Morfološki i genetički dokazi hibridizacije između bijele (Alnus incana (L.) Moench) i crne johe (A. glutinosa (L.) Gaertn.) u Podravini

Viljevac, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:610250

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Barbara Viljevac

Morfološki i genetički dokazi hibridizacije između bijele (*Alnus incana*) i crne (*A. glutinosa*) johe u Podravini

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju za Filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkoga zavoda Biološkoga odsjeka Prirodoslovno-matematičkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja magistrice edukacije biologije i kemije.

Za sve što ovaj rad jest, iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Igoru Poljaku na nesebičnom i iznimnom trudu, pedantnosti i pozitivnoj energiji te svom mentoru prof. dr. sc. Zlatku Liberu na nepresušnom strpljenju, predanom radu, jednostavnoj, preciznoj i jasnoj komunikaciji te velikodušnosti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

MORFOLOŠKI I GENETIČKI DOKAZI HIBRIDIZACIJE IZMEĐU BIJELE (*ALNUS INCANA*) I CRNE (*A. GLUTINOSA*) JOHE U PODRAVINI

Barbara Viljevac
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U Podravini se jasno razlikuju sastojine bijele i crne johe, no ponegdje se mogu naći obje vrste u istim sastojinama. Cilj diplomskog rada je bio potvrditi ili osporiti postojanje hibridnih jedinki bijele i crne johe u Podravini, morfometrijskim i molekularnim pristupom. Morfometrijski pristup se temeljio na mjerenju i usporedbi 10 parametara lista, a molekularni na provedbi analize 12 mikrosatelitnih lokusa. U istraživanju su analizirane 102 jedinke iz pet populacija. U crne johe je zapažena veća genetička, a u bijele johe nešto veća morfološka raznolikost. Hibridno podrijetlo je dokazano za samo tri jedinke iz populacije bijele johe. Upotrebom Bayesovske analize populacijske strukture na molekularnim podacima bilo je moguće procijeniti razinu introgresije genoma crne johe u hibridnim jedinkama. Hibridne jedinke se razlikuju od roditeljskih vrsta po većoj površini plojke, dužini plojke mjerenoj od osnove do mjesta najveće širine te po dužini peteljke. Različitim antropogenim zahvatima na području nizinskih šumskih ekosustava u Podravini nepovratno su promijenjene stanišne prilike pa osobine hibrida bijele i crne johe kao što su veća otpornost na sušu i na bolesti korijena, manji zahtjevi za kvalitetom tla te dobre fizičko-tehničke osobine drva, čine ovu svojtu prihvatljivim izborom za obnavljanje šuma u Podravini.

(XX stranica, xx slika, xx tablica, xx literaturnih navoda)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: crna i bijela joha, genetička raznolikost, morfološka raznolikost, hibridizacija

Voditelj: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Ocjenitelji: 1. prof. dr. sc. Zlatko Liber (mentor)
2. xx
3. xx

Rad prihvaćen: xx. xx. 2020. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

MORPHOLOGICAL AND GENETIC EVIDENCES OF HYBRIDIZATION BETWEEN GREY (*ALNUS INCANA*) AND BLACK ALDER (*A. GLUTINOSA*) IN PODRAVINA REGION

Barbara Viljevac
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

In the Podravina region, white and black alder stands are clearly distinguished, although sporadically both species can be found in the same stand. Aim of this graduation thesis was to confirm or deny the existence of black and white alder hybrid individuals in the Podravina region by morphometric and molecular approaches. The morphometric approach was based on the measurements and comparison of 10 leaf parameters, while the molecular one was based on the analysis of 12 microsatellite loci. The study analyzed 102 individuals from the five populations. In the black alder was observed a higher genetic while in the grey alder slightly higher morphological diversity. Hybrid origin has been proven only for three individuals in a grey alder population. Bayesian analysis of population structure on molecular data allowed the assessement of the level of introgression of the genome of black alder in hybrid individuals. Hybrid individuals differ from the parental species by the larger surface of the leaf blade, the length of the blade from the base to the point of the maximum leaf width and by the length of the petiole. Various anthropogenic interventions in the area of lowland forest ecosystems in Podravina region irreversibly changed the habitat conditions and because of that the characteristics of the hybrid of the grey and black alder, such as higher resistance to the drought and the root diseases, lower requirements for soil quality and good physical and technical characteristics of the wood, make this taxon an acceptable choice for the regeneration of the forests in the Podravina region.

(**x** pages, **x** figures, x tables, x references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: black and grey alder, genetic diversity, morphological diversity, hybridization

Supervisor: Full Professor Zlatko Liber, PhD

Reviewers: 1. Full Professor Zlatko Liber, PhD
2.
3.

Thesis accepted: xxx 2020

Sadržaj

1. UVOD 9

1.1. OSNOVNE OSOBINE RODA *Alnus* Mill. 10

1.2. ROD *Alnus* Mill. U FLORI HRVATSKE 12

1.3. DNA-BILJEZI 16

1.3.1. Mikrosatelitni biljezi 16

2. CILJ RADA 19

3. MATERIJALI I METODE 21

3.1. BILJNI MATERIJAL 22

3.2. MORFOLOŠKA ANALIZA LISTA 23

3.3. IZOLACIJA BILJNE DNA 24

3.4. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM 25

3.5. DETEKCIJA MIKROSATELITNIH BILJEGA 27

3.6. STATISTIČKA ANALIZA MORFOLOŠKIH PODATAKA 28

3.6.1. Deskriptivna statistika 28

3.6.2. Analiza varijance (ANOVA) 28

3.6.3. Diskriminantna analiza 29

3.7. STATISTIČKA ANALIZA MOLEKULARNIH PODATAKA 30

3.7.1. Deskriptivna statistika 30

3.7.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA) 30

3.7.4. Bayesovska analiza populacijske strukture 31

4. REZULTATI 32

4.1. MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST LISTA 33

4.1.1. Deskriptivna statistika 33

4.1.2. Analiza varijance (ANOVA) 38

4.1.3. Diskriminantna analiza 41

4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST POPULACIJA 44
4.2.1. Deskriptivna statistika 44
4.2.2. Genetička diferencijacija 45
4.2.3. Analiza molekularne varijance (AMOVA) 46
4.2.4. Faktorijalna analiza korespodencije (FCA) 46
4.2.5. Bayesovska analiza genetičke strukture 47
4.3. MORFOLOŠKE OSOBINE LISTA HIBRIDNIH JEDINKI SVOJTE *Alnus x pubescens* Tausch 49
5. RASPRAVA 52
6. ZAKLJUČCI 56
8. POPIS LITERATURE 58
9. ŽIVOTOPIS 65

Popis kratica:

AMOVA (eng. *Analysis of Molecular Variance*)**,** analiza molekularne varijance, metoda određivanja genetičke raznolikosti između vrsta te između i unutar svih analiziranih populacija

ANOVA (eng. *Analysis of variance*), analiza varijance, metoda određivanja statistički značajnih odstupanja varijanci određenog uzorka od varijance ukupnog uzorka

PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*), lančana reakcija polimerazom, postupak umnožavanja malih dijelova DNA ponavljanjem ciklusa sinteze *in vitro*

