

Genetska raznolikost i identifikacija rameta klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži hrasta kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)

Jakšić, Viktor

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:362933>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



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

VIKTOR JAKŠIĆ

**GENETSKA RAZNOLIKOST I IDENTIFIKACIJA RAMETA
KLONOVA U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI HRASTA
KITNJAKA (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2024.

**FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE
TEHNOLOGIJE ŠUMARSKI ODSJEK**

**GENETSKA RAZNOLIKOST I IDENTIFIKACIJA
RAMETA KLONOVA U KLONSKOJ SJEMENSKOJ
PLANTAŽI HRASTA KITNJAKA (*Quercus petraea*
(Matt.) Liebl.)**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Šumarstvo – Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim
gospodarenjem

Predmet: Oplemenjivanje šumskoga drveća

Ispitno povjerenstvo: 1. izv. prof. dr. sc. Ida Katičić Bogdan
2. prof. dr. sc. Saša Bogdan
3. Marko Bačurin mag. ing. silv.

Student: Viktor Jakšić

JMBAG: 0068234280

Datum odobrenja teme: 26. travnja 2024.

Datum predaje rada: 20. rujna 2024.

Datum obrane rada: 30. rujna 2024.

ZAGREB, RUJAN, 2024.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov	Genetska raznolikost i identifikacija rameta klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži hrasta kitnjaka (<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.)
Autor	Viktor Jakšić
Adresa autora	Tadije Smičiklasa 5c, 47000 Karlovac
Mjesto izrade	Fakultet šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Izv. prof. dr. sc. Ida Katičić Bogdan
Asistent	Marko Bačurin, mag. ing. silv.
Godina objave	2024.
Obujam	broj stranica: 33 broj slika: 5 broj tablica: 5 broj navoda literature: 21
Ključne riječi:	hrast kitnjak, klonska sjemenska plantaža, genotipizacija, mikrosatelitni biljezi, genetska raznolikost
Sažetak	U ovom radu uzorkovano je 156 rameta 52 klonova hrasta kitnjaka iz klonske sjemenske plantaže „Novoselci“. Klonska sjemenska plantaža osnovana je pomoću vegetativnih kopija izabranih majčinskih stabala. Kopije su proizvedene cijepljenjem. Jedinke su analizirane pomoću 14 jezgrinih mikrosatelitskih biljega kako bi se odredili genotipovi svih klonova. Uspješno su se amplificirali odsječci DNA za 155 jedinki, od kojih je 130 pridruženo nekom klonu. 20% jedinki nije odgovaralo nacrtu. Neke su krivo obilježene, a kod nekih je došlo do odumiranja plemke i biljka se razvila iz podloge. Uzorci su ispravljeni u nacrtu plantaže. Jedinke koje su nastale rastom podloge preporuča se ukloniti zbog negativnog utjecaja na genetsku dobit. Genetska raznolikost genotipova klonova zadovoljavajuća je i odgovara vrijednostima iz prirodnih sastojina hrasta kitnjaka, te predstavlja dobru genetsku bazu za proizvodnju sjemena ($H_E = 0,817$).

BASIC DOCUMENTATION CARD

Title	Genetic diversity and identification of clonal ramets in the clonal seed orchard of sessile oak (<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.)
Author	Viktor Jakšić
Address of Author	Tadije Smičiklasa 5c, 47000 Karlovac
Thesis performed at	The Faculty of Forestry and Wood Technology, University of Zagreb
Publication Type	Master thesis
Supervisor	Associate Professor Ida Katičić Bogdan, PhD
Publication year	2024
Assistant	Marko Bačurin, mag. ing. silv.
Volume	Number of pages: 33 Number of figures: 5 Number of tables: 5 Number of references: 21
Key words:	Sessile oak, clonal seed orchard, genotyping, microsatellite markers, genetic diversity
Abstract	<p>In this study, 156 ramets from 52 clones of sessile oak were sampled from the "Novoselci" clonal seed orchard. The clonal seed orchard was established using vegetative copies of selected parent trees. The copies were produced through grafting. The individuals were analysed using 14 nuclear microsatellite markers to determine the genotypes of all clones. DNA fragments were successfully amplified for 155 individuals, of which 130 were assigned to a clone. Twenty percent of the individuals did not match the layout plan. Some were mislabelled, and in some cases, the scion had died and the plant developed from the rootstock. The samples were corrected in the orchard layout. It is recommended to remove individuals that developed from the rootstock due to their negative impact on genetic gain. The genetic diversity of the clone genotypes is satisfactory and corresponds to the values found in natural sessile oak stands, representing a good genetic base for seed production ($H_E = 0.817$).</p>

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

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

U Zagrebu, 30. rujna 2024. godine.

vlastoručni potpis

Viktor Jakšić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Rod <i>Quercus</i> (Matt.) Liebl.).....	1
1.2. Morfologija i biologija istraživane vrste	1
1.3. Rasprostranjenost i ekologija istraživane vrste	2
1.4. Klonske sjemenske plantaže.....	5
1.5. Mikrosatelitski biljezi.....	6
1.6. Dosadašnja istraživanja	6
2. CILJ RADA.....	8
3. MATERIJAL I METODE.....	9
3.1. Područje istraživanja	9
3.2. Biljni materijal.....	13
3.3. Analiza pomoću jezgrinih mikrosatelitskih biljega.....	13
3.3.1. Molekularni biljezi	13
3.3.2. Statistička obrada podataka	17
3.3.2.1. Genetska identifikacija rameta klonova (genotipizacija)	17
3.3.2.2. Genetska raznolikost klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Genetska identifikacija rameta klonova (genotipizacija)	19
4.2. Genetska raznolikost klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži	24
4.2.1. Raznolikost mikrosatelitskih biljega	24
4.2.2. Raznolikost genotipova klonova u plantaži	25
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČCI	29
7. LITERATURA.....	31

PREDGOVOR

Na početku rada želio bih se zahvaliti svima koji su mi bili podrška tijekom studiranja na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije.

Posebno se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Idi Katičić Bogdan na velikoj pomoći pri realizaciji diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na neizmjenoj podršci kroz cijeli period studiranja.

U Zagrebu, 30. rujna 2024. godine.

Viktor Jakšić

1. UVOD

1.1 Rod *Quercus* (Matt.) Liebl.)

Rod *Quercus* najznačajniji je rod iz porodice bukava (Fagaceae). Svojom općom rasprostranjenošću vrste roda *Quercus* zauzimaju veliko područje u čitavom pojasu sjeverne hemisfere. S obzirom na broj vrsta spada u najbogatije drvenaste rodove, a njihov broj u literaturi jako varira pa se tako mogu pronaći podaci od oko 200 pa sve do više od 600 vrsta drveća, rjeđe grmlja (Franjić 1996).

Šume u Hrvatskoj zauzimaju dva milijuna hektara ili 35% površine, a od toga hrastove šume pokrivaju oko 30% što iznosi 615 000 hektara (Matić 1996).

1.2. Morfologija i biologija istraživane vrste

Raste kao stablo do 35(40) m visine i promjera do 1(3) m. Kora je na starim primjercima debela (do 2 cm), plitko ispucala i bjeličastosiva (Franjić, Škvorc, 2010).

Ima dobro razvijen korijenov sustav sa snažnom žilom srčanicom (Idžojtić, 2013).

Pupovi su do 8 mm dugi, sa zašiljenim i koničnim ljuskama. Vršni pupovi su najkrupniji. Listovi su na užljebljenim, golim, 12-30 (40) mm dugim peteljka. Plojka je tanka, čvrsta, do 12 cm duga i 7 cm široka. Muški cvjetovi su u resama dugim do 6 cm, na goloj osi ili rijetko dlakavoj. Ženski su pojedinačni ili po 2-5 grupirani. Kupula je polukuglasta, plitka, tankih zidova, 5-12 mm visoka i 8-14 mm široka, s prileglim ljuskama. Plod (žir) je dug 1,5-4 cm, promjera 0,8-2,5 cm, sjedeći ili na vrlo kratkoj stapci, goli. Obavijen je kupulom od 1/4-1/3 dužine (Franjić, Škvorc 2010). Kitnjak je izrazito polimorfna vrsta (Franjić, Škvorc 2010).



Slika 1. *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) – žir.

