušiću, Juriću te voditelju Šumskog Vrta, Tomislavu Šelendiću. Najljepše zahvaljujem i tehničarkama s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Renati Petrović, ing., te Valentini Hohnjec, na stručnoj, ali i životnoj podršci i prijateljstvu. Hvala i tehničarki Brigiti Lacković iz Ekološko-pedološkog laboratorija, koja je teško razdoblje života učinila lakšim.

Hvala i svim studentima i kolegama koji su pomagali u prikupljanju, čišćenju i obradi plodova kestena, posebice kolegicama Magdaleni Brener, mag. ing. silv. te Ivani Zegnal, mag. ing. silv. Najdublje zahvale kolegi Antoniju Vidakoviću, mag. ing. silv., koji je bio nezamjenjiv suradnik u svakoj fazi izrade ove disertacije, kao i pravi prijatelj tijekom doktorskog studija. Svim svojim kolegama iskreno želim svako dobro u provedbi njihovih istraživanja i izradi disertacija.

Najljepše zahvaljujem svim uzgajivačima maruna na području Lovrana i Cresa na donaciji plodova u svrhu istraživanja. Veliko hvala gospodinu Adrianu Grževiću, čijim je zalaganjem dobar odnos s uzgajivačima i ostvaren, kao i gospodinu Milovanu Žiganteu te svim djelatnicima PP Učka, na nesebičnoj pomoći u organizaciji i izvođenju terenskih istraživanja.

Hvala i svim kolegama sa Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku, posebice gospođama Spomenki Ratkajec i Renati Matković, na prijateljstvu, podršci i stvaranju osjećaja doma izvan doma.

Naposlijetku, najdublje zahvale upućujem svojoj obitelji i prijateljima, čija je podrška bila daleko najbitnija i najpotrebnija. Hvala im na strpljenju, kojega je ponekad doista trebalo, te na razumijevanju tijekom svih godina istraživanja.

Beskrajna hvala i mojem Filipu, mojoj stijeni i sigurnoj luci – nisi napisao niti jednu riječ ove disertacije, ali si ipak utkan u svako slovo.

Katarina Tumpa



*Dulcius ex asperis*

## Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Istraživana vrsta.....	1
1.2.	Kultivacija pitomog kestena.....	3
1.3.	Maruni.....	4
1.4.	Ugroženost pitomog kestena.....	6
1.5.	Protok gena između kultiviranih i divljih populacija pitomog kestena.....	7
1.6.	Genetička raznolikost maruna.....	8
1.7.	Morfološka raznolikost maruna.....	13
1.8.	Multielementni sastav jestivog dijela ploda maruna.....	17
1.9.	Pitomi kesten i marun u Hrvatskoj.....	19
2.	Ciljevi i hipoteze istraživanja.....	21
3.	Materijali i metode.....	22
3.1.	Područje istraživanja.....	22
3.2.	Materijal i metode za genetičku analizu.....	25
3.2.1.	Materijal.....	25
3.2.2.	Izolacija ukupne stanične DNA.....	25
3.2.3.	Mjerenje koncentracije i utvrđivanje čistoće izoliranih DNA.....	26
3.2.4.	Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimerazom (PCR).....	26
3.2.5.	Detekcija umnoženih mikrosatelita.....	27
3.3.	Materijal i metode za morfološke analize listova i plodova.....	29
3.3.1.	Materijal i metode za morfološku analizu listova.....	29
3.3.2.	Materijal i metode za morfološku analizu plodova.....	31
3.3.3.	UPOV parametri procjene.....	32
3.4.	Materijal i metode za multielementnu analizu jestivog dijela ploda kestena.....	33
3.5.	Materijali i metode za fizikalna i kemijska istraživanja tla.....	34
3.5.1.	Fizikalne analize tla.....	34
3.5.2.	Kemijske analize tla.....	35
3.5.3.	Multielementna analiza tla.....	37
3.6.	Statistička obrada podataka.....	38
3.6.1.	Genetička raznolikost.....	38
3.6.2.	Morfološka raznolikost i pedološke značajke.....	39
3.6.3.	Multielementni sastav jestivog dijela ploda kestena i tla.....	40

4.	Rezultati .....	42
4.1.	Rezultati istraživanja genetičke raznolikosti .....	42
4.1.1.	Genetička raznolikost .....	42
4.1.2.	Raznolikost nasada i klonalnost .....	44
4.1.3.	Genetička udaljenost, razdvajanje i struktura populacija.....	46
4.1.4.	Srodnost.....	50
4.2.	Rezultati istraživanja morfološke raznolikosti i pedoloških značajki .....	53
4.2.1.	Morfološke značajke plodova .....	53
4.2.2.	Morfološke značajke listova.....	55
4.2.3.	Kvalitativne značajke plodova (UPOV).....	56
4.2.4.	Pedološki parametri.....	58
4.2.5.	Korelacije između morfoloških značajki plodova i listova.....	59
4.2.6.	Korelacije između morfoloških značajki plodova i parametara tla.....	59
4.2.7.	Korelacije između morfoloških značajki listova i parametara tla .....	60
4.2.8.	Analiza kovarijance (ANCOVA) .....	60
4.2.9.	Analiza glavnih sastavnica (eng. <i>principal component analysis</i> , PCA) .....	82
4.2.10.	Mantel test .....	87
4.2.11.	Diskriminantna analiza .....	88
4.3.	Rezultati istraživanja multielementne analize jestivog dijela ploda kestena i tla.....	90
4.3.1.	Multielementna karakterizacija jestivog dijela ploda kestena.....	90
4.3.2.	Multielementna analiza uzoraka tla.....	91
4.3.3.	Korelacije .....	92
4.3.4.	Analiza kovarijance (ANCOVA).....	93
4.3.5.	Diskriminantna analiza.....	93
5.	Rasprava .....	96
5.1.	Genetička raznolikost maruna .....	96
5.2.	Morfološka raznolikost maruna.....	101
5.3.	Multielementna raznolikost jestivog dijela ploda kestena.....	107
5.4.	Značaj i očuvanje maruna u Hrvatskoj .....	110
6.	Zaključci.....	112
7.	Popis literature.....	114
8.	Životopis.....	143

## 1. Uvod

### 1.1. Istraživana vrsta

*Castanea sativa* Mill. jedina je europska vrsta roda *Castanea* Mill. (Mellano i sur. 2018). Unutar današnjeg areala pitomog kestena, razlikuju se tri distinktna genska bazena: prvi obuhvaća populacije istočne i središnje Turske, drugi zapadnu Tursku i Grčku, dok treći bazen čine populacije Apeninskog i Iberijskog poluotoka (Mattioni i sur. 2013). Podjela populacija na genske bazene slijedi prethodno utvrđene glacijalne refugije, u kojima je kesten opstao tijekom zadnjeg ledenog doba, a koji su se nalazili na području Balkanskog, Apeninskog i Iberijskog poluotoka. S druge strane, na području Turske, čije su populacije uključene u dva odvojena genska bazena, prethodno su utvrđena dva zasebna refugija, na području današnje Gruzije te na području tjesnaca Dardanela (Krebs i sur. 2004). Kao rezultat divergencije između zapadnih (Italija, Španjolska) i istočnih (Turska, Grčka) populacija, utvrđena je također i zona introgresije u Turskoj, odnosno preklapanja, između ovih dviju grupa populacija (Mattioni i sur. 2013). Osim utjecaja geografske odvojenosti refugija, na raširenost pitomog kestena utjecao je i čovjek, posebice na sjevernim granicama areala (Conedera i sur. 2016). Areal ove vrste rasprostire se od 28° sjeverne geografske širine na Kanarskom otočju do 60° sjeverne geografske širine u Švedskoj i Škotskoj; najzapadnije mu je stanište na Azorima (17° zapadne geografske dužine), a najistočnije Azerbajdžan te Iran (49° istočne geografske dužine). Ipak, paleobotanički dokazi ukazuju na širu prisutnost vrste tijekom Kvartara, na području Čada u središnjoj Africi, sjeveroistočnom Iranu te Norveškoj (Krebs i sur. 2019).

Iako fragmentiranog areala (Krebs i sur. 2019), pitomi kesten raste na različitim nadmorskim visinama, od razine mora do 1800 m nadmorske visine na Kavkazu (do Santos Rosa i sur. 2019). Kesten pripada u listače umjereno toplog pojasa, s prosječnom godišnjom temperaturom između 8 °C i 15 °C, te prosječnom temperaturom višom od 10 °C tijekom šest mjeseci u godini. Najmanja potrebna količina padina razlikuje se između populacija, no kreće se u rasponu od 600 do 800 mm godišnje (Bounous 2014). Kao posljedica ovih potreba za vodom, vrsta je veoma osjetljiva na ljetne suše, koje se očituju kao visoke temperature zraka i tla te izostanak padalina (Conedera i sur. 2003). Kesten ne uspijeva dobro na vapnencima (kalcifobna vrsta), preferirajući dobro ocjedita tla, veoma kisele do neutralne pH-vrijednosti te također dobro podnosi manjak hranjiva u tlu. Osjetljiv je na kasne mrazeve, ali odlično podnosi oštećenja nastala vatrom, zahvaljujući velikoj snazi izboja iz žilja (panja) (Pereira-Lorenzo i sur. 2011).

Kesten raste kao stablo, visine do 40 m te promjera do 1,5 m. Iznimno stare jedinke te one na osami mogu dosegnuti prsni promjer i od 3 m. Plantažno uzgajana stabla za pridobivanje plodova rijetko prelaze visinu od 18 m (EUFORGEN 2014). Listopadna je vrsta, jednodomnih i jednospolnih cvjetova. Cvjeta u lipnju, a oprašuje se pomoću kukaca i vjetra (Idžojić 2019). Plodovi su veliki i najčešće jednosjemeni orasi, jestivih sjemenki. Najčešće se do tri oraha nalaze zajedno u bodljikavoj kupuli. Plod dozrijeva u listopadu te kupula puca na četiri dijela. Plodovi su zoohorni i jestivi (Idžojić 2013).

Pitomi kesten višestruko je korisna vrsta, koja je od davnina korištena prvenstveno kao izvor kvalitetne drvne građe te hranjivih sjemenki (Anić 1941; Conedera i sur. 2019). Drvo kestena posebice je prikladno za vanjsku uporabu, s obzirom na visok udio tanina, koji ga štite od truleži i propadanja (Conedera i sur. 2016). Osim za izradu popločenja i namještaja za vanjsku i unutarnju uporabu, drvo se tradicionalno koristi i za izradu ograda, vinogradarskih kolaca i sl. (Medak i sur. 2009). Uzgoj kestena u niskom uzgojnom obliku, upravo za proizvodnju vinogradarskih kolaca, poznat je još od doba Rimskoga Carstva (Conedera i sur. 2004), a temelji se na visokoj sposobnosti tjeranja iz žilja (Conedera i sur. 2019). Zbog visokog udjela tanina u drvu, kesten je također korišten u proizvodnji izolata tanina, za potrebe kožarske industrije te kao lijek u veterinarskoj praksi (Krisper i sur. 1992).

Osim drva, pitomi kesten je izvor hranjivih namirnica, meda i plodova (Poljak i sur. 2016; Conedera i sur. 2019). Upravo zahvaljujući hranjivoj vrijednosti sjemenki, kesten je od davnina uzgajan te oplemenjivan, u cilju dobivanja jedinki krupnijeg, ukusnijeg ploda (Conedera i sur. 2004). Za razliku od drugih orašastih plodova, kesten se ističe iznimno niskim udjelom masti (2-4 %), kao i proteina (4-7 %) (Torres i sur. 2014). Najveći postotak suhe mase jestivog dijela ploda čine ugljikohidrati, odnosno škrob (38-67 %) i saharoza (30 %) (de Vasconcelos i sur. 2010).

Kesteni se koriste svježi ili se prerađuju u proizvode kao što su brašno, *marrons glacés* (kandirane cijele sjemenke), kesten-pire ili kesten-pasta, a izvrsna su zamjena za proizvode s glutenom, odnosno predstavljaju bezglutensku alternativu (Torres i sur. 2014). Hranjivost kestena poznata je od antike, pa tako Atenej iz Naukrata navodi kako kuhani kesteni najviše hrane pojedinca, nešto manje pečeni, dok su najmanje hranjivi sirovi (Conedera i sur. 2004). Na primjer, kuhanje kestena dovodi do velikih promjena u makromolekularnoj strukturi škroba, ujedno mijenjajući i njezinu probavljivost nabolje (Cruz i sur. 2013). Osim visokog udjela hranjivog škroba, kesten je izvrstan izvor i prehrambenih vlakana, kao i velikog broja vitamina te makro- i mikroelemenata, čime ga se svrstava u namirnice „superhrane“ (Sacchetti i sur. 2009; de Vasconcelos i sur. 2010; Moreira i sur. 2012).

## 1.2. Kultivacija pitomog kestena

Pitomi kesten od davnina je privlačio pozornost ljudi, posebice u planinskim područjima. Tijekom nekih razdoblja povijesti, posebice u Srednjemu vijeku, bio je nezamjenjiva namirnica te je neke civilizacije moguće okarakterizirati kao „civilizacije kestena“ (Gobbin i sur. 2007; Pereira-Lorenzo i sur. 2020). Podrijetlo znanstvenog imena roda, *Castanea*, etimološki je vezano uz armensku riječ *kaskeni* („kesten“), odnosno uz perzijsku riječ *kashtash* („tvoj plod“, „Božji plod“). U samome podrijetlu imena indicirano je i podrijetlo stabla, odnosno potencijalno orijentalno podrijetlo roda (Heiniger i Conedera 1992).

Na području Europe, prvi spomen kestena nalazimo u grčkoj literaturi, iako najčešće posredno, iz prijevoda rimskih autora. Teofrastova (helenističko razdoblje, 371. do 287. godine prije nove ere) *Povijest biljaka* predstavlja najpouzdaniji izvor podataka. Iako autor nije posvetio zasebno poglavlje kestenu, često ga spominje te navodi kako se uzgaja kao divlje stablo, vjerojatno u šumama panjačama, za proizvodnju drva i ugljena. Osim toga, navodi kako su okus i slatkoća jestivog dijela ploda slični okusu bukvice. Ipak, Teofrast i drugi antički autori, kao što su Mnesitej, Difil te rimski kroničar Vergilije, nemaju povoljno mišljenje o okusu i prehrambenoj vrijednosti kestena; u rimskoj aristokraciji kesten je čak korišten kao alegorija provincijalnosti. Izravni dokazi postojanja različitih kultivara kestena ne postoje, no ne može se u potpunosti isključiti mogućnost da se brojni nazivi korišteni za plod kestena (*mota*, *lopima*, *sardijski orah*, *orah iz Carystusa*) zapravo odnose na nazive različitih lokalnih kultivara.

Grčkom kolonizacijom Apeninskog poluotoka najvjerojatnije započinje širenje kulture pitomog kestena na područje današnje Italije, usporedno sa širenjem kultivacije vinove loze, masline i drugih vrsta. Djela Plinija Starijeg govore tome u prilog, navodeći kako su kesteni doneseni iz Sardisa (u današnjoj Turskoj), te ih Grci nazivaju „sardijskim orasima“. Plinije također navodi kako su najpoželjniji plodovi iz okolice Taranta i Napulja, te su iz prvog stoljeća prije Krista poznata i tri geografska kultivara kestena: *tarantina* (okolica Taranta), *corelliana* i *tereiana* (okolica Napulja). U prilog tvrdnji kako je riječ o kultivarima govori i naziv „Zeusov žir“ koji se, prema Pliniju, koristio za kestone oplemenjene uzgojem. Oplemenjivanje kestena spominje i Vergilije, navodeći selekciju te postupak cijepljenja koji je, kao što je čest slučaj u klasičnoj književnosti, nerealističan (cijepljenje kestena na bukvu, orah, planiku).

Iako se uzgoj pitomog kestena relativno sporo širio Rimskim Carstvom, upravo je rimska civilizacija najviše utjecala na kulturu kestena u Europi. Najkasnije do kraja pretrkršćanske ere, postojali su kultivari dobre kvalitete plodova, uzgajani na komercijalnoj razini. Ovi su se kultivari odlikovali jednostavnošću čišćenja (guljenja) te raznolikom

moгуćnošću uporabe. Osim konzumacije svježih plodova, u kuhanom ili pečenom obliku, kesten se koristio i u proizvodnji brašna. Brašno je bila temeljna namirnica rimskih legija, kao i siromašnijeg dijela pućanstva. Dokaze o ukljućenosti kestena u prehranu starih Rimljana nalazimo i u ruševinama vile Torre Annunziata, uništene u erupciji Vezuva 79. godine (Conedera i sur. 2004).

Ozbiljnija kultivacija pitomog kestena zapoćinje u ranome Srednjem vijeku u Toskani (Quirós Castillo 1998) te se razvija u potpunosti u razdoblju od 11. do 16. stoljeća (Pitte 1987). U Srednjem vijeku, kesten je uzgajan na zemljištu neprikladnome za druge kulture te je nazivan „planinskom žitaricom“ (Martín i sur. 2009). Plodovi kestena postaju nezamjenjiva namirnica, a stablo je kestena povremeno nazivano „stablom kruha“ (Bounous 1999). Na području Alpa, kesten je bio najznačajnija namirnica u ljudskoj prehrani do introdukcije krumpira sredinom 18. stoljeća, o ćemu svjedoće zapisi o trgovanju plodovima u kantonu Ticino (Švicarska) iz 12. stoljeća, kao i podatak da su plodove vazali i kmetovi predavali kao danak vlasteli (Heiniger i Conedera 1992). Osim hranjivih plodova, kesten je bio na cijeni kao izvor krmiva i stelje za stoku, ćesto vrijednije od samih plodova, kao i drva za ogrjev i izradu ugljena (Tanner 1928). Kesten na području Alpa doživljava postupan pad znaćaja introdukcijom krumpira te izgradnjom željeznica krajem 19. stoljeća, kojima je omogućen uvoz jeftinijih izvora hrane (riža, kukuruz). Kraća revitalizacija dogaća se tijekom dvaju svjetskih ratova, zbog proizvodnje tanina i lokalno uzgojene hrane, no proizvodnja ponovo zamire tijekom 1960-ih (Heiniger i Conedera 1992). Od kraja 20. stoljeća te u suvremeno doba, uzgoj kestena ponovno je u porastu, prvenstveno zahvaljujući plodovima jestivih sjemenki, koje su povoljnih nutritivnih karakteristika (de Vasconcelos i sur. 2010; Poljak 2014; Poljak i sur. 2016, 2021; Conedera i sur. 2019). Osim obnavljanja postojećih nasada, diljem južne Europe podignuti su visokoproduktivni nasadi kultivara pitomog kestena, kao i hibridnih kultivara, u kojima se stabla kultiviraju kao kultura visokih prinosa, ili u sklopu tradicionalnih oblika mješovite poljoprivrede (*dehasas*, *montados*), u kojima se nasadi kestena preklapaju s pašnjacima ili poljima žitarica (Ferraz-de-Oliveira i sur. 2016; Conedera i sur. 2019).

### **1.3. Maruni**

Iako je kesten višestruko koristan, najviše se cijeni zbog izrazito kvalitetnih, ukusnih plodova jestivih sjemenki (Conedera i sur. 2008). Zahvaljujući velikoj varijabilnosti (Abdelhamid i sur. 2014; Poljak 2014), od divljih je stabala kultivacijom te cijepljenjem stvoren velik broj kultivara (Gobbin i sur. 2007; Conedera i sur. 2008), koje se naziva marunima (Poljak

i sur. 2016, 2021). Kultivari se razlikuju s obzirom na vrijeme sazrijevanja plodova, način uporabe plodova (konzumacija svježih plodova, mogućnost dugoročnog skladištenja, proizvodnja brašna te krmiva) te s obzirom na rasprostranjenost (više ili niže nadmorske visine) (Gobbin i sur. 2007). Čest je i uzgoj dualnih kultivara, odnosno onih stabala koje se ističu kvalitetom plodova, kao i drva (Conedera i sur. 2008).

Kultivacija maruna prisutna je na području prirodnog rasprostranjenja vrste, odnosno na području Španjolske, Portugala, Francuske, Italije i južne Švicarske (Gobbin i sur. 2007; Abdelhamid i sur. 2014). Maruni se, prije svega, ističu krupnoćom ploda. Dok će divlja stabla u 1 kg dati 100-120 plodova, u maruna taj je broj svega 80-90 (Idžojić 2013). Prema podacima iz 2017. godine, svjetska proizvodnja kestenova ploda iznosila je 2.327.495 t, dok je pod plantažnim uzgojem 603.076 ha zemljišta. Najveći svjetski proizvođač je Kina, a slijede je Južna Koreja te Italija (dos Santos Rosa i sur. 2019). U današnje je vrijeme poznato više od 300 priznatih različitih kultivara maruna u Italiji, 250 u Francuskoj, više od 200 u Španjolskoj te 100 u južnoj Švicarskoj (Gobbin i sur. 2007; Abdelhamid i sur. 2014). Conedera i sur. (2004) navode kako dosadašnje inventarizacije europskih kultivara na nacionalnoj razini sugeriraju postojanje tisuća kultivara. Prema talijanskim standardima, osim krupnoće i dobrog okusa, plodove maruna definiraju i lako čišćenje (guljenje) te najčešće prisutnost samo jedne sjemenke po plodu. Plodovi su duguljasta oblika, svjetlije smeđe su boje s tamnijim, izdignutim prugama te su sjajni. Sličan standard primjenjuje se i u francuskoj klasifikaciji, koja dodatno definira kako udio plodova s dvije sjemenke ne smije prelaziti 12 % (Poljak i sur. 2016).

Maruni igraju važnu kulturološku ulogu u južnoeuropskim zemljama, kao što je vidljivo na primjeru Korzike. Ovdje su maruni okosnica lokalne kulture, s autohtonim kultivarima svojstvenim pojedinom selu ili obitelji. Plodovi kestena i njihove prerađevine od davnina su služile kao glavno sredstvo trampe u ruralnoj ekonomiji, a vlasti iz Genove, te kasnije Francuske, neuspješno su pokušale ukinuti uzgoj te time potaknule pokret za neovisnost, čiji je simbol upravo bio plod maruna (Michon 2011). Osim na Korzici, kultivari kestena zastupljeni su i u ranije spomenutim tradicionalnim agrošumarskim sustavima, *dehesas* u Španjolskoj te *montados* u Portugalu (Díaz i sur. 1997; Feraz-de-Oliveira i sur. 2016). Riječ je o površinama pod ekstenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom, kojom dominiraju veće površine, mjestimično zasjenjene skupinama stabala i soliternim stablima hrasta, jasena ili kestena (Feraz-de-Oliveira i sur. 2016; Moreno i Caceres 2016). *Dehesasi* su uključeni i u mrežu Natura 2000, a plodovi se prodaju pod Zaštićenom oznakom izvornosti Europske unije (POD) (Moreno i Caceres 2016).



U zemljama izražene kulture kestena, uključujući i Hrvatsku, plodovi kestena i maruna središnji su element „kestenijada“ i „marunada“. Najpoznatija takva nacionalna manifestacija održava se od 1973. godine na području Lovrana i susjednih naselja pod nazivom „Lovranska marunada“.

#### 1.4. Ugroženost pitomog kestena

Pitomi kesten pokriva više od 2,5 milijuna ha u Europi te je jedna od najkultiviranijih vrsta drveća (Silla i sur. 2018). Ipak, zbog djelovanja većeg broja ugrožavajućih čimbenika, prirodne populacije, kao i nasadi, pod ugrozom su smanjenja površina ili nestanka. Brojnost nasada započela je opadati selidbom ruralnog stanovništva u gradove, odnosno napuštanjem ruralnog područja kao posljedice industrijalizacije u 19. i 20. stoljeću (Conedera i sur. 2004; Michon 2011; Poljak i sur. 2016). S druge strane, površine pod prirodnim sastojinama kestena u Europi počinju opadati 1960-ih, kada dolazi do oštrog pada površina pod prirodnim šumama općenito, kao posljedice brzog rasta poljoprivredne proizvodnje (Freitas i sur. 2021). Usto, u napuštene nasade i šume započinju pridolaziti konkurentnije autohtone šumske vrste, čime se površina kestenovih šumskih zajednica smanjuje (Zlatanov i sur. 2013; Conedera i sur. 2019). Osim ovih čimbenika, pitomi kesten u Europi istovremeno je postao ugrožen dvama patogenima, rakom kestenove kore (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.) i fitoftorom (*Phytophthora* spp.) (Silla i sur. 2018; Freitas i sur. 2022). Krajem 19. stoljeća u Sjevernoj Americi te Europi po prvi je puta otkrivena zaraza fitoftorom (Andriveau 1996). Riječ je o azijskom patogenu koji u obliku oomiceta obitava u tlu te kroz infekciju korijena dovodi do značajnog odumiranja korijena te nadzemnih dijelova biljke (Akili Simsek i sur. 2019). *Cryphonectria parasitica* fitopatogena je gljiva također podrijetlom iz Azije, čije rakaste tvorevine na kori te mlađim izbojcima i granama stabla ne uspijevaju kalusirati. Osim velikih šteta na europskom pitomom kestenu, ovaj patogen doveo je do gotovo potpunog uništenja američkog pitomog kestena (*C. dentata* (Marshall) Borkh.) u 20. stoljeću (Powell i sur. 2019). U Europi je gljiva prvi puta zabilježena 1938. godine u Italiji te se ubrzo proširila kontinentom, a u Hrvatskoj je prvi puta opažena na području Lovrana 1955. godine (Poljak 2014). Ipak, prirodnom pojavom hipovirulentnih sojeva, odumiranje je stabilizirano (Novak Agbaba i sur. 2011; Silla i sur. 2018). Također, aktivno se provode hibridizacije europskog i američkog kestena s azijskim srodnicima, u cilju stvaranja jedinki otpornih na oba patogena (Pereira-Lorenzo i sur. 2016; Silla i sur. 2018).

Posljednja ugroza pojavila se u obliku kestenove ose šiškarice (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), koja uništava pupove te dovodi do abnormalnog rasta i pojave šiški na pupovima, lišću i peteljka. U Europi je prvi puta zabilježena 2002. godine u Italiji, dok je u Hrvatskoj prvi puta primijećena 2010. godine (Arač 2013; Kos i sur. 2015).

### **1.5. Protok gena između kultiviranih i divljih populacija pitomog kestena**

Kultivirane biljke, uzgajane u blizini svojih divljih predaka ili srodnika, često stvaraju spontane hibride, odnosno dolazi do protoka i razmjene gena između divljih i kultiviranih populacija (Iketani i sur. 2010; O'Connor i sur. 2015). Iako je učestalost hibridizacije ovisna o većemu broju čimbenika, prije svega srodnosti dviju vrsta, introgresija ovoga tipa zabilježena je u trećine pripitomljenih vrsta Ujedinjenog Kraljevstva i četvrtine vrsta u Nizozemskoj, kao i u 12 od 13 najznačajnijih poljoprivrednih kultura na svijetu (Ellstrand i sur. 1999). Osim toga, ovako nastali hibridi najčešće su fertilni, sposobni oformiti novu populaciju te opstati u divljini (Sørensen i sur. 2007; Belaj i sur. 2010). Nažalost, ulazak kultiviranih gena u divlje populacije može biti negativan, kao u slučaju hibridizacije s korovnim vrstama, budući da usmjerava evoluciju korova u smjeru agresivnijih karakteristika rasta. Osim toga, introgresija omogućuje i ulazak transgena iz genski modificiranih kultura u prirodni genofond (Ellstrand i sur. 1999), čime potencijalno ugrožava opstanak populacije (Feurtey i sur. 2020). Ipak, introgresija može potaknuti i nastanak novih, potencijalno povoljnih svojstava, koja divljim vrstama omogućavaju bolji rast i opstanak (Rieseberg i sur. 2003). Na primjeru divlje riže (*Oryza rufipogon* Griff.), spontana hibridizacija i introgresija događale su se tijekom cijele tisućljetne povijesti kultivacije riže te su današnje "podivljala" i divlja riža obje najvjerojatnije kompleksni hibridi divlje i pitome riže, kao i mnogo generacija njihovih hibrida (Wang i sur. 2017).

Susret kultiviranih i divljih populacija također je prisutan i u pitomog kestena, zahvaljujući dugoj povijesti gospodarenja divljim populacijama, kao i kultivaciji određenih genotipova u nasadima (Bounous 2009). Položaj nasada, koji je često uz same prirodne populacije (Bounous 2014; Poljak i sur. 2016), pogoduje protoku gena, čime genska granica između kultivirane i divlje populacije postaje manje oštra, odnosno populacije nisu posve genetički odvojene (Mattioni i sur. 2008; Lusini i sur. 2014; Poljak i sur. 2017). Osim toga, zapuštanje nasada potaknulo je ulazak divljih stabala u nasade, čime je dodatno potencirano širenje alohtonih (kultiviranih) gena u divlju populaciju (Mattioni i sur. 2008; Poljak i sur. 2017). Ova pojava zabilježena je za populacije triju značajnih vrsta pitomih kestena, europskog (*C. sativa*), japanskog (*C. mollissima* Blume) i američkog (*C. dentata*). Genetička raznolikost

onih divljih populacija, koje se nalaze blizu nasada kultiviranih stabala, odstupa od genetičke raznolikosti populacija koje su udaljenije od kultiviranih nasada, odnosno sugerira dugotrajni utjecaj kultivacije (Mattioni i sur. 2008; Poljak i sur. 2017). Rezultat introgresije očituje se u nastanku hibridnih stabala, izraslih iz sjemena, koja se ističu intermedijarnim vrijednostima morfoloških obilježja, kao i kemijskog sastava plodova (Poljak i sur. 2016, 2021). Iako hibridnog podrijetla, pojedine jedinke odlikuju se plodovima koji, zahvaljujući svojoj veličini i kvalitativnim svojstvima (bojom, okusom), zadovoljavaju standard karakterizacije maruna, te se nastavljaju vegetativno uzgajati kao novi kultivar, u procesu poznatom kao „trenutna domestikacija“ (Pereira -Lorenzo i sur. 2019; Bouffartigue i sur. 2020). Alternativno, ova stabla izrasla iz sjemena pripisuju se majčinskome kultivaru, tvoreći poliklonalni kultivar (Pereira-Lorenzo i sur. 2011).

## 1.6. Genetička raznolikost maruna

Prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 80/13-1658), genetička raznolikost definira se kao sveukupna raznolikost gena između jedinki, populacija i različitih taksonomskih skupina. Osim značaja za opstanak vrsta u divljini, genetička raznolikost preduvjet je uspješne poljoprivredne proizvodnje. Jedan je od osnovnih izazova suvremene poljoprivrede povećanje proizvodnosti, uz istovremeno očuvanje bioraznolikosti. U tu je svrhu potrebno očuvati lokalne ekotipove, najbolje prilagođene mikrouvjetima. Osim toga, tradicionalni kultivari sve su cjenjeniji među potrošačima, zahvaljujući percepciji kako su visokokvalitetni (Conedera i Krebs 2008).

Osim morfološkim mjerenjima, proučavanje ekotipova moguće je i izravnim genetičkim istraživanjima, pomoću genetičkih biljega (Martín i sur. 2009). Genetički biljezi predstavljaju različite oblike nasljednog polimorfizma, koje se može jednostavno pratiti unutar jedne ili više populacija ili jedinki (Poljak 2014). Osim toga, razvoj i primjena lančane reakcije polimerazom (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) te sekvencioniranje DNA pojednostavile su i stvaranje genetičkih markera velike učinkovitosti (D'Surney i sur. 2001; Idžojić i sur. 2012; Torello Marinoni i sur. 2013; Poljak i sur. 2017). PCR metoda se, u najširem smislu, može koristiti u kvalitativne i kvantitativne svrhe, odnosno njezinom primjenom određuju se svojstva ciljane molekule ili njihov broj u uzorku (Morley 2014). Genetički biljezi, kojima se istražuje raznolikost kultivara, kao i kojima je moguće utvrditi srodnost na međuvrskoj te unutarvrskoj razini su: 1) mitohondrijska DNA (mtDNA); 2) polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*; RFLP); 3) slučajno amplificirana polimorfna DNA (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*; RAPD); 4) polimorfizam dužine

amplificiranih ulomaka (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*; AFLP); 5) jednonukleotidni polimorfizam (eng. *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP) te 6) ponavljajuće jednostavne sekvence (eng. *Simple Sequence Repeats*; SSR), kao što su mikrosateliti (D' Surney i sur. 2001; Poljak 2014).

U istraživanjima genetičke raznolikosti maruna, prvi su korišteni izoenzimi (Sawano i sur. 1984; Müller-Starck i sur. 1994; Pereira-Lorenzo i sur. 1996a), a primjenjivi su prvenstveno zahvaljujući svojoj kodominantnoj ekspresiji te neovisnosti o okolišnim čimbenicima. Prvo opsežnije istraživanje provedeno je na klonovima pitomog kestena (Fineschi i sur. 1994), dok su Pereira-Lorenzo i sur. (1996a) primijenili izoenzime da bi opisali raznolikost 42 različita kultivara sjeverozapadne Španjolske te ih usporedili s učinkovitošću morfoloških karakteristika kao faktora determinacije kultivara. Korišteno je sedam izoenzimatičnih lokusa, uz analizu 15 alela. Također, opsežnije je istraživanje korištenjem izoenzima provedeno na 66 kultivara pokrajine Asturije (Španjolska) (Pereira-Lorenzo i sur. 2005). Osim šest morfoloških karakteristika, analizirano je i četiri sustava izoenzima, na pet lokusa. Svi izoenzimi korišteni u ovome istraživanju otprije su bili utvrđeni i u Galiciji, što je ukazalo na zajedničko podrijetlo španjolskih kultivara. Također, utvrđeno je smanjenje raznolikosti (brojnosti) kultivara prema jugu Španjolske, što je posljedica manje uloge maruna u poljoprivredi i kulturi južne Španjolske, uz moguće djelovanje geografskih barijera (Pereira-Lorenzo i sur. 2011). Do sličnih rezultata dolaze i Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo (2005), koji su analizom pet izoenzima dokazali kako su kultivari iz sjeverne regije Galicije genetski raznolikiji od onih iz južnih regija Andaluzije i Castilla-Leonea.

Osim izoenzima, u nekoliko istraživanja su korišteni i RAPD biljezi. Ovi biljezi koriste kratke PCR početnice koje su najčešće duljine osam do 15 nukleotida. Nedostatak RAPD markera je u njihovoj slaboj ponovljivosti između laboratorija, zbog iznimne osjetljivosti na uvjete tijekom reakcija sinteze (Butler 2012). Osim toga gotovo svi RAPD biljezi su dominantni, čime nije moguće razlikovanje heterozigotnog od homozigotnog alela (Reshma Raj i Das 2021). RAPD biljezi korišteni su u istraživanjima na divljim populacijama pitomog kestena (Casasoli i sur. 2001; Solar i sur. 2001, 2005), dok su Fineschi i sur. (1994) RAPD biljezima istražili raznolikost švicarskih kultivara.

Ipak, najčešće se koriste biljezi skupine SSR, odnosno CsCAT, QpZAG, QrZAG, EMCs, OCI, OAL, RIC te CIO (Botta i sur. 1999, 2001; Buck i sur. 2003; Marinoni i sur. 2003; Martín i sur. 2005; Gobbin i sur. 2007), koji se ističu učestalošću i u kodirajućim i nekodirajućim regijama DNA. Osim toga, visoka razina polimorfizma i jednostavnost detekcije i ponavljanja čine ih jednostavnijom i jeftinijom opcijom od starijih biljega, a ujedno je količina

tkiva potrebna za njihovu primjenu mala, čime su primjenjivi i u slučajevima degradiranih ili čak arheoloških uzoraka (Feng i sur. 2016). SSR biljezi veoma su često korišteni u istraživanjima genetičke raznolikosti maruna u Europi.

U Španjolskoj, Martín i sur. (2005, 2009, 2010, 2016, 2017) koriste SSR u većemu broju istraživanja te opisuju raznolikost španjolskih kultivara, odnosno uspoređuju ih s talijanskim. U istraživanju iz 2009. godine, analizirani su varijeteti iz španjolskih regija Huelva i Malaga. Osim morfološke analize, korišteno je i sedam polimorfni mikrosatelita, čime je otkriven 61 alel, po lokusu prosječno 8,7. Najpolimorfni lokus bio je EMCs38, s 25 genotipova i zapaženom heterozigotnošću od 0,85. Uočena je razlika u genetičkome uzorku između stabala iz Malage i Huelve; 23 alela pronađena su isključivo u uzorku iz Malage, dok je osam bilo specifično uzorku iz Huelve. Kombiniranjem morfoloških karakteristika te SSR biljega, utvrđeno je barem 36 kultivara klonalnog podrijetla, razvijenih *in situ*, jedan populacijski kultivar te jedan poliklonalni kultivar. Istraživanje iz 2016. godine (Martín i sur. 2016) obuhvatilo je i usporedilo španjolske kultivare iz ranijih istraživanja (Martín i sur. 2008, 2010) s tradicionalnim talijanskim. Sakupljeni plodovi razdijeljeni su u „tip maruna“ i „tip kestena“, s obzirom na morfološke karakteristike. Korišteno je 10 EST-SSR parova početnica, razvijenih na F1 unutarvrsnome hibridu (*C. sativa* × *C. sativa*) te međuvrsnome hibridu hrasta lužnjaka te kitnjaka (*Q. robur* × *Q. petraea*). Svih 10 EST-SSR lokusa bila su polimorfna. Sveukupno je utvrđen 51 alel, varirajući od tri (PIE260) do osam (PIE227). Svi lokusi, osim PIE260, imali su rijetke alele s frekvencijom <0,05, a pet je lokusa imalo privatne alele. Različit je bio i broj genotipova koji su bili utvrđeni na pojedinome lokusu, od pet (PIE233) do 16 (PIE227). Svi su lokusi testirani na postojanje nul-alela te je jedino lokus GOT014 imao značajne vrijednosti. Time su parametri genetičke raznolikosti izračunati za devet lokusa koji nisu bili nepoznati. Broj alela u obje skupine kultivara, španjolskih i talijanskih, bio je sličan te je iznosio 38, odnosno 46. Očekivana heterozigotnost iznosila je 0,566 u španjolskih, odnosno 0,658 u talijanskih kultivara. Ukupna očekivana heterozigotnost iznosila je 0,612. Zapažene heterozigotnosti iznosile su 0,459, odnosno 0,678, dok je sveukupna iznosila 0,569. EST-SSR biljezi ukazali su na postojanje devet privatnih alela u Italiji, odnosno pet u Španjolskoj. Lokusi koji su nosili ekskluzivne alele diskriminirali su tri kultivara u Španjolskoj, odnosno dva u Italiji. Odabranih devet EST-SSR biljega bili su dovoljno polimorfni da jedinstveno odrede sve genotipove. Pri tome je najuspješnija bila početnica PIE227, koja je sama omogućila prepoznavanje 16 od 50 genotipova. Ovo je istraživanje pokazalo da je, usprkos opće prihvaćenoj teoriji o razmjeni germplazme između Italije i Španjolske u vrijeme Rimskoga Carstva, lokalni uzgoj te utjecaj poljoprivrednika uzrokovao jasno odjeljivanje španjolskih od

talijanskih varijeteta tijekom klasteriranja. Također je utvrđeno jasno razdvajanje varijeteta iz španjolskih regija Huelva i Malaga, kao i onih s juga, odnosno sjevera Italije. Istraživanja SSR biljezima obuhvatila su također i regiju El Bierzo, u kojoj je korištenjem devet biljega analizirano 169 jedinki te je utvrđena velika raznolikost kultivara (Quintana i sur. 2015). U Portugalu, Batista i sur. (2008) primijenili su SSR biljege u istraživanju hibrida *C. sativa* 'Aveira' (majčinsko stablo) i *C. mollissima*, odnosno *C. crenata* Siebold et Zucc. (očinska stabla). Uzorci oba roditeljska stabla, kao i hibridnog potomstva, amplificirani su nuklearnim mikrosatelitni početnicama na osam lokusa. Utvrđeni su novi aleli u vrsta *C. crenata* i *C. mollissima*, time potvrđujući veću genetičku raznolikost azijskih vrsta pitomih kestena naspram europskog pitomog kestena. Razdvajanje alela hibridnoga potomstva slijedilo je Mendelov zakon segregacije, osim u lokusa EmCs15.

Šire istraživanje Iberijskog poluotoka proveli su Pereira-Lorenzo i sur. (2011), obuhvaćajući kultivare i hibride iz Portugala, Španjolske, Francuske, kao i Kanarskih otoka. Primjenom 10 SSR biljega utvrđena je velika raznolikost, koja je bila usporediva s raznolikošću prirodnih populacija pitomog kestena. Osim toga, uspješno su determinirani svi hibridi, uključujući i one prethodno morfološki svrstane pod jednu vrstu. Nadalje, Pereira-Lorenzo i sur. (2017) analizirali su daljnje kultivare s područja Španjolske, Portugala, Francuske i Italije. Korištenjem 24 SSR biljega istraženo je 118 kultivara, a utvrđena su dva velika klastera maruna, španjolski i talijanski. Kao rezultat istraživanja, odabrana je temeljna grupa od najmanje 37 europskih kultivara, koji trebaju biti pod zaštitom. Nadalje, Pereira-Lorenzo i sur. (2019), proveli su analizu starih stabala Španjolske, Portugala i Italije, koristeći ista 24 biljega. Osim već poznatih kultivara, utvrđen je 91 novi genotip, od kojih su neki predstavljali dokaz o „trenutnoj domestikaciji“, odnosno predstavljaju jedinke izrasle iz sjemena maruna koji se, zahvaljujući dobrim karakteristikama ploda, nastavljaju cijepiti kao novi kultivar.

Na području Švicarske, SSR biljezi korišteni su u nekoliko istraživanja. Gobbin i sur. (2007) analizirali su 164 stabla pomoću osam biljega te je utvrđeno 98 genotipova, a ujedno je potvrđeno postojanje 12 homonima te četiri sinonima, čime je dokazana velika etnogeografska raznolikost nasada. U novijem istraživanju iz 2020. godine (Pereira-Lorenzo i sur. 2020), provedena je sveobuhvatna analiza genetičke raznolikosti kestena i maruna u Švicarskoj. Analizirana su 962 stabla te je utvrđeno 54 kultivara, s ukupno 341 rametom. Ovi su genotipovi označeni kao prioritetni u zaštiti, u cilju očuvanja lokalne germplazme.

Biljezi SSR skupine korišteni su i u Italiji, u istraživanju starih stabala pitomog kestena (Beghè i sur. 2013). Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 37 stabala lokalnog kultivara u provinciji Parmi (Italija). Korišteno je osam parova SSR početnica: četiri SSR dinukleotida te četiri SSR

trinukleotida. Odabir dinukleotida temeljen je na činjenici kako su dinukleotidi češći u genomu te su polimorfnije. Trinukleotidi su izabrani s obzirom na jednostavnije tumačenje rezultata i veću pouzdanost, kao i mogućnost usporedbe s rezultatima drugih istraživača. Svi su biljezi proizveli polimorfne i ponovljive amplifikacije, omogućujući identifikaciju 38 alela. Broj alela po svakome lokusu varirao je između dva (lokus EMCs13) i 11 (lokus CsCAT2), s prosječnom vrijednošću od 3,02. Vrijednosti očekivane i zapažene heterozigotnosti iznosile su 0,062, odnosno 0,660. U kasnijem istraživanju, analizirana je germplazma maruna u talijanskom Pijemontu (Torello Marinoni u sur. 2013), korištenjem 10 SSR biljega. Utvrđena je velika raznolikost, odnosno 36 genotipa, koji su se grupirali prema geografskom položaju, kao i namjeni za koju se plodovi koriste (sirovi plodovi, brašno, kandiranje). Slično je istraživanje provedeno na području južne Italije (Martín i sur. 2010). Analizirano je 26 tradicionalnih kultivara te je korišteno istih sedam biljega. Svi su parovi početnica bili polimorfni te su omogućili zadovoljavajuću amplifikaciju. Sveukupno su utvrđena 52 alela, a njihov se broj kretao od tri (EMCs25) do 11 (EMCs38), s prosjekom od 7,4. Svi lokusi, osim EMCs25, imali su rijetke alele, a četiri lokusa (CsCAT2, CsCAT3, CsCAT16 i EMCs38) imala su svaki po dva jedinstvena alela. Očekivana heterozigotnost iznosila je 0,76, dok je zapažena iznosila 1,0 za CsCAT1 te 0,05 za EMCs25. Niska vrijednost zapažene heterozigotnosti na lokusu EMCs25 mogla bi upućivati na postojanje nul-alela, čija je procijenjena frekvencija iznosila 0,353. Ovo je istraživanje pokazalo kako je primjena dviju početnica veoma učinkovita u determinaciji kultivara pitomog kestena; lokus EMCs38 omogućio je razlikovanje 16 od 20 genotipova, dok je uz istovremenu primjenu CsCAT3 omogućeno razlikovanje svih kultivara. U novijem istraživanju iz 2020. godine (Alessandri i sur. 2020) analizirana su 134 cijepljena stabla iz regije Emilia-Romagna, pomoću 16 biljega. Utvrđeno je postojanje 21 genotipa, s prevlašću jednoga, kao i veći broj sinonima.

U Grčkoj, raznolikost maruna istraživana je na Kreti (El Chami i sur. 2021). Istraživanje je obuhvatilo četiri najznačajnija kultivara, s ukupno 59 jedinki, a upotrijebljeno je sedam SSR biljega. Istraživanjem je utvrđeno kako su sva četiri kultivara poliklonalna, odnosno svaki je kultivar predstavljen s više genotipova. Također je otkriven veći broj homonima.

Osim primjene samo SSR biljega, neki ih autori kombiniraju s drugim biljezima. Goulão i sur. (2000) koristili su RAPD i ISSR biljege istražujući portugalske kultivare, uspoređujući njihovu učinkovitost. 125 RAPD i 125 ISSR biljega umnožena su koristeći 28, odnosno sedam početnica. ISSR biljezi pri tome su se pokazali boljima, zahvaljujući visoko učinkovitom umnožavanju fragmenata te ponovljivosti testa. Korištenjem obje vrste biljega, kultivari su se grupirali u dva klastera. Također je utvrđeno postojanje dva homonima, odnosno za četiri

imenom različita kultivara, utvrđeno je kako je genetički riječ o samo dva. Abdelhamid i sur. (2014a) proveli su istraživanje o raznolikosti cijeloga roda *Castanea*, uključujući kultivare *C. sativa*. RAPD, AFLP, ISSR te SSR biljezi bili su korišteni te se svaka metoda pokazala korisnom i informativnom. AFLP biljezi bili su najefikasniji, generirajući najveći broj polimorfnihi lokusa (248). Ipak, ISSR i SSR biljezi generirali su značajno manje polimorfnihi lokusa, samo 42 (ISSR), odnosno 36 (SSR). Ovakvi rezultati upućuju na nisku genetičku raznolikost unutar istraživane populacije kestena, najvjerojatnije kao rezultat prirodne te umjetne (čovjekom uvjetovane) selekcije. Druga mogućnost male raznolikosti leži u vjerojatnome zajedničkome pretku europskog, kineskog te japanskog kestena. Genetička uniformnost unutar grupe varijeteta iz Švicarske, Francuske i Italije oslikava dugu povijest njihove kultivacije, dok je smanjenje genetičke raznolikosti cijepljenjem potencijalno kompenzirano korištenjem klijanaca maruna. Pri tome su se švicarski kultivari istaknuli unutar kultivarnom homogenošću najcjepjenijih kultivara. Ova homogenost potječe od prilagodbe lokalnoj mikroklimi te pedološkim uvjetima, ili je pak posljedica dugotrajnog selekcijskog pritiska uzgajivača na području južne Švicarske.

### **1.7. Morfološka raznolikost maruna**

Morfologija biljaka proučava te analizira biljni organizam kao cjelinu, koristeći biljne organe kao najnižu jedinicu organizacije (Kaplan 2001). Pristup koji nazivamo tradicionalna morfometrija primjenjuje različite multivarijatne statističke metode prilikom izmjere skupova varijabli (Poljak 2014). Rezultat ovih metoda najčešće se iskazuje numerički te grafički, kao linearna kombinacija mjerenih varijabli (Rohlf i Marcus 1993). Drugim riječima, izmjerom različitih biljnih organa (lista, ploda) te usporedbom podataka možemo uspoređivati te kategorizirati uzorke (Chuanromanee i sur. 2019). Jedna od primjena morfometrije je i razlikovanje te klasifikacija kultivara iste ili srodnih vrsta, a o njezinoj primjenjivosti najbolje govori postojanje izdvojene znanstvene grane ampelografije, koja se bavi razlikovanjem isključivo kultivara vinove loze (*Vitis vinifera* L.), na temelju morfoloških karakteristika (Lo Bianco i Mirabella 2018).

Točna identifikacija i karakterizacija kultivara neki su od najvažnijih koraka u uzgoju i proizvodnji kultiviranihi biljaka. Na temelju točno definiranog kultivara, moguće je njegovo oplemenjivanje, kao i transport i prodaja certificiranog biljnog materijala, te su u tu svrhu razvijeni različiti sustavi, odnosno smjernice za determinaciju (Korir i sur. 2013). Jedan od sustava za karakterizaciju kultivara razvila je i Međunarodna unija za zaštitu novih kultivara



biljaka (eng. *International Union for the Protection of New Varieties of Plants*, UPOV), sa sjedištem u Ženevi. Riječ je o međunarodnoj organizaciji nastaloj na temelju Konvencije o zaštiti novih kultivara biljaka, održanoj 1961. godine. Cilj Konvencije, kao i Međunarodne unije, je pružiti i promovirati učinkovit sustav determinacije postojećih kultivara, na temelju kojih je moguć razvitak novih. Potpisnici Konvencije, odnosno članovi Unije, mogu temeljem službenog opisa svojih kultivara zatražiti njihovu zaštitu te intelektualna prava, odnosno biti zakonski vlasnici (UPOV 2004). Smjernice UPOV-a razvijene su i za potrebe determinacije i opisivanja kultivara i hibrida pitomog kestena te obuhvaćaju čak 32 parametra izmjere i procjene. Parametri obuhvaćaju karakteristike rasta stabla, kao što su promjer debla, oblik rasta (uspravnost) te dužina internodija na jednogodišnjem prirastu, ali i parametre fenologije listanja, cvjetanja i plodonošenja. Ipak, za same su marune najznačajnije morfološke karakteristike lista i ploda, koje se ujedno i najčešće uključuju u istraživanja (Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo 2005; Furones-Pérez i Fernández López 2009; Poljak i sur. 2016; Tumpa i sur. 2021). Ove smjernice uključuju parametre veličine i oblika lista, veličine i oblika ploda, boju sjemene ljuske i ploda, kao i broj ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku, svojstva od velikog značaja u proizvodnji maruna za konzumaciju (Bounous 2009).