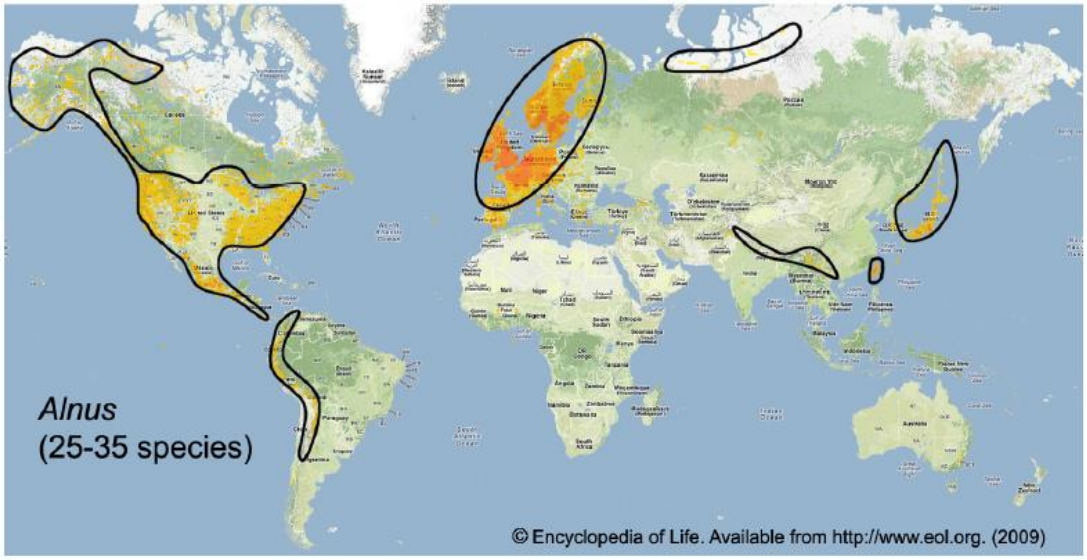
SSR (eng. *Simple Sequence Repeats*), jednostavne ponovljene sekvence ili mikrosateliti

STR (eng. *Short Tandem Repeats*), kratka uzastopna ponavljanja

1. UVOD

1.1. OSNOVNE OSOBINE RODA *Alnus* Mill.

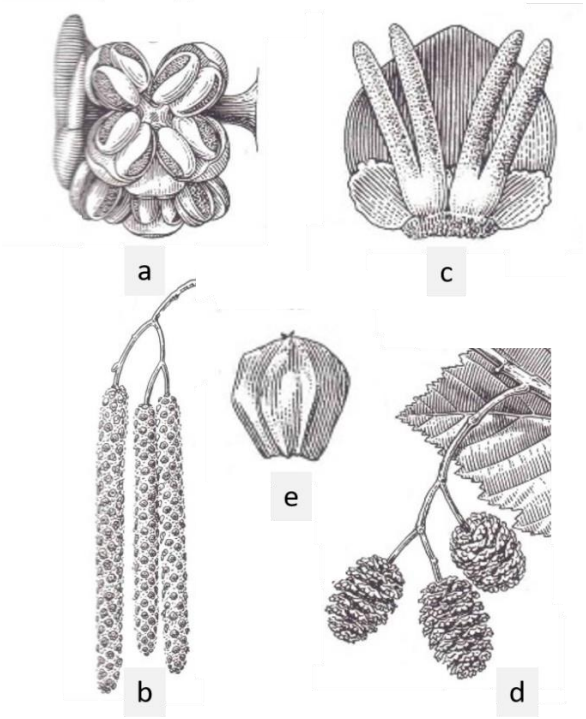
Joha (*Alnus* Mill.) je rod porodice *Betulaceae,* reda *Fagales* te nadreda *Rosanae* unutar velike skupine pravih dvosupnica (Byng i sur. 2016). Unutar ovog roda prisutno je do 35 drvenastih vrsta rasprostranjenih diljem umjerenog kontinentalnog područja sjeverne hemisfere te u Andama na južnoj hemisferi (Slika 1).



Slika 1. Rasprostranjenost vrsta roda *Alnus.* Najvažniji centri rasprostranjenja su okruženi crnim linijama (Hiltbrunner i sur. 2014).

Sve vrste ovog roda su monecične biljke s neuglednim anemofilnim cvjetovima. Zbog neselektivnosti oprašivanja vjetrom potrebna je veća proizvodnja peluda pa vrste ovog roda posjeduju neugledne jednospolne cvjetove gusto pakirane u cvatove dihazije, a brojni dihaziji oko izdužene osi dodatno formiraju složenije cvatove poznate kao rese. Muški cvjetovi sastoje se od četiri prašnika okruženih s četiri srasle brakteje, koji tvore trocvjetne dihazije (Slika 2a), a veći broj dihazija formira sastavljeni cvat mušku resu (Slika 2b). Ženski cvjetovi su apetalni, a sastoje se od podrasle plodnice od dva plodna lista koja u gornjem dijelu završava s izrazito dugom dvodijelnom njuškom. Ženski dihazij se sastoji od dva cvijeta jer je središnji u pravilu sterilan (Slika 2c). Više desetina ženskih dihazija izgrađuju sastavljeni cvat žensku resu (Slika 2d). Nakon oprašivanja i oplodnje razvija se slabo okriljeni i spljošteni plod oraščić (Slika 2e), a brakteje dihazija odrvene formirajući drvenastu strukturu karakterističnu za cijeli rod *Alnus*.

Vrste roda *Alnus* su ekonomski vrijedne kao izvor ogrjevnog drva i građevinskog materijala otpornog na vlagu, ali njihova najveća vrijednost je u šumarstvu gdje se koriste kao pionirske vrste. Naime, zahvaljujući bakterijama roda *Frankia* (Actinomycetales) smještenih u kvržicama korijenja i sposobnih za fiksaciju atmosferskog dušika (Slika 3), johe su važne za dušičnu gnojidbu tla na kojem rastu (Benson i sur. 2004).



Slika 2. Građa cvijeta, cvata, sastavljenog cvata i ploda crne johe. **a)** tri muška cvijeta u cvatu dihaziju, **b)** muške rese **c)** dva ženska cvijeta unutar cvata dihazija, **d)** potpuno zrele i otvorene ženske rese, **e)** plod oraščić (prilagođeno iz Potočić 1980).



Slika 3. Kvržice s bakterijama roda *Frankia* u simbiozi s korijenom johe. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Frankia_alni_20131230.jpg)

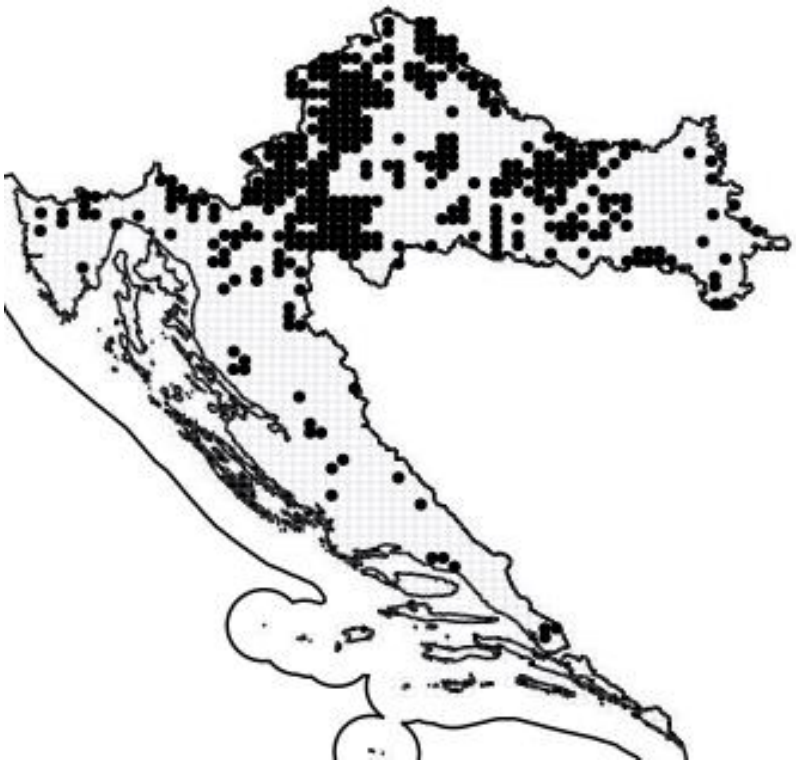
1.2. ROD *Alnus* Mill. U FLORI HRVATSKE

U flori Hrvatske zabilježene su tri vrste joha: crna (*Alnus glutinosa* /L./ Gaertn.), bijela (*Alnus inca*na /L./ Moench) i zelena (*Alnus alnobetula* (Ehrh.) K.Koch). Ove vrste moguće je pronaći u različitim ekološkim uvjetima kontinentalnoga područja; od nizinskog područja sjeverne Hrvatske, obronaka Žumberačkog gorja i Papuka do alpsko-dinarskog područja uz rijeku Kupu i njezine pritoke.