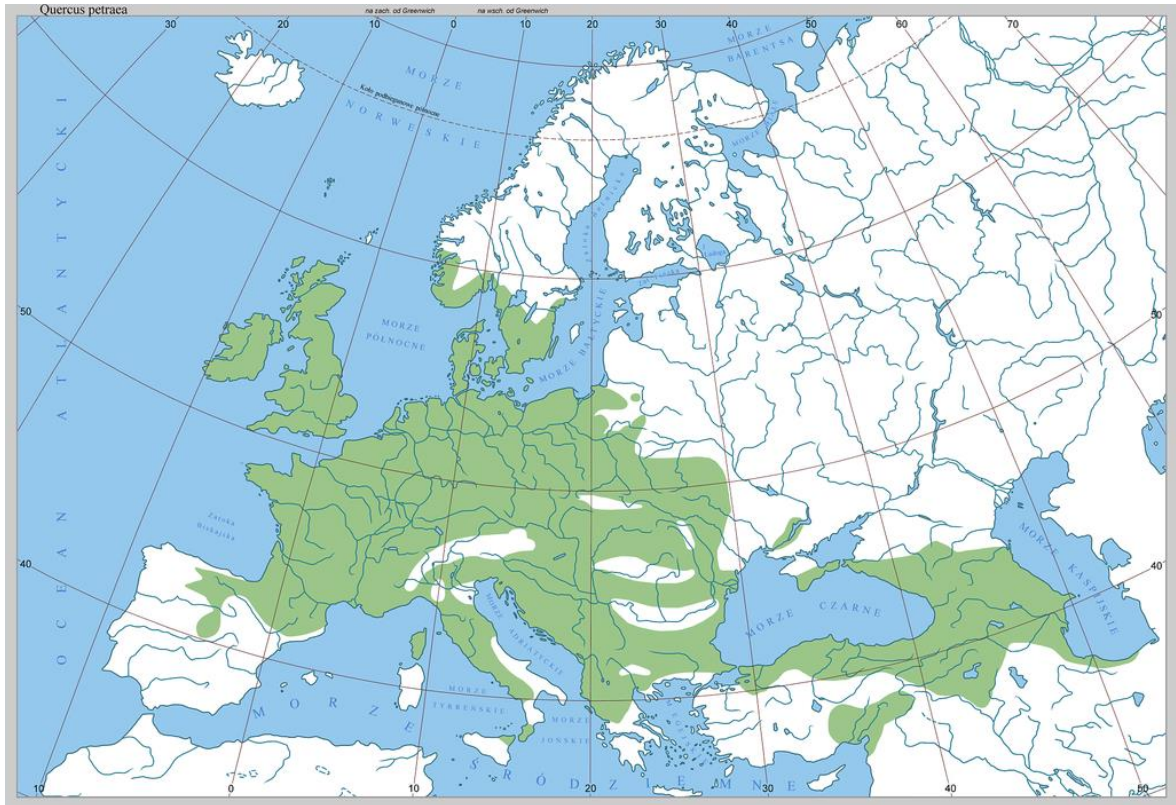
(izvor: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/quercus-petraea/?lang=en>)

1.3. Rasprostranjenost i ekologija istraživane vrste

Hrast kitnjak rasprostire se u Europi, na području Kavkaza i Male Azije (Idžojtić, 2013). Najbolje uspijeva na svježim tlima, a u pogledu hranjivosti tla nema velikih zahtjeva. Raste na kiselom, podzolastom, čak i na slabo razvijenom skeletnom tlu, nizinskih a naročito brežuljkastih i brdskih terena. Zastupljen je u brojnim zajednicama (Franjić, Škvorc, 2010).

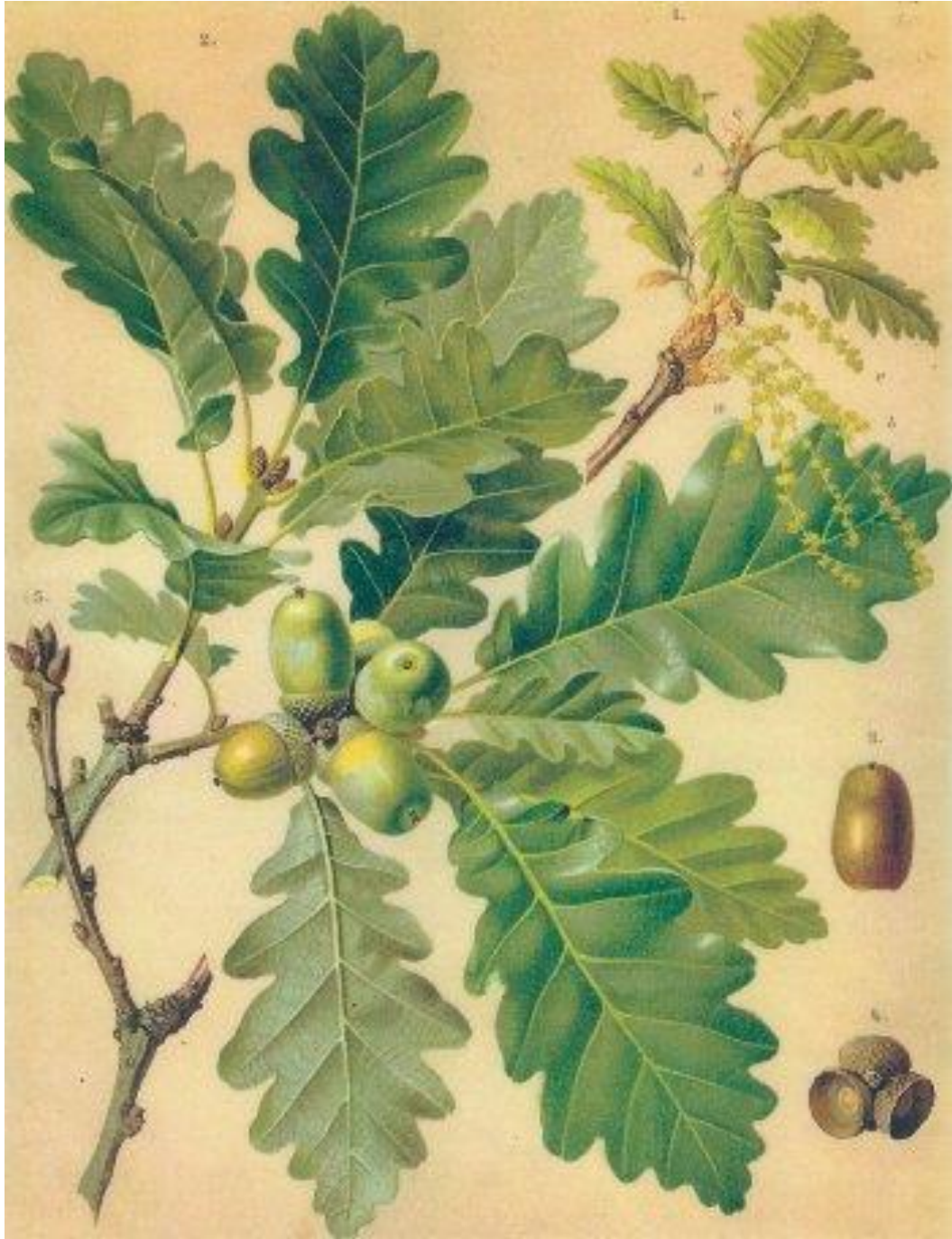
On je listopadna vrsta, počinje cvjetati nakon 20 godina starosti, ako se nalazi u sastojini onda nakon 40 godina. Cvjeta u IV. i V. mjesecu, a sazreli žir možemo naći u IX. i X. mjesecu (Idžojtić, 2013). Hrast kitnjak je listopadna, jednodomna, anemofilna i pretežno mezofilna vrsta (Franjić, Škvorc, 2010).

Kitnjak je poslije lužnjaka najčešća europska vrsta hrastova. Drvo mu je vrlo cijenjeno jer je čvrsto i trajno. Žir je vrlo značajan u prehrani životinja (Franjić, Škvorc, 2010).



Slika 2. Areal hrasta kitnjaka (izvor:

https://vi.wikipedia.org/wiki/Quercus_petraea#/media/T%E1%BA%ADp_tin:Quercus_petraea_-_range_in_Europe_by_Boratynski.png)



Slika 3. *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), (Hempel i Wilhelm 1889).

1.4. Klonske sjemenske plantaže

Klonske sjemenske plantaže su umjetni nasadi u kojima se na jednoj lokaciji sadi više klonova nastalih vegetativnim razmnožavanjem jedinki odabranih u prirodnim ili drugim populacijama koje se odlikuju superiornim obilježjima za neka svojstva od interesa (kvaliteta drvne mase, otpornost na štetne čimbenike, hortikultura vrijednost i slično). Odabrano ishodišno stablo koje će biti klonirano nazivamo ortetom. Klonovi su u plantaži predstavljeni sa više kopija (rameta) i ideja je da se takvi superiorni genotipovi međusobno oprašuju i proizvode reprodukcijски materijal (sjeme) u kojem je ostvarena genetska dobit za svojstva od interesa. Postupak osnivanja i održavanja klonske sjemenske plantaže podrazumijeva sljedeće korake (Katičić Bogdan 2012):

1. **Selekcija plus stabala** - Selekcija plus stabala za klonske sjemenske plantaže prve generacije vrši se u prirodnim sastojinama ili nasadima, po kriterijima koji ovise o cilju oplemenjivanja. U programima oplemenjivanja naprednijih generacija osnovna populacija sastojat će se od materijala potvrđene uzgojne vrijednosti na osnovu genetičkog testiranja.
2. **Vegetativno razmnožavanje plus stabala** - Vegetativni dijelovi plus stabala, tzv. plemke, uzimaju se sa selekcioniranih stabala. Najčešće su to vršni izbojci. Vrši se vegetativno razmnožavanje takvog materijala cijepljenjem, ukorijenjivanjem ili kulturom tkiva. Najčešće se koristi cijepljenje, ali i drugi načini osiguravaju da proizvedene biljke imaju genotip identičan majčinskom stablu (izuzevši pojavu nepredviđenih somatskih mutacija). Majčinsko stablo naziva se orteta, vegetativne kopije rametama, a zajedno čine klon.
3. **Sadnja biljaka na odabranom lokalitetu** - Vegetativno razmnožene biljke sade se na odabranoj lokaciji na relativno širokim razmacima, u usporedbi sa drugim nasadima, kako bi se omogućila što veća osunčanost krošnje za poticanje cvatnje. Svaka biljka označena je brojem svog klona, a određenim dizajnom rasporeda sadnje najčešće se nastoji maksimalno razdvojiti ramete istog klona, kako bi se minimalizirala samooplodnja. Tipična klonska sjemenska plantaža osniva se sa 20 - 60 klonova
4. **Njega klonskih sjemenskih plantaža** - Nakon sadnje, klonskom sjemenskom plantažom se intenzivno gospodari (zaštita, gnojidba) kako bi se proizvele

maksimalne količine sjemena dobivenog slobodnim oprašivanjem između klonova. Dobiveno sjeme se koristi u redovnom gospodarenju za sjetvu, proizvodnju sadnica, pošumljavanje i popunjavanje. Stabla se oblikuju na način koji potiče što bolje plodonošenje, te olakšavaberbu, uz minimalne troškove. Fenotipski izgled stabala u plantaži nikako ne ukazuje na genetsku kvalitetu proizvedenog sjemena. Ona se pretpostavlja na osnovu fenotipa ishodišnih stabala, te naknadno potvrđuje u genetičkim testovima.

