

Kvantitativna genetska diferencijacija populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u pokusnom nasadu »Jastrebarski lugovi«

Maja Morić, Saša Bogdan, Mladen Ivanković

Nacrtak – Abstract

Hrast lužnjak, kao jedna od triju najrasprostranjenijih vrsta drveća u Republici Hrvatskoj, ima važnu ulogu u ekonomsko-socijalnom i ekološkom smislu. Poznavanje genetske strukture tako značajne vrste šumskoga drveća temeljni je preduvjet njezina očuvanja za budućnost. Jer to, poznavanje genetske strukture, omogućuje naprednije korištenje šumskoga reprodukcijskoga materijala hrasta lužnjaka radi povećanja prilagodljivosti populacija na stresne okolišne prilike. Analiza kvantitativnih (poligenih, metričkih) fenotipskih svojstava u genetičkim testovima jedna je od metoda utvrđivanja genetske strukture vrsta šumskoga drveća. Iz šesnaest sjemenskih i jedne gospodarske sastojine koje reprezentiraju cjelokupan areal hrasta lužnjaka u Hrvatskoj, u rujnu i listopadu 2006. godine skupljen je sjemenski materijal. S dvogodišnjim potomstvom 2008. godine osnovan je genetički pokusni nasad u gospodarskoj jedinici »Jastrebarski lugovi«. Mjeren je visinski rast i određivani su preživljavanje i visinski prirast u trima uzastopnim godinama (2010, 2011. i 2012). Analiza varijance provedena je procedurom PROC MIXED u statističkom paketu SAS te su izračunate komponente varijance i statistička značajnost slučajnih efekata, tj. izvora varijabilnosti (blokovi, populacije, familije unutar populacija, interakcija blokova i populacija te interakcija blokova s familijama unutar populacija). Izračunate komponente varijance poslužile su za izračunavanje parametra Q_{ST} kojim se određuje razina međupopulacijske genetske diferencijacije. Multivarijantna regresijska stabilna analiza (engl. MRT) korištena je za određivanje obrasca genetske diferencijacije populacija u nasadu, a s obzirom na okolišne (klimatske) varijable njihovih izvornih matičnih sastojina. Parametar Q_{ST} bio je visok kod sva tri analizirana svojstva, što jasno upućuje na međupopulacijsku genetsku diferencijaciju hrvatskih populacija hrasta lužnjaka. Utvrđeni obrazac adaptivne genetske diferencijacije potvrđuje ekotipski obrazac, odnosno najvjerojatnije je prirodna selekcija u matičnim sastojinama (ponajprije s obzirom na vlažnost i toplinu staništa) uzrokovala genetsku izdiferenciranost lokalnih populacija.

Ključne riječi: genetska struktura, kvantitativna fenotipska svojstva, genetički test, ekotipska varijabilnost, prirodna selekcija

1. Uvod – Introduction

Hrast lužnjak, kao jedna od triju najrasprostranjenijih vrsta drveća u Hrvatskoj, od pamtivijeka je imao važnu ulogu i u ekonomsko-socijalnom i u ekološkom smislu. Procjenjuje se kako je ekološki učinak šuma hrasta lužnjaka nekoliko puta veći od gospodarskoga, ponajprije u antirozzijskom i hidrološkom smislu. U svojem staništu hrast lužnjak održava ravnotežu vodnoga statura procesom transpiracije te tako sprječava zamočvarenje terena i povoljno djeluje na vodni sustav u tlu (Klepac 1996).

Genetska je raznolikost, kao dio ukupne biološke raznolikosti, bogatstvo različitih alela unutar jedinki, populacija odnosno vrsta. Bolju prilagodbu jedinki populacija, odnosno vrsta u promjenjivom okolišu i sposobnost njihova prilagođavanja, omogućuje viša razina genetske raznolikosti. Genetska je varijabilnost dakle temelj evolucijskoga razvoja. Gubitak genetske varijabilnosti značio bi smanjenje dugoročne prilagodljivosti populacija odnosno vrsta. Važan dio genetskoga bogatstva neke vrste čini genetska diferencijacija populacija odnosno postojeće genetskih razlika među populacijama iste vrste.

Jedna od metoda utvrđivanja genetske raznolikosti vrsta šumskoga drveća može se provesti analizom kvantitativnih (poligenih, metričkih) fenotipskih svojstava u genetičkim testovima (Falconer i Mackay 1996, Eriksson i dr. 2006, White i dr. 2007, Bogdan i Katičić Bogdan 2015). Poznavanje razine, obrasca i uzroka genetske raznolikosti neke vrste nužna je informacija za pravilno uzgajanje, obnovu sastojina, prometovanje šumskim reprodukcijskim materijalom, oplemenjivanje, izradu programa očuvanja genetske raznolikosti ili pak za taksonomska evolucijska ili ekološka istraživanja vrste.

Genetički su testovi posebno dizajnirani nasadi koji se osnivaju u relativno homogenim okolišnim uvjetima radi analize varijabilnosti kvantitativnih fenotipskih svojstava biljaka. Fenotipska varijabilnost uvjetovana je genetskom i okolišnom komponentom. Ako potomstvo testiramo u približno jednakim uvjetima okoliša, odnosno utjecaj okolišne komponente svedemo na minimum, tada se varijabilnost praćenih fenotipskih svojstava može pripisati genetskim razlikama među potomstvima, odnosno među genetičkim čimbenicima koje testirana potomstva reprezentiraju (populacije, familije, klonovi) (Falconer i Mackay 1996, Eriksson i dr. 2006, White i dr. 2007, Bogdan i Katičić Bogdan 2015).

Izmjerama kvantitativnih fenotipskih svojstava u genetičkim testovima skupljaju se podaci koji se najčešće obrađuju statističkom metodom analize varijance radi utvrđivanja vrijednosti i statističke značajnosti različitih poznatih izvora varijabilnosti. Izračunate komponente varijance služe za izračunavanje kvantitativnih genetičkih parametara kojima se određuje razina unutarpopulacijske genetske raznolikosti i razina međupopulacijske genetske diferencijacije.

Prvi značajniji radovi na upoznavanju i očuvanju genetske raznolikosti hrasta lužnjaka u Hrvatskoj započeli su sredinom 1950-ih kategorizacijom šumskoga reprodukcijskoga materijala (ŠRM) i kategoriziranjem šuma te razdjelbom šuma na sjemenske jedinice (Šafar 1958). Nakon toga izabrane su najbolje sastojine na temelju fenotipskoga izgleda te je istraživana raznolikost svojstava populacija hrasta lužnjaka u pokusima provenijencija (Gračan 1996).