Osim UPOV smjernica, u uporabi su i smjernice Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. FAO; *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) iz 1997. godine. Ove su smjernice znatno jednostavnije te obuhvaćaju samo devet parametara (Bolvansky i Mendel 2001). Države u kojima postoji značajnija proizvodnja kestenovih plodova koriste neki od sustava determinacije, najčešće UPOV ili FAO (Bolvanský i Mendel 2001), iako je moguće izbaciti ili uključiti zasebni parametar te tako stvoriti nacionalan sustav klasifikacije. U slučaju maruna, posebne državne standarde imaju Francuska i Italija koje, uz određeni broj UPOV smjernica, dodatno uvjetuju i određena svojstva maruna, kao što je najviši dozvoljeni broj sjemenki po plodu (Bounous 2009; Poljak i sur. 2016, 2021).

Koje će se svojstvo, odnosno koje smjernice, koristiti u istraživanju, odlučuju sami autori. Tako list kao parametar koriste Pinto i sur. (2011), Serdar i sur. (2011) te Serdar i Kurt (2011). Plodove, odnosno plod i sjemenku analizirali su Pandit i sur. (2013), Torello Marinoni i sur. (2013), Bolvanský i Užík (2014), Benedetti i sur. (2018) te Poljak i sur. (2016, 2021). Morfološke analize uključuju izmjere plodova, sjemenki te cvjetnih resa, kao što je slučaj s istraživanjima Pereira-Lorenzo i sur. (1996b), Pereira-Lorenzo i Fernandez-Lopez (1997), te Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo (2005). Serdar i sur. (2011) su, uz izmjeru cvjetnih resa, plodova i sjemenki, u izmjere uključili i parametre lista, dok su Álvarez-Álvarez i sur. (2006), uz izmjeru plodova i sjemenki, uključili i izmjeru parametara lista. Furones-Pérez i Fernández

López (2009) su, uz parametre ploda i cvjetnih resa, uključili i fenološke karakteristike cvjetanja.

Morfološka istraživanja maruna provedena su ponajviše u zemljama južne i jugoistočne Europe, koje su i veliki proizvođači plodova, te najviše obuhvaćaju morfologiju ploda i/ili lista. U Španjolskoj su Pereira-Lorenzo i sur. (1996b) analizirali 82 tradicionalna galicijska kultivara, koristeći 17 parametara. Kao rezultat istraživanja, stvorena je klasifikacija temeljena na jednostavnim, lako uočljivim karakteristikama, te su autori predložili grupiranje ovih parametara u četiri hijerarhijske razine: razinu 1 određuje veličina ploda; razinu 2 parametri oblika ploda (omjer širine i visine ploda); razinu 3 tip muškog cvjetanja; razinu 4 dužina bodlji na jezici. Ova podjela stvara osam klasa, a na ovaj je način uspješno determinirano 53 od 82 kultivara. U preostalih je 29 kultivara značajna unutarklonalna varijabilnost onemogućila determinaciju. Podrijetlo ove varijabilnosti može se pripisati pogreškama prilikom cijepljenja, pogrešnome imenovanju kultivara ili pak povremenome spolnome razmnožavanju kultivara. Slični rezultati ponovili su se i u slijedećem španjolskom istraživanju (Pereira-Lorenzo i Fernandez-Lopez 1997), kada je 11 od 80 istraživanih kultivara ostalo nedeterminirano. Istraživanje španjolskih kultivara nastavili su Furones-Pérez i Fernández López (2009), analizirajući 38 tradicionalnih galicijskih kultivara, pomoću devet karakteristika. Sedam karakteristika definirano je u smjernicama UPOV (vrijeme otvaranja lisnog pupa, dužina prašničkih niti muškoga cvijeta, vrijeme početka cvjetanja muškoga cvijeta, vrijeme početka cvjetanja ženskoga cvijeta, stupanj urezanosti sjemenke, oblik ploda te veličina hiluma). Druge dvije karakteristike predložili su sami autori: omjer dužine i širine hiluma te postotak plodova s raspucanim perikarpom. Svi parametri pokazali su se dobrima za determinaciju kultivara. Fenološki parametri (vrijeme otvaranja pupa te početak cvjetanja muškog i ženskog cvijeta) te veličina hiluma bili su pod velikim utjecajem klimatskih prilika te su varirali kroz godine. Ovi su rezultati potvrdili ranije istraživanje (Álvarez-Álvarez i sur. 2006), u kojemu je također utvrđeno kako se sposobnost determinacije ploda povećava uključivanjem morfoloških karakteristika cijeloga ploda, uz parametre lista i sjemenke.

Morfološka varijabilnost kultivara istraživana je i na području Turske, korištenjem parametara lista (Serdar i Demirsoy 2006). Mjereno je 18 kultivara i hibrida te su izmjerene širina i dužina lista. Lišće je izmjereno PLACOM digitalnim planimetrom, a na temelju dobivenih podataka, opisan je model koji se može koristiti za buduće procjene lisne površine. Nadalje, Serdar i Kurt (2011) istraživali su morfološku varijabilnost osam genotipova. Lišće je sakupljano s dobro razvijenih bočnih izbojaka te su mjereni sljedeći parametri: dužina i širina plojke; ukupna dužina lista; dužina peteljke; visina i širina zubaca; razmak između bočnih žila;

indeks puči (širina/dužina) te omjer visine i širine zubaca. Mjerenja su ponavljana dvije godine, da bi se utvrdilo utjecaj klimatskih prilika na parametre lista. Većinu je genotipova bilo jednostavno determinirati s obzirom na morfometrijske karakteristike, osim genotipova SE-21-2 te 556-8. Serdar i sur. (2011) proveli su također i usporedbu turskog kultivara 'Serdar' i europsko-japanskog hibrida 'Marigoule' (*C. sativa* × *C. crenata*), s ciljem odabira kultivara bolje prilagođenog uvjetima uzgoja na obalama Crnog mora. Oba su se kultivara iskazala sličnim karakteristikama cvijeta, no 'Serdar' je cvjetao 11 dana kasnije te je stoga bio otporan na proljetne mrazeve. Osim toga, ovaj se kultivar ističe cvjetanjem više puta u godini, a istaknuo se i lakšim čišćenjem plodova od plodova 'Marigoule'. Iako izvan područja južne Europe, morfološka istraživanja provedena su i na području Slovačke. Bolvansky i Užík (2014) tijekom pet godina prikupljali su plodove s osam stabala, od kojih je pet bilo hibrida *C. sativa* × *C. crenata*, jedno stablo hibrid *C. sativa* te dva stabla *C. crenata*. Osim prikupljanja meteoroloških podataka, izmjerili su sljedeće morfološke parametre: masu ploda; širinu, visinu i debljinu ploda; udaljenost od osnove ploda do najšireg dijela ploda; dužinu i širinu hiluma; dužinu ostataka vrata i njuške tučka na vrhu ploda; broj ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku te broj sjemenki u plodu. Statistički značajne razlike utvrđene su za gotovo sve parametre. Najboljim plodovima odlikovalo se stablo L8 (*C. crenata*), s obzirom na veličinu ploda, izostanak ureza endokarpa te razvoj samo jedne sjemenke po plodu. Veličina plodova onih jedinki koje su proizvele veće plodove (>7 g) bila je utjecana ponajviše temperaturom zraka, odnosno pozitivno je korelirala s porastom temperature u razdoblju od lipnja do rujna. S druge strane, stabla s manjim plodovima (<7 g) pod većim su utjecajem količine padalina tijekom istoga razdoblja.

Osim samih morfoloških karakteristika, istraživanja mogu obuhvaćati i analize genskih odnosa i srodnosti. U istraživanju iz 2005. godine, Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo utvrdili su kako se masa plodova smanjivala prema jugu Španjolske te kao glavni razlog navode smanjenu dostupnost vode, odnosno učestalost sušnih razdoblja. Porastom temperature, uz dostatne količine vode, masa plodova raste. Također je utvrđeno da se jedino kultivar 'Rapada' odlikuje kratkim bodljama na ježicama, poželjnim svojstvom s obzirom na ručnu berbu plodova. Istraživanje koje objedinjuje morfološku i gensku karakterizaciju španjolskih kultivara proveli su također i Martín i sur. (2006), koristeći deset morfoloških i fenoloških obilježja. Ovaj se združeno morfološko genetički pristup pokazao uspješnim, točno identificirajući 36 od 38 kultivara. Osim u Španjolskoj, istovremeni genetički i morfološki pristup determinaciji kultivara proveden je i u Italiji (Torello Marinoni i sur. 2013), gdje se također pokazao

uspješnim. Korišteno je 20 morfoloških deskriptora, uz mikrosatelitne biljege, te je uspješno determinirano 36 kultivara.

### **1.8. Multielementni sastav jestivog dijela ploda maruna**

Iako je najvećim dijelom sastavljen od ugljikohidrata i vode (de Vaconcelos i sur. 2010a; Poljak i sur. 2016), te se odlikuje i niskim udjelom pepela, manjim od 3,5 % (Pereira-Lorenzo i sur. 2006; Borges i sur. 2008; Barreira i sur. 2012), jestivi dio kestenova ploda izvrstan je izvor makro- i mikroelemenata (Borges i sur. 2008; de Vasconcelos i sur. 2010). Pritom su najzastupljeniji elementi u sjemenkama maruna kalij, fosfor i magnezij (Ertürk i sur. 2006; Borges i sur. 2008; Sacchetti i sur. 2009; de Vasconcelos i sur. 2010; Nazzaro i sur. 2011; Moreira i sur. 2012). Osim ovih elemenata, jestivi dio ploda je karakteriziran i visokim udjelima željeza, bakra, cinka i mangana (Pereira-Lorenzo i sur. 2005; Borges i sur. 2008), a 100 g sirove sjemenke osigurat će trećinu dnevnih potreba za željezom u muškaraca, odnosno šestinu potreba žena, te će u potpunosti zadovoljiti potrebe za kalcijem. Također, 100 g sirove sjemenke kestena pruža 10,9 %, odnosno 8,3 % dnevnih potreba za magnezijem, za muškarce i žene (de Vasconcelos i sur. 2010).

Istraživanja makro- i mikroelemenata u sjemenkama maruna provedena su u zemljama južne i jugoistočne Europe, uključujući Portugal (Borges i sur. 2008; de Vaconcelos i sur. 2010), Španjolsku (Peña-Méndez i sur. 2007), Italiju (Sacchetti i sur. 2009; Neri i sur. 2010), Bugarsku (Glushkova i sur. 2010) i Tursku (Ertürk i sur. 2006). Pritom su najzastupljeniji elementi bili kalij (471,5-1475 mg/100 g suhe tvari) i fosfor (68-238 mg/100g suhe tvari) (Ertürk i sur. 2006; Borges i sur. 2008; de Vasconcelos i sur. 2010b), a zajedno s magnezijem i kalcijem, pokazali su i najveću varijabilnost u vrijednostima (Pereira-Lorenzo i sur. 2006; Peña-Méndez. i sur. 2008).

Četiri najznačajnija mikroelementa u ovim su istraživanjima imala sljedeće vrijednosti: željezo (0,4-10,99 mg/100 g s.t.), cink (0,7-11,0 mg/100 g s.t.), bakar (0,39-2,91 mg/100 g s.t.) i mangan (0,7-8,2 mg/100 g s.t.). Maseni udjel makro- i mikroelemenata u sjemenkama maruna ovisi o većem broju čimbenika, pri čemu se ističe utjecaj genotipa, odnosno primjetan je različit elementni sastav pojedinih kultivara (Peña-Méndez i sur. 2008; Borges i sur. 2008; Glushkova i sur. 2010), kao i utjecaj područja na kojemu kultivari rastu, posebice čimbenika tla i matične podloge (Korel i Balaban 2006; Borges i sur. 2008; Sacchetti i sur. 2009). Na primjer, stabla koja rastu na nekarbonatnim tlima imaju zamjetno niže koncentracije kalcija u sjemenkama (Sacchetti i sur. 2009), dok će jedinke kultivara 'Marsol' uzgajane na glinastim aluvijalnim tlima

imati niže vrijednosti makroelemenata od onih uzgajanih na ilovastim tlima (Ciucure i sur. 2022). Također, primjetan je utjecaj i matične podloge koja može utjecati na više vrijednosti makroelemenata u sjemenkama, kao što je slučaj s podlogom metamorfnih škriljevaca (Borges i sur. 2008). Osim genotipa i karakteristika staništa, na sastav kestena utječu i postupci njege u nasadima, kao što je navodnjavanje (Mota i sur. 2018), a zamjetan je i utjecaj klimatskih uvjeta (Ciucure i sur. 2022) i nadmorske visine (Silvanini i sur. 2014).

Općenito gledano, kemijski sastav maruna može biti izmijenjen i tijekom prerade jestivog dijela ploda u gotove proizvode, kao što su kandirani maruni, kestenovo brašno ili kesten-pire (Korel i Balaban 2006; de Vasconcelos i sur. 2010). Iako skladištenje plodova u trajanju do tri mjeseca nije pokazalo negativan utjecaj na koncentracije makro- i mikroelemenata u sjemenkama maruna, ljuštenje ploda na visokim temperaturama (de Vasconcelos i sur. 2010a) te početna termička obrada parom, kao prvi korak kandiranja, dovode do značajnog pada udjela istih (Korel i Balaban 2006). Sljedeći korak u kandiranju, natapanje u otopini saharoze, također dovodi do daljnjeg značajnog pada udjela makro- i mikroelemenata, ali i vitamina i polifenola, čime je nutritivni sastav prerađenih sjemenki znatno lošiji od sastava sirovih sjemenki (Korel i Balaban 2006; de Vasconcelos i sur. 2010, 2010a).

## 1.9. Pitomi kesten i marun u Hrvatskoj

U Hrvatskoj su poznata tri tradicionalna kultivara pitomoga kestena, definirana geografskim područjem uzgoja: 'Lovranski Marun', 'Lovrinski Marun' te 'Creski Marun'. Dok su 'Lovrinski Marun', koji raste u okolici Pazina, te 'Creski Marun', kao jedini otočki kultivar, slabije poznati te do sada nisu bili niti istraživani, 'Lovranski Marun' dobro je poznat na nacionalnoj razini te se uzgaja na privatnim posjedima istočnih padina Učke, kao i u okolici Lovrana, na nadmorskoj visini od 400 do 700 m (Poljak i sur. 2016). Najstariji nasadi stari su nekoliko stoljeća te su plodovi ovih stabala već u 17. stoljeću bili značajan izvozni proizvod. Uzgoj dostiže vrhunac u 19. stoljeću, nakon čega slijedi stagnacija te postupno zapuštanje nasada, kao posljedica iseljavanja ruralnog stanovništva. Osim zapuštanja, velik udarac uzgoju kestena u cijeloj Europi zadala je pojava raka kestenove kore, kao i ose šiškarice (Idžojić i sur. 2012; Ježić i sur. 2014; Poljak i sur. 2016). U posljednjih se desetak godina interes za uzgojem maruna polako vraća te se stari nasadi obnavljaju, uz uspješno suzbijanje štetnika i patogena (Poljak i sur. 2016, 2021).

U Hrvatskoj, kesten raste u dvije klimatske zone. Veći dio areala rasprostire se unutar kontinentalne klimatske zone, na području od granice sa Slovenijom do Bosne i Hercegovine. U ovome području najbolje uspijevaju sastojine na dubokim, kiselim, nekarbonatnim tlima, silikatne matične podloge. Manji dio areala nalazi se u toplijoj i vlažnijoj submediteranskoj zoni, na području Istre te otoka Cresa i Krka (Poljak i sur. 2012, Poljak 2014). Kesten na ovome području raste na svježim, dubokim te ispranim tlima, na vapnenastoj matičnoj podlozi. Zaklonjenost od vjetra također je značajan faktor; u Lovranskoj dragi, na primjer, kesten raste do granice zaklonjenosti od udara bure (Medak i sur. 2009).

Analizu genetičke raznolikosti maruna proveli su i Idžojić i sur. (2012) na području submediteranske Hrvatske. U istraživanju koje je obuhvatilo 72 stabla tadašnje operativne taksonomske jedinice „lovranskoga maruna“, također su primijenjeni SSR biljezi, odnosno korišteno je pet mikrosatelitnih biljega iz skupine CsCAT. Utvrđena je prisutnost 11 multilokusnih genotipova te ukupno 24 alela. Uniformna genska struktura utvrđena je u 58 jedinki te su one označene kao kultivar MG01. Kultivaru MG02, koji se razlikovao u samo jednome alelu, pripisano je pet jedinki. Ostale su jedinice označene kao devet pojedinačnih kultivara. Također je utvrđeno postojanje i osam jedinstvenih alela. Prosječna vrijednost alela po lokusu iznosila je 4,80, a kretala se u rasponu od tri (CsCAT17) do sedam (CsCAT3). Zapažena heterozigotnost iznosila je 0,75, dok je očekivana iznosila 0,61. S obzirom na rezultate, operativna taksonomska jedinica „lovranski marun“ nije posve genetički homogena,

no značajno prevladava genotip MG01. Do sličnih rezultata dolaze i Ježić i sur. (2014), koji su genotipizacijom 57 cijepljenih jedinki kestena s područja Lovrana utvrdili postojanje samo jednoga genotipa, odnosno postojanje klona. Ovim je istraživanjima potvrđeno postojanje kultivara pitomog kestena kojeg, s obzirom na lokaciju uzgoja, možemo smatrati 'Lovranskim Marunom'. Ovim je istraživanjem utvrđeno postojanje klonalnih jedinki, odnosno postojanje kultivara 'Lovranskog Maruna'. Poljak i sur. (2016) proveli su morfološku karakterizaciju plodova ovoga kultivara. Sa deset stabala genotipa MG01 (Idžojić i sur. 2012) sakupljeno je po 30 plodova. Analizirane su: masa ploda te visina, širina i debljina ploda. Osim toga na svakom plodu izmjerena je i dužina i širina hiluma te dužina najdužeg ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku. Osim ovih parametara, procijenjeni su i standardizirani deskriptori: broj embrija, stupanj urastanja endokarpa u sjemenku, oblik ploda, sjajnost ploda, boja sjemenke te boja ploda. Procijenjene su i dlakavost ploda na vrhu ploda te postojanje uzdužnih pruga na plodu. S obzirom na prosječnu masu ploda, 1 kg sadržavao je 80 plodova te se time plod lovranskih maruna mogao svrstati u kategoriju velikih, na granici s osrednje velikim. Plodovi su jednosjemeni, s osrednje jakim urezima endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku. Osim toga, plodovi se lako čiste, crvenkastosmeđe su boje s tamnijim uzdužnim prugama. Slično je istraživanje provedeno i 2021. godine (Poljak i sur. 2021) te su plodovi 'Lovranskog Maruna' u oba istraživanja zadovoljila parametre talijanskog i francuskog standarda, kao i UPOV smjernice za proglašenje valjanom kultivarom (marunom).

Osim morfoloških i kemijskih istraživanja, te osnovne genetičke karakterizacije 'Lovranskog Maruna' (Idžojić i sur. 2012), provedena su i istraživanja cijelih nasada maruna na području Istre, kojima je detaljnije opisana genetička raznolikost. Poljak i sur. (2017) tako su utvrdili postojanje introgresije, odnosno ulaska kultiviranih gena u divlju populaciju u okruženju, koja je jasno vidljiva u postojanju marušnjaka, odnosno hibridnih jedinki izraslih iz plodova maruna, a nastalih oprašivanjem divlje jedinke.

## 2. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Duga povijest uzgoja kestena u Europi, kao i u Hrvatskoj, obilježena je istovremenim oplemenjivanjem i selekcijom najboljih jedinki. Kao rezultat, stvoreni su kultivari visokovrijednih plodova, poznati pod nazivom maruni. Maruni se od stabala iz prirodnih populacija razlikuju veličinom ploda, njegovim boljim okusom te lakoćom čišćenja. Na području Hrvatske, odnosno Kvarnera i Istre, uzgoj maruna prisutan je stoljećima, s najstarijim zapisima o izvozu plodova iz 17. stoljeća, kada su uz trešnje, maslinovo ulje te grožđe, plodovi maruna tvorili okosnicu poljoprivrednih dobara za razmjenu (Poljak i sur. 2016, 2017). Gospodarski značaj maruna prošao je kroz razdoblje pada, dok je u novije vrijeme ponovno u porastu, zahvaljujući obnovi nasada te popularizaciji plodova kao visokokvalitetne, hranjive i zdrave namirnice. Osim gospodarskog, maruni imaju i veliku društvenu te kulturološku ulogu, s obiteljskim nasadima koji se generacijama njeguju i održavaju tradicionalnim metodama razmnožavanja te predstavljaju turističku atrakciju. Uz berbu plodova vežu se i lokalne manifestacije, kao što je Lovranska Marunada, ali su plodovi i na širem nacionalnom tržištu prepoznati te postižu veću cijenu od plodova sakupljenih u šumama. S obzirom na ugroze s kojima se svi europski maruni susreću u 21. stoljeću, uključujući patogene, štetnike, prenamjenu zemljišta te klimatske promjene, potrebno je očuvati i zaštititi autohtone kultivare maruna u Hrvatskoj. Prvi korak svake zaštite svakako je karakterizacija, odnosno stvaranje službenih smjernica za determinaciju kultivara.

Cilj ovdje predstavljenog istraživanja upravo je karakterizacija triju lokalno poznatih kultivara maruna (lovranski, lovrinski i creski), koja će se provesti genetičkim, morfološkim i kemijskim metodama, odnosno provest će se genska karakterizacija nasada maruna te će se analizirati morfologija lista i ploda, kao i sastav elemenata u tragovima u jestivom dijelu ploda. Također će se ispitati potencijalan utjecaj okolišnih čimbenika na morfološku raznolikost lista i ploda te na sastav elemenata u tragovima u jestivom dijelu ploda. Kao krajnji rezultat uspješne karakterizacije, za utvrđene kultivare istražiti će se mogućnost zaštite na nacionalnoj razini, odnosno kultivari će potencijalno biti predloženi za nacionalnu sortnu listu Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu.

Hipoteze koje će se ispitivati u ovome istraživanju su sljedeće: (A) u Hrvatskoj postoji više kultivara pitomog kestena; (B) hrvatske kultivare moguće je opisati i razlikovati pomoću morfoloških parametara listova i plodova; (C) hrvatski se kultivari razlikuju u genskoj strukturi alela te ih je moguće razlikovati primjenom mikrosatelitnih biljega; i (D) morfologija plodova te sastav elemenata u tragovima u sjemenkama posljedica su genetičke i okolišne raznolikosti.



### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Područje istraživanja

Biljni materijal analiziran u ovome radu sakupljen je na tri geografski odvojene, ali klimatološki bliske lokacije, tijekom 2019. godine. Na području Istre, uzorci su sakupljeni u nasadima maruna na sjeveroistočnim padinama Učke, u naseljima Lovran, Dobreć i Liganj, odnosno na području Lovranske Drage. Također, uzorci su prikupljeni i u okolici grada Pazina, u naselju Lovrin. Na otoku Cresu, uzorci su sakupljeni u nasadima maruna na sjeveroistočnom dijelu otoka, na predjelu Tramuntana. Sakupljanje uzoraka na ove tri lokacije definiralo je tri populacije uzoraka, koje su korištene tijekom cijelog istraživanja: Populacija 1 (P1) predstavljala je stabla s područja Lovrina, Populacija 2 (P2) stabla s područja Lovrana, dok je Populacija 3 (P3) obuhvatila sve uzorke s otoka Cresa (tablica 1, slika 1).

Na području Lovrina, uzorkovana su 44 stabla, koja u velikome broju slučaja nisu imala vidljivo mjesto cijepa. Na području Lovrana, odnosno Cresa, uzorkovano je 83 te 92 stabla, čija su mjesta cijepa najčešće bila jasno vidljiva.

**Tablica 1.** Geografske koordinate analiziranih populacija maruna.

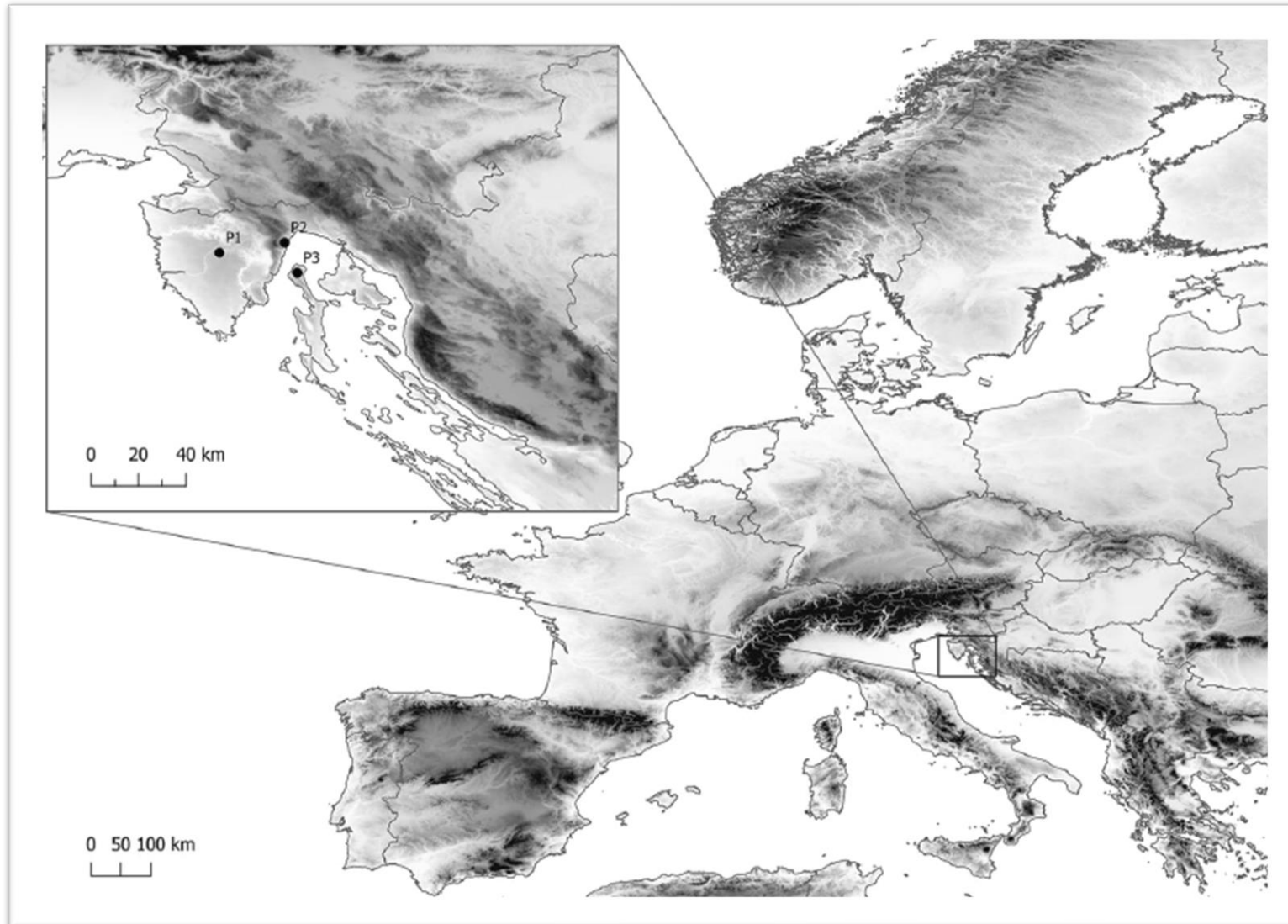
Oznaka populacije	Analizirani lokalitet	Zemljopisna širina (N)	Zemljopisna dužina (E)
P1	Lovrin	45,2356	13,9148
P2	Lovran	45,3059	14,2654
P3	Cres	45,1248	14,3449

Nasadi maruna uključeni u ovome istraživanju u različitim su stupnjevima kultivacije, odnosno uređenosti. Lovranski nasadi u najboljem su stanju, održavaju se redovito, čiste od raslinja i kose, te se stara stabla orezuju, a nove jedinke cijepe i nanovo sade. Velik je broj nasada zbog strmog terena u obliku terasa, odnosno redovi stabala sađeni su na terase formirane suhozidovima. U manjem broju nasada, primjećuje se napuštanje nasada, odnosno zarastanje i urušavanje suhozidova, ali generalni dojam koji nasadi ostavljaju je onaj urednih voćnjaka. Za razliku od nasada u Lovranskoj Dragi, stabla analizirana na području Lovrina rastu u uvjetima prirodne ili gotovo prirodne šumske vegetacije, odnosno nasad je posve zarastao. Broj cijepljenih stabala mali je, te je primjetan velik broj osušenih, potencijalno cijepljenih stabala.

Lovrinski lokalitet, za razliku od urednih voćnjaka Lovrana, u najvećem dijelu predstavlja klimazonalnu vegetaciju s povećim udjelom divljih stabala pitomog kestena te malim brojem cijepljenih stabala, odnosno maruna. Treća skupina maruna, ona na otoku Cresu, raste u starim i relativno dobro održavanim nasadima. Creski se nasadi razlikuju od lovranskih prvenstveno u topografiji, s obzirom na to da su creski nasadi na ravnim ili blago kosim površinama, manje kamenitosti. Primjetan je velik broj veoma starih, tzv. veteranskih stabala, iznimnih dimenzija, kao i osrednji broj osušenih stabala.

Sva tri istraživana područja nalaze se unutar pojasa submediteranske klime. Prema Köppenovoj klasifikaciji klime, riječ je o klimatskom tipu Cfs's"a. Najveći dio oborina je ujesen, dok je glavni minimum oborina zimi, a jedno manje suho razdoblje ljeti. Osim suhoće, ljeta su i vruća, sa srednjom temperaturom najtoplijeg mjeseca u godini iznad 22 °C (Seletković i sur. 2011). Pedološki uvjeti također su uniformni, usprkos velikoj pedološkoj varijabilnosti na području cijele Istarske županije (Milko i sur. 2013). Tla su razvijena na stijenama karbonatnog kompleksa, čije su veće površine isprekidane tankim pojasevima fliša, te povremenim naplavinama. Zastupljena su tri osnovna litološka tipa: vapnenci, dolomiti te dolomiti i vapnenci u izmjeni, uključujući i kalcitične do dolomitične breče. Tekstura tla koja se razvijaju su dominantno ilovače, s različitim udjelima gline i praha, a dominantni tipovi tala su crnice, rendzine te smeđa tla na vapnencima i dolomitima različite dubine (UIH 2007).

Vegetacijski pokrov područja obuhvaćenog istraživanjem karakterizira submediteranska kestenova šuma s krškim kukurijekom (*Helleboro multifidi-castanetum sativae* Medak 2009). Razlikovna vrsta zajednice, osim pitomog kestena i krškog kukurijeka (*Helleborus multifidus* subsp. *istriacus* (Schiffn.) Merxm. et Podlech), jest i jesenska šašika (*Sesleria autumnalis* (Scop.) F.W.Schultz). Uz pitomi kesten, u sloju drveća pojavljuju se crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) i divlja trešnja (*Prunus avium* L.), te u manjoj mjeri hrast medunac (*Quercus pubescens* Willd.) i cer (*Quercus cerris* L.), obični grab (*Carpinus betulus* L.), kao i bijeli (*C. orientalis* Mill.) i crni grab (*Ostrya carpinifolia* Scop.) te klen (*Acer campestre* L.). Sloj grmlja bujno je razvijen, što je uočljivo na lokaciji Pazin. Ovaj sloj karakteriziraju lijeska (*Corylus avellana* L.), svib (*Cornus sanguinea* L.), javor gluhač (*Acer opalus* subsp. *obtusatum* (Waldst. et Kit. ex Willd.) Gams) te oskorusa (*Sorbus domestica* L.). Zajednica raste na zaravnjenim i blago nagnutim terenima, a na padinama Učke javlja se samo na sjevernim padinama, gdje su utjecaji ljetne vrućine i suše manje izraženi. Na šume ove zajednice, koje okružuju nasade maruna, značajno je utjecano kroz povijest, čime je povećana prisutnost acidofilnih vrsta. Ipak, današnji negativan utjecaj znatno je manji te se očituje u zbijanju tla prilikom skupljanja kestenovih plodova te u pašarenju (na Cresu) (Vukelić 2012).



**Slika 1.** Područje istraživanja – analizirane populacije: P1-Lovrin; P2-Lovran; P3-Cres.

## 3.2. Materijal i metode za genetičku analizu

### 3.2.1. Materijal

Biljni materijal za molekularnu analizu sakupljen je na području Lovrina (P1), Lovrana (P2) i Cresa (P3). Za molekularne analize, sa svakoga su stabla sakupljeni neotvoreni, posve razvijeni lisni pupovi. Lisni su pupovi na terenu odmah stavljeni u filter vrećice, te su filter vrećice zatim uronjene u veće plastične ziplock vrećice sa silika-gelom.

### 3.2.2. Izolacija ukupne stanične DNA

Ukupna stanična DNA za sve jedinke izolirana je korištenjem 50 mg pupova pomoću DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen<sup>®</sup>, Njemačka):

1. izvagano tkivo stavljeno je u „safe lock“ 2,0 mL epruvetu (Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka) te je u nju stavljena čelična kuglica za usitnjavanje tkiva
2. uzorci pripremljeni u prethodnome koraku smrznuti su tekućim dušikom te usitnjeni u TissueLyser uređaju (Qiagen<sup>®</sup>, Njemačka), u trajanju od 1 min, frekvencije 30 Hz
3. kada je tkivo usitnjeno, u epruvetu je dodano 600  $\mu$ L prethodno ugrijanog AP1 pufera (otopina detergenta i proteinaze za razgradnju staničnih membrana), 4  $\mu$ L RNaze, 6 mg PVP-a i 6  $\mu$ L 2-merkptoetanol; ova je smjesa zatim homogenizirana korištenjem «vorteks» miješalice (GVLab- Gilson<sup>®</sup>, SAD)
4. nakon homogenizacije, slijedila je inkubacija u trajanju od 10 min, na 65 °C, uz povremeno miješanje vorteks miješalicom
5. inkubiranim uzorcima nadodano je 195  $\mu$ L AP2 pufera, ručno izmiješano ručnim protresanjem te ponovno inkubirano 5 min na -20 °C, u svrhu sedimentacije denaturiranih proteina
6. sadržaj epruvete je centrifugiran 7,5 min na 16100 g (centrifuga 5415 D Eppendorf<sup>®</sup>, Njemačka)
7. ovako nastali supernatant pipetom je prebačen na QIAshredder Mini Spin kolonu s filterom te je centrifugiran 5 min na 16100 g
8. 600  $\mu$ L filtrata zatim je prebačeno u novu epruvetu od 1,5 mL te mu je nadodano 1,5 volumen pufera AP3 (kako bi se isključivo DNA molekule vezale na membranu Dneasy Mini Spin kolone)

9. 650  $\mu\text{L}$  homogenata prebačeno je na Dneasy Mini Spin kolonu te je centrifugirano 1 min na 5800 g
10. nakon centrifugiranja, filtrat je uklonjen, a Dneasy Mini Spin kolona je prenesena u novu epruvetu od 2 mL, nadodano je 500  $\mu\text{L}$  AW pufera te je ponovo centrifugirano 1 min na 5800 g (ispiranje DNA molekula vezanih na filter)
11. filtrat je ponovno uklonjen, te je nadodano novih 500  $\mu\text{L}$  AW pufera i centrifugirano 4 min na 16100 g
12. nakon centrifuge, Dneasy Mini Spin kolona je puštena na sobnoj temperaturi oko 5 min, kako bi etanol iz AW pufera ispario do kraja
13. Dneasy Mini Spin kolona je prebačena na novu epruvetu od 1,5 mL te je na membranu kolone dodano 100  $\mu\text{L}$  AE otopine prethodno zagrijane na 65 °C (vodena otopina TRIS-a, kojom se sprječava degradacija DNA kroz dulje razdoblje stabilizacijom pH-vrijednosti iznad 8)
14. nakon inkubacije od 5 min pri sobnoj temperaturi, Dneasy Mini Spin kolona završno je centrifugirana 1 min na 5800 g, čime se DNA molekule odvajaju od kolone te tvore filtrat
15. filtrat dobiven na kraju ovog postupka pohranjen je u zamrzivaču, na temperaturi od -20 °C.

### **3.2.3. Mjerenje koncentracije i utvrđivanje čistoće izoliranih DNA**

Nakon izolacije DNA, provedena je izmjera (provjera) koncentracija ukupne stanične DNA u svakome uzorku. Izmjera je izvršena na spektrofotometru NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, SAD). Potreban volumen izolata DNA za svaku izmjeru veoma je mali, samo 0,5-2  $\mu\text{L}$  DNA, a ujedno nisu potrebni dodatni reagensi ili kemikalije. Kalibracija je izvršena korištenjem AE otopine, koja je korištena i prilikom postupka izolacije DNA molekula. Dodatna kalibracija vrši se u obliku izmjere DNA  $\lambda$  poznate koncentracije, od 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Uz koncentraciju, utvrđuje se i omjer apsorbancije 260/280, koji se koristi kao mjera čistoće izoliranih otopina ukupne stanične DNA.

### **3.2.4. Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimerazom (PCR)**

Molekularno-biološka analiza hrvatskih kultivara maruna u ovome istraživanju provedena je korištenjem 15 mikrosatelitnih biljega iz skupina EST-SSR (Durand i sur. 2010) i SSR (Buck i sur. 2003; Marinoni i sur. 2003; Gobbin i sur. 2007). Nazivi mikrosatelitnih

lokusa, te očekivane duljine umnoženih fragmenata i ponavljajući motivi DNA navedeni su u tablici 2.

PCR otopina za umnožavanje mikrosatelitnih motiva za jedan uzorak ukupnog volumena od 20  $\mu\text{L}$  imala je sljedeći sastav:

- 4,06  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (sterilizirana deionizirana)
- 2,00  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR pufer (TAKARA)
- 1,60  $\mu\text{L}$  dNTP (TAKARA)
- 1,00  $\mu\text{L}$  početnica F (Forward)
- 1,00  $\mu\text{L}$  početnica R (Reverse)
- 0,14  $\mu\text{L}$  Taq Hs (TAKARA)
- 0,20  $\mu\text{L}$  BSA (20 ng/ $\mu\text{L}$ )
- 10,0  $\mu\text{L}$  otopine DNA (1 ng/ $\mu\text{L}$ )

Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimerazom provedeno je u uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD). Program umnožavanja DNA molekula uključivao je početni korak denaturacije u trajanju od devet minuta, pri temperaturi od 95  $^{\circ}\text{C}$ . Nastavno na denaturaciju, uslijedilo je 28 ciklusa prema slijedećem rasporedu: denaturacija u trajanju od 50 sekunda na 94  $^{\circ}\text{C}$ , proces sparivanja u trajanju od 45 sekunda na temperaturi specifičnoj za svaku početnicu, produljivanje fragmenata u trajanju od 90 sekunda na 72  $^{\circ}\text{C}$ , te konačni korak elongacije od 7 minuta na 72  $^{\circ}\text{C}$  (Marinoni i sur. 2003).

### **3.2.5. Detekcija umnoženih mikrosatelita**

Produkti nastali lančanom reakcijom polimerazom provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu. Za provedbu elektroforeze, 5  $\mu\text{L}$  svakog uzorka pomiješano je s 1  $\mu\text{L}$  boje za nanošenje na gel (30 % saharoze, 0,25 % brom fenolnog modrila i 0,25 % ksilen-cijanola) i stavljeno u ureze u gelu. Elektroforeza je provedena u trajanju od 15 minuta te pri naponu od 100 V. Gel je zatim uronjen u otopinu etidij bromida na 20 minuta, čime su DNA fragmenti postali vidljivi pod UV svjetlom transiluminatora.

Nakon provjere, uspješno umnoženi uzorci su pripremljeni za posljednji korak, kapilarnu elektroforezu. Za svaki uzorak, pomiješano je 1,5  $\mu\text{L}$  mikrosatelitnih PCR produkta s 10  $\mu\text{L}$  formaldehida i 0,5  $\mu\text{L}$  DNA standarda 500 LIZ (Applied Biosystems<sup>®</sup>, SAD). Uzorci su tri minute denaturirani na 95  $^{\circ}\text{C}$  te neposredno nakon toga smješteni na led.

Umnoženi mikrosateliti poslani su u laboratorij Macrogen (Amsterdam, Nizozemska), gdje su zatim detektirani kapilarnom elektroforezom. Rezultati kapilarne elektroforeze zaprimljeni su u obliku .fsa datoteka, te je daljnje očitavanje mikrosatelitnih alela izvršeno korištenjem računalnog programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, SAD).

**Tablica 2.** Nazivi i sekvence početnica, ponavljajući motivi i očekivane duljine umnoženih mikrosatelitnih fragmenata.

Lokus	Tip biljega	Ponavljajući motiv	Duljina umnoženih fragmenata (bp)
WAG11	EST-SSR	TC (cca 143 bp)	217-231
PIE233	EST-SSR	(TG)5TA(TG)24 (cca 220 bp)	162-168
PIE228	EST-SSR	TC (cca 143 bp)	175-193
PIE227	EST-SSR	AG (cca 224 bp)	158-179
WAG004	EST-SSR	CAC (cca 90 bp)	260-272
POR009	EST-SSR	(CT)16AGT(CT)2 (cca 300 bp)	120-128
FIR030	EST-SSR	CT (235-252 bp)	168-172
POR026	EST-SSR	CCA (162-168 bp)	139-151
PIE260	EST-SSR	AGA (177-196 bp)	153-165
CsCAT6	SSR	TGG (154-179 bp)	158-194
CsCAT1	SSR	TTC (260-271 bp)	194-228
CsCAT16	SSR	AG (122-140 bp)	121-217
CsCAT3	SSR	AG (168-173 bp)	212-256
EMCs15	SSR	TC (137-148 bp)	81-93
OAL	SSR	AG (154-168 bp)	299-331

### **3.3. Materijal i metode za morfološke analize listova i plodova**

Listovi i plodovi korišteni za morfološku analizu maruna u Hrvatskoj sakupljani su na tri prethodno navedene lokacije, odnosno na području Lovrana, Lovrina te otoka Cresa. Iako je u izvornom sakupljanju uzoraka u svrhu utvrđivanja genetičke raznolikosti sakupljen biljni materijal sa svih 219 jedinki, u morfološkim analizama taj je uzorak bio smanjen. Naime, u morfološke su analize ušle samo one jedinke u kojih je bilo moguće uzorkovati i list i plod, odnosno ona stabla koja su u godinama sakupljanja plodonosila te imala zdrav list. Dakle, morfološke su analize izvršene za 144 jedinke, na kojima je tijekom 2019. godine bilo moguće pronaći odgovarajući uzorak lišća i plodova.

#### **3.3.1. Materijal i metode za morfološku analizu listova**

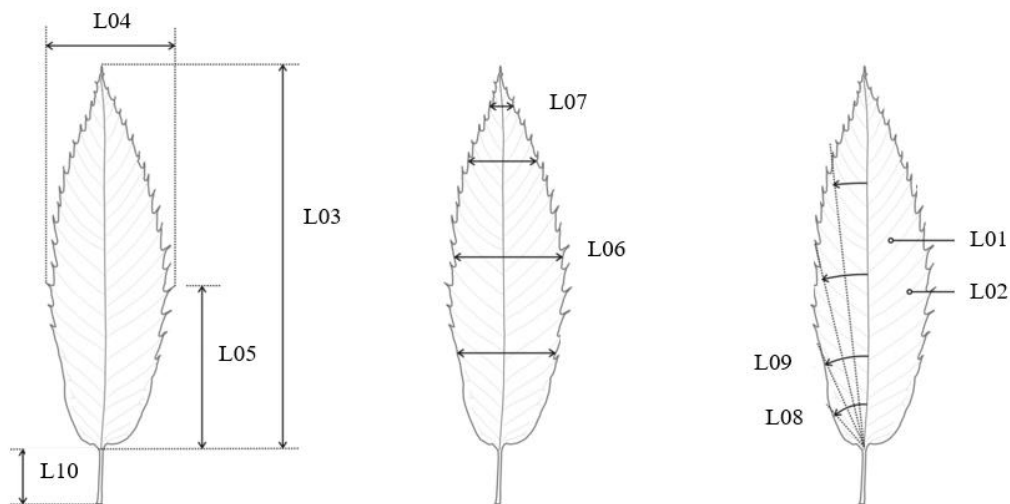
Sa svakog od 144 stabla sakupljeno je između 10 i 20 listova, a sakupljanje je provedeno u kasno ljeto, nakon potpunog razvoja lišća. Nadalje, odabrani su optimalno razvijeni listovi kratkih izbojaka, dakle oni iz dobro osunčanih dijelova krošnje, bez oštećenja ili vidljivih napada štetnika i patogena. Listovi su odmah po sakupljanju smješteni u zatvorene vrećice te su transportirani u Herbarij Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku, Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije, gdje su herbarizirani između listova novinskog papira. Listovi su na ovaj način posve osušeni u izvornom obliku, bez izmjena u dimenzijama ili obliku.

Nakon što su listovi posve osušeni, proveden je postupak skeniranja, u skeneru A3 formata (MICROTEK ScanMaker 9800XL), uz razlučivost od 600 dpi (TIF datoteka). Nastale slikovne datoteke korištene su u softverskom paketu WinFolia PRO (Regent Instruments Inc., Kanada), korištenjem opcije *Leaf Morphology*. Na svakom listu izmjereno je 10 morfoloških značajki (tablica 3, slika 2) pri čemu je točnost mjerenja iznosila 0,1 mm.



**Tablica 3.** Mjerene značajke lista.

Značajka	Oznaka
Površina lisne plojke	L01
Koeficijent oblika	L02
Dužina plojke	L03
Maksimalna širina plojke	L04
Dužina plojke, mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke	L05
Širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke	L06
Širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke	L07
Kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista, koja se nalazi na 10 % dužine plojke	L08
Kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista, koja se nalazi na 25 % dužine plojke	L09
Dužina peteljke	L10



**Slika 2.** Slikovni prikaz mjerenih značajki lista (Poljak 2014).

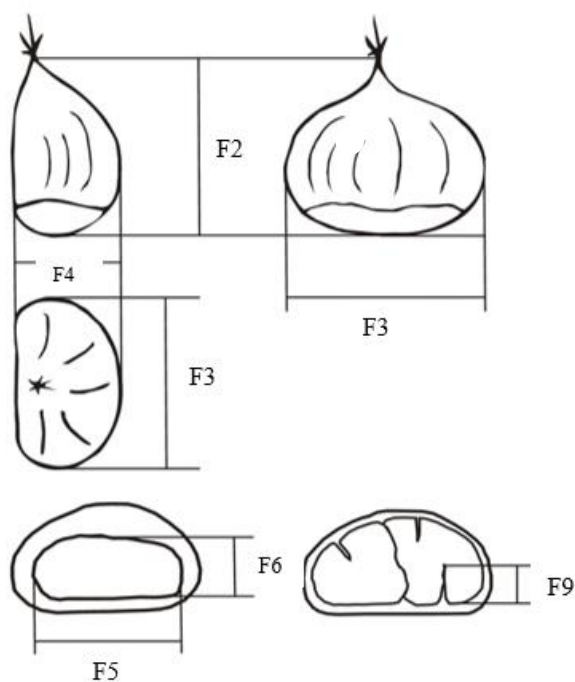
### 3.3.2. Materijal i metode za morfološku analizu plodova

Uzorci plodova za morfološku analizu sakupljeni su sa 144 stabla na području Lovrana, Lovrina i Cresa. Plodovi su sakupljeni u jesen, uz dopuštenje i pomoć lokalnih uzgajivača i vlasnika nasada na području Lovrana i otoka Cresa, dok su plodovi na području Lovrina sakupljeni bez posebnih uvjeta, s obzirom na zarasli karakter nasada. Sa svakog je stabla sakupljen veći broj plodova, između 10 i 50. Posebna je pažnja pridodana sakupljanju plodova koji su postranog položaja u ježicama, budući da su isključivo ti plodovi ulazili u morfološke analize, dok su središnji plodovi bili korišteni samo u analizama elementnog sastava jestivog dijela ploda.

Plodovi su sakupljeni u platnene vrećice, te im je odmah nakon sakupljanja određena masa. Plodovi su zatim čuvani u hladnjaku, te je u sljedećih nekoliko dana obavljena izmjera pomičnom mjerkom, s preciznošću od 0,1 mm. Na plodovima je izvana izmjereno šest, a na poprečnom presjeku tri značajke (tablica 4, slika 3).