5. **Daljnje oplemenjivanje na osnovu saznanja iz genetičkih testova** - Podaci dobiveni iz genetičkih testova (najčešće testovi potomstva) koriste se za procjenu uzgojne vrijednosti klonova. Klonovi koji ne zadovoljavaju mogu se u potpunosti ukloniti iz plantaže ili se po određenom sustavu može smanjiti broj njihovih rameta. Takvi postupci proreda rezultiraju nepravilnijim razmakom između preostalih stabala, ali poboljšavaju genetsku kvalitetu dobivenog sjemena, pri čemu treba voditi računa i o očuvanju genetske raznolikosti u plantažnom potomstvu.

1.5. Mikrosatelitski biljezi

Mikrosatelitski biljezi predstavljaju ulomke DNA u kojima se neki tzv. motiv (slijed nukleotida (1-6 baza)) ponavlja određeni broj puta. Po svom sastavu razvrstavaju se po motivu kao a) savršeni, ako su sazđani isključivo od jednog ponavljajućeg motiva; b) nesavršeni ako se neki bazni par koji ne pripada motivu nalazi između ponavljanja; c) prekinuti – ako je slijed od nekoliko baznih parova ubačen u motiv ili d) sastavljen – ako se sastoji od nekoliko ponavljajućih motiva koji se izmjenjuju jedan uz drugoga. Njihova je značajka da su jako polimorfni, što znači da postoji veliki broj alela tj. velika raznolikost inačica jednog ulomka DNA između različitih jedinki. Zbog te su značajke izrazito prikladni za točnu genetsku identifikaciju jedinki (genotipizaciju), zajedničkom upotrebom više mikrosatelitskih lokusa (biljega). Također su idealni za istraživanje genetske raznolikosti unutar i između populacija i procese kao što migracije gena između populacija i obrasci razmnožavanja unutar populacija zbog velike primjenjivosti u roditeljskim analizama.

1.6. Dosadašnja istraživanja

Hrast kitnjak jedna je od ekonomski i ekološki važnih vrsta šumskog drveća u Europi. U skladu s tim, postoje zaista brojna istraživanja ne samo o populacijama hrasta kitnjaka u raznim europskim zemljama, nego i o međuodnosu i međuvrsnoj hibridizaciji te vrste sa vrstama srodnih hrastova, najčešće kitnjakom i meduncem, na područjima gdje te vrste često žive na

zajedničkom ili bliskom staništu. Osim klasičnih jezgrinih mikrosatelitskih biljega (Steinkellner i dr. 1997 a, b, Streiff i dr. 1998, Neophytou i dr. 2010, Crăciunesc i dr. 2017, Dostálek i dr. 2011) upotrebljavaju se i EST SSR (mikrosatelitski) biljezi (Yücedağ i Gailing 2013), te kloroplastni biljezi (RFLP i cpSSR) korisni za rekonstrukciju postglacijalnih rekolonizacijskih puteva i ustanovljavanje porijekla biljnog materijala (Blanc-Jolivet i Liesebach 2015). U novije vrijeme, zahvaljujući sekvenciranju genoma hrastova, sve važniju primjenu kod hrastova, pa tako i kitnjaka, imaju SNP biljezi iz regija gena kandidata, zbog posebno zanimljive potencijalne povezanosti sa adaptivnim svojstvima (Temunović i dr. 2020). U svim istraživanjima pomoću jezgrinih mikrosatelitskih biljega, genetska raznolikost (u vidu očekivane heterozigotnosti H_E) prirodnih sastojina hrasta kitnjaka dosta je visoka i kreće se, s obzirom na biljege koji se koriste, u rasponu od 0,777 do 0,884. Neophytou i dr. (2010) analizirali su populacije kitnjaka iz Grčke, Bugarske i Njemačke sa istim biljezima korištenim u ovom istraživanju. Prosječna H_E u grčkim populacijama iznosila je 0,781, u bugarskim 0,815, a u njemačkim 0,813. Dostalek i dr. 2011 uspoređivali su genetsku raznolikost prirodnih populacija, panjača i sađenih sastojina hrasta kitnjaka u Češkoj i dobili približno iste vrijednosti genetske raznolikosti za sva tri sistema uzgoja (raspon 0,857 do 0,882). Klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka također je posađena umjetna plantaža od koje očekujemo proizvodnju genetski raznolikog i poboljšanog reproduktivnog materijala. Zbog toga bi vrijednosti genetske raznolikosti roditeljskih stabala uključenih u plantažu trebali imati dovoljno visok stupanj raznolikosti, sličan raznolikosti u prirodnim populacijama iz literature.

2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada je genetski identificirati (genotipizirati) klonove i ustanoviti genetsku raznolikost klonova unutar klonske sjemenske plantaže hrasta kitnjaka na području Šumarije Požega. Na uzorku od tri ramete svakog klona provest će se genetska identifikacija (genotipizacija) klonova pomoću jezgrinih mikrosatelitskih molekularnih biljega i ustanoviti točnost pripadanja uzorka rameta klonovima kako je predviđeno planom i naznačeno nacrtom položaja rameta klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži. Prikladnim statističkim metodama utvrdit će se genetska raznolikost klonova u plantaži i usporediti sa podacima o genetskoj raznolikosti hrasta kitnjaka u prirodnim populacijama u Europi, kako bi se utvrdilo sadrži li klonska sjemenska plantaža dovoljnu potencijalnu genetsku raznolikost za proizvodnju potomstva dostatno široke genetske osnove.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Područje istraživanja

Šumska proizvodnja sadnica u rasadniku Hajderovac UŠP Požega uglavnom se bazira na proizvodnji sadnica hrasta kitnjaka (oko 2,0 mil. sadnica godišnje). Stoga je odlučeno je da se za potrebe rasadnika osnuje klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka na kojoj će se kontrolirano proizvoditi sjeme (žir) s fenotipski kvalitetnih stabala iz ovog područja, odabranih po objektivnim kriterijima selekcije, te ujedno očuvati i njihov genofond.

Gospodarskom jedinicom „Novoselci“ gospodari Šumarija Požega u sklopu Uprave šuma Podružnice Požega. Površina klonske sjemenske plantaže nalazi se unutar područja obuhvata gospodarske jedinice „Poljadijske šume" kojoj je nekad i pripadala. Osnovana je u proljeće 2008. godine na području gospodarske jedinice „Poljadijske šume“ Šumarije Požega, Uprave šuma Podružnice Požega na čistini evidentiranoj kao odjel/odsjek 43e, površine 10,28 ha. Sa ukupno 52 plus stabala (selekcioniranih po fenotipu) iz sastojina UŠP Požega, sa područja sedam Šumarija, skidane su plemke iz krošanja dužine 20-30 cm, te su cijepljene na podlogu dvogodišnjih sadnica hrasta kitnjaka uzgojenih u rasadniku. Sva 52 klona uvrštena su u plantažu. Cijepljenje i uzgoj klonova obavio se u rasadniku Hajderovac, Šumarije Kutjevo (UŠP Požega). Primijenjena je metoda cijepjenja odvojenom plemkom (kopuliranje) s običnim spajanjem. Razmak sadnje u plantaži iznosi 8×6 m. Ukupno je predviđeno 1244 rameta, a krajem 2019. godine u plantaži se nalazilo ukupno 1014 cijepova.

U Tablici 1 nalazi se popis klonova uključenih u plantažu, sa opisom geografskog porijekla i brojem rameta uključenih u plantažu 2019.godine.