Prvi genetički test lokalnih hrvatskih provenijencija osnovan je 1988. godine (Gračan i dr. 1991). Posljednjih tridesetak godina istraživanja varijabilnosti morfoloških i fizioloških svojstava hrasta lužnjaka pokazuje kako postoji vrlo izražena varijabilnost spomenutih svojstava među lokalnim populacijama i unutar svake populacije, što upućuje i na genetsku diferencijaciju populacija (Gračan i dr. 1991, Gračan

1996, Krstinić 1996, Franjić i dr. 2000, Perić i dr. 2000, Škvorc i dr. 2018).

Prvi rezultati istraživanja genetske raznolikosti na temelju kvantitativnih fenotipskih svojstava u testu potomstva iz sjemenskih sastojina u Hrvatskoj upućuju na ekotipski obrazac genetskih razlika među populacijama, koji razumijeva diferencijaciju s obzirom na slične okolišne uvjete koji vladaju u pojedinim sastojinama (Bogdan i dr. 2004, Ivanković i dr. 2011, Popović i dr. 2014, Morić 2016, Bogdan i dr. 2017).

Cilj je ovoga rada odrediti obrazac genetske raznolikosti populacija hrasta lužnjaka u Hrvatskoj analizom visinskoga rasta i preživljavanja potomstva u genetičkom testu sa sedamnaest reprezentativnih populacija.

2. Materijal i metode – *Material and methods*

2.1 Uzorkovane populacije i genetički nasad *Sampled populations and genetic field trial*

Iz šesnaest sjemenskih i jedne gospodarske sastojine u rujnu i listopadu 2006. godine skupljen je sjemenski materijal s tla ispod krošanja 25 stabala koja su međusobno bila udaljena najmanje 50 m zbog izbjegavanja srodstvene povezanosti. Brojnošću i zemljopisnim položajem odabrane sastojine reprezentiraju cjelokupan areal hrasta lužnjaka u Hrvatskoj (tablica 1).

Prilikom uzgoja potomstva očuvalo se podrijetlo svake pojedine biljke s obzirom na majčinska stabla i populacije.

S dvogodišnjim sadnicama (2+0) tijekom studenoga i prosinca 2008. godine osnovan je pokusni nasad u gospodarskoj jedinici »Jastrebarski lugovi« (Šumarija Jastrebarsko, Uprava šuma podružnica Karlovac), odjel/odsjek 19b. Nasad se nalazi na 111 m n. v. i koordinatama 45,644° geografske širine i 15,699° geografske dužine. Prosječna je godišnja temperatura 11,9°C, a prosječna godišnja količina oborine 932 mm (Climate EU).

Na službenim stranicama DHMZ-a (izvor: http://klima.hr/ocjene_arhiva.php) dostupni su podaci o klimatskim prilikama za područje nasada »Jastrebarski lugovi« tijekom istraživanoga razdoblja od 2010. godine do 2012. Godina 2010. bila je topla godina s najviše oborine, 2011. godina ekstremno sušna, dok je 2012. bila ekstremno topla, ali i s relativno normalnom količinom oborine. Takve su vremenske prilike utjecale također i na rast i razvoj istraživanih populacija.

Tablica 1. Podaci o sastojinama u kojima je skupljen žir**Table 1** Information on sampled populations

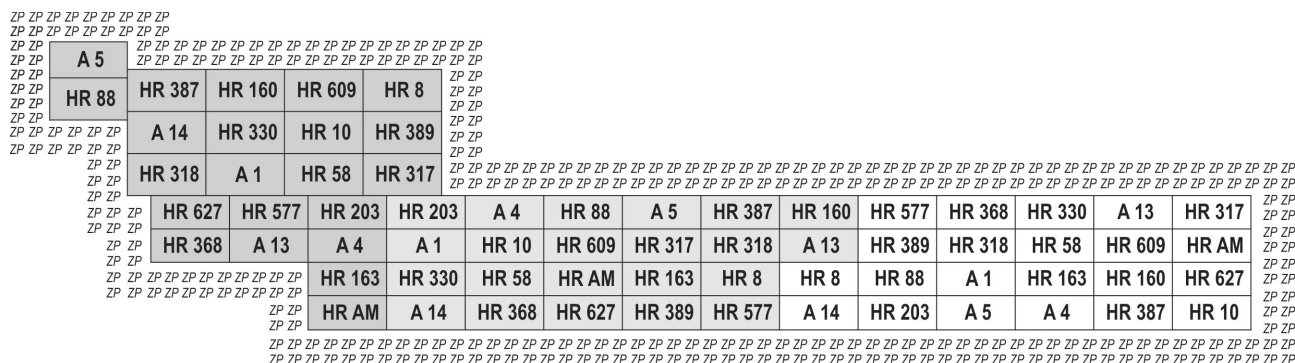
Broj Number	Oznaka populacije Population identification	Uprava šuma podružnica Forest Administration	Šumarija Forest Office	Geografska širina, ° Geographic latitude, °	Geografska dužina, ° Geographic length, °	Nadmorska visina, m Altitude, m	Prosječna godišnja temperatura zraka, °C Average annual air temperature, °C	Prosječna godišnja količina oborine, mm Average annual rainfall, mm
1	HR 12	Vinkovci	Gunja	44,916	18,833	85	12	770
2	HR 16	Vinkovci	Otok	45,033	18,9	81	12	746
3	HR 58	Osijek	Darda	45,733	18,583	90	11,8	675
4	HR 160	Nova Gradiška	Trnjani	45,133	18,116	86	11,5	785
5	HR 163	Nova Gradiška	Stara Gradiška	45,183	17,183	98	11,8	862
6	HR 203	Bjelovar	Vrbovec	45,833	16,666	105	11,3	784
7	HR 317	Zagreb	Kutina	45,433	16,683	95	11,5	851
8	HR 318	Zagreb	Lipovljani	45,433	16,816	96	11,6	861
9	HR 330	Zagreb	Velika Gorica	45,674	16,16	99	11,1	873
10	HR 368	Sisak	Sunja	45,266	16,716	97	11,6	902
11	HR 387	Karlovac	Karlovac	45,55	15,733	108	11,9	917
12	HR 389	Karlovac	Karlovac	45,483	15,7	114	11,9	980
13	HR 577	Požega	Požega	45,35	17,8	168	11,2	802
14	HR 609	Buzet	Buzet	45,347	13,817	22	14,9	941
15	HR 627	Koprivnica	Repaš	46,15	17,183	115	11,5	763
16	HR 88	Našice	Koška	45,566	18,233	95	11,7	719
17	HR AM*	Vinkovci	Otok	45,095	18,813	92	11,8	744

*Gospodarska sastojina – Management stand

Genetički nasad osnovan je sukladno dizajnu randomiziranoga potpunoga blok-sustava s tri ponavljanja, 20 familija (familiju čini potomstvo jednoga matičnoga stabla) po populaciji i 5 biljaka po familiji, odnosno ukupno 5100 mjernih biljaka u nasadu. Biljke su sađene u razmaku 2,0 m unutar redova i 2,5 m između redova. Oko mjernih biljaka zasađena su i dva reda tzv. zaštitnoga pojasa biljaka, s istim potomstvom iz uzorkovanih sjemenskih sastojina kao i mjerne biljke. Sve mjerne biljke, kao i biljke prvoga reda zaštitnoga pojasa zaštićene su neposredno nakon sadnje polipropilenskim štitnicima (tzv. Tuleyevim cijevima). Nasad zauzima površinu od gotovo 4 ha (slike 1 i 2).

