https://doi.org/10.31298/sl.149.9-10.1

Izvorni znanstveni članci – Original scientific papers
Šumarski list, 9-10 (2025): 411-422

GENETSKA RAZNOLIKOST I GENOTIPIZACIJA KLONOVA U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI CRNOG BORA (*Pinus nigra* J.F.Arnold)

GENETIC DIVERSITY AND GENOTYPING OF CLONES IN CLONAL SEED ORCHARD OF BLACK PINE (*Pinus nigra* J.F.Arnold)

Ida KATIČIĆ BOGDAN[1], Rudolf STIPETIĆ[1], Antonio VIDAKOVIĆ[1], Marko BAČURIN[1], Saša BOGDAN[1], Zlatko ŠATOVIĆ[2], Igor POLJAK[1]*

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi raznolikost klonova unutar klonske sjemenske plantaže crnog bora (*Pinus nigra* J.F.Arnold, Pinaceae) na području Šumarije Krk pomoću morfoloških i molekularnih biljega te provesti genetsku identifikaciju (genotipizaciju) rameta kako bi se provjerila točnost nacrta plantaže. U istraživanje su uključeni uzorci 136 rameta iz pet populacija. Molekularne analize provedene su primjenom mikrosatelitskih DNA-biljega, dok je morfometrijska analiza obuhvatila 10 svojstava iglica i češera. Analiza je pokazala statistički značajne razlike među klonovima i populacijama prema svim istraživanim morfološkim svojstvima. Prosječna dužina iglica iznosila je 89,8 mm, dok su češeri, prosječne dužine 55,7 mm i širine 26,8 mm, sadržavali 106 sjemenih ljusaka. U klonskoj sjemenskoj plantaži utvrđeno je 27,2 % pogrešno označenih jedinki (rameta), od kojih su tri pripadale drugim klonovima, dok su ostale imale nepoznate genotipe. Glavni uzroci pogrešaka uključuju odumiranje plemki i rast stabalaca iz podloge, dok su greške u označavanju također moguće. Nacrt plantaže potrebno je ispraviti kako bi se pogrešno označene ramete pravilno označile, a jedinke nepoznatog porijekla i genotipa trebalo bi ukloniti. Buduće plemke za nadopunjavanje plantaže, u slučaju njenog daljnjeg održavanja, trebaju se uzimati sa sada potvrđenih rameta. Kod primjeraka s niskom rašljom koji su za dvije grane imali različite genotipove od kojih samo jedan pripada klonu po nacrtu treba odstraniti granu s krivim genotipom jer je potjerala iz podloge. U usporedbi s drugim istraživanjima s mikrosatelitskim biljezima na crnom boru, genetska raznolikost u plantaži (H_E = 0,646) pokazala je vrijednosti slične prirodnim populacijama. Klonovi u plantaži porijeklom su iz malog broja populacija od kojih su neke vrlo slabo zastupljene pa se u slučaju održanja plantaže preporuča proširiti genetsku bazu novoselekcioniranim klonovima. Multivarijatnim statističkim metodama nije utvrđeno grupiranje klonova temeljem njihove pripadnosti izvornim populacijama. Dobiveni rezultati ovog istraživanja imaju značajnu praktičnu vrijednost za šumarsku struku jer sjemenske plantaže čine prikladnu bazu za *ex situ* očuvanje genetske raznolikosti vrste te za proizvodnju genetski kvalitetnog sjemena za obnovu sastojina ili potpomaganje prirodne obnove. Ovo istraživanje također ukazuje na važnost točnog označavanja klonova kako bi se izbjegle negativne posljedice u gospodarenju klonskim sjemenskim plantažama.

KLJUČNE RIJEČI: crni bor, morfometrijska analiza, genetska analiza, mikrosateliti, klonska sjemenska plantaža, očuvanje genofonda

[1] Izv. prof. dr. sc. Ida Katičić Bogdan, Rudolf Stipetić, mag. ing. silv., dr. sc. Antonio Vidaković, Marko Bačurin, mag. ing. silv., prof. dr. sc. Saša Bogdan, izv. prof. dr. sc. Igor Poljak, Sveučilište u Zagrebu Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zagreb
[2] Prof. dr. sc. Zlatko Šatović, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb
* Dopisni autor: Igor Poljak, e-mail: ipoljak@sumfak.unizg.hr

UVOD
INTRODUCTION

Nabava šumskog sjemena za potpomaganje prirodne obnove može se provoditi na nekoliko načina, pri čemu kriteriji za odabir mjesta sakupljanja ili šumskog sjemenskog objekta (ŠSO-a) određuju svrstavanje prikupljenog sjemena u različite kategorije.

Sjeme za potrebe šumarstva može se proizvoditi na više načina. Najjednostavniji je način sabiranje sjemena u šumi ili izvan šume s pojedinačnih stabala koja se slobodno oprašuju, a da se pri tome ne obrati posebna pažnja na kvalitetu stabala, genetsku i tehničku, s kojih se sabire sjeme, niti se ne izdvajaju iz daljnje proizvodnje fenotipski loša stabla. Od tako sakupljenog sjemena ne možemo očekivati dobro, a često puta niti prosječno potomstvo. Stoga se ovako proizvedeno i sakupljeno sjeme ne koristi u šumarstvu za biološku obnovu šuma. Umjesto toga, biraju se dijelovi kvalitetnijih šuma koje se svrstavaju u kategoriju „poznato podrijetlo". Drugi način je sakupljanje sjemena u odabranim kvalitetnim sastojinama – sjemenskim sastojinama. Dobiveno sjeme ima u prosjeku bolju genetsku konstituciju jer se prikuplja isključivo s fenotipski kvalitetnih stabala. Potomstvo proizvedeno od takvog sjemena, u genetskom smislu, trebalo bi biti barem na razini prosjeka sjemenske sastojine iz koje je sjeme prikupljeno (kategorija „selekcioniran"). Treća metoda proizvodnje šumskog sjemena odvija se u tzv. sjemenskim plantažama (kategorija „kvalificiran").

U programima oplemenjivanja određenih svojti šumskog drveća koje se ne mogu rutinski razmnožavati autovegetativno, klonske sjemenske plantaže imaju ključnu ulogu. Klonske sjemenske plantaže predstavljaju skupinu genetski superiornih stabala koja se intenzivno održavaju kako bi se osigurala učestala i obilna cvatnja te redovita rodnost. Njihov je cilj zadovoljiti povećane potrebe u proizvodnji šumskog reprodukcijskog materijala.

Pod sjemenskom plantažom podrazumijeva se kultura genetski superiornih stabala koja su izolirana ili posebno uređena kako bi se izbjeglo ili znatno smanjilo oprašivanje iz vanjskih izvora genetski inferiornih stabala. Plantažom se intenzivno gospodari u vidu zaštite od štetnika i vremenskih nepogoda, gnojidbe i navodnjavanja, sa svrhom učestale i obilne cvatnje i sjemenonošenja. Fenotipski najkvalitetnija stabla, tzv. plus stabla, u plantaži se međusobno oprašuju i oplođuju, čime se ostvaruje genetska dobit. Tako proizvedeni šumski reprodukcijski materijal pripada kategoriji „kvalificiran". Daljnje poboljšanje genetske kvalitete sjemena i biljaka ostvaruje se selekcijom po genotipu kroz testove potomstva. Takav šumski reprodukcijski materijal svrstava se u kategoriju „testiran". Na osnovi testiranja potomstva iz plantaže uklanjaju se klonovi (majčinska plus stabla) koja daju ispodprosječno potomstvo. Nakon selekcije plus stabala provodi se njihovo heterovegetativno razmnožavanje (cijepljenje), osnivanje i nadopunjavanje sjemenskih plantaža cijepovima (rametama) te njega biljaka i oblikovanje krošnji. Ujedno se provodi zaštita od bolesti i štetnika, praćenje vremena listanja, fruktifikacije i sjemenonošenja klonova. Monitoring nam daje ključne informacije o zakonitostima i problemima sjemenonošenja u plantažama. Genetska kvaliteta selekcioniranih stabala (plus stabala) ispituje se putem testova potomstva, a klonske sjemenske plantaže služe i kao arhivi za očuvanje genetskih resursa vrste.