Tablica 1. Popis klonova u KSP Novoselci

Redni broj	Oznaka klona	Geografsko porijeklo klona Šumarija, GJ, Odjel, odsjek,	Broj rameta (cijepova)
1	1	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	14
2	2	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	23
3	3	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	17
4	4	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	16
5	5	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	20
6	6	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	18
7	7	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	22
8	8	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 21a	16
9	9	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 21a	30
10	10	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 21a	22
11	11	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	24
12	12	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	21
13	13	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	28
14	14	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	20
15	15	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	17
16	16	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	19
17	17	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 28b	19
18	18	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 27a	24
19	19R	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 22a	19
20	20R	Šumarija Čaglin, GJ Južna Krndija čaglinska 21a	14
21	21	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk kam. 76b	29
22	22	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk kam. 76a	23
23	23	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk kam. 76a	18
24	24	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk kam. 78a	22
25	25	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk zveč. 36b	23
26	26	Šumarija Kamenska, GJ Zapadni Papuk zveč. 36b	22
27	27	Šumarija Kutjevo, GJ Južna Krndija kutjeva. 79b	24
28	28	Šumarija Kutjevo, GJ Južna Krndija kutjeva. 78c	22
29	29	Šumarija Kutjevo, GJ Južna Krndija kutjeva. 78c	17
30	30	Šumarija Pleternica, GJ Požeška gora 58a	24
31	31	Šumarija Pleternica, GJ Požeška gora 58a	20
32	32	Šumarija Pleternica, GJ Požeška gora 58a	16
33	33	Šumarija Pleternica, GJ Požeška gora 59a	23
34	34	Šumarija Požega, GJ Sjeverna Babja gora 59a	12
35	35	Šumarija Požega, GJ Sjeverna Babja gora 40a	19
36	36R	Šumarija Požega, GJ Sjeverna Babja gora 89b	10
37	37R	Šumarija Požega, GJ Sjeverna Babja gora 90a	14
38	38	Šumarija Velika, GJ Južni Papuk 69a	21
39	39	Šumarija Velika, GJ Južni Papuk 69a	22

40	40	Šumarija Velika, GJ Južni Papuk 69a	19
41	41	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	16
42	42	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	25
43	43	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	22
44	44	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	8
45	45	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	17
46	46	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	25
47	47	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	17
48	48	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	18
49	49	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	16
50	50	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	16
51	51	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	5
52	52	Šumarija Našice, GJ Našička planina 27a	26



Slika 4. Klonska sjemenska plantaža „Novoselci“

Plantaža se nalazi na 135 m nadmorske visine. Geografski je plantaža smještena na težištu od 17° 46' 59" istočne geografske dužine, računajući od Greenwicha i na 45° 19' 59" sjeverne geografske širine.



Slika 5. Katastarski plan sa izdvojenim k.č. za KSP „Novoselci“

3.2. Biljni materijal

Materijal za molekularnu analizu sakupljen je u proljeće 2024. godine sa po tri odabrane ramete klonova koji se nalaze na plantaži (Tablica 3). Uzorkovani su mladi neoštećeni listovi i pohranjeni u silika gelu do izolacije DNA. Ukupno je sakupljeno 156 uzoraka.

3.3. Analiza pomoću jezgrinih mikrosatelitskih biljega

3.3.1. Molekularni biljezi

Jezgri mikrosatelitni biljezi korišteni u ovom istraživanju izdvojeni su iz nekoliko vrsta roda *Quercus*, i to sedam biljega iz vrste *Quercus robur* (KAMPFER i dr. 1998), šest biljega izdvojenih iz vrste *Quercus petraea* (STEINKELLNER i dr. 1997b), te jedan biljeg izdvojen iz vrste *Quercus macrocarpa* (DOW i ASHLEY 1996).

Tablica 2 sadrži detaljan prikaz biljega, njihovih početnica, ponavljajućih slijedova nukleotida, te očekivanih duljina alela.

Radi veće ekonomičnosti, spojeno je nekoliko mikrosatelitnih biljega u jednu PCR reakciju. Takvo spajanje biljega naziva se multipleks ili višestruki PCR. Koriste se dva ili više parova početnica s ciljem istovremenog umnožavanja dva ili više odsječaka DNK. Kod kapilarne elektroforeze koriste se različito obojane početnice kako bi se razlikovali produkti. Također, najčešće se koristi veći broj ponavljajućih ciklusa (35-40) zbog istovremenog umnažanja nekoliko različitih odsječaka DNK kada koristimo PCR multiplekse (AMBRIOVIĆ RISTOV i dr. 2007).

Tablica 2. Korišteni jezgri biljezi i početnice, izdvojeni iz izvorne literature. U zagradi ispod očekivanog raspona alela rasponi dobiveni u ovom istraživanju

Br.	Naziv biljega	Početnice (slijed u smjeru 5' – 3') F početnice obilježene (Stigma® Prologo)		Ponavljajući motiv	Očekivane duljine alela (Raspon u ovom istraživanju)
1	ssrQrZAG96	F - ned	CCCAGTCACATCCACTACTGTCC	(TC) ₂₀	135-194 (138-190)
		R	GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA		
2	ssrQrZAG7	F - vic	CAACTTGGTGTTCGGATCAA	(TC) ₁₇	115-153 (115-155)
		R	GTGCATTTCTTTTATAGCATTAC		
3	ssrQrZAG87	F - ned	TCCCACCACTTTGGTCTCTCA	(TC) ₂₀	110-131 (109-135)
		R	GTTGTCAGCAGTGGGATGGGTA		

4	ssrQrZAG112	F - ned	TTCTTGCTTTGGTGCGCG	(GA) ₃₂	85-96 (84-98)
		R	GTGGTCAGAGACTCGGTAAGTATTC		
5	ssrQrZAG11	F - ned	CCTTGAACCTCGAAGGTGTCCTT	(TC) ₂₂	238-267 (243-281)
		R	GTAGGTCAAAACCATTTGGTTGACT		
6	ssrQrZAG101	F - fam	CCTGCACAATCAAATCCTTCACTT	(TC) ₂₀ (AC) ₁₅	136-160 (125-177)
		R	GCCATGAACAACGGAGGTATCTAG		
7	ssrQrZAG30	F - vic	TGCTCCGTCATAATCTTGCTCTGA	(GA) ₂₆	172-248 (166-229)
		R	GCAATCCTATCATGCACATGCACAT		
8	ssrQpZAG9	F - vic	GCAATTACAGGCTAGGCTGG	(AG) ₁₂	182-210 (183-209)
		R	GTCTGGACCTAGCCCTCATG		
9	ssrQpZAG110	F - fam	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT	(AG) ₁₅	206-262 (199-237)
		R	GATCTCTTGTGTGCTGTATTT		
10	ssrQpZAG1/5	F - fam	GCTTGAGAGTTGAGATTTGT	(GA) ₅ (GA) ₉	160-190 (131-185)
		R	GCAACACCCTTTAACTACCA		
11	ssrQpZAG15	F - vic	CGATTTGATAATGACACTATGG	(AG) ₂₃	108-152 (107-151)
		R	CATCGACTCATTGTTAAGCAC		
12	ssrQpZAG16	F - fam	CTTCACTGGCTTTTCCTCCT	(AG) ₂₁	164-199 (143-171)
		R	TGAAGCCCTTGCAACATGC		
13	ssrQpZAG104	F - ned	ATAGGGAGTGAGGACTGAATG	(AG) ₁₆ AT(GA) ₃	176-196 (165-229)
		R	GATGGTACAGTAGCAACATTC		
14	MSQ13	F - vic	TGGCTGCACCTATGGCTCTTAG	(TC) ₁₂	222-246 (190-228)
		R	ACACTCAGACCCACCATTTTCC		

MULTIPLEKS 1 (biljezi ssrQpZAG9, ssrQrZAG11, ssrQrZAG101)

PCR reakcijska smjesa:

U PCR reakcijskoj smjesi volumena 20 µl po uzorku upotrijebljeno je 1 µl genomske DNA, u 10 mM PCR pufera, uz 0,025 U/µl *Taq* DNK Polimeraze, te 0,2 mM svakog dNTP-a i po 0,2 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQpZAG9 i ssrQrZAG101, te po 0,3 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG11 (LIFE TECHNOLOGIES®). Do punog volumena koristila se sterilizirana i deionizirana H₂O.

PCR protokol:

Prvi stupanj PCR reakcije, denaturacije odvijala se pri 94 °C u vremenu trajanja od 3 minute. Amplifikacija DNK se odvijala u 30 ciklusa s temperaturama denaturacije (engl. *denaturation*) 94 °C u trajanju 40 sekundi i nalijeganja početnica (engl. *annealing*) na 50 °C utrajanju od po

40 sekundi, i elongacijom, tj. produživanjem DNK na temperaturi od 65 °C u trajanju od 80 sekundi. Nakon što su svi ciklusi završeni, uslijedila je produžena elongacija u trajanju od 5 minuta pri 65 °C.

BILJEG ssrQrZAG112

Zbog specifičnog protokola za biljeg ssrQrZAG112, umnažanje tog biljega je rađeno zasebno prema GUICHOUX i dr. 2011, bez mogućnosti njegovog uklapanja u jedan od multipleksa. Naknadno su uzorci prije slanja u Macrogen pridruženi uzorcima odgovarajućih rameta multipleksa 1.

PCR reakcijska smjesa:

U PCR reakcijskoj smjesi volumena 10 µl po uzorku upotrijebljeno je 1 µl genomske DNA, u 10 mM PCR pufera, uz 0,025 U/µl Taq DNK Polimeraze, te 0,2 mM svakog dNTP-a i po 0,4 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG112 (LIFE TECHNOLOGIES®). Do punog volumena koristila se sterilizirana i deionizirana H₂O.