**Tablica 4.** Mjerene značajke ploda.

Značajka	Oznaka
Masa ploda	F1
Visina ploda	F2
Širina ploda	F3
Debljina ploda	F4
Dužina hiluma	F5
Širina hiluma	F6
Broj sjemenki u plodu	F7
Broj ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku	F8
Dužina najdužeg ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku	F9



**Slika 3.** Slikovni prikaz mjerenih značajki ploda (Poljak 2014).

### 3.3.3. UPOV parametri procjene

Osim izmjere klasičnih morfoloških karakteristika, na plodovima maruna rađena je i procjena UPOV parametara. Riječ je o parametrima Međunarodne unije za zaštitu novih kultivara biljaka (eng. *Union for the Protection of New Varieties of Plants*), sa sjedištem u Ženevi (Švicarska). Misija Unije je dati jasne i opširne smjernice za opisivanje postojećih i novih kultivara poznatih kultiviranih biljaka. Odnosno, UPOV smjericama moguće je istražiti uniformnost, jedinstvenost i stabilnost svojstva od interesa uzgajane biljke i njezinih kultivara. U ovu se svrhu za svaku biljnu vrstu izdaje priručnik s detaljnim smjericama o pravilnom sakupljanju i izmjeri biljnog materijala, kao i svojstvima od interesa, te različitim ocjenama za izraženost (ili izostanak) pojedinog svojstva. U slučaju kultivara kestena, priručnik obuhvaća kultivare europskog pitomog kestena, kao i njegove među- i unutarvrstne hibride. Smjernice obuhvaćaju čak 39 svojstava, no u ovome je istraživanju odabrano devet značajki, kao i dvije dodatne značajke, prema odluci istraživača (tablica 5).

**Tablica 5.** Procijenjene UPOV značajke.

Značajka	Oznaka
Lakoća ljuštenja ploda	U01
Boja ploda	U02
Istaknute (izdignute) pruge na plodu	U03
Prisutnost tamnih pruga	U04
Dlakavost	U05
Boja sjemenke	U06
Sjaj ploda	U07
Oblik ploda	U08
Oblik hiluma	U09
Veličina hiluma	U10
Veličina ploda	U11

### 3.4. Materijal i metode za multielementnu analizu jestivog dijela ploda kestena

Plodovi sakupljeni s ranije navedene 144 jedinke korišteni su za utvrđivanje sastava elemenata u tragovima jestivog dijela ploda. Za navedene analize, plodovi su oljušteni i očišćeni od sjemene ljuske i vanjskog dijela ploda te su sjemenke odmah po ljuštenju samljevene u kuhinjskom procesoru (Gorenje, Velenje, Slovenija). Zatim je 2 g samljevenog, jestivog dijela ploda stavljeno u plastične Petrijeve zdjelice te su zdjelice označene. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi tri tjedna, tijekom kojih su se osušili. Ovom je metodom sušenja konačna veličina čestica bila od 0,5 do 1,5 mm. Nakon sušenja, uzorci su poklopljeni do daljnjih analiza.

Analiza multielementnog sastava jestivog dijela ploda provedena je u Ekološko-pedološkom laboratoriju Zavoda za ekologiju i uzgajanje šuma, na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Kao prvi korak pripreme osušenog uzorka, izvršeno je raščinjavanje kiselinskim reagensima u mikrovalnom sustavu za digestiju. Svaki uzorak odvagan je na 0,5 g ( $\pm 0,0100$ ) izravno u teflonskoj kiveri, prelivljen s 5 mL koncentrirane dušične kiseline ( $\text{HNO}_3$ , *p.a.*, 65 %) te 2 mL koncentriranog vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , *p.a.*, 36 %) nakon čega je mikrovalno potpomognuta mokra digestija u sustavu za digestiju Anton Paar Multiwave 3000 (Anton Paar, Austrija). Paralelno s uzorcima, tretirana je i slijepa proba procedure (5 mL  $\text{HNO}_3$  + 2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Kontrola kvalitete mjerenja provedena je paralelnom analizom certificiranog referentnog materijala za durum pšenicu CRM DUWF-1 (NRC-CNRC National Research Council, Kanada). Instrumentni parametri bili su sljedeći:  $t_{\max} = 200$  °C;  $P_{\max} = 1200$  W;  $p_{\max} = 60$  bar;  $\tau_{(\text{porast temperature})} = 20$  min,  $\tau_{(\text{trajanje ciklusa na maksimalnoj temperaturi})} = 20$  min,

$\tau_{(\text{hladenje})} = 20$  min. Nakon razaranja, svaka je priređena otopina kvantitativno prebačena u odmjerne tikvice volumena 100 mL (Nalgene, SAD), te je razrijeđena ultračistom vodom na točan volumen od 100 mL. Ovako priređene otopine prebačene su u scintilacijske posudice (20 mL) te su pohranjene u hladnjak, do određivanja odabranih kemijskih elemenata atomskom emisijskom spektroskopijom (eng. *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy*, ICP-AES), na uređaju Thermo Fischer iCAP6300 Duo (Thermo Scientific, SAD) (EPA 2014; Popović-Djordjević i sur. 2021).

### **3.5. Materijali i metode za fizikalna i kemijska istraživanja tla**

Uzorci tla korišteni za fizikalne i kemijske analize sakupljani su u 2019. godini. Kod svakog od 144 stabla izrađen je kompozitni uzorak tla: na sve četiri strane svijeta, u neposrednoj blizini debla, uklonjen je organski površinski sloj te je uzet uzorak tla do dubine od 10 cm i stavljen u istu plastičnu vrećicu. Ovako nastali kompozitni uzorci pri povratku u Ekološko-pedološki laboratorij stavljeni su na plastične podloške, rašireni u tankom sloju te ostavljeni da se suše na zraku tri tjedna. Nakon što su se osušili, uzorci su usitnjeni ručno u tarioniku te prosijani u dvije frakcije, 0,2 mm te 2 mm, prema normi ISO 11464 (ISO 2009) nakon čega su spremljeni za sve daljnje analize u plastične laboratorijske posudice.

#### **3.5.1. Fizikalne analize tla**

##### **3.5.1.1. Gravimetrijski udio vode u tlu (gswc)**

Gravimetrijski udio vode u tlu (eng. *gravimetric soil water content*, gswc) izračunat je prema normi ISO 11461 (ISO 2001). Između 10 i 15 g suhog tla frakcije od 2 mm odvučeno je u staklene posudice. Uzorci su sušeni u laboratorijskom sušioniku (Instrumentaria, Zagreb), u trajanju od 24 sata pri temperaturi od 105 °C. Uzorci su zatim stavljeni u eksikatore te pušteni da se posve ohlade, nakon čega su ponovo izvagani. Razlika u masi nakon drugog vaganja predstavlja gubitak vlage, odnosno postotni gravimetrijski udio vode, nakon dijeljenja inicijalne mase s masom osušenog tla i množenja sa 100.

### **3.5.1.2. Granulometrijski sastav uzoraka tla**

Granulometrijski sastav tla opisuje postotni sastav svake od osnovnih frakcija tla, koje sačinjavaju svaki tip tla: krupni i sitni pijesak, krupni i sitni prah te glina. Granulometrijska analiza tla provedena je sukladno metodi opisanoj u normi ISO 11277 (ISO 1998). Petnaest grama tla odvajano je u staklene laboratorijske čaše od 600 mL te je u čaše dodano 30 mL ultračiste vode te 30 mL 30 %-tne otopine vodikovog peroksida. Uzorci su zatim zagrijavani na laboratorijskom kuhalu, sve dok se sva organska tvar u uzorcima nije razorila. Uzorci su pušteni preko noći kako bi se sedimentirali, nakon čega je bistri supernatant uklonjen iz čaše, a preostali mineralni dio uzorka tla kvantitativno je prebačen u plastične boce. Nadalje, u boce je nadodano 25 mL otopine disperznog sredstva (otopina se priprema otapajući 33 g natrijeva heksametafosfata i 7 g natrijeva karbonata u odmjernoj tikvici volumena 1000 mL), te je sveukupni volumen u boci nadopunjen do volumena od 250 mL ultračistom vodom. Uzorci su zatim smješteni u metalne okvire i stavljeni na laboratorijsku miješalicu 24 sata. Najkrupnije frakcije, krupni (2,00-0,20 mm) te sitni (0,20-0,063 mm) pijesak, odvojeni su korištenjem laboratorijskih sita, dok je ostatak uzorka prebačen u staklene cilindre od 500 mL, koji su dopunjeni do 500 mL ultračistom vodom. Cilindri su stavljeni u stakleni spremnik s vodom na temperaturu 30 °C te su ručno miješani dvije minute, nakon čega su preostale frakcije pipetirane (Eijkelkamp, Nizozemska) u keramičke lončiče, u točno određenim vremenskim razmacima, prema službenim smjernicama ISO norme. Na ovaj su način pipetirane frakcije krupnog (0,063-0,020 mm) i sitnog (0,020-0,002 mm) praha, kao i gline (<0,002 mm). Svi uzorci u keramičkim lončičima stavljeni su na sušenje u sušionik na 105 °C, tijekom 24 sata, ohlađeni te izvagani. Udio svake individualne frakcije izračunat je prema formulama ISO norme 11277 (ISO 1998).

### **3.5.2. Kemijske analize tla**

#### **3.5.2.1. pH-vrijednost tla**

pH-vrijednost tla utvrđena je prema normi ISO 10390 (ISO 2005). Pet grama uzorka frakcije 2 mm odvajano je u plastične kivete u dva ponavljanja, tvoreći dvije identične serije uzoraka. Prvoj je seriji nadodano 25 mL ultračiste vode, dok je drugoj nadodano 25 mL otopine kalcijeva klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Kivete su zatim stavljene na laboratorijsku treskalicu na pet minuta te zatim ostavljene da se otopina stabilizira dva sata. pH-metar (Mettler Toledo, Švicarska) kalibriran je korištenjem puferских otopina samoga proizvođača, s poznatim

pH-vrijednostima, pH = 4,00 i pH = 7,00. Neposredno prije mjerenja, svaka je kiveta protresena rukom, zatim je uzorku ostavljeno kraće vrijeme da se staloži, te je u otopinu stavljena pH-elektroda, nakon čega je bila očitana pH-vrijednost.

### 3.5.2.2. Udio karbonata u tlu

Analiza udjela karbonata u tlu izvršena je volumetrijski, prema normi ISO 10693 (ISO 1995) na uzorcima tla čija je pH-vrijednost u otopini kalcijevog klorida bila veća od 5,5. Birete na Scheiblerovom kalcimetru (Eijkelkamp, Nizozemska) napunjene su ultračistom vodom te su uklonjeni svi zaostali mjehurići zraka. Preliminarno kvalitativno ispitivanje svakog uzorka tla provedeno je korištenjem male količine uzorka granulacije 2 mm. Uzorci su stavljani na satno stakalce te je na njih nakapano par kapi HCl. Ovisno o reakciji na satnom stakalcu odredila se masa uzorka za kvantitativno određivanje udjela karbonata u tlu. Općenito, između jednog i pet grama uzoraka izvagano je u Erlenmeyerove tikvice, u njih je nadodano 20 mL ultračiste vode te je umetnuta kiveta sa 7 mL HCl ( $c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Na isti su način, ali bez uzoraka, napravljene i slijepe probe. Također, na isti su način napravljena i dva standarda, korištenjem 0,2 g i 0,4 g čistog  $\text{CaCO}_3$ . Tikvice su zatim postavljene na kalcimetar te začepljene silikonski čepovima. Svaka je tikvica pažljivo izmiješana, čime je HCl iz kivete došao u dodir s tlom te je, u slučaju prisutnosti karbonata u uzorku, oslobođen  $\text{CO}_2$ , čime je razina vode u biretama padala (usporedno s tim padom, potrebno je spuštati i kompenzacijsku posudu). Nakon stabilizacije nivoa vode u bireti (mućkati ne duže od jednog sata), volumen otpuštenog  $\text{CO}_2$  (mL) je očitao. Udio karbonata izračunat je prema formuli definiranoj ISO normom 10693 (ISO 1995).

### 3.5.2.3. Ukupni organski ugljik (TOC) i ukupni dušik (TN)

Analiza ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) i dušika (eng. *total nitrogen*, TN) provedena je prema normama ISO 10694 (ISO 1995) i ISO 13878 (ISO 1998), korištenjem metode suhog spaljivanja. 10 – 50 mg uzorka tla frakcije 0,2 mm odvađeno je u kositrene kapsule. Uzorci su zatim spaljeni na 900 °C u CN elementnom analizatoru (Thermo Scientific, SAD), u helijem zasićenoj inertnoj atmosferi, s dotokom kisika. Ovim je načinom sav prisutan ugljik oksidirao u  $\text{CO}_2$ , dok su se dušične forme reducirale u elementarni dušik. Otpušteni plinovi razdvojeni su u frakcijskim kolonama i detektirani detektorom termalnog konduktiviteta. Na ovaj je način odmah poznata vrijednost ukupnog dušika, dok su

vrijednosti ukupnog organskog ugljika izračunate iz razlike u razini detektirane detektorom te razine prethodno utvrđene analizom udjela karbonata.

### 3.5.3. Multielementna analiza tla

Za multielementnu analizu tla korišteni su uzorci frakcije 0,2 mm, a sama je metoda izvršena prema metodi US EPA 3051A (EPA 2007). Kao prvi korak analize, izvršeno je raščinjavanje kiselinskim reagensima u mikrovalnom sustavu za digestiju. Svaki uzorak je, u teflonskoj kivetu, odvagano na masu od 0,1000 g. Nadalje, uzorci su prelivevani sa 7,5 mL koncentrirane klorovodične kiseline (HCl, *p.a.*, 36,5 %) te 2,5 mL koncentrirane dušične kiseline (HNO<sub>3</sub>, *p.a.*, 65 %) čime je zlatotopka priređena *in situ*. Kao slijepa proba procedure, korištena je također zlatotopka, dok je za kontrolu kvalitete mjerenja bio korišten certificirani referentni materijal za tla NCS D87104 (NCS Testing Technology Co., Kina). Razaranje uzoraka tla, potom, provedeno je u mikrovalnom sustavu Anton Paar Multiwave 3000 (Anton Paar, Austria). Parametri ciklusa razaranja bili su:  $t_{\max} = 200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $P_{\max} = 1200 \text{ W}$ ;  $p_{\max} = 60 \text{ bar}$ ;  $\tau_{(\text{porast temperature})} = 20 \text{ min}$ ,  $\tau_{(\text{trajanje ciklusa na maksimalnoj temperaturi})} = 20 \text{ min}$ ,  $\tau_{(\text{hlađenje})} = 20 \text{ min}$ . Nakon razaranja, svaka je otopina kvantitativno prebačena u polipropilenske odmjerne tikvice volumena 100 mL (Nalgene, SAD), te je razrijeđena ultračistom vodom na točan volumen od 100 mL. Alikvotni dijelovi (10 mL) tako priređenih otopina zatim su prebačeni u kivete, centrifugirani na 3000 o/s, na uređaju Tehtnica centric 322A (Tehtnica, Slovenija), u trajanju od 20 minuta, te završno razrijeđene 10× ultračistom vodom. Otopine su u scintilacijskim posudama bile pohranjene u hladnjaku do provedbe određivanja elemenata u tragovima atomskom emisijskom spektrometrijom, na uređaju Thermo Fischer iCAP6300 Duo (Thermo Scientific, SAD) (EPA 2014; Roje i sur. 2018).



### 3.6. Statistička obrada podataka

#### 3.6.1. Genetička raznolikost

Nakon provedenih analiza molekularne raznolikosti i klonalnosti nasada, te analizirane srodnosti između genotipiziranih stabala pitomoga kestena, utvrđene su tri genetički odijeljene grupe unutar cjelokupnog uzorka. Grupa 1 (G1) predstavljala je jedinke klonalnog podrijetla (marune), grupa 2 (G2) hibridne jedinke (križance maruna i divljih stabala), dok je grupa 3 (G3) obuhvaćala divlja stabla (vidi Rezultate).

Broj jedinstvenih genotipova u tri analizirane grupe maruna identificiran je korištenjem softvera GenClone 2.089. Za svaki mikrosatelitni lokus, broj alela po lokusu ( $N_a$ ), informativni sadržaj polimorfizma ( $PIC$ ) te vjerojatnost identiteta ( $PI$ ) bili su izračunati korištenjem softvera Cervus v3.090. Efektivni broj alela ( $N_e$ ) izlučen je iz očekivane heterozigotnosti ( $H_E$ ), korištenjem slijedeće formule:  $N_e = 1/(1 - H_E)$ . Aleli, čija je frekvencija bila ispod 0,05 (5 %), smatrani su manjinskim (minornim) alelima. Svi istraživani genetički parametri izračunati su na dvije razine: za sva stabla (219 jedinki), kao i za neponavljajuće genotipove, odnosno jedinstvene genotipove (141 jedinka). Kako bi bila provjerena značajnost razlika u vrijednostima  $N_a$ ,  $N_{ma}$  (broj manjinskih alela),  $N_e$  i  $PIC$  između EST-SSR i SSR biljega, neparametrijski Wilcoxon test je proveden korištenjem softvera SAS v9.391.

Raznolikost alela u svakoj grupi ispitana je izračunavanjem prosječnog broja alela po lokusu ( $N_{av}$ ), bogatstvu alela ( $N_{ar}$ ), kao i brojem privatnih alela ( $N_{pra}$ ). Korišten je softver FSTAT v2.9.3.2 u izračunavanju bogatstva alela ( $N_{ar}$ ; broj alela po lokusu, bez obzira na veličinu uzorka). Klonalna raznolikost grupe procijenjena je izračunavanjem broja multilokusnih genotipova ( $N_c$ ), genotipskog bogatstva ( $R$ ) te Simpsonovog komplementarnog indeksa ( $D^*$ ) korištenjem softvera GenClone v2.089. Genetička raznolikost grupa ispitana je procjenom zapažene ( $H_O$ ) te očekivane ( $H_E$ ) heterozigotnosti, korištenjem softvera GENEPOP v4.096, isključujući pritom redundantne genotipove iz svake od tri grupe. Genetičke udaljenosti između multilokusnih genotipova izračunate su u softveru MICROSAT97, korištenjem udaljenosti između proporcija zajedničkih alela ( $D_{psa}$ ). Stablo nastalo metodom udruživanja susjeda (eng. *neighbour-joining tree*) izrađeno je u softveru PHYLIP v3.69899. Za izradu stabla korištena je vrijednost 1000 *bootstrap* replikacija stvorenih u softveru te zatim korištenih u programima NEIGHBOR i CONSENSE, unutar softvera PHYLIP. Diferencijacija grupa procijenjena je izračunavanjem uparenih  $F_{ST}$  procjena u programu FSTAT.  $P$ -vrijednosti izračunate su nakon 10.000 slučajnih permutacija. Softver ARLEQUIN v3.5.2.2101 bio je

korišten u analizi molekularne varijance (AMOVA), razdjeljivanjem sveukupne mikrosatelitne raznolikosti između i unutar grupa maruna. Razina značajnosti  $\varphi_{ST}$  bila je utvrđena neparametrijskim testom randomizacije s 10.000 permutacija.

Genetička struktura marunskih grupa u istraživanju ispitana je korištenjem programa STRUCTURE v2.3.4103. Izvedeno je 30 ponavljanja analize, s brojem klastera u rasponu od jedan do 11, na računalnom klasteru Isabella, u Sveučilišnom računalnom centru (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu. Svako ponavljanje sastojalo se od *burn-in* razdoblja od 200.000 koraka, nakon kojeg su slijedila  $10^6$  ponavljanja algoritma MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), korištenjem modela primjese (eng. *admixture*), s koreliranim frekvencijama alela. Optimalan broj klastera utvrđen je izračunavanjem  $\Delta K_{49}$ , MedMeaK, MaxMeaK, MedMedK i MaxMedK50 vrijednosti, kako je primijenjeno u programu StructureSelector, koji integrira program CLUMPAK, koji se koristi za klasteriranje i združivanje podataka iz neovisnih ponavljanja.

Metoda najveće vjerojatnosti primijenjena u programu ML-Relate korištena je u izračunu sparene procjene srodnosti ( $r$ ) genotipa M001 i svih ostalih stabala, u sve tri grupe, kao i za razdjeljivanje svih stabala u četiri moguće skupine rodbinskih odnosa: nesrodni (U, eng. *unrelated*), polusrodnici (HS, eng. *half-siblings*), puni srodnici (FS, eng. *full-siblings*) te roditelj-potomak (PO, eng. *parent-offspring*).

### 3.6.2. Morfološka raznolikost i pedološke značajke

Pearsonov koeficijent korelacije bio je izračunat za sve parove kvantitativnih značajki morfologije lista i ploda, te karakteristika tla, uključujući sva stabla zajedno, te razdvojeno po grupama, korištenjem procedure CORR, u softveru SAS v9.3 (SAS Institute 2011).

Razlike u kvantitativnim karakteristikama lista i ploda između grupa istražene su analizom varijance (ANOVA), kao i Tukeyevim HSD testom. Također, provedena je linearna regresijska analiza između značajki lista i ploda te karakteristika ploda za cijeli skup podataka, kao i unutar svake grupe zasebno, čime je ispitana homogenost regresijskih nagiba između grupa. Naposljetku, analiza kovarijance (ANCOVA) provedena je korištenjem svake značajke tla zasebno kao kovarijance u modelu. Svi testovi provedeni su GLM procedurom u softveru SAS.

Shannonov informacijski indeks je korišten kao mjera fenotipske raznolikosti 11 kvalitativnih UPOV karakteristika ploda. Indeks je korišten i kao mjera sveukupne raznolikosti ( $H_T$ ) svake od karakteristika, kao i raznolikost unutar svake grupe ( $H_G$ ) te prosječne raznolikosti

između pojedinih stabala unutar grupa ( $H_{GA}$ ). Na temelju ovih podataka, utvrđene su proporcije raznolikosti između grupa ( $1 - H_{GA}/H_T$ ) kao i unutar svake pojedine grupe ( $H_{GA}/H_T$ ). Kako bi se ispitale značajnosti razlika u  $H_G$  između grupa, provedeni su neparametrijski testovi (Kruskal-Wallis i Wilcoxon test) korištenjem softvera SAS. Kruskal-Wallis test korišten je kako bi se usporedili medijani sve tri grupe (G1, G2, G3), dok je Wilcoxon test korišten kako bi se testirao svaki par skupina (G1 vs. G2, G1 vs. G2, G2 vs. G3).

Hi-kvadrat test omjera vjerojatnosti upotrijebljen je kako bi se ispitale razlike u broju jedinki koje posjeduju određeno svojstvo unutar grupe. Značajnost asocijacije istražena je izračunom Cramerovog  $V$  (Cramér 1946), mjere čija je maksimalna vrijednost 1, kada su dvije varijable identične.

Analiza glavnih sastavnica provedena je odvojeno za tlo, list i plod, korištenjem PRINCOMP procedure u softveru SAS (SAS Institute 2011). Euklidske udaljenosti između svih parova, izračunate na temelju prve dvije vrijednosti glavnih sastavnica za karakteristike i značajke tla, ploda i lista, korištene su za izradu matrice pedoloških i morfoloških (za list i za plod) različitosti između individualnih stabala. Genetičke udaljenosti između individualnih stabla izračunate su na temelju 15 mikrosatelitnih biljega, korištenjem proporcije zajedničkih alela (DPSA) u softveru MICROSAT. Korelacije između matrica genetičkih udaljenosti te pedoloških i morfoloških (za list i za plod) različitosti su analizirane Mantel testom. Razina značajnosti izračunata je nakon 10.000 permutacija u softveru NTSYS-pc v. 2.21L.

Diskriminantna analiza je provedena kako bi se utvrdilo koja je od 19 značajki lista i ploda najkorisnija u maksimalnoj diskriminaciji između istraživanih grupa: maruna, marušnjaka i divljih stabala. Procedure STEPDISC, DISCRIM i CANDISC softvera SAS upotrijebljene su u ovu svrhu.

### **3.6.3. Multielementni sastav jestivog dijela ploda kestena i tla**

Procedura CORR u programu SAS v9.3 (SAS Institute 2011) korištena je u izračunu Pearsonovog koeficijenta korelacije između udjela elemenata (Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Sr, Ti, V, Zn) utvrđenih u uzorcima tla te u sjemenkama pitomog kestena i maruna. Nadalje, Pearsonov koeficijent korelacije izračunat je između svih izmjerenih elemenata u sjemenkama te svih izmjerenih elementima u uzorcima tla, i to na razini sveukupnog uzorka (sva stabla), te na razini pojedine grupe uzoraka (G1, G2, G3).

Razlike u udjelu elemenata (Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Sr, Ti, V, Zn) u sjemenkama između grupa (G1, G2, G3) bile su utvrđene analizom varijance (ANOVA), kao i

Tukeyevim HSD testom. Linearne regresijske analize provedene su na cijelom skupu podataka, kao i unutar svake od tri grupe odvojeno. Provjerena je također i homogenost regresijskog nagiba između grupa. Analiza kovarijance (ANCOVA) provedena je između grupa za svaki element, korištenjem vrijednosti njegovog udjela u tlu kao kovarijable u modelu. Osim toga, analiza varijance (ANOVA) provedena je i za one elemente koji su utvrđeni u sjemenkama, ali ne i u uzorcima tla (Cd, Mo, Na, Tl). Sve analize provedene su korištenje procedure GLM u programu SAS.

Podaci o kemijskom sastavu sjemenki podvrgnuti su diskriminantnoj analizi (DA), u cilju odabira elemenata s najboljom diskriminirajućom sposobnošću između grupa (G1, G2, G3). Korištene su procedure STEPDISC, DISCRIM te CANDISC programa SAS.

## 4. Rezultati

### 4.1. Rezultati istraživanja genetičke raznolikosti

#### 4.1.1. Genetička raznolikost

Svih 15 korištenih mikrosatelitnih biljega pokazalo se polimorfniima, s ukupno umnoženih 86 alela, odnosno 52 alela utvrđena su korištenjem SSR početnica te 34 alela pomoću EST-SSR početnica. Mikrosatelitna raznolikost analizirana je na dvije razine, za 219 genotipiziranih jedinki (ALL), kao i za 141 neredundantna (multilokusna) (MLG) genotipa.

Broj alela po lokusu ( $N_a$ ) varirao je između biljega, te se kretao u rasponu od 12 (CsCAT6) do dva (FIRO30). SSR početnice pokazale su se značajno varijabilnijim, s prosječnim brojem alela od 8,667, za razliku od prosječnog broja od 3,778, zabilježenog u EST-SSR početnica (tablica 6). Efektivni broj alela ( $N_e$ ) također je bio viši u SSR skupine, i to na obje razine, odnosno za grupu uzoraka ALL, kao i MLG, s pripadajućim prosječnim vrijednostima od 2,444, odnosno 2,695. Ipak, efektivni broj alela nije se pokazao značajno različitim kada se uspoređuju dvije grupe biljega, SSR i EST-SSR. Broj minornih alela ( $N_{ma}$ ), odnosno alela s učestalošću nižom od 5 %, bio je značajno viši u SSR grupi, s prosječnim vrijednostima od 5,500 u grupi uzoraka ALL, te 5,167 za grupu MLG, u usporedbi s vrijednostima za EST-SSR, koje su iznosile 0,778, odnosno 0,667.

*PIC* (informacijski sadržaj polimorfizma) izračunat je za obje grupe uzoraka te se za ALL grupu kretao u rasponu od 0,052 (FIR030) do 0,708 (CsCAT3), dok je za MLG grupu bio prevladavajuće viših vrijednosti, unutar raspona od 0,013 (EMCs15) do 0,785 (CsCAT3). Nadalje, u MLG grupi tri su početnice demonstrirale niže *PIC* vrijednosti od onih u grupi ALL (WAG004, POR026, EMCs15), dok je početnica FIR030 imala identičnu *PIC* vrijednost u obje skupine uzoraka (0,052). Najinformativniji lokusi u grupi uzoraka MLG bili su PIE228 i CsCAT3, s *PIC* vrijednostima iznad 0,7, dok je osam lokusa (OAL NED, PIE260, PIE233, CsCAT6, PIE227, POR009, CsCAT1 i CsCAT16) bilo umjereno informativno, s rasponom *PIC* vrijednosti od 0,412 do 0,691. U ALL grupi uzoraka, samo je lokus CsCAT3 bio visoko informativan (0,708), dok je istih osam lokusa pokazalo umjerenu razinu informativnosti. Uspoređujući *PIC* vrijednosti između dviju skupina biljega, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima.

**Tablica 6.** Deskriptivna svojstva 15 analiziranih lokusa za sveukupni uzorak od 219 jedinki (ALL) te skupinu neredundantnih jedinki (MLG).

Lokus	Skupina početnica	Raspon duljina umnoženih ulomaka	All				MLG		
			$N_a$	$N_{ma}$	$N_e$	$PIC$	$N_{ma}$	$N_e$	$PIC$
CsCAT6	SSR	158-194	12	9	2,963	0,602	9	3,392	0,639
CsCAT1	SSR	194-228	9	5	3,662	0,678	5	4,073	0,682
CsCAT16	SSR	121-217	10	6	3,564	0,668	5	4,167	0,691
CsCAT3	SSR	212-256	11	7	3,934	0,708	6	5,373	0,785
EMCs15	SSR	81-93	5	3	1,242	0,187	3	1,396	0,013
OAL	SSR	299-331	5	3	1,984	0,406	3	1,840	0,412
WAG11	EST-SSR	217-231	3	1	1,361	0,233	1	1,593	0,326
PIE233	EST-SSR	162-168	3	0	2,322	0,488	0	2,352	0,504
PIE228	EST-SSR	175-193	6	1	3,720	0,684	1	4,515	0,718
PIE227	EST-SSR	158-179	5	0	2,979	0,603	0	3,671	0,664
WAG004	EST-SSR	260-272	4	2	1,874	0,392	1	1,610	0,368
POR009	EST-SSR	120-128	4	0	3,251	0,634	0	3,679	0,671
FIR030	EST-SSR	168-172	2	1	1,056	0,052	1	1,089	0,052
POR026	EST-SSR	139-151	4	2	1,902	0,376	2	1,736	0,337
PIE260	EST-SSR	153-165	3	0	2,088	0,435	0	1,990	0,439
PROSJEK	SSR		8,667	5,500	2,444	0,542	5,167	2,695	0,537
	EST-SSR		3,778	0,778	1,972	0,433	0,667	2,029	0,453

$N_a$  – broj alela po lokusu

$N_{ma}$  – broj minornih alela

$N_e$  – efektivan broj alela

$PIC$  – informacijski sadržaj polimorfizma

#### 4.1.2. Raznolikost nasada i klonalnost

Raznolikost nasada analizirana je u tri uzorkovane populacije: P1 (Lovrin), P2 (Lovran) te P3 (Cres), s pripadajućim brojem analiziranih stabala od 44, 83 te 92 (tablica 7). Unutar nasada, vizualno je bilo moguće utvrditi stabla klonalnog podrijetla, s obzirom da su te jedinke cijepljene te su mjesta cijepa vidljiva, a često i zadebljana. Osim cijepljenih stabala, na sve su tri lokacije nađene i jedinke bez vidljivih mjesta cijepljenja. Budući da je moguće da se mjesto cijepa vizualno ne može utvrditi, sva su stabla podvrgnuta analizi mikrosatelita i klonalnosti, kako bi se utvrdile razine klonalnosti unutar svake analizirane lokacije. Najviši broj alela po lokusu ( $N_{av}$ ) utvrđen je u P1 (5,267), a ovaj se nasad istaknuo i najvišom razinom bogatstva alela ( $N_{ar}$ ) (5,267). Osim toga, u P1 pronađen je i najveći broj privatnih alela ( $N_{pra}$ ), čak 15, dok je u P2 i P3 taj broj bio značajno manji, samo tri, odnosno samo četiri alela.

Sveukupno je utvrđen 141 multilokusni genotip ( $N_g$ ), s najvećom brojnošću u P3 (84), osrednjom u P1 (44) te najnižom u P2 (17). Najbrojniji genotipovi, čije su sve ramete imale vidljiva mjesta cijepa, bili su genotipovi iz grupe M001-M005, s uočljivom prevlašću genotipa M001. Ovaj je genotip pronađen u nasadima grupa P2 i P3, gdje je predstavljao 78,31 %, odnosno 3,26 %, ukupnog uzorka nasada. S druge strane, klonovi grupe M002-M005 predstavljali su 2,27 %, 6,02 % i 9,78 % pripadajućeg ukupnog uzorka u P1, P2, i P3. Zbog izrazite prevlasti u ukupnome uzorku, genotipska grupa M001-M005 nazvana je “marunskom grupom” te je korištena u daljnjim, detaljnijim analizama. Broj jedinstvenih genotipova ( $N_{ug}$ ) iznosio je 136, a većina je utvrđena u P3 (80), gdje su ovi genotipovi predstavljali 86,96 % ukupnog uzorka. Nadalje, 43 jedinstvena genotipa predstavljala su 97,73 % ukupnog uzorka u P1, ukazujući na visoku raznolikost u ove dvije lokacije istraživanja. S druge strane, P2 je bila okarakterizirana malim brojem jedinstvenih genotipova (13), te su ovi genotipovi u ukupnom uzorku sačinjavali samo 15,66 %. Osim toga, u P2 pronađen je i najveći broj cijepljenih stabala, čime je nizak broj jedinstvenih genotipova dodatno objašnjen, budući da je riječ prvenstveno o M001 klonovima. Također, ova je činjenica dodatno podržana vrijednostima genotipskog bogatstva ( $R$ ) te Simpsonovog komplementarnog indeksa ( $D^*$ ), mjera koje se koriste za iskazivanje raznolikosti te se kreću u rasponu od nule (najmanja raznolikost) do jedan (najveća raznolikost). U P2, vrijednosti ovih mjera bile su niske, 0,195 i 0,388. Za razliku od P2, najraznolikija grupa P1 imala je vrijednost od 1,000 za obje mjere raznolikosti. U sve je tri skupine očekivana heterozigotnost ( $H_E$ ) bila niža od zapažene ( $H_O$ ), ukazujući na visoke razine genetičke varijabilnosti, kao što je potvrđeno i prethodno navedenim rezultatima.

**Tablica 7.** Mikrosatelitna raznolikost i klonalnost analiziranih populacija: P1 – Lovrin; P2 – Lovran; P3 – Cres.

Populacija	Lokacija	$n$	$N_{av}$	$N_{ar}$	$N_{pra}$	$N_g$	$n_{c(M001)}$	$n_{c(M001)} (\%)$	$n_{c(M002-M005)}$	$n_{c(M002-M005)} (\%)$	$N_{ug}$	$n_{c(ug)} (\%)$	$R$	$D^*$	$H_O$	$H_E$
P1	Lovrin	44	5,267	5,267	15	44	0	0,00	1	2,27	43	97,73	1,000	1,000	0,609	0,571
P2	Lovran	83	3,467	2,942	3	17	65	78,31	5	6,02	13	15,66	0,195	0,388	0,737	0,490
P3	Cres	92	3,933	3,665	4	84	3	3,26	9	9,78	80	86,96	0,912	0,996	0,580	0,516
Ukupno		219			22	145	68		15		136					

$n$  – veličina uzorka

$N_{av}$  – prosječan broj alela po lokusu

$N_{ar}$  – bogatstvo alela

$N_{pra}$  – broj privatnih alela

$N_g$  – broj multilokusnih genotipova

$n_{c(M001)}$  – broj rameta M001

$n_{c(M001)} (\%)$  – % uzorka koji predstavljaju ramete M001

$n_{c(M002-M005)}$  – broj rameta klonalne grupe M002-M005

$n_{c(M002-M005)} (\%)$  – % uzorka koji predstavljaju ramete M002-M005

$N_{ug}$  – broj jedinstvenih genotipova

$n_{c(ug)} (\%)$  – % uzorka koji predstavljaju jedinstveni genotipovi

$R$  – genotipsko bogatstvo

$D^*$  – Simpsonov komplementarni indeks

$H_O$  – zapažena heterozigotnost

$H_E$  – očekivana heterozigotnost



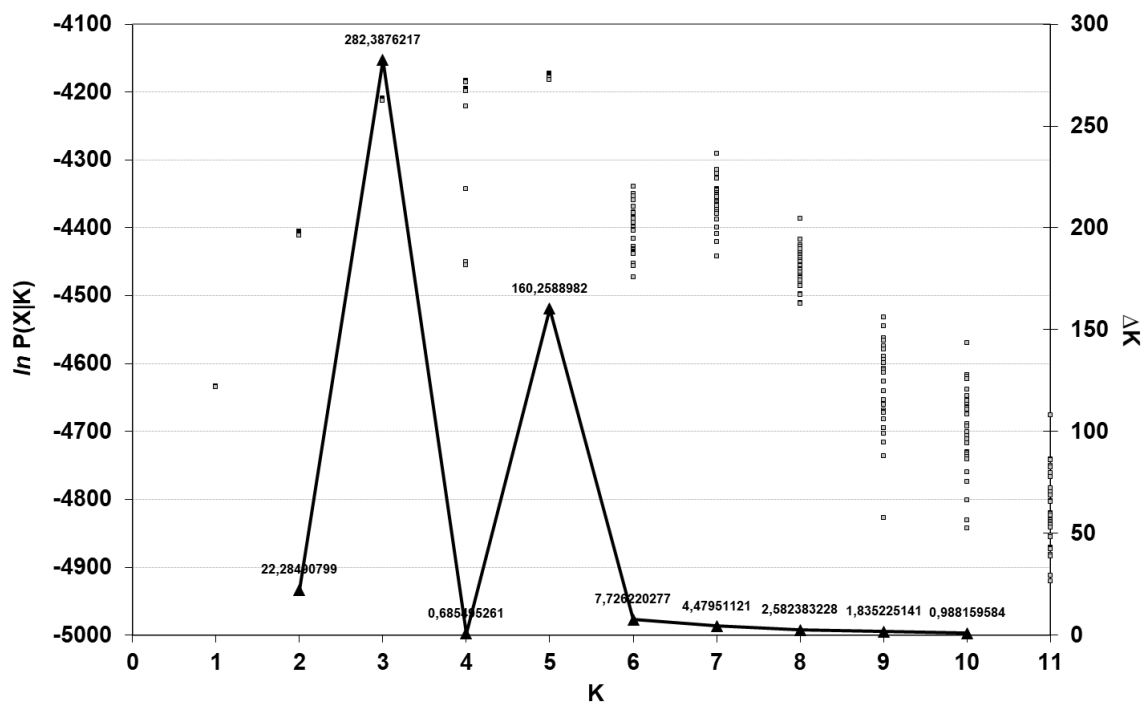
### 4.1.3. Genetička udaljenost, razdvajanje i struktura populacija

Vrijednosti genetičke diferencijacije populacija,  $F_{ST}$ , bile su statistički značajne između svih parova populacija. Najviša  $F_{ST}$  vrijednost zabilježena je između P1 i P2 ( $F_{ST} = 0,151$ ;  $P < 0,001$ ), dok je slična  $F_{ST}$  vrijednost zabilježena i između P2 i P3 ( $F_{ST} = 0,111$ ;  $P < 0,001$ ). S druge strane, najniža  $F_{ST}$  vrijednost bila je ona za populacijski par P1 i P3 ( $F_{ST} = 0,066$ ;  $P < 0,001$ ). Nadalje, analiza molekularne varijance (AMOVA) pokazala je statistički značajne razlike između populacija, s 10,83 % ukupne varijabilnosti pripisane međupopulacijskoj, te 89,17 % unutarpopulacijskoj varijabilnosti (tablica 8).

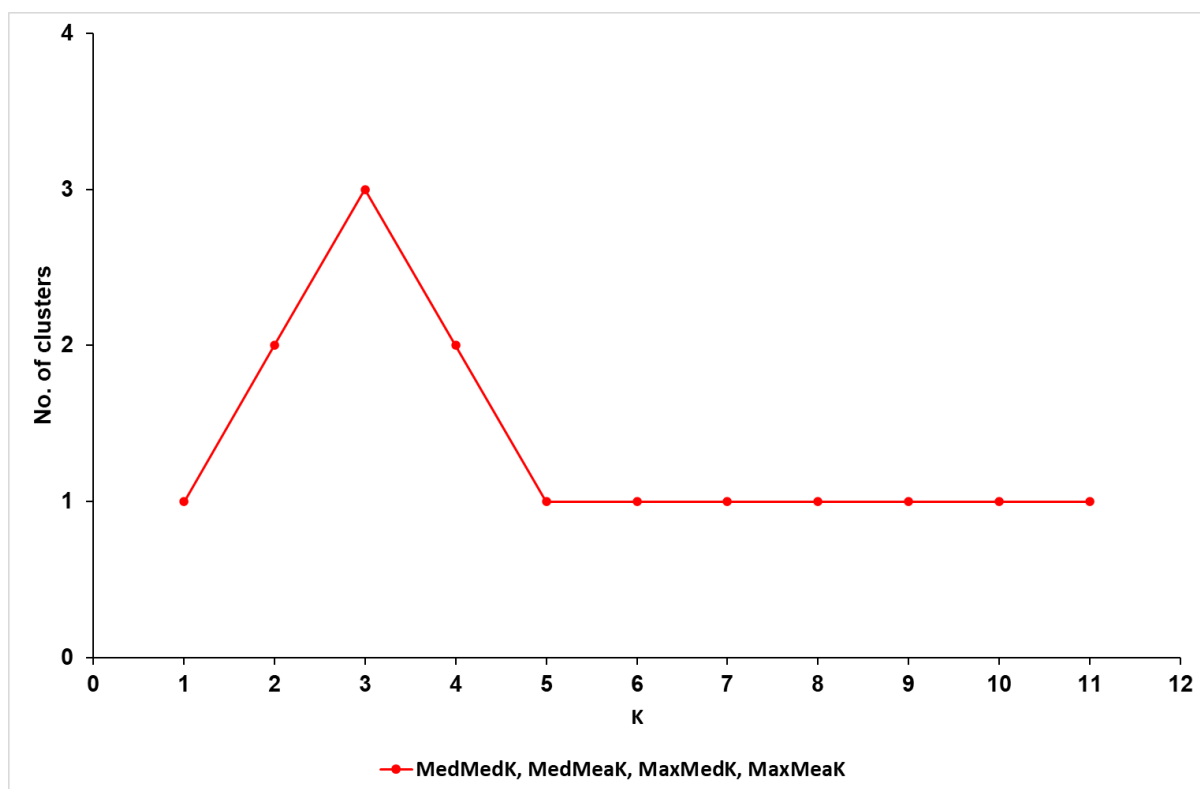
**Tablica 8.** Analiza molekularne varijance (AMOVA).

Izvor varijabilnosti	$df$	Sastavnica varijance	Ukupna varijabilnost %	$f_{ST}$	$P$
između populacija	2	0,450	10,83	0,108	< 0,0001
unutar populacija	435	3,705	89,17		

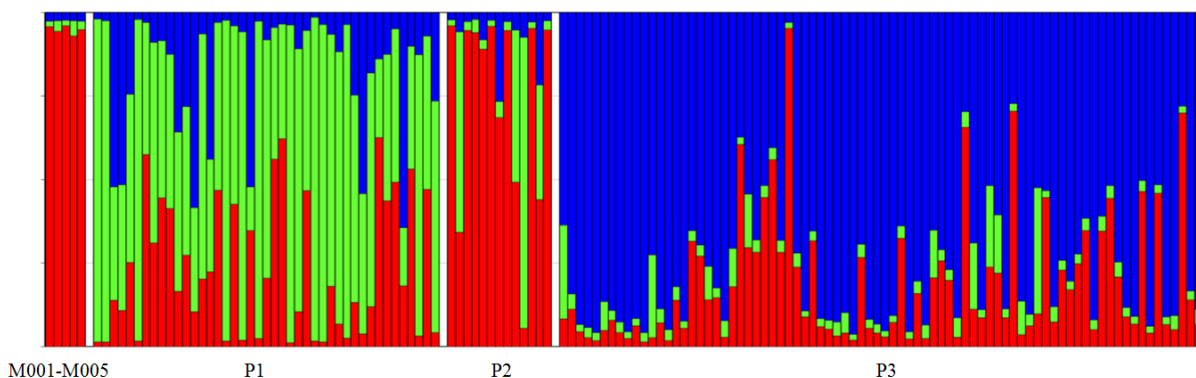
Kako bi se utvrdila distribucija genotipova unutar tri populacije, kao i genetička srodnost između 141 multilokusna genotipa, provedena je STRUCTURE analiza. Kao optimalan broj klastera ( $K$ ), odabran je  $K = 3$ , koji je utvrđen izračunom  $\Delta K$  (slika 4), kao i pomoću MedMeaK, MaxMeaK, MedMedK i MaxMedK funkcija programa StructureSelector (slika 5). Genotipovi M001-M005 grupirali su se zajedno s većinom genotipova iz P2, unutar klastera A (slika 6), tvoreći time klaster od 14 genotipova. S druge strane, klaster B obuhvatio je 15 jedinki i prvenstveno su ga sačinjavale jedinke iz populacije P1, dok je većina jedinki iz P3 tvorila klaster C, s ukupno 46 jedinki. Populacija P1 bila je ponajviše mješovitog podrijetla, s 29 jedinki (67,44 %) čija je vjerojatnost pripadanja bila manja od 75 % ( $Q < 75 \%$ ) za svaki od tri klastera, dok je populacija P2 bila najhomogenija, sa samo četiri jedinke (30,77 %) mješovitog podrijetla. Sveukupno gledano, najviši broj jedinki miješanog podrijetla, njih čak 28, imalo je vjerojatnost pripadanja manju od 75 % ( $Q < 75 \%$ ) za klaster C, te su pripadale populaciji P3.



**Slika 4.** Utvrđivanje vrijednosti K, najvjerojatnijeg broja klastera, korištenjem softvera STRUCTURE, na temelju analize mikrosatelitnih biljega svih 219 jedinki.

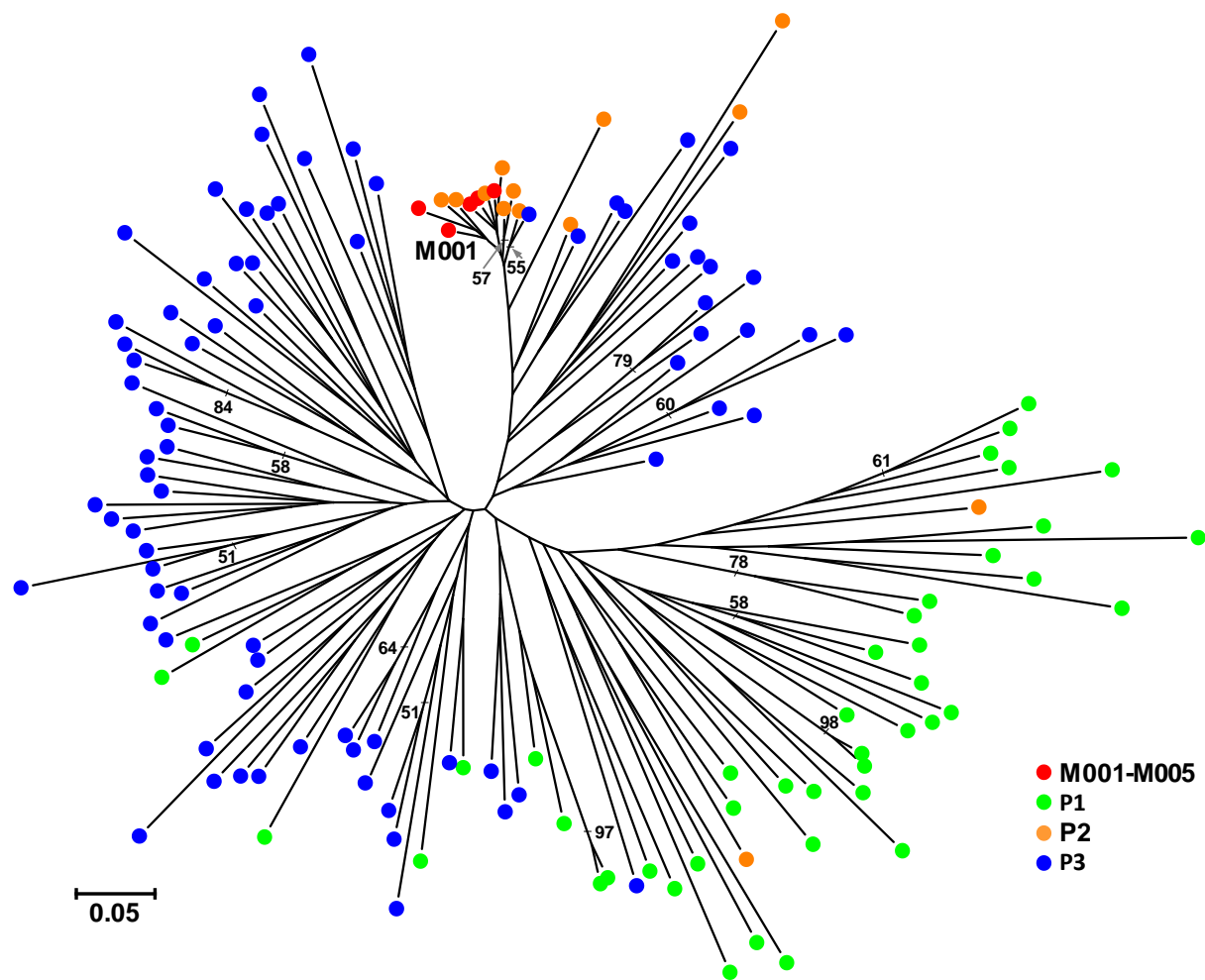


**Slika 5.** Optimalan broj klastera izračunat pomoću MedMeaK, MaxMeaK, MedMedK i MaxMedK, dobiven kroz program StructureSelector.



**Slika 6.** Genetička struktura 141 multilokusnog genotipa (MLG), utvrđenih analizom 219 jedinki, prema procjeni analize STRUCTURE, za broj klastera  $K = 3$ . Svaki je MLG predstavljen stupcem, dok su klasteri definirani bojama: klaster A crvenom bojom, klaster B zelenom te klaster C plavom bojom.