Ako se provode propisane mjere, proizvodnja sjemena u plantaži je veća i češća nego u prirodnim sastojinama i kulturama. Zahvaljujući tome, planirane potrebe za sjemenom mogu se lakše ostvariti. Sakupljanje sjemena u plantaži jednostavnije je jer se radi o modificiranim stablima uzgojenima za fruktifikaciju i sjemenonošenje, smještenima na odgovarajućoj i prethodno pripremljenoj površini. Pravilnim odabirom lokaliteta za podizanje sjemenske plantaže može se dodatno povećati učestalost rodnosti i poboljšati kvaliteta sjemena. Druga vrlo važna uloga sjemenskih plantaža je veća genetska dobit u potomstvu nego što je to kod sjemenskih sastojina ili šumskih sastojina. Naime, u sjemenskim plantažama provodi se polukontrolirano oprašivanje, a sjeme potječe od selekcioniranih i poznatih roditelja. S druge strane, u sjemenskim sastojinama poznata je samo majčinska jedinka s koje se sjeme prikuplja, dok su očevi nepoznati. Zahvaljujući tome, sjeme proizvedeno u plantaži ima garantirano visoku genetsku kvalitetu.

Iako je u gospodarenju hrvatskim šumama predviđena prirodna obnova, ona se ne može uvijek u potpunosti provesti. Najčešći razlog tome je nedostatak uroda u sastojinama koje se trebaju prirodno pomladiti. Godišnje potrebe za sjemenom važnijih svojti šumskog drveća pokazuju znatan godišnji manjak. Kako bi se smanjila ili potpuno uklonila ova negativna razlika između potrebnog i prikupljenog sjemena, nužno je poboljšati organizaciju proizvodnje sjemena. U tom kontekstu, proizvodnja sjemena u sjemenskim plantažama trebala bi nam pružiti bolja rješenja. Upravo s tom idejom, 2004. godine osnovana je klonska sjemenska plantaža crnog bora (*Pinus nigra* J.F.Arnold, Pinaceae) na otoku Krku.

Crni bor raste na suhim staništima, pretežito na vapnenačkim tlima, dolomitima i terasastim površinama, na južnim ekspozicijama brdskog i gorskog pojasa (Vidaković 1993, Enescu i dr. 2016). Ova vrsta uspijeva u čistim ili mješovitim sastojinama, najčešće na nadmorskoj visini od 250 do 1500 (2200) metara. Crni bor ima izrazito diskontinuiran areal i općenito je rasprostranjen u južnoj Europi, sjeverozapadnoj Africi, Maloj Aziji, Krimu i Cipru. U Hrvatskoj se smatra reliktom tercijara (Bogunić i dr. 2007), koji je u pliocenu rastao na područjima gdje raste i danas. Pretežno raste u čistim sastojinama

na kamenitim i sunčanim padinama zapadnih obronaka Dinarida, na nadmorskoj visini od 350 do 1400 (1600) metara. U Hrvatskoj su prisutne dvije podvrste crnog bora (Liber 2000, Liber i dr. 2003, Scotti-Saintagne i dr. 2019): tipska podvrsta (*Pinus nigra* subsp. *nigra*) te endemična podvrsta, dalmatinski crni bor (*P. nigra* subsp. *dalmatica* (Vis.) Franco). Dalmatinski crni bor raste na vrhovima srednjodalmatinskih i južnodalmatinskih otoka Brača, Hvara i Korčule, kao i na poluotoku Pelješcu. Istraživanja genetske raznolikosti crnog bora pomoću jezgrenih mikrosatelita nisu brojna. Očekivana heterozigotnost (H_E) za portugalske prirodne populacije (Dias i dr. 2020), analizirane s 13 mikrosatelita, od kojih su neki bili izrazito polimorfni, iznosila je 0,76. U istraživanju Giovanelli i dr. (2017) s korištenih 14 mikrosatelita H_E se kretao u rasponu od 0,576 do 0,717 u devet populacija, s tim da je hrvatska populacija (dalmatinski crni bor) imala H_E od 0,660.

Crni bor je heliofilna i kserofitna vrsta koja u mladosti raste relativno brzo (Herman 1971). Otporan je na vjetrove i sušu, a dobro podnosi i gradske uvjete. Osim toga, značajan je i kao ukrasna vrsta koja se široko uzgaja te često koristi za sadnju u parkovima. Najvažnija je vrsta bora za pošumljavanje submediteranskog krša (Isajev i dr. 2004) zbog čega je ključno osigurati pouzdan i genetski kvalitetan izvor reprodukcijskog materijala.

Za analizu genetske raznolikosti, kao i genetsku identifikaciju jedinki u plantažama, često se koriste jezgreni mikrosateliti kao molekularni ili, preciznije rečeno, DNA biljezi. Mikrosatelitski biljezi predstavljaju dijelove DNA u kojima se neki nukleotidni slijed, obično od 1-6 parova baza, ponavlja određeni broj puta. Njihova je značajka velika mutacijska stopa i s njom povezana velika polimorfnost DNA na tim dijelovima genoma kod različitih jedinki u analizi. Uobičajeno je raznolikost mikrosatelitskih lokusa kod različitih jedinki u analizi nazvati različitim alelima na tom mikrosatelitskom lokusu. Zbog svoje polimorfnosti analiza većeg broja mikrosatelitskih lokusa (biljega) prikladna je za točnu genetsku identifikaciju jedinki (genotipizaciju). Osim za genotipizaciju, mikrosatelitski biljezi prikladni su za istraživanje genetske raznolikosti unutar i između populacija, istraživanje migracije gena između populacija, obrazaca razmnožavanja unutar populacija te za utvrđivanje roditelja.

Cilj ovog rada bio je utvrditi raznolikost klonova unutar klonske sjemenske plantaže crnog bora na području Šumarije Krk primjenom morfoloških i DNA biljega. Analizom morfoloških biljega utvrđena je raznolikost među pojedinim rametama klona, između klonova, kao i među izvornim populacijama. Primjenom mikrosatelitskih DNA biljega provedena je genetska identifikacija (genotipizacija) klonova, a također je utvrđena pripadnost rameta klonovima prema unaprijed utvrđenom planu i nacrtu njihova položaja unutar klonske sjemenske plantaže.

MATERIJALI I METODE
MATERIALS AND METHODS

Područje istraživanja - *Research area*

Klonska sjemenska plantaža crnog bora nalazi se u sklopu gospodarske jedinice Lug na otoku Krku i u nadležnosti je Šumarije Krk. Sa svih strana okružena je gospodarskom jedinicom Kras–Gabonjin. Plantaža se nalazi na nadmorskoj visini od približno 10 metara i udaljena je oko 10 kilometara od prirodnih šuma crnog bora. Ukupna površina plantaže iznosi 2,0 hektara. Godine 2004. u rasadniku su uzgajane podloge, na koje su zatim cijepljene ramete jednog plus stabla s područja Šumarije Krk. Ostale ramete, njih 31, heterovegetativno su razmnožene (precijepljene) iz klonske sjemenske plantaže crnog bora u Prkosu (UŠP Gospić). U listopadu 2006. na prethodno obrađenoj površini zasađene su ramete 32 klona, ukupno njih 157. Do 2023. godine u plantaži su ostale prisutne 132 ramete. Razmak između redova, kao i između rameta unutar reda, iznosi 10 metara (10 × 10 m). Podaci o plus stablima crnog bora u klonskoj sjemenskoj plantaži prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Podaci o plus stablima crnog bora u klonskoj sjemenskoj plantaži.
Table 1 Data on plus trees included in the clonal seed orchard of black pine.

Broj klona *Clone number*	Geografsko porijeklo klona (Šumarija, G.J., ŠP odjel/odsjek; lokalitet) *Geographical origin of the clone (Forest administration data)*
1	Vrhovine, Samar, 8
2	Vrhovine, Samar, 8
3	Vrhovine, Samar, 8
4	Vrhovine, Samar, 8
5	Vrhovine, Samar, 8
9	Vrhovine, Samar
6	Vrhovine, Samar, 8
7	Vrhovine, Samar, 8
8	Šipovo, Donji Janj, Sastavci Palež 61
10	Krk, Obzova, 121a
11	Vrhovine, Samar, 8
12	Vrhovine, Samar, 8
13	Vrhovine, Samar, 8
14	Vrhovine, Samar, 8
15	Vrhovine, Samar, 8
16	Vrhovine, Samar, 8
17	Vrhovine, Samar, 8
18	Vrhovine, Samar, 8
19	Vrhovine, Samar, 8
20	Vrhovine, Samar, 8
21	Labin, Smolići, Ripenda
22	Delnice, Klana, Škalnica 18
23	Delnice, Klana, Brdo
24	Vrhovine, Samar, 8
25	Vrhovine, Samar, 8
26	Vrhovine, Samar, 8
27	Vrhovine, Samar, 8
28	Šipovo, Donji Janj, Sastavci Palež 61
29	Šipovo, Donji Janj, Jašev Begova kosa
30	Šipovo, Donji Janj, Jašev Begova kosa
31	Šipovo, Donji Janj, Sastavci Palež 61
32	Šipovo, Donji Janj, Jašev Begova kosa