Crna joha ili jalša je drvenasta, jednodomna biljka koja doseže visinu i do 30 m. Kora debla je tamnosiva do tamnosmeđa, uzdužno i poprečno izbrazdana i ljuskava (Slika 4a). Listovi su karakterističnog oblika s tupim do srcoliko urezanim vrhom, ljepljivi, goli i sjajni (Slika 4b). Kao i u svih vrsta joha i crna joha ima jednospolne, anemofilne cvjetove koji formiraju dihazije, a oni muške i ženske rese (Slika 4b). Crna joha preferira vlažna, duboka, humozna tla neposredno uz potoke i rijeke. U Hrvatskoj su šume crne johe rasprostranjene na približno 8000 ha (Prpić i Milković 2005), a šumarski najvrjednije sastojine su u Podravini (Vukelić i sur. 2006) (Slika 5).



Slika 4. Morfološke osobine crne johe. **a)** ljuskava kora debla (autor I. Poljak), **b)** oblik lista, građa muške ♂ i ženske rese ♀ u različitim razvojnim stadijima (prilagođeno iz Hempel i Wilhelm 1889).



Slika 5. Rasprostranjenost crne johe u Hrvatskoj (Nikolić 2015).

Bijela ili siva joha u prosjeku naraste do 10 m, a vrlo rijetko doseže visinu od 25 m. Kora debla je svjetlosiva, glatka, s brojnim bjelkastim lenticelama (Slika 6a), kasnije tamnosiva i plitko uzdužno ispucala. Listovi su karakterističnog ušiljenog vrha i gusto dlakavi na naličju (Slika 5b). Muški i ženski cvjetovi su slične građe kao i u crne johe, a formiraju gotovo identične dihazije koji su osnovna građevna jedinica sastavljenih muških i ženskih resa (Slika 6b). Bijela joha u šumskoj vegetaciji Hrvatske raste u dvama orografski i fitogeografski jasno ograničenim arealima (Slika 7): uz tok rijeke Drave na nadmorskoj visini od 100 do 190 m te u gorskom području uz rijeku Kupu i njezine pritoke od 220 do 550 m nadmorske visine (Vukelić i sur. 2018). Bijela joha, izbjegavajući staništa s visokom razinom podzemne vode, više voli pjeskovita tla.

Zelena joha (zelena jošica, alpska jošica, alpska joha) je listopadni grm koji naraste do 3 m. Kora ove vrste je u mladosti siva i glatka s izraženim lenticelama, a s vremenom tamnija i naborana. Listovi su široko jajasti do široko eliptični, obostrano zeleni, nepravilno dvostruko našiljenog ruba. Građa jednospolnih cvjetova, dihazija i sastavljenih resa je gotovo istovjetna kao i u svih ostalih vrsta ovog roda (Slika 8). Muške nerazvijene rese i drvenaste tvorevine u kojima se nalaze plodovi pokriveni su

karakterističnom bijelom, čvrstom i smolavom prevlakom. Zelena joha raste na kiselim i vlažnim tlima na otvorenim staništima ili na rubovima šuma. Jedini poznati lokalitet ove vrste u Hrvatskoj je Sveta Gera, najviši vrh Žumberka (Poljak i sur. 2018a).



Slika 6. Morfološke osobine bijele johe. **a)** svjetlosiva kora s izraženim lenticelama (autor I. Poljak), **b)** oblik lista, građa muške (♂) i ženske rese (♀) u različitim razvojnim stadijima (prilagođeno iz Hempel i Wilhelm 1889).



Slika 7. Rasprostranjenost bijele johe u Hrvatskoj (Nikolić 2015).



Slika 8. Dio herbarijskog primjerka zelene johe (Herbarium Croaticum ZA) s jasno vidljivim morfološkim osobinama lista te nerazvijenim muškim resama i drvenastim tvorevinama u kojima se nalaze plodovi (Nikolić 2015).

Na staništima gdje se pojavljuju crna i bijela joha zapaženi su njihovi križanci koji su najčešće opisivani pod imenom *Alnus* × *pubescens* Tausch (Alegro i sur.2006, Poljak i sur. 2014). Morfološkom analizom populacija bijele i crne johe u Podravini, utvrđena je prisutnost jedinki s prijelaznim značajkama koje bi mogle biti hibridne, međutim dodatna, a prije svega genetička istraživanja ovog fenomena nisu još provedena (Poljak i sur. 2014a).

1.3. DNA-BILJEZI

DNA biljeg (eng. DNA marker) je polimorfan dio molekule DNA jedinki određenih klasifikacijskih kategorija (npr. rod, vrsta, podvrsta itd.) čijom se analizom dobiva uvid u razinu srodnosti istraživanih kategorija. Različiti polimorfni oblici DNA-biljega se nazivaju alelima, a njihove pozicije na molekulama DNA (kromosomima) se nazivaju lokusom. Idealan DNA-biljeg u sebi ujedinjuje sljedeća svojstva: brzo i lako uočavanje svih alela, mogućnost uočavanja alela u svim razvojnim stadijima istraživanog organizma, odsustvo interakcije s drugim biljezima (Šatović 1999). Osim navedenih svojstava visoko informativni DNA-biljezi trebaju biti ponovljivi, dovoljno polimorfni i po mogućnosti kodominantni.

DNA-biljezi i uz pomoć njih utvrđena genetička raznolikost i struktura biljnih populacija, omogućili su bolje razumijevanje evolucijske povijesti, geografske distribucije i ekoloških potreba vrste. Isto tako, DNA-biljezi upotrebljavaju se za razlikovanje blisko srodnih vrsta te dokazivanje hibrida među njima, čime se značajno osnažilo naše razumijevanje genetičke osnove specijacije i efekta introgresije na integritet vrste (Turchetto i sur. 2016; Radosavljević i sur. 2019).

Danas postoji veliki broj molekularno-bioloških tehnika za tvorbu lako uočljivih, polimorfnih i ponovljivih DNA-biljega. Do sada su u različitim istraživanjima divljih biljnih populacija najčešće upotrebljavani sljedeći DNA-biljezi : 1) AFLP biljezi (eng. *Amplified Fragment Lenght Polymorphisms*) (Vos i sur. 1995), 2) mikrosatelitni ili SSR-biljezi (eng. *Simple Sequence Repeats*), te SNP-biljezi ili polimorfizam jednog nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*). Za mikrosatelitne biljege može se reći da su od svih DNA-biljega najduže i najčešće upotrebljavani. Zašto je to tako? Odgovor treba tražiti u činjenici da oni ispunjavaju sve uvjete najboljeg DNA-biljega: laku uočljivost, polimorfnost, ponovljivost i kodominantnost.