2.2 Kvantitativna fenotipska svojstva i statistička obrada podataka – Quantitative phenotypic traits and statistical analysis

Izmjera visine u pokusnom nasadu u Jastrebarskom započela je u dobi biljaka od 4 godine nakon završetka vegetacijskoga razdoblja 2010. godine. Mjerene su sve biljke u pokusnom nasadu, uz pomoć mjernih letvi na 1 cm točnosti. Mjerenja su se provodila uzastopno tri godine, do dobi biljaka od 6 godina, zaključno s krajem 2012. godine. Iz evidencije visinskoga rasta odredilo se preživljavanje biljaka (0 – nema biljke/ osušena biljka, 1 – živa biljka), dok je iz razlika visinskoga rasta izračunat visinski pri-



Slika 1. Shema pokusnoga nasada u Jastrebarskom, obilježene provenijencije (populacije) i ponavljanja (različitim bojama), zp – zaštitni pojas biljaka

Fig. 1 Field trial scheme, repetitions marked with colours, zp – additional plants around filed trial



Slika 2. Genetički nasad »Jastrebarski lugovi«

Fig. 2 Genetic field trial »Jastrebarski lugovi«

rast između dviju uzastopnih godina (2010. i 2011. te 2011. i 2012).

Analiza varijance provedena je procedurom PROC MIXED u statističkom paketu SAS 9.3 (SAS/STAT® software, SAS Institute) zbirno za sve populacije (model ANOVA). Izračunate su komponente varijance i statistička značajnost slučajnih efekata, tj. izvora varijabilnosti. Analizirani izvori varijabilnosti bili su: blokovi, populacije, familije unutar populacija, interakcija blokova i populacija te interakcija blokova s familijama unutar populacija.

Analiza je varijance provedena prema ovomu linearnom modelu (model ANOVA):

$$y_{ijkl} = \mu + B_i + P_k + F(P)_{jk} + BP_{ik} + BF_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \quad (1)$$

gdje su:

- y_{ijkl} individualna vrijednost svojstva
- μ ukupna sredina svih izmjera za promatrano svojstvo

- B_i slučajni efekt bloka i ($i = 1,2,3$)
- P_k slučajni efekt populacije k ($k = 1,2,3...17$)
- $F(P)_{jk}$ slučajni efekt familije j unutar populacije k ($j = 1,2,...20$)
- BP_{ik} slučajni efekt interakcije populacija s blokovima
- BF_{ijk} slučajni efekt interakcije familija s blokovima
- ϵ_{ijk} ostatak ili eksperimentalna greška.

Komponente varijance korištene su za izračunavanje kvantitativnoga genetičkoga parametra kojim je određena razina međupopulacijske genetske diferencijacije (Lande 1992, u: Jensen i Hansen 2008, Eriksson i dr. 2006).

Parametar kvantitativne genetske diferencijacije (Q_{ST}) određuje se kao omjer varijance između populacija i aditivne genetičke varijance (varijabilnosti familija unutar populacija) sukladno formuli (Houle 1992):

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_p^2 + (2V_A)} \quad (2)$$

gdje je:

- σ_p^2 komponenta varijance uzrokovana efektom populacija (model ANOVA)
- σ_A aditivna genetska varijanca (model 1 ANOVA), ($\sigma_A = 3 \sigma_f^2$).

Multivarijantna regresijska stabalna analiza (engl. MRT – *Multivariate Regression Tree analysis*) korištena je prilikom određivanja obrasca genetske diferencijacije. To je relativno nova statistička metoda u kojoj se populacije, odnosno genetski čimbenici

svrstavaju u grupe (klastere) za istraživanja kvantitativna svojstva potomstva, a u ovom slučaju ovisno o okolišnim varijablama matičnih izvornih sastojina. Kao prediktorske varijable korištene su klimatske varijable matičnih sastojina iz kojih potječe istraživano potomstvo, a izračunate su na temelju klimatskih podataka za referentno razdoblje od 1981. do 2009. godine koristeći se programskim paketom ver. 4.63 Climate EU (Hamann i dr. 2013, Climate EU, još neobjavljeni programski paket dostupan na <http://www.ualberta.ca/~ahamann/data/climateeu.html>).

MRT analiza provedena je pomoću R statističkoga paketa ver. 3.0.3. (R Development Core Team 2014) uporabom MVpart procedure.

Programski paket (Climate EU) koristi izmjerenje mjesečne klimatske podatke u referentnom razdoblju određenoga područja na temelju geografske širine i dužine te nadmorske visine za izračunavanje i procjenu sezonskih i godišnjih klimatskih varijabli

(Daly i dr. 2002, Mitchell i Jones 2005). Na temelju osnovnih mjesečnih klimatskih varijabli temperature i oborine program neke varijable izračunava izravno iz mjesečnih podataka, dok se ostale varijable određuju pomoću jednadžbi. Mjesečne varijable koriste se i za procjenu klimatskih varijabli koje se obično dobivaju iz dnevnih podataka, a biološki su važne. To su procjene zbroja toplinskih jedinica, broj dana bez mraza ili razdoblje bez mraza, te klimatska varijabla evaporacije nazvana Hargreavesova referentna evaporacija (engl. *Hargreaves reference evaporation – Eref*) koja se računa na temelju temperature i geografske širine. Više vrijednosti Hargreavesove evaporacije staništa upućuju na višu temperaturu i južnije geografske pozicije matičnih staništa. Detaljan opis i izračun klimatskih varijabli daju Wang i dr. (2012) te Wang i Hamann (2012).