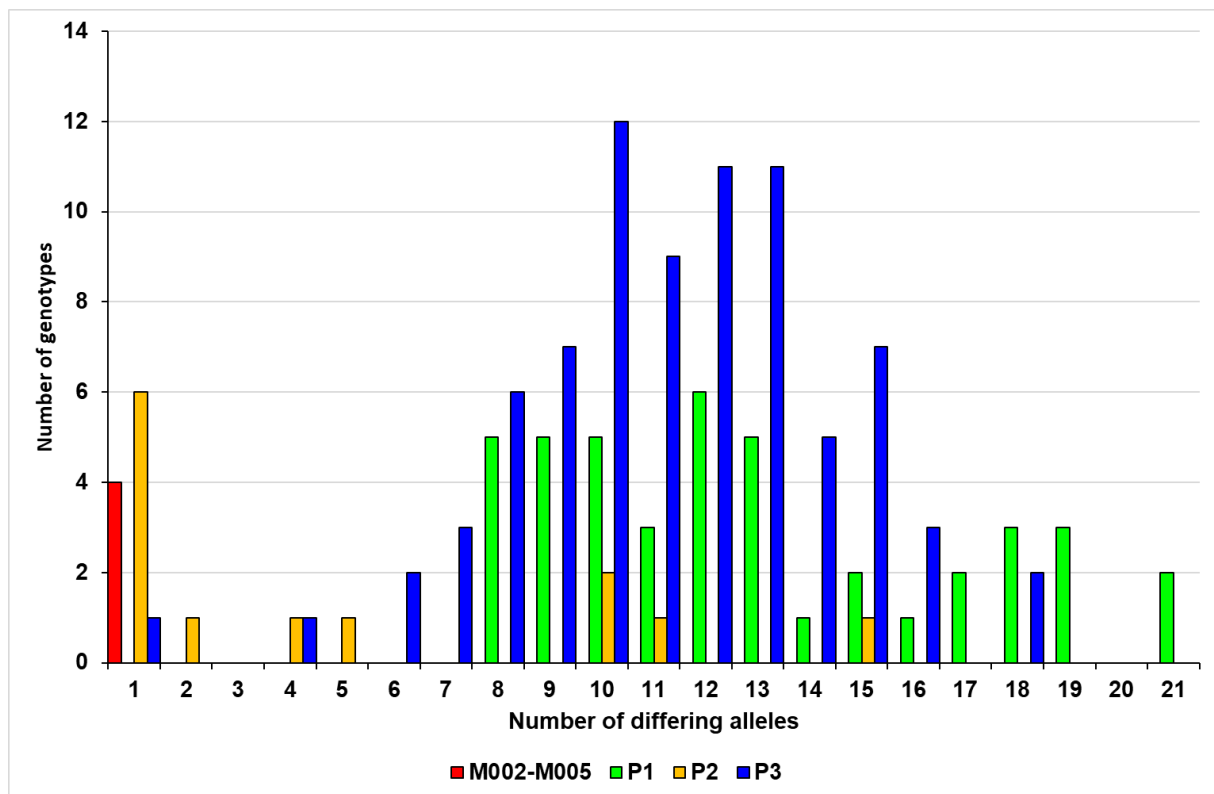
U svrhu dodatne analize strukture populacija istraživanih genotipova, izrađeno je neukorijenjeno stablo nastalo združivanjem susjeda (eng. *Unrooted neighbour-joining tree*) (slika 7). Rezultati ove analize potvrđuju rezultate prethodno opisane STRUCTURE analize. Genotipovi M001-M005 također su se grupirali s jedinkama iz populacije P2, dok su se P1 i P3 izdvojile u zasebne klastere, sa samo manjim područjem preklapanja.



**Slika 7.** Nezakorijenjeno stablo nastalo na temelju podataka o raznolikosti mikrosatelitnih biljega 141 jedinke multilokusnih genotipova kestena analiziranih u ovome istraživanju. Marunska (klonalna) grupa M001-M005, kao i populacija kojoj pojedina jedinka pripada (P1, P2, P3) naznačene su na svakoj grani stabla. Brojevi iznad grana predstavljaju pripadajuće *bootstrap* vrijednosti iznad 50 %, u 1000 pseudoreplikacija.

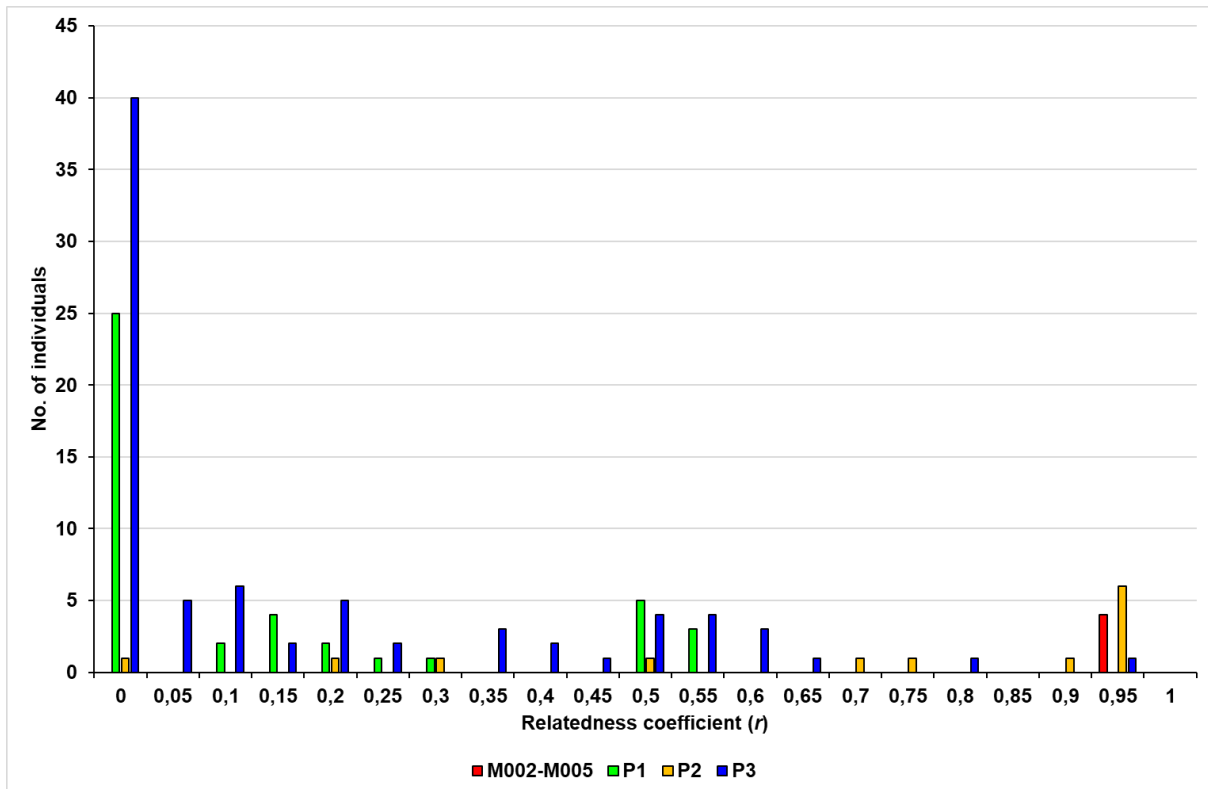
#### 4.1.4. Srodnost

Srodnost između najčešćeg genotipa, M001, te preostalih 140 multilokusnih genotipova, analizirana je te je utvrđen broj razlikovnih alela (slika 8). Najmanji broj razlikovnih alela imala je populacija P2, koja se istaknula i najmanjim brojem jedinstvenih genotipova. U ovoj je populaciji šest MLG jedinki bilo razlikovano samo jednim alelom, dok su sljedeća četiri genotipa razlikovana pomoću četiri, pet i 11, odnosno 15 alela. Nadalje, dva su MLG diferencirana putem deset alela. S druge strane, u populaciji P3 utvrđena je najveća raznolikost, sa 60 od 80 jedinstvenih genotipova razlikovanih s više od deset alela. Osim toga, samo su dvije MLG jedinice imale manje od pet razlikovnih alela. Nadalje, u populaciji P1 sve su jedinice imale između osam i 21 razlikovnih alela. Naposljetku, marunska grupa M002-M005, s ukupno četiri analizirana genotipa, razlikovala se u samo jednome alelu, potvrđujući time iznimnu srodnost s prevladavajućim genotipom M001.



**Slika 8.** Histogram sparenih udaljenosti (broja razlikovnih alela), temeljen na 15 polimorfnihi mikrosatelita, te izrađen za parove M001 genotipa i svih ostalih genotipova.

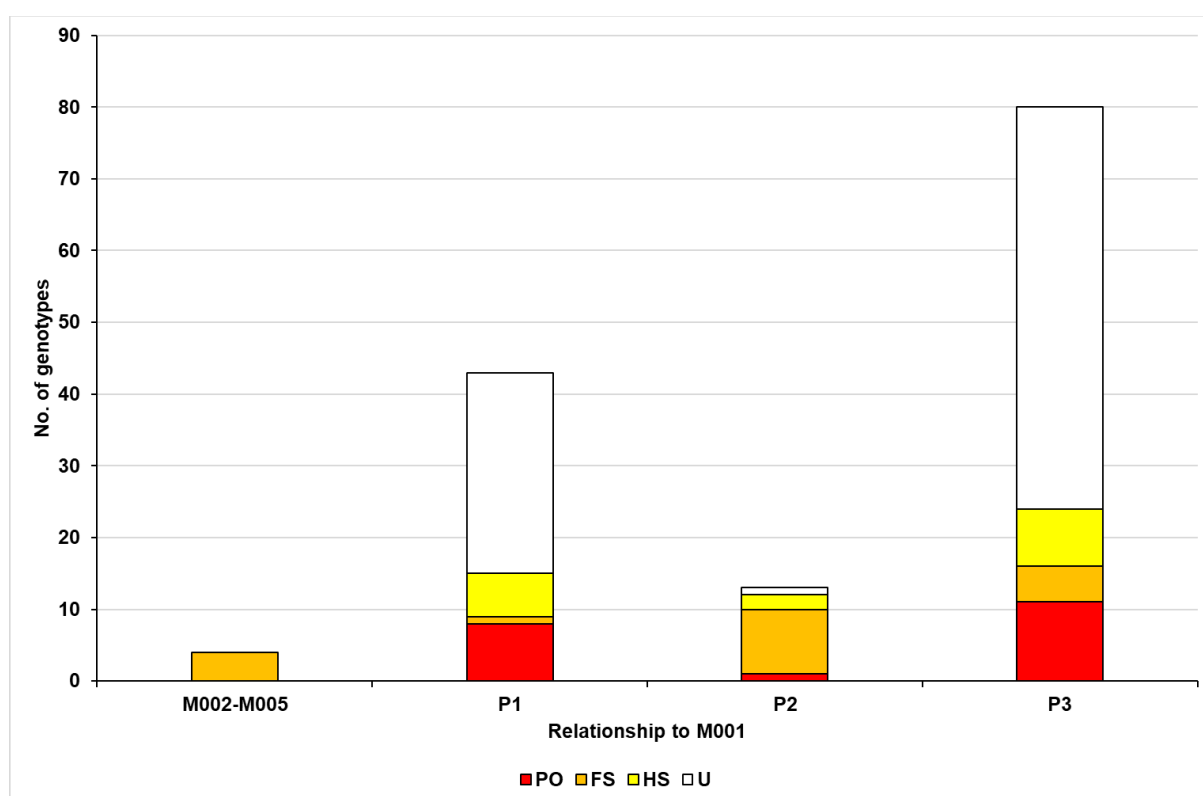
Koeficijent srodnosti ( $r$ ) izračunat je za sve genotipove, u odnosu na genotip M001 (slika 9), te se kretao u rasponu od 0,00 do 0,95. Kao što je bilo i za očekivati, najviše  $r$  vrijednosti, 0,95, utvrđene su za klonalnu grupu M002-M005. Osim toga, ista je  $r$  vrijednost utvrđena i za šest jedinki u P2 te jednu u P3. Svih 43 jedinke u P1 imale su  $r$  vrijednost u rasponu od 0,00 do 0,55, ukazujući na niski stupanj srodnosti s M001. S druge strane devet genotipova iz P2 imalo je  $r$  vrijednost veću ili jednaku vrijednosti 0,70, time ukazujući na visoku srodnost s M001. Niski stupanj srodnosti također je utvrđen i u P3, gdje su samo dvije jedinke imale  $r$  vrijednost veću ili jednaku 0,70. Sveukupno, 66 jedinki bilo je genetički nesrodno genotipu M001 ( $r = 0.00$ ), s 25 (58,14 %) jedinki u P1, jednom (7,69 %) u P2, te 40 u P3 (50,00 %).



**Slika 9.** Histogram koeficijenta srodnosti ( $r$ ), temeljen na 15 polimorfnih mikrosatelita, utvrđen između genotipa M001 i svih ostalih analiziranih genotipova.

Osim koeficijenta srodnosti, analizirani su mogući stupnjevi rodbinskih odnosa između genotipa M001 i ostalih genotipova, temeljenih na najvišoj vjerojatnosti pripadanja jednom od četiri moguća odnosa: nesrodni (eng. *unrelated*) (U), polusrodnici (eng. *half-siblings*) (HS), puni srodnici (eng. *full-siblings*) (FS), te roditelj-potomak (eng. *parent-offspring*) (PO),

korištenjem ML-Relate (slika 10). Sva četiri genotipa grupe M002-M005 klasificirala su se kao puni srodnici (FS). Jedinke u populaciji P2 demonstrirale su slične rezultate, sa 69,00 % genotipova klasificiranih kao puni srodnici (FS), dva kao polusrodnici (HS) te samo jednim genotipom koji je pokazao roditelj-potomak (PO) stupanj srodnosti. S druge strane, populacije P1 i P3 bile su znatno manje srodne genotipu M001, s 28 (65,12 %), odnosno 56 (70,00 %) genotipova klasificiranih u kategoriju nesrodnih (U). Po jedna je jedinka (18,6 %) iz P1, te po pet jedinki (13,75 %) iz P3 klasificiralo se kao FS, odnosno kao PO, dok je šest jedinki iz P1 (13,95 %) i osam jedinki (10 %) iz P3 ušlo u kategoriju HS.



**Slika 10.** Histogram srodstvenih kategorija između analiziranih genotipova te najčešćeg genotipa maruna, M001. Četiri srodstvena odnosa predstavljena su različitim bojama unutar stupaca: nesrodni (*unrelated*) (U) bijelom bojom, polusrodnici (*half-siblings*) (HS) žutom bojom, puni srodnici (*full-siblings*) (FS) narančastom te roditelj-potomak (*parent-offspring*) (PO) crvenom bojom.

## 4.2. Rezultati istraživanja morfološke raznolikosti i pedoloških značajki

### 4.2.1. Morfološke značajke plodova

Prosječna masa plodova (F1) svih 144 stabala bila je 12,18 g. Prosječna visina ploda (F2) bila je 29,22 mm, dok je prosječna širina (F3) bila 35,52 mm (tablica 9). Prosječna debljina plodova (F4) bila je 20,72 mm, dok je dužina hiluma (F5) iznosila 22,86 mm, što je gotovo dvostruka vrijednost širine hiluma (11,12 mm) (F6). Time je oblik hiluma definiran kao gotovo pravokutan. U prosjeku, uzorkovani plodovi imali su 1,96 ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (F8), koje su imale prosječnu dužinu od 4,26 mm (F9).

Promatraju li se rezultati analize varijance (ANOVA), istraživane skupine stabala statistički značajno razlikovale su se po svim značajkama plodova (tablica 9).

Pearsonovim koeficijentom korelacije je utvrđeno da sve značajke vezane uz veličinu plodova (F1, F2, F3, F3, F4, F5, F6) međusobno značajno koreliraju, s najjačom korelacijom između značajki F1 i F3 (0,922,  $P < 0,0001$ ). Druga najznačajnija korelacija bila je ona između F1 i F4 (0,913,  $P < 0,0001$ ), dok je najniža značajna korelacija bila između F2 i F5 (0,480,  $P < 0,0001$ ). S druge strane, nije utvrđena niti jedna značajna korelacija između značajki veličine ploda i značajki F7, F8 i F9. Broj sjemenki (F7) nije značajno korelirao niti s jednom drugom značajkom, dok su značajke F8 i F9 međusobno značajno korelirale (0,764,  $P < 0,0001$ ).

U usporedbi, grupa G1 (maruni) iskazala se najvišom vrijednosti značajke F1, s vrijednošću od 14,32 g, dok je grupa G3 (divlja stabla) bila obilježena najnižom vrijednošću, od 9,96 g (tablica 9). Grupa G2 bila je intermedijarnih vrijednosti, s prosječnom masom ploda od 11,89 g. Isti trend distribucije podataka između ovih tri grupa zamijećen je i za značajke F2, F3, F4 i F5. S druge strane, značajka F6 demonstrirala je najviše vrijednosti u G1, ali najniže u G2. Značajka F7 imala je najviše vrijednosti u G2 te intermedijarne u G3, dok su značajke F8 i F9 pokazale suprotno, odnosno najviše vrijednosti zabilježene su im u G3, a najniže u G1.

Korelacije između značajki koje opisuju veličinu ploda u svakoj individualnoj grupi slijedile su isti trend podataka kao i sveukupne korelacije, s najjačim korelacijama između F1 i F3, te F1 i F4. Također, značajke F8 i F9 značajno su pozitivno korelirale među sobom u sve tri grupe uzoraka. Značajka F7 statistički značajno je negativno korelirala s F2 i F9, dok je F9 statistički značajno korelirala sa svim značajkama u G1. U G2, značajka F7 značajno je korelirala s F2, F8 i F9, te F9 s F2. U G3, situacija je bila drugačija, budući da F7 nije značajno korelirala niti s jednom od značajki, dok je F8 korelirala s F5, značajka F6 sa svim značajkama osim s F7, a F9 je korelirala s F5, F6 i F8.



**Tablica 9.** Aritmetička sredina (M), standardna devijacija (SD), minimalne (Min) i maksimalne (Max) vrijednosti, F-vrijednosti te P-vrijednosti ANOVA testa, na temelju morfoloških značajki ploda i lista. Rezultati su izračunati na razini grupe te sumarno (G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla). Značajke plodova: F1–masa ploda; F2–visina ploda; F3–širina ploda; F4–debljina ploda; F5–dužina hiluma; F6–širina hiluma; F7–broj sjemenki; F8–broj ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku; F9–dužina najdužeg ureza endokarpa i sjemene ljuske u sjemenku. Značajke lista: L01–površina lista; L02–koeficijent oblika; L03–dužina lisne plojke; L04–maksimalna širina plojke; L05–dužina lisne plojke mjerena od osnove plojke do točke najveće širine plojke; L06–širina lisne plojke na 50 % dužine; L07–širina lisne plojke na 90 % dužine; L08–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 10% dužine; L09–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 25 % dužine; L10–dužina peteljke.

Značajka	G1		G2		G3		Ukupno				ANOVA	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	Min	Max	F	P
F1	14,32 <sup>A</sup>	2,42	11,89 <sup>B</sup>	2,59	9,96 <sup>C</sup>	2,25	12,18	3,08	5,77	19,16	281,39	< 0,0001
F2	30,61 <sup>A</sup>	1,36	28,62 <sup>B</sup>	1,96	27,99 <sup>C</sup>	2,25	29,22	2,21	23,50	33,98	178,68	< 0,0001
F3	36,13 <sup>A</sup>	2,25	33,48 <sup>B</sup>	3,04	30,66 <sup>C</sup>	3,13	33,52	3,69	24,88	40,95	335,97	< 0,0001
F4	22,96 <sup>A</sup>	2,00	20,19 <sup>B</sup>	2,90	18,51 <sup>C</sup>	1,64	20,72	2,89	12,43	27,58	295,14	< 0,0001
F5	23,67 <sup>A</sup>	1,84	22,53 <sup>B</sup>	2,53	22,14 <sup>B</sup>	3,03	22,86	2,57	16,43	31,92	33,17	< 0,0001
F6	11,87 <sup>A</sup>	1,12	10,50 <sup>B</sup>	1,72	10,60 <sup>B</sup>	1,50	11,12	1,53	5,32	15,57	77,75	< 0,0001
F7	1,03 <sup>B</sup>	0,07	1,08 <sup>A</sup>	0,23	1,02 <sup>B</sup>	0,05	1,03	0,11	0,90	2,00	11,71	< 0,0001
F8	1,51 <sup>C</sup>	0,70	1,94 <sup>A</sup>	0,89	2,46 <sup>B</sup>	0,95	1,96	0,94	0,20	4,60	54,93	< 0,0001
F9	3,36 <sup>B</sup>	1,60	3,91 <sup>B</sup>	1,89	5,45 <sup>A</sup>	2,03	4,26	2,05	0,30	9,33	55,37	< 0,0001
L01	56,04 <sup>C</sup>	12,66	73,20 <sup>A</sup>	12,65	59,99 <sup>B</sup>	15,22	60,88	15,00	32,31	104,05	99,34	< 0,0001
L02	0,18 <sup>C</sup>	0,02	0,25 <sup>A</sup>	0,04	0,23 <sup>B</sup>	0,05	0,21	0,05	0,14	0,37	266,49	< 0,0001
L03	16,77 <sup>B</sup>	1,83	18,38 <sup>A</sup>	1,62	17,03 <sup>B</sup>	1,96	17,18	1,93	12,69	22,24	42,68	< 0,0001
L04	5,12 <sup>B</sup>	0,67	6,01 <sup>A</sup>	0,73	5,24 <sup>B</sup>	0,82	5,34	0,81	3,66	8,02	101,77	< 0,0001
L05	8,19 <sup>B</sup>	1,43	9,54 <sup>A</sup>	1,23	8,31 <sup>B</sup>	1,68	8,50	1,57	4,74	13,09	42,29	< 0,0001
L06	4,70 <sup>C</sup>	0,66	5,61 <sup>A</sup>	0,66	4,82 <sup>B</sup>	0,80	4,92	0,79	3,22	7,42	110,1	< 0,0001
L07	1,36 <sup>C</sup>	0,24	1,80 <sup>A</sup>	0,36	1,52 <sup>B</sup>	0,42	1,50	0,38	0,76	2,83	92,3	< 0,0001
L08	39,39 <sup>A</sup>	3,82	39,26 <sup>A</sup>	3,46	40,08 <sup>A</sup>	4,13	39,63	3,87	29,11	46,51	2,15	0,1172
L09	24,92 <sup>B</sup>	2,00	25,85 <sup>A</sup>	2,16	25,70 <sup>A</sup>	2,48	25,40	2,25	19,79	31,24	10,43	< 0,0001
L10	2,05 <sup>A</sup>	0,29	1,81 <sup>B</sup>	0,41	2,06 <sup>A</sup>	0,55	2,01	0,44	0,92	3,72	23,77	< 0,0001

Srednje su vrijednosti označene različitim slovima, s obzirom na stupanj značajnosti u ANOVA analizi, pri  $P \leq 0,05$ .

#### 4.2.2. Morfološke značajke listova

Prosječna površina lisne plojke (L01) na sveukupnome uzorku iznosila je 60,88 cm<sup>2</sup>, s prosječnom dužinom plojke (L03) od 17,18 cm te prosječnom maksimalnom širinom plojke (L04) od 5,34 cm (tablica 9). Prosječna dužina peteljke (L10) iznosila je 2,01 cm, dok su kutovi koji opisuju osnovu plojke, značajke L08 i L09, imale prosječne vrijednosti od 39,63° i 25,40°.

ANOVA analiza pokazala je statistički značajne razlike između triju grupa uzoraka za devet od deset značajki lista (tablica 9). Značajka L08 bila je jedina koja nije razlikovala istraživane grupe stabala. Značajke L01, L02, L06 i L07 razdijelile su istraživana stabla u tri grupe, dok su značajke L03, L04, L05 i L10 grupirale marune i divlja stabla (G1 i G3) zajedno. S druge strane, značajka L09 grupirala je hibridna i divlja stabla zajedno (G2 i G3).

Korelacijskom analizom, za značajke L04, L06 i L07 utvrđeno je osam značajnih korelacija s drugim morfometrijskim karakteristikama lista, dok su druge po broju značajnih korelacija, sa sedam korelacija, bile značajke L03 i L09. Najjača pozitivna korelacija sveukupno utvrđena je između L04 i L06 (0,992,  $P < 0,0001$ ), dok je najslabija pozitivna statistički značajna korelacija bila između L03 i L10 (0,024,  $P < 0,0001$ ). Najjača negativna korelacija zabilježena je između L7 i L10 ( $-0,497$ ,  $P < 0,0001$ ).

Za razliku od značajki plodova, morfometrijske značajke lišća u grupama G1, G2 i G3 pokazale su različite distribucije vrijednosti (tablica 9). Osam izmjerenih značajki (L01, L02, L03, L04, L05, L06, L07, L09) imale su najviše vrijednosti u G2 (hibridna stabla), s najnižim vrijednostima utvrđenim u G1, a intermedijarnim vrijednostima u G3. Značajke L08 i L10, s druge strane, imale su najviše vrijednosti u G3, s najnižim vrijednostima u G2, a intermedijarnim u G1.

Gledaju li se korelacije između značajki unutar grupe G1, manji je broj značajnih korelacija primjetan, u usporedbi s brojem korelacija na sveukupnom uzorku od 144 stabla. Najveći broj pozitivnih korelacija utvrđen je za L01, L03, L04, L05, L06 i L07. Najjača pozitivna korelacija utvrđena je između L04 i L06 (0,993,  $P < 0,0001$ ), dok je najniža statistički značajna korelacija bila između L01 i L02 (0,300,  $P < 0,019$ ). U grupi G2, broj značajnih korelacija bio je još niži, sa sveukupno šest statički značajnih pozitivnih korelacija za L06 te šest negativnih za L10. Najjača pozitivna korelacija ponovno je bila između L04 i L06 (0,986,  $P < 0,0001$ ), dok je najjača negativna korelacija utvrđena između L09 i L10 ( $-0,602$ ,  $P < 0,001$ ). Nadalje, značajka L02 korelirala je samo s L10. Grupu G3 obilježio je znatno manji broj značajnih korelacija od broja u G1 i G2. Najveći broj pozitivnih korelacija utvrđen je za F04, F06 i F07 (sedam pozitivnih korelacija), dok je najveći broj negativnih korelacija utvrđen

za L10, sveukupno osam korelacija. Nadalje, najjača korelacija bila je ona između L04 i L06 (0,991,  $P < 0,0001$ ).

#### 4.2.3. Kvalitativne značajke plodova (UPOV)

Promatra li se distribucija kvalitativnih značajki (UPOV) u sve tri grupe, mogu se zamijetiti razlike u morfologiji plodova. Grupa G1, koju predstavlja kultivar ‘Lovranski Marun’, karakterizirana je velikim plodovima, sa 60 % uzoraka svrstanih u kategoriju “velikih” plodova. Svi uzorkovani plodovi iz G1 svrstani su u kategorije “veoma laki” i “laki” za čišćenje (ljuštenje). Nadalje, 92 % plodova bilo je crvenkasto-smeđe boje te je više od 97 % plodova imalo izdignute, tamne pruge, a plodovi su bili eliptičnog oblika, s malim do srednje velikim hilumom, te bijelim sjemenkama. Grupa G2 iskazala se sličnim rezultatima kao i G1, iako su rezultati bili heterogeniji, sa zabilježenim nešto raznolikijim stupnjevima unutar svakog svojstva. Grupa G3 pokazala je slične vrijednosti u mnogo svojstava, iako je raspon podataka unutar svakog pojedinog svojstva bio još veći od onih u G1 i G2. Plodovi u G3 bili su smeđi i tamnosmeđi, sa samo 14,5 % uzoraka crveno-smeđe boje, koja je bila dominantna u G1 i G3. Osim toga, više od 50 % uzoraka pripadalo je “slabo dlakavoj” kategoriji, te je većina uzoraka bila široko jajolikog oblika, za razliku od elipsoidnog oblika dominantnog u G1 i G2. Zamjetne razlike između sve tri grupe zabilježene su u obliku hiluma (U09), s 40 % uzoraka u G3 okarakterizirano s “izduljeno eliptičnim” oblikom hiluma, nasuprot samo 1,63 % plodova u G1 te 42,86 % plodova u G2 s time oblikom hiluma.

Fenotipska raznolikost plodova istražena je Shannonovim informacijskim indeksom ( $H$ ), koji je izračunat za 11 UPOV značajki (tablica 10): lakoća ljuštenja (U01), boja ploda (U02), istaknute linije (U03), prisutnost pruga (U04), dlakavost (U05), boja sjemenki (U06), sjaj ploda (U07), oblik ploda (U08), oblik hiluma (U09), veličina hiluma (U10) te veličina ploda (U11). Izračuni su provedeni za svaku grupu pojedinačno, kao i za cijeli uzorak sumarno. Najvišu vrijednost Shannonovog indeksa ( $H$ ) unutar svake grupe zasebno pokazale su značajke U08 i U11, s vrijednostima u rasponu od 1,102 i 1,953 za U08, te od 1,342 do 2,121 za U11. Najniže vrijednosti zabilježene su za U07 u G1 i G2, dok je G3 pokazao najniže vrijednosti za značajku U06. Sve značajke, osim U10, imale su najnižu  $H$  vrijednost u G1, dok je većina maksimalnih vrijednosti zabilježena u G3. Slična distribucija vrijednosti zabilježena je na sveukupnom uzorku od 144 stabla, sa najvišim vrijednostima zabilježenim za značajke U08 i U11, a najniža vrijednost za U07. Vrijednosti raznolikosti bile su značajno različite između G1 (0,053) i druge dvije grupe (G2 i G3), koje su međusobno imale slične vrijednosti, 1,082 i

1,285. Najveći dio raznolikosti, 0,862, pripisan je razlikama unutar svake od grupa, dok je samo 0,138 pripisano razlikama između grupa. Najviša proporcija raznolikosti unutar grupa zabilježena je za značajku U01 (0,957) i boju sjemenke (1,036), dok je na razini između grupa, najvišu vrijednost imala značajka U07 (0,293).

Analiza Cramerovog V koeficijenta otkrila je značajnu povezanost između sveukupnog uzorka (144 jedinice) i 11 UPOV značajki (tablica 11). Jaka razina povezanosti također je zabilježena i za značajke U02, U03, U05, U07, U08, U09 i U11, s najvišom vrijednošću za U02 (0,529) i U05 (0,479). Značajke U01, U04 i U10 pokazale su osrednje jaku povezanost, dok je značajka U06 pokazala slabu povezanost (0,199).

**Tablica 10.** Shannonov informacijski indeks vrijednosti za kvalitativne značajke ploda (UPOV). Vrijednosti su iskazane na razini grupa te sumarno: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla; T–sumarno. Udjeli raznolikosti izraženi su na dvije razine, unutar te između triju grupa. Srednje vrijednosti označene su različitim slovima značajnosti, te su značajno različite u Wilcoxon testu, pri  $P \leq 0,05$ . k—broj stupnjeva slobode.

Oznake	Značajka	k	Shannon informacijski indeks ( $H$ )				Udio raznolikosti	
			$H_{G1}$	$H_{G2}$	$H_{G3}$	$H_T$	između grupa	unutar grupa
U01	Lakoća ljuštenja	3	0,956	1,516	1,524	1,391	0,043	0,957
U02	Boja ploda	4	0,489	1,648	1,890	1,712	0,216	0,784
U03	Istaknute linije	3	0,208	0,946	1,521	1,105	0,193	0,807
U04	Prisutnost pruga	2	0,121	0,371	0,818	0,524	0,166	0,834
U05	Dlakavost	2	0,283	0,967	0,998	0,880	0,148	0,852
U06	Boja sjemenke	2	0,121	0,592	0,497	0,389	-0,036*	1,036
U07	Sjaj	2	0,000	0,222	0,845	0,503	0,293	0,707
U08	Oblik ploda	4	1,102	1,675	1,953	1,766	0,107	0,893
U09	Oblik hiluma	3	0,241	0,985	1,291	1,003	0,164	0,836
U10	Veličina hiluma	2	1,000	0,863	0,892	0,964	0,047	0,953
U11	Veličina ploda	5	1,342	2,121	1,902	2,095	0,146	0,854
Prosjek			0,533 <sup>B</sup>	1,082 <sup>A</sup>	1,285 <sup>A</sup>	1,121	0,138	0,862

\*negativna vrijednost sastavnica udjela raznolikosti između grupa ukazuje na to da je prosječna raznolikost unutar grupe zapravo viša od raznolikosti udruženog uzorka, te je ta značajka isključena iz diskriminacije grupa

**Tablica 11.** Hi-kvadrat test omjera vjerojatnosti za svaku od kvalitativnih (UPOV) značajki unutar tri grupe uzoraka kestena (G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla). k–broj stupnjeva slobode; *P*–statistička značajnost.

Značajka	Opis	k	Hi-kvadrat test omjera vjerojatnosti	<i>P</i>	Cramerov V
U01	Lakoća ljuštenja	3	21,906	***	0,231
U02	Boja ploda	4	92,369	***	0,529
U03	Istaknute linije	3	50,320	***	0,393
U04	Prisutnost tamnih pruga	2	17,538	***	0,338
U05	Dlakavost	2	38,062	***	0,479
U06	Boja sjemenke	2	6,641	*	0,199
U07	Sjaj ploda	2	27,381	***	0,406
U08	Oblik ploda	4	45,457	***	0,376
U09	Oblik hiluma	3	35,128	***	0,349
U10	Veličina hiluma	2	6,384	*	0,211
U11	Veličina ploda	5	77,336	***	0,467

\*\*\* značajno pri  $P < 0,001$ , \*\* značajno pri  $0,001 < P < 0,01$ , \* značajno pri  $0,01 < P < 0,05$ , ns označava neznačajne vrijednosti ( $P > 0,05$ )

#### 4.2.4. Pedološki parametri

Na razini 144 kompozitna uzorka tla, prosječna pH-vrijednosti u vodi (S01) bila je 5,95, dok je pH-vrijednost u otopini CaCl<sub>2</sub> (S02) iznosila 5,07 (tablica 12). Ukupan sadržaj dušika (S03) iznosio je 0,31 %, dok je udio organskog ugljika (S04) iznosio 4,80 %. Prosječni granulometrijski sastav za sve uzorke razotkrio je prevlast dviju najmanjih frakcija tla, s 37,27 % sitnog praha (S09) te 34,33 % (S10) čestica gline.

Pearsonov koeficijent korelacije otkrio je relativno mali broj značajnih korelacija između deset parametara tla. Najveći broj značajnih korelacija zabilježen je za S06, s pet pozitivnih i tri negativne značajne korelacije. Najjača korelacija utvrđena je između S01 i S02 (0,987,  $P < 0,0001$ ). Parametri vezani za najsitnije frakcije (sitni prah i glina) pokazale su najmanji broj korelacija, po četiri negativne korelacije za obje frakcije (S09 i S10). Promatra li se distribucija srednjih vrijednosti za sve tri grupe zajedno, jasan trend distribucije minimalnih i maksimalnih vrijednosti nije uočen, odnosno niti jedna od tri grupe nije se istaknula po broju maksimalnih, intermedijarnih ili minimalnih vrijednosti parametara.

**Tablica 12.** Deskriptivna analiza svih deset pedoloških parametara tla. M–srednja vrijednost; SD–srednja vrijednost; Min–minimalna vrijednost; Max–maksimalna vrijednost. Parametri: S01–pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O; S02–pH-vrijednost u otopini CaCl<sub>2</sub>; S03–postotni udio ukupnog dušika; S04–postotni udio organskog ugljika; S05–postotni udio ukupnog dušika/postotni udio organskog ugljika; S06–krupni pijesak; S07–sitni pijesak; S08–krupni prah; S09–sitni prah; S10–glina.

Parametar	Opis	M	SD	Min	Max
S01	pH (H <sub>2</sub> O)	5,95	0,80	4,51	8,11
S02	pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,07	0,93	3,50	7,29
S03	N <sub>tot.</sub>	0,31	0,12	0,05	0,78
S04	C <sub>org</sub>	4,80	1,85	1,22	14,19
S05	C <sub>org</sub> /N <sub>tot</sub>	15,90	2,44	6,52	25,91
S06	krupni pijesak	7,16	6,64	0,16	37,32
S07	sitni pijesak	4,26	1,77	0,80	9,15
S08	krupni prah	17,12	4,68	0,74	27,49
S09	sitni prah	37,27	9,22	16,41	83,91
S10	glina	34,33	9,53	4,29	66,75

#### 4.2.5. Korelacije između morfoloških značajki plodova i listova

Na sveukupnom uzorku od 144 jedinke, značajne korelacije između značajki listova i plodova pokazale su niske razine značajnosti. Značajka L02 imala je značajne korelacije sa svim značajkama, osim F7, s rasponom podataka od –0,422 do 0,312. Druga najznačajnija značajka bila je L07, s pet negativnih značajnih korelacija. Kada se promatraju individualne grupe, nije uočen jasan trend podataka, s najvećim brojem korelacija zabilježenih u G3.

#### 4.2.6. Korelacije između morfoloških značajki plodova i parametara tla

Na sveukupnom uzorku od 144 jedinke, značajne su korelacije zabilježene samo između pH-vrijednost tla (S01 i S02) te značajki koje opisuju veličinu plodova (F01-F06), ali vrijednosti koeficijenata navedenih korelacija bile su veoma niske. Granulometrijski parametri pokazali su istovremeno značajne i neznačajne korelacije, s parametrom S08 obilježenim s najvećim brojem značajnih korelacija sa značajkama F4, F5 i F6. Na razini pojedine grupe, nisu zabilježene značajne korelacije.

#### **4.2.7. Korelacije između morfoloških značajki listova i parametara tla**

Značajne korelacije između značajki lista i parametara tla utvrđene su između S01 i S02 te svih značajki vezanih za veličinu lista. Nadalje, parametar S05 pokazao je velik broj značajnih korelacija. Na razini pojedine grupe, utvrđen je manji broj korelacija, bez jasno uočljivog trenda distribucije.

#### **4.2.8. Analiza kovarijance (ANCOVA)**

Interakcije između značajki plodova i parametara tla, kao i između značajki lista i parametara tla bile su analizirane pomoću ANCOVA analize. Sveukupni rezultati ukazali su na nisku razinu interakcije.

Promatramo li značajke plodova i parametre tla (tablice 13-32), parametar S04 demonstrirao je značajnu homogenost regresijskog nagiba, sa svih devet značajki ploda, dok je najniži broj značajnih homogenih regresijskih nagiba utvrđen za S01, S02, S07 i S10. Značajka F3 imala je najveći broj značajnih homogenih regresijskih nagiba, dok je devet od 10 parametara tla imalo značajne vrijednosti. Promatraju li se razlike između tri grupe, 60 parova demonstriralo je razlike, odnosno zabilježeno je 60 interakcija između značajki plodova i parametara tla, s najvećim brojem primijećenim za S04 (devet interakcija), a najnižim za značajke S01, S02, S07 i S09 (četiri interakcije). Općenito govoreći, parametri koji su opisivali granulometrijski sastav bili su neznačajni, sa samo nekoliko interakcija, dok su pH-vrijednost tla, kao i ukupni udjel dušika i organskog ugljika, utjecali na velik broj parova značajki.

Tukeyevim HSD testom je utvrđeno da grupiranje uzoraka ovisi o devet značajki plodova. Značajke F1, F2, F3, F4 i F8 poduprle su grupiranje uzoraka u tri grupe, dok su F5 i F6 razlikovale samo dvije grupe, udružujući marune i divlja stabla (G1 i G3). Najraznolikije grupiranje bilo je ono pomoću F9, prema kojoj je značajki razlikovano tri grupe u interakciji sa S01 i S02, ali samo dvije grupe za ostalih osam parametara, prema kojima su se maruni i hibridna stabla grupirali zajedno (G1 i G2), izdvajajući divlja stabla (G3).

**Tablica 13.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S01 (pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
Regresija	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,052	< 0,0001	Ukupno	< 0,0001	< 0,0001	Ukupno	0,042335	< 0,0001	Ukupno	0,055047	< 0,0001	Ukupno	0,029722	< 0,0001
	G1	0,032	< 0,0001	G1	0,053389	< 0,0001	G1	0,014193	0,0032	G1	0,027561	< 0,0001	G1	0,018877	0,0007
	G2	0,042	0,001	G2	0,000012	0,9534	G2	0,050102	0,0002	G2	0,046391	0,0003	G2	0,020452	0,0166
	G3	0,030	< 0,0001	G3	0,001414	0,3788	G3	0,045472	< 0,0001	G3	0,052647	< 0,0001	G3	0,048419	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,110		S*Grupa	0,1508		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0123		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 14.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke (F6–F9) ploda i S01 (pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
Regresija	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,02011	< 0,0001	Ukupno	0,000322	0,4963	Ukupno	0,001085	0,2117	Ukupno	0,000325	0,4944
	G1	0,010655	0,0107	G1	0,000173	0,7455	G1	0,017921	0,0009	G1	0,016244	0,0016
	G2	0,017905	0,0251	G2	0,000858	0,6255	G2	0,001772	0,483	G2	0,013782	0,0497
	G3	0,008382	0,0318	G3	0,016655	0,0024	G3	0,003195	0,1856	G3	0,000033	0,8932
Homogenost	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,229		S*Grupa	0,0676		S*Grupa	0,1675		S*Grupa	0,0084	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0002		Tlo (S)	0,373		Tlo (S)	0,0041		Tlo (S)	0,033	



**Tablica 15.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S02 (pH-vrijednost u vodenoj otopini CaCl<sub>2</sub>). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,051196	< 0,0001	Ukupno	0,027518	< 0,0001	Ukupno	0,041519	< 0,0001	Ukupno	0,052565	< 0,0001	Ukupno	0,032928	< 0,0001
	G1	0,037076	< 0,0001	G1	0,049018	< 0,0001	G1	0,015518	0,0021	G1	0,029125	< 0,0001	G1	0,021909	0,0002
	G2	0,038449	0,001	G2	0,000015	0,948	G2	0,054251	< 0,0001	G2	0,044478	0,0004	G2	0,028754	0,0044
	G3	0,034406	< 0,0001	G3	0,002566	0,2356	G3	0,049548	< 0,0001	G3	0,057884	< 0,0001	G3	0,051015	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,166		S*Grupa	0,2067		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0161		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 16.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S02 (pH-vrijednost u vodenoj otopini CaCl<sub>2</sub>). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,020809	< 0,0001	Ukupno	0,000625	0,3433	Ukupno	0,001458	0,1475	Ukupno	0,000072	0,747
	G1	0,012058	0,0066	G1	0,000013	0,9294	G1	0,017607	0,001	G1	0,013868	0,0036
	G2	0,028269	0,0048	G2	0,000259	0,7885	G2	0,002848	0,3737	G2	0,027871	0,0051
	G3	0,008538	0,0303	G3	0,015017	0,004	G3	0,004565	0,1135	G3	0,000016	0,9245
Homogenost	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,1118		S*Grupa	0,1356		S*Grupa	0,108		S*Grupa	0,0011	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,276		Tlo (S)	0,0038		Tlo (S)	0,1085	

**Tablica 17.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S03 (ukupni N). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,000003	0,9444	Ukupno	0,003106	0,0345	Ukupno	0,000377	0,4615	Ukupno	0,000194	0,597	Ukupno	0,000066	0,7581
	G1	0,017293	0,0011	G1	0,001876	0,2855	G1	0,007755	0,0297	G1	0,00346	0,1468	G1	0,02034	0,0004
	G2	0,094111	< 0,0001	G2	0,065576	< 0,0001	G2	0,106947	< 0,0001	G2	0,065384	< 0,0001	G2	0,089473	< 0,0001
	G3	0,000002	0,9733	G3	0,00591	0,0716	G3	0,001589	0,3508	G3	0,005797	0,0744	G3	0,000002	0,9742
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,3272		Tlo (S)	0,0907		Tlo (S)	0,9173		Tlo (S)	0,7833		Tlo (S)	0,5448	

**Tablica 18.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S03 (ukupni N). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,002161	0,0778	Ukupno	0,000136	0,6582	Ukupno	0,00539	0,0053	Ukupno	0,003973	0,0168
	G1	0,000983	0,4395	G1	0,000223	0,713	G1	0,015763	0,0019	G1	0,011566	0,0079
	G2	0,077423	< 0,0001	G2	0,00012	0,855	G2	0,000555	0,6948	G2	0,009205	0,1092
	G3	0,000831	0,5	G3	0,006957	0,0506	G3	0,000546	0,5844	G3	0,00103	0,4527
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,3273		S*Grupa	0,2885		S*Grupa	0,0465	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,1392		Tlo (S)	0,6044		Tlo (S)	0,0129		Tlo (S)	0,0385	

**Tablica 19.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S04 (organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,000913	0,2519	Ukupno	0,005595	0,0045	Ukupno	0,00155	0,1353	Ukupno	0,003447	0,0259	Ukupno	0,001559	0,1342
	G1	0,006549	0,0457	G1	0,001379	0,3599	G1	0,002866	0,1867	G1	0,000112	0,7939	G1	0,008291	0,0245
	G2	0,19122	< 0,0001	G2	0,080694	< 0,0001	G2	0,164693	< 0,0001	G2	0,138509	< 0,0001	G2	0,081346	< 0,0001
	G3	0,001403	0,3807	G3	0,004285	0,1252	G3	0,000773	0,5152	G3	0,000423	0,6305	G3	0,011595	0,0115
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,1298		Tlo (S)	0,0013		Tlo (S)	0,0426		Tlo (S)	0,0054		Tlo (S)	0,1198	

**Tablica 20.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S04 (organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,007774	0,0008	Ukupno	0,001652	0,1231	Ukupno	0,001875	0,1005	Ukupno	0,000657	0,3312
	G1	0,000217	0,7162	G1	0,000492	0,5845	G1	0,017421	0,0011	G1	0,008102	0,0262
	G2	0,07589	< 0,0001	G2	0,018502	0,0228	G2	0,000541	0,6984	G2	0,007222	0,1561
	G3	0,015968	0,003	G3	0,005623	0,0789	G3	0,002671	0,2263	G3	0,0006	0,5665
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,003		S*Grupa	0,0222		S*Grupa	0,0468	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0005		Tlo (S)	0,1509		Tlo (S)	0,0721		Tlo (S)	0,2536	

**Tablica 21.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S05 (ukupni N/organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
Regresija	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,001135	0,2013	Ukupno	0,000021	0,8636	Ukupno	0	0,9958	Ukupno	0,002676	0,0497	Ukupno	0,00892	0,0003
	G1	0,0018	0,0018	G1	0,02964	< 0,0001	G1	0,00802	0,027	G1	0,02313	0,0002	G1	0,018349	0,0008
	G2	0,073282	< 0,0001	G2	0,006774	0,1696	G2	0,025902	0,007	G2	0,052242	0,0001	G2	0,000132	0,8483
	G3	0,008415	0,0315	G3	0,003241	0,1825	G3	0,031837	< 0,0001	G3	0,027626	< 0,0001	G3	0,093907	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0988		S*Grupa	0,0136		S*Grupa	0,0061		S*Grupa	0,2825		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0035		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 22.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S05 (ukupni N/organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
Regresija	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,003117	0,0341	Ukupno	0,00531	0,0057	Ukupno	0,013387	< 0,0001	Ukupno	0,011214	< 0,0001
	G1	0,008559	0,0223	G1	0,001316	0,3711	G1	0,00082	0,4802	G1	0,001554	0,331
	G2	0,000001	0,9843	G2	0,063204	< 0,0001	G2	0,000003	0,9762	G2	0,000031	0,9265
	G3	0,069848	< 0,0001	G3	0,001609	0,3477	G3	0,055805	< 0,0001	G3	0,032398	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0014	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0148		Tlo (S)	0,0066		Tlo (S)	0,0233	

**Tablica 23.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S06 (krupni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,0179	< 0,0001	Ukupno	0,0001	0,7618	Ukupno	0,0193	< 0,0001	Ukupno	0,0144	< 0,0001	Ukupno	0,0068	0,0018
	G1	0,0008	0,4745	G1	0,0007	0,5078	G1	0,0002	0,7277	G1	0,0000	0,9287	G1	0,0010	0,4472
	G2	0,0238	0,0097	G2	0,0069	0,1659	G2	0,0130	0,0572	G2	0,0227	0,0116	G2	0,0007	0,6564
	G3	0,0362	< 0,0001	G3	0,0123	0,0091	G3	0,0524	< 0,0001	G3	0,0390	< 0,0001	G3	0,0310	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0125		S*Grupa	0,0104		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0028		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,1595		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0009		Tlo (S)	0,0138	

**Tablica 24.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S06 (krupni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,0082	0,0006	Ukupno	0,001839	0,1038	Ukupno	0,001027	0,2243	Ukupno	0,000068	0,7542
	G1	0,0002	0,7025	G1	0,003558	0,1412	G1	0,003107	0,1692	G1	0,000655	0,5281
	G2	0,0038	0,3041	G2	0,005091	0,234	G2	0,005869	0,2012	G2	0,008631	0,1209
	G3	0,0143	0,005	G3	0,000621	0,5598	G3	0,029612	< 0,0001	G3	0,004245	0,127
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,11		S*Grupa	0,221		S*Grupa	0,0002		S*Grupa	0,1455	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0165		Tlo (S)	0,1502		Tlo (S)	0,0361		Tlo (S)	0,2972	

**Tablica 25.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S07 (sitni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,022044	< 0,0001	Ukupno	0,001974	0,0919	Ukupno	0,016217	< 0,0001	Ukupno	0,016101	< 0,0001	Ukupno	0,009233	0,0003
	G1	0,040403	< 0,0001	G1	0,014604	0,0028	G1	0,018572	0,0007	G1	0,019703	0,0005	G1	0,020321	0,0004
	G2	0,069332	< 0,0001	G2	0,007555	0,1469	G2	0,018857	0,0215	G2	0,036598	0,0013	G2	0,021565	0,0139
	G3	0,017216	0,002	G3	0,046206	< 0,0001	G3	0,038766	< 0,0001	G3	0,031529	< 0,0001	G3	0,003448	0,1691
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0108		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,4309		S*Grupa	0,2135		S*Grupa	0,2926	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0975		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0001	

**Tablica 26.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S07 (sitni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,000749	0,2994	Ukupno	0,000545	0,3759	Ukupno	0,000695	0,3175	Ukupno	0,000179	0,6124
	G1	0,014941	0,0025	G1	0,000043	0,8721	G1	0,010038	0,0133	G1	0,002679	0,2017
	G2	0,007936	0,137	G2	0,000088	0,876	G2	0,049561	0,0002	G2	0,010405	0,0884
	G3	0,004364	0,1218	G3	0,003342	0,1758	G3	0,00373	0,1526	G3	0,000585	0,5712
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0039		S*Grupa	0,8166		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,1133	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,2159		Tlo (S)	0,3757		Tlo (S)	0,3586		Tlo (S)	0,5245	

**Tablica 27.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S08 (krupni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,004341	0,0124	Ukupno	0,007261	0,0012	Ukupno	0,011453	< 0,0001	Ukupno	0,018061	< 0,0001	Ukupno	0,024334	< 0,0001
	G1	0,00882	0,0203	G1	0,001253	0,3828	G1	0,005828	0,0595	G1	0,000225	0,7116	G1	0,001599	0,3241
	G2	0,039236	0,0009	G2	0,013333	0,0536	G2	0,103211	< 0,0001	G2	0,07662	< 0,0001	G2	0,07237	< 0,0001
	G3	0,015305	0,0037	G3	0,003395	0,1724	G3	0,017486	0,0019	G3	0,028236	< 0,0001	G3	0,042721	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,3081		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,3203		Tlo (S)	0,0305		Tlo (S)	0,0059		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 28.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S08 (krupni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,015759	< 0,0001	Ukupno	0,004866	0,0081	Ukupno	0	0,9817	Ukupno	0,000011	0,9001
	G1	0	0,9893	G1	0,000043	0,8712	G1	0,000517	0,5753	G1	0,000086	0,8192
	G2	0,119437	< 0,0001	G2	0,04252	0,0005	G2	0,001997	0,4564	G2	0,008547	0,1228
	G3	0,017228	0,002	G3	0,001822	0,3177	G3	0,013785	0,0058	G3	0,008801	0,0278
Homogenost	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0134		S*Grupa	0,0412	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0121		Tlo (S)	0,3619		Tlo (S)	0,4364	

**Tablica 29.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S09 (sitni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,003938	0,0172	Ukupno	0,000026	0,8479	Ukupno	0,004758	0,0088	Ukupno	0,000305	0,5081	Ukupno	0,006947	0,0015
	G1	0,005311	0,0721	G1	0,010922	0,0098	G1	0,007568	0,0317	G1	0,001239	0,3854	G1	0,005464	0,0681
	G2	0,000103	0,8655	G2	0,003865	0,2999	G2	0,000942	0,6091	G2	0,004612	0,2574	G2	0,009676	0,1005
	G3	0,028893	< 0,0001	G3	0,00174	0,3289	G3	0,032978	< 0,0001	G3	0,012836	0,0078	G3	0,013294	0,0068
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0252		S*Grupa	0,0344		S*Grupa	0,0013		S*Grupa	0,051		S*Grupa	0,1797	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,002		Tlo (S)	0,5564		Tlo (S)	0,0007		Tlo (S)	0,2566		Tlo (S)	0,0007	

**Tablica 30.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S09 (sitni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,00329	0,0295	Ukupno	0,00033	0,4909	Ukupno	0,010746	< 0,0001	Ukupno	0,006133	0,0029
	G1	0,008219	0,0252	G1	0,001031	0,4286	G1	0,000775	0,4924	G1	0,003403	0,1501
	G2	0,001096	0,5811	G2	0,000071	0,8881	G2	0,057865	< 0,0001	G2	0,009806	0,0982
	G3	0,005693	0,0771	G3	0,001159	0,4255	G3	0,018767	0,0013	G3	0,012818	0,0079
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,7115		S*Grupa	0,9638		S*Grupa	0,0012		S*Grupa	0,3693	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0075		Tlo (S)	0,3562		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0019	



**Tablica 31.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki ploda (F1–F5) i S10 (glina). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F1–masa ploda			F2–visina ploda			F3–širina ploda			F4–debljina ploda			F5–dužina hiluma		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,007043	0,0014	Ukupno	0,000854	0,2677	Ukupno	0,010912	< 0,0001	Ukupno	0,022261	< 0,0001	Ukupno	0,006506	0,0022
	G1	0,004074	0,1153	G1	0,006452	0,0474	G1	0,007849	0,0287	G1	0,00004	0,8762	G1	0,002321	0,2348
	G2	0,053093	< 0,0001	G2	0,040321	0,0007	G2	0,088848	< 0,0001	G2	0,115136	< 0,0001	G2	0,017296	0,0278
	G3	0,00733	0,0448	G3	0,004663	0,1097	G3	0,015517	0,0034	G3	0,031232	< 0,0001	G3	0,022448	0,0004
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,2118		Tlo (S)	0,3843		Tlo (S)	0,0323		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0252	

**Tablica 32.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između četiri istraživane značajke ploda (F6–F9) i S10 (glina). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	F6–širina hiluma			F7–broj sjemenki			F8–broj ureza sjemene ljuske u sjemenku			F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske u sjemenku		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,005133	0,0065	Ukupno	0,001024	0,2248	Ukupno	0,003697	0,021	Ukupno	0,004084	0,0153
	G1	0,003255	0,1593	G1	0,000013	0,9305	G1	0,007908	0,0281	G1	0,005706	0,0622
	G2	0,043822	0,0004	G2	0,004142	0,2832	G2	0,016299	0,0327	G2	0,00005	0,9058
	G3	0,005466	0,0832	G3	0,007399	0,0438	G3	0,006632	0,0563	G3	0,000119	0,7989
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,2019		S*Grupa	0,0035		S*Grupa	0,5152	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,1449		Tlo (S)	0,1725		Tlo (S)	0,1821		Tlo (S)	0,12	

Promatraju li se interakcije između značajki lista i parametara tla, svi uzorci zajedno diferencirali su se u 71 par interakcija (tablice 33-52). Parametar S01 imao je značajne interakcije sa svih 10 lisnih značajki, dok su S02 i S05 imali svaki po devet interakcija. Najniži broj interakcija utvrđen je za S04, sa samo tri značajne interakcije. S druge strane, najniži broj značajnih interakcija u lisnih značajki utvrđen je za L08, sa samo pet interakcija. Općenito gledano, parametri vezani za granulometrijski sastav pokazali su manji broj interakcija (S06, S08, S09, S10), posebice kada je riječ o značajkama vezanim za oblik lista.