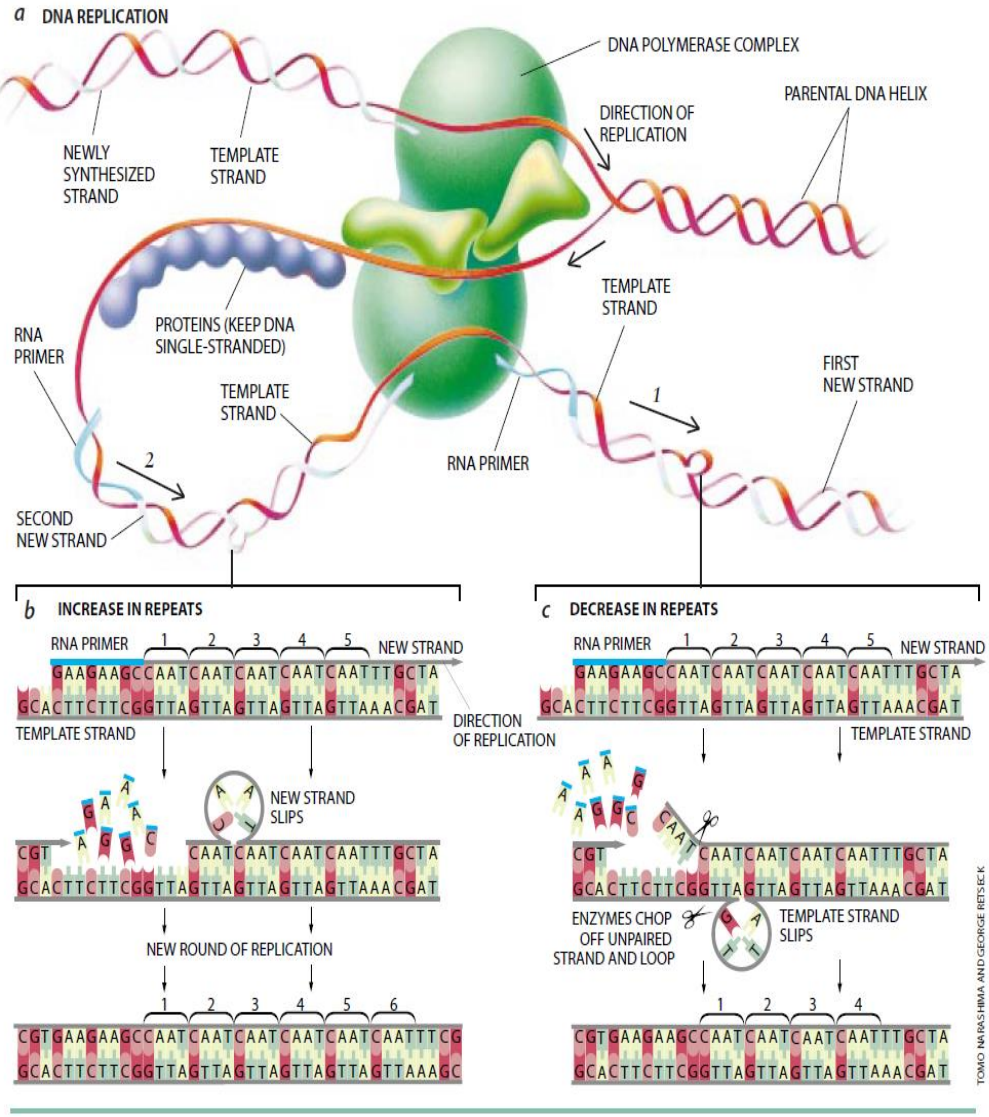
1.3.1. Mikrosatelitni biljezi

Mikrosateliti su kratka uzastopna ponavljanja nukleotidnog motiva od 1-6 pb koja najčešće nisu dulja od 30 ponavljanja (Ellegren 2002). Jedno (mono-), dva (di-), tri (tri-) i četiri (tetra-) nukleotidna ponavljanja su najčešći tipovi mikrosatelita, ali i pet (penta-) i šest (heksa-) nukleotidna ponavljanja su isto tako klasificirana kao mikrosateliti, dok se duža ponavljanja smatraju minisatelitima, a jako duge forme

satelitnom DNA. Mikrosatelitni biljezi se u literaturi još nazivaju jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. *Simple Sequence Repeats*, skračenica SSR) i kratka uzastopna ponavljanja (eng. *Short Tandem Repeats*, skračenica STR). Premda su mikrosateliti prisutni u genomima svih organizama, osobito su česti u eukariota (npr. ljudski genom sadrži više od 100 000 ovakvih lokusa). Zbog izuzetno velike mutacijske stope ($\approx 10^{-3}$–10^{-4} po lokusu po generaciji), mikrosatelitni lokusi ističu se velikom polimorfnošću u populacijama, a to ih uz osobine kao što su ponovljivost i kodominantnost čini gotovo idealnim DNA-biljezima.

Zašto je mutacijska stopa mikrosatelita tako visoka i po kojem evolucijskom modelu dolazi do mutacija još nije u potpunosti razjašnjeno. Danas se smatra da mehanizam replikacijskog klizanja (eng. *replication slippage*) najbolje objašnjava nastanak učestalih polimorfizama unutar ovih regija (Slika 9). Replikacijsko klizanje je rezultat nesavršenog rada DNA polimeraze. Naime, tijekom replikacije dolazi do prolaznog razdvajanja i proklizavanja DNA lanca što dovodi do krivog sparivanja lanaca, a to za posljedicu ima stvaranje omče na jednom lancu. U sljedećim replikacijskim ciklusima omča može poslužiti kao kalup ili se može pojaviti na rastućem lancu. U prvom slučaju doći će do smanjenja broja mikrosatelitnih ponavljanja, a u drugom do povećanja. Većinu takvih mutacija popravlja tzv. *mismatch repair system*, tako da samo mali broj njih završava kao mutacijski događaj. Što se tiče evolucijskog modela za mnoge genetičke analize točno poznavanje mutacijskog mehanizma nije ni važno, no neke analize, kao što su one koje se temelje na procjeni frekvencije alela (npr. procjena F_{ST} vrijednosti) zahtijevaju prethodni izbor mutacijskog modela (npr. *Infinite Allele Model*, Kimura i Crow 1964; *Stepwise Mutation Model*, Ohta i Kimura 1973; *Two-Phase Model*, Di Rienzo i sur. 1994).

Mikrosateliti su otkriveni krajem 80-tih godina prošlog stoljeća, a već nekoliko godina nakon toga su okarakterizirani upotrebom PCR-a (Weber i May 1989). Od tog vremena pa do danas, mikrosateliti su postali i ostali neizostavni u genetičkim mapiranjima, populacijskoj genetici i forenzici. Ako bi se za ovaj tip DNA-biljega tražila mana onda bi to bila njihova vrsna specifičnost tj. prilikom analize svake nove vrste ili skupine usko srodnih vrsta, potrebno je iznova pretraživati cjelokupni genom na mikrosatelitne motive kako bi se pronašle PCR-početnice za umnožavanje ovih lokusa. Ovaj nekad kompleksan laboratorijski posao danas je uvelike olakšan mogućnošću sekvenciranja cjelokupnih genoma upotrebom NGS-tehnika sekvenciranja (eng. *Next Generation Sequencing*).



Slika 9. Shematski prikaz replikacijskog klizanja (preuzeto iz Moxon i Willis 1999).

2. CILJ RADA

Istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu dio je istraživanja na projektu Ministarstva poljoprivrede: Vegetacijska i genetička raznolikost roda *Alnus* Mill. u Hrvatskoj (voditelj projekta: prof. dr. sc. Joso Vukelić). Cilj diplomskog rada je potvrditi postojanje hibridnih jedinki bijele i crne johe u Podravini morfometrijskim i molekularnim pristupom. Morfometrijski pristup će se temeljiti na mjerenju i usporedbi 10 parametara lista, a molekularni na provedbi analize 12 mikrosatelitnih lokusa. U istraživanju će se analizirati 102 jedinke obje vrste i potencijalnog hibrida iz pet populacija s četiri lokaliteta: Ormoško jezero, Đurđevac, Slatina, Donji Miholjac.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Materijal za molekularna i morfometrijska istraživanja sakupljen je u pet prirodnih populacija na području Podravine. Istraživanjem su obuhvaćene tri populacije bijele i dvije populacije crne johe (Tablica 1). Biljni materijal uzorkovan je tako da su sakupljeni listovi iz svake populacije s po 20-ak stabala koja su međusobno bila udaljena najmanje 30 m.

Uzorci listova za molekularnu analizu na terenu su odmah pohranjeni u plastične vrećice ispunjene silika gelom. Kao trajno pohranjen materijal ovog istraživanja, uz silika gel uzorke i DNA uzorke, čuvaju se i herbarijski uzorci istraživanih populacija (*voucher*) u Herbarium DEND Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku Šumarskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

S obzirom na to da listovi drvenastih biljaka pokazuju visok stupanj varijabilnosti te da se unutar istog stabla međusobno razlikuju ovisno o njihovom položaju na biljci (listovi svjetla u odnosu na listove sjene) i o tipu izbojka na kojem se razvijaju (Melville 1937, 1939; Trinajstić i sur. 2001; Bruschi i sur. 2003; Bednorz 2006; Poljak i sur. 2014b), za morfometrijsku analizu upotrijebljeni su listovi kratkih izbojaka osunčanog dijela krošnje. Na svakom stablu sakupljeno je po 20 neoštećenih listova.