Obrazac genetske diferencijacije utvrđivao se na temelju izračunatih klimatskih varijabli matičnih sastojina istraživanih populacija i standardiziranih ari-

Tablica 2. Ukupna srednja vrijednost svojstva, postoci komponenata varijance i parametar kvantitativne genetske diferencijacije (Q_{ST}) za svojstva visinski rast, preživljavanje i visinski prirast u pokusnom nasadu u Jastrebarskom u dobi od 4 do 6 godina

Table 2 Total mean value, percentages of variance components and parametar of quantitative genetic differentiation (Q_{ST}) for height growth, survival and height increment in genetic field trial Jastrebarsko at age 4 to 6

Svojstvo Feature	Sredina Middle	Komponente varijance, % – Variance components, %					Q_{ST}
		σ^2_b	σ^2_P	$\sigma^2_{f(P)}$	$\sigma^2_{b \times P}$	$\sigma^2_{b \times f}$	
Visina 2010. Height 2010	162,3 ± 1,5	1,6 ± 1,8	2,3 ± 1,2*	0,7 ± 0,8	1,7 ± 0,7**	6,1 ± 1,4***	0,354
Visina 2011. Height 2011	182,3 ± 2,2	3,3 ± 3,6	3,8 ± 2,0*	0,1 ± 0,8	3,9 ± 1,3**	7,0 ± 1,5***	0,865
Visina 2012. Height 2012	209,6 ± 3,7	3,0 ± 3,4	5,2 ± 2,8*	2,1 ± 1,0*	5,8 ± 1,7***	6,3 ± 1,4***	0,294
Preživljavanje 2010. Survival 2010	0,99 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 3,2	1,5 ± 1,3	0,0 ± 0,0	0,000
Preživljavanje 2011. Survival 2011	0,89 ± 0,02	1,3 ± 2,0	14,4 ± 6,7*	0,7 ± 2,4	9,4 ± 3,3**	0,0 ± 0,0	0,779
Preživljavanje 2012. Survival 2012	0,86 ± 0,02	0,0 ± 0,0	15,1 ± 6,5*	4,4 ± 2,7*	5,1 ± 2,2**	0,0 ± 0,0	0,366
Prirast 2010–2011. Increment 2010–2011	20,2 ± 1,1	0,6 ± 0,8	0,9 ± 0,9	0,0 ± 0,8	2,6 ± 1,0**	4,3 ± 1,5**	0,977
Prirast 2011–2012. Increment 2011–2012	28,5 ± 1,6	1,3 ± 1,5	2,2 ± 1,4	0,6 ± 0,9	3,2 ± 1,1**	4,1 ± 1,5**	0,397

σ^2_b – Komponenta varijance efekta bloka – Variance component of block effect

σ^2_P – Komponenta varijance efekta populacija – Variance component of provenance effect

$\sigma^2_{f(P)}$ – Komponenta varijance efekta familija unutar populacija – Variance component of family within provenance effect

$\sigma^2_{b \times P}$ – Komponenta varijance efekta interakcije populacija i blokova – Variance component of block by provenance interaction effect

$\sigma^2_{b \times f}$ – Komponenta varijance efekta familija – Variance component of family within population effect

$\sigma^2_{b \times f}$ – Komponenta varijance efekta interakcije familija i blokova – Variance component of block by-family within provenance interaction effect

Q_{ST} – Parametar kvantitativne genetske diferencijacije – Parametar of quantitative genetic differentiation

* Značajnost na razini 0,01-0,05 – Significant at 0.05 level

** Značajnost na razini 0,0001-0,01 – Significant at 0.01 level

*** Značajnost na razini <0,0001 – Significant at 0.001 level

tmetičkih sredina njihovih izmjerenih kvantitativnih svojstava u testu.

Formula standardizacije aritmetičke sredine populacija primijenjena je za sva istraživana kvantitativna svojstva koja su korištena kao zavisne varijable:

$$z_{ip\text{std.}} = \frac{\bar{x}_{ip} - \bar{X}_i}{\sigma_i} \quad (3)$$

gdje je:

- $z_{ip\text{std.}}$ standardizirana varijabla određenoga svojstva i za populaciju p ($p = 1, \dots, 17$)
- \bar{x}_{ip} srednja vrijednost svojstva i za populaciju p
- \bar{X}_i ukupna aritmetička sredina svojstva i za sve populacije
- σ_i standardna devijacija svojstva i .

3. Rezultati i rasprava – Results and discussion

3.1 Razina kvantitativne genetske diferencijacije – Level of quantitative genetic differentiation

U tablici 2 prikazani su rezultati analize varijance provedene prema opisanom modelu ANOVA, kao i parametri kvantitativne genetske diferencijacije za svojstva visinski rast, preživljavanje i visinski prirast u genetičkom nasadu u Jastrebarskom u dobi populacija od 4 do 6 godina.

Za svojstvo visinski rast 2010. i 2011. godine utvrđene su statistički značajne razlike za većinu ispitivanih izvora varijabilnosti, izuzev efekata blokova i familija unutar populacija, dok u 2012. godini samo efekt blokova nije bio statistički značajan (tablica 2). U sve tri analizirane godine efekt populacija bio je statistički značajan, dok efekt familija (unutar populacija) nije bio statistički značajan. To znači da je utvrđena viša razina genetske varijabilnosti među populacijama nego među familijama unutar populacija. Statistička značajnost efekta populacija pokazuje genetsku diferenciranost populacija. Efekti interakcije (interakcija blok \times populacije, blok \times familije unutar populacija) bili su statistički visoko značajni. Statistička značajnost efekta interakcije blok \times populacija upućuje na određenu razinu fenotipske plastičnosti analiziranih populacija. Izračunati koeficijenti kvantitativne genetske diferencijacije (Q_{ST}) relativno su visoki i također upućuju na međupopulacijsku genetsku diferencijaciju.

U tablici 2 prikazane su i vrijednosti komponenta varijance i parametara kvantitativne genetske

diferencijacije za preživljavanje. U dobi od 4 godine, nakon dva vegetacijska razdoblja rasta biljaka u terenskim uvjetima, ni jedan analizirani efekt nije bio statistički značajan zbog vrlo velikoga postotka preživljavanja biljaka u svim populacijama. Statistički značajan efekt populacija bio je u sljedećim analiziranim godinama, što uz visoke koeficijente genetske diferencijacije upućuje na međupopulacijsku genetsku diferencijaciju.

Analizom varijance za prirast utvrđene su statistički značajne razlike samo za efekte blok \times populacija i blok \times familije unutar populacija, što upućuje na fenotipsku plastičnost populacija odnosno familija. Parametar kvantitativne genetske diferencijacije bio je vrlo visok, pogotovo za prirast od 2010. do 2011. godine (0,977) (tablica 2). To jasno pokazuje visoku razinu međupopulacijske diferencijacije za to svojstvo.