Biljni materijal - *Plant material*

Materijal za morfometrijsku i molekularnu analizu sakupljen je u proljeće 2023. godine sa svih rameta koje se nalaze na plantaži. U slučaju rameta koje su imale dvije glavne grane (rašlja) koje su se granale nisko iz debla, posebno su uzorkovane obje grane kao zasebni uzorci, kako bi se provjerilo jesu li istog genotipa. Za potrebe molekularne analize uzorkovane iglice su pohranjene u silika gelu do izolacije DNA. Za morfometrijsku analizu sa svake ramete sakupljeno je po 20 zdravih i neoštećenih iglica iz vanjskog osunčanog dijela krošnje. Na biljkama koje su imale češere sakupljeno je po 10 češera. Uzorci za morfometrijsku analizu na terenu su pohranjeni u plastične vrećice. Po povratku s terena iglice su herbarizirane, a češeri su pohranjeni u hladnjak do daljnje analize. Za morfometrijsku analizu iglica i molekularnu analizu sakupljeni su uzorci sa 136 biljaka, a za morfometrijsku analizu češera s 87 biljaka.

Morfološka analiza - *Morphological analysis*

Morfološka analiza iglica i češera - *Morphological analysis of needles and cones*

Iglice su skenirane A3 skenerom (MICROTEK ScanMaker 9800XL) pri čemu je korištena razlučivost od 600 dpi (TIF datoteka). Nakon skeniranja, izmjerene su softverskim paketom WINFOLIA PRO (2005) korištenjem opcije Leaf Morphology. Točnost mjerenja iznosila je 0,1 mm, a za svaku iglicu određena je dužina (NL) i njezina najveća širina (NW). Osim toga, korištenjem opcije Interactive Measurements određena je i dužina rukavca (NSL).

Digitalnim pomičnim mjerilom određena su sljedeća morfološka svojstva češera: dužina češera (CL), najveća širina češera (CW), visina štitića (AL), širina štitića (AW), debljina štitića (AT) i dužina mjerena od sredine grbice do vrha štitića (DAU). Osim toga, za svaki češer određen je i ukupni broj sjemenih ljusaka (CSN).

Statistička analiza morfoloških podataka - *Statistical analysis of morphological data*

Za potrebe statističke obrade podataka upotrijebljene su standardne deskriptivne i multivarijatne statističke metode (Sokal i Rohlf 1989, McGarigal i dr. 2000) unutar programskog paketa Statistica for Windows (StatSoft, Inc. 2001). Za svaku istraživanu značajku određeni su sljedeći deskriptivni statistički pokazatelji: aritmetička sredina (M) i standardna devijacija (SD). Odnos između mjerenih značajki češera i iglica utvrđen je Spearmanovim koeficijentom korelacije. Kako bi se utvrdile razlike između klonova i izvornih populacija korištena je Kruskal-Wallis ANOVA.

Kako bi se dodatno pojasnio trend variranja morfoloških svojstava i izvornih populacija primijenjena je analiza glavnih sastavnica. Ulazni podaci prethodno su standardizirani z-score metodom, a sve analize provedene su pomoću računalnog programa R v.3.2.2 (R Core Team 2016) i funkcija unutar MorphoTools R scripts (Koutecký 2015).

Analiza pomoću molekularnih biljega - *Analysis with molecular markers*

Izolacija DNA - *DNA extraction*

Ukupna stanična DNA svakog pojedinog uzorka izolirana je iz 50 mg osušenog lisnog tkiva. Prije izolacije DNA tkivo je smrznuto u tekućem dušiku i usitnjeno pomoću uređaja Tissuelyser (Qiagen). Za izolaciju ukupne stanične DNA upotrijebljen je DNeasy® Plant Pro Kit (250) (Qiagen) komplet. Ovaj izolacijski komplet namijenjen je za izolaciju DNA iz problematičnih uzoraka koji zbog sadržaja inhibirajućih spojeva poput polifenola obično daju slabiji prinos DNA pri standardnim izolacijama.

Molekularni biljezi - Molecular markers

Mikrosatelitski lokusi umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) upotrebom pet pari početnica opisanih u Ganea i dr. (2015). Ovi mikrosatelitski biljezi su razvijeni za primjenu kod običnog bora (*Pinus sylvestris* L.), ali autori navode da su testirani i na crnom boru te da su primjenjivi i za genotipizaciju ove vrste. Značajke upotrijebljenih mikrosatelitskih biljega prikazane su u Tablici 2.

Lančana reakcija polimerazom (PCR) - *Polymerase chain reaction (PCR)*

Za umnožavanje mikrosatelitskih lokusa lančanom reakcijom polimerazom upotrijebljen je komercijalni komplet za PCR (Type-it Microsatellite PCR kit, Qiagen) po uputama proizvođača. Forward početnice označene su na 5' kraju fluorescentnim oznakama za detekciju kapilarnom elektroforezom (Tablica 2). Ukupni volumen reakcije po

Tablica 2. Mikrosatelitni biljezi korišteni u analizi, florescencijska oznaka, ponavljajući motivi i očekivani raspon alela.
Table 2 Molecular markers used in the analysis, fluorescent label, repeat motifs and expected allele ranges.

Biljeg *Marker*	Oznaka na F početnici *F primer dye*	Ponavljajući motiv *Repeat motif*	Očekivani raspon alela (*Pinus sylvestris* L.) *Allele range (Pinus sylvestris* L.*)*
PtTx3013	6-FAM	GTT	90–120
PtTx3020	VIC	A(CAA)	150–170
PtTx3049	VIC	TG	280–320
SPAC12.5	6-FAM	(GT)(GA)	130–210
PtTx3107	NED	CAT	140–160

pojedinom uzorku bio je 10 µl. Za umnožavanje mikrosatelitskih lokusa upotrjebljen je Touchdown protokol naveden u Ganea i dr. (2015), na uređaju MasterCycler gradient (Eppendorf). Analiza fragmenata kapilarnom elektroforezom provedena je pomoću Macrogen Europe. Duljine alela očitane su u programu GeneMapper™ Software 5 (Thermo Fisher Scientific).

Statistička analiza molekularnih podataka - *Statistical analysis of molecular data*

Genetska identifikacija (genotipizacija) klonova u plantaži - *Genetic identification of clones in the clonal seed orchard*

Ramete istog klona trebale bi dijeliti isti genotip. Ukoliko se primijeti da neka rameta ne pripada klonu kojem bi trebala pripadati, izdvojena je iz rameta tog klona i naznačena kao greška u nacrtu. Ukoliko se ustanovi da krivo dodijeljena jedinka po genotipu pripada drugom klonu, pridružena je tom klonu. Ukoliko genotip takve jedinke nije pripao ni jednom klonu, izdvojen je iz daljnjih analiza.

Raznolikost mikrosatelitskih biljega - *Microsatellite markers diversity*

Za svaki mikrosatelitski lokus određeni su broj alela po lokusu (N_a), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) i vjerojatnost identiteta (probability of identity) (PI) koristeći računalni program Cervus v3.0 (Kalinowski i dr. 2007).

Raznolikost genotipova klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži - *Genetic diversity of clones in the clonal seed orchard*

Unutarpopulacijska raznolikost klonova procijenjena je pomoću računalnog programa GenAlEx 6.5. (Peakall i Smouse 2012). Izračunati su prosječni broj alela (N_{av}), primijećena (H_O) i očekivana (H_E) heterozigotnost te koeficijent inbridinga (F_{IS}) za sve klonove iz plantaže. Klasterska analiza matrice genetičke udaljenosti dobivene izračunom udjela zajedničkih alela (proportion of shared alleles, PSA) provedena je metodom Neighbor-joining u računalnom potprogramu NEIGHBOR paketa PHYLIP v3.698 (Felsenstein 2004).

REZULTATI

RESULTS

Morfološka analiza - *Morphological analysis*

Deskriptivna statistika - *Descriptive statistics*

Rezultati deskriptivne statističke analize za pojedine klonove prikazani su u Tablici 3, dok su za izvorne populacije prikazani u Tablici 4. Prosječna dužina češera svih stabala na klonskoj sjemenskoj plantaži iznosila je 55,7 mm, dok je njihova širina bila 26,8 mm. Češeri su u prosjeku imali 106 sjemenih ljusaka. Dužina iglica svih istraživanih stabala iznosila je 89,8 mm, njihova širina bila je 1,09 mm, dok je dužina rukavca bila 6,66 mm. Provedenom Kruskal-Wallis analizom varijance utvrđeno je da se klonovi i izvorne populacije statistički značajno razlikuju prema morfološkim svojstvima iglica i češera.