Tablica 1. Opće značajke istraživanih populacija.

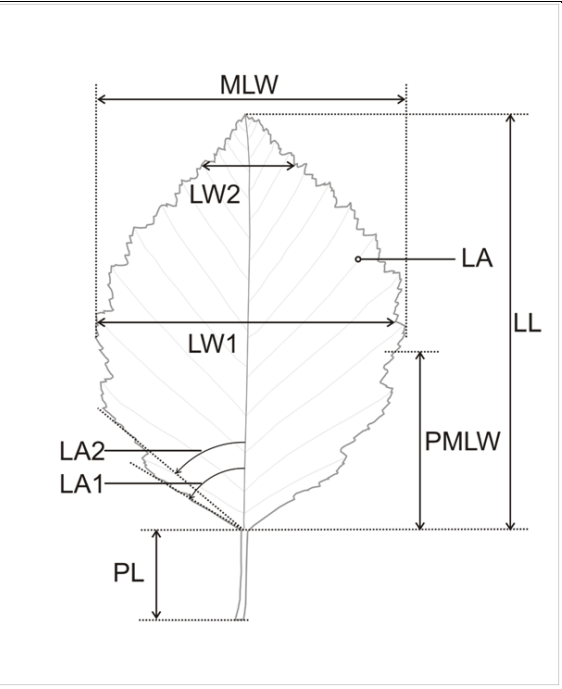
Vrsta	Populacija	Oznaka populacije	Geografska dužina	Geografska širina	Broj jedinki
Alnus glutinosa	Ormoško jezero	Ag1	16,21	46,37	19
Alnus glutinosa	Đurđevac	Ag2	17,08	46,12	21
Alnus incana	Ormoško jezero	Ai1	16,21	46,37	20
Alnus incana	Slatina	Ai2	17,83	45,80	20
Alnus incana	Donji Miholjac	Ai3	18,12	45,78	22

3.2. MORFOLOŠKA ANALIZA LISTA

Materijal za morfometrijsku analizu je herbariziran, a zatim skeniran A3 skenerom ScanMaker 9800XL (Microtek®) pri čemu je razlučivost bila 600 dpi (.tif datoteka). Nakon skeniranja, listovi su izmjereni softverskim paketom WinFOLIA ver. 2005 (Regent Instruments Inc.) korištenjem opcije *Leaf Morphology*. Za svaki list izmjereno je 10 folijarnih značajki (Tablica 2, Slika 10) pri čemu je točnost mjerenja iznosila 0,1 mm.

Tablica 2. Mjerene značajke lista.

Br.	Mjerena značajka	Oznaka
1.	Površina lisne plojke	LA
2.	Dužina plojke	LL
3.	Maksimalna širina plojke	MLW
4.	Dužina plojke (od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke)	PMLW
5.	Širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke	LW1
6.	Širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke	LW2
7.	Kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista, koja se nalazi na 10 % dužine plojke	LA1
8.	Kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista, koja se nalazi na 25 % dužine plojke	LA2
9.	Dužina peteljke	PL
10.	Broj lisnih žila	NLV



Slika 10. Mjerene značajke lista (Poljak i sur. 2018b).

3.3. IZOLACIJA BILJNE DNA

Ukupna stanična DNA svake istraživane jedinke izolirana je iz 25 mg silika-gel osušenog lisnog tkiva pomoću DNeasy® Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen®):

1. izvagano lisno tkivo stavljeno je u epruvetu *safe lock* 2,0 ml (Eppendorf®) u koju je dodana čelična kuglica za usitnjavanje,
2. prethodno pripremljeni uzorci tretirani su tekućim dušikom, a potom su usitnjeni u Tissue Lyser uređaju (Qiagen®), 1 min na 30 Hz/s,
3. nakon što je tkivo usitnjeno, u epruvetu je dodano 600 µl prethodno ugrijanog AP1 pufera (otopina detergenta i proteinaze za razgradnju staničnih membrana), 4 µl Rnaze (enzim koji razgrađuje RNA molekule) , 6 mg PVP-a (polivinilpirolidon veže vodikovim vezama fenolne spojeve koji se zatim taloženjem uklanjaju iz izolata DNA) i 6 µl 2-merkaptoetanola (reducens koji uklanjanja tanine i druge polifenole iz otopine DNA) te je homogenat kratko izmiješan u «vorteks» miješalici GVLab (Gilson®),
4. dobiveni homogenat je inkubiran 10 min na 65 °C uz povremeno miješanje u istoj vorteks mješalici,
5. dodano je 195 µl AP2 pufera (otopina za taloženje denaturiranih proteina), promiješano laganim treskanjem epruvete te inkubirano 5 min na -20 °C,
6. sadržaj epruvete je centrifugiran 7,5 min na 16100 g u centrifugi 5415 D (Eppendorf®) (Napomena: za sva daljnja centrifugiranja upotrebljavana je ista centrifuga),
7. supernatant je pomoću pipete prenesen na QIAshredder Mini Spin kolonu s filterom te je centrifugiran 5 min na 16100 g,
8. 600 µl filtrata prebačeno je u čistu epruvetu od 1,5 ml te je dodano 900 µl pufera AP3 (omogućava selektivno vezanje DNA molekula na membranu Dneasy Mini Spin kolone),
9. 650 µl homogenata prebačeno je na Dneasy Mini Spin kolonu te je centrifugirano 1 min na 5800 g,
10. nakon centrifugiranja filtrat je odbačen, a Dneasy Mini Spin kolona je prebačena na novu epruvetu od 2 ml, dodano je 500 µl AW pufera (otopina za ispiranje DNA molekula vezanih na filtar), te je centrifugirano 1 min na 5800 g,

11. nakon što je odbačen filtrat dodano je novih 500 µl AW pufera i centrifugirano 4 min na 16100 g,
12. Dneasy Mini Spin kolona je ostavljena otvorena na sobnoj temperaturi oko 5 min kako bi ispario sav etanol (u sastavu AW pufera),
13. Dneasy Mini Spin kolona je prebačena na novu epruvetu od 1,5 ml te je na membranu kolone dodano 100 µl AE otopine (vodena otopina TRIS-a i EDTA koja održava pH iznad 8 i veže metalne ione nužne za aktivnost Dnaza, a što je bitno za sprječavanje degradacije DNA kroz duži vremenski period) prethodno zagrijane na 65 °C,
14. nakon inkubacije od 5 min pri sobnoj temperaturi, Dneasy Mini Spin kolona centrifugirana je 1 min na 5800 g pri čemu su DNA molekule oslobođene s kolone u vidu filtrata,
15. nakon centrifugiranja dobivenoj otopini DNA izmjerena je koncentracija i čistoća-spektrofotometrijski, upotrebljavajući uređaj Nanophotometer (Implen®),
16. do daljnih istraživanja otopina DNA je pohranjena na -20 °C.

3.4. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM

Reakcija umnožavanja DNA odvijala se prema *touchdown* PCR programu: 94°C 5 min; 5 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 60 °C, s tim da se ova temperatura smanjuje u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C, i 90 s na 72 °C; 25 ciklusa od 45 s na 94 °C, 30 s na 55 °C, i 90 s na 72 °C; 8 min korak produljivanja na 72 °C; vremenski neograničeni završni korak 12 °C.

Sastav tzv. *multiplex* PCR otopine za umnožavanje jednog uzorka i pet SSR lokusa prikazan je u tablici 3, jednog uzorka i sedam SSR lokusa u tablici 4, a nazivi i sekvence početnica za PCR umnožavanje, mikrosatelitni motivi i očekivane duljine umnoženih fragmenata DNA prikazani su u tablici 5.