Parametri Q_{ST} svih svojstava bili su relativno visoki, osobito kad se uzme u obzir da su značajno viši u usporedbi Neievim genetičkim udaljenostima i parametrima F_{ST} izračunatim na temelju analiza neutralnih jezgrinih mikrosatelitnih biljega za hrvatske populacije hrasta lužnjaka koje daju Katičić Bogdan (2012) i Morić (2016). To također upućuje na genetsku diferenciranost istraživanih populacija.

Kod sva tri svojstva efekt familija (unutar populacija) nije bio statistički značajan, dok se statistički značajan pokazao efekt populacija za visinski rast i preživljavanje, što znači kako je utvrđena viša razina genetske varijabilnosti među populacijama nego u njima. Prilikom analize istih populacija za visinski rast jednogodišnjih sadnica Popović i dr. (2014) također su utvrdili statističku značajnost efekta populacija.

Istražujući visinski rast kod litvanskih populacija hrasta lužnjaka Baliuckas i Pliura (2003) utvrdili su statističku značajnost slučajnoga efekta familija. Fiksni efekt populacija nije bio statistički značajan, dok je efekt blokova u većini slučajeva bio statistički značajan. Utvrdili su unutarpopulacijsku raznolikost, ali ne i međupopulacijsku diferencijaciju za to svojstvo. No, također je utvrđena statistička značajnost efekta interakcije blok \times familija. Ta značajnost najvjerojatnije pokazuje kako su genetske razlike među populacijama potisnute, odnosno nisu mogle doći od izražaja zbog vrlo jakoga utjecaja okoliša na visinski rast. Slične rezultate dobili su Baliuckas i Pliura (2008) i u istraživanju istih populacija u starijoj dobi.

Za visinski prirast u nasadu »Jastrebarski lugovi« nije utvrđena statistički značajna međupopulacijska

varijabilnost, već je statistički značajan bio efekt interakcije blok \times populacija upućujući na fenotipsku plastičnost populacija. No, parametar Q_{ST} bio je prilično visok (0,977 i 0,397), što je ipak pokazatelj postojanja juvenilne međupopulacijske diferencijacije (tablica 2). Visinski prirast i ostala kvantitativna morfološka svojstva poput visine pod velikim su utjecajem kompleksnih interakcija raznovrsnih okolišnih čimbenika (svjetlost, toplina, vlaga, štetnici, kompeticija i brojni drugi) koji djeluju na biljke tijekom rasta. Procjene pripadajućih komponenata varijance, izrazito visoke vrijednosti varijance ostataka, značajno su uvjetovane snagom kontrole okolišnih čimbenika u pokusnom nasadu. Kako su nasadi osnovani na velikoj površini, heterogeni su stanišni uvjeti, pa djelovanje okolišnih čimbenika može uzrokovati visoku razinu fenotipske varijabilnosti i time potisnuti genetski uvjetovane razlike. Opravdano se može pretpostaviti da je izostanak statističke značajnosti za efekte populacija i familija unutar populacija bio uzrokovan velikom raznovrsnošću okolišnih utjecaja na biljke.

3.2 Obrazac međupopulacijske genetske diferencijacije – *Pattern of interpopulation genetic differentiation*

Kako bi se odredio obrazac genetske diferencijacije, provedena je multivarijantna regresijska stabilna analiza (MRT). Prilikom analize genetički čimbenici, odnosno populacije svrstavaju se u klustere s obzirom na klimatske parametre matičnih sastojina iz kojih potječu i na temelju vrijednosti standardizirane aritmetičke sredine kvantitativnih svojstava.

S obzirom na to da su analizirane populacije u ovom istraživanju zapravo područje rasprostranjenosti hrasta lužnjaka u Hrvatskoj, postojanje međupopulacijskih genetskih razlika nameće pitanje na koji se način te populacije međusobno razlikuju.

Sva dosadašnja istraživanja provedena na hrastu lužnjaku u Hrvatskoj slažu se s postojanjem genetske diferencijacije populacija, međutim rezultati o obrascu genetske diferencijacije nisu ujednačeni. S jedne strane, veći dio autora zaključio je da međupopulacijska diferencijacija nije odgovarala geografskomu obrascu, već da utvrđeni karakter diferencijacije upućuje na ekotipski obrazac genetskih razlika među provenijencijama, koji razumijeva diferencijaciju s obzirom na slične okolišne uvjete koji vladaju u pojedinim sastojinama (Franjić i dr. 2000, Franjić i Škvorc 2001, Bogdan i dr. 2004, Ivanković i dr. 2011, Popović i dr. 2014, Morić 2016, Bogdan i dr. 2017). S druge strane, neka su istraživanja otkrila geografsku

diferencijaciju, odnosno razlike među postojećim sjemenskim zonama (Roth 2003, Krstinić i dr. 1996).

Slika 3 prikazuje razdvajanje populacija za svojstva visinski rast, preživljavanje i visinski prirast u četirima klasterima. Stupići na slici prikazuju srednju vrijednost klastera za određeno fenotipsko svojstvo. Visina stupića naznačuje veličinu srednje vrijednosti klastera, a položaj u odnosu na horizontalnu crtu naznačuje da li se radi o pozitivnoj ili o negativnoj vrijednosti.

Prvi korak u klasteriranju populacija učinjen je s obzirom na Hargreavesovu referentnu evaporaciju, klimatsku varijablu koja upućuje na humidnost odnosno aridnost staništa. Prvi klaster čine populacije HR 609 i HR 330 koje prema Hargreavesovoj referentnoj evaporaciji potječu iz relativno humidnijega staništa. Te su populacije imale ispodprosječan visinski rast, preživljavanje i visinski prirast u odnosu na prosjek svih populacija u pokusnom nasadu u Jastrebarskom.

U drugom koraku populacije su razdvojene s obzirom na prosječnu godišnju temperaturu. Populacije koje potječu sa staništa gdje je prosječna godišnja temperatura ispod 11,4 °C (HR 577 i HR 203) imale su ispodprosječan visinski rast i prirast, ali prosječno preživljavanje. Populacije koje potječu iz staništa gdje je prosječna godišnja temperatura iznad 11,4 °C, a ujedno imaju i manje od 283 dana u godini bez mraza, imale su iznadprosječne vrijednosti za sva tri analizirana svojstva (HR 160, HR 317 i HR 88).

Iz dosadašnjih rezultata (Morić 2016) vidljivo je kako su nadprosječan visinski rast također imale populacije HR 160, HR 317 i HR 88 koje potječu s područja koje ima manje od 283 dana bez mraza. Također je u tom istraživanju ustanovljeno da navedene populacije potječu s lokacija u kojima razdoblje završetka proljetnoga mraza započinje prosječno ranije, a istodobno i rani jesenski mraz nastupa ranije, te zbog toga vjerojatno imaju veću otpornost prema ranom jesenskomu mrazu. Stoga se opravdano može pretpostaviti kako je u istraživanom razdoblju na lokaciji pokusnoga nasada u Jastrebarskom dominantan selekcijski pritisak na visinski rast i prirast bio upravo utjecaj ranoga jesenskoga mraza. Te populacije ranije započinju s rastom, ali i završavaju ranije, te su zbog toga bolje iskoristile trajanje vegetacijskog razdoblja, pritom izbjegavajući negativne posljedice jesenskoga mraza.