Promatrajući morfološka svojstva češera na razini izvornih populacija, uočava se da su češeri klonova podrijetlom s Krka najduži (62,7 mm) i najširi (29,7 mm), dok su najkraći (51,4 mm) i najuži (26,2 mm) kod klonova podrijetlom iz Labina. Sjemene ljuske bile su najšire (11,0 mm) kod klonova podrijetlom iz Delnica, a najuže (9,46 mm) kod onih podrijetlom s Krka, koji su istovremeno imali i najkraće sjemene ljuske (6,56 mm). S druge strane, najduže sjemene ljuske (7,70 mm) bile su karakteristične za klonove podrijetlom iz Vrhovina. Udaljenost od sredine grbice do vrha štitića bila je najveća kod klonova iz Delnica i Vrhovina (3,51 mm), a najkraća kod klonova iz Labina (3,16 mm). Klonovi podrijetlom s Krka imali su i najveći broj sjemenih ljusaka (141), dok su klonovi iz Delnica imali najmanji broj (102). Iglice su bile najduže (97,6 mm) i najšire (1,14 mm) kod klonova podrijetlom iz Delnica, dok je najduži rukavac bio zabilježen kod klonova s Krka (7,50 mm). S druge strane, najkraće iglice (78,6 mm) i najkraći rukavac (6,08 mm) zabilježeni su kod klonova iz Šipova, dok su najuže iglice (0,99 mm) zabilježene kod klonova iz Labina.

Korelacijska analiza - *Correlation analysis*

Rezultati korelacijske analize prikazani su u Tablici 5. Od ukupno 45 parova, statistički značajne korelacije utvrđene su za 33 para, od kojih su samo dva para bila u značajnoj negativnoj korelaciji: broj sjemenih ljuski (NS) i visina štitića (AH) te broj sjemenih ljuski (NS) i udaljenost od sredine grbice do vrha štitića (DAU). Najviše značajnih korelacija bilo je zabilježeno za svojstvo udaljenost od sredine grbice do vrha štitića (DAU), koje je bilo značajno korelirano sa svim ostalim mjerenim morfološkim svojstvima. Slijedile su širina češera (CW), visina štitića (AH) i dužina iglice (NL), s osam značajnih korelacija. Najmanje značajnih korelacija, njih četiri, bilo je zabilježeno za broj sjemenih ljuski (NS) i debljinu štitića (AT).

Analiza glavnih sastavnica - *Principal component analysis*

Analizom glavnih sastavnica utvrđeno je da prve četiri glavne sastavnice objašnjavaju 88,5 % ukupne varijabilnosti. Svojstvene vrijednosti za prve tri glavne sastavnice bile su veće od 1. U Tablici 6 prikazane su korelacije između prve četiri glavne sastavnice i svih istraživanih svojstava češera i iglica. Slika 1 prikazuje dijagram u kojem su u koordinatnom sustavu točkama prikazani položaji analiziranih klonova temeljem njihove pripadnosti izvornim populacijama, dok su istraživana morfološka svojstva prikazana vektorima. Iz priložene

Tablica 3. Rezultati deskriptivne statistike za mjerena morfološka svojstva češera i iglica, prikazani po klonovima. Morfološka svojstva: CL–dužina češera (mm); CW–širina češera (mm); AW–širina štitića (mm); AH–visina štitića (mm); DAU–udaljenost od sredine grbice do vrha štitića (mm); NS–broj sjemenih ljusaka; AT–debljina štitića (mm); NL–dužina iglice (mm); NSL–dužina rukavca (mm); NW–širina iglice (mm). Deskriptivni pokazatelji: M–aritmetička sredina; SD–standardna devijacija. Crvenom bojom označene su najveće prosječne vrijednosti, a zelenom najmanje.

Table 3 The results of descriptive statistics for measured cone and needle morphological traits, showed per clones. Morphological traits: CL–cone length (mm); CW–cone width (mm); AW–width of cone scale apophysis (mm); AH–height of cone scale apophysis (mm); DAU–distance between umbo and scale top (mm); NS–number of cone scales; AT–thickness of cone scale apophysis (mm); NL–needle length (mm); NSL–basal sheath length (mm); NW–needle width (mm). Descriptive parameters: M–arithmetic mean; SD–standard deviation. The highest average values are marked in red, while the lowest are marked in green.

Klon *Clone*	Porijeklo *Origin*	Deskriptivni pokazatelj *Descriptive parameter*	Svojstvo / *Trait*									
			CL	CW	AW	AH	DAU	NS	AT	NL	NSL	NW
1	Vrhovine	M	52,2	29,2	10,3	6,81	3,19	122	3,58	103	7,63	1,16
		SD	3,61	1,75	0,88	0,83	0,40	12	0,31	13,6	0,73	0,12
2	Vrhovine	M	53,1	29,7	11,1	8,47	4,06	91	3,90	124	7,86	1,28
		SD	5,61	2,51	1,32	0,82	0,59	6	0,43	10,0	0,70	0,19
3	Vrhovine	M	61,3	27,6	9,43	6,09	3,15	143	2,97	80,2	7,40	1,13
		SD	5,29	0,73	1,41	0,94	0,51	14	0,21	8,40	0,83	0,09
4	Vrhovine	M	62,6	26,2	11,0	9,02	3,80	102	3,92	88,9	6,78	1,08
		SD	7,62	2,51	1,58	1,02	0,39	7	0,48	15,3	0,89	0,17
5	Vrhovine	M	63,5	26,9	10,7	7,69	3,44	97	3,12	104	7,48	1,10
		SD	9,21	3,01	1,69	1,17	0,45	10	0,36	25,7	1,33	0,12
6	Vrhovine	M	54,8	27,8	10,3	8,46	3,64	104	3,58	95,4	7,48	1,02
		SD	6,3	2,61	1,01	0,84	0,42	9	0,37	9,70	0,91	0,12
7	Vrhovine	M	49,8	25,9	10,2	8,92	4,11	84	3,82	89,5	6,28	1,21
		SD	3,94	1,5	0,61	0,82	0,38	9	0,48	8,80	0,77	0,14
8	Vrhovine	M	50,9	25,4	10,3	6,31	2,92	99	2,83	60,9	5,31	0,86
		SD	3,91	1,35	0,9	0,75	0,28	7	0,17	7,90	0,60	0,08
9	Vrhovine	M	58,5	24,4	10,2	7,67	3,47	108	3,04	93,5	5,81	1,09
		SD	5,64	1,89	0,86	0,69	0,47	10	0,28	10,70	0,71	0,12
10	Krk	M	62,7	29,7	9,46	6,56	3,25	141	3,20	95,0	7,50	1,05
		SD	3,72	1,83	1,1	0,41	0,35	18	0,28	9,90	1,30	0,10
11	Vrhovine	M	50,2	25,9	10,2	7,22	3,30	93	3,24	91,2	6,47	1,14
		SD	4,08	1,95	0,78	0,65	0,32	6	0,27	9,30	1,08	0,07
12	Vrhovine	M	51,1	28,8	9,98	6,76	3,10	102	3,07	80,6	5,71	1,00
		SD	7,75	1,92	1,4	1,18	0,63	5	0,42	12,8	0,84	0,10
13	Vrhovine	M	63,3	29,2	11,7	8,81	4,05	104	3,64	96,0	7,15	1,19
		SD	8,01	3,58	1,44	1,12	0,55	10	0,36	14,6	0,82	0,12
14	Vrhovine	M	58,5	28,5	11,5	7,65	3,67	98	3,51	102	7,28	1,20
		SD	6,13	1,96	1,13	0,73	0,31	8	0,34	8,30	0,83	0,11
15	Vrhovine	M	67,5	28,4	11,3	8,85	4,07	102	3,40	89,2	6,39	1,06
		SD	6,51	1,99	0,76	0,77	0,44	10	0,22	14,2	0,74	0,09
16	Vrhovine	M	59,2	29,0	11,7	7,28	3,48	122	3,60	93,0	6,61	1,05
		SD	7,74	2,46	1,42	0,84	0,51	12	0,34	20,2	0,76	0,08
18	Vrhovine	M	53,2	22,0	10,5	8,27	3,59	83	3,03	98,7	6,68	1,11
		SD	9,92	3,23	1,42	1,00	0,40	10	0,38	14,9	0,85	0,09
19	Vrhovine	M	45,1	22,5	8,97	6,66	3,09	78	3,07	108	6,25	1,07
		SD	4,4	1,67	0,85	0,74	0,52	7	0,24	8,90	0,91	0,04
20	Vrhovine	M	53,0	26,8	10,0	6,90	3,15	111	3,56	77,0	6,39	1,06
		SD	5,98	2,34	0,87	0,79	0,35	9	0,28	11,6	0,66	0,09
21	Labin	M	51,4	26,2	10,4	6,64	3,16	111	3,27	86,2	6,34	0,99
		SD	4,57	2,6	1,16	0,86	0,33	15	0,25	22,1	0,92	0,12
22	Delnice	M	56,5	28,8	11,0	7,72	3,40	97	3,21	97,2	7,12	1,16
		SD	7,54	3,43	1,58	1,02	0,35	5	0,39	8,70	0,91	0,07
23	Delnice	M	62,8	28,3	11,0	7,55	3,57	104	3,26	98,0	7,07	1,13
		SD	5,73	1,84	0,94	0,81	0,44	8	0,27	17,2	1,00	0,16
24	Vrhovine	M	49,7	24,2	9,28	7,89	3,43	94	3,11	84,3	6,17	1,04
		SD	3,46	0,98	0,48	0,57	0,44	7	0,28	9,7	0,99	0,09
25	Vrhovine	M	52,0	25,8	9,02	6,15	2,87	126	3,08	78,7	6,20	1,10
		SD	5,96	2,06	0,83	0,79	0,45	13	0,30	16,5	0,96	0,12
26	Vrhovine	M	54,4	27,5	8,91	8,05	3,98	115	3,35	89,5	7,23	1,10
		SD	6,45	2,55	0,97	0,58	0,44	8	0,28	12,1	0,91	0,10
28	Šipovo	M	54,0	26,1	9,22	6,46	3,09	129	3,04	85,6	6,64	1,14
		SD	4,78	1,90	0,87	0,60	0,35	12	0,29	16,1	0,84	0,12
30	Šipovo	M	52,4	29,3	9,57	6,81	3,13	101	3,35	95,3	6,45	1,10
		SD	6,29	2,32	1,18	0,65	0,37	7	0,42	16,2	1,11	0,08
31	Šipovo	M	50,9	25,8	11,0	9,32	4,25	80	3,68	102	6,66	1,25
		SD	6,37	2,47	1,4	1,27	0,55	8	0,31	8,9	0,62	0,08
32	Šipovo	M	49,8	23,9	8,98	7,08	3,33	116	3,59	58,2	5,53	0,99
		SD	4,51	1,67	1,09	0,66	0,29	5	0,36	11,8	0,78	0,14
Ukupno *Total*		M	55,8	26,8	10,3	7,51	3,45	106	3,36	89,8	6,66	1,09
		SD	8,15	2,97	1,42	1,27	0,56	17	0,44	19,4	1,09	0,14