Tablica 3. Sastav PCR otopine za umnožavanje pet SSR-lokusa ukupnog volumena 20 µl

Materijal	Volumen
H_20 (sterilizirana, deionizirana)	1,30 µl
10x PCR pufer (TAKARA)	2,00 µl
dNTP (TAKARA)	1,60 µl
Početnica A2 FAM (*Forward*)	1,00 µl
Početnica A2 (*Reverse*)	1,00 µl
Početnica A22 VIC (*Forward*)	1,00 µl
Početnica A22 (*Reverse*)	1,00 µl
Početnica A35 NED (*Forward*)	1,00 µl
Početnica A35 (*Reverse*)	1,00 µl
Početnica A37 PET (*Forward*)	1,00 µl
Početnica A37 (*Reverse*)	1,00 µl
Početnica A38 PET (*Forward*)	1,00 µl
Početnica A38 (*Reverse*)	1,00 µl
Taq Hs polimeraza (TAKARA)	0,10 µl
Otopine DNA uzorka (c = 1,0 ng / µl)	5,00 µl
Napomena: FAM, NED, VIC i PET su florescencijske oznake, koncentracija PCR početnica = 5 µM	

Tablica 4. Sastav PCR otopine za umnožavanje sedam SSR-lokusa ukupnog volumena 20 µl

Materijal	Volumen
H_20 (sterilizirana, deionizirana)	4,30 µl
10x PCR pufer (TAKARA)	2,00 µl
dNTP (TAKARA)	1,60 µl
Početnica Ag1 PET (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag1 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag 5 FAM (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag 5 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag9 NED (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag 9 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag10 FAM (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag10 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag13 VIC (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag13 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag20 NED (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag20 (*Reverse*)	0,50 µl
Početnica Ag30 FAM (*Forward*)	0,50 µl
Početnica Ag30 (*Reverse*)	0,50 µl
Taq Hs polimeraza (TAKARA)	0,10 µl
Otopine DNA uzorka (c = 1,0 ng / µl)	5,00 µl
Napomena: FAM, NED, VIC i PET su florescencijske oznake, koncentracija PCR početnica = 10 µM	

Tablica 5. Nazivi i sekvence početnica, SSR motiv i očekivane duljine PCR umnoženih fragmenata (Drašnarová i sur. 2014; Lepais i Bacles 2011)

Br.	Naziv	Sekvenca 5'-3'	Motiv	Očekivana duljina (bp)
1	A2 F	GAAAGGATCTGTATAGCCAAC	$(GT)_{10}$	140-150
	A2 R	ACCACATGGCAGCAATTCTAG		
2	A22 F	CTCTGTGTCGGCTTTCTGG	$(AG)_{14}$	150-180
	A22 R	ATAAACCTCACGCCACACCT		
3	A35 F	AGGTTGCTCAACCTAACCAACAT	$(TC)_8$	220-250
	A35 R	GTTTGGACAAGAACAACCACCAAG		
4	A37 F	ACAATATCTCACAAATCTGCCGC	$(TC)_9$	240-280
	A37 R	GTTTAACCTGAACGTCCTCAAAGGTCC		
5	A38 F	ACGCTAGGCCTCTTGAACTTCTC	$(CAA)_5$	100-150
	A38 R	GTTTAAGCTGTGGTTGAAGGAAAAGGG		
6	Ag1 F	CAGTCTATCTGCTACAAGCGTGGT	$(TC)_{15}$	120-180
	Ag1 R	GACGTTTTCAACGACCAAAAACAC		
7	Ag5 F	AAGCAAAATCCCAAGGTATCCAGT	$(GA)_{12}$	130-160
	Ag5 R	GGGGTTCCAACCAATTTATTCTTC		
8	Ag9 F	GATGGTAATGTGACGTGAGCAAAA	$(TC)_{12}$	190-260
	Ag9 R	CCTATTCTCATCGTTTAAAGCCCC		
9	Ag10 F	AACTTGTCTTATTGTGCACTTGCG	$(TC)_{11}$	200-240
	Ag10 R	ACATTTACGGCTAAACAGCATTCC		
10	Ag13 F	CAAGCGAAATAGATTCGTGGTCTT	$(TG)_{12}$	240-290
	Ag13 R	CTTCCATTTGGAGCCTTAAAACAC		
11	Ag20 F	GGTTCCAAGTGGTAAGGGGAGTTA	$(TC)_9$	270-330
	Ag20 R	GAGTGTGAGAATGTGGTTCACGAG		
12	Ag30 F	GGAACTCTGGAAACAGAAACAACG	$(TC)_8$	90-120
	Ag30 R	AGCAAGGTAAAACTTCAGTAGCCG		

3.5. DETEKCIJA MIKROSATELITNIH BILJEGA

Uspješnost umnožavanja mikrosatelitnih alela lančanom reakcijom polimerazom je provjerena agaroznom gel elektroforezom. Po 5 µl svakog uzorka PCR umnožene DNA pomiješano je s 1 µl boje za nanošenje na gel (30% saharoze, 0.25% brom fenolnog modrila i 0.25% ksilen-cijanola) i stavljeno u jažice. Elektroforeza je tekla 15

minuta pri 100 V. Nakon elektroforeze gel je bio uronjen u otopinu *gel red* 20 minuta kako bi DNA fragmenti bili vidljivi pod UV svjetlom transiluminatora.

Uspješno umnoženi SSR-lokusi pripremljeni su za detekciju kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru. Po 1,5 µl mikrosatelitelitnih PCR produkata pomiješano je s 10 µl formaldehida i 0,5 µl DNA standarda 500 LIZ (Applied Biosystems®). Uzorci su 3 minute denaturirani na 95° C te neposredno nakon toga smješteni na led. Umnoženi mikrosateliti detektirani su kapilarnom elektroforezom uz pomoć automatskog sekvencera ABI Prism 3130 i «Dye set» Fam, Vic, Ned i Rox. Nakon kapilarne elektroforeze mikrosatelitni fragmenti DNA bili su vidljivi u obliku .fsa podataka. Pregledavanje .fsa podataka i određivanje mikrosatelitnih alela izvršeno je uz pomoć računalnog programa GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems).

3.6. STATISTIČKA ANALIZA MORFOLOŠKIH PODATAKA

Kako bi se utvrdila varijabilnost populacija crne i bijele johe u Podravini na temelju morfometrijske analize lista, pristupilo se statističkoj obradi podataka. Statistička obrada podataka obavljena je pomoću statističkog programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc. 2001). Sve korištene metode provedene su korištenjem standardnih algoritama (Conover 1980; Everitt 1981; Sokal i Rohlf 2012; Sharma 1996; Legendre i Legendre 1998).

3.6.1. Deskriptivna statistika

Trend izmjerenih morfoloških značajki lista istraživanih vrsta u ovome istraživanju opisan je putem deskriptivnih statističkih pokazatelja, pri čijem su izračunu korišteni standardni algoritmi deskriptivne statističke analize (Sokal i Rohlf 2012). Podaci su prikazani sljedećim procjeniteljima: aritmetička sredina (M), mod, medijan, standardna devijacija (SD), raspon (x_{min} - x_{max}), koeficijent varijabilnosti (CV%) (Snedecor i Cochrain 1971).

3.6.2. Analiza varijance (ANOVA)

Analizom varijance (ANOVA) ukupna je varijanca raščlanjena na varijancu između prosječnih vrijednosti skupina i na varijancu unutar samih skupina (Sokal i Rohlf 2012). Analizirani izvori varijabilnosti bili su populacija kao fiksni efekt te stablo

kao slučajni efekt, na način da je efekt stablo ugniježđen unutar efekta populacija. Kako bi se dobio uvid u zastupljenost pojedinih istraživanih izvora varijabilnosti u ukupnoj varijanci primijenjena je metoda najveće vjerodostojnosti (*Restricted Maximum Likelihood Method* – REML). Ukupna varijanca raščlanjena je na sastavnice varijance: između vrsta, između populacija (međupopulacijska varijabilnost) i između stabala unutar populacija (unutarpopulacijska varijabilnost).