Uspoređujući značajke listova sa značajkama plodova, grupiranje lisnih značajki pokazalo je veću varijabilnost. L03, L04 i L05 (dužina i širina plojke) grupirale su G1 i G3 zajedno, za gotovo sve interakcije s a parametrima tla, time ukazujući na sličnost ovih dviju grupa, za razliku od grupe hibridnih stabala (G2), kao i na u određenoj mjeri izražen utjecaj na parametre tla. L01 i L02 diferencirali su sve tri grupe. Značajke L01, L02 i L07 razdijelile su sve tri grupe, dok je većina drugih značajki varirala u razdjeljivanju uzoraka u dvije ili tri grupe, ovisno o interakcijama s određenim, individualnim parametrima tla. Lisna značajka L08, s druge strane, grupirala je sve uzorke u jednu grupu, odnosno nije diferencirala niti jedno stablo.

**Tablica 33.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S01 (pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,062	< 0,0001	Ukupno	0,021504	< 0,0001	Ukupno	0,026467	< 0,0001	Ukupno	0,063054	< 0,0001	Ukupno	0,033924	< 0,0001
	G1	0,043	< 0,0001	G1	0,006858	0,0409	G1	0,012304	0,0061	G1	0,050908	< 0,0001	G1	0,021023	0,0003
	G2	0,112	< 0,0001	G2	0,005429	0,219	G2	0,075576	< 0,0001	G2	0,104753	< 0,0001	G2	0,070645	< 0,0001
	G3	0,074	< 0,0001	G3	0,013652	0,0061	G3	0,035132	< 0,0001	G3	0,075997	< 0,0001	G3	0,046914	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0294		S*Grupa	0,0003		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0008	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,004		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 34.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S01 (pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,064874	< 0,0001	Ukupno	0,044232	< 0,0001	Ukupno	0,001235	0,1826	Ukupno	0,007404	0,0011	Ukupno	0,006096	0,003
	G1	0,054145	< 0,0001	G1	0,041335	< 0,0001	G1	0,003997	0,1188	G1	0,01103	0,0094	G1	0,017386	0,0011
	G2	0,104098	< 0,0001	G2	0,039689	0,0008	G2	0,006915	0,1652	G2	0,000673	0,6655	G2	0,028059	0,0049
	G3	0,075653	< 0,0001	G3	0,046156	< 0,0001	G3	0,000449	0,62	G3	0,00395	0,141	G3	0,005434	0,0841
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0003		S*Grupa	0,2096		S*Grupa	0,3245		S*Grupa	0,0027	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,1455		Grupa	0,0002		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,2463		Tlo (S)	0,0098		Tlo (S)	0,009	

**Tablica 35.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S02 (pH-vrijednost u CaCl<sub>2</sub>). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,057661	< 0,0001	Ukupno	0,02457	< 0,0001	Ukupno	0,023382	< 0,0001	Ukupno	0,059233	< 0,0001	Ukupno	0,03083	< 0,0001
	G1	0,048133	< 0,0001	G1	0,010796	0,0102	G1	0,014122	0,0033	G1	0,055513	< 0,0001	G1	0,025516	< 0,0001
	G2	0,096169	< 0,0001	G2	0,032288	0,0025	G2	0,052212	0,0001	G2	0,091028	< 0,0001	G2	0,040746	0,0007
	G3	0,062172	< 0,0001	G3	0,013458	0,0065	G3	0,028311	< 0,0001	G3	0,064601	< 0,0001	G3	0,036991	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0001		S*Grupa	0,0075		S*Grupa	0,0079		S*Grupa	0,0003		S*Grupa	0,0317	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 36.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S02 (pH-vrijednost u CaCl<sub>2</sub>). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,06143	< 0,0001	Ukupno	0,040701	< 0,0001	Ukupno	0,001666	0,1216	Ukupno	0,009033	0,0003	Ukupno	0,007058	0,0014
	G1	0,058808	< 0,0001	G1	0,045232	< 0,0001	G1	0,003444	0,1477	G1	0,011036	0,0094	G1	0,019984	0,0005
	G2	0,097811	< 0,0001	G2	0,03418	0,0019	G2	0,001207	0,5626	G2	0,000809	0,6356	G2	0,050485	0,0001
	G3	0,062957	< 0,0001	G3	0,038713	< 0,0001	G3	0,000841	0,4974	G3	0,005764	0,0752	G3	0,006353	0,0618
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0007		S*Grupa	0,004		S*Grupa	0,5617		S*Grupa	0,6384		S*Grupa	0,0002	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,149		Grupa	0,0002		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,1663		Tlo (S)	0,0024		Tlo (S)	0,0031	

**Tablica 37.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S03 (ukupni N). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,017149	< 0,0001	Ukupno	0,003343	0,0282	Ukupno	0,005556	0,0047	Ukupno	0,018247	< 0,0001	Ukupno	0,015261	< 0,0001
	G1	0,011713	0,0075	G1	0,003313	0,1557	G1	0,001735	0,3044	G1	0,010751	0,0104	G1	0,024882	< 0,0001
	G2	0,016114	0,0337	G2	0,002271	0,427	G2	0,005307	0,2243	G2	0,022511	0,012	G2	0,001815	0,4778
	G3	0,050521	< 0,0001	G3	0,040168	< 0,0001	G3	0,02257	0,0004	G3	0,053546	< 0,0001	G3	0,013595	0,0062
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0008		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0204		S*Grupa	0,0004		S*Grupa	0,5184	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0016		Tlo (S)	0,0036		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 38.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S03 (ukupni N). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,017379	< 0,0001	Ukupno	0,006597	0,002	Ukupno	0,004699	0,0093	Ukupno	0,011782	< 0,0001	Ukupno	0,036512	< 0,0001
	G1	0,009554	0,0157	G1	0,018917	0,0007	G1	0,005568	0,0655	G1	0,008473	0,023	G1	0,049528	< 0,0001
	G2	0,020614	0,0162	G2	0,000022	0,9383	G2	0,006407	0,1817	G2	0,011959	0,0677	G2	0,05233	0,0001
	G3	0,055167	< 0,0001	G3	0,009142	0,0249	G3	0,004113	0,1331	G3	0,027666	< 0,0001	G3	0,030636	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0002		S*Grupa	0,3279		S*Grupa	0,8986		S*Grupa	0,0346		S*Grupa	0,0963	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,0943		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0006		Tlo (S)	0,0073		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 39.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S04 (organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,001036	0,2222	Ukupno	0,002155	0,0782	Ukupno	0,000108	0,6939	Ukupno	0,001003	0,2297	Ukupno	0,002965	0,0388
	G1	0,00225	0,2421	G1	0,000886	0,463	G1	0,000101	0,8044	G1	0,002099	0,2585	G1	0,016004	0,0017
	G2	0,016687	0,0307	G2	0,003525	0,3222	G2	0,011628	0,0716	G2	0,013892	0,0488	G2	0,027116	0,0057
	G3	0,018652	0,0013	G3	0,033389	< 0,0001	G3	0,009411	0,0229	G3	0,018593	0,0013	G3	0,003301	0,1785
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0006		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0166		S*Grupa	0,0009		S*Grupa	0,0016	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,1141		Tlo (S)	0,0254		Tlo (S)	0,5492		Tlo (S)	0,1123		Tlo (S)	0,0199	

**Tablica 40.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S04 (organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,000988	0,2332	Ukupno	0,000043	0,804	Ukupno	0,001756	0,112	Ukupno	0,005356	0,0055	Ukupno	0,020465	< 0,0001
	G1	0,001386	0,3587	G1	0,005919	0,0576	G1	0,000726	0,5065	G1	0,002038	0,2656	G1	0,050441	< 0,0001
	G2	0,013095	0,0558	G2	0,039266	0,0009	G2	0,009698	0,1001	G2	0,007456	0,1496	G2	0,004846	0,2456
	G3	0,021181	0,0006	G3	0,002686	0,2249	G3	0,00196	0,3	G3	0,018644	0,0013	G3	0,012148	0,0097
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0006		S*Grupa	0,0002		S*Grupa	0,5403		S*Grupa	0,0358		S*Grupa	0,4515	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,1243		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,1104		Tlo (S)	0,6221		Tlo (S)	0,1208		Tlo (S)	0,0048		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 41.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S05 (ukupni N/organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,06398	< 0,0001	Ukupno	0,000353	0,4763	Ukupno	0,031992	< 0,0001	Ukupno	0,066464	< 0,0001	Ukupno	0,036758	< 0,0001
	G1	0,036692	< 0,0001	G1	0,000548	0,5638	G1	0,016803	0,0013	G1	0,025956	< 0,0001	G1	0,014289	0,0031
	G2	0,239042	< 0,0001	G2	0,000398	0,7396	G2	0,117696	< 0,0001	G2	0,260401	< 0,0001	G2	0,167707	< 0,0001
	G3	0,096493	< 0,0001	G3	0,013741	0,0059	G3	0,03906	< 0,0001	G3	0,109022	< 0,0001	G3	0,041628	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0108		S*Grupa	0,0017		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0003	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0784		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 42.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S05 (ukupni N/organski C). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,062218	< 0,0001	Ukupno	0,028403	< 0,0001	Ukupno	0,003014	0,0372	Ukupno	0,005112	0,0066	Ukupno	0,010482	< 0,0001
	G1	0,02963	< 0,0001	G1	0,017241	0,0012	G1	0,011914	0,007	G1	0,011425	0,0082	G1	0,00229	0,2379
	G2	0,237397	< 0,0001	G2	0,158256	< 0,0001	G2	0,000713	0,6565	G2	0,00197	0,4594	G2	0,081906	< 0,0001
	G3	0,099572	< 0,0001	G3	0,027763	< 0,0001	G3	0,003665	0,1562	G3	0,012656	0,0083	G3	0,043914	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,1307		S*Grupa	0,1676		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,0453		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0125		Tlo (S)	0,0008		Tlo (S)	0,0003	

**Tablica 43.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S06 (krupni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,001537	0,137	Ukupno	0,0123	< 0,0001	Ukupno	0,006518	0,0022	Ukupno	0,000015	0,8851	Ukupno	0,000036	0,8188
	G1	0,000042	0,8727	G1	0,003546	0,1418	G1	0,007059	0,038	G1	0,002953	0,1801	G1	0,000955	0,4461
	G2	0,00193	0,4641	G2	0,017327	0,0276	G2	0,00105	0,5893	G2	0,004457	0,2656	G2	0,000451	0,7236
	G3	0,000362	0,6562	G3	0,003287	0,1794	G3	0,003591	0,1605	G3	0,001023	0,454	G3	0,009006	0,026
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,7677		S*Grupa	0,3075		S*Grupa	0,8007		S*Grupa	0,2602		S*Grupa	0,077	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,6386		Tlo (S)	0,0083		Tlo (S)	0,0129		Tlo (S)	0,3864		Tlo (S)	0,3906	

**Tablica 44.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S06 (krupni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,000005	0,9296	Ukupno	0,000602	0,3522	Ukupno	0,003759	0,02	Ukupno	0,003019	0,0371	Ukupno	0,036988	< 0,0001
	G1	0,002728	0,1977	G1	0,004862	0,0853	G1	0,010531	0,0112	G1	0,020937	0,0003	G1	0,049001	< 0,0001
	G2	0,005743	0,2062	G2	0,001261	0,554	G2	0,010329	0,0896	G2	0,001681	0,4944	G2	0,000348	0,7561
	G3	0,001852	0,3138	G3	0,010038	0,0188	G3	0,000085	0,8292	G3	0,00011	0,8064	G3	0,080533	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,2073		S*Grupa	0,09		S*Grupa	0,1616		S*Grupa	0,0533		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,0935		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,3311		Tlo (S)	0,0277		Tlo (S)	0,0155		Tlo (S)	0,0103		Tlo (S)	< 0,0001	



**Tablica 45.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S07 (sitni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,004331	0,0125	Ukupno	0,013098	< 0,0001	Ukupno	0,00701	0,0015	Ukupno	0,000675	0,3246	Ukupno	0,000376	0,4624
	G1	0,023695	0,0001	G1	0,034723	< 0,0001	G1	0,006337	0,0494	G1	0,014793	0,0026	G1	0,005567	0,0655
	G2	0,053165	< 0,0001	G2	0,021504	0,014	G2	0,064757	< 0,0001	G2	0,039191	0,0009	G2	0,020924	0,0154
	G3	0,002793	0,2159	G3	0,015793	0,0032	G3	0,001698	0,3347	G3	0,012495	0,0087	G3	0,005544	0,081
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,6646		S*Grupa	0,0128		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0046	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0058		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0009		Tlo (S)	0,2595		Tlo (S)	0,4243	

**Tablica 46.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S07 (sitni pijesak). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
Regresija	Ukupno	0,000569	0,3657	Ukupno	0,000166	0,6247	Ukupno	0,000458	0,417	Ukupno	0,000583	0,3599	Ukupno	0,041505	< 0,0001
	G1	0,017794	0,001	G1	0,020847	0,0003	G1	0,007747	0,0297	G1	0,006866	0,0408	G1	0,022199	0,0002
	G2	0,038448	0,001	G2	0,003692	0,311	G2	0,027281	0,0056	G2	0,017927	0,0251	G2	0,006314	0,1849
	G3	0,01562	0,0033	G3	0,020453	0,0008	G3	0,008384	0,0318	G3	0,007006	0,0498	G3	0,084321	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,0005		S*Grupa	0,0025		S*Grupa	0,0012	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,1188		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,2936		Tlo (S)	0,6832		Tlo (S)	0,4262		Tlo (S)	0,3848		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 47.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S08 (krupni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,007566	0,001	Ukupno	0,000117	0,6816	Ukupno	0,027029	< 0,0001	Ukupno	0,003289	0,0296	Ukupno	0,015503	< 0,0001
	G1	0,011309	0,0086	G1	0,000403	0,6205	G1	0,049773	< 0,0001	G1	0,001061	0,4219	G1	0,038733	< 0,0001
	G2	0,000012	0,954	G2	0,077065	< 0,0001	G2	0,016919	0,0296	G2	0,000093	0,8723	G2	0,000992	0,5998
	G3	0,016031	0,0029	G3	0,023504	0,0003	G3	0,014269	0,005	G3	0,016588	0,0025	G3	0,004486	0,1167
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,1875		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,6279		S*Grupa	0,0534		S*Grupa	0,082	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0003		Tlo (S)	0,4376		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,024		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 48.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S08 (krupni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,002391	0,0636	Ukupno	0,00093	0,2474	Ukupno	0,022533	< 0,0001	Ukupno	0,026865	< 0,0001	Ukupno	0,010159	0,0001
	G1	0,000316	0,6612	G1	0,001207	0,3918	G1	0,043554	< 0,0001	G1	0,06345	< 0,0001	G1	0,026926	< 0,0001
	G2	0,001149	0,5722	G2	0,01918	0,0204	G2	0,018245	0,0238	G2	0,061118	< 0,0001	G2	0,027852	0,0051
	G3	0,017674	0,0018	G3	0,01759	0,0018	G3	0,003196	0,1856	G3	0,000003	0,9652	G3	0,000872	0,4895
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0199		S*Grupa	0,0002		S*Grupa	0,091		S*Grupa	0,0004		S*Grupa	0,2005	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,2633		Grupa	0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0541		Tlo (S)	0,1317		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 49.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S09 (sitni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,019285	< 0,0001	Ukupno	0,000368	0,4671	Ukupno	0,013248	< 0,0001	Ukupno	0,013588	< 0,0001	Ukupno	0,023033	< 0,0001
	G1	0,030891	< 0,0001	G1	0,003022	0,1751	G1	0,049562	< 0,0001	G1	0,005482	0,0676	G1	0,028251	< 0,0001
	G2	0,031728	0,0028	G2	0,010696	0,0841	G2	0,001153	0,5715	G2	0,036795	0,0013	G2	0,02444	0,0088
	G3	0,002099	0,2835	G3	0,017716	0,0018	G3	0,000415	0,6334	G3	0,011476	0,0119	G3	0,011107	0,0134
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,3486		S*Grupa	0,0002		S*Grupa	0,0011		S*Grupa	0,1397		S*Grupa	0,9631	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0884		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 50.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S09 (sitni prah). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,013342	< 0,0001	Ukupno	0,010301	0,0001	Ukupno	0,001459	0,1473	Ukupno	0,0002	0,5917	Ukupno	0,026141	< 0,0001
	G1	0,005661	0,0633	G1	0,005956	0,0568	G1	0,001611	0,3223	G1	0,009412	0,0165	G1	0,003247	0,1598
	G2	0,032875	0,0023	G2	0,037015	0,0012	G2	0,036336	0,0014	G2	0,032969	0,0023	G2	0,020503	0,0165
	G3	0,012351	0,0091	G3	0,003291	0,1792	G3	0,008098	0,0349	G3	0,004728	0,1072	G3	0,092079	< 0,0001
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,2058		S*Grupa	0,0892		S*Grupa	0,0039		S*Grupa	0,0003		S*Grupa	< 0,0001	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,1103		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	< 0,0001		Tlo (S)	0,0006		Tlo (S)	0,1362		Tlo (S)	0,6974		Tlo (S)	< 0,0001	

**Tablica 51.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L01–L05) i S10 (glina). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L01–površina plojke			L02–koeficijent oblika			L03–dužina plojke			L04–maksimalna širina plojke			L05–dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,016096	< 0,0001	Ukupno	0,006819	0,0017	Ukupno	0,009809	0,0002	Ukupno	0,00793	0,0007	Ukupno	0,006761	0,0018
	G1	0,01852	0,0008	G1	0,000034	0,8855	G1	0,029171	< 0,0001	G1	0,001531	0,3347	G1	0,009369	0,0168
	G2	0,054065	< 0,0001	G2	0,104056	< 0,0001	G2	0,001413	0,5311	G2	0,06837	< 0,0001	G2	0,020813	0,0157
	G3	0,0005	0,6009	G3	0,016004	0,003	G3	0,000625	0,5584	G3	0,000428	0,6282	G3	0,000832	0,4998
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,0052		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,012		S*Grupa	0,0009		S*Grupa	0,0739	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0002		Tlo (S)	0,4375		Tlo (S)	0,0025		Tlo (S)	0,0203		Tlo (S)	0,015	

**Tablica 52.** Rezultati ANCOVA analize. Interakcije između pet istraživanih značajki lista (L06–L10) i S10 (glina). Grupe uzoraka: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla.

Regresija	L06–širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke			L07–širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke			L08–lisni kut na 10 % dužine plojke			L09–lisni kut na 90 % dužine plojke			L10–dužina peteljke		
	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>	Izvor var.	R-kvadrat	<i>P</i>
	Ukupno	0,008226	0,0006	Ukupno	0,003795	0,0194	Ukupno	0,003834	0,0188	Ukupno	0,002477	0,059	Ukupno	0,00108	0,2127
	G1	0,002558	0,2122	G1	0,001212	0,3907	G1	0,000104	0,8013	G1	0,002585	0,2098	G1	0,001062	0,4217
	G2	0,071337	< 0,0001	G2	0,075314	< 0,0001	G2	0,021727	0,0136	G2	0,052779	0,0001	G2	0,0333	0,0022
	G3	0,000947	0,4715	G3	0,016181	0,0028	G3	0,009191	0,0246	G3	0,002611	0,2316	G3	0,000033	0,8936
Homogen.	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	S*Grupa	0,001		S*Grupa	< 0,0001		S*Grupa	0,1037		S*Grupa	0,0007		S*Grupa	0,0233	
ANCOVA	Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>		Izvor var.	<i>P</i>	
	Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001		Grupa	0,1395		Grupa	< 0,0001		Grupa	< 0,0001	
	Tlo (S)	0,0188		Tlo (S)	0,3378		Tlo (S)	0,023		Tlo (S)	0,1801		Tlo (S)	0,4371	

#### 4.2.9. Analiza glavnih sastavnica (eng. *principal component analysis, PCA*)

Analiza glavnih sastavnica na temelju devet značajki ploda pokazala je kako je prva glavna sastavnica (PC1) objasnila 53,19 % ukupne varijabilnosti, dok je druga glavna sastavnica (PC2) objasnila 21,36 % (tablica 53). Osim toga, obje su sastavnice imale svojstvene vrijednosti veće od 1, odnosno 4,79 i 1,92. Visoko značajne korelacije (vrijednost veća od 0,7) utvrđene su između prve glavne sastavnice (PC1) i značajki F1-F6, te između druge glavne sastavnice (PC2) i F8 i F9.

**Tablica 53.** Pearsonov koeficijent korelacija između devet morfoloških značajki plodova te vrijednosti prvih dviju glavnih sastavnica. Značajke ploda: F1–masa ploda; F2–visina ploda; F3–širina ploda; F4–debljina ploda; F5–dužina hiluma; F6–širina hiluma; F7–broj sjemenki; F8–broj ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku; F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku.

Značajka	Glavna sastavnica (PC)	
	PC1	PC2
F1	0,949	-0,026
F2	0,804	-0,031
F3	0,944	-0,081
F4	0,941	-0,069
F5	0,811	0,296
F6	0,864	0,232
F7	-0,087	-0,347
F8	-0,198	0,905
F9	-0,110	0,910
Svojstvena vrijednost	4,79	1,92
% varijance	53,19	21,36

PC analiza provedena za 10 značajki lista dala je slične rezultate, s PC1 odgovornom za 54,53 %, i PC2 za 26,39 % ukupne varijabilnosti (tablica 54). Prve su dvije sastavnice imale svojstvene vrijednosti veće od 1, odnosno vrijednost od 5,45 i 2,64. Nadalje PC1 je visoko korelirala sa značajkama L01 i L03-L07, dok je PC2 slično visoko korelirala sa značajkama L08 i L09.

**Tablica 54.** Pearsonov koeficijent korelacija između 10 morfoloških značajki lista te vrijednosti prvih dviju glavnih sastavnica. Značajke listova: L01–površina lista; L02–koeficijent oblika; L03–dužina lisne plojke; L04–maksimalna širina plojke; L05–dužina lisne plojke mjerena od osnove plojke do točke najveće širine plojke; L06–širina lisne plojke na 50 % dužine; L07–širina lisne plojke na 90 % dužine; L08–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 10 % dužine; L09–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 25 % dužine; L10–dužina peteljke.

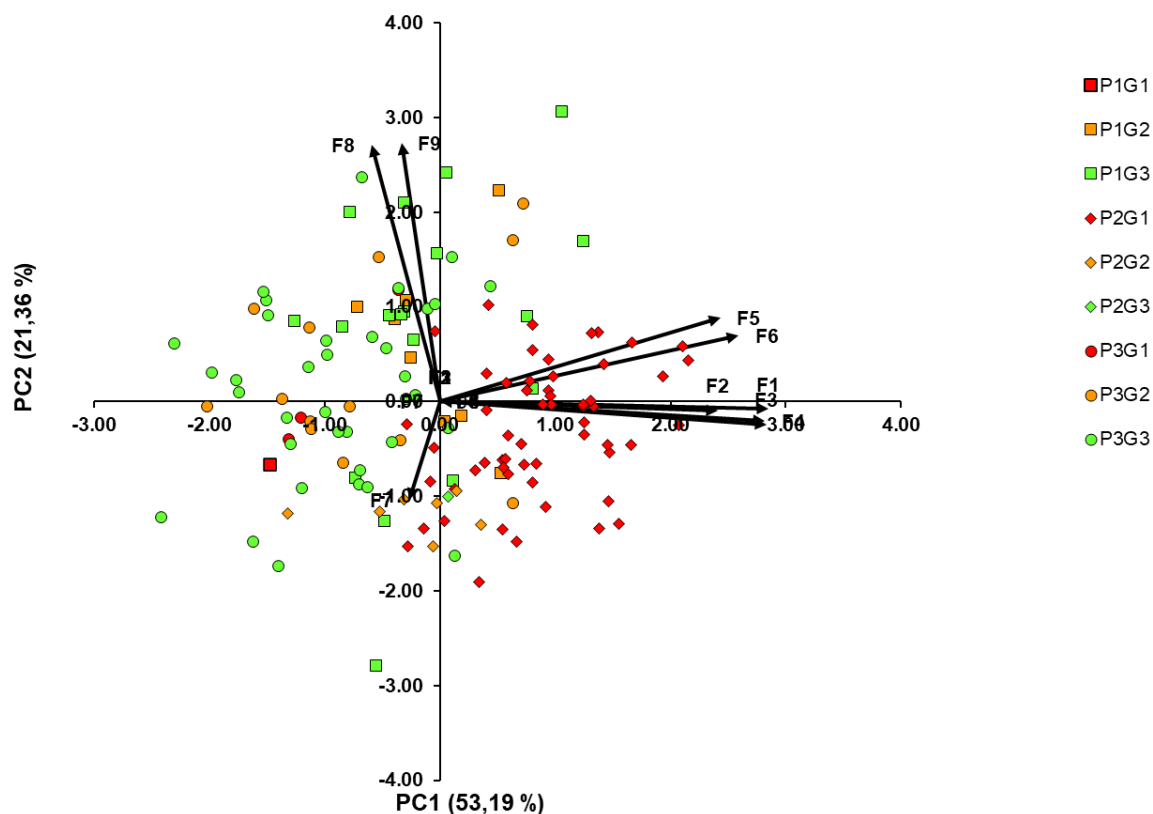
Značajka	Glavna sastavnica (PC)	
	PC1	PC2
L01	0,968	-0,151
L02	0,500	0,357
L03	0,763	-0,586
L04	0,968	0,049
L05	0,864	-0,411
L06	0,971	0,080
L07	0,883	0,174
L08	0,009	0,880
L09	0,242	0,923
L10	-0,468	-0,557
Svojstvena vrijednost	5,45	2,64
% varijance	54,53	26,39

PC analiza za 10 parametara tla utvrdila je kako prve četiri sastavnice imaju svojstvenu vrijednost veću od 1 (tablica 55). Prve dvije sastavnice opisuju 31,19 % i 17,97 % ukupne varijabilnosti. Značajne su pak korelacije, s vrijednostima iznad 0,7, zabilježene između PC1 i parametara S01-S03, te između PC2 i parametra S07. Treća glavna sastavnica bila je u visokoj pozitivnoj korelaciji sa S09 te u negativnoj sa S10. Vrijednost koeficijenta korelacije viša od 0,7 utvrđena je i između četvrte glavne sastavnice i parametra S04.

**Tablica 55.** Pearsonov koeficijent korelacija između 10 pedoloških parametara tla vrijednosti prvih četiriju glavnih sastavnica. Parametri: S01–pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O; S02–pH-vrijednost u otopini CaCl<sub>2</sub>; S03–postotni udio ukupnog dušika; S04–postotni udio organskog ugljika; S05–postotni udio ukupnog dušika/postotni udio organskog ugljika; S06–krupni pijesak; S07–sitni pijesak; S08–krupni prah; S09–sitni prah; S10–glina.

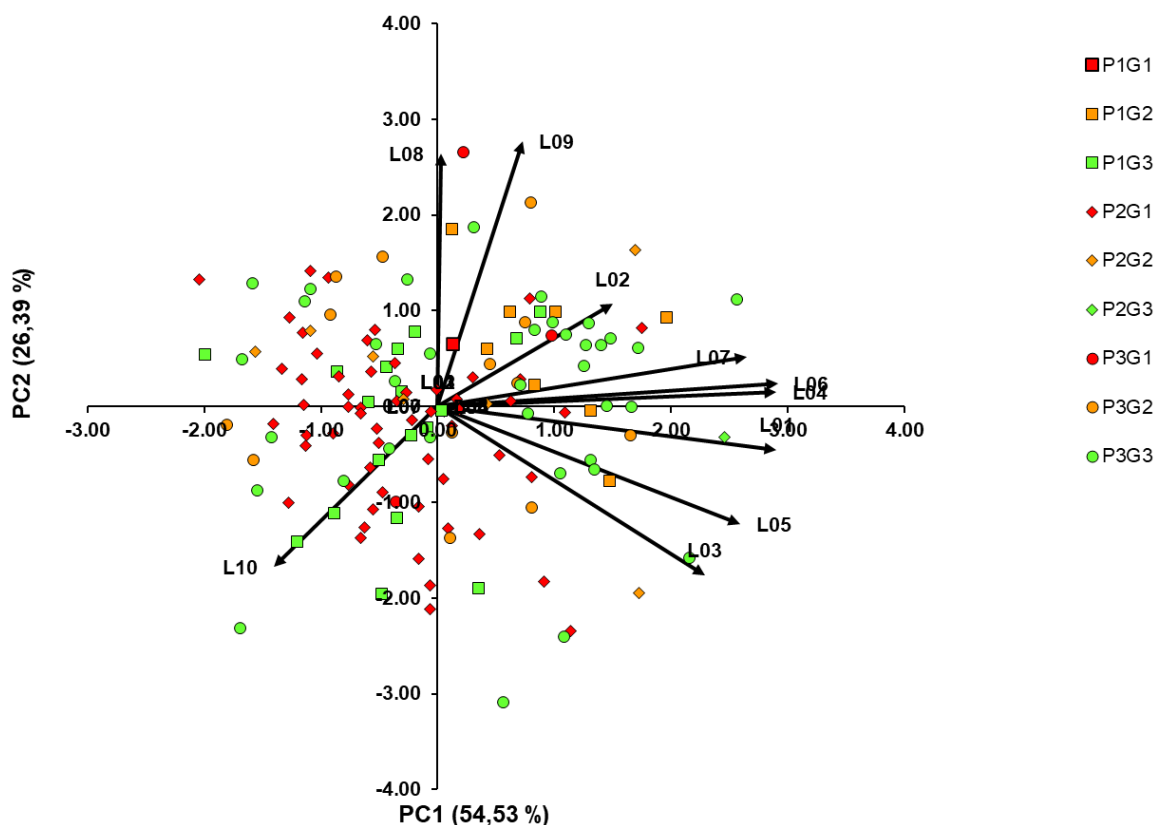
Parametar	Glavna sastavnica (PC)			
	PC1	PC2	PC3	PC4
S01	0,814	-0,320	0,222	-0,249
S02	0,839	-0,331	0,195	-0,200
S03	0,745	0,183	-0,023	0,618
S04	0,572	0,363	0,005	0,720
S05	-0,554	0,439	0,040	0,148
S06	0,536	0,596	0,208	-0,396
S07	0,044	0,824	0,081	-0,347
S08	-0,404	0,041	0,212	0,323
S09	-0,317	-0,380	0,749	0,199
S10	0,104	-0,214	-0,958	0,0087
Svojstvena vrijednost	3,12	1,80	1,66	1,45
% varijance	31,19	17,97	16,62	14,46

Rezultati analize glavnih sastavnica ukazali su na razdvajanje triju genetički zasebnih grupa, s obzirom na morfološke karakteristike ploda (slika 11) i lista (slika 12), stavljajući hibridna stabla (G2) u sredinu, između maruna (G1) i divljih stabala (G3), te ih djelomično preklapajući. Nadalje, kada se u obzir uzmu pedološki parametri (slika 13) nije utvrđeno grupiranje uzoraka prema njihovom geografskom porijeklu.

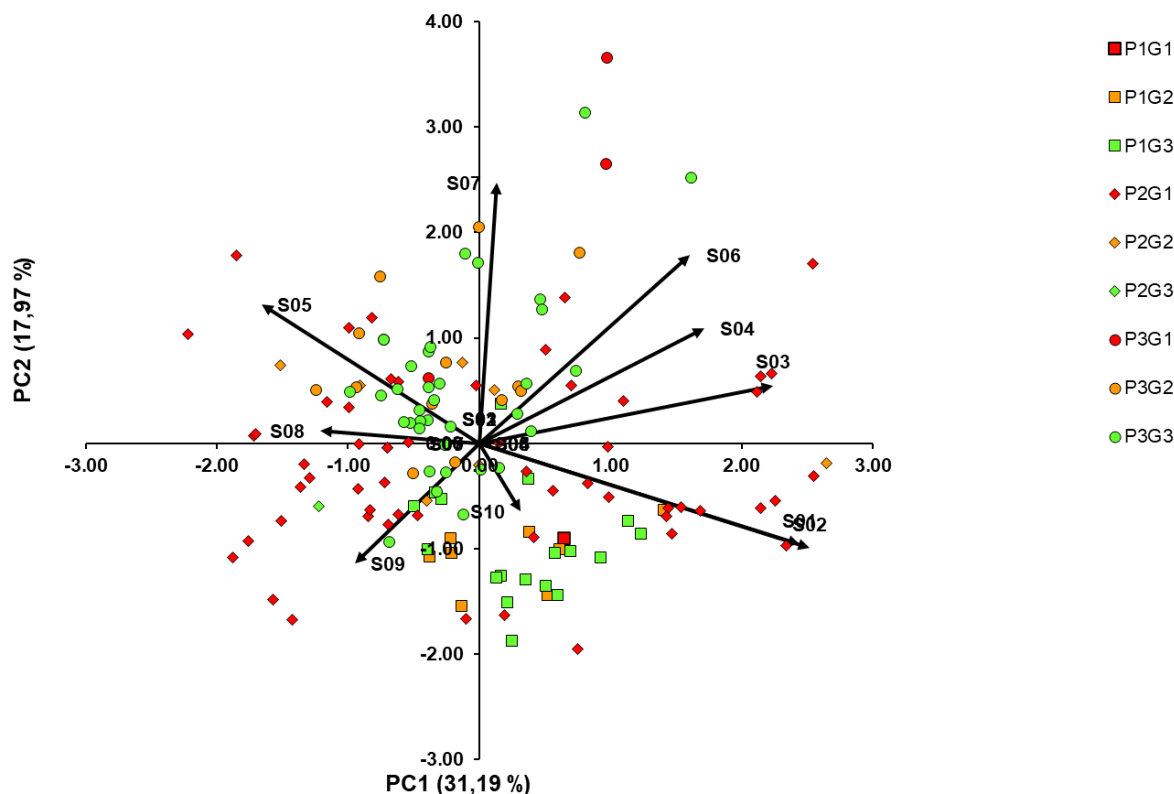


**Slika 11.** Grafički prikaz analize glavnih sastavnica (PCA), na temelju devet morfoloških značajki ploda. Značajke ploda: F1–masa ploda; F2–visina ploda; F3–širina ploda; F4–debljina ploda; F5–dužina hiluma; F6–širina hiluma; F7–broj sjemenki; F8–broj ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku; F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku. Grupe stabala: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla. Lokacije uzorkovanja: P1–Lovrin; P2–Lovran; P3–Cres.





**Slika 12.** Grafički prikaz analize glavnih sastavnica (PCA), na temelju 10 morfoloških značajki lista. Značajke: Značajke lista: L01–površina lista; L02–koeficijent oblika; L03–dužina lisne plojke; L04–maksimalna širina plojke; L05–dužina lisne plojke mjerena od osnove plojke do točke najveće širine plojke; L06–širina lisne plojke na 50 % dužine; L07–širina lisne plojke na 90 % dužine; L08–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 10 % dužine; L09–kut koji zatvaraju glavna žila te linija koja spaja osnovu plojke s točkom na rubu plojke, na 25 % dužine; L10–dužina peteljke. Grupe stabala: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla. Lokacije uzorkovanja: P1–Lovrin; P2–Lovran; P3–Cres.



**Slika 13.** Grafički prikaz analize glavnih sastavnica (PCA), na temelju 10 pedoloških parametara tla. Parametri tla: Parametri: S01–pH-vrijednost u H<sub>2</sub>O; S02–pH-vrijednost u otopini CaCl<sub>2</sub>; S03–postotni udio ukupnog dušika; S04–postotni udio organskog ugljika; S05–postotni udio ukupnog dušika/postotni udio organskog ugljika; S06–krupni pijesak; S07–sitni pijesak; S08–krupni prah; S09–sitni prah; S10–glina. Grupe stabala: G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla. Lokacije uzorkovanja: P1–Lovrin; P2–Lovran; P3–Cres.

#### 4.2.10. Mantel test

Mantel test je primijenjen između matrica genetičkih, morfoloških (za list i plod) te pedoloških udaljenosti između istraživanih jedinki. Statistički značajne korelacije utvrđene su između genetičkih i morfoloških udaljenosti za list ( $r = 0,094$ ;  $P_{\text{Mantel}} = 0,039$ ), a još više vrijednosti utvrđene su između genetičkih i morfoloških udaljenosti za plod ( $r = 0,275$ ,  $P_{\text{Mantel}} = 0,001$ ). Pedološki parametri, ipak, nisu se pokazali značajnima naspram genetičkih ( $r = -0,116$ ,  $P_{\text{Mantel}} = 0,996$ ) ili morfoloških (list i plod) ( $r = -0,053$ ,  $P_{\text{Mantel}} = 0,125$ ); ( $r = -0,012$ ,  $P_{\text{Mantel}} = 0,610$ ) matrica. Nadalje, statistički značajna korelacija nije utvrđena između morfoloških matrica za list i za plod ( $r = 0,010$ ,  $P_{\text{Mantel}} = 0,392$ ).

#### 4.2.11. Diskriminantna analiza

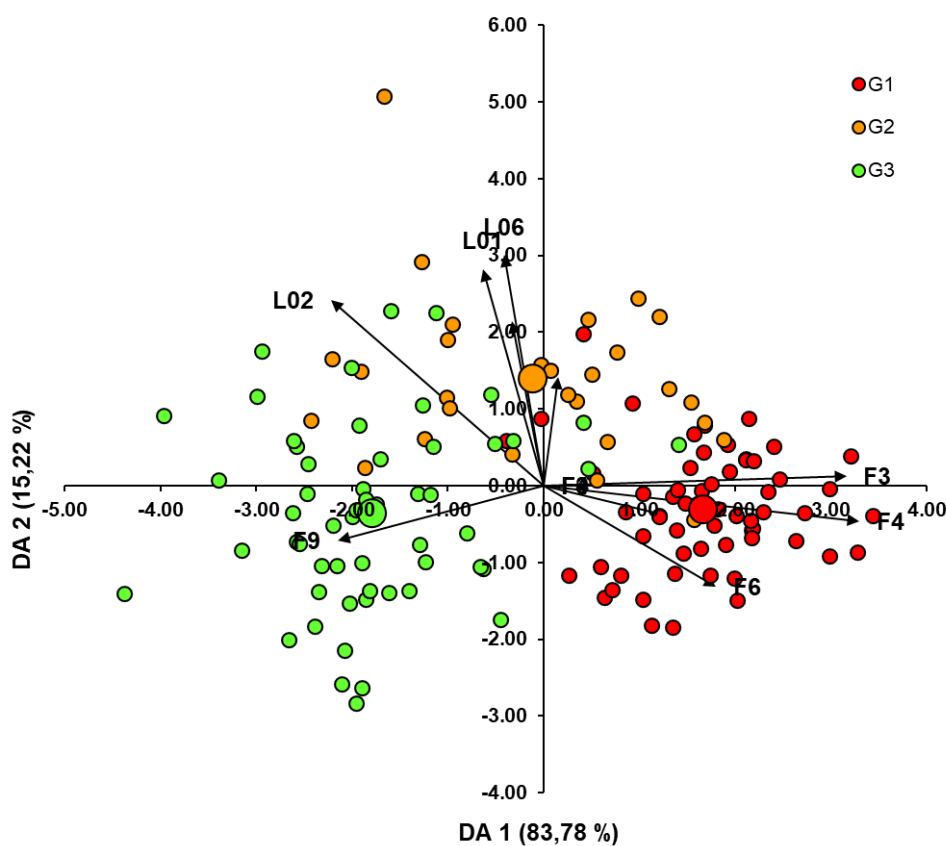
Korištenjem diskriminantne analize, četiri od 10 morfoloških značajki (debljina ploda (F4), dužina najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (F9), koeficijent oblika lista (L2), te širina lisne plojke na 50 % dužine (L06)) odabrane su kao najbolji faktori diskriminacije između istraživanih grupa G1, G2 i G3 (tablica 56). Diskriminantna analiza, temeljena na 10 morfometrijskih značajki lista i ploda demonstrirala je uspješnost klasifikacije od 84,03 %. Jedinke u G1 bile su točno klasificirane u najvišem postotku (95,08 %), dok su jedinke u G2 bile točno klasificirane u najmanjem postotku (57,14 %). Točnost klasifikacije stabala u G3 iznosila je 85,45 %. Niti jedno stablo u G1 nije pogrešno klasificirano u G3, dok su pogrešno klasificirane jedinke unutar G2 bile podjednako raspodijeljene između G1 i G3.

**Tablica 56.** Diskriminantna analiza. F3–širina ploda; F4–debljina ploda; F5–dužina hiluma; F6–širina hiluma; F7–broj sjemenki; F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku; L01–površina lista; L02–koeficijent oblika; L03–dužina lisne plojke; L06–širina lisne plojke na 50 % dužine.

Značajka	<i>Partial</i> R-kvadrat	F-vrijednost	<i>P</i> (F)	Wilksova Lambda	<i>P</i> (Lambda)
F4	0,487	67,00	***	0,513	***
F9	0,266	25,43	***	0,376	***
L02	0,186	15,92	***	0,306	***
L06	0,097	7,39	***	0,276	***
F6	0,088	6,62	**	0,252	***
F3	0,039	2,79	*	0,242	***
F5	0,075	5,48	**	0,224	***
F7	0,038	2,68	*	0,215	***
L01	0,032	2,22	ns	0,208	***
L03	0,056	3,90	*	0,197	***

\*\*\* značajan pri  $P < 0,001$ , \*\* značajan pri  $0,001 < P < 0,01$ , \* značajan pri  $0,01 < P < 0,05$ , ns označava neznačajne vrijednosti ( $P > 0,05$ )

Diskriminantnom analizom (slika 14) utvrđena je jasna diferencijacija na temelju 10 morfoloških značajki između G1 i G3, duž prve osi, koja je odgovarala za 83,78 % ukupne varijabilnosti. Duž iste osi, jasan intermedijarni trend hibridnih jedinki iz G2 je uočljiv. Duž druge osi, koja je odgovarala ostatku varijabilnosti od 15,22 %, uočljiv je trend grupiranja hibridnih jedinki u gornjem dijelu dijagrama. Ovo je grupiranje duž prve osi prvenstveno rezultat svojstava vezanih uz veličinu plodova, uz svojstvo dužine najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (F9). Duž druge osi, isti je slučaj sa značajkama vezanim uz oblik i veličinu lista.



**Slika 14.** Diskriminantna analiza triju grupa stabala (G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla), za 10 morfoloških značajki ploda i lista. Svako stablo označeno je malim kružićem (G1–zeleno; G2–narančasto, G3–crveno), dok su baricentri svake grupe prikazani većim kružićem. F3–širina ploda; F4–debljina ploda; F5–dužina hiluma; F6–širina hiluma; F7–broj sjemenki; F9–dužina najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku; L01–površina lista; L02–koeficijent oblika; L03–dužina lisne plojke; L06–širina lisne plojke na 50 % dužine.