PCR protokol:

Prvi stupanj PCR reakcije, denaturacije odvijala se pri 95 °C u vremenu trajanja od 15 minuta. Amplifikacija DNK se odvijala u 30 ciklusa s temperaturama denaturacije (engl. *denaturation*) 94 °C u trajanju 30 sekundi i jednom minutnom nalijeganju početnica (engl. *annealing*) na 56 °C, te elongacijom, tj. produživanjem DNK na temperaturi od 72 °C u trajanju od 45 sekundi. Nakon što su svi ciklusi završeni, uslijedila je produžena elongacija u trajanju od 10 minuta pri 60 °C.

MULTIPLEKS 2 (ssrQpZAG15, ssrQpZAG104, ssrQpZAG110)

PCR reakcijska smjesa:

U PCR reakcijskoj smjesi volumena 20 µl po uzorku upotrijebljeno je 1 µl genomske DNA, u 10 mM PCR pufera, uz 0,025 U/µl Taq DNK Polimeraze, te 0,2 mM svakog dNTP-a i po 0,3 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQpZAG15, po 0,22 µM Forward i Reversepočetnica biljega ssrQpZAG104, te po 0,4 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQpZAG110 (LIFE TECHNOLOGIES®). Do punog volumena koristila se sterilizirana i deionizirana H₂O.

PCR protokol:

Tri minute početne denaturacije pri 94 °C. Amplifikacija DNK se odvijala u 30 ciklusa s temperaturama denaturacije 94 °C u trajanju 40 sekundi i nalijeganja početnica na 50 °C u trajanju od po 40 sekundi, te elongacijom DNK na temperaturi od 65 °C u trajanju od 80 sekundi. Nakon što su svi ciklusi završeni, uslijedila je produžena elongacija u trajanju od 5 minuta pri 65 °C.

MULTIPLEKS 3 (ssrQpZAG16, ssrQrZAG30, ssrQrZAG87)

PCR reakcijska smjesa:

U PCR reakcijskoj smjesi volumena 20 µl po uzorku upotrijebljeno je 1 µl genomske DNA, u 10 mM PCR pufera, uz 0,025 U/µl Taq DNK Polimeraze, te 0,2 mM svakog dNTP-a i po 0,4 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQpZAG16, po 0,3 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG30, te po 0,15 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG87 (LIFE TECHNOLOGIES®). Do punog volumena koristila se sterilizirana i deionizirana H₂O.

PCR protokol:

Tri minute početne denaturacije pri 94 °C. Amplifikacija DNK se odvijala u 30 ciklusa s temperaturama denaturacije 94 °C u trajanju 40 sekundi i nalijeganja početnica na 50 °C u trajanju od po 40 sekundi, te elongacijom DNK na temperaturi od 65 °C u trajanju od 80 sekundi. Nakon što su svi ciklusi završeni, uslijedila je produžena elongacija u trajanju od 5 minuta pri 65 °C.

MULTIPLEKS 4 (ssrQrZAG7, ssrQrZAG96, ssrQpZAG1/5, MSQ13)

PCR reakcijska smjesa:

U PCR reakcijskoj smjesi volumena 20 µl po uzorku upotrijebljeno je 1 µl genomske DNA, u 10 mM PCR pufera, uz 0,025 U/µl Taq DNK Polimeraze, te 0,2 mM svakog dNTP-a i po 0,22 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG7, po 0,15 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQrZAG96, te po 0,3 µM Forward i Reverse početnica biljega ssrQpZAG1/5 i po 0,22 µM Forward i Reverse početnica biljega MSQ13 (LIFE TECHNOLOGIES®). Do punog volumena koristila se sterilizirana i deionizirana H₂O.

PCR protokol:

Tri minute početne denaturacije pri 94 °C. Amplifikacija DNK se odvijala u 30 ciklusa s temperaturama denaturacije 94 °C u trajanju 40 sekundi i nalijeganja početnica na 50 °C u trajanju od po 40 sekundi, te elongacijom DNK na temperaturi od 65 °C u trajanju od 80 sekundi. Nakon što su svi ciklusi završeni, uslijedila je produžena elongacija u trajanju od 5 minuta pri 65 °C.

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

3.3.2. Statistička obrada podataka**3.3.2.1. Genetska identifikacija rameta klonova (genotipizacija)**

Izolacijom DNA dobiveni su uzorci visoke koncentracije i kakvoće, koja je provjerena na uređaju NanoPhotometer P300 (Implen GmbH, Munich, Germany), te su se uspješno amplificirali svi odsječci DNA (mikrosatelitski biljezi). Aleli su očitani programom GeneMapper™ Software 5 (Thermo Fisher) i tablice genotipova izvezene su i dalje obrađivane u programu Microsoft Excel 2019 (Microsoft).

Na temelju dobivenih podataka, sastavljeni su genotipovi 155 od 156 rameta (uzorak broj 118 (40/1) nije se uspješno amplificirao ni za jedan biljeg), te su na temelju barem dva identična, od tri raspoloživa genotipa za svaki klon, identificirani genotipovi klonova.

Ukoliko genotip nekog klona nije potpun jer ni kod jedne ramete klona, koja je nedvosmisleno pridružena datom klonu nije došlo do uspješne amplifikacije svih 14 biljega, genotipovi tih klonova uvršteni su u daljnju analizu sadržavajući nedostajuće podatke (missing data).

Ukoliko su sve tri ramete klona imale isti genotip za sve biljege, njihovi genotipovi su bez ikakve sumnje potvrđeni kao genotip pripadajućeg klona

Ukoliko su sve tri navodne ramete klona imale različite genotipove bila je onemogućena prvobitna identifikacija točnog genotipa klona. Takve ramete označene su narančastom bojom i isključene iz klona kojem navodno pripadaju.

Ukoliko su dvije ramete klona imale identični genotip, taj se genotip uzeo kao genotip datog klona. U takvom slučaju genotip treće ramete neodgovarajućih vrijednosti označen je crvenom bojom i isključen iz klona kojem navodno pripada.

Nakon identifikacije genotipova klonova, tablica sa genotipovima klonova, te svim narančasto i crveno označenim genotipovima koji u tom trenutku nisu svrstani ni u jedan klon, u programu Microsoft Excel 2019 sortirana je napredujućim redom po svih 28 alela 14 upotrijebljenih biljega. Na taj način nastojalo se ustanoviti hoće li se neki od crveno ili narančasto označenih genotipova svrstati uz neki od poznatih genotipova klonova, te će se tako ustanoviti pripada li nekom drugom klonu, kako bi ga se moglo pravilno svrstati i ispraviti podatak na nacrtu klonske sjemenske plantaže.

Ukoliko se uspostavilo da neki od narančasto označenih genotipova ima kopiju (istovjetni genotip) označenu crvenom bojom, pretpostavilo se da upravo ta narančasta rameta predstavlja pravi genotip klona kojem je prvobitno po nacrtu pripadala, po jednostavnoj pretpostavci da zaista predstavlja klon, ukoliko uzorak iz plantaže (tih 156 tj. 155 rameta) sadrži njenu vegetativnu kopiju (cijep), premda je ta kopija (crveno označena) svrstana u krivi klon. U takvom slučaju genotip narančastog uzorka proglašen je genotipom klona, a crveni uzorak proglašen je njegovom rametom i pridružen klonu uz promjenu na nacrtu plantaže.

Također sa usporedbom genotipova nastojalo ustanoviti jesu li svi potvrđeni genotipovi klonova međusobno različiti ili je možda došlo do duplikacije uzoraka u nekom od procesa osnivanja ili popunjavanja plantaže, pa zapravo neki klonovi dijele genotip odnosno predstavljaju zapravo isti klon

3.3.2.2. Genetska raznolikost klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži

Sastavljena je tablica genotipova na način opisan u prethodnom potpoglavlju. Kako bi se ustanovila genetska raznolikost klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži, podaci o korištenim biljezima i klonovima su analizirani pomoću softvera GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse 2006, 2012).

4. REZULTATI

4.1. Genetska identifikacija rameta klonova (genotipizacija)

Obradom podataka za duljine alela 155 jedinki (rameta) kod kojih su se svi ili većina odsječaka DNA (mikrosatelitskih biljega) uspješno umnožili došlo se do sljedećih rezultata.