3.6.3. Diskriminantna analiza

Diskriminantna analiza primijenjena je za određivanje morfoloških značajki listova koje najbolje razlikuju, odnosno diskriminiraju, istraživane populacije crne i bijele johe. Nezavisne varijable koje su upotrijebljene za razlikovanje grupa, u model su unesene sukcesivno, odnosno postupnom metodom prema naprijed (*forward stepwise method*). Ovom su metodom prvo izračunati specifični pokazatelji diskriminantne analize: Wilksova Lambda i parcijalna Wilksova Lambda. Wilksova Lambda ima vrijednost od nula (savršeno razlikovanje) do jedan (nema razlikovnog značenja). Parcijalna Wilksova Lambda određuje pojedinačni doprinos varijable razlikovanju grupa. Što je manja vrijednost parcijalne Lambde, veći je doprinos dotične varijable razlikovanju grupa. Vrijednost parcijalne Wilksove Lambde izražena je i putem standardne F-vrijednosti, koja je u odnosu na nju obrnuto proporcionalna te je razlikovna snaga varijable to veća što je F-vrijednost veća. Za svaki F izračunata je i pripadna vjerojatnost p. Diskriminacijske funkcije dobivene su pomoću kanoničke analize. Diskriminantnom analizom za pet grupa dobivene su četiri diskriminacijske funkcije. Zatim je, $\chi 2$ testom sa sukcesivnim isključivanjem kanoničkih korijena, određeno jesu li diskriminacijske funkcije signifikantne. Za svaku signifikantnu funkciju potom su određeni standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli i to za svaku varijablu posebno. Što je veći standardizirani koeficijent po svojoj apsolutnoj vrijednosti to je i veći doprinos određene varijable razlikovanju grupa koje je definirano određenom diskriminacijskom funkcijom. I na kraju, kako bi se odredilo između kojih je grupa definirano razlikovanje dobivenim funkcijama, određene su sredine funkcija.

3.7. STATISTIČKA ANALIZA MOLEKULARNIH PODATAKA

3.7.1. Deskriptivna statistika

Prosječan broj mikrosatelitnih alela (*Na*) po populaciji, zapažena heterozigotnost (H_O) i očekivana heterozigotnost (H_E) izračunati su pomoću programa GENEPOP 4.0 (Raymond i Rousset 1995). Alelno bogatstvo (N_{ar}) je izračunato u računalnom programu HP-Rare 1.0 (Kalinowski 2004), bogatstvo jedinstvenih alela (N_{par}) u programu Convert (Glaubitz 2004), a indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija pomoću nepristranog procjenitelja θ po metodi Weira i Cockerhama (1984) kao i njihova signifikantnost pomoću permutacija u programu FSTAT (Goudet 1995).

3.7.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Analizom molekularne varijance (AMOVA) (Excoffier i sur. 1992) raščlanjena je ukupna genotipska varijanca u sastavnice varijance: sastavnicu uzrokovanu razlikama između vrsta, između populacija i unutar populacija te sastavnicu uzrokovanu razlikama između i unutar populacija za svaku zasebnu vrstu. Analiza je provedena upotrebom programa Arlequin ver. 3.0 (Excoffier i sur. 2005).

3.7.3. Faktorijalna analiza korespondencije (FCA)

Prikazivanje podataka u obliku tablica je najčešći i najjednostavniji način prikazivanja rezultata, no tumačenje tablica s velikim brojem redova i stupaca je vrlo zahtjevno, a ponekad i nemoguće. Faktorijalna analiza korespondencije je tehnika s kojom je moguće pronaći višedimenzionalni prikaz ovisnosti između redaka i stupaca u prostoru. Ona omogućuje izgradnju ortogonalnog sustava osi zvanih faktori gdje se promatranja (redovi tablice) i varijable (stupci tablica) mogu istovremeno prikazati, što olakšava otkrivanje skrivenih podataka sadržanih u određenoj tablici. Faktorijalna analiza korespondencije (eng. *Factorial Correspondence Analysis*; FCA) provedena je pomoću programa Genetix 4.05 (Belkhir i sur. 2004).

3.7.4. Bayesovska analiza populacijske strukture

Bayesovska analiza populacijske strukture provedena je pomoću računalnog programa STRUCTURE (Pritchard i sur. 2000; Hubisz i sur. 2009). Broj pretpostavljenih skupina bio je od 1 do 10 (K = 1 - 10) te je za svaku hipotezu provedeno 10 neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastojao od 200 000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*). Podatci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljani su tijekom 1 000 000 ponavljanja algoritma Markov Chain Monte Carlo uz pretpostavku modela koji dozvoljava mješovito podrijetlo jedinki (eng. *admixture model*) i korelirane alelne učestalosti bez uključivanja prethodnih informacija o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki.

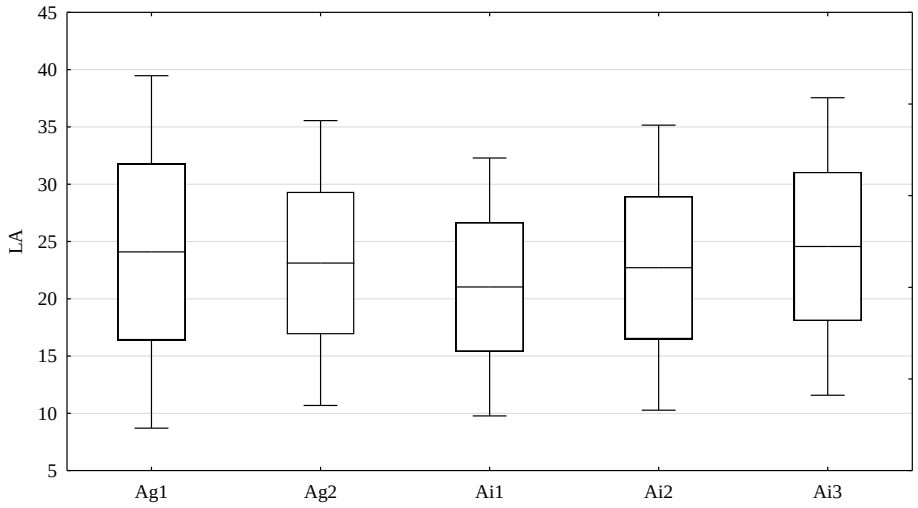
4. REZULTATI

4.1. MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST LISTA

4.1.1. Deskriptivna statistika

Za svaku mjerenu morfološku značajku lista izračunati su sljedeći deskriptivni statistički pokazatelji: aritmetička sredina, medijan, mod, raspon (minimalne i maksimalne vrijednosti), standardna devijacija i koeficijent varijacije. Aritmetička sredina i standardna devijacija kao dio rezultata deskriptivne statističke analize prikazani su u obliku *Box & Whiskers* dijagrama na slikama 11-20.

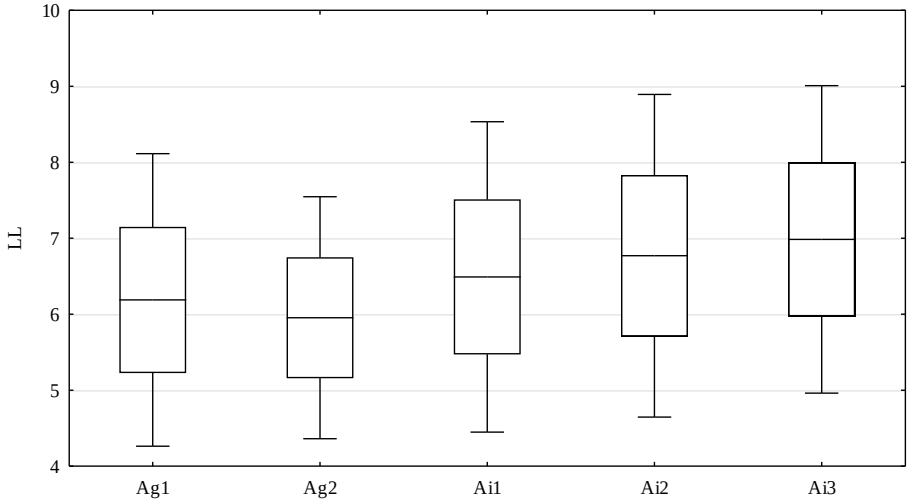
Površina plojke (LA). Prosječna površina plojke triju populacija bijele johe je bila 22,64 cm^2, dok je u ukupnom uzorku dviju populacija crne johe bila 23,60 cm^2. Od tri istraživane populacije bijele johe prosječno najveću površinu plojke (24,57 cm^2) imale su jedinke iz populacija Ai3 (Donji Miholjac). Ova značajka je bila najvarijabilnija u populacijama crne johe.