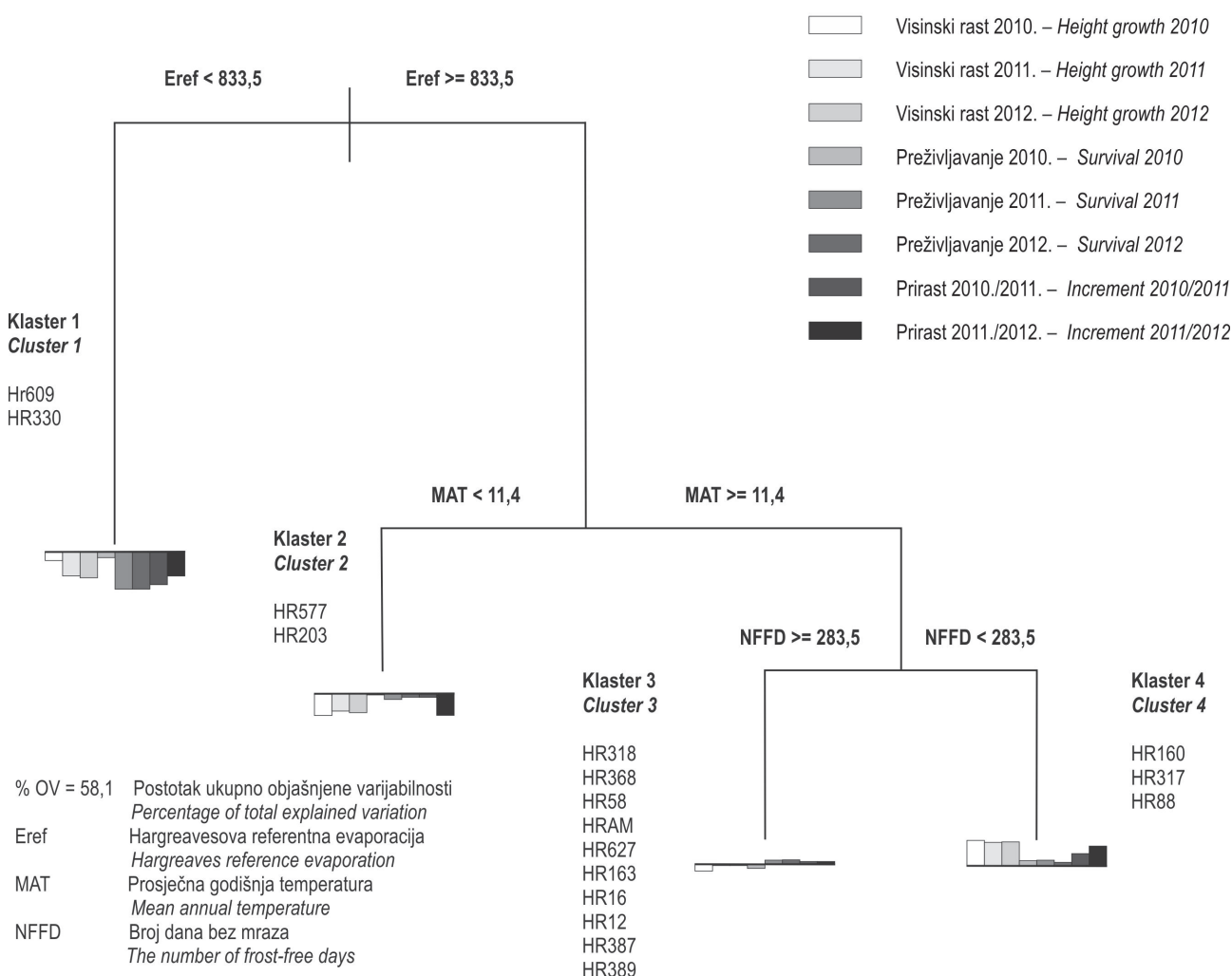
Ujedno populacije HR: 88, 160 i 317 potječu s relativno sušega područja, a prema izvještaju DHMZ-a (izvor: http://klima.hr/ocjene_arhiva.php) 2011.

godina bila je vrlo sušna i vruća te takvi vremenski uvjeti nisu negativno utjecali na populacije prilagođene toplijim i sušnim staništima, dok su značajno utjecali na lošije preživljavanje, visinski rast i prirast populacija iz relativno humidnijih staništa (HR 609 i HR 330).

Analiza visinskoga rasta i preživljavanja populacija u pokusnom nasadu Koška (Bogdan i dr. 2017) također pokazuju da su važni klimatski uvjeti područja s kojega potječu. S obzirom na to kako je taj pokusni nasad bio izložen dugotrajnom sušnom razdoblju, može se opravdano pretpostaviti da je tamo sušni stres bio dominantan selekcijski pritisak. Zbog toga su prosječno niži visinski rast i preživljavanje

imale populacije koje potječu iz relativno humidnijih staništa (niži *Eref*). One populacije koje su bolje prilagođene aridnijim uvjetima imale su prosječno veći visinski rast i iznadprosječno preživljavanje. Na slične zaključke upućuju i dobiveni rezultati ovoga istraživanja (slika 3).

Usporedbom populacija s manjega geografskoga područja najčešće se uočava ekotipski obrazac razdvajanja (Baliuckas i dr. 2001, Jensen i Hansen 2008, Baliuckas i Pliura 2003), što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Jensen i Hansen (2008) navode kako se inferioran rast populacija hrasta lužnjaka iz srednje i zapadne Europe može pojasniti njihovim kasnijim završetkom rasta (engl. *budget*), jer na njih značajno



Slika 3. Razdvajanje analiziranih populacija multivarijantnom regresijskom stabilnom analizom za svojstva visinski rast, preživljavanje i visinski prirast u pokusnom nasadu u Jastrebarskom u dobi od 4 do 6 godina

Fig. 3 Separation of analyzed population by multivariate regression tree analysis for height growth, survival and height increment in genetic field trial Jastrebarsko at age 4 to 6

utječe rani jesenski mraz koji se na sjeveru Europe pokazao limitirajućim čimbenikom za visinski rast. Takve rezultate limitiranja rasta zbog ranoga jesenskoga mraza dobila je i Morić (2016) analizirajući visinski rast iste populacije hrasta lužnjaka.