- Od ukupnog broja od 155 jedinki nacrtu (klonu kako je označen na nacrtu) je nedvosmisleno odgovaralo 115 jedinki tj. 74% analiziranih rameta. U tom prvom naletu definiran je genotip 44 pretpostavljena klona.
- Koristeći gore opisane metode naknadno je još 15 jedinki (prvobitno označenih crveno ili narančasto) pridruženo određenom klonu. Tad je za još 5 klonova određen genotip na temelju pretpostavke opisane u poglavlju materijal i metode (narančasto označene jedinke).
- Na te načine 130 jedinki je pretpostavljeno pravilno pripisano klonu.
- Od toga 10 jedinki pripisanih klonu nije na mjestu određenom nacrtom, točnije nalaze se na mjestima na kojima je zapisan drugi klon.
- Za tri klona (16, 23 i 29) nije se mogao ustanoviti genotip jer su sve tri ramete imale drugačiji genotip, a nije se moglo razlučiti koji je pravi jer nigdje u uzorku nije postojala jedinka istog genotipa.
- 26 jedinki nije se moglo pripisati niti jednom klonu. Od tih jedinki, 9 narančasto označenih jedinki imaju šansu pripadati jednom od tri klona za koje nije ustanovljen genotip (16, 23, 29), ali bez uzorkovanja dodatnih rameta ta tri klona, nije moguće ustanoviti koja od njih, ako ikoja, pripada klonu.
- Preostalih 17 jedinki najvjerojatnije ne pripadaju niti jednom klonu i pretpostavlja se da su to zapravo neuspjeli cijepovi, tj. da je plemka u nekom trenutku rasta cijepa odumrla i da genotip pripada podlozi (obična sadnica iz rasadničkog uzgoja).
- Poretkom genotipova svih klonova ustanovljeno je da su genotipovi sljedećih klonova zapravo identični:
 - KLON 2 i KLON 4
 - KLON 5 i KLON 6
 - KLON 17 i KLON 18
 - KLON 32 i KLON 33
 - KLONOVI 41, 43 i 44
 - KLON 49 i KLON 52

što znači da klonska sjemenska plantaža zapravo sadrži 44 umjesto 52 klona kako je službeno zavedeno u programu gospodarenja. U Tablici 3 su identičnim klonovima dodijeljene oznake klona prvog po poretku (npr. identični genotipovi za klon 2 i klon 4 sada su oba označena sa brojem 2, 5 i 6 sa 5 itd.)

Tablica 3. Popis uzorkovanih rameta sa položajem u plantaži i novoodređenim klonom nakon genotipizacije. Promjene su registrirane žutom bojom i naveden je klon za kojeg se smatra da se odnosi na tu rametu. Crvena boja s upitnikom označava ramete koje ne pripadaju klonovima, a bile su uparene s dvije ramete koje pripadaju, narančasta s upitnikom također ne pripada klonu, a bila je uparene sa dvije ramete različite od nje i međusobno, zelena s upitnikom bi mogla pripadati klonu, ali su potrebna dodatna uzorkovanja da bi se to dokazalo.

Klon	Red (nacrt)	U redu (nacrt)	Oznaka uzorka	Oznaka DNA uzorka	Klon nakon genotipizacije
1	6	11	1/1	1	1
1	5	7	1/2	2	1
1	8	4	1/3	3	1
2	10	5	2/1	4	2
2	5	4	2/2	5	2
2	16	1	2/3	6	2
3	7	14	3/1	7	3
3	7	2	3/2	8	3
3	12	1	3/3	9	3
4	6	14	4/1	10	2
4	9	5	4/2	11	2
4	5	2	4/3	12	2
5	5	12	5/1	13	5
5	21	2	5/2	14	?
5	9	15	5/3	15	5
6	9	11	6/1	16	5
6	11	4	6/2	17	5
6	21	10	6/3	18	5
7	8	14	7/1	19	7
7	5	7	7/2	20	?
7	18	1	7/3	21	7
8	1	15	8/1	22	8
8	5	9	8/2	23	8
8	12	6	8/3	24	8

9	10	10	9/1	25	9
9	13	7	9/2	26	9
9	2	6	9/3	27	20?
10	8	11	10/1	28	10
10	11	7	10/2	29	10
10	5	6	10/3	30	10
11	6	16	11/1	31	?
11	11	6	11/2	32	11
11	6	5	11/3	33	11
12	8	2	12/1	34	?
12	28	11	12/2	35	12?
12	15	32	12/3	36	13?
13	3	7	13/1	37	12?
13	4	4	13/2	38	13
13	25	16	13/3	39	13
14	5	10	14/1	40	14
14	11	9	14/2	41	14
14	4	6	14/3	42	14
15	5	14	15/1	43	15
15	1	6	15/2	44	15
15	13	2	15/3	45	15
16	2	17	16/1	46	?
16	4	8	16/2	47	?
16	12	2	16/3	48	15
17	7	18	17/1	49	17
17	12	12	17/2	50	17
17	11	5	17/3	51	17
18	8	10	18/1	52	17
18	6	10	18/2	53	17
18	10	1	18/3	54	17
19	14	10	19/1	55	19
19	1	9	19/2	56	19
19	24	6	19/3	57	19
20	11	17	20/1	58	20?
20	11	12	20/2	59	?
20	27	9	20/3	60	?
21	7	12	21/1	61	21
21	4	3	21/2	62	21
21	23	2	21/3	63	21
22	9	8	22/1	64	22
22	2	5	22/2	65	22
22	9	1	22/3	66	22

23	6	9	23/1	67	15
23	7	3	23/2	68	?
23	14	1	23/3	69	?
24	1	4	24/1	70	24
24	14	3	24/2	71	?
24	8	15	24/3	72	24
25	7	7	25/1	73	25
25	13	1	25/2	74	25
25	25	4	25/3	75	25
26	8	13	26/1	76	26
26	6	3	26/2	77	26
26	13	3	26/3	78	26
27	2	14	27/1	79	?
27	3	1	27/2	80	?
27	16	7	27/3	81	27?
28	3	11	28/1	82	28
28	4	5	28/2	83	28
28	9	2	28/3	84	28
29	10	7	29/1	85	?
29	1	2	29/2	86	?
29	17	4	29/3	87	?
30	9	9	30/1	88	30
30	11	2	30/2	89	?
30	7	1	30/3	90	30
31	2	12	31/1	91	31
31	1	8	31/2	92	?
31	8	1	31/3	93	31
32	12	7	32/1	94	32
32	7	5	32/2	95	32
32	26	7	32/3	96	?
33	5	11	33/1	97	32
33	8	7	33/2	98	?
33	2	4	33/3	99	32
34	8	12	34/1	100	34
34	10	4	34/2	101	34
34	1	3	34/3	102	34
35	11	13	35/1	103	?
35	15	1	35/2	104	35
35	16	4	35/3	105	35
36	5	16	36/1	106	36
36	4	13	36/2	107	36
36	9	3	36/3	108	36

37	3	8	37/1	109	37
37	6	7	37/2	110	37
37	9	4	37/3	111	37
38	5	13	38/1	112	38
38	6	2	38/2	113	38
38	7	15	38/3	114	38
39	12	14	39/1	115	39
39	14	2	39/2	116	39
39	19	12	39/3	117	39
40	8	8	40/1	118	40
40	5	5	40/2	119	40
40	12	3	40/3	120	40
41	22	5	41/1	121	41
41	8	25	41/2	122	?
41	1	25	41/3	123	41
42	8	16	42/1	124	42
42	3	6	42/2	125	42
42	20	3	42/3	126	42
43	21	1	43/1	127	41
43	24	20	43/2	128	?
43	10	21	43/3	129	41
44	27	1	44/1	130	?
44	28	10	44/2	131	41
44	13	31	44/3	132	41
45	3	14	45/1	133	51
45	1	10	45/2	134	?
45	6	4	45/3	135	45?
46	14	4	46/1	136	46
46	2	3	46/2	137	46
46	5	15	46/3	138	46
47	9	18	47/1	139	47
47	7	9	47/2	140	?
47	6	6	47/3	141	47
48	9	13	48/1	142	46
48	23	1	48/2	143	46
48	17	7	48/3	144	11
49	7	11	49/1	145	49
49	11	8	49/2	146	49
49	1	5	49/3	147	49
50	11	10	50/1	148	50
50	8	5	50/2	149	50
50	8	3	50/3	150	50

51	26	6	51/1	151	?
51	22	12	51/2	152	51?
51	18	17	51/3	153	27
52	13	5	52/1	154	49
52	3	4	52/2	155	?
52	5	1	52/3	156	49

4.2. Genetska raznolikost klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži

4.2.1. Raznolikost mikrosatelitskih biljega

U Tablici 4 prikazani su parametri raznolikosti za 14 mikrosatelitskih biljega.

Kod 13 od 14 biljega informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) je iznad 0,7 i predstavlja visoko informativne biljege. Isključivo je kod biljega *ssrQrZAG112* nizak (0,218), te taj biljeg spada u nisko informativne biljege u ovom istraživanju. Očekivana heterozigotnost (H_E) je visoka kod gotovo svih biljega i kreće se od 0,739 (*ssrQrZAG30*) do 0,925 (*ssrQrZAG96*). Jedino je niska kod biljega *ssrQrZAG112* i iznosi 0,282. Kod biljega sa najnižim vrijednostima za H_E (*ssrQrZAG112*, *MSQ13*, *ssrQrZAG30*) najčešće je i najveći koeficijent inbridinga F_{IS} , osim u slučaju *ssrQpZAG16* koji ima F_{IS} 0,238, koji je drugi po redu. Ostali markeri imaju F_{IS} ispod 0,1. Kod 6 biljega postoji lagani višak heterozigota, te je F_{IS} poprimio negativne vrijednosti. Skoro za sve biljege vidljivo je da je efektivni broj alela znatno manji od ukupnog, što znači da ima puno alela koji imaju nisku učestalost, a znatno manji broj onih koji su najčešće prisutni kod genotipova klonova.