### **4.3. Rezultati istraživanja multielementne analize jestivog dijela ploda kestena i tla**

#### **4.3.1. Multielementna karakterizacija jestivog dijela ploda kestena**

Multielementni sastav jestivog dijela ploda kestena (sjemenki) analiziran je na razini sveukupnog uzorka, kao i na razini pojedine grupe (tablica 57). Za analizu je bilo odabrano 28 elemenata, pri čemu ih je 18 kvantificirano (Al, Cd, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Sr, Ti, Tl, V, Zn), dok je za deset elemenata u analiziranim uzorcima bilo moguće konstatirati da su prisutni u koncentracijama koje su ispod njihovih detekcijskih granica (As, B, Ba, Be, Cr, Li, Pb, S, Sb, Se). Promatra li se pet makroelemenata, samo je sumpor (S) bio ispod razine detekcije, dok su ostala četiri elementa imala slijedeće srednje vrijednosti (izražene kao mg/kg suhe mase sjemenki): Ca (5267), K (137300), Mg (5952) i P (10470). S druge strane, svih je sedam mikroelemenata bilo mjerljivo, sa slijedećim srednjim vrijednostima: Fe (96,2), Mn (481), Zn (101), Cu (57,1), Mo (0,365) i Ni (12,7), svima iskazanim kao mg/kg suhe mase sjemenki. Na razini pojedine grupe (G1, G2 i G3), makroelementi su se iskazali najvišim vrijednostima u G3 (Ca, Mg, P) i G2 (K), dok su najniže vrijednosti Ca i Mg utvrđene u G1, a najniže vrijednosti K i P u G3, odnosno G2. Obrnuti je trend primijećen za mikroelemente, s većinom najnižih srednjih vrijednosti izmjerenih u G3 (Co, Cu, Fe, Mo), dok je većina najviših vrijednosti izmjerena u G1 (Co, Cu, Fe, Zn, Mo). Grupa G2 bila je definirana prevladavajuće intermedijarnim vrijednostima.

ANOVA je pokazala kako 11 od 18 mjerenih elemenata u sjemenkama ima statistički značajno različite vrijednosti između triju grupa (G1, G2, G3). Vrijednosti elemenata Co, Ni, P, Ti, Cd, Mo, i Tl nisu bile značajne, dok su tri elementa, Ca, Mg i Sr, mogla razlikovati sve tri grupe. S druge strane, vrijednosti Al, Co, Cu, Ti i Mo smjestile su G2 između G1 i G3, dok su se prema njima G1 i G3 grupirale zajedno. Sličan je trend primijećen i za G3, koja se izdvojila od G1 i G2 prema vrijednostima K, dok se niti jedna grupa nije izdvojila prema vrijednostima Zn. Nadalje, G1 se izdvojila od G2 i G3, promatraju li se vrijednosti Fe, Mn i V.

**Tablica 57.** Srednje vrijednosti (M), standardne devijacije (SD), minimalne (Min) i maksimalne (Max) vrijednosti udjela (razina) 18 determiniranih elemenata u tragovima u uzorcima sjemenki, iskazanih kao mg/kg osušenog sjemena. Rezultati su izračunati na razini grupe G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla) te sumarno.

Element	G1		G2		G3		Sveukupno			
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	Min	Max
Al	27,22 <sup>B</sup>	16,70	34,78 <sup>AB</sup>	16,44	41,14 <sup>A</sup>	24,57	32,90	19,89	5,73	117
Ca	4731 <sup>C</sup>	740,11	5342 <sup>B</sup>	983,66	6133 <sup>A</sup>	1472	5267	1194	2478	9439
Co	0,88 <sup>A</sup>	0,57	0,75 <sup>AB</sup>	0,48	0,607 <sup>B</sup>	0,59	0,77	0,56	0,01	3,64
Cd	0,44 <sup>A</sup>	0,39	0,44 <sup>A</sup>	0,20	0,41 <sup>A</sup>	0,15	0,43	0,30	0,01	2,16
Co	0,88 <sup>A</sup>	0,57	0,75 <sup>AB</sup>	0,48	0,61 <sup>B</sup>	0,59	0,77	0,56	0,02	3,64
Cu	60,24 <sup>A</sup>	11,02	55,17 <sup>AB</sup>	12,60	53,29 <sup>B</sup>	10,60	57,08	11,66	29,56	86,44
Fe	106,90 <sup>A</sup>	22,58	87,00 <sup>B</sup>	20,51	85,61 <sup>B</sup>	20,66	96,15	23,79	33,16	172,79
K	143600 <sup>A</sup>	36494	144069 <sup>A</sup>	44365	120393 <sup>B</sup>	16450	137342	35916	93990	261100
Mg	5508 <sup>C</sup>	719,75	6018 <sup>B</sup>	872,50	6668 <sup>A</sup>	762,14	5952	907,97	2677	8385
Mn	396,60 <sup>B</sup>	229,05	524,29 <sup>A</sup>	201,84	589,45 <sup>A</sup>	172,48	481,04	223,43	95,72	1060
Mo	0,446 <sup>A</sup>	0,458	0,354 <sup>AB</sup>	0,433	0,233 <sup>B</sup>	0,367	0,365	0,435	0,059	2,26
Ni	11,28 <sup>A</sup>	6,86	13,58 <sup>A</sup>	6,91	14,23 <sup>A</sup>	7,16	12,65	7,03	3,68	33,74
P	10390 <sup>A</sup>	1663	10270 <sup>A</sup>	1980	10803 <sup>A</sup>	2658	10474	2051	4909	17750
Sr	2,56 <sup>C</sup>	0,62	3,50 <sup>B</sup>	1,14	4,31 <sup>A</sup>	1,59	3,27	1,32	0,88	7,92
Ti	1,39 <sup>B</sup>	1,03	1,58 <sup>AB</sup>	0,94	1,89 <sup>A</sup>	1,03	1,57	1,03	0,02	4,07
Tl	1,04 <sup>A</sup>	1,07	1,22 <sup>A</sup>	0,98	1,00 <sup>A</sup>	0,81	1,07	0,98	0,04	4,74
V	0,70 <sup>B</sup>	0,92	1,46 <sup>A</sup>	1,95	1,84 <sup>A</sup>	1,76	1,20	1,55	0,17	7,54
Zn	103,81 <sup>A</sup>	16,30	95,10 <sup>B</sup>	16,22	99,80 <sup>AB</sup>	15,22	100,56	16,27	51,29	158,75

Srednje su vrijednosti označene različitim slovima, s obzirom na stupanj značajnosti u ANOVA analizi, pri  $P \leq 0,05$ .

#### 4.3.2. Multielementna analiza uzoraka tla

Multielementni sastav tla detektiran je pomoći istih 28 elemenata, no samo je njih 14 kvantificirano (tablica 58). Na ukupnom uzorku, srednje vrijednosti četiriju makroelemenata detektiranih u tlu bile su slijedeće (izražene kao mg/kg suhe mase tla): Ca (3985), K (8977), Mg (5179) i P (499). Elementni sastav također je detektiran za svih sedam mikroelemenata, sa

slijedećim srednjim vrijednostima, iskazanim kao mg/kg suhe mase tla: Fe (44637), Mn (1219), Zn (115), Cu (69,7) i Ni (74,1).

**Tablica 58.** Srednje vrijednosti (M), standardne devijacije (SD), minimalne (Min) i maksimalne (Max) vrijednosti udjela (razina) 14 detektiranih elemenata u uzorcima tla, iskazanih kao mg/kg zrakovih tla. Rezultati su izračunati na razini grupe (G1–maruni; G2–hibridna stabla; G3–divlja stabla) te sumarno.

Element	G1		G2		G3		Sveukupno			
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	Min	Max
Al	61989	10730	63235	14010	57879	15546	61167	13097	10500	98930
Ca	4113	2034	3932	1488	3810	1617	3985	1795	1410	9661
Co	23,21	3,96	28,15	4,15	30,10	5,53	26,32	5,41	12,41	42,65
Cu	69,64	20,76	69,01	19,01	70,46	28,73	69,71	22,68	33,54	174,23
Fe	42763	8527	46813	11437	45953	15600	44637	11620	26670	94760
K	8771	2850	9338	4339	9012	3675	8977	3478	3120	23470
Mg	5974	1685	4817	1212	4117	837,66	5179	1594	2759	12550
Mn	967,19	314,34	1416	642,27	1482	543,62	1219	534,15	308,56	2979
Ni	74,14	33,99	77,31	35,65	71,21	29,66	74,12	33,13	39,05	191,27
P	519,46	242,11	506,91	102,62	456,00	115,66	498,94	186,35	187,14	1409
Sr	59,89	19,95	64,39	18,93	56,84	13,34	60,16	18,20	25,79	128,01
Ti	2267	424,80	2477	368,50	2481	482,64	2377	438,91	1111	4272
V	215,19	90,85	246,74	92,30	216,78	61,23	223,40	84,65	98,71	523,55
Zn	123,73	34,12	108,15	27,18	105,21	41,61	114,81	35,68	69,52	270,90

### 4.3.3. Korelacije

Za multielementni sastav sjemenki, sveukupno su utvrđene 82 statistički značajne korelacije između elemenata. Korelacije su uglavnom bile slabe ( $< 0,5$ ), s 12 umjereno jakih ( $0,5-0,7$ ) korelacija, od kojih je jedna bila negativna, a 11 pozitivnih. Jake su korelacije ( $> 0,7$ ) utvrđene za samo dva para elemenata, Cu i P te Mo i V.

Promatraju li se korelacije vrijednosti elementnog sastava u uzorcima tla, sveukupno je 54 od 91 moguće korelacije bilo značajno. Većina je korelacija bila slaba, osim sedam korelacija, od kojih je šest bilo pozitivnih (Fe i V, Fe i Ni, K i Mn, P i K, Ni i V te Zn i Ti), a jedna negativna (Mg i Co).

Korelacije između elemenata u uzorcima tla i sjemenki analizirane su te su pokazale gotovo podjednak broj pozitivnih i negativnih korelacija. Na sveukupnom uzorku, značajne su korelacije utvrđene za Co, Mn, Mg, Sr, i Zn, s tri negativne korelacije: Co ( $r = -0,193$ ;  $P = 0,021$ ), Mg ( $r = -0,277$ ;  $P = 0,001$ ) i Sr ( $r = -0,203$ ;  $P = 0,015$ ). Unutar grupe makro- i mikroelemenata, značajne su korelacije utvrđene za Mg ( $r = -0,277$ ;  $P = 0,001$ ), Mn ( $r = 0,425$ ;  $P < 0,001$ ) i Zn ( $r = 0,382$ ;  $P < 0,001$ ).

Na razini pojedinih grupa, grupa G1 imala je samo dvije značajne korelacije, pozitivnu za Zn ( $r = 0,259$ ;  $P = 0,033$ ) te negativnu za Sr ( $r = -0,362$ ;  $P = 0,002$ ). Grupa G2 imala je tri značajne korelacije, i to sve tri unutar grupe makro- i mikroelemenata, s pozitivnim korelacijama za Mn ( $r = 0,565$ ;  $P = 0,000$ ), P ( $r = 0,364$ ;  $P = 0,032$ ) i Zn ( $r = 0,541$ ;  $P = 0,001$ ). Grupa G3 okarakterizirana je najvišim brojem značajnih korelacija (Al, Ca, P, V, Zn), te dvije negativne korelacije, za Ca ( $r = -0,321$ ;  $P = 0,047$ ) i V ( $r = -0,412$ ;  $P = 0,010$ ).

#### **4.3.4. Analiza kovarijance (ANCOVA)**

ANCOVA je provedena samo za one elemente koji su bili izmjereni i u tlu i u sjemenkama (parovi uzoraka). Sveukupno, 14 od 18 elemenata zadovoljilo je te kriterije, s osam elemenata koji su pokazali statistički značajne razlike (Al, V, Ca, K, Mg, Sr, Cu, Mn). Nadalje, tri su elementa bila karakterizirana homogenim regresijskim nagibima (V, Ca, P). Sve tri su grupe (G1, G2, G3) bile razlikovane trima elementima, Ca, Mg, i Sr. Osim toga, G2 se grupirala s G1 i s G3, gledaju li se vrijednosti Al i Cu. S druge strane, G1 se razdvojila od druge dvije grupe prema Fe i V, dok se G3 odvojila od drugih grupa prema vrijednostima za K.

#### **4.3.5. Diskriminantna analiza**

Jedanaest od 28 određivanih elemenata u sjemenkama pokazale su se značajnima u razlikovanju između triju istraživanih grupa (G1, G2, G3). Najjača diskriminirajuća snaga utvrđena je za mikroelement Fe te makroelement Mg, s vrijednostima djelomične Wilksove lambde od 0,603, odnosno od 0,525 (tablica 59). Značajnosti drugih elemenata, u padajućem rasporedu, su: K, Ca, Al, Cd, Na, Ni, Cu, Mo te Zn.

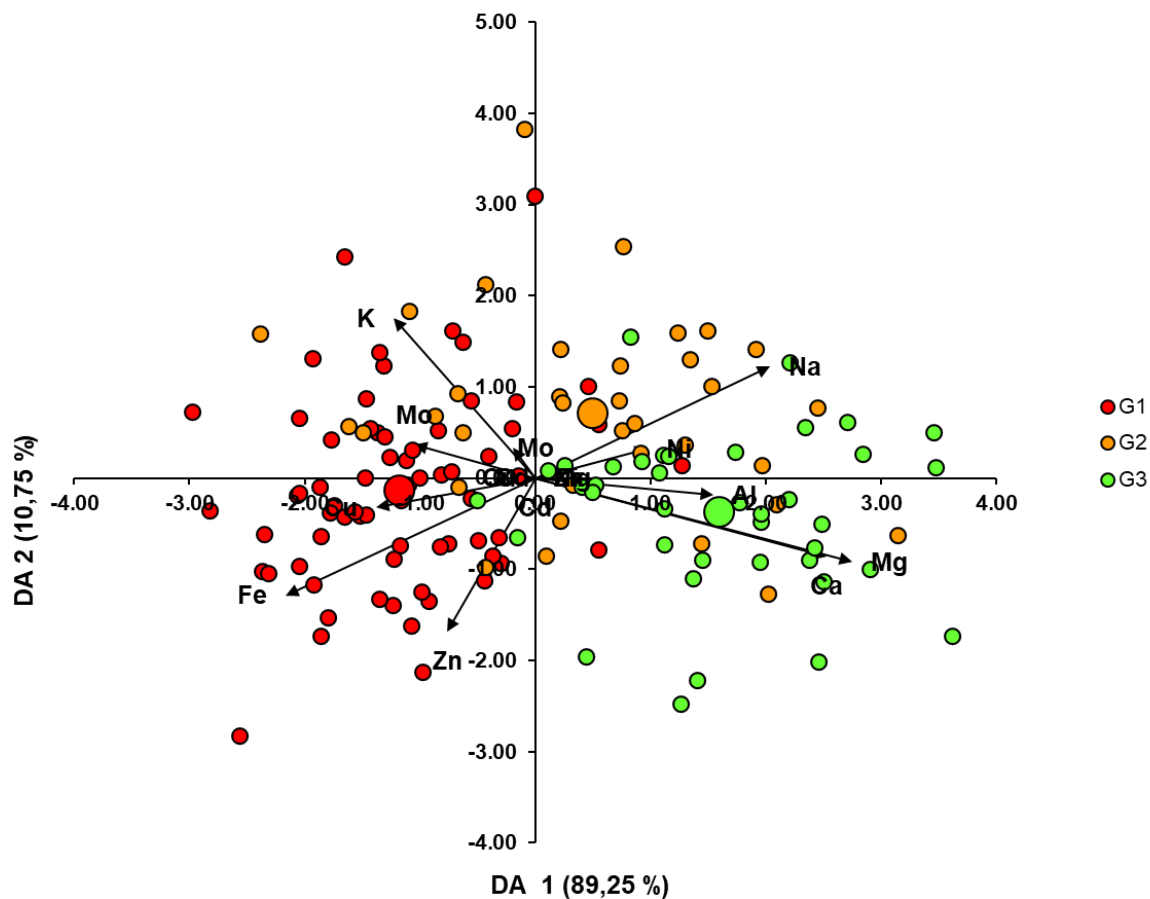


**Tablica 59.** Rezultati diskriminantne analize.

Faktor	<i>Partial R-</i> kvadrat	F-vrijednost	<i>P</i> (F)	Wilksova Lambda	<i>P</i> (Lambda)
Fe	0,113	8,770	0,000	0,603	< 0,0001
Mg	0,129	10,120	< 0,0001	0,525	< 0,0001
K	0,053	3,790	0,025	0,497	< 0,0001
Ca	0,056	4,020	0,020	0,469	< 0,0001
Al	0,081	5,910	0,003	0,434	< 0,0001
Cd	0,057	4,010	0,020	0,409	< 0,0001
Na	0,041	2,830	0,062	0,393	< 0,0001
Ni	0,036	2,460	0,090	0,379	< 0,0001
Cu	0,030	2,010	0,138	0,367	< 0,0001
Mo	0,029	1,950	0,146	0,357	< 0,0001
Zn	0,030	1,990	0,141	0,346	< 0,0001

Klasifikacijska funkcija točno je klasificirala 69,01 % istraživanih stabala u tri genetičke grupe (G1, G2, G3), s najvišim brojem točno klasificiranih stabala u grupi G1 (86,76 %) te najmanjim brojem točno klasificiranih u grupi G2 (40,00 %).

Varijanca duž prve osi objasnila je 89,25 % varijabilnosti, dok je preostalih 10,75 % bilo objašnjeno duž druge osi. Grafički prikaz diskriminantne analize (slika 15) pokazuje razdvajanje grupa G1 i G3, koje su pokazale samo manje preklapanje. Grupa G2, s druge strane, pozicionirala se intermedijarno, s nešto većim preklapanjem s obje grupe, G1 i G3.



**Slika 15.** Grafički prikaz diskriminantne analize, za 11 elemenata u tragovima u sjemenkama kestena (tablica 19). Tri su grupe označene različitim bojama: grupa G1 (maruni) – crveno; grupa G2 (hibridna stabla) – narančasto; grupa G3 (divlja stabla) – zeleno. Svako stablo označeno je malim kružićem, dok su baricentri svake grupe prikazani većim kružićem.

## 5. Rasprava

### 5.1. Genetička raznolikost maruna

Dobiveni rezultati potvrdili su visoku učinkovitost gSSR i EST-SSR markera u opisivanju genetičke raznolikosti pitomog kestena, kao što je objavljeno i u ranijim radovima za divlje populacije (Beccaro i sur. 2012; Fernández-Cruz i Fernandez- López 2016; Martín i sur. 2010a; Poljak i sur. 2017) i kultivare (Martín i sur. 2010, 2016, 2017; Pereira-Lorenzo i sur. 2010; Beghè i sur. 2013; Torello Marinoni i sur 2013; Fernández-Cruz i Fernandez- López 2016; Alessandri i sur. 2022). Najinformativniji, odnosno najmanje informativni gSSR lokus bio je CsCAT3 ( $PIC = 0,785$ ), odnosno EMCs15 ( $PIC = 0,013$ ), što je bilo i očekivano, s obzirom na iste rezultate u prijašnjim istraživanjima (Pereira-Lorenzo i sur. 2010, 2017; Martín i sur. 2012; Alessandri i sur. 2022). Vrijednosti  $N_a$  dobivene u ovome istraživanju (8,67 za gSSR i 3,78 za EST-SSR) nalaze se unutar raspona podataka za južnu Europu za obje grupe markera, gSSR i EST-SSR (Marinoni i sur. 2003; Martín i sur. 2010, 2016, 2017; Pereira-Lorenzo i sur. 2010; Beghè i sur. 2013; Alessandri i sur. 2022), s rasponima podataka 4,75–13,25, odnosno 0,78–4,00. Razlike u podacima između gSSR i EST-SSR grupa markera potječu iz različitih područja genoma koje oni procjenjuju. Dok se SSR markeri nalaze na intronima ili nekodirajućim regijama DNA, EST-SSR markeri su svojstveno vezani za pojedini funkcionalni gen (Zhou i sur. 2015). EST-SSR markeri su konzervativniji zbog povezanosti s određenim genom, te su zbog toga financijski i vremenski isplativiji način istraživanja genetičke raznolikosti na jednome genu ili raznolikosti povezane uz jedan gen. Za razliku od toga, učestalost u genomu, jednostavna reprodukcija i visoki polimorfizam gSSR markera čini ih posebice prikladnim za karakterizaciju germplazme, identifikaciju kultivara i analizu roditeljskih odnosa (Varshney i sur. 2005; Zhou i sur. 2015; Parthiban i sur. 2018; Huang i sur. 2020).

Iako su na početku ovog istraživanja smatrane voćnjacima, populacije P1 i P3 pokazale su razine genetičke raznolikosti sličnije onima u divljim populacijama nego voćnjacima, s razinama očekivane i zabilježene heterozigotnosti sličnim onima objavljenim u Španjolskoj (Martín i sur. 2010; Mattioni i sur. 2013; Fernández-Cruz i Fernandez- López 2016) i Švicarskoj (Beccaro i sur. 2012), te nešto nižim od onih u Bugarskoj (Lusini i sur. 2014), Italiji (Mattioni i sur. 2013) i Grčkoj (Martín i sur. 2010a). U usporedbi s populacijama iz Male Azije i Crnog mora, koje su karakterizirane visokom genetičkom varijabilnošću, kao posljedicom bivanja na kontaktnoj zoni između dvaju glacijalnih refugija (Villani i sur. 1999; Mattioni i

sur. 2013), vrijednosti u ovome istraživanju bile su razumljivo niže. Kao posljedica zapuštanja zemljišta u 20. stoljeću (Beghè i sur. 2013; Poljak i sur. 2016), ovi su voćnjaci napušteni i u najvećoj su mjeri zarasli prirodnom vegetacijom. Priljev divljih gena povećao je raznolikost ovih populacija te su danas P1 i P3 genetički bliskije divljim populacijama nego kultiviranim nasadima. Iako su jedinke klonalnog podrijetla pronađene u P3, većina vidljivo cijepljenih stabala bila je mrtva i, zajedno s nedostatkom novocijepljenih stabala, ukazala je na to da su ova cijepljena stabla najvjerojatnije zadnja stabla iz nekadašnjeg kultiviranog nasada. Napuštanje zemljišta ovih razmjera u prošlosti je dokazano utjecalo na spontanu obnovu krajobraza te povratak divljine, posebice u Mediteranskom bazenu (Plieninger i sur. 2013), te je u sinergiji s različitostima u stanišnim uvjetima, zasigurno utjecalo na razinu genetičke raznolikosti zabilježenu u P1 i P3.

Za razliku od naturaliziranog stanja u populacijama P1 i P3, populacija P2 pokazala je nisku razinu genetičke raznolikosti, sličnu onoj u voćnjacima. Izrazit ljudski utjecaj i dulje razdoblje vegetativnog razmnožavanja prisutni u P2 najvjerojatnije su održali nisku genetičku raznolikost te populacije, kao što su u prijašnjem istraživanju naveli Mattioni i sur. (2013). Većina ovih voćnjaka na području Lovrana u vlasništvu je i kultivaciji lokalnih obitelji, a znanje o tehnikama cijepljenja 'Lovranskog Maruna' prenosi se generacijama (Tumpa i sur. 2021). Ovo je vidljivo u visokome broju klonalnih genotipova, sa 70 jedinki koje su pripadale genotipu M001 i grupi genotipova M002-M005. Niska alelna raznolikost u P2 nadalje je ilustrirana sa samo 13 jedinstvenih genotipova pronađenih u ovoj populaciji, kao i veoma niskim vrijednostima indeksa genotipskog bogatstva (0,195) i Simpsonovog komplementnog indeksa (0,388). Ovi podaci sugeriraju kako je područje Lovrana ishodišna zona kultivacije maruna u Sjevernojadranskoj regiji, iz kojeg se kultura kestena proširila u Lovrin i na Cres, iako u manjoj mjeri.

Rezultati AMOVA-e ukazali su na to da je 89,17 % ukupne varijance pripisano varijabilnosti unutar populacija, dok se samo 10,83 % odnosilo na varijabilnost između populacija. Ove su vrijednosti u suglasju s onima objavljenim za druge populacije pitomog kestena u Europi (Mattioni i sur. 2008, 2013; Lusini i sur. 2014; Poljak i sur. 2017). Ove vrijednosti također upućuju na izostanak intenzivne kultivacije i visoku genetičku raznolikost na razini populacija, iako velike razlike u genetičkoj raznolikosti i klonalnosti između populacija postoje, a populacija P2 jasno se istaknula s najvećim utjecajem klonalnosti na njezinu genetičku raznolikost, u odnosu na druge dvije populacije. Nadalje, populacije P1 i P3, obje okarakterizirane velikim brojem distinktnih genotipova, kao i slabijim utjecajem čovjeka,

ipak su se genetički statistički značajno razlikovale. Varijabilni uvjeti u okolišu mogli su potencijalno utjecati na ove razlike, budući da je poznato kako heterogenost staništa igra veliku ulogu u genetičkoj diferencijaciji (Ricklefs 1977; Roff 2002). Gotovo potpuni izostanak ljudskog utjecaja na P1 i ograničeni utjecaj na P3 doveli su do toga da prirodni proces selekcije, s alelima koji omogućavaju prilagodbu na specifičnosti pojedinom staništu (Míguez-Soto i Fernández-López 2015; Nishio 2021), budu znatno utjecajnije na genetičku raznolikost od selekcije kultivacijom. Alternativno, P1 i P3 mogli bi biti rezultat introdukcije iz dvaju odvojenih genetičkih bazena, umjesto serije prirodnih kolonizacija (Poljak i sur. 2017). Kao što je analiza naslaga peludnih zrnaca u istočnome Jadranu otkrila, antropogeni utjecaj na autohtone vrste bio je velik, a datira još iz vremena grčke i rimske kolonizacije (Beug 1977; Schmidt i sur. 2000).

Najčešći genotip sveukupno bio je M001, koji je pronađen u populacijama P2 i P3, dok je drugi najčešći bio M002, sa svih pet jedinki pronađenih u P3. Deset jedinki pridruženo je grupi M003–M005 te su bile raspoređene u sve tri populacije. Genotip M001 prevladavajuće je pronađen u kultivacijskoj zoni populacije P2, koju su prethodno istraživali Poljak i sur. (2017). U tom je istraživanju korišteno 10 markera kojima je istražena struktura lokalnih nasada te je utvrđena prevlast jednog genotipa. Od tih 10 markera, šest je također upotrijebljeno i u ovome istraživanju te je utvrđeno kako su najčešći genotipovi u oba istraživanja isti genotip. Muški-sterilni te nesposobni za oprašivanje, M001 se ipak razlikovao u jednome alelu od grupe M002-M005, demonstrirajući odnos punog srodnika. Ovakav odnos može biti rezultat jednog od dva moguća događaja tijekom povijesti uzgoja klona. Vjerojatnija teorija ona je o zajedničkome pretku, odnosno postojanje aneestralne poliklonalnosti. Ova je teorija temeljena na visoko vjerojatnim međuoprašivanjima unutar grupe ancestralnih maruna, koji su postojali na području Lovrana, prije pojave muške sterilnosti. Ova bi križanja dovela do smanjenja genetičkih razlika, te naposljetku do križanja u srodstvu, vidljivog danas u obliku muške sterilnosti, kao što je zabilježeno također za mnoge biljne (Willis 1999; Gomez i Shaw 2006) i životinjske vrste (Dybdahl Pedersen i sur. 2011). Selekcija koja se zasigurno odvijala morala je favorizirati jedinke s povoljnim karakteristikama ploda koje, uz mušku sterilnost, i danas predstavljaju bitne značajke za determinaciju tradicionalnog kultivara 'Lovranskog Maruna'. S obzirom na to da je svih pet genotipova razvilo zajednički fenotip te se, zahvaljujući zajedničkim metodama cijepjenja, kultiviraju na isti način, nastavili su koegzistirati te ih se može smatrati jedinstvenim, poliklonalnim kultivarom pod nazivom 'Lovranski Marun'. Slične rezultate naveli su istraživači i za tradicionalni portugalski kultivar masline (*Olea europaea* L.)

'Galega Vulgar' (Gemias i sur. 2004), kao i za hrvatske kultivare maslina 'Lastovku', 'Oblicu' i 'Drobnicu' (Strikić i sur. 2011), dok je zajedničko poliklonalo podrijetlo također otkrilo kako su hrvatski kultivar masline 'Bjelica' i crnogorski kultivar 'Žutica' sinonimi (Lazović i sur. 2018). S obzirom na gore navedeno, 'Lovrinski Marun' i 'Creski Marun' ne bi se trebali smatrati odvojenim kultivarima; odnosno svi genotipovi iz M001-M005 grupe trebaju se smatrati jedinstvenim, poliklonalnim kultivarom 'Lovranskim Marunom'. Iako nisu identični, ovi se genotipovi kultiviraju na isti način, čime dodatno podržavaju teoriju o poliklonalnosti. Alternativno objašnjenje odnosa klonova M001-M005 je nakupljanje somatskih mutacija, kojima su od jednog ancestralnog genotipa (M001) nastala četiri druga genotipa (M002-M005). Ovakve se mutacije mogu nakupiti bez da utječu na fenotip, s obzirom na to da su gSSR regije neutralno evoluirajuće i urođeno veoma varijabilne (Díez i sur. 2011). Ipak, ova teorija je manje vjerojatna, s obzirom na relativno kratko vrijeme tijekom kojega su se mutacije mogle nakupljati, odnosno samo tri stoljeća, u odnosu na veoma stare kultivare maslina, u kojih je nakupljanje mutacija dobro zabilježeno (Belaj i sur. 2004). S druge strane, generativno razmnožavanje i kasnije cijepljenje pokazalo je utjecaj na genetičku varijabilnost unutar kultivara iberijskih maruna (Pereira-Lorenzo i sur. 2011). U iberijskim nasadima, uzgajivači maruna siju sjeme poznatih kultivara te ako mlado stablo proizvede plodove sa zadovoljavajućim parametrima, koji nalikuju onima s roditeljskog stabla, nastavljaju uzgajati novonastalu jedinku pod istim imenom, time povećavajući genetičku raznolikosti postojećeg kultivara. Alternativno, proizvede li mlado stablo plodove drugačijih karakteristika, jedinka se nastavlja uzgajati cijepljenjem pod novim nazivom, time tvoreći zasebni kultivar. Ova je činjenica dokazana učestalim roditelj-potomak odnosom između glavnog kultivara i njegovog potomstva iz sjemena. Ipak, u ovome istraživanju ova je pojava manje vjerojatna, budući da su se klonovi M002-M005 razlikovali od M001 u samo jednome alelu, čime je isključena mogućnost da su oni potomci M001, odnosno rezultat oprašivanja M001 stabala s peludi divljih srodnika. Uz cijepljene, sada dokazano klonalne jedinke, u P2 su pronađene i necijepljene jedinke. Ova su stabla lokalno poznata pod nazivom „marušnjaci“ te predstavljaju dugu povijest križanja između kultiviranih i divljih stabala, odnosno predstavljaju potomstvo M001 klona, nastalo oprašivanjem peludi divljih stabala. Ove jedinke mogu se naći u divljoj populaciji (Poljak i sur. 2017), kao i unutar nasada, a njihova je prisutnost stvorila priliku za drugi val umjetne selekcije, posebice primijeti li se intermedijaran karakter morfoloških obilježja lista i ploda, kao i kemijskog sastava plodova „marušnjaka“ (Poljak i sur. 2016, 2021).

S druge strane, ova bi se stabla mogla istaknuti kao vrijedan izvor genetičke raznolikosti, koja bi mogla proizaći kao rezultat hibridnog vigora (Kiær i sur. 2007).

Za razliku od P2, P1 i P3 demonstrirale su nisku srodnost s M001, s preko 50 % jedinki u obje populacije okarakterizirane s *r*-vrijednošću od 0,00 i s manje od 20 % jedinki za koje je utvrđeno roditelj-potomak odnos. Ovi rezultati mogli bi se dovesti u vezu s uvjetima opaženima na terenu. U ove dvije populacije nasadi su manje kultivirani (uređeni), posebice na području Lovrina (P3), a okolna šumska vegetacija te divlja stabla kestena ih prerastaju. Nadalje, velik broj stabala s vidljivim spojevima cijepa u P3 bila su osušena, odnosno mrtva. Drugim riječima, karakter genske raznolikosti u ove dvije populacije svjedok je minulim kultivacijskim naporima, u vidu cijepljenih stabala, dok velik broj necijepljenih jedinki predstavlja prirodnu sukcesiju šumske zajednice u zapuštenom nasadu. Duga povijest proširivanja prirodnog areala pitomog kestena te pripitomljavanje na području prirodnih populacija utjecala je na raznolikost germplazme u Švicarskoj (Beccaro i sur. 2012), dok je ulazak kultiviranih gena u divlje populacije u okruženju utjecao na populacije u Španjolskoj (Fernández-Cruz i Fernandez-López 2016) i Italiji (Mattioni i sur. 2008). Nadalje, u Francuskoj (Bouffartigue i sur. 2020), Italiji i Španjolskoj (Pereira-Lorenzo i sur. 2019), interakcija između nasada i divljih populacija posebice je vidljiva u slučajevima „trenutnog pripitomljavanja“, odnosno cijepljenja spontano izraslih jedinki kestena, čime se smanjuje genetička razlika između nasada i divlje populacije. Slične interakcije između kultiviranih i divljih populacija zabilježene su u 12 od 13 najznačajnijih biljnih kultura (Ellstrand i sur. 1999), kao i za rodove: repa (*Beta* L.) (Bartsch i sur. 1999), jabuka (*Malus* Mill.) (Feurtey i sur. 2020), vija (*Medicago* L.) (Jenczewski i sur. 1999), cikorija (*Cichorium* L.) (Sørensen i sur. 2007), salata (*Lactuca* L.) (Uwimana i sur. 2012) i pomoćnica (*Solanum* L.) (Hardigan i sur. 2017). Iako su neki autori izrazili zabrinutost zbog negativnog utjecaja ovakvog protoka gena na izumiranje divljih populacija (Small 1984; Levin i sur. 1996; Ellstrand 2003; Todesco i sur. 2016), pojavu „pestifikacije“ (Saleh i sur. 2014; Depotter i sur. 2016; Feurtey i sur. 2020) te širenje transgena iz kultiviranih u divlje populacije (Uwimana i sur. 2012), hibridizacija bi mogla povećati genetičku varijabilnost populacija te potaknuti pojavu povoljnih prilagodbi (Rieseberg i sur. 2003). Slična je pojava zabilježena za kultivirane jabuke (*Malus domestica* Borkh.) (Cornille i sur. 2013), kao i za kultivirani kakaovac (*Theobroma cacao* L.) (Motamayor i sur. 2022).

Zaključno, genetička struktura triju uzgojnih područja analiziranih u ovome istraživanju nije potvrdila postojanje triju lokalno poznatih kultivara. Potvrđeno je postojanje jednog poliklonalnog kultivara, kojeg se može smatrati 'Lovranskim Marunom'. Podrijetlo

'Lovranskog Maruna' najvjerojatnije je rezultat unakrsnih oprašivanja između ancestralnih genotipova, koje je dovelo i do danas primjetnog muškog steriliteta. Ne može se isključiti niti utjecaj somatskih mutacija koje su mogle dovesti do, ili barem utjecati na, genetičku varijabilnost kultivara, iako je to manje vjerojatno, s obzirom na relativno kratko razdoblje kultivacije maruna. Također nije vjerojatna mogućnost nastanka grupe M002-M005 kao generativnih potomaka M001, budući da se ova klonalna grupa razlikuje u samo jednome alelu od najčešćeg genotipa M001. Nadalje, prevlast cijepljenih jedinki na području Lovrana ukazuje na to kako je ovo područje najvjerojatnije ishodište uzgoja maruna, iz kojeg se kultura kestena proširila na Lovrin i Cres. Geni vezani uz kultivaciju kestena također su se spontano proširili i u divlje populacije koje okružuju nasade, kroz sjeme 'Lovranskog Maruna'. Ovo potomstvo nastavlja biti u uzgoju, čime se proširuje genetički bazen populacije, iako u različitim stupnjevima intenziteta. Na ovaj način vrijedni bi aleli iz divljih populacija mogli biti reintroducirani u kultivirane genotipove i time potpomoći njihovome odgovoru na promjene u okolišu, kao i potencijalno tvoriti nove i poboljšane kultivare kestena.

## **5.2. Morfološka raznolikost maruna**

Ranija istraživanja na području Istre i Kvarnera prvenstveno su bila usmjerena na genetičku raznolikost nasada kestena (Idžojić i sur. 2012; Poljak i sur. 2017), s ograničenim podacima o morfologiji nasada (Pereira-Lorenzo i sur. 1996b, 1997; Poljak i sur. 2016). S druge strane, ovo je istraživanje pružilo znatno detaljniji pregled podataka, s ukupno 144 analizirane jedinke. Morfometrijska analiza plodova otkrila je značajne razlike između tri genetička entiteta, maruna (G1), hibrida (G2) te divljih stabala (G3). Marunska grupa (G1) istaknula se najnižom razinom raznolikosti, čineći ju najhomogenijom grupom. Nadalje, ova je grupa demonstrirala homogene vrijednosti UPOV klasa. S druge strane, divlja stabla (G3) istaknula su se najvišom razinom raznolikosti. Ova je činjenica bila očekivana, budući da marunsku grupu predstavlja samo pet genotipova, za razliku od grupe divljih stabala, koju sačinjavaju brojniji genotipovi, odnosno svaki je genotip jedinstven. Ovi rezultati u suglasju su s prethodno objavljenim podacima s istog područja, iako manjeg opsega (Poljak i sur. 2016, 2021). Grupa hibrida (G2) pozicionirala se u sredini, između maruna i divljih stabala, sa srednjim razinama morfološke raznolikosti, kao i srednjim vrijednostima UPOV parametara. Slični su rezultati objavljeni prethodno i za maslinu (*Olea europaea* L.), u koje su hibridne jedinke također demonstrirale intermedijarne vrijednosti (Hannachi i sur. 2017). Grupa G1, jedinke 'Lovranskog Maruna', pokazale su karakteristike koje su u suglasju s podacima



prethodno objavljenim za ovaj kultivar (Poljak i sur. 2016, 2021). Generalno, vrijednosti svih parametara ukazuju na činjenicu kako je 'Lovranski Marun' doista marun, sukladno talijanskim i francuskim standardima (Poljak i sur. 2016, 2021), zahvaljujući velikim plodovima, s istaknutim tamnim prugama. Nadalje, najmanji broj ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (F8), kao i najmanja vrijednost najdužeg ureza (F9) omogućavaju lako ljuštenje plodova, što je ključna osobina plodova maruna koja ih čini prikladnim za daljnju industrijsku obradu (Bounous 1999, 2009).

U usporedbi s drugim, dobro poznatim europskim kultivarima maruna, 'Lovranski Marun' iskazao se sličnim ili višim vrijednostima morfoloških parametara. U usporedbi s čestim kultivarima Galicije, plodovi 'Lovranskog Maruna' pokazali su se superiornima u svim usporedivim parametrima (Álvarez-Álvarez i sur. 2006), odnosno bili su usporedive mase (Ramos-Cabrer i sur. 2005). Sličan trend uočen je u usporedbi s talijanskim kultivarom 'Marradi' (Poljak i sur. 2021), kao i u usporedbi s turskim kultivarom 'Serdar' (Serdar i sur. 2011), te turskim genotipovima koje su analizirali Akbulut i sur. (2017) i Özkan i sur. (2020). U usporedbi s grupom od 10 turskih genotipova iz sličnoga istraživanja, 'Lovranski Marun' imao je kraće i uže plodove, ali značajno kraće ureze sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (Ertan 2007). Navedeni podaci smještaju 'Lovranski Marun' u sredinu podataka prijavljenih za europske kultivare maruna, što se poklapa i s geografskim položajem nasada u europskom kontekstu. U usporedbi s kultivarima iz Kašmira, 'Lovranski Marun' pokazao je slične vrijednosti mase i dimenzije plodova (Pandit i sur. 2013). Naposljetku, usporede li se plodovi s plodovima kultivara međuvrskog-hibridnog podrijetla, 'Lovranski Marun' je usporediv u veličini ploda s kultivarom 'Marsol', te je nešto manji od plodova 'Bouche de Betizac' i 'Marigoule' (Serdar i sur. 2011; Poljak i sur. 2021). S druge strane, 'Lovranski Marun' istaknuo se većom masom plodova u usporedbi sa svih devet hibridnih kultivara uključenih u istraživanje Bolvanskýja i Užika (2014). Promatraju li se vrijednosti UPOV parametara, 'Lovranski Marun' najbliži je kultivarima s Iberijskog poluotoka, odnosno podudara se s njima u svojstvima srednje velikog hiluma, koji je osrednje elipsoidnog oblika, te općenito uzdužno-elipsoidnog te poprečno-široko-elipsoidnog oblika ploda (Furones-Pérez i Fernández López 2009). Osim toga, boja i lakoća ljuštenja plodova bili su usporedivi s plodovima iz Galicije (Pereira-Lorenzo i Fernández-López 1997), s većinom plodova crvenkaste boje i jednostavnog ljuštenja. Zahvaljujući veličini i lakoći čišćenja, plodovi 'Lovranskog Maruna' dobro su prilagođeni za konzumaciju u svježem obliku, budući da su ove karakteristike visoko na cijeni u kupaca (Bounous 1999, 2009). Ovo je očito u popularnosti 'Lovranskog Maruna' na

lokalnim tržnicama, kao i u postojanju brojnih manifestacija posvećenih konzumaciji njegovih plodova, kao što je Lovranska Marunada (<http://www.marunada-lovran.com>). Nadalje, relativno mali broj ureza sjemene ljuske u endosperm ukazuje na pogodnost ovoga kultivara za daljnju preradu u deserte i kestenovo brašno, kao i u kesten-pire, juhe, umake te različita punjenja (Medak i sur. 2009). Slične primjene plodova opisane su za kultivare usporedivih veličina ploda te morfoloških karakteristika (Pereira-Lorenzo i Fernández-López 1997; Bounous 1999, 2009; Torello Marinoni i sur. 2013).

Iako oblik i veličina lista nisu sastavni dio talijanskog ili francuskog standarda za opisivanje maruna (Poljak i sur. 2016), niti ih uzgajivači smatraju determinacijskom karakteristikom, već se usmjeravaju na plodove, ovi parametri predstavljaju velik dio UPOV smjernica za determinaciju kultivara maruna. Prema UPOV-u, oblik i veličina lista trebaju se izmjeriti, kao i poprečni presjek lisne plojke. Ipak, većina istraživanja usmjerena je na morfologiju plodova (Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo 2005; Pandit i sur. 2013; Torello Marinoni i sur. 2013; Poljak i sur. 2016, 2021), najvjerojatnije zbog značaja plodova u proizvodnji, kao i zbog jednostavnosti prikupljanja plodova kao uzoraka. Promatraju li se parametri lisne morfologije istraživani u ovome istraživanju, 'Lovranski Marun' ponovno ima srednje vrijednosti u odnosu na zapadne, odnosno istočne populacije maruna u Europi. Odnosno, parametri dužine lisne plojke (L03), širine lisne plojke (L04) te dužina peteljke (L10) istaknuli su se većim vrijednostima od onih zabilježenih na Iberijskome poluotoku (Pereira-Lorenzo i sur. 1997) te manjim od onih u Turskoj (Serdar i Demirsoy 2011; Serdar i Kurt 2011). Nadalje, vrijednosti dužine lista bile su niže od onih prijavljenih za hibridni kultivar 'Marigoule', hibrid između vrsta *C. sativa* i *C. crenata* (Serdar i Demirsoy 2011).

Za razliku od G1, grupu G2 sačinjavala su hibridna stabla, tzv. marušnjaci. Vrijednosti morfoloških parametara za plodove ove grupe bile su usporedive s prethodno utvrđenim vrijednostima u istraživanju Poljak i sur. (2016). U usporedbi s G1 i G3, stabla iz G2 imala su intermedijarne vrijednosti, odnosno plodovi su bili teži i veći od onih u G3, ali manji i lakši od plodova maruna iz G1. Ova je činjenica očekivana, budući da je u G2 očekivan utjecaj divljeg roditelja, odnosno gena nekultiviranih jedinki. Slično tomu, plodovi iz G2 imali su veću masu od plodova iz divljih populacija koje rastu na istome geografskom području (Aravanopoulos 2005; Idžojtić i sur. 2009; Poljak i sur. 2014, 2016; Tumpa i sur. 2021).

Iako intermedijarnih vrijednosti, hibridne jedinice iz G2 iskazale su se vrijednostima parametara lista značajno većim od onih zabilježenih u G1 i G3, s površinom lisne plojke (L01) koja je bila 18,05 %, odnosno 23,44 % veća. Isti uzorak uočen je i za dužinu lisne plojke (L03)

i maksimalni širinu lisne plojke (L04), s najvišim vrijednostima ovih parametara zabilježenih u G2. Moguće objašnjenje ove pojave je tzv. hibridni vigor (heterozis), odnosno pojava superiornih obilježja u križanaca dviju vrsta ili dvaju kultivara, u usporedbi s vrijednostima obilježja pojedinog roditelja (Dodds 1955). Poznato je kako hibridni vigor utječe pozitivno na urod prehrambenih i tekstilnih kultura biljaka (Tollenaar i sur. 2004; Saeki i sur. 2016; Angui i sur. 2020; Muhu-Din i sur. 2022), sa zabilježeno izraženijim heterozisom u križanaca različitih vrsta, u odnosu na križance kultivara iste vrste (Munir i sur. 2016). Iako su istraživanja na drvenastim vrstama ograničena, pozitivan utjecaj heterozisa na hibridne jedinke utvrđen je u rodovima ariša (*Larix* Mill.) (Greenwood i sur. 2015; Marchal i sur. 2017), topola (*Populus* L.) (Li i Wu 2011) i eukalipta (*Eucalyptus* L'Hér.) (Weng i sur. 2014), iako je jačina utjecaja modulirana te djelomično ovisi o okolišu (Marchal i sur. 2017; Zanewich i sur. 2018). Samim time, moglo bi se pretpostaviti kako je potencijalno riječ o ovoj pojavi i u slučaju pitomog kestena, odnosno kako je veće lišće, zabilježeno u G2, rezultat hibridnog vigora. Grupa G3, sastavljena od divljih stabala, istaknula se najmanjim plodovima, s najvećim brojem ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku, najveće dužine. Ovi rezultati su u suglasju s prethodno objavljenim podacima za divlje populacije kestena na istome području istraživanja (Poljak i sur. 2016, 2021), kao i populacije u širem prostoru sjevernojadranske regije (Solar i sur. 2001, 2005). U usporedbi s drugim populacijama Europe, plodovi iz G3 bili su manji od onih na Siciliji (Cutino i sur. 2006), ali veći od onih u kontinentalnome dijelu Hrvatske (Idžojtić i sur. 2009; Poljak 2014; Poljak i sur. 2022; Tumpa i sur. 2021), kao i onih u Turskoj (Villani i sur. 1999), Grčkoj (Aravanopoulos 2001), Bosni i Hercegovini (Mujić i sur. 2010) te Slovačkoj (Bolvanský i Užík 2005). Parametri lisne morfologije svrstali su jedinke iz G3 u raspon podataka prethodno prijavljenih u Bosni i Hercegovini (Mujagić-Pašić i Ballian 2012), kao i u Italiji (Pigliucci i sur. 1991).

Promatrajući oblik hiluma, uočljive su sličnosti hibridne grupe G2 s G3, budući da su obje grupe obilježene izduljeno-eliptičnim oblikom hiluma. Osim toga, vrijednosti parametara koji opisuju hilum (F5 i F6) demonstrirali su slične rezultate, odnosno odvojili su marunsku grupu G1 od G2 i G3. Oblik hiluma uključen je u UPOV smjernice i pokazao se kao vrijedan parametar za razlikovanje kultivara. Također, ovaj je parametar razlikovao marun od divljih stabala pitomog kestena s Učke (Poljak i sur. 2016); isti je trend razlikovanja zabilježen i u Italiji (Bounous 1999, 2014) te Ukrajini (Grygorieva i sur. 2017), dokazujući kako je ovaj parametar primjenjiv u determinaciji kultivara kestena. S druge strane, broj sjemenki je obilježje koje je pod snažnom negativnom selekcijom u uzgoju (Idžojtić i sur. 2012; Poljak i

sur. 2021), te je čak uključen u francuski nacionalni standard (Bounous 2002; Poljak i sur. 2016). Budući da su plodovi s jednom sjemenkom lakši za čišćenje i daljnju obradu (Bounous 2002; Torello Marinoni i sur. 2013; Poljak i sur. 2016, 2021), selekcija protiv poliembrijonije bila je vjerojatno prisutna i preferirana od strane uzgajivača, te je u konačnici dovela do smanjenja broja sjemenki u plodovima marunske grupe (G1), koja je primjetna danas. Nadalje, divlja stabla iz G3 odvojila su se od G1 i G2 u parametrima dužine najdužeg ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku (F9), po kojemu su se G1 i G2 grupirali zajedno. Budući da je riječ o veoma nepoželjnime obilježju ploda, koje plod čini težim za ljuštenje te manje iskoristivim u preradi (Bounous 2006; Kane i Kane 2007), navedeno je obilježje vrlo vjerojatno bilo podložno negativnom selekcijskom pritisku uzgajivača maruna, tijekom stoljeća uzgoja (Bounous 2006; La Bonte i sur. 2018). Ova bi pojava u konačnici dovela do nižih vrijednosti F9 u G1 te, kao rezultat posljedičnog protoka gena iz nasada u divlje populacije, nižih vrijednosti u G2.

Iako rezultati Mantel-testa nisu ukazali na značajne korelacije između pedoloških parametara te parametara morfologije plodova, na razini pojedinog para parametara tla i ploda, utvrđen je manji broj pozitivnih, no slabo značajnih korelacija, kao što je utjecaj pH-vrijednosti tla (S01 i S02) na veličinu ploda u G1 i G3. Ipak, raniji rezultati nisu ukazali na postojanje pozitivne korelacije između veličine ploda i reakcije tla, pokazujući kako su veći plodovi zabilježeni u mezofilnim populacijama (Poljak 2014), usprkos acidofilnoj prirodi vrste (Anić 1945, 1953; Medak 2009). pH-vrijednosti zabilježene u ovome istraživanju bile su u širokome rasponu, varirajući od 4,51 do 8,11 u H<sub>2</sub>O, te od 3,50 do 7,29 u CaCl<sub>2</sub>. Prema metodologiji Schaffera i Schachtschabela (Pernar i sur. 2013), pH-vrijednost tla varira od veoma kisele do blago lužnate. Osim toga, značajni utjecaj pH-vrijednosti tla nije zabilježen u hibridnih stabala. S druge strane, Mantel-test je otkrio značajne i veoma jake korelacije između genetičke i morfološke (plod) udaljenosti između istraživanih jedinki, ukazujući na predominantan utjecaj genotipa na varijabilnost parametara kestenova ploda.