Jensen i Hansen (2008) navode kako je lošije preživljavanje uzrokovano kasnijim završetkom rasta te kako na te populacije negativan utjecaj ima rani jesenski mraz. U ovom istraživanju preživljavanje je bilo uvjetovano mrazom, ali i humidnošću staništa iz kojega potječu analizirane populacije.

Ekološki uvjeti staništa iz kojih potječu populacije vrlo vjerojatno su osnovni selekcijski pritisci u oblikovanju genetske strukture sastojina hrasta lužnjaka. To znači da se populacije genetski razlikuju zbog različita djelovanja prirodne selekcije u njihovim matičnim sastojinama, ponajviše s obzirom na razlike u vlažnosti i toplini staništa.

4. Zaključak – Conclusion

Analizom visinskoga rasta i preživljavanja u genetičkom testu hrasta lužnjaka »Jastrebarski lugovi«, u razdoblju od 2010. do 2012. godine, utvrđene su statistički visoko značajne razlike među populacijama. Utvrđeno je da su najmanji visinski rast, prirast i preživljavanje imale populacije koje potječu iz relativno najvlažnijih staništa Hrvatske. Nasuprot tomu, najviše prosječne vrijednosti za to svojstvo imale su populacije koje potječu iz relativno sušnijih i toplijih staništa, ali i u kojima se prosječno ranije pojavljuje jesenski mraz. Potrebno je naglasiti da je na lokalitetu genetičkoga testa u istraživanom razdoblju vladalo neuobičajeno toplo i sušno vrijeme. Takvi vremenski uvjeti evidentno su više odgovarali populacijama koje potječu s toplijih i sušnijih staništa. Isto tako, vrlo je vjerojatno da je rani jesenski mraz snažan selekcijski čimbenik u genetičkom testu (barem u promatranom razdoblju). Dobiveni rezultati jasno upućuju na genetsku diferencijaciju naših populacija za analizirana svojstva. Analiza genetske diferencijacije potvrđuje ekotipski obrazac. Rezultati pokazuju da su se populacije genetski razdvojile zbog djelovanja prirodne selekcije u njihovim matičnim sastojinama. Vjerojatni uzročni čimbenici selekcijskoga pritiska, koji su doveli do genetskoga razdvajanja istraživanih populacija, razlike su u vlažnosti i temperaturi njihovih izvornih staništa. Dobiveni rezultati upućuju na važnost promišljenoga korištenja šumskoga reprodukcijanskoga materijala u obnovi sastojina hrasta lužnjaka, posebice s obzirom na klimatske promjene.

Zahvala – Acknowledgements

Ovo je istraživanje bilo dio znanstvenoga projekta MZOS 024-0242108-2099 – »Oplemenjivanje i šumsko sjemenarstvo« (Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske), znanstvenoistraživačkoga projekta »Masovna i individualna selekcija, izbor i bonitiranje sjemenskih objekata« (Hrvatske šume d.o.o. Zagreb) te znanstvenoistraživačkoga projekta »Testiranje sjemenskih sastojina lužnjaka (*Quercus robur* L.) putem usporednih testova« (Hrvatske šume d.o.o. Zagreb, Uprava šuma podružnica Karlovac). U sklopu navedenih projekata osnovani su genetički testovi i prikupljeni podaci. Rad je također financirala/sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom (8131) u sklopu kojega su napravljeni obračuni i analizirani prikupljeni podaci.

Autori zahvaljuju za financijsku podršku. Zahvaljujemo i svim djelatnicima Hrvatskih šuma d.o.o. Zagreb koji su sudjelovali u organizaciji i provedbi skupljanja sjemena u sjemenskim sastojinama te u osnivanju pokusne plohe i time omogućili ovo istraživanje.

5. Literatura – References

- Baliuckas, V., T. Lagerstrom, G. Eriksson, 2001: Within-population variation in juvenile growth rhythm and growth in *Quercus robur* L. and *Fagus sylvatica* L. *Forest Genetics*, 8(4): 259–269.
- Baliuckas, V., A. Pliura, 2003: Genetic variation and ecological sensitivity of *Quercus robur* populations and open pollinated families. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 18(4): 305–319.
- Baliuckas, V., A. Pliura, 2008: Phenogenetic variation pattern in adaptive traits of *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* and *Quercus robur* in Lithuania. *Biologija*, 54(2): 60–65.
- Bogdan, S., I. Katičić-Trupčević, D. Kajba, 2004: Genetic Variation in Growth Traits in a *Quercus robur* L. Open-Pollinated Progeny Test of the Slavonian Provenance. *Silvae Genetica*, 53(5–6): 198–201.
- Bogdan, S., I. Katičić Bogdan, 2015: Genetika s oplemenjivanjem drveća i grmlja. Recenzirana interna skripta. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1–224.
- Bogdan, S., M. Ivanković, M. Temunović, M. Morić, J. Franjić, I. Katičić Bogdan, 2017: Adaptive genetic variability and differentiation of Croatian and Austrian *Quercus robur* L. populations at a drought prone field trial. *Ann. For. Res.*, 60(1): 33–46.
- Daly, C., W. P. Gibson, G. H. Taylor, G. L. Johnson, P. Pasteris, 2002: A knowledge-based approach to the statistical mapping of climate. *Climate Research*, 22(2): 99–113.