Tablica 4. Parametri raznolikosti za 14 mikrosatelitskih biljega. N_a – broj alela, N_e – efektivni broj alela. PIC – informacijski sadržaj polimorfizma (zeleno označene vrijednosti $> 0,7$ – visoko informativni biljezi), I – Shannonov informacijski indeks, H_o – ostvarena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent inbridinga (fiksacijski indeks)

Naziv biljega	Raspon alela	N_a	N_e	PIC	I	H_o	H_E	F_{IS}
<i>ssrQrZAG96</i>	138-190	21	13,33	0,925	2,771	0,975	0,925	-0,054
<i>ssrQrZAG7</i>	115-155	18	12,96	0,922	2,689	0,850	0,923	0,079
<i>ssrQrZAG87</i>	109-135	12	8,82	0,887	2,297	0,878	0,887	0,010
<i>ssrQrZAG112</i>	84-98	4	1,39	0,218	0,593	0,171	0,282	0,394
<i>ssrQrZAG11</i>	243-281	12	4,93	0,797	1,910	0,846	0,797	-0,061
<i>ssrQrZAG101</i>	125-177	20	10,70	0,906	2,610	0,950	0,907	-0,048

ssrQrZAG30	166-229	22	3,83	0,739	2,096	0,634	0,739	0,142
ssrQpZAG9	183-209	12	8,58	0,883	2,298	0,900	0,883	-0,019
ssrQpZAG110	199-237	17	8,80	0,886	2,464	0,780	0,886	0,119
ssrQpZAG1/5	131-185	13	7,48	0,866	2,211	0,900	0,866	-0,039
ssrQpZAG15	107-151	13	4,82	0,792	1,908	0,854	0,793	-0,077
ssrQpZAG16	143-171	13	7,36	0,864	2,197	0,659	0,864	0,238
ssrQpZAG104	165-229	24	13,45	0,925	2,838	0,878	0,926	0,051
MSQ13	190-228	9	4,18	0,761	1,702	0,650	0,761	0,146

4.2.2. Raznolikost genotipova klonova u plantaži

U Tablici 5 prikazani su parametri raznolikosti u klonskoj sjemenskoj plantaži, prosječno po svim lokusima (biljezima). Genetska raznolikost prosječno za sve biljege iznosi 0,817 (H_E). Ostvarena heterozigotnost iznosi 0,780, a prosječni F_{IS} je nizak i iznosi 0,063.

Tablica 5. Parametri raznolikosti za plantažu, prosječno za sve biljege. N_a – broj alela, N_e – efektivni broj alela. I - Shannonov informacijski indeks, H_O – ostvarena heterozigotnost, H_E - očekivana heterozigotnost, F_{IS} - koeficijent inbridinga (fiksacijski indeks)

Populacija		N_a	N_e	I	H_O	H_E	F_{IS}
plantaža	ukupno	15	7,903	2,185	0,780	0,817	0,063

5. RASPRAVA

Klonske sjemenske plantaže imaju dva glavna cilja – proizvodnju genetski poboljšanog materijala i očuvanje genetske raznolikosti ciljnih vrsta u kontroliranim uvjetima (*Ex-situ*). Oplemenjivanje se postiže odabirom fenotipski najkvalitetnijih jedinki za određena svojstva, njihovim vegetativnim razmnožavanjem (kod šumskog drveća koje se teško autovegetativno razmnožava najčešće cijepljenjem) i njihovim križanjem kako bi se proizvelo potomstvo s poboljšanim genetskim svojstvima. Ako se u plantažama uzgaja reprodukcijски materijal za uvođenje u prirodna staništa, a ne samo za brzu proizvodnju drvne mase, ključno je očuvati genetsku raznolikost početnog materijala. Plantaža bi trebala imati dovoljno široku genetsku bazu kako bi potomstvo imalo sposobnost prilagodbe promjenama u okolišu i otpornosti na štetnike.

Ključno je da vegetativne kopije (ramete klona) odabranih jedinki budu pravilno uključene u plantažu kako bi se moglo garantirati porijeklo reprodukcijskog materijala, bilo da se koristi u šumarstvu ili za daljnje oplemenjivanje (primjerice, kroz klonske testove ili testove potomstva). Tijekom osnivanja i popunjavanja plantaža mogu se javiti pogreške. Na primjer, prilikom prikupljanja plemki s plus stabala (orteta) može doći do pogrešnog označavanja. Slično, pri cijepljenju u rasadniku ili kasnijoj uporabi cijepljenog materijala može doći do odumiranja plemke, dok podloga nastavlja rasti, što može biti pogrešno protumačeno kao uspješan razvoj. Greške se mogu dogoditi i u transportu i sadnji biljaka, te kasnije, ako podloga preuzme rast a plemka odumre, a biljke su već posađene na terenu i gotovo je nemoguće primjetiti razliku, s obzirom da biljka nastavlja s rastom.

Ako plantaže nisu prevelike, preporučuje se genetska identifikacija (genotipizacija) biljaka kako bi se otkrile moguće greške u označavanju, koje mogu dovesti do nepravilnosti u rasporedu biljaka. To je važno jer se plemke za dopunu plantaža često prikupljaju iz same plantaže, a ne s izvornog stabla. Prikupljanje plemki s pogrešnih stabala može širiti greške i, u slučaju genetskog testiranja, dati nepouzdanе rezultate.

Klonska sjemenska plantaža hrasta kitnjaka „Novoselci“ trenutno sadrži cca 1000 cijepova, što je vrlo velik uzorak za genotipizaciju, te se stoga pristupilo sakupljanju uzorka, sa po tri navodna predstavnika svakog klona. Cilj je bio utvrditi genotipove svih klonova i na uzorku ustanoviti ima li grešaka u postojećem nacrtu.

Ustanovljeno je da je 115 od 155 jedinki nedvosmisleno pripadaju klonu po nacrtu sadnje, a još 15 je pripisano određenom klonu na temelju pretpostavki opisanih u poglavlju materijal i metode. Svakako je minimalno 31 jedinka (isključivši one koje eventualno još imaju šanse biti pripisane nekom klonu nakon dodatnog uzorkovanja rameta klonova 16, 23, 29) krivo označena i ne pripada klonu kao na nacrtu, što u uzorku predstavlja 20% krivo označenih jedinki. Od toga se 14 jedinki nalazi na krivom mjestu, ali bi ih se moglo pripisati nekom klonu. Ostalih 17 su po svemu sudeći odbacili plemku i nastavili rast iz podloge. U prethodnoj genotipizaciji cijele plantaže crnog bora na Krku (Stipetić 2023) čak je 27% jedinki u cijeloj plantaži bilo krivo označeno na nacrtu, od čega su samo 3 jedinke pripadale nekom drugom klonu, a ostale su također predstavljale genotipove podloga koje su odbacile plemku. To ukazuje na veliki potencijalni problem, ukoliko se daljnje plemke uzimaju sa takvih stabala i time se greška širi po plantaži ili naknadno po genetičkim testovima. Preporuča se daljnje plemke uzimati isključivo sa stabala čiji je genotip potvrđen molekularnim analizama tj. genetskom identifikacijom, u slučaju da je takva analiza provedena u plantaži.

Genotipizacija je također pokazala da neki klonovi dijele isti genotip, što je vjerojatno posljedica greške u nekoj od faza od izvornog stabla do plantaže. Moguće je da je u ranoj fazi sakupljanja plemki došlo do pogrešnog obilježavanja te su plemke istog klona zabunom obilježene različitim brojevima. Ili se slična pogreška dogodila u rasadničkoj proizvodnji cijepova. Moguće je uzorkovati dodatne ramete duplih klonova kako bi se ustanovilo postoje li ipak zasebni genotipovi. Svakako uzorkovane jedinke iz ovog istraživanja treba obilježiti zajedničkim brojem klona u nacrtu. U ovom slučaju obilježeni su brojem klona prvim po redu.

Genetska raznolikost (očekivana heterozigotnost H_E) klonova u plantaži iznosila je 0,817, što je potpuno u skladu sa dosadašnjim istraživanjima prirodnih populacija hrasta kitnjaka (Steinkellner i dr. 1997 a, b, Streiff i dr. 1998, Neophytou i dr. 2010, Crăciunesc i dr. 2017, Dostálek i dr. 2011, Popović i dr. 2022) i predstavlja zadovoljavajuću raznolikost roditeljske populacije, pogotovo uzevši u obzir da je u naše multiplekse biljega uključen i biljeg *ssrQrZAG112*, koji ima vrlo niske vrijednosti genetske raznolikosti, pa je smanjio prosjek heterozigotnosti za ostale biljege.