Tablica 4. Rezultati deskriptivne statistike za mjerena morfološka svojstva češera i iglica, prikazani po lokalitetima. Morfološka svojstva: CL–dužina češera (mm); CW–širina češera (mm); AW–širina štitića (mm); AH–visina štitića (mm); DAU–udaljenost od sredine grbice do vrha štitića (mm); NS–broj sjemenih ljusaka; AT–debljina štitića (mm); NL–dužina iglice (mm); NSL–dužina rukavca (mm); NW–širina iglice (mm). Deskriptivni pokazatelji: M–aritmetička sredina; SD–standardna devijacija. Crvenom bojom označene su najveće prosječne vrijednosti, a zelenom najmanje.
Table 4 The results of descriptive statistics for measured cone and needle morphological traits, showed per locality. Morphological traits: CL–cone length (mm); CW–cone width (mm); AW–width of cone scale apophysis (mm); AH–height of cone scale apophysis (mm); DAU–distance between umbo and scale top (mm); NS–number of cone scales; AT–thickness of cone scale apophysis (mm); NL–needle length (mm); NSL–basal sheath length (mm); NW–needle width (mm). Descriptive parameters: M–arithmetic mean; SD–standard deviation. The highest average values are marked in red, while the lowest are marked in green.

Porijeklo *Origin*	Deskriptivni pokazatelj *Descriptive parameter*	Svojstvo / *Trait*									
		CL	CW	AW	AH	DAU	NS	AT	NL	NSL	NW
Delnice	M	60,8	28,5	11,0	7,61	3,51	102	3,24	97,6	7,09	1,14
	SD	6,96	2,44	1,17	0,88	0,42	8	0,31	13,6	0,95	0,12
Krk	M	62,7	29,7	9,46	6,56	3,25	141	3,20	95,0	7,50	1,05
	SD	3,72	1,83	1,1	0,41	0,35	18	0,28	9,90	1,30	0,1
Labin	M	51,4	26,2	10,4	6,64	3,16	111	3,27	86,2	6,34	0,99
	SD	4,57	2,6	1,16	0,86	0,33	15	0,25	22,1	0,92	0,12
Šipovo	M	51,9	26,3	9,68	7,05	3,29	109	3,28	78,6	6,08	1,04
	SD	5,42	2,68	1,27	1,24	0,56	19	0,44	22,1	1,02	0,17
Vrhovine	M	56,5	26,8	10,4	7,70	3,51	105	3,4	92,1	6,77	1,11
	SD	8,56	3,05	1,44	1,28	0,57	17	0,46	17,9	1,07	0,13

Tablice 6 i Slike 1 vidljivo je da prva glavna sastavnica objašnjava 43,2 % ukupne varijabilnosti, dok druga glavna sastavnica objašnjava 21,0 % ukupne varijabilnosti. Prva glavna sastavnica u visoko je negativnoj korelaciji s pet morfoloških svojstava, a to su: udaljenost od sredine grbice do vrha štitića (DAU), visina štitića (AH), širina štitića (AW), debljina štitića (AT) i dužina iglice (NL). Druga glavna sastavnica je u negativnoj korelaciji s dva svojstva, a to su: broj sjemenskih ljusaka (NS) i širina češera (CW).

Tablica 5. Rezultati korelacijske analize između mjerenih morfoloških svojstava češera i iglica crnog bora. Morfološka svojstva: CL–dužina češera; CW–širina češera; AW–širina štitića; AH–visina štitića; DAU–udaljenost od sredine grbice do vrha štitića; NS–broj sjemenih ljusaka; AT–debljina štitića; NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NW–širina iglice. n.s. – nije statistički značajno; * – $0,01 < p < 0,05$; ** – $0,001 < p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.
Table 5 The results of correlation analysis between measured cone and needle morphological characters. Morphological traits: CL–cone length; CW–cone width; AW–width of cone scale apophysis; AH–height of cone scale apophysis; DAU–distance between umbo and scale top; NS–number of cone scales; AT–thickness of cone scale apophysis; NL–needle length; NSL–basal sheath length; NW–needle width. n.s. – not significant; * – $0.01 < p < 0.05$; ** – $0.001 < p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

	CL	CW	AW	AH	DAU	NS	AT	NL	NSL	NW
CL		***	***	***	***	n.s.	n.s.	***	***	n.s.
CW	0,502		***	n.s.	*	*	***	***	***	*
AW	0,680	0,542		***	***	n.s.	***	***	**	n.s.
AH	0,456	0,164	0,624		***	***	***	***	*	*
DAU	0,436	0,231	0,591	0,921		***	***	***	**	**
NS	0,183	0,229	-0,182	-0,509	-0,441		n.s.	*	n.s.	n.s.
AT	0,150	0,373	0,395	0,507	0,503	-0,101		n.s.	n.s.	n.s.
NL	0,449	0,431	0,491	0,432	0,433	-0,230	0,123		***	***
NSL	0,447	0,497	0,330	0,263	0,299	0,049	0,185	0,577		***
NW	0,212	0,240	0,210	0,243	0,306	-0,179	0,115	0,615	0,417	

Analiza pomoću molekularnih biljega - *Analysis with molecular markers*

Genetska identifikacija (genotipizacija) klonova u plantaži - *Genetic identification of clones in the clonal seed orchard*

Genotipizacijom svih rameta ustanovljeno je da 37 od ukupno 136 uzoraka ne odgovara navedenom klonu u nacrtu plantaže, tj. da je u plantaži pogrešno označeno 27,2 % rameta. Tri pogrešno označene ramete su po svom genotipu pridružene drugim klonovima, a preostala 34 pogrešno označena uzorka nisu pripala niti jednom klonu i imali su međusobno različite genotipove. Od deset jedinki u kojih su uzorkovane dvije grane zbog niske rašlje sedam je na obje grane imalo isti genotip koji je pripadao odgovarajućem klonu. Jedna jedinka imala je na obje grane isti genotip, ali nije pripadala klonu po nacrtu, a dvije su imale različite genotipove na dvije grane, od kojih je jedan pripadao odgovarajućem klonu. Nacrt plantaže s unesenim promjenama prikazan je na Slici 2.