Promatraju li se parametri lista, oni koji opisuju dužinu te širinu lisne plojke (L03-L05), kao i dužinu peteljke (L10), grupirali su G1 i G3, dok se G2 istaknula kao grupa s najvećim listom. Ovaj je podatak u suglasju s ranije spomenutim hibridnim vigorom, odnosno teorijom o heterozisu. Nadalje, Mantel-testom nije utvrđena značajna povezanost pedoloških i morfoloških udaljenosti; umjesto toga, test je ukazao na visoko značajnu korelaciju između morfoloških i genetičkih udaljenosti. Na razini pojedinog parametra, ipak, parametri veličine lista demonstrirali su značajnu korelaciju s parametrima pH-vrijednosti tla (S01 i S02) - niža

pH-vrijednost korelirala je s većim listom. Kiselost tla čest je ograničavajući faktor u rastu i razvoju biljaka (Kidd i Proctor 2001), s obzirom da dovodi do nepovoljne dostupnosti hranjiva (Bounous 2006; Grygorieva i sur. 2017), ili toksičnosti različitih spojeva u kiselim tlima (Baziramakenga i sur. 1995; Zeng i Clark 2013; Bojórquez-Quintal i sur. 2017). Ipak, pitomi je kesten acidofilna vrsta, dobro prilagođena rastu na kiselim tlima, do te mjere da pokazuje kalcifobna svojstva. Posljedično tomu, više pH-vrijednosti tla mogle bi predstavljati nepovoljne uvjete za stabla te bi mogle dovesti do razvoja manjega lišća, kao što je zabilježeno u ovome istraživanju. Naši su podaci razotkrili iznenađujuće velik broj uzoraka tla s visokim pH-vrijednostima, s vrijednostima od 7,5 ili višim. Iako je ovaj podatak znatno viši od prethodno objavljenih podataka na lokaciji Cres, sa zabilježenim rasponom pH-vrijednosti od 5,0 do 6,1 (Medak i sur. 2009), važno je napomenuti da prethodni podaci o pH-vrijednostima ne postoje za lokacije Učka i Pazin, odnosno nedostaju potrebni podaci za pravu usporedbu svih triju lokacija. Nadalje, ostali parametri tla, kao što su dubina, ispranost te točan hranjivi status tla, nepoznati su te vjerojatno utječu na rast stabla, kao i na sveukupnu kvalitetu staništa koja, ukoliko je visoka, može nadigrati utjecaj kiselosti tla, ili manjka kiselosti. Iznenađujuća je također bila i negativna korelacija između veličine lista i udjela dušika (S03) te ugljika (S04) u tlu. Iako je dušik veoma često gnojivo te uobičajeno utječe pozitivno na veličinu lista (Wang i sur. 2012; Razaq i sur. 2017), to nije bio slučaj u ovom istraživanju. Ipak, bitno je napomenuti da je uzorkovanje tla provedeni na maloj dubini, do 10 cm, izvan zone glavnog korijena, gdje se odvija usvajanje dušika. Naposljetku, analiza provedena u ovome istraživanju bila je usmjerena na ukupni dušik, bez uzimanja u obzir različite oblike dušika koje su dostupne biljci, kao i sveobuhvatni pregled hranjivog statusa okoliša te fiziologije stabala, budući da bi i oni mogli utjecati na usvajanje hranjiva (Masclaux-Dubresse i sur. 2010; Guo i sur. 2019; Plett i sur. 2020). Potrebna su daljnja istraživanja, kojima bi se utvrdile točne koncentracije hranjiva i mikroelemenata u tlu, kao i istraživanja fiziologije kestena.

Ovo je istraživanje utvrdilo kako se morfološke razlike među stablima podudaraju s ranije utvrđenim genetičkim grupiranjima. Drugim riječima, genetski *melting pot* nasada isprepletenih s divljim populacijama pokazao se kao žarište morfološke varijabilnosti, s pozitivnim implikacijama za budućnost. U ovome smislu, hibridni vigor, koji je utvrđen u hibridnih jedinki, ima velik potencijal za sama stabla, kao i za proizvođače maruna. S obzirom na to da hibridna stabla pokazuju karakteristike ploda koje su sukladne onim u maruna, a superiorne onim u divljih stabala, te se ističu snažnijim rastom, hibridna bi stabla mogla postati budućnost nasada u ovoj regiji. Osim mogućnosti uzgoja novih kultivara, putem trenutne

domestikacije, hibridna stabla predstavljaju izvor divljih gena pomoću kojih bi se nove, povoljne prilagodbe mogle ispoljiti i biti uvedene u postojeći kultivar 'Lovranski Marun'. Kao posljedica, nasadi bi mogli nastaviti proizvoditi značajne prinose plodova, koji su ključni za uzgajivače, te bi istovremeno bili bolje pripremljeni na stalne i pogoršavajuće klimatske promjene.

### **5.3. Multielementna raznolikost jestivog dijela ploda kestena**

Brojni kemijski elementi, posebice mikroelementi, igraju značajnu ulogu u ljudskoj prehrani i zdravlju, na primjer kao metalna komponenta hemoglobina unutar crvenih krvnih stanica, te kao kofaktor različitih enzima (FAO 2004). Kestene karakterizira povoljan nutritivni sastav, s obzirom na to da imaju niski udio masti, a visok udio vlakana i topljivih šećera (de Vasconcelos i sur. 2010a; Poljak i sur. 2016). Osim toga, koncentracije brojnih elemenata u sjemenkama kestena utvrđene su kao visoke (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn) (Pereira-Lorenzo i sur. 2006; Borges i sur. 2008). Na primjer, samo 100 g sjemenke osigurava više od 100 % dnevno preporučene doze Ca, te 10,9 % dnevne doze Mg za muškarce, odnosno 8,3 % za žene (de Vasconcelos i sur. 2010).

Multielementni sastav sjemenki kestena, odnosno jestivog dijela ploda, utvrđen u ovome istraživanju u suglasju je s prethodno objavljenim podacima (dos Santos Rosa i sur. 2019). Stave li se ovdje prikazani sjevernojadranski podaci u širi europski kontekst, uočljivo je kako su koncentracije Ca i K više od, a koncentracije P, Fe, Mn, Zn i Cu unutar raspona, podataka prijavljenih za portugalske (Ferreira-Cardoso i sur. 1993, 2002; Ribeiro i sur. 2007; Borges i sur. 2008; de Vasconcelos i sur. 2010a) i španjolske (Pereira-Lorenzo i sur. 2006; Peña-Méndez i sur. 2008) kultivare. Nadalje, u usporedbi s talijanskim kultivarom 'Marrone del Mugello' (Bellini i sur. 2005), kao i u usporedbi s većim brojem talijanskih ekotipova, koncentracije K, Mg i Ca bile su više u sjemenkama analiziranim u ovome istraživanju. Usporede li se sjemenke s bugarskim kultivarima (Glushkova i sur. 2010), kesteni analizirani u ovome istraživanju imali su koncentracije P, Fe i Zn niže od bugarskih, dok su koncentracije Ca i Mg bile više, a Cu usporedive (unutar istog intervala). Sličan je trend podataka uočljiv i u usporedbi s turskim kultivarima (Ertürk i sur. 2006), s obzirom na to da je većina usporedivih makro- i mikroelemenata pokazala niže vrijednosti u sjemenkama ovdje istraživanih stabala (Ca, Mg, P, Zn), dok je udio K bio viši, a oni Fe i Mn su bili unutar istog raspona podataka kao i u turskih kultivara.

Svi analizirani toksični metali i polumetali (As, Ba, Cd, Cr, Ni, Pb, Sb) u istraživanim uzorcima tla, utvrđeni su u koncentracijama nižim od limita detekcija, ili ispod graničnih vrijednosti utvrđenih odredbama UNEP-a (Program za okoliš UN-a, eng. *United Nations Environment Programme*) (van der Voet i sur. 2013), kao i ispod granica u međunarodnoj uporabi, definiranih od strane MEF-a (Ministarstvo za okoliš Republike Finske, eng. *Ministry of Environment of Finland*) (MEF 2007). Budući da područje, na kojemu je istraživanje izvršeno, nije podvrgnuto intenzivnoj poljoprivrednoj uporabi, vrijednosti teških metala bile su očekivano značajno ispod graničnih vrijednosti za poljoprivredna tla u Hrvatskoj, prema definiranim vrijednostima u Pravilniku o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (NN 2019).

Stabla uzorkovana u ovome istraživanju grupirana su u tri distinktna, genetički definirane grupe (G1, G2, G3). Sve su se tri grupe mogle razlikovati po udjelu Ca, Mg i Sr u sjemenkama. Nadalje, razine Al, Co, Cu, Ti i Mo opisale su G2 kao intermedijarnu grupu, odnosno razdvojile su G1 i G3. Srednje vrijednosti multielementnog sastava u ovome istraživanju najbliže su vrijednostima koje su objavili Poljak i sur. (2016), s obzirom na to da su iste tri grupe stabala istraživane u oba istraživanja, iako je u ovome istraživanju uzorak bio veći. U oba istraživanja, Ca i Mg demonstrirali su najviše vrijednosti u G3. Nadalje, treći usporedivi makroelement, K, izmjeren je u gotovo identičnoj vrijednosti u G1, kao i u ranijem istraživanju (1372 mg/100 g). S druge strane, grupa G2 demonstrirala je prevladavajuće intermedijarne vrijednosti u oba istraživanja. Koncentracije usporedivih makro- i mikroelemenata (Ca, K, Mg, Fe, Zn, Cu), osim Mn, imali su više koncentracije u ovome istraživanju, u usporedbi s onime iz 2016. godine (Poljak i sur. 2016). Nadalje, elementi P, Mo i Ni nisu bili istraživani u prethodnome istraživanju te njihove vrijednosti nisu usporedive. Ove razlike između stabala, koja rastu u istome ekosustavu, u istim pedološkim i klimatskim uvjetima, najvjerojatnije su posljedica različitih genetičkih odgovora, odnosno specifičnih načina u kojemu svaki pojedini genotip usvaja hranjiva iz mineralnog kompleksa tla te ih metabolizira. Sličan je genetički odgovor zabilježen u kultivara obične lijeske (*Corylus avellana* L.) u Turskoj (Özkutlu i sur. 2011; Özenc i sur. 2014; Cetin i sur. 2020), Njemačkoj (Müller i sur. 2020) i Rumunjskoj (Posta i sur. 2022), kao i u kultivara običnog oraha (*Juglans regia* L.) u Rumunjskoj (Cosmolescu i sur. 2010; Iordanescu i sur. 2022), Turskoj (Şimşek i sur. 2016) i Kini (Geng i sur. 2021), sa statistički značajnim razlikama u razinama određenih makro- i mikroelemenata između različitih kultivara. Osim toga, varijacije u koncentracijama nekih elemenata nalaze se pod snažnom kontrolom pojedinih gena, kao što su IRT1 i FRO geni,

koji reguliraju usvajanje metala (npr. Fe, Mn, Zn) u brojnih biljnih vrsta. Kao rezultat ovoga, moguće je razlikovati „učinkovite“ i „neučinkovite“ genotipove (Connolly i sur. 2002; M'Sehli i sur. 2011; Kabir i sur. 2015). Posebice je dobro istražen utjecaj gena IRT1 u brojnih biljnih vrsta i kvasaca (Korshunova i sur. 1999; Eckhardt i sur. 2001; Kabir i sur. 2011, 2012). Budući da je ovaj gen dio obitelji ZIP metalnih transportera, koji su prisutni u brojnim eukariotskim organizmima (Gueriont 2000), uključujući i ljude (Gaither i Eide 2000, 2001), moguće je da ovaj gen utječe i na kestene. Iz podataka koji su prikupljeni u ovome istraživanju, sa sigurnošću se može pretpostaviti kako genotip ima ključnu, ili čak i prevladavajuću, ulogu u usvajanju makro- i mikroelemenata iz tla.

Kada se promatraju korelacije između udjela makro- i mikroelemenata u tlu i u sjemenkama, Mn i Zn se ističu kao dva elementa s pozitivnim i značajnim korelacijama, posebice u G1 i G2. Mangan, sudeći po već ranije objavljenim istraživanjima, lako je usvojiv element, s pozitivnim korelacijama između koncentracija u tlu i biljnome tkivu (Alejandro i sur. 2020; Martias i sur. 2021). Osim toga, riječ je o važnome elementu u biljnome organizmu, budući da igra ključnu ulogu u fotosintezi (Alejandro i sur. 2020). S obzirom na to da je dostupnost mangana u tlu ovisna o uvjetima u okolišu (Siskawardani i sur. 2016), te da na istraživanim plohama nisu uočeni negativni čimbenici, kao što je produženo zadržavanje vode u tlu ili višak organske prostirke na površini tla (Schulte i Kelling 1999), sa sigurnošću možemo pretpostaviti kako stabla na istraživanim plohama imaju dostatne količine Mn na raspolaganju za usvajanje. Slične pozitivne korelacije između udjela Mn u tlu i u biljnome tkivu utvrđene su u citrusa (Kwakyee and Kadyampakeni 2022), soje (Randall i sur. 1975) i zobi (Page i sur. 1963). Slična je situacija i sa Zn, čije koncentracije ovise o tipu tla, a pjeskovita tla, kao i ona u hladnijim klimama, često iskazuju manjak Zn (Sudrathar i Kaiser 2016). Uzmemo li u obzir toplu submediteransku klimu, kao i tip tla (crvenica) (Gluhić 2005), koja karakterizira istraživano područje, koncentracije Zn vjerojatno su obilne. Ova bi pak činjenica omogućila stablima da imaju pristup dostatnim količinama, s obzirom na značaj tog elementa u rastu i zriobi plodova, posebice orašastih vrsta (Meriño-Gergichevich i sur. 2021). Naposljetku, na ovaj bi se način mogla objasniti pozitivna korelacija između uzoraka tla i plodova, kao što je i prethodno objavljeno u istraživanjima na kukuruzu (Liu i sur. 2020), pšenici (Liu i sur. 2019) te citrusima (Kwakyee and Kadyampakeni 2022).

Kada se promatraju sveukupne korelacije i rezultati, zamjetan je prevladavajući utjecaj grupe, odnosno genotipa, na usvajanje makro- i mikroelemenata. Genotip-specifičan odgovor u usvajanju makro- i mikroelemenata je dobro istražen (Liu i sur. 2021), te je zabilježen kao



pojava u usvajanju brojnih elemenata, kao što su Fe, Zn i Mn (Rengel 2001), a poznato je i postojanje tzv. „učinkovitih“ genotipova, odnosno onih genotipova koji su posebice dobro prilagođeni za usvajanje pojedinog elementa (Rengel 2001; Boamponen i sur. 2017). U pitomog kestena, ova je pojava zabilježena u tradicionalnih španjolski kultivara, u kojih je utvrđeno značajno različito usvajanje K, Ca, Cu, Mg i Zn, s obzirom na kultivar koji je istraživan (Peña-Méndez i sur. 2008). Slični su rezultati objavljeni i za bugarske kultivare (Glushkova i sur. 2010), u kojih je utvrđena statistički značajna razlika u usvajanju P, K, Cu, Mg, Fe i Mn. Nadalje, ovi su elementi varirali u svojim koncentracijama i u tradicionalnih portugalskih kultivara. Osim toga, sastav mikroelemenata bio je najviši u kultivara PDO 'Terra Fria', koji se uzgaja na tlima na škriljevcima, čime ukazuje i na utjecaj matične podloge na multielementni sastav sjemenki kestena (Borges i sur. 2008). Uzmemo li sve rečeno u obzir, ovdje prikazani podaci za tri istraživane grupe u djelomičnome su suglasju s prethodno objavljenim podacima te bi mogli tvoriti osnovu daljnje selekcije kultivara kestena, odnosno genotipova koji su „učinkoviti“ za usvajanje pojedinog hranjiva, posebice Mn i Zn, koji su pokazali pozitivne korelacije između udjela u tlu i sjemenkama. Utjecaj tla i matične podloge stoga ne treba zanemariti, s obzirom na to da karakteristike tla, prije svega pH-vrijednost i tip matične podloge, utječu na dostupnost brojnih elemenata (Soranz Ferrarezi i sur. 2022).

#### **5.4. Značaj i očuvanje maruna u Hrvatskoj**

Pitomi kesten jedna je od najznačajnijih autohtonih vrsta južne Europe, čija je povijest uzgoja usko vezana uz europske civilizacije i društva od antičkog doba nadalje (Conedera i sur. 2019). Kultivari kestena, odnosno maruni, svakako su jedan od elemenata poljoprivrednog nasljeđa te predstavljaju višestoljetnu tradiciju uzgoja i selekcije (Bounous 2009). S obzirom na dugu povijest kultivacije na određenom području, lokalni su kultivari optimalno prilagođeni stanišnim uvjetima te pokazuju viši stupanj otpornosti na negativne čimbenike (Lei i sur. 2008; Zhang i sur. 2011). Osim toga, tradicionalni kultivari koji se mogu uzgajati i u sustavima kao što su *agroforestry* sustavi, pokazuju veću genetičku raznolikost od posve plantažnog uzgoja (Atta-Krah i sur. 2004; Figueredo-Urbina i sur. 2021), predstavljajući time izvor potencijalnih, povoljnih prilagodbi na nadolazeće promjene u klimi (Lei i sur. 2009; Caiji i Xue 2016). Kao najpoznatiji primjeri ovakvih tradicionalnih nasada kestena, ističu se silvopastoralni te silvogranarni krajolici Španjolske i Portugala (Moreno i Caceres 2016; Van Colen 2020), odnosno *montados*, *dehasas*, *soutos*, *castañeros* i *castañeos* (Moreno i Caceres 2016; Roces-Díaz i sur. 2018). Osim mogućnosti kontinuiranog i višestrukog korištenja površina pod

nasadima, ovaj način uzgoja omogućio je i očuvanje tradicionalnih kultivara kestena, usprkos sveukupnoj ugroženosti nasada (Roces-Díaz i sur. 2018).

Nasadi 'Lovranskog Maruna' od velikog su kulturološkog i turističkog značaja na području Istre i Kvarnera (Medak i sur. 2009; Tumpa i sur. 2021; Poljak i sur. 2023), a suočeni su s nekoliko prijetnji. Naime, usprkos visokoj zastupljenosti *Cryphonectria hypovirusa 1* (CHV-1) u okolnoj divljoj populaciji, te postojeću biološku kontrolu bolesti, nasadi 'Lovranskog Maruna' značajno se slabije oporavljaju od divljih stabala (Ježić i sur. 2014). Osim toga, u nasadima prevladavaju stara, na otoku Cresu i monumentalna, stabla te je sušenje sve većeg broja jedinki neizbježno. Naposljetku, nasadi se nalaze često na poželjnim lokacijama te su ugroženi prenamjenom zemljišta. Nažalost, upravo je prenamjenom zemljišta uništen i dio stabala analiziranih u ovome radu, nedugo nakon uzorkovanja stabala. Zaštita 'Lovranskog Maruna' stoga je nužna na više razina i iz više smjerova djelovanja, da bi se očuvale njegove morfološko-kemijske značajke, ali i socioekonomski značaj. Kao što je vidljivo iz rezultata molekularnih istraživanja prikazanih u ovome radu, istraživani nasadi su genetički raznoliki te su okarakterizirani mješovitim karakterom, obuhvaćajući jedinke klonalnog podrijetla, odnosno 'Lovranski Marun', te divlja stabla, kao i potomke njihove hibridizacije. Iako sam 'Lovranski Marun' čini pet genotipova, koji se uzgajaju i tretiraju kao jedan, potencijal za unaprjeđenje, kao i razvoj novih kultivara, je velik te moguć u dva smjera. Naime, fertilno potomstvo 'Lovranskog Maruna', odnosno marušnjaci, predstavljaju izvor genotipova za selekciju, te daljnje vegetativno razmnožavanje odabranih jedinki putem "trenutnog pripitomljavanja". Ovi bi se genotipovi mogli pridružiti 'Lovranskome Marunu' te time reintroducirati divlje gene u genofond kultivara, uz potencijalnu pojavu novih obilježja (Pereira-Lorenzo i sur. 2019). Alternativno, novootkriveni, fertilni genotipovi mogli bi biti uključeni u programe selekcije i ciljanih križanja, međusobno ili s postojećim kultivarima, uz mogućnost uzgoja posve novih, superiornih kultivara. Ovim bi se metodama 'Lovranski Marun' mogao očuvati kao kultivar te biti uvršten na Sortnu listu Republike Hrvatske. Osim toga, zbog ograničenog i jasno definiranog područja uzgoja, 'Lovranski Marun' potencijalan je kandidat i za zaštitu europskim oznakama izvornosti, odnosno oznakama "Zaštićena oznaka izvornosti" (ZOI) ili "Zaštićena oznaka zemljopisnog podrijetla" (ZOZP), dok bi se tradicionalni proizvodi dobiveni iz plodova 'Lovranskog Maruna' također mogli zaštititi oznakom "Zajamčeno tradicionalni specijalitet" (ZTS) (NN 80/2013-1661). Ovim bi oznakama plodovi i prerađevine 'Lovranskog Maruna' dobile na vrijednosti i prepoznatljivosti na nacionalnoj, ali i europskoj razini, čime bi se zasigurno dodatno potaknulo očuvanje nasada i kulture kestena u Hrvatskoj.

## 6. Zaključci

Iako su u Hrvatskoj tradicionalno poznata tri kultivara, ovim je istraživanjem utvrđeno postojanje samo jednog, 'Lovranskog Maruna'. Pritom je riječ o poliklonalnom kultivaru, kojega tvori pet genotipova, prisutnih u različitim omjerima na području Lovrana, Lovrina i Cresa. Najčešći genotip, M001, ujedno je i najbrojniji te predstavlja najveći dio analiziranih jedinki u nasadima Lovrana, koji se mogu smatrati inicijalnim područjem uzgoja maruna u Hrvatskoj. Podrijetlo 'Lovranskog Maruna' najvjerojatnije se može objasniti ancestralnom poliklonalnošću, odnosno međuoprašivanjem ancestralnih maruna. S obzirom na mali inicijalni genofond, međuoprašivanje je u relativno kratkome razdoblju, od nekoliko stoljeća, dovelo do veoma male genetičke raznolikosti, koja je danas uočljiva između pet genotipova koji tvore 'Lovranski Marun', u obliku genske razlike od samo jednog alela. Osim toga, križanjem u srodstvu pojavila se muška sterilnost, koja je danas također značajno determinacijsko svojstvo. Usprkos tomu, geni 'Lovranskog Maruna' šire se danas i generativnim putem, putem sjemena nastalog oprašivanjem divljeg roditelja iz okolnih prirodnih populacija pitomog kestena (hibridna stabla). Jedinke hibridnog podrijetla predstavljaju potencijalni novi genofond za selekciju, kao i za reintrodukciju divljih gena u kultivirani genofond (marune), čime bi se mogli uzgojiti otporniji, produktivniji kultivari, bolje prilagođeni na nadolazeće promjene u okolišu.

Osim marunskih jedinki te hibridnih stabala, na području analiziranih nasada utvrđene su i jedinke okarakterizirane kao "divlje", odnosno jedinke bez utvrđene srodnosti s 'Lovranskim Marunom'. Osim korištenjem molekularnih markera, ove su se tri grupe razlikovale u morfološkim značajkama lista i ploda. Na samu morfologiju lista i ploda dominantno je utjecalo gensko podrijetlo, odnosno pripadnost jednoj od tri genske jedinstvene grupe (maruni, hibridi, divlja stabla). Analizirana stabla maruna (G1) imala su očekivano nisku razinu raznolikosti u morfologiji plodova, kao i homogene vrijednosti UPOV parametara. Svojstva koja su nepovoljna sa stajališta konzumacije i prerade plodova, kao što su brojnost i dužina ureza sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku, očekivano su imala najmanje vrijednosti, budući da je izgledno da je selekcija maruna upravo išla u smjeru uzgoja jedinki s najmanjim negativnim karakteristikama. Divlja su stabla pak imala očekivano najmanje plodove s najbrojnijim i najdužim urezima sjemene ljuske i endokarpa u sjemenku, predstavljajući time dijametralnu suprotnost marunima. Hibridne su jedinke, s druge strane, zauzele intermedijaran položaj, demonstrirajući time također utjecaj gena na morfologiju ploda. Ipak, promatra li se morfologija lista, hibridne su se jedinke istaknule najvećim lišćem, demonstrirajući time hibridni vigor, odnosno pozitivan utjecaj hibridizacije između maruna i divljih jedinki.

Iako je istražen utjecaj pedoloških svojstava na morfologiju plodova i lišća, značajne korelacije nisu utvrđene. Na razini pojedinih parova parametara tla i morfoloških značajki, kao što je pH-vrijednost tla i veličina ploda, utvrđene su pozitivne, iako slabo značajne korelacije. Također, utvrđena je negativna korelacija između udjela ugljika i dušika u tlu s veličinom lista.

Analizama multielementnog sastava jestivog dijela plodova maruna (G1), kao i divljih stabala (G3), utvrđeno je kako 'Lovranski Marun' ima slične vrijednosti makro- i mikroelemenata kao i drugi europski kultivari maruna, dok su koncentracije Ca, K i Mg bile više od većine usporedivih kultivara europskih maruna. Također, vrijednosti zabilježene za sjemenke divljih stabala bile su unutar raspona podataka drugih divljih populacija Europe. Važno je napomenuti kako su koncentracije toksičnih metala, odnosno štetnih elemenata u tragovima, bile ispod graničnih vrijednosti svih relevantnih standarda, kao i zakonom određenih graničnih vrijednosti u Republici Hrvatskoj.

Sve tri genetički definirane grupe (maruni, hibridi, divlja stabla) jasno su se razlikovala s obzirom na vrijednosti Ca, Mg i Sr. Osim toga, vrijednosti Al, Co, Cu, Ti i Mo izdvojile su G2 (hibridi) kao grupu u sredini intervala, odnosno potvrdile su intermedijarni karakter hibridnih stabala. Vrijednosti Ca i Mg, kao značajnih elemenata koja su također razlikovala sve tri grupe, bile su najviše u G3. Podaci dobiveni u ovome istraživanju potvrđuju kako je utjecaj genotipa na usvajanje makro- i mikroelemenata dominantan, te nadilazi utjecaj okoliša na stabla koja rastu na istome području. Osim toga, značajne i pozitivne korelacije između udjela pojedinog elemenata u tlu i u sjemenkama utvrđene su za Mn i Zn, posebice u G1 i G2.

Prevladavajući utjecaj genotipa na usvajanje makro- i mikroelemenata iz tla mogao bi se primijeniti u daljnjoj selekciji kultivara, čime bi se uzgojili kultivari hranjivijih plodova, kao i oni posebno prilagođeni rastu na tlima siromašnim određenim makro- i mikroelementom, poznati kao tzv. "učinkoviti" genotipovi.

Istraživanja genofonda maruna u Hrvatskoj prvi su i najvažniji korak u zaštiti te očuvanju tradicionalnih kultivara kao baštine Istre i Kvarnera. Osim toga, genotipizacija jedinki 'Lovranskog Maruna' nužan je preduvjet uvrštavanja ovog kultivara na sortnu listu Republike Hrvatske, čime se otvara mogućnost zaštite na europskoj razini. Time bi se, osim samog očuvanja, mogao i popularizirati njegov uzgoj te potaknuti organizirana proizvodnja rasadničkog materijala.

## 7. Popis literature

- Abdelhamid, S.; Küpfer, P.; Conedera, M.; Le, C. L. Identification of chestnut (*C. sativa* Mill.) cultivars using RAPD and AFLP Marker. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* **2014**, *36* (6), 349–354.
- Abdelhamid, S.; Le, C.-L.; Conedera, M.; Küpfer, P. The assessment of genetic diversity of *Castanea* species by RAPD, AFLP, ISSR, and SSR markers. *Turkish Journal of Botany* **2014a**, *38* (5), 835–850.
- Akbulut, M.; Bozhuyuk, M. R.; Ercisli, S.; Skender, A.; Sorkheh, K. Chemical composition of seed propagated chestnut genotypes from northeastern Turkey. *Notulae Boanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **2017**, *45*, 425–430.
- Akili Simsek, S.; Katircioglu, Y. Z.; Serçe, C. U.; Çakar, D.; Rigling, D.; Maden, S. *Phytophthora* species associates with dieback of sweet chestnut in Western Turkey. *Forest Pathology* **2019**, e125333, 11.
- Alejandro, S.; Holler, S.; Meier, B.; Peiter, E. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Frontiers in Plant Science* **2020**, *11*, 300.
- Alessandri, S.; Krznar, M.; Ajolfi, D.; Ramos Cabrer, A. M.; Pereira-Lorenzo, S.; Dondini, L. Genetic diversity of *Castanea sativa* Mill accessions from the Tuscan-Emilian Apennines and Emilia Romagna Region (Italy). *Agronomy* **2020**, *10* (9), 1319.
- Alessandri, S.; Ramos Cabrer, A. M.; Martín, M. A.; Mattioni, C.; Pereira-Lorenzo, S.; Donadini, L. Genetic characterization of Italian and Spanish wild and domesticated chestnut trees. *Scientia Horticulturae* **2022**, *295*, 110882.
- Álvarez-Álvarez, P.; Barrio-Anta, M.; Diéguez-Aranda, U. Differentiation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars by leaf, nut and burr dimensions. *Forestry* **2006**, *79*, 149–158.
- Anagnostakis, S. L. Chestnut breeding in the United States for disease and insect resistance. *Plant Disease* **2012**, *96*, 1392–1403.
- Andrison, D. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* **1996**, 1365–3059.
- Angui, C. M. V.; Koffi, K. K.; Issali, A. E.; Zoro, B. I. A. Assessment of hybrid vigour, dominance effect and hybrids regeneration potential in the genus *Citrullus*. *Heliyon* **2020**, *6*, e05005.
- Anić, M. Pitomi kesten na Cresu. *Glasnik za šumarske pokuse* **1953**, *11*, 321–356.
- Anić, M. Pitomi kesten u Zagrebačkoj gori. *Glasnik za šumarske pokuse* **1942**, *8*, 239.

- Anić, M. Pogledi na šumsku vegetaciju Istre i susjednih zemalja. *Šumaski list* 1945, 69, 13–23.
- Arač, K. Kestenova osa šiškarića: prvi nalazi u Koprivničko-križevačkoj županiji. *Podravski zbornik*, 2013, 39, 207–213.
- Aravanopoulos, F. A. Phenotypic variation and population relationships of chestnut (*Castanea sativa*) in Greece, revealed by multivariate analysis of leaf morphometrics. *Acta Horticulturae* 2005, 693, 233–240.
- Aravanopoulos, F. A.; Drouzas, A. D.; Alizoti, P. G. Electrophoretic and quantitative variation in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Hellenic populations in old growth natural and coppice stands. *Forest Snow and Landscape Research* 2001, 76, 429–434.
- Arnaud-Haond, S.; Belkhir, K. GENCLONE 1.0: A new program to analyze genetics data on clonal organism. *Molecular Ecology Notes* 2007, 7, 15–17.
- Arnaud-Haond, S.; Duarte, C. M.; Alberto, F.; Serrao, E. A. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* 2007, 16, 5115–5139.
- Atta-Krah, K.; Kindt, R.; Skilton, J. N.; Amaral, W. Managing biological and genetic diversity in tropical agroforestry. *Agroforestry Systems* 2004, 61, 183–194.
- Barreira, J. C. M.; Casal S.; Ferreira, I. C. F. R.; Peres, A. M.; Pereira, J. A.; Oliviera, M. B. P. P. Chemical characterization of chestnut cultivars from three consecutive years: Chemometrics and contribution for authentication. *Food and Chemical Toxicology* 2012, 50, 2311–2317.
- Bartsch, D.; Lehnen, M.; Clegg, J.; Pohl-Orf, M.; Schuphan, I.; Ellstrand, N. C. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology* 1999, 8, 1733–1741.
- Batista, D.; Valdivieso, T.; Santos, L.; Costa, R.; Paulo, O. S.; Gomes-Laranjo, J. Genotyping *Castanea sativa* × *C. crenata* and *C. sativa* × *C. mollissima* F1 hybrids using nuclear SSRs. U: *Acta Horticulturae* 784, Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Iberian Chestnut Congress, Vila Real, Portugal, 20.–22. lipnja 2007.; Gomes-Laranjo, J.; Gomes de Abreu, C.; Peixoto, F. P. (ur.); ISHS: Leuven, Belgija, 2008.
- Baye, T. M.; Abebe, T.; Wilke, R. A. Genotype–environment interactions and their translational implications. *Journal of Personalized Medicine* 2011, 8, 59–70.
- Baziramakenga, R.; Leroux, G. D.; Simard, R. R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology* 1995, 21, 1271–1285.

- Beccaro, G. L.; Torello-Marinoni, D.; Binelli, G.; Boccacci, P.; Botta, R.; Cerutti, A. K.; Conedera, M. Insights in the chestnut genetic diversity in Canton Ticino (Southern Switzerland). *Silvae Genetica* **2012**, *61*, 292–300.
- Beghè, D.; Ganino, T.; Dall'Asta, C.; Silvanini, A.; Cirlini, M.; Fabbri, A. Identification and characterization of ancient Italian chestnut using nuclear microsatellite markers. *Scientia Horticulturae* **2013**, *164*, 50–57.
- Belaj, A.; Cipriani, G.; Testolin R.; Rallo, L.; Trujillo, I. Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *Horticultural Science* **2004**, *39*, 1557–1561.
- Belaj, A.; Muñoz Díez, C.; Baldoni, L.; Šatović, Z.; Barranco, D. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae* **2010**, *124*, 323–330.
- Bellini, E.; Giordani, E.; Marinelli, C.; Migliorini, M.; Funghini, L. Marrone del Mugello PGI: Nutritional and organoleptic quality of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae* **2005**, *693*, 97–102.
- Benedetti, S.; Balocchi, F.; Gonzalez, M.; Garcia-Chevesich, P. Morphological characterization of sweet chestnut fruits from forest plantations in central Chile. *Ciencia e Investigacion Agraria* **2018**, *45*(2), 138–146.
- Beug, H. J. Vegetationsgeschichtliche Untersuchungen im Küstenbereich von Istrien (Jugoslawien). *Flora* **1977**, *166*, 357–381.
- Boamponsem, G. A.; Leung, D. W. M.; Lister, C. Insights into resistance to a Fe deficiency stress from a comparative study of *in vitro*-selected novel Fe-efficient and Fe-inefficient potato plants. *Frontiers in Plant Science* **2017**, *8*, 1581.
- Bojórquez-Quintal, E.; Escalante-Magaña, C.; Echevarria-Machado, I.; Martínez-Estévez, M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* **2017**, *8*, 1767.
- Bolvanský, M.; Mendel, L. Revised descriptor list for the evaluation of genetic resources of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Forest and Snow Landscape Research* **2001**: *76* (3), 439–444.
- Bolvanský, M.; Užík, M. Morphometric variation and differentiation of European chestnut (*Castanea sativa*) in Slovakia. *Biologia* **2005**, *60*, 423–429.

- Bolvanský, M.; Užík, M. Seasonal variation of fruit characteristics in chestnut grafts and seedlings of different parentage. *Acta Horticulturae* **2014**, *1019*, 31–37.
- Borges, O. P.; Carvalho, J. S.; Correia, P. R.; Silva, A. P. Lipid and fatty acids profiles of *Castanea sativa* Mill. chestnuts of 17 native Portuguese cultivars. *Journal of Food Composition Analysis* **2007**, *20*, 80–89.
- Borges, O. P.; Gonçalves, B.; de Carvalho, J. L. S.; Correia, P.; Silva, A. P. Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry* **2008**, *106*, 976–984.
- Botta, R.; Akkac, A.; Marinoni, D.; Bounous, G.; Kampfer, S.; Steinkellner, H.; Lexer, C. Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Horticulturae* **1999**, *494*, 277–282.
- Botta, R.; Marinoni, D.; Beccaro, G.; Akkac, A.; Bounous, G. Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *Forest and Snow Landscape Research* **2001**, *76* (3), 425–428.
- Bouffartigue, C.; Debille, S., Fabreguette, O.; Ramos Cabrer, A.; Pereira-Lorenzo, S.; Flutre, T.; Harvengt, L. High admixture between forest and cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in France. *bioRxiv* **2020**.
- Bounous G. *Among the chestnut trees in Cuneo province*, 1. izd.; Edizioni Metafore: Cuneo, Italija, 1999; str. 79.
- Bounous G. *Il Castagno, risorsa multifunzionale in Italia e nel mondo*, 2. izd.; Edagricole-New Business Media: Bolonja, Italija, 2014; str. 29.
- Bounous G. *Il castagno: Coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo*, 1. izd.; Edagricole, Bolonja, Italija, 2002; str. 312.
- Bounous, G. Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – cultivation and culture, folklore and history, traditions and use Italy. U: *Acta Horticulturae* 908, Zbornik radova s Međunarodnog simpozija o krioprezervaciji hortikulturnih vrsti, Leuven, Belgija, 5. –8. travnja; Avanzato, D. (ur.); ISHS: Leuven, Belgija, 2009, str. 72–84.
- Bounous, G. Revival of chestnut culture in Mediterranean countries: factors to improve the quality of productions. *Advances in Horticultural Science* **2006**, *20*, 7–15.
- Buck, E. J.; Hadonou, M.; James, C. J.; Blakesley, D.; Russell, K. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes* **2003**, *3*, 239–241.



- Butler, J. M. *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology*. 1. izd.; Elsevier - Academic Press,: Amsterdam, Nizozemska, 2012; str. 708.
- Caiji, Z. M.; Xue, D. Y. Influence of Tibetan traditional culture in Qing-hai on resource utilization of highland barley varieties. *Guizhou Social Sciences* **2016**, 314(2), 135–139.
- Casasoli, M.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Villani, F. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* **2001**, 102, 1190–1199.
- Cetin, N.; Yaman, M.; Karaman, K.; Demir, B. Determination of some physiochemical and biochemical parameters of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **2020**, 44, 439–450.
- Chuanromanee, T. S.; Cohen, J. I.; Ryan, G. L. Morphological analysis of size and shape (MASS): an integrative software program for morphometric analyses of leaves. *Applications in Plant Sciences* **2019**, 7(9).
- Ciucure, C. T.; Geana, E.-I.; Sandru, C.; Tita, O.; Botu, M. Phytochemical and nutritional profile composition in fruits of different sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars grown in Romania. *Separations* **2022**, 9, 66.
- Conedera, M.; Barthold, F.; Torriani, D.; Pezzatti, G. B. Drought sensitivity of *Castanea sativa*: case study of summer 2003 in the southern Alps. *Acta Horticulturae* **2003**, 866, 297.
- Conedera, M.; Krebs, P. History, present situation and perspective of chestnut cultivation in Europe. *Acta Horticulturae* **2008**, 784, 23–27.
- Conedera, M.; Krebs, P.; Tinner, W.; Pradella, M.; Torriani, D. The cultivation of *Castanea sativa* Mill. in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Vegetation History and Archaeobotany* **2004**, 13, 161–179.
- Conedera, M.; Tinner, W.; Krebs, P.; de Rigo, D.; Caudullo, G. *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: *Atlas of Forest Tree Species*, 1. izd.; San-Miguel-Ayanz, J.; de Rigo, D.; Caudullo, G.; Houston Durrant, T.; Mauri, A. (ur.); Ured za izdavaštvo Europske Unije: Luxembourg, Luxembourg, 2019; str. 78–79.
- Connolly, E. L.; Fett, J. P.; Guerinot, M. L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **2002**, 14, 1347–1357.
- Cornille, A.; Giraud, T.; Bellard, C.; Tellier, A.; Le Cam, B.; Smulders, M. J. M.; Kleinschmit, J.; Roldan-Ruiz, I.; Gladieux, P. Postglacial recolonization history of the European

- crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Molecular Ecology* **2013**, *22*, 2249–2263.
- Cosmolescu, S.; Botu, M.; Trandafir, I. Mineral composition and physical characteristics of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars originating in Romania. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* **2010**, *24*, 33–37.
- Cramér H. *Mathematical methods of statistics*. 1. izd.; Princeton University Press; New Jersey, SAD, 1946; str. 575.
- Cruz, B. R.; Abraao, A.; Lemos, A. M.; Nunes, F. M. Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill.) *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94* (1), 594–602.
- Cutino, I.; La Mantia, T.; Caruso, T.; Cartabellotta, D. The indigenous germplasm of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in the Etna area: ecophysiological aspects and morphological traits of the fruit. *Advances in Horticultural Science* **2006**, *20*, 107–112.
- D’Surney, S. J.; Shugart, L. R.; Theodorakis, C. W. Genetic markers and genotyping methodologies: an overview. *Ecotoxicology* **2001**, *10*(4), 201–204.
- de Vasconcelos M. C. B. M.; Nunes, F.; Viguera, C. G.; Bennet, R. N.; Rosa, E. A. S.; Ferreira-Cardoso, J.V. Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill) 3 – minerals, free sugars, carotenoids and antioxidant vitamins. *International Journal of Food Science & Technology* **2010a**, *45*, 496–505.
- de Vasconcelos, M. C. B. M.; Bennett, R. N.; Rosa, E. A. S.; Ferreira-Cardoso, J. V. Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2010b**, *90*, 1578–1589.
- Depotter, J. R.; Seidl, M. F.; Wood, T. A.; Thomma, B. P. Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Current Opinions in Microbiology* **2016**, *19*, 3997–4009.
- Díaz, M.; Campos, P.; Pulido, F.J. The Spanish dehesas: a diversity of land use and wildlife. U: *Farming and birds in Europe: The Common Agricultural Policy and its implications for bird conservation*, 1.izd.; Pain, D.; Pienkowski M. (ur.); Elsevier – Academic Press: London, UK, 1997; str. 178–209.
- Díez, C. M.; Trujillo, I.; Barrio, E.; Belaj, A.; Barranco, D.; Rallo, L. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Annals of Botany* **2011**, *108*, 797–807.

- Dodds, K. S. Hybrid vigour in plant breeding. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **1955**, *144*, 185–192.
- dos Santos Rosa, E.; Martins Morais, M. C. S.; Oliveira, I. V.; de Carvalho Goncalves Macedo, B. M.; Calvaso Moreira da Silva, A.P. Uses and health benefits of chestnuts. U: *Achieving sustainable cultivation of tree nuts*, 1. izd.; Serdar, Ü.; Mayis, O. (ur.); Burleigh Dodds Science Publishing Limited: Cambridge, UK; 2019, str. 552.
- Dybdahl Pedersen, L.; Roer Pedersen, A.; Bijlsma, R.; Bundgaard, J. The effects of inbreeding and heat stress on male sterility in *Drosophila melanogaster*. *Biological Journal of the Linnean Society* **2011**, *104*, 432–442.
- Eckhardt, U.; Marques, A. M.; Buckout, T. J. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Molecular Biology* **2001**, *45*, 437–448.
- El Chami, M. A.; Tourvas, N.; Kazakis, G.; Kalaitzis, P.; Aravanopoulos, F. A. Genetic characterization of chestnut cultivars in Crete. *Forests* **2021**, *12*, 1659.
- Ellstrand, N. C. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2003**, *358*, 1163–1170.
- Ellstrand, N. C.; Prentice, H. C.; Hancock, J. F. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **1999**, *30*, 539–563.
- Ertan E. Variability in leaf and fruit morphology and in fruit composition of chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) in the Nazilli region of Turkey. *Genetics Resources and Crop Evolution* **2007**, *54*, 691–699.
- Ertürk, Ü.; Mert, C.; Soylu, A. Chemical composition of fruits of some important chestnut cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2006**, *49*, 183–188.
- EUFORGEN: *Castanea sativa*. dostupno online: <http://www.euforgen.org/species/castanea-sativa/> (pristupljeno 10.3.2023.)
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **2005**, *14*, 2611–2620.
- Excoffier, L.; Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **2010**, *10*, 564–567.

- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* **1992**, *131*, 479–491.
- FAO (1997). web poveznica: <https://www.fao.org/3/AD235E/ad235e09.htm#TopOfPage> (pristupljeno 20.4.2023.)
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791.
- Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. *Cladistics* **2004**, *12*, 99–124.
- Feng, S.; He, R.; Lu, J.; Jiang, M.; Shen, X.; Jiang, Y.; Wang, Z.; Wang, H. Development of SSR markers and assessment of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* cultivars. *Frontiers in Genetics* **2016**, *7*, 113.
- Feraz-de-Oliveira, M.; Azeda, C.; Pinot-Correia, T. Management of montados and dehesas for high nature value: an interdisciplinary pathway. *Agroforestry Systems* **2016**, *90*, 1–6.
- Fernandes, P.; Colavolpe, M. B.; Serrazina, S.; Lourenço Costa, R. European and American chestnuts: An overview of the main threats and control efforts. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*.
- Fernández-Cruz, J. & Fernandez- López, J. Genetic structure of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in northwest of Spain and their differences with other European stands. *Conservation Genetics* **2016**, *17*, 949–967.
- Ferreira-Cardoso, J. V. Caracterizacao e Valorizacao do Fruto de *Castanea sativa* Mill.: Composicao quimica, valor nutritivo e efeito da sua utilizacao na engorda de porcos. Doktorski rad, Universidade e Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2002.
- Ferreira-Cardoso, J. V.; Fontaínhas-Fernandes, A. A.; Torres-Pereira, M. G. (1993) Nutritive value and technological characteristics of *Castanea sativa* Mill. fruits: comparative study of some northeastern Portugal cultivars. U: Proceedings of the International Chestnut Congress, Perugia, Italija, 20.–23. listopada; University Perugia Press, Perugia, 1993, str. 445–449.
- Feurtey, A.; Guitton, E.; de Gracia Coquerel, M.; Duvaux, L.; Shiller, J.; Bellanger, M.-N.; Expert, P.; Sannier, M.; caffier, V.; Giraud, T.; Le Cam, B.; Lemaire, C. Threat to Asian wild apple trees posed by gene flow from domesticated apple trees and their “pestified” pathogens. *Molecular Ecology* **2020**, *29*, 4925–4941.

- Figueredo-Urbina, C. J.; Álvarez-Ríos, G. D.; García-Montes, M. A.; Octavio-Aguilar, P. Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLOS ONE* **2021**, *16* (7), e0254376.
- Fineschi, S.; Turchini, D.; Müller-Stack, G.; Conedera, M. Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in southern Switzerland: III. Analysis of RAPD's molecular markers. U: Proceedings of the International Congress on Chestnut, Spoleto, Italia; Antogonozzi, E. (ur.); Tipografia Litografia Spoletina: Spoleto, Italia, 1994.
- Flamm, P. L. Impact of temperature and precipitation on apple and peach yields in southern Illinois. Doktorski rad, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, SAD, 2019.
- Freitas, T. R.; Santos, J. A.; Silva, A. P.; Fraga, H. Influence of climate change on chestnut trees: a review. *Plants* **2021**, *10*, 1463.
- Freitas, T. R.; Santos, J. A.; Silva, A. P.; Martinsm J.; Grafa, H. Climate change projections for bioclimatic distribution of *Castanea sativa* in Portugal. *Agronomy* **2022**, *12*, 1137.
- Furones-Pérez, P.; Fernández López, J. Morphological and phenological description of 38 sweet chestnut cultivars (*Castanea sativa* Miller) in a contemporary collection. *Spanish Journal of Agricultural Research* **2009**, *7*, 829–843.
- Gaither, L. A.; Eide, D. J. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 5560–5564.
- Gaither, L. A.; Eide, D. J. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 22258–22264.
- Gemas, V. J. V.; Almadanim, M. C.; Tenreiro, R.; Martins, A.; Fevereiro, P. Genetic diversity in the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Research in Crop Evolution* **2004**, *51*, 501–511.
- Geng, S.; Ning, D.; Ma, T.; Chen, H.; Zhang, Y.; Sun, X. Comprehensive analysis of components of walnut kernel (*Juglans regia* L.) in China. *Journal of Food Quality* **2021**, *11*.
- Gluhčić, D. (2005) Adaptability of different soil type from Istria region, Croatia, for viticulture production. *Glasnik zaštite bilja* **2005**, *6*, 29–54.
- Glushkova, M.; Zhyanski, M.; Velinova, K. Nut quality assessment of chestnut cultivars from 'Ivanik' clone collection. *Forest Science* **2010**, *1*, 3–14.