Upravo biljeg *ssrQrZAG112* na razini populacija, zajedno sa biljegom *ssrQrZAG96* predstavlja svojevrsni dijagnostički biljeg za razlikovanje populacija hrasta kitnjaka i lužnjaka. Naime, karakteristično je za pšopulacije hrasta kitnjaka da za biljeg *ssrQrZAG112* imaju vrlo malen, a za *ssrQrZAG96* vrlo visok broj alela, a time sukladno i očekivanu heterozigotnost. Kao što

vidimo u slučaju plantaže hrasta kitnjaka, H_E za *ssrQrZAG112* iznosi 0,282 i PIC 0.218, a za *ssrQrZAG96* i H_E i PIC 0,925, što odgovara vrijednostima za kitnjak i ukazuje da selekcionirani klonovi dolaze sa tipičnih staništa kitnjaka i vjerojatno ne uključuju hibride sa lužnjakom. Za usporedbu Neophytou i dr. (2010) su za *ssrQrZAG112* za Grčke populacije kitnjaka dobili H_E 0,173, za bugarske 0,192, a za njemačke 0,366, što je malo viša vrijednost koja ukazuje na moguću djelomičnu hibridizaciju s lužnjakom. Popović i dr. (2023) su pak sa istim biljezima za populacije hrasta lužnjaka u Hrvatskoj dobili vrijednosti PIC za *ssrQrZAG112* 0,876, a za *ssrQrZAG96* 0,418, što potvrđuje dosadašnja opažanja za ta dva biljega i na hrvatskim populacijama lužnjaka i plantaži kitnjaka. Možemo zaključiti da klonovi u plantaži hrasta kitnjaka predstavljaju zadovoljavajuću bazu genetske raznolikosti za proizvodnju potopmstva, koja se može dodatno proširiti selekcioniranjem i uključivanjem novih klonova. Jedinke koje su zapravo izrasle podloge i ne spadaju u nijedan klon trebalo bi isključiti iz plantaže zbog nepoznavanja njihove fenotipske kvalitete. Ukoliko ih se odlučiti ostaviti u plantaži, potencijalno će doprinijeti genetskoj raznolikosti, ali mogu negativno djelovati na očekivanu genetsku dobit. Svakako s njih ne treba uzimati plemke i dalje ih umnožavati.

Klonska sjemenska plantaža kitnjaka, uz ostale klonske sjemenske plantaže u Hrvatskoj predstavlja vrijedan doprinos očuvanju genofonda najvažnijih vrsta u Hrvatskoj i potencijalnoj proizvodnji većih količina reprodukcijaskog materijala u visokim kategorijama „kvalificiran“ i, u slučaju osnivanja genetičkih testova, „testiran“.

6. ZAKLJUČCI

- Genetskom identifikacijom uzorkovanih jedinki 130 jedinki je pretpostavljeno pravilno pripisano klonu.
- Od toga 10 jedinki pripisanih klonu nije na mjestu određenom nacrtom, točnije nalaze se na mjestima na kojima je zapisan drugi klon.
- Za tri klona (16, 23 i 29) nije se mogao ustanoviti genotip jer su sve tri ramete imale drugačiji genotip, a nije se moglo razlučiti koji je pravi jer nigdje u uzorku nije postojala jedinka istog genotipa.
- 26 jedinki nije se moglo pripisati niti jednom klonu. Od tih jedinki, 9 narančasto označenih jedinki imaju šansu pripadati jednom od tri klona za koje nije ustanovljen genotip (16, 23, 29), ali bez uzorkovanja dodatnih rameta ta tri klona, nije moguće ustanoviti koja od njih, ako ikoja, pripada klonu.
- Preostalih 17 jedinki najvjerojatnije ne pripadaju niti jednom klonu i pretpostavlja se da su to zapravo neuspjeli cijepovi, tj. da je plemka u nekom trenutku rasta cijepa odumrla i da genotip pripada podlozi (obična sadnica iz rasadničkog uzgoja).
- Poretkom genotipova svih klonova ustanovljeno je da su genotipovi sljedećih klonova zapravo identični:
 - KLON 2 i KLON 4
 - KLON 5 i KLON 6
 - KLON 17 i KLON 18
 - KLON 32 i KLON 33
 - KLONOVI 41, 43 i 44
 - KLON 49 i KLON 52

što znači da klonska sjemenska plantaža zapravo sadrži 44 umjesto 52 klona kako je službeno zavedeno u programu gospodarenja.

- Genetska raznolikost (očekivana heterozigotnost H_E) klonova u plantaži iznosila je 0,817, što je potpuno u skladu sa dosadašnjim istraživanjima prirodnih populacija hrasta kitnjaka
- Klonovi u plantaži hrasta kitnjaka predstavljaju zadovoljavajuću bazu genetske raznolikosti za proizvodnju potomstva, koja se može dodatno proširiti selekcioniranjem i uključivanjem novih klonova.

- Jedinke koje su zapravo izrasle podloge i ne spadaju u nijedan klon trebalo bi isključiti iz plantaže zbog nepoznavanja njihove fenotipske kvalitete. Ukoliko ih se odlučiti ostaviti u plantaži, potencijalno će doprinijeti genetskoj raznolikosti, ali mogu negativno djelovati na očekivanu genetsku dobit. Svakako s njih ne treba uzimati plemke i dalje ih umnožavati.
- Klonska sjemenska plantaža kitnjaka, uz ostale klonske sjemenske plantaže u Hrvatskoj predstavlja vrijedan doprinos očuvanju genofonda najvažnijih vrsta u Hrvatskoj i potencijalnoj proizvodnji većih količina reprodukcijanskog materijala u visokim kategorijama „kvalificiran“ i, u slučaju osnivanja genetičkih testova, „testiran“.

7. LITERATURA

1. Ambriović Ristov, A. (gl. ur.), A. Brozović, B. Bruvo Madarić, H. Četković, M. Herak Bosnar, D. Hranilović, S. Katušić Hećimović, N. Meštrović Radan, S. Mihaljević, N. Slade, D. Vujaklija (ur.), (2007): metode u molekularnoj biologiji, priručnik, institut Ruđer Bošković, Zagreb.
2. Blanc-Jolivet, C., & Liesebach, M. (2015). Tracing the origin and species identity of *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: a review. *Silvae Genetica*, 64(1-6), 182-193.
3. Crăciunescu, I., Curtu, A. L., & Sofletea, N. (2016). Genetic Diversity and Differentiation Among Four “*Quercus robur*” and “*Q. petraea*” Natural Populations in Romania. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series II: Forestry • Wood Industry Agricultural Food Engineering*, 7-16.
4. Dostálek, J., Frantík, T., & Lukášová, M. (2011). Genetic differences within natural and planted stands of *Quercus petraea*. *Open Life Sciences*, 6(4), 597-605.
5. Dow, B.D., M.V. Ashley, (1996). Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Mol. Ecol.*, 5: 615-627.
6. Franjić, J., (1996): Multivarijatna analiza posavskih i podravskih populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L., Fagaceae) u Hrvatskoj. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu-Šumarski fakultet (F: 185 str.)
7. Franjić, J., Škvorc, Ž., (2010): Šumsko drveće i grmlje Hrvatske Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 292 str.
8. Idžojić, M., (2013): Dendrologija – cvijet, češer, plod, sjeme. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 478 str.
9. Jurkšienė, G., Baranov, O. Y., Kagan, D. I., Kovalevič-Razumova, O. A., & Baliuckas, V. (2020). Genetic diversity and differentiation of pedunculate (*Quercus robur*) and sessile (*Q. petraea*) oaks. *Journal of Forestry Research*, 31(6), 2445-2452.

10. Kampfer, S., C. Lexer, J. Glossl, H. Steinkellner, 1998: Characterization of (GA) Microsatellite Loci From *Quercus Robur*. *Hereditas*, 129: 183-186.

11. Matić, S. i dr., (1996): Sjeme hrasta lužnjaka kao temeljni uvjet nastanka i opstanka lužnjakovih šuma. U: D. Klepac (ur.), *Hrast lužnjak (Quercus robur L.) u Hrvatskoj, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Centar za znanstveni rad u Vinkovcima i Hrvatske šume, p.o. Zagreb, 145-157. Zagreb Vinkovci.*

12. Neophytou, C., Aravanopoulos, F. A., Fink, S., & Dounavi, A. (2010). Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*, 259(10), 2026-2035.

13. Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

14. Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

15. Popović, V., Daničić, V., Milovanović, J., Lučić, A., Rakonjac, L., Mladenović-Drinić, S., & Ristić, D. (2022). Genetic structure of Sessil oak (*Quercus petraea* (matt.) liebl) from the area of outstanding natural beauty “Avala “. *Genetika*, 54(2), 841-856.

16. Popović, M., Katičić Bogdan, I., Varga, F., Šatović, Z., Bogdan, S., & Ivanković, M. (2023). Genetic diversity in peripheral pedunculate oak (*Quercus robur* L.) provenances—Potential climate change mitigators in the center of distribution despite challenges in natural populations. *Forests*, 14(12), 2290.

17. Steinkellner*, H., Fluch, S., Turetschek, E., Lexer, C., Streiff, R., Kremer, A., ... & Glössl, J. (1997a). Identification and characterization of (GA/CT) n-microsatellite loci

from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 33, 1093-1096.

18. Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., & Glössl, J. (1997b). Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6(12), 1189-1194.
19. Streiff, R., Labbe, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., & Kremer, A. (1998). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*, 7(3), 317-328.
20. Temunović, M., Garnier-Géré, P., Morić, M., Franjić, J., Ivanković, M., Bogdan, S., & Hampe, A. (2020). Candidate gene SNP variation in floodplain populations of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) near the species' southern range margin: Weak differentiation yet distinct associations with water availability. *Molecular ecology*, 29(13), 2359-2378.
21. Yücedağ, C., & Gailing, O. (2013). Morphological and genetic variation within and among four *Quercus petraea* and *Q. robur* natural populations. *Turkish Journal of Botany*, 37(4), 619-629.