- Eriksson, G., I. Ekberg, D. Clapham, 2006: An introduction to Forest Genetic. Second Edition. Uppsala, Sweden.
- Falconer, D. S., T. F. C. Mackay, 1996: Introduction to Quantitative Genetics, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Franjić, J., J. Gračan, D. Kajba, Ž. Škvorc, B. Dalbelo-Bašić, 2000: Multivariate analysis of leaf shape of the common oak (*Quercus robur* L.) in the »Gajno« provenance test (Croatia). Glasnik za šumske pokuse, 37: 469–479.
- Franjić, J., Z. Škvorc, 2001: Dosadašnji rezultati istraživanja varijabilnosti hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L., Fagaceae) u Hrvatskoj. U: S. Matić, A. P. B. Krpan, J. Gračan (ur.), Znanost u potrajnom gospodarenju hrvatskim šumama. Šumarski fakultet Zagreb, Šumarski institut Jastrebarsko, »Hrvatske šume« p.o., Zagreb, 53–59.
- Gračan, J., N. Komlenović, P. Rastovski, 1991: Pokus provenijencija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). Šumarski list, 115(6–9): 245–260.
- Gračan, J., 1996: Masovna selekcija. U: D. Klepac (ur.), Hrast lužnjak u Hrvatskoj, HAZU i »Hrvatske šume« p.o., Vinkovci – Zagreb, 96–144.
- Hamann, A., T. Wang, D. L. Spittlehouse, T. Q. Murdock, 2013: Climate EU – još neobjavljeni softverski paket za Europu dostupan na <http://www.ualberta.ca/~ahamann/data/climateeu.html>
- Houle, D., 1992: Comparing Evolvability and Variability of Quantitative Traits. Genetics, 130(1): 195–204.
- Ivanković, M., M. Popović, S. Bogdan, 2011: Varijabilnost morfoloških svojstava žireva i visina sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) iz sjemenskih sastojina u Hrvatskoj. Šumarski list, 135(13): 46–58.
- Katičić Bogdan, I., 2012: Genetska raznolikost hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u klonskim sjemenskim plantažama u Hrvatskoj. Disertacija. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1–165.
- Klepac, D., 1996: Uvod. U: D. Klepac (ur.), Hrast lužnjak u Hrvatskoj, HAZU i »Hrvatske šume« p.o., Vinkovci – Zagreb, 9–12.
- Krstinić, A., 1996: Unutarpopulacijska i međupopulacijska varijabilnost hrasta lužnjaka. U: D. Klepac (ur.), Hrast lužnjak u Hrvatskoj, HAZU i »Hrvatske šume« p.o., Vinkovci – Zagreb, 96–101.
- Krstinić, A., I. Trinajstić, J. Gračan, J. Franjić, D. Kajba, M. Britvec, 1996: Genetska izdiferenciranost lokalnih populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj. U: S. Matić, J. Gračan (ur.), Skrb za hrvatske šume od 1846. do 1996. Zaštita šuma i pridobivanje drva 2, Hrvatsko šumarsko društvo, Zagreb, 159–168.
- Jensen, J. S., J. Hansen, 2008: Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur* L. oak grown in greenhouse. Scand. J. For. Res., 23(2): 179–188.
- Mitchell, T. D., P. D. Jones, 2005: An improved method of constructing a database of monthly climate observations and associated high-resolution grids. International Journal of Climatology, 25(6): 693–712.
- Morić, M., 2016: Genetska raznolikost hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u pokusnim nasadima s potomstvom iz odabranih sjemenskih sastojina. Disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1–264.
- Perić, S., J. Gračan, B. Dalbelo-Bašić, 2000: Flushing variability of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in provenance experiment in Croatia. Glasnik za šumske pokuse, 37: 395–412.
- Popović, M., M. Ivanković, S. Bogdan, 2014: Varijabilnost visinskog rasta i preživljenja potomstava iz sjemenskih sastojina hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u pokusnom nasadu »Jastrebarski lugovi« – prvi rezultati. Šumarski list, 138(1–2): 155–165.
- Roth, V., 2003: Neki pokazatelji rasta hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) iz sjemenskih zona i rajona Hrvatske u rasadničkom testu. Radovi, 38(2): 195–210.
- R ver. 3.0.3. R Development Core Team 2014.
- SAS 9.3, 9.2 (SAS/STAT® software, SAS INSTITUTE).
- Šafar, J., 1958: Osnovna razdioba područja hrvatske na sjemenarske jedinice. Šumarski list, 82(10): 329–338.
- Škvorc, Ž., M. Prugovečki, Z. Užarević, S. Bogdan, M. Ivanković, K. Sever, I. Katičić Bogdan, D. Krstonošić, I. Kovač, J. Franjić, 2018: Utjecaj staništa na anatomske građu lista hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u pokusnim nasadima Koška i Vrbanja. Radovi, 46(1): 1–12.
- Wang, T., A. Hamann, D. L. Spittlehouse, T. Q. Murdock, 2012: ClimateWNA – High-resolution spatial climate data for western North America. Journal of Applied Meteorology and Climatology, 51(1): 16–29.
- Wang, T., A. Hamann, 2012: Climate EU v4.63 – A program to generate annual, seasonal and monthly data for Europe. User Guide.
- White, T. L., W. T. Adams, D. B. Neale, 2007: Forest Genetics. CAB International 2007, UK. 682 p.

Abstract

Quantitative Genetic Differentiation of Pedunculate Oak (*Quercus Robur* L.) Populations in Field Trial »Jastrebarski Lugovi«

Pedunculate oak is one of the three most common tree species in Croatia and has an important role in economic, social and environmental terms. Knowledge of the genetic structure for such a significant forest tree species is the fundamental prerequisite for its future preservation. Specifically, the knowledge of the genetic structure allows more advanced use of forest reproductive material in order to increase the adaptability of oak populations to stressful environmental conditions. Analysis of quantitative (polygene, metric) phenotypic traits in genetic field trials is one of the methods to determine forest tree species genetic structure. Seed material was collected from sixteen seeds and one normally managed stand, representing the distribution range of pedunculate oak in Croatia, in September and October 2006. With two-year-old seedlings, in 2008 a genetic field trial was established in the area of the Management Unit Jastrebarski lugovi. The height growth was measured and the survival and height increment were determined through three consecutive years (2010-2012). The variance analysis was performed by the PROC MIXED procedure in the SAS statistical package, and the variance components and the statistical significance of random effects were calculated (blocks, populations, population within populations, interactions of block with populations, and interaction of blocks with families with populations). Variance components were used to calculate the Q_{ST} parameter that determines the level of interpopulation genetic differentiation. Multivariate regression tree analysis (MRT) was used to determine the pattern of genetic differentiation and classify population into groups (clusters) for the investigated quantitative traits, depending on the environmental (climatic) variables of their habitat of origin. The Q_{ST} parameter was high for all three analysed traits, which clearly indicates interpopulation genetic differentiation of Croatian oak populations. The established pattern of adaptive genetic differentiation is confirmed by the ecotypic pattern, i.e. most probably the natural selection in parental stands (primarily considering the humidity and heat of the habitat) caused the genetic differentiation of local populations.

Keywords: genetic structure, quantitative phenotypic traits, genetic field trial, ecotypic variability, natural selection

Adrese autorâ – Authors' addresses:

Dr. sc. Maja Morić *

e-pošta: mmoric@sumfak.hr

Prof. dr. sc. Saša Bogdan

e-mail: bogdan@sumfak.hr

Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku

Svetošimunska 25

10000 Zagreb

HRVATSKA

Dr. sc. Mladen Ivanković

e-pošta: mladeni@sumins.hr

Hrvatski šumarski institut

Zavod za genetiku, oplemenjivanje šumskog

drveća i sjemenarstvo

Cvjetno naselje 41

10450 Jastrebarsko

HRVATSKA

Primljeno (Received): 10. 10. 2018.

Prihvaćeno (Accepted): 22. 11. 2018.

* Glavni autor – Corresponding author