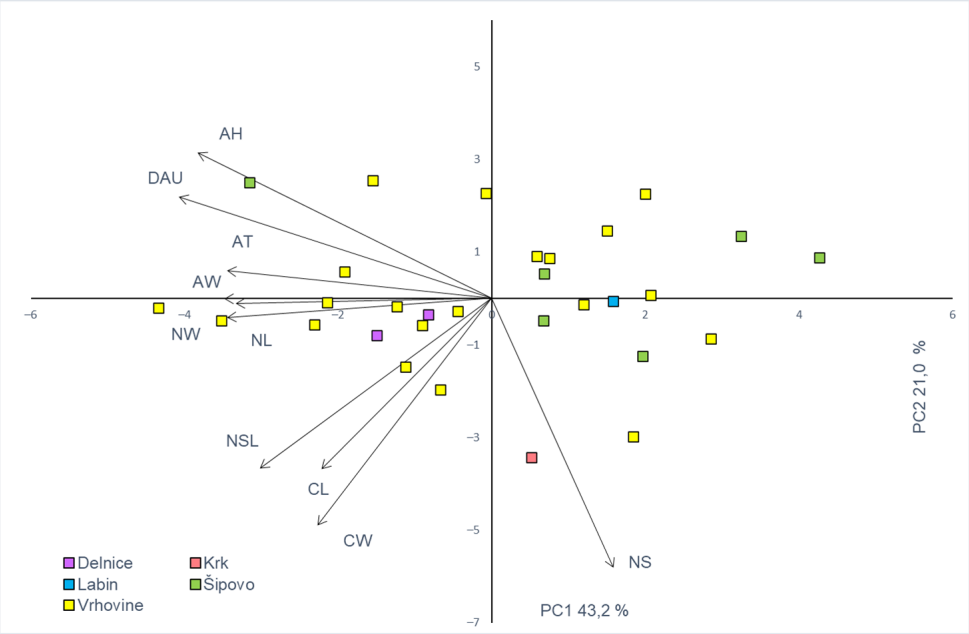
Raznolikost mikrosatelitskih biljega - *Microsatellite markers diversity*

U Tablici 7 prikazani su parametri mikrosatelitskih biljega. Najveći broj alela i informacijski sadržaj polimorfizma imali su biljezi PtTx3020 i PtTx3013. Od polimorfnih alela najmanji broj imao je biljeg SPAC12.5. Sve skupa za svih pet biljega nađeno je 39 alela.

Tablica 6. Pearsonovi korelacijski koeficijenti između 10 morfoloških svojstava češera i iglica i prve četiri glavne sastavnice. Morfološka svojstva: CL–dužina češera; CW–širina češera; AW–širina štitića; AH–visina štitića; DAU–udaljenost od sredine grbice do vrha štitića; NS–broj sjemenih ljusaka; AT–debljina štitića; NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NW–širina iglice.

Table 6 Pearson's correlation coefficients between 10 morphological traits of cones and needles and the first four principal components. Morphological traits: CL–cone length; CW–cone width; AW–width of cone scale apophysis; AH–height of cone scale apophysis; DAU–distance between umbo and scale top; NS–number of cone scales; AT–thickness of cone scale apophysis; NL–needle length; NSL–basal sheath length; NW–needle width.

Svojstvo *Trait*	PC–glavna sastavnica *PC–Principal Component*			
	PC1	PC2	PC3	PC4
CL	-0,462	-0,534	-0,557	0,279
CW	-0,472	-0,711	-0,063	-0,142
AW	-0,724	0,000	-0,417	0,316
AH	-0,797	0,456	-0,273	-0,061
DAU	-0,847	0,317	-0,205	-0,158
NS	0,329	-0,842	-0,118	-0,274
AT	-0,716	0,087	-0,061	-0,598
NL	-0,716	-0,060	0,522	0,363
NSL	-0,627	-0,533	0,389	0,059
NW	-0,692	-0,015	0,531	-0,097
Svojstvena vrijednost *Eigenvalue*	4,32	2,10	1,33	0,80
Varijanca (%) *Variance (%)*	43,2	21,0	13,3	8,0
Kumulativna varijanca (%) *Cumulative Variance (%)*	43,2	64,2	77,5	85,5



Slika 1. Dijagram analize glavnih sastavnica na temelju 10 morfoloških svojstava češera i iglica. Morfološka svojstva: CL–dužina češera; CW–širina češera; AW–širina štitića; AH–visina štitića; DAU–udaljenost od sredine grbice do vrha štitića; NS–broj sjemenih ljusaka; AT–debljina štitića; NL–dužina iglice; NSL–dužina rukavca; NW–širina iglice.

Figure 1 Diagram of PCA analysis based on 10 morphological traits of cones and needles. Morphological traits: CL–cone length; CW–cone width; AW–width of cone scale apophysis; AH–height of cone scale apophysis; DAU–distance between umbo and scale top; NS–number of cone scales; AT–thickness of cone scale apophysis; NL–needle length; NSL–basal sheath length; NW–needle width.

Kombinirani PI (probability of identity) za svih pet biljega bio je 0,00005339.

Raznolikost genotipova klonova u klonskoj sjemenskoj plantaži - *Genetic diversity of clones in the clonal seed orchard*

Prosječni broj alela (N_a) u plantaži bio je 7,6, primijećena heterozigotnost (H_O) iznosila je 0,613, a očekivana heterozigotnost (H_E) 0,646. Koeficijent inbreedinga (F_{IS}) bio je 0,064. Na Slici 3 prikazano je nezakorijenjeno Neighbor-joining stablo izrađeno na temelju udjela zajedničkih alela (proportion of shared alleles, PSA).

RASPRAVA
DISCUSSION

Provedenim istraživanjem utvrđena je velika morfološka varijabilnost iglica i češera crnog bora u klonskoj sjemenskoj plantaži na otoku Krku. Rezultati su pokazali da se klonovi i izvorne populacije mogu razlikovati za sva istraživana morfološka svojstva. Pet podvrsta crnog bora tradicionalno je prepoznato na temelju morfoloških i molekularnih razlika (Vidaković 1957, Liber 2000, Idžojtić 2001, Liber i dr. 2003, Bogunić i dr. 2007, Scotti-Saintagne i dr. 2019) koje su geografski odvojene i prilagođene različitim klimatskim uvjetima. Od ukupnog broja podvrsta, u Hrvatskoj prirodno rastu dvije, subsp. *nigra* i subsp. *dalmatica*, a vrijednosti za dimenzije iglica i češera dobivene u ovom istraživanju odgovaraju vrijednostima koje se navode u dendrološkoj literaturi za tipsku podvrstu (Vidaković 1993, Liber 2000). Navedena podvrsta prilagođena je stanišnim uvjetima submediteranskog područja, pa je korištenje genetski oplemenjenog materijala iz klonske sjemenske plantaže Krk za proizvodnju sjemenskog materijala i sadnica za pošumljavanje tih područja opravdano i optimalno.

Klonske sjemenske plantaže objedinjuju dva ključna cilja: proizvodnju genetski oplemenjenog materijala i *ex-situ* očuvanje genetske raznolikosti ciljne vrste. Ciljevi oplemenjivanja postižu se odabirom fenotipski superiornih jedinki za svojstva od interesa, njihovim vegetativnim umnožavanjem (najčešće cijepljenjem kod šumskog

Tablica 7. Raspon alela, broj alela (N_a), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC), vjerojatnost jednakosti – očekivanje učestalosti jednakih parova genotipova u analiziranoj populaciji (probability of identity; PI).
Table 7 Allele range, number of Alleles (N_a), polymorphism information content (PIC), probability of identity; PI - expectation of frequency of equal pairs of genotypes in the analysed population.