- Gobbin, D.; Hohl, L.; Conza, L.; Jermini, M.; Gessler, C.; Conedera, M. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* **2007**, *50*, 1089–1103.
- Gomez, N. N.; Shaw, R. G. Inbreeding effect on male and female fertility and inheritance of male sterility in *Nemophila menziesii* (Hydrophyllaceae). *American Journal of Botany* **2006**, *93*, 739–746.
- Goudet, J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **1995**, *86*, 485–486.
- Goulão, L.; Valdivieso, T.; Santana, C.; Moniz Oliveira, C. Comparison between phenetic characterisation using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genetic Resources and Crop Evolution* **2000**, *48*, 329–338.
- Greenwood, M. S.; Roth, B. E.; Maass, D.; Irland, L. C. Near rotation-length performance of selected hybrid larch in Central Maine, USA. *Silvae Genetica* **2015**, *64*, 73–80.
- Grossmann A, Romane F (2004) Final report EU project CASCADE EVK-2-CT-1999–00000. web poveznica: <http://soi.cnr.it/chestnut/> (pristupljeno 10.2.2023).
- Grygorieva, O.; Klymenko, S.; Brindza, J.; Schubertová, Z.; Nikolaieva, N.; Šimková, J. Morphometric characteristics of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruits. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* **2017**, *11*, 288–295.
- Guerinot, M. L. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2000**, *1465*, 190–198.
- Guo, J.; Jia, Y.; Chen, H.; Zhang, L.; Yang, J.; Zhang, J.; Hu, X.; Ye, X.; Zhous, Y. Growth, photosynthesis, and nutrient uptake in wheat are affected by differences in nitrogen levels and forms and potassium supply. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1248.
- Hannachi, H.; Martín Gómez, J. J.; Saadaoui, E.; Cervantes, E. Stone diversity in wild and cultivated olive trees (*Olea europaea* L.). *Dendrobiology* **2017**, *77*, 19–32.
- Hardigan, M. A.; Laimbeer, F. P. E.; Newton, L.; Crisovan, E.; Hamilton, J. P.; Vaillancourt, B.; Wiegert-Rininger, K.; Wood, J. C.; Douches, D. S.; Farré, E. M.; Veilleux, R. E.; Buell, C. R. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *PNAS* **2017**, *114* (46).
- Hatfield, J. L.; Prueger, J. H. Temperature extremes: effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes* **2015**, *10*, 4–10.
- Heiniger, U.; Conedera, M. Chestnut Forests and Chestnut Cultivation in Switzerland. Proceedings of the international chestnut conference, Morgantown, SAD, 10. – 14- srpnja;

- Double, M. L.; MacDonalds, W. L. (ur.); West Virginia University, Morgantown, West Virginia University Press, SAD, 1992; str. 175–178.
- Herrera, E. Selecting soil and site for a pecan orchard. Guide H-614. 1. izd.; College of Agriculture and Home Economics: Las Cruces, New Mexico, SAD, 1999, str. 2.
- Huang, C.; Chu, F.-H.; Huang, Y.-S.; Hung, Y.-M.; Tseng, Y.-H.; Pu, C.-E.; Chao, C.-H.; Chou, Y.-S.; Liu, S.-C.; You, Y.-T.; Hsu, S.-Y.; Hsieh, H.-C.; Hsu, C.-T.; Chen, M.-Y.; Lin, T.-A.; Shyu, H.-Y.; Tu, Y.-C.; Chen, C.-T. Development and technical application of SSR-based individual identification system for *Chamaecyparis taiwanensis* against illegal logging convictions. *Scientific Reports* **2020**, *10*, 22095.
- Idžojtić, M. Dendrologija – cvijet, češer, plod, sjeme. 1. izd.; Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet: Zagreb, Hrvatska, 2013.
- Idžojtić, M. Dendrology: Cones, Flowers, Fruits and Seeds. 1. izd.; Elsevier – Academic Press, London, UK, 2019.
- Idžojtić, M.; Zebec, M.; Poljak, I.; Medak, J. Variation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Croatia according to the morphology of fruits. *Sauteria* **2009**, *18*, 323–333.
- Idžojtić, M.; Zebec, M.; Poljak, I.; Medak, J. Variation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Croatia according to the morphology of fruits. U: Turk R, Comes P, editors. *Schriftenreihe für systematische Botanik, Floristik und Geobotanik*, 1. izd.; Turk, R.; Comes, P. (ur.); Verlag Alexander Just Dorfbeuern, Salzburg, Austrija, 2009; str. 323–333.
- Idžojtić, M.; Zebec, M.; Poljak, I.; Šatović, Z.; Liber, Z. Analiza genetske raznolikosti “lovranskog maruna” (*Castanea sativa* Mill.) korištenjem mikrosatelitnih biljega. *Šumarski List* **2012**, *136*, 577–585.
- Iketani, H.; Yamamoto, T.; Katayama, H.; Uematsu, C.; Mase, N.; Sato, Y. Introgression between native and prehistorically naturalized (archaeophytic) wild pear (*Pyrus* spp.) populations in northern Tohoku, northeast Japan. *Conservation Genetics* **2010**, *11*, 115–126.
- Iordanescu, O. A.; Radulov, I.; Buhan, I. P.; Cocan, I.; Berbecea, A. A.; Popescu, I.; Posta, D. S.; Camen, D.; Lalescu, D. Physical, Nutritional and Functional Properties of Walnuts Genotypes (*Juglans regia* L.) from Romania. *Agronomy* **2021**, *11*, 1092.
- ISO 10390 (2005). Soil quality – Determination of pH. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 10693 (1995). Soil quality – Determination of carbonate content – Volumetric method. ISO, Ženeva, Švicarska.

- ISO 10694 (1995). Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11277 (1998). Soil quality — Determination of particle size distribution in mineral soil material — Method by sieving and sedimentation. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11277 (2001). Soil quality – Determination of particle size distribution in mineral soil material – Method by sieving and sedimentation. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11461 (ISO 2000). Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analysis. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11464 (2006). Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analysis. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11464 (2009). Soil quality – Pretreatment of samples for physico-chemical analysis. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 11465 (1993). Soil quality – Determination of dry matter and water content on mass basis – Gravimetric method. ISO, Ženeva, Švicarska.
- ISO 13878 (1998). Soil quality – Determination of total nitrogen content by dry combustion (elemental analysis). ISO, Ženeva, Švicarska.
- Jenczewski, E.; Prospero, J.-M.; Ronfort, J. Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany* **1999**, *86*, 677–687.
- Ježić, M.; Krstin, Lj.; Poljak, I.; Liber, Z.; Idžojtić, M.; Jelić, M.; Meštrović, J.; Zebec, M.; Ćurković-Perica, M. *Castanea sativa*: genotype-dependent recovery from chestnut blight. *Tree Genetics and Genomes* **2014**, *10* (1), 101–110.
- Kabir, A. H.; Paltridge, N. G.; Able, A. J.; Paul, J. G.; Stangoulis, J. C. Natural variation for Fe-efficiency is associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. *Planta* **2012**, *235*, 1409–1419.
- Kabir, A. H.; Rahman, M. M.; Haider, S. A.; Paul, N. K. Mechanisms associated with differential tolerance to Fe deficiency in okra (*Abelmoschus esculentus* Moench). *Environmental and Experimental Botany* **2015**, *112*, 16–26.
- Kabir, A. H.; Tahura, S.; Elseehy, M. M.; El-Shehawi, A. M. Molecular characterization of Fe acquisition genes causing decreased Fe uptake and photosynthetic inefficiency in Fe-deficient sunflower. *Scientific Reports* **2011**, *11*, 5537.



- Kalinowski, S. T.; Taper, M. L.; Marshall, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **2007**, *16*, 1099–1106.
- Kalinowski, S. T.; Wagner, A. P.; Taper, M. L. ML-RELATE: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* **2006**, *6*, 576–579.
- Kane, J.; Kane, H. A study tour of the American chestnut industry with a focus on peeling equipment. 1. izd.; Horticultural Australia Ltd: Sydney, Australija, 2007.
- Kaplan, D. R. The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology. *American Journal of Botany* **2001**, *88* (10), 1711–1741.
- Kiær, L. P.; Philipp, M.; Jørgensen, R. B.; Hauser, T. P. Genealogy, morphology and fitness of spontaneous hybrids between wild and cultivated chicory (*Cichorium intybus*). *Heredity* **2007**, *99*, 112–120.
- Kidd, P. S.; Proctor, J. Why plants grow poorly on very acid soils: are ecologists missing the obvious? *Journal of Experimental Botany* **2001**, *52*, 791–799.
- Kopelman, N. M.; Mayzel, J.; Jakobsson, M.; Rosenberg, N. A.; Mayrose, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **2015**, *15*, 1179–1191.
- Korel, F.; Balaban, M. O. Composition, color and mechanical characteristics of pretreated candied chestnuts. *International Journal of Food Properties* **2006**, *9*(3), 559–572.
- Korir, N. K.; Han, J.; Shangguan, L.; Wang, C.; Kayesh, E.; Zhang, Y.; Fang, J. Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* **2013**, *33* (2), 111–125.
- Korshunova, Y.O.; Eide, D.; Clark, W. G.; Guerinot, M. L.; Pakrasi, H. B. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with broad specificity. *Plant Molecular Biology* **1999**, *40*, 37–44.
- Kos, K.; Kriston, E.; Melika, G. Invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), its native parasitoid community and association with oak gall wasps in Slovenia. *European Journal of Entomology* **2015**, *112*(4), 698–704.
- Krebs, P.; Conedera, M.; Pradella, M.; Torriani, D.; Felber, M.; Tinner, W. Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* **2004**, *13*, 145–160.

- Krebs, P.; Pezzatti, G. B.; Beffa, G.; Tinner, W.; Conedera, M. Revising the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) refugia history of the last glacial period with extended pollen and macrofossil evidence. *Quaternary Science Reviews* **2019**, *206*, 111–128.
- Krisper, P.; Tišler, V.; Skubic, V.; Rupnik, I.; Kobal, S. The use of tannin from chestnut (*Castanea vesca*). U: *Plant Polyphenols*, 1. izd.; Heimngwas, R. W. (ur.); Plenum Press: New York, SAD; 1992.
- Kwakye, S.; Kadyampakeni, D. M. Variable manganese rates influence the performance of Huanglongbing-affected citrus trees in Florida. *Horticultural Science* **2022**, *57*, 360–366.
- La Bonte, N. R.; Zhao, P.; Woeste, K. Signatures of selection in the genomes of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume): the roots of nut tree domestication. *Frontiers in Plant Science* **2018**, *9*, 810.
- Lazović, B.; Klepo, T.; Adakalic, M.; Šatović, Z.; Baruca Arbeiter, A.; Hladnik, M.; Strikić, F.; Liber, Z.; Bandelj, D. Intra-varietal variability and genetic relationships among the homonymic East Adriatic olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Scientia Horticulturae* **2018**, *236*, 175–185.
- Lei, Q. Y.; Bai, H. F.; Zhang, W. H.; Sun, J. Influence of diversity of proto-typical ethnic culture in diversity of glutinous rice in southeast of Gui-zhou. *Agricultural Science & Technology* **2009**, *10(5)*, 184–188.
- Levin, D. A.; Francisco-Ortega, J.; Jansen, R. K. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* **1996**, *10*, 10–16.
- Li, B.; Wu, R. Heterosis and genotype × environment interactions of juvenile aspens in two contrasting sites. *Canadian Journal of Forest Research* **2011**, *27*, 1525–1537.
- Li, Y. L.; Liu, J. X. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources* **2018**, *18*, 176–177.
- Liang, S.; Chen, J.; Xiao, K.; Yang, W. Origin of the domesticated horticultural species and molecular bases of fruit shape and size changes during the domestication, taking tomato as an example. *Horticultural Plants Journal* **2017**, *3*, 125–132.
- Liu, D.-Y. ; Liu, Y.-M.; Zhang, W.; Chen, X.-P.; Zou, C.-Q. Zinc uptake, translocation, and remobilization in winter wheat as affected by soil application of Zn fertilizer. *Frontiers in Plant Science* **2019**, *10*, 426.

- Liu, D.-Y.; Zhang, W.; Liu, Y.-M.; Chen, X.-P.; Zou, C.-Q. Soil application of zinc fertilizer increases maize yield by enhancing the kernel number and kernel weight of inferior grains. *Frontiers in Plant Science* **2020**, *11*, 188.
- Liu, H.; Fiorani, F.; Jack, O.; Colombi, T.; Nagel, K. A.; Weih, M. Shoot and root traits underlying genotypic variation in early vigor and nutrient accumulation in spring wheat grown in high-latitude light conditions. *Plants* **2021**, *10*, 174.
- Lo Bianco, R.; Mirabella, F. Use of leaf and fruit morphometric analysis to identify and classify white mulberry (*Morus alba* L.) genotypes. *Agriculture* **2018**, *8* (10), 157.
- Lovranska marunada. Web poveznica: <http://www.marunada-lovran.com> (pristupljeno 25.4.2023.)
- Lusini, I.; Velichkov I.; Pollegioni, P.; Chiocchini, F.; Hinkov, G.; Zlatanov, T.; Cherubini, M.; Mattioni, C. Estimating the genetic diversity and spatial structure of Bulgarian *Castanea sativa* populations by SSRs: implications for conservation. *Conservation Genetics* **2014**, *15*, 283–293.
- M'sehli, W.; Dell'Orto, M.; Donnini, S.; De Nisi, P.; Zocchi, G.; Abdelly, C.; Gharsalli, M. Variability of metabolic responses and antioxidant defence in two lines of *Medicago ciliaris* to Fe deficiency. *Plant and Soil* **2009**, *32*, 219–230.
- Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **1967**, *27*, 209–220.
- Marchal, A.; Muñoz, F.; Millier, F.; Sánchez, L.; Pâques, L. E. Hybrid larch heterosis: for which traits and under which genetic control? *Tree Genetics and Genomes* **2017**, *13* (92), 17.
- Marinoni, D.; Akkac, A.; Bounous, G.; Edwards, K. J.; Botta, R. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* Mill. *Molecular Plant Breeding* **2003**, *11*, 127–136.
- Martias, A.; Hariyanto, B.; Purnama, T.; Nofiarli, Z.; Emilda, D.; Hendri, L.; Siregar, A. F.; Kasno, A.; Yuliati, S.; Hernita, D.; Arsana, I. G. K. D.; Mejaya, M. J. Critical level of manganese in soil and leaves: its relationship to fruit quality of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Annual Research & Review in Biology* **2021**, *36*, 75–85.
- Martín, A. C.; Gimenez, M. J.; Alvarez, J. B. Varietal identification of chestnut using microsatellites markers. *Acta Horticulturae* **2005**, *693*, 441–446.
- Martín, A.; Alvarez, J. B.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Villani, F.; Martín, L. M. On-farm conservation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Andalusia. *Journal of Agricultural Science and Technology* **2011**, *5*, 154–159.

- Martín, M. A.; Alvarez, J. B.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Villani, F.; Martín, L. M. Identification and characterization of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeat (SSRs) markers. *Annals of Applied Biology* **2009**, *154*, 389–398.
- Martín, M. A.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Turchini, D.; Villani, F. Genetic characterization of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats). *Annals of Applied Biology* **2010**, *157*, 37–44.
- Martín, M. A.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Turchini, D.; Villani, F. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes* **2010a**, *6*, 735–744.
- Martín, M. A.; Mattioni, C.; Cherubini, M.; Villani, F.; Martín, L. M. A comparative study of European chestnut varieties in relation to adaptive markers. *Agroforestry Systems* **2016**, *91*, 97–109.
- Martín, M. A.; Mattioni, C.; Molina Martínez, J. R.; Alvarez, J. B.; Cherubini, M.; Herrera Machuca, M. Á. Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain. *Tree Genetics and Genomes* **2012**, *8*, 127–136.
- Martín, M. A.; Monedero, E.; Martín, L. M. Genetic monitoring of traditional chestnut orchards reveals a complex genetic structure. *Annals of Forest Science* **2017**, *74*, 15.
- Masclaux-Dubresse, C.; Daniel-Vedele, F.; Dechorgnat, J.; Chardon, F.; Gaufichon, L. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **2010**, *105*, 1141–1157.
- Mattioni, C.; Cherubini, M.; Micheli, E.; Villani, F.; Bucci, G. Role of domestication in shaping *Castanea sativa* genetic variation in Europe. *Tree Genetics and Genomes* **2008**, *4*, 563–574.
- Mattioni, C.; Martín, M. A.; Pollegioni, P.; Cherubini, M.; Villani, F. Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): evidence for multiple glacial refugia. *American Journal of Botany* **2013**, *100*, 951–961.
- Medak J. Šumske zajednice i staništa pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2009.
- Medak, J.; Idžojić, M.; Novak-Agbaba, S.; Čurković-Perica, M.; Mujić, I.; Poljak, I.; Juretić, D.; Prgomet, Ž. Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – Cultivation and culture, folklore and history, traditions and uses. U: *Scripta Horticulturae* **9**, Zbornik radova sa

- simpozija “International Society for Horticultural Science (ISHS)”, Leuven, Belgija, 13.-16. rujna: Avanzato, D.; Bounous, G. (ur.); ISHS: Leuven, Belgija 2009, str. 40–43.
- MEF (2007). Government Decree on the Assessment of Soil Contamination and Remediation Needs (214/2007). Ministry of Environment of Finland, Helsinki, Finska, 2007.
- Mellano, M. G.; Torello Marinoni, D.; Boccacci, P.; Donno, D.; Cerutti, A. K.; Beccaro, G. L. Ex situ conservation and characterization of the genetic diversity of *Castanea* spp. *Acta Horticulturae* **2018**, *1220*, 1–6.
- Meriño-Gergichevich, C.; Luengo-Escobar, A.; Alarcón, D.; Reyes-Díaz, M.; Ondrasek, G.; Morina, F.; Ogass, K. Combined spraying of boron and zinc during fruit set and premature stage improves yield and fruit quality of European hazelnut cv. Tonda di Giffoni. *Frontiers in Plant Science* **2021**, *12*, 661542.
- Michon, G. Revisiting the resilience of chestnut forests in Corsica: from socialecological systems theory to political ecology. *Ecology & Society* **2011**, *16*, 1–5.
- Míguez-Soto, B.; Fernández López, J. Variation in adaptive traits among and within Spanish and European populations of *Castanea sativa*: selection of trees for timber production. *New Forests* **2015**, *46*, 23–50.
- Miko, S.; Kruk, B.; Dedić, Ž.; Kruk, Lj.; Peh, Z.; Kovačević-Galović, E.; Gabrić, A. *Rudarsko-geološka studija potencijala i gospodarenja mineralnim sirovinama.*, Hrvatski geološki institut: Zagreb, Hrvatska, 2013; str. 435.
- Minch, E.; Ruiz-Linares, A.; Goldstein, D.; Feldman, M.; Cavalli-Sforza, L. L. MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. v1.5d. Stanford University, SAD, 1997.
- Moreira, R.; Chenlo, F.; Torres, M. D.; Prieto, D. M. Technological assessment of chestnut flour doughs regarding to doughs from other commercial flours and formulations. *Food and Bioprocess Technology* **2012**, *5*, 2301–2310.
- Moreno, G.; Caceres, Y. System report: Iberian Dehesas, Spain. U: Agroforwards – agroforestry for Europe, research project. Burgess, P.; Garcia de Jalon, S. (ur.); Europska komisija: Bruxelles, Belgija, 2016, str. 60.
- Morley, A. A. Digital PCR: a brief history. *Biomolecular Detection and Quantification* **2014**, *1(1)*, 1–2.
- Mota, M.; Pinto, T.; Vilela, A.; Marques, T.; Borges, A.; Caco, J.; Ferreira-Cardoso, J.; Raimundo, F.; Gomes-Laranjo, J. Irrigation positively affects the chestnut’s quality: The

- chemical composition, fruit size and sensory attributes. *Scientia Horticulturae* **2018**, *238*, 177–186.
- Motamayor, J. C.; Risterucci, A. M.; Lopez, P. A.; Oritz, F. C.; Moreno, A.; Lanaud, C. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* **2022**, *89*, 380–386.
- Muhu-Din Ahmed, H. G.; Zeng, Y.; Raza, H.; Muhammad, D.; Iqbal, M.; Uzair, M.; Khan, M. A.; Iqbal, R.; El Sabagh, A. Characterization of wheat (*Triticum aestivum* L.) accessions using morpho-physiological traits under varying levels of salinity stress at seedling stage. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, 953670.
- Mujagić-Pašić, A.; Ballian, D. Variability of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on the morphological properties of the leaf in natural populations of Bosanska Krajina. *Works of the Faculty of Forestry* **2012**, *1*, 57–69.
- Mujić, I.; Alibabić, V.; Živković, J.; Jahić, S.; Jokić, S.; Prgomet, Ž. Morfološke karakteristike pitomog kestena *Castanea sativa* sa područja Unsko-Sanskog kantona. *JCEA* **2010**, *11*, 185–190.
- Müller, A. K.; Helms, U.; Rohrer, C.; Möhler, M.; Hellwig, F.; Glej, M.; Schwerdtke, T.; Lorkowski, S.; Dawczynski, C. Nutrient composition of different hazelnut cultivars grown in Germany. *Foods* **2020**, *9*, 1596.
- Müller-Starck, G.; Conedera, M.; Fineschi, S. Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. II. Genetic inventory based on enzyme gene markers. U: Proceedings of the International Congress on Chestnut, Spoleto, Italija; Antogonozzi, E. (ur.); Tipografia Litografia Spoletina: Spoleto, Italija, 1994.
- Munir, S.; Hussain, S. B.; Manzoor, H.; Quereshi, M. K.; Zubair, M.; Noumann, W.; Shehzad, A. N.; Rasul, S.; Manzoor, S. A. Heterosis and correlation in interspecific and intraspecific hybrids of cotton. *Genetics and Molecular Research* **2016**, *15*, 15028083.
- Nazzaro, M.; Barbarisi, C.; La Cara, F.; Volpe, M. G. Chemical and biochemical characterisation of an IGP ecotype chestnut subjected to different treatments. *Food Chemistry* **2011**, *128* (4), 930–936.
- Neri, L.; Dimitri, G.; Sacchetti, G. Chemical composition and antioxidant activity of cured chestnuts from three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *Journal of Food Composition and Analytics* **2010**, *23*, 23–29.

- Nishio, S. Genetic structure analysis of cultivated and wild chestnut populations reveals gene flow from cultivars to natural stands. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (240).
- NN (2013) Zakon o zaštićenim oznakama izvornosti, zaštićenim oznakama zemljopisnog podrijetla i zajamčeno tradicionalnim specijalitetima poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda. Narodne novine 80/2013, 1661, Hrvatski sabor, 2013.
- NN (2013). Zakon o zaštiti prirode. Narodne novine 80/2013, 1658, Hrvatski sabor, 2013.
- NN (2019). Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja. Narodne novine 71/2019, 1507, Ministarstvo poljoprivrede, 2019.
- Novak Agbaba, S.; Čelepirović, N.; Čurković Perica, M. Zaštita šuma pitomog kestena. *Šumarski List* **2011**, *135* (13), 202–210.
- O'Connor, K.; Powell, M.; Nock, C.; Shapcott, A. Crop to wild gene flow and genetic diversity in a vulnerable *Macadamia* (Proteaceae) species in New South Wales, Australia. *Biological Conservation* **2015**, *191*, 504–511.
- Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO); Svjetska zdravstvena organizacija (WHO). *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2. izd.; Bangkok, Tajland, 2004; str. 362.
- Özenc, N.; Bender Özenc, D.; Duyar, Ö. Nutritional composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) as influenced by basic fertilization. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B: Soil and Plant Science* **2014**, *64*, 710–721.
- Özkan, G.; Ercisli, S.; Fidan, H.; Sestras, A. F.; Ayed, R. B.; Ersoy, N. Agro-morphological and biochemical characteristics of disease-free seed propagated European chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Genetika* **2020**, *52*, 547–558.
- Özkutlu, F.; Doğru, Y. Z.; Özenç, N.; Yazici, G.; Turan, M.; Akçay, F. The importance of Turkish hazelnut trace and heavy metal contents for human nutrition. *Journal of Soil Science and Environment Management* **2011**, *2*, 25–33.
- Page, E. R.; Schofield-Palmer, E. K; McGregor, A. J. Studies in soil and plant manganese. *Plant & Soil* **1963**, *19*, 255–264.
- Pandit, A. H.; Mir, M. A.; Kour, A.; Bhat, K. M. Variability and selection of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) genotypes in Srinagar district of Kashmir valley. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* **2013**, *50*, 205–209.
- Parthiban, S.; Govindaraj, P.; Senthilkumar, S. Comparison of relative efficiency of genomic SSR and EST-SSR markers in estimating genetic diversity in sugarcane. *3 Biotech.* **2018**, *8*, 144.

- Peña-Méndez, E. M.; Hernández-Suárez, M.; Díaz-Romero, C.; Rodríguez-Rodríguez, E. Characterization of various chestnut cultivars by means of chemometrics approach. *Food Chemistry* **2008**, *107*, 537–544.
- Pereira-Lorenzo, S.; Bischofberger, Y.; Conedera, M.; Piattini, P.; Crovadore, J.; Chablais, R.; Rudow, A.; Hatt, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Barreneche, T.; Lefort. Reservoir of the European chestnut diversity in Switzerland. *Biodiversity and Conservation* **2020**, *29*, 2217–2234.
- Pereira-Lorenzo, S.; Costa, R.; Anagnostakis, S.; Serdar, U.; Yamamoto, T.; Saito, T.; Ramos-Cabrer, A. M.; Ling, Q.; Barreneche, T.; Robin, C.; Botta, R.; Contessa, C.; Conderea, M.; Martin, L. M.; Martin, A.; Gomes-Laranjo, J.; Villani, F.; Carlson, J. E. Interspecific hybridization of chestnut. U: *Polyploidy and Hybridization for Crop Improvement*, 1. izd.; Mason, A. S. (ur.); CRC Press – Taylor and Francis Group: Abingdon, UK, 2016.
- Pereira-Lorenzo, S.; Costa, R.; Ramos-Cabrer-A. M.; Barreneche, T. Diversification process of cultivated chestnut in the Iberian Peninsula, Canary Islands and Azores. *Genome* **2011**, *54* (4).
- Pereira-Lorenzo, S.; Fernández-López, J. Description of 80 cultivars and 36 clonal selections of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from Northwestern Spain. *Fruit Variability Journal* **1997**, *51*, 13–27.
- Pereira-Lorenzo, S.; Fernández-López, J.; Moreno-González, J. Variability and grouping Northwestern Spanish chestnut cultivars. I. Morphological traits. *Journal of American Society of Horticultural Science* **1996b**, *121*, 183–189.
- Pereira-Lorenzo, S.; Fernández-López, J.; Moreno-Gonzalez, J. Variability and grouping Northwestern Spanish chestnut cultivars. II. Isoenzymatic traits. *Journal of American Society of Horticultural Science* **1996a**, *121*, 190–197.
- Pereira-Lorenzo, S.; Laurenço Costa, R.; Ramos-Cabrer, A.; Marques Ribeiro, C. A.; Serra da Silva, M. F.; Manzano, G.; Barreneche, T. Variation in grafted European chestnut and hybrids by microsatellites reveals two main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genetics and Genomes* **2010**, *5*, 701–715.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Barreneche, T.; Mattioni, C.; Villani, F.; Díaz-Hernández, M.; Martín, L. M.; Robles-Loma, A.; Cáceres, Y.; Martín, A. Instant domestication process of European chestnut cultivars. *Annals of Applied Biology* **2019**, *174*, 74–85.



- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Barreneche, T.; Mattioni, C.; Villani, F.; Belén Díaz-Hernández, M.; Martín, L. M.; Martín, Á. Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats. *Tree Genetics and Genomes* **2017**, *13* (114).
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Díaz-Hernández, B.; Ascasíbar-Errasti, J.; Sau, F. Spanish chestnut cultivars. *Horticultural Science* **2001**, *36*, 344–347.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Díaz-Hernández, M. B.; Ciordia-Ara, M.; Ríos-Mesa, D. Chemical composition of chestnut cultivars from Spain. *Scientia Horticulturae* **2006**, *107*, 306–314.
- Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrer, A. M.; Díaz-Hernández, M. B.; Ciordia-Ara, M. Características morfológicas e isoenzimáticas de los cultivares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) de Asturias. *Seria Agricola* **2005**, *16*.
- Pernar, N., Bakšić, D., Perković, I. *Terenska i laboratorijska istraživanja tla priručnik za uzorkovanje i analizu*, 1. izd.; Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 2013, str. 192.
- Pigliucci, M.; Paoletti, C.; Fineschi, S.; Malvolti, M. E. Phenotypic integration in chestnut (*Castanea sativa* Mill.): leaves versus fruits. *Botanical Gazette* **1991**, *152*, 514–521.
- Pinto, T. M.; do Rosario Anjos, M.; Martins, N. M.; Gomes-Laranjo, J.; Ferreira-Cardoso, J.; Peixoto, F. Structural analysis of *Castanea sativa* Mill. leaves from different regions in the tree top. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2011**, *54* (1).
- Pitte, J. R. Terres de castanide: homme et paysage du chataignier de l'Antiquité à nos jours. *Méditerranée* **1987**, *60*, 52.
- Plett, D. C.; Ranathunge, K.; Melino, V. J.; Kuya, N.; Uga, Y.; Kronzucker, H. J. The intersection of nitrogen nutrition and water use in plants: new paths toward improved crop production. *JXB* **2020**, *71*, 4452–4468.
- Plieninger, T.; Gaertner, M.; Hui, C.; Huntsinger, L. Does land abandonment decrease species richness and abundance of plants and animals in Mediterranean pastures, arable lands and permanent croplands?. *Environmental Evidence* **2013**, *2*, 3.
- Poljak, I.; Idžojić, M.; Zebec, M.; Perković, N. The variability of European sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in the region of northwest Croatia according to morphology of fruits. *Šumarski list* **2012**, *136* (9-10), 489–489.

- Poljak, I. Morfološka i genetska raznolikost populacija i kemijski sastav plodova europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2014.
- Poljak, I.; Idžojtić, M.; Šatović, Z.; Ježić, M.; Ćurković-Perica, M.; Simovski, B.; Acevski, J.; Liber, Z. Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genet Genomes* **2017**, *13*, 18. doi: 10.1007/s11295-017-1107-2.
- Poljak, I.; Vahčić, N.; Gačić, M.; Idžojtić, M. Morphology and chemical composition of fruits of the traditional Croatian chestnut variety 'Lovran Marron'. *Food Technol Biotechnol.* **2016**, *54*, 189–199. doi: 10.17113/ftb.54.02.16.4319.
- Poljak, I.; Vahčić, N.; Liber, Z.; Šatović, Z.; Idžojtić, M. Morphological and chemical variation of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) population. *Forests* **2022**, *13*, 55. doi: 10.3390/f13010055.
- Poljak, I.; Vahčić, N.; Liber, Z.; Šatović, Z.; Idžojtić, M. Morphological and chemical variation of wild sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Forests* **2022**, *13* (1), 55.
- Poljak, I.; Vahčić, N.; Vidaković, A.; Tumpa, K.; Žarković, I.; Idžojtić, M. Traditional sweet chestnut and hybrid varieties: chemical composition, morphometric and qualitative nut characteristics. *Agronomy* **2021**, *11*, 516. doi: 10.3390/agronomy11030516.
- Poljak, I.; Tumpa, K.; Vidaković, A.; Ćurković-Perica, M.; Ježić, M.; Šatović, Z.; Liber, Z.; Idžojtić, M. Očuvanje i upravljanje genofondom pitomog kestena. *Šumarski list* **2023**, *147* (3-4), 137-146. <https://doi.org/10.31298/sl.147.3-4.4>
- Popović-Djordjević, J.; Paunović, D.; Milić, A.; Krstić, Đ.; Siavash Moaghaddam, S.; Roje, V. Multi-elemental analysis, pattern recognition techniques of wild and cultivated rosehips from Serbia, and nutritional aspect. *Biological Trace Elements Research* **2021**, *199*, 1110–1122.
- Posta, D. S.; Radulov, I.; Cocan, I.; Berbecca, A. A.; Alexa, E.; Hotea, I.; Iordanescu, O. A.; Bala, M.; Cantarm, I. C.; Rosza, S.; Crista, F. L.; Boldea, M. V.; Negrea, M.; Popsecu, I. Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from spontaneous flora of the west part of Romania: a source of nutrients for locals. *Agronomy* **2022**, *12*, 214.
- Powell, W. A.; Newhouse, A. E.; Coffey, V. Developing blight-tolerant American chestnut trees. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2019**, *11*(7), a034587.

- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **2000**, *155*, 945–959.
- Puechmaille, S. J. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources* **2016**, *16*, 608–627.
- Quintana, J.; Contreras, A.; Merino, I.; Vinuesa, A.; Orozco Gutiérrez, G.; Ovalie, F.; Gomez, L. Genetic characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) orchards and traditional nut varieties in El Bierzo, a glacial refuge and major cultivation site in northwestern Spain. *Tree Genetics and Genomes* **2015**, *11* (826).
- Quirós Castillo, J. A. Cambios y transformaciones en el paisaje, del Apenino toscano entre la Antigüedad Tardía y la Edad Media. El castaño. *Archeologia Medievale* **1998**, *25*, 177–197.
- Ramos-Cabrer, A. M.; Pereira-Lorenzo, S. Genetic relationship between *Castanea sativa* Mill. trees from north-western to south Spain based on morphological traits and isoenzymes. *Genetics Resources in Crop Evolution* **2005**, *52*, 879–890.
- Randall, G. W.; Schulte, E. E.; Corey, R. B. Effect of soil and foliar-applied manganese on the micronutrient content and yield of soybeans. *Agronomy Journal* **1975**, *67*, 502–507.
- Raymond, M.; Rousset, F. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **1995**, *86*, 248–249.
- Razaq, M.; Zhang, P.; Shen, H.-L.; Salahuddin, M. Influence of nitrogen and phosphorus on the growth and root morphology of *Acer mono*. *PLOS One* **2017**, *12*, e0171321.
- Rengel, Z. Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **2001**, *32*, 1163–1186.
- Reshma Raj, S.; Das, D. N. Molecular markers and its application in animal breeding. U: *Advances in animal genomics*, 3. izd.; Mondal, S.; Lakhan Singh, R. (ur.); Academic Press – Elsevier: Amsterdam, Nizozemska, 2021; str. 123–140.
- Ribeiro, B.; Rangel, J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Pereira, J. A.; Bölke, H.; Seabra, R. M. Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 504–508.
- Ricklefs, R. Environmental heterogeneity and plant species diversity: A hypothesis. *American Naturalist* **1977**, *111*, 376–381.

- Rieseberg, L. H.; Raymond, O.; Rosenthal, D. M.; Lai, Z.; Livingstone, K.; Nakazato, T., Durphy, J. L.; Schwarzbach, A. E.; Donovan, L. A.; Lexer, C. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **2003**, *301*, 1211–1216.
- Roces- Díaz, J. V.; Díaz-Varela, E. R.; Barrio-Anta, M.; Álvarez-Álvarez, P. Sweet chestnut agroforestry systems in North-western Spain: Classification, spatial distribution and an ecosystem services assessment. *Forest Systems* **2018**, *27* (1), 14.
- Roff, D. A. *Life History Evolution*, 1. izd.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2002; 527 str.
- Rohlf FJ. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.2, 1. izd.; Applied Biostatistics Inc.: New York, SAD, 2009.
- Rohlf, F. J.; Marcus, L. F. A revolution in morphometrics. *Tree* **1993**, *8* (4).
- Roje, V.; Orešković, M.; Rončević, J.; Bakšić, D.; Pernar, N.; Perković, I. Assessment of the trace element distribution in soils in the parks of the city of Zagreb. *Environmental Monitoring Assessment* **2018**, *190*, 121.
- Sacchetti, G.; Neri, L.; Dimitri, G.; Mastrocola, D. Chemical composition and functional properties of three sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) ecotypes from Italy. *Acta Horticulturae* **2009**, *844*, 41–46.
- Saeki, N.; Kawanabe, T.; Ying, H.; Shimizu, M.; Kojima, M.; Abe, H.; Okazaki, K.; Taylor, J. M.; Sakakibara, H.; Peacock, W. J.; Dennis, E. S.; Fujimoto, R. Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. *BMC Plant Biology* **2016**, *16* (45).
- Saleh, D.; Milazzo, J.; Adreit, H.; Fournier, E.; Tharreau, D. South-East Asia is the center of origin, diversity and dispersion of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *New Phytologist* **2014**, *201*, 1440–1456.
- SAS Institute Inc.: Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures. dostupno online: <https://doi.org/10.1002/wics.131> (pristupljeno 10.2.2022.)
- Sawano, M.; Ichii, T.; Nakanishi, T.; Kotera, Z. Studies on identification of chestnut species and varieties by isozyme analysis. *Scientific Reports of Faculty of Agriculture Kobe University* **1984**, *16*, 67–71.
- Schmidt, R.; Müller, J.; Drescher-Schneider, R.; Krisai, R. Changes in lake level and trophy at Lake Vrane, a large karstic lake on the Island of Cres (Croatia), with respect to paleoclimate and anthropogenic impacts during the last approx. 16,000 years. *Journal of Limnology* **2000**, *2*, 113–130.

- Schulte, E. E.; Kelling, K. A. Soil and applied manganese - UW Extension, A2526, 1. izd.; University of Wisconsin: Madison, Wisconsin, SAD, 1999, 4 str.
- Schulte, E. E.; Kelling, K. A. Soil and applied manganese - UW Extension, A2526, 1. izd.; University of Wisconsin: Madison, Wisconsin, SAD, 1999, 4 str.
- Seletković, Z.; Tikvić, I.; Vučetić, M.; Ugarković, D. Klimatska obilježja i vegetacija sredozemne Hrvatske. U: *Šume hrvatskoga sredozemlja*, 1. izd.; Matić, S. (ur.); Akademija šumarskih znanosti: Zagreb, Hrvatska, 2011, str. 142–161.
- Serdar, U.; Demirsoy, H. Non-destructive leaf area estimation in chestnut. *Scientia Horticulturae* **2006**, *108* (2), 227–230.
- Serdar, U.; Demirsoy, H.; Demirsoy, L. A morphological and phenological comparison of chestnut (*Castanea*) cultivars ‘Serdar’ and ‘Marigoule’. *AJCS* **2011**, *5*, 1311–1317.
- Serdar, U.; Kurt, N. Some leaf characteristics are better morphometric discriminators for chestnut genotypes. *JAST* **2011**, *13*, 885–894.
- Shannon, C. E.; Weaver, W. *The mathematical theory of communication*, 1. izd.; University of Illinois Press: Urbana, Illinois, SAD, 1949; 131 str.
- Silla, F.; Camison, A.; Solana, A.M.; Hernandez, H.; Rios, G.; Cabrera, M.; Lopez, D.; Morera-Beita, A. Does the persistence of sweet chestnut depend on cultural inputs? Regeneration, recruitment, and mortality in *Quercus*- and *Castanea*-dominated forests. *Annals of Forest Science* **2018**, *75* (95).
- Silvanini, A.; Dall’Asta, C.; Morrone, L.; Cirlini, M.; Beghè, D.; Fabbri, A.; Ganin, T. Altitude effects on fruit morphology and flour composition of two chestnut cultivars. *Scientia Horticulturae* **2014**, *176*, 311–318.
- Simpson, E. H. Measurement of diversity. *Nature* **1949**, *163* (688).
- Şimşek, M. Chemical, mineral, and fatty acid compositions of various types of walnut (*Juglans regia* L.) in Turkey. *Bulgarian Chemistry Communications* **2016**, *48*, 66–70.
- Siskawardani, D. D.; Onthong, J.; Khawmee, K.; Poonpakdee, C. Manganese status in upland and lowland rubber-growing soils in Songkhla province, southern Thailand. *Agriculture and Natural Resources* **2016**, *50*, 321–325.
- Small, E. Hybridization in the domesticated-weed-wild complex. U: *Plant Biosystematics*, 1. izd.; Grant, W. F. (ur.); Academic Press – Elsevier: Amsterdam, Nizozemska, 1984; str. 195–210.

- Solar, A.; Podjavoršek, A.; Ostrec, G.; Štampar, F. Evaluation and comparison of domestic chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Slovenia. *Forest and Snow Landscape Research* **2001**, *76*, 455–459.
- Solar, A.; Podjavoršek, A.; Štampar, F. Phenotypic and genotypic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Slovenia – opportunity for genetic improvement. *Genetics Resources in Crop Evolution* **2005**, *52*, 381–394.
- Soranz Ferrarezi, R.; Lin, X.; Gonzalez Neira, A. C.; Zambon, F. T.; Hu, H.; Wang, X.; Huang, J.-H.; Fan, G. Substrate pH influences nutrient absorption and rhizosphere microbiome of Huanglongbing-affected grapefruit plants. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, 856937.
- Sørensen, B. S.; Kiær, L. P.; Jørgensen, R. B.; Hauiser, T. P. The temporal development in a hybridizing population of wild and cultivated chicory (*Cichorium intybus* L.). *Molecular Ecology* **2007**, *16*, 3292–3298.
- Souza, M. L.; Duarte, A. A.; Lovato, M. B.; Fagundes, M.; Vallardes, F.; Lemos-Filho, J. P. Climatic factors shaping intraspecific leaf trait variation of a neotropical tree along a rainfall gradient. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0208512.
- Strikić, F.; Liber, Z.; Bandelj Mavsar, D.; Čmelik, Z.; Perica, S.; Radunić, M.; Javornik, B.; Šatović, Z. Intra-cultivar diversity in the Croatian olive cultivar, ‘Lastovka’. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **2011**, *86*, 305–311.
- Sudrathar, A. K.; Kaiser, D. E. Zinc for crop production – UM Extension, 1. izd.; University of Minnesota: St. Paul, Minnesota, SAD, 2016, 6 str. dostupno online: <https://extension.umn.edu/micro-and-secondary-macronutrients/zinc-crop-production> (pristupljeno 12.12.2022).
- Tanner, H. Die Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der zahmen Kastanie im Kanton St. Gallen. *Naturwissenschaftlicher Gesellschaft* **1928**, *63*, 27–48.
- Todesco, M.; Pascual, M. A.; Owens, G. L.; Ostevik, K. L.; Moyers, B. T.; Hübner, S.; Heredia, S. M.; Hahn, M. A.; Caseys, C.; Bock, D. G.; Rieseberg, L. H. Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications* **2016**, *9*, 892–908.
- Tollenaar, M.; Ahmadzadeh, A.; Lee, E. A. Physiological basis of heterosis for grain yield in maize. *Crop Science* **2004**, *44*, 2086–2094.
- Torello Marinoni, D.; Akkak, A.; Beltramo, C.; Guaraldo, P.; Boccacci, P.; Bounous, G.; Ferrara, A. M.; Ebone, A.; Viotto, E.; Botta, R. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics and Genomes* **2013**, *9*, 1017–1030.

- Torres, M. D.; Moreira, R.; Chenlo, F.; Morel, M. H.; Barron, C. Physicochemical and structural properties of starch isolated from fresh and dried chestnuts and chestnut flour. *Food Technology and Biotechnology* **2014**, *52*, 135–139.
- Tumpa, K.; Idžojtić, M.; Čurković-Perica, M.; Ježić, M.; Juretić, D.; Drvodelić, D.; Šango, M.; Žigante, M.; Poljak, I. Vegetativno razmnožavanje pitomog kestena i maruna. *Šumarski List* **2021a**, *9-10*, 489–498.
- Tumpa, K.; Vidaković, A.; Drvodelić, D.; Šango, M.; Idžojtić, M.; Perković, I.; Poljak, I. The effect of seed size on germination and seedling growth in sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Forests* **2021**, *12*, 858.
- UIH (2007) Prostorni plan uređenja općine Lovran. Urbanistički institut Hrvatske d. d., 2007, 156 str.
- UPOV (2004). Workshop on data handling. web poveznica:  
[https://www.upov.int/export/sites/upov/publications/en/pdf/upov\\_data\\_bei\\_04\\_01.pdf](https://www.upov.int/export/sites/upov/publications/en/pdf/upov_data_bei_04_01.pdf)  
(pristupljeno: 04.05.2023.)
- UPOV (2017). Chestnuts (*Castanea mollissima* Blume; *Castanea creneta* Siebold & Zucc.; *Castanea sativa* Mill.): guidelines for the conduct of test for distinctness homogeneity and stability. UPOV, Ženeva, Švicarska, 2017.
- US EPA 3051A (2007). Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, SAD.
- US EPA 6010D (2014). Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, SAD.
- Uwimana, B.; D'Andrea, L.; Felber, F.; Hooftman, D. A. P.; Den Nijs, H. C. M.; Smulders, M. J. M.; Visser, R. G. F.; Van De Wiel, C. C. M. A Bayesian analysis of gene flow from crops to their wild relatives: Cultivated (*Lactuca sativa* L.) and prickly lettuce (*L. serriola* L.) and the recent expansion of *L. serriola* in Europe. *Molecular Ecology* **2012**, *21*, 2640–2654.
- Van Colen, W. Sweet chestnut in agroforestry systems. AFINET 2020. dostupno online: [www.eurafagroforestry.eu/afinte/](http://www.eurafagroforestry.eu/afinte/) (pristupljeno: 14.4.2023.)
- van der Voet, E.; Salminen, R.; Eckelman, M.; Mudd, G.; Norgate, T.; Hischer, R. Environmental risks and challenges of anthropogenic metal flows and cycles. U: Report of the working group on the global metal flows to the international resource panel. Resource

- Panel, Working Group on the Global Metal Flows (ur.); United Nations Environmental Programme (UNEP), Nairobi, Kenija, 2013, 231 str.
- Varshney, R. K.; Graner, A.; Sorrells, M. E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 48–55.
- Villani, F.; Lauteri, M.; Sansotta, A.; Cherubini, M.; Monteverdi, M. C.; Mattioni, C. Genetic structure and quantitative traits variation in F1 full-sibs progenies of *Castanea sativa* Mill. *Acta Horticulturae* **1999**, *494*, 395–405.
- Vukelić, J. *Šumska vegetacija Hrvatske*, 1. izd.; Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Državni zavod za zaštitu prirode: Zagreb, Hrvatska, 2012; 403 str.
- Wang, D.; Maughan, M. W.; Sun, J.; Feng, X.; Miguez, F.; Lee, D.; Dietze, M. Impact of nitrogen allocation on growth and photosynthesis of *Miscanthus* (*Miscanthus* x *giganteus*). *GCB Bioenergy* **2012**, *4*, 688–697.
- Wang, H.; Vieira, F. G.; Crawford, J. E.; Chu, C.; Nielsen, R. Asian wild rice is a hybrid swarm with extensive gene flow and feralization from domesticated rice. *Genome Research* **2017**, *27*, 1029–1038.
- Wang, Y.; Kang, M.; Huang, H. W. Microsatellite loci transferability in chestnut. *Journal of American Society for Horticultural Science* **2008**, *133*, 692–700.
- Weng, Q.; He, X.; Li, F.; Li, M.; Yu, X.; Shi, J.; Gan, S. Hybridizing ability and heterosis between *Eucalyptus urophylla* and *E. tereticornis* for growth and wood density over two environments. *Silvae Genetica* **2014**, *63*, 15–24.
- Willis, J. H. The contribution of male-sterility mutations to inbreeding depression in *Mimulus guttatus*. *Heredity* **1999**, *83*, 337–346.
- WinFolia TM: Version PRO 2005b. Regent Instruments Inc.: Quebec, Kanada, 2005.
- Zanewich, K. P.; Pearce, D. W.; Rood, S. B. Heterosis in poplar involves phenotypic stability: cottonwood hybrids outperform their parental species at suboptimal temperatures. *Tree Physiology* **2018**, *38*, 789–800.
- Zeng, Y.; Clark, M. J. Optimal growing substrate pH for five *Sedum* species. *Horticultural Science* **2013**, *48*, 448–451.
- Zhang, Q.-P.; Liu, D.-C.; Liu, S.; Liu, N.; Wei, X.; Zhang, A.; Liu, W.-S. Genetic diversity and relationships of common apricot (*Prunus armeniaca* L.) in China based on simple sequence repeat (SSR) markers. *Genetic Resources in Crop Evolution* **2014**, *61*, 357–368.



- Zhou, R.; Wu, Z.; Jiang, F. L.; Liang, M. Comparison of gSSR and EST-SSR markers for analyzing genetic variability among tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.). *Genetics in Molecular Research* **2015**, *14*, 13184–13194.
- Zlatanov, T.; Schleppe, P.; Velichkov, I.; Hinkov, G.; Georgieva, M.; Eggertsson, P.; ZlatANCOVA, M.; Vacik, H. Structural diversity of abandoned chestnut (*Castanea sativa* Mill.) dominated forests: Implications for forest management. *Forest Ecology and Management*, **2013**, *291*, 326–335.
- Zlatanov, T.; Velichkov, I.; Georgieva, M.; Hinkov, G.; ZlatANCOVA, M.; Gogusev, G.; Eastaugh, C. S. Does management improve the state of chestnut (*Castanea sativa* L) on Belasitsa Mountain, southwest Bulgaria? *iForest* **2015**, *8*, 860–865.

## 8. Životopis

Katarina Tumpa rođena je u Zagrebu 11. kolovoza 1993. godine. Nakon osnovne škole upisuje Petu gimnaziju, koju završava 2012. godine. Iste godine započinje studij Krajobrazne arhitekture na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, no odustaje od studija u drugome semestru te 2013. godine upisuje preddiplomski studij Urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša na Šumarskom fakultetu (danas Fakultet šumarstva i drvne tehnologije) u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2016. godine, obranom završnog rada pod naslovom “Porodica Magnoliaceae”, te nastavlja sa diplomskim studijem Urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša. Diplomski studij završava 2018. godine *summa cum laude*, obranom diplomskog rada pod nazivom “Utjecaj povećanja vlažnosti tla na stabilnost urbanih stabala hrasta kitnjaka u park-šumama grada Zagreba”. Tijekom studija osvaja dvije Dekanove nagrade te nagrade “Akademik Dušan Klepac” i “Akademik Milan Anić”, za najbolju studenticu na preddiplomskom, odnosno diplomskom studiju. Tijekom diplomskog studija, provodi sedam mjeseci na Erasmus studentskoj razmjeni u Pragu, a sudjeluje i u volonterskim radnim kampovima na Islandu 2014. i 2016. godine.

Od ožujka 2019. godine zaposlena je kao znanstveni novak-asistent na projektu Hrvatske zaklade za znanost “Od terena do nasada: karakteristike i prilagodljivost na stres prirodnih populacija pitomoga kestena i maruna”, u sklopu kojega se bavila ovim istraživanjem i izradom disertacije. Tijekom doktorskog studija, objavila je osam znanstvenih radova u autorstvu i koautorstvu, dva stručna rada u autorstvu i koautorstvu, kao i poglavlje u monografiji. Također, sudjelovala je s usmenom prezentacijom na dva domaća te jednom međunarodnom znanstvenom skupu.