Biljeg *Marker*	Raspon alela *Allele range*	N_a	PIC	PI
PtTx3107	259-283	6	0,404	0,349
PtTx3013	114-158	11	**0,700**	0,099
PtTx3020	84-109	13	**0,851**	0,030
PtTx3049	203-213	5	0,588	0,185
SPAC12,5	252-260	4	0,477	0,274
				0,00005339*

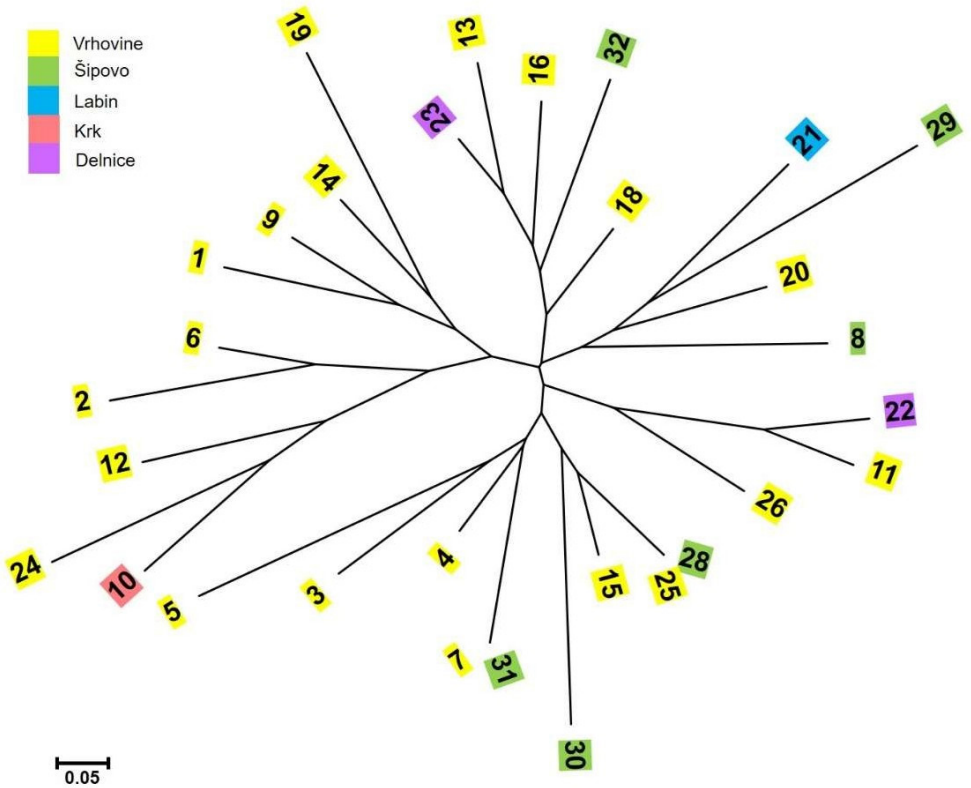
podebljano – PIC > 0,7, visoko informativni biljeg / *bold PIC > 0.7, highly informative marker*
*kombinirano za svih pet biljega / **all five markers combine*

RED *LINE*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	5	6	7	8	6									
2	19	20	21	22	23	31	25	35	4	28	29	7		
3	1	2	4	17	5	6	4	3	9	33	11	12	13	14
4	15	16	35	18	9	20	21	17	23	24	25	26	34	28
5	29	30	31	32	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6	17	19	13	28	32	16	15	18	19	20	25	22	23	24
7	25	16	4	26	22	30	31	32	1	7	3	4	5	6
8	7	8	9	20	11	29	13	14	15	16	32	18	19	20
9	21	23	12	24	25	26	27	28	19	30	31	32	21	2
10	3	4	12	6	7	8	9	17	11	18	13	14	15	16
11	11	16	19	15	21	22	23	12	25	13	13	28	29	30
12	25	32	1	2	3	4	5	6	7	8				
13	13	14	27	16										

Legenda	
x	krivi genotip, nepoznati - podloga *wrong genotype, unknown - rootstock*
x	krivi genotip, pripada drugom klonu, upisan novi točan broj klona kojem pripada *wrong genotype, belonging to another clone, the correct clone number is written*
x	nedostaje biljka *missing plant*
x	rašljavo stablo kod kojeg je samo jedna glavna grana pravi genotip, a drugu treba ukloniti *Fork tree, just one branch belonging to the correct genotype, other needs to be removed*

Slika 2. Nacrt plantaže nakon provedenih DNA analiza.
Figure 2 Orchard plan after DNA analysis.

drveća) te njihovim međusobnim razmnožavanjem radi proizvodnje potomstva s očekivanom genetskom dobiti za ciljana svojstva. Ukoliko se u plantažama proizvodi reprodukcijski materijal za unošenje u prirodne sastojine, a ne samo za brzu plantažnu proizvodnju drvne mase, od velike važnosti je genetska raznolikost početnog materijala unesenog u plantažu. Plantaža kao reprodukcijska populacija mora imati dovoljnu genetsku raznolikost kako bi genetska baza za proizvodnju potomstva omogućila prilagodljivost potomstva promjenjivim uvjetima okoliša i otpornost na štetnike.



Slika 3. Nezakorijenjeno Neighbor–Joining stablo izrađeno na temelju udjela zajedničkih alela (proportion of shared alleles, PSA).
Figure 3 Unrooted Neighbour-Joining tree based on the proportion of shared alleles (proportion of shared alleles, PSA).

U tom je procesu ključno osigurati da vegetativne kopije odabranih jedinki budu pouzdano uključene u plantažu kako bi se moglo garantirati porijeklo reprodukcijskog materijala, bilo za primjenu u operativnom šumarstvu ili za daljnje cikluse oplemenjivanja, poput postavljanja klonskih testova. U postupku osnivanja i popunjavanja plantaža postoji mnogo koraka u kojima može doći do grešaka. Prilikom sabiranja plemki s plus stabala (orteta) može se dogoditi pogrešno označavanje. U rasadnicima, tijekom cijepljenja, mogu nastati pogreške u označavanju, a moguće su i situacije poput odumiranja plemke, nakon čega podloga nastavlja rasti, što se može pogrešno interpretirati kao razvoj cijepa. Pogreške se mogu pojaviti i tijekom transporta i sadnje biljaka u plantažu. Nadalje, može se dogoditi nezapaženo preuzimanje podloge te odumiranje plemke nakon što su biljke već posađene na terenu, što dodatno komplicira situaciju.

Ako je moguće, u slučaju kada plantaže nisu prevelike, poželjno je genotipizirati biljke kako bi se ustanovilo jesu li neke od tih grešaka rezultirale pogrešno označenim rasporedom na nacrtu, koji dovodi do daljnjih grešaka, s obzirom na to da se plemke za nadopunu plantaže skupljaju u samoj plantaži, a ne više na izvornom plus stablu. Ako se plemke skupljaju s pogrešne ramete, to dovodi do daljnjeg širenja grešaka, a u slučaju postavljanja genetičkog testa do potpuno nepouzdanih rezultata izmjera u testu.

U ovom istraživanju genotipizirane su sve jedinke (ramete) u plantaži crnog bora i ustanovljeno je da je čak 27,2 % rameta krivo označeno, tj. da ne pripadaju klonu s nacrta. Samo su tri krivo svrstane jedinke zapravo bile pripadnice drugog klona, što možemo pripisati greški označavanja u nekoj od faza od uzimanja plemke do sadnje. Ostale 34 jedinke imale su različite genotipove koji ne pripadaju ni jednom klonu. Razlog za to može biti greška označavanja u rasadniku, ali vjerojatnije je da je na tim jedinkama došlo do odumiranja plemke i da su te jedinke zapravo stabalca izrasla iz podloge. U slučaju nekih nisko rašljavih stabala došlo je do situacije

da je jedna glavna grana porijeklom iz podloge, dok je druga izrasla iz plemke. U takvim slučajevima potrebno je odstraniti granu iz podloge kako bi preostali genotip zaista predstavljao selekcionirani klon.

Nacrt plantaže potrebno je ispraviti tako da se ramete pripisane pogrešnom klonu označe kao klon kojem zaista pripadaju. Sve jedinke nepoznatog porijekla i genotipa potrebno je ukloniti iz plantaže, a buduće plemke za nadopunjavanje plantaže trebaju se uzimati isključivo sa sada potvrđenih rameta. Genetska raznolikost klonova u plantaži, izražena kao očekivana heterozigotnost (H_E), iznosila je 0,646, što je približno vrijednostima koje su u prirodnim populacijama utvrdili Giovannelli i dr. (2017) i Dias i dr. (2020). Neighbor-joining stablo nije pokazalo jasno grupiranje prema izvornim populacijama, osim što su se na jednu granu (lijevu) uglavnom grupirali klonovi iz gospodarske jedinice (GJ) Vrhovine, koji značajno prevladavaju u plantaži. Na istu granu svrstao se i jedini klon s Krka. Klonovi iz ostalih područja bili su raspoređeni po drugim granama, zajedno s ostalim klonovima iz GJ Vrhovine. Provedenom morfometrijskom analizom također nije utvrđeno grupiranje stabala prema pripadnosti izvornim populacijama. Bez obzira na zabilježenu veliku morfološku i genetsku varijabilnost unutar klonske sjemenske plantaže, preporučuje se povećanje genetske baze selekcijom dodatnih plus stabala i uključivanjem klonova iz novih populacija, posebno iz područja u kojem se plantaža nalazi. Naime, većina klonova u plantaži potječe iz jedne populacije, uz male primjese drugih, što naglašava potrebu za daljnjim proširenjem genetske raznolikosti.

ZAKLJUČCI

CONCLUSIONS

- Provedenim istraživanjem utvrđeno je da se klonovi i izvorne populacije na osnovi morfologije iglica i češera statistički značajno razlikuju.
- Dimenzije iglica i češera ukazuju na to da klonovi u istraživanoj sjemenskoj plantaži pripadaju tipskoj podvrsti crnog bora.
- U klonskoj sjemenskoj plantaži pogrešno je označeno 27,2 % jedinki (rameta). Tri su svrstane pod druge klonove kojima zaista pripadaju, dok su ostale imale nepoznate genotipe, vjerojatno potekle iz podloge. Sve takve jedinke potrebno je odstraniti iz plantaže i zamijeniti pravim rametama klona prema nacrtu.
- Kod primjeraka s niskom rašljom, gdje su dvije grane imale različite genotipove, od kojih samo jedan pripada klonu po nacrtu, potrebno je odstraniti granu s nepripadajućim genotipom jer je potekla iz podloge.
- Klonovi u plantaži potječu iz vrlo ograničenog broja populacija, od kojih su neke slabo zastupljene.
- Preporučuje se proširenje genetske baze novoselekcioniranim klonovima.
- Multivarijatnim statističkim metodama nije utvrđeno grupiranje klonova na temelju njihove pripadnosti izvornim populacijama.

ZAHVALE

ACKNOWLEDGMENT

Autori zahvaljuju na svesrdnoj pomoći mr. sc. Zdravku Brekalu. Zahvaljujemo i djelatnicima Šumarije Krk.

Istraživanje je financirala tvrtka Hrvatske šume d.o.o., u okviru ugovora o pružanju usluga stručnog nadzora pri provedbi programa gospodarenja šumskim sjemenskim objektima u kategoriji „kvalificiran" (klonske sjemenske plantaže) i „testiran" s ciljem proizvodnje istoimenog šumskog reprodukcijskog materijala, temeljem Zakona o šumskom reprodukcijskom materijalu (Narodne novine, broj: 75/2009, 61/2011, 56/2013, 14/2014, 32/2019 i 98/2019).

LITERATURA

REFERENCES

- Bogunić, F., E. Muratović, D. Ballian, S. Siljak-Yakovlev, S.C. Brown, 2007: Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold s.l. Environmental and Experimental Botany 59 (3): 354–360. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.04.006
- Dias, A., G. Giovannelli, B. Fady, I. Spanu, G.G. Vendramin, F. Bagnoli, A. Carvalho, M.E. Silva, J. Lima-Brito, J.L. Lousada, M.J. Gaspar, 2020: Portuguese *Pinus nigra* J.F.Arnold populations: genetic diversity, structure and relationships inferred by SSR markers. Annals of Forest Science 77: 1–15. https://doi.org/10.1007/s13595-020-00967-9
- Enescu, C.M., D. de Rigo, G. Caudullo, A. Mauri, T. Houston Durrant, 2016: *Pinus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In (San-Miguel-Ayanz, J., D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, A. Mauri, eds.): European atlas of forest tree species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e015138+.
- Felsenstein, J., 2004: PHYLIP v3. 6. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle.
- Ganea, S., S.S. Ranade, D. Hall, S. Abrahamsson, M.R. García-Gil, 2015: Development and transferability of two multiplexes nSSR in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), Journal of Forestry Research 26: 361–368.
- GeneMapper® Software 5, 2012: Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts.
- Giovannelli, G., A. Roig, I. Spanu, G.G. Vendramin, B. Fady, 2017: A new set of nuclear microsatellites for an ecologically and economically important conifer: the European black pine (*Pinus nigra* Arn.). Plant Molecular Biology Reporter 35: 379–388.
- Herman, J., 1971: Šumarska dendrologija. Stanbiro, Zagreb.
- Idžojtić, M. 2001: Morphometrical analysis and needle volatiles composition of some hard pine species and their hybrids.

Glasnik za šumske pokuse: Annales Experimentis Silvarum Culturae Provehendis 38: 1–76.

- Isajev, V., B. Fady, H. Semerci, V. Andonovski, 2004: EUFORGEN technial guidelines for genetic conservation and use for European black pine (*Pinus nigra*). International Plant Genetic Resources Institute, Rim.
- Kalinowski, S.T., M.L. Taper, T.C. Marshall, 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology 16 (5): 1099–1106. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.
- Koutecký, P., 2015: MorphoTools: A set of R functions for morphometric analysis. Plant Systematics and Evolution 301: 1115–1121. https://doi.org/10.1007/s00606-014-1153-2
- Liber, Z., 2000: Filogenetski i taksonomski odnosi populacija crnog bora (*Pinus nigra* Arnold) u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Liber Z., T. Nikolić, B. Mitić, Z. Šatović, 2003: RAPD markers and black pine (*Pinus nigra* Arnold) intraspecies taxonomy – Evidence from the study of nine populations. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 72 (3): 249–257. https://doi.org/10.5586/asbp.2003.033
- McGarigal, K., S. Cushman, S. Stafford, 2000: Multivariate statistics for wildlife and ecology research. Springer Verlag, New York.
- Peakall, R., P.E. Smouse, 2012: GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics 28 (19): 2537–2539.
- R Core Team, 2017: R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. http://www.R-project.org/
- Scotti-Saintagne C., G. Giovannelli, I. Scotti, A. Roig, I. Spanu, 2019: Recent, Late Pleistocene fragmentation shaped the phylogeographic structure of the European black pine (*Pinus nigra* Arnold). Tree Genetics & Genomes 15 (5): 76. https://doi.org/10.1007/s11295-019-1381-2**
- Sokal, R.R., F.J. Rohlf, 1989: Biometry. Freeman and CO, San Francisco.
- StatSoft, Inc. 2001: STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.
- Vidaković, M., 1957: Oblici crnog bora u Jugoslaviji na temelju anatomije iglica. Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis 13: 111–248.
- Vidaković, M., 1993: Četinjače: morfologija i varijabilnost. Hrvatske šume, Zagreb.
- WinFolia TM, 2005: Regent Instruments Inc., Quebec, Canada, version PRO 2005b.

SUMMARY

The aim of this study was to assess the genetic diversity of clones within the clonal seed orchard of black pine (*Pinus nigra* J.F.Arnold, Pinaceae) located in the area of the Krk Forest Office, using morphological and molecular markers, and to conduct genetic identification (genotyping) of ramets to verify the accuracy of the orchard layout. The study included samples from 136 ramets across five populations. Microsatellite markers were used for the genotyping of clones, and morphometric analysis was carried out based on ten morphological traits of needles and cones. Significant differences were observed among clones and populations for all morphological traits examined. The average needle length was 89.8 mm, and the cones, averaging 55.7 mm in length and 26.8 mm in width, contained 106 seed scales. The orchard layout revealed 27.2% of mislabeled ramets, of which three belonged to different clones, while others had unknown genotypes. Main sources of error included scion die-off and growth of rootstock shoots, with labeling errors also being a possibility. Corrective actions should include proper labeling of misidentified ramets and the removal of individuals with unknown origins or genotypes. Future scions for orchard supplementation should be sourced exclusively from confirmed ramets. For specimens with branching discrepancies (where different genotypes were identified on two branches, one matching the designated clone), the incorrect branch must be removed as it originates from the rootstock. Comparisons with other studies on black pine using microsatellite markers indicate that the genetic diversity in the orchard (H_E = 0.646) aligns with values found in natural populations. Since most clones originate from a limited number of populations, with some poorly represented, expanding the genetic base with newly selected clones is recommended if the orchard is to be maintained. Multivariate statistical methods did not reveal grouping of clones based on their original population affiliations. The results of this study hold practical value for forestry as seed orchards serve as a suitable base for *ex situ* conservation of genetic diversity and the production of genetically superior seeds for stand restoration or natural regeneration support. The findings also highlight the importance of accurate clone labeling to avoid negative consequences in managing clonal seed orchards.

KEY WORDS: black pine, morphometric analysis, genetic analysis, microsatellites, clonal seed orchard, gene conservation