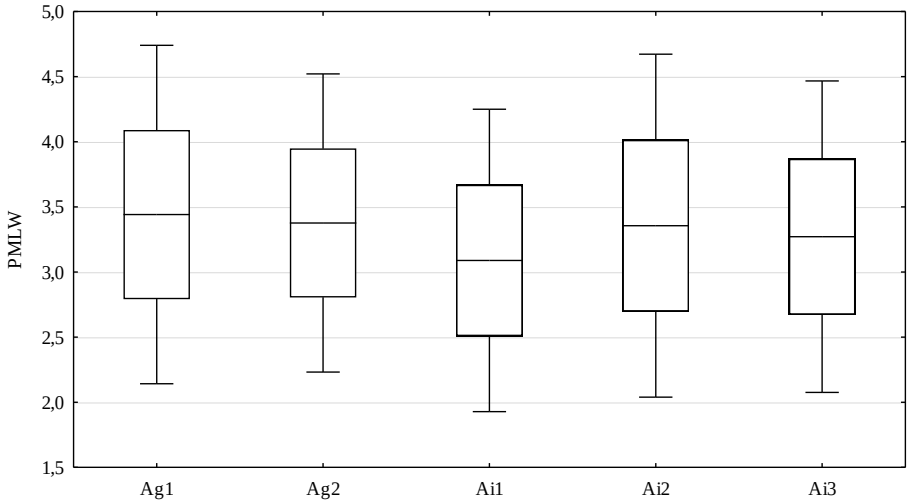
Slika 11. Osnovni statistički parametri za površinu plojke (LA) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

Dužina plojke (LL) i dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke (PMLW). Prosječna dužina plojke u ukupnom uzorku populacija bijele johe iznosila je 6,75 cm, dok je među populacijama crne johe prosječna dužina plojke bila 6,07 cm. Najveće vrijednosti za dužinu plojke mjerenu od osnove plojke do mjesta njezine najveće širine zabilježene su za populacije bijele i crne johe s Ormoškoga jezera. Dužina plojke i dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke bile su varijable čiji su koeficijenti varijacije govorili da najveću varijabilnost imaju

populacije bijele johe s vrijednostima 15,66 % (LL) i 19,14 % (PMLW). Koeficijenti varijacije za populacije crne johe iznosili su 14,67 % (LL) i 17,98 % (PMLW).

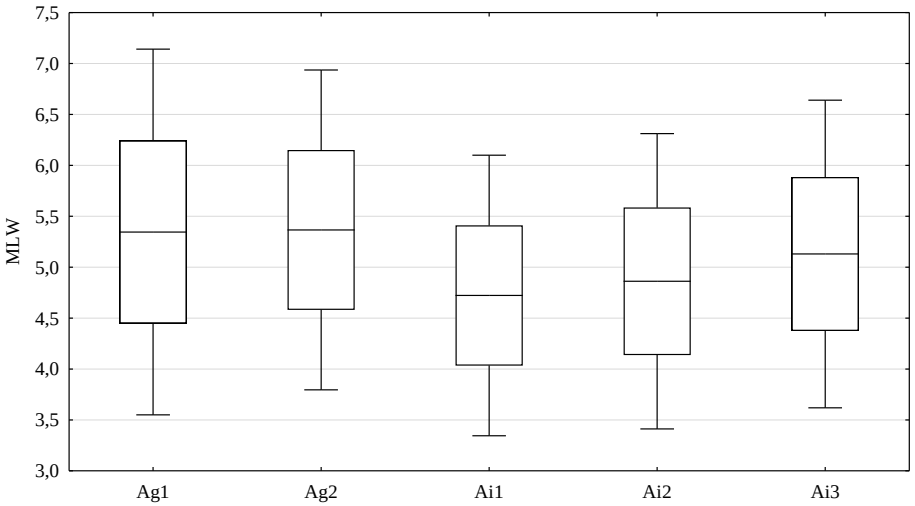


Slika 12. Osnovni statistički parametri za dužinu plojke (LL) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

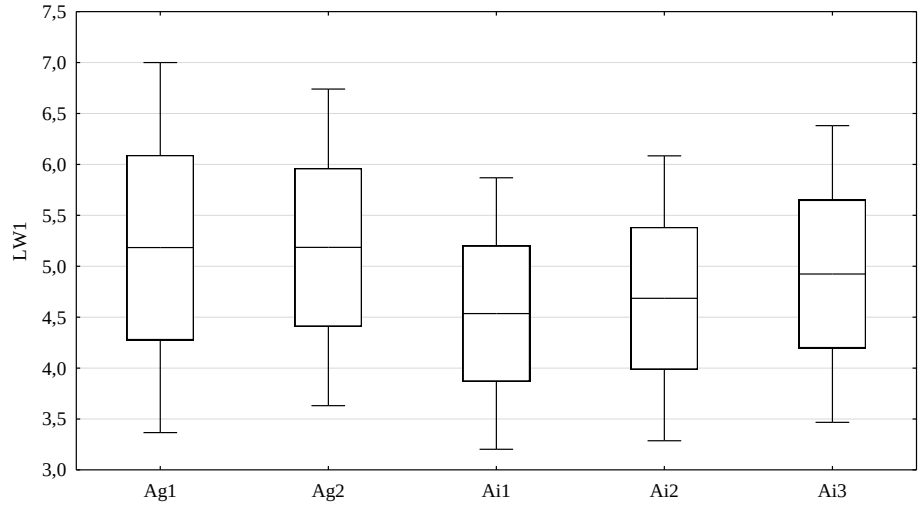


Slika 13. Osnovni statistički parametri za udaljenost od osnove plojke do mjesta njezine najveće širine (PMLW) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

Maksimalna širina plojke (MLW) i širina plojke na 50 % dužine plojke (LW1). Prosječna maksimalna širina plojke i širina plojke mjerena na 50 % njezine dužine u populacija crne johe iznosila je 5,36 i 5,18 cm, a u populacija bijele johe 4,88 i 4,69 cm. Veća varijabilnost za navedene značajke zabilježena je u populacijama crne johe.

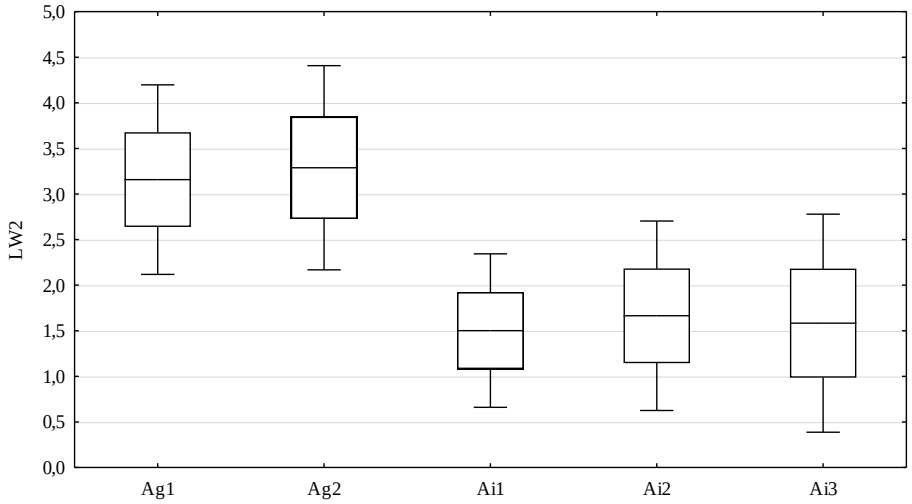


Slika 14. Osnovni statistički parametri za maksimalnu širinu plojke (MLW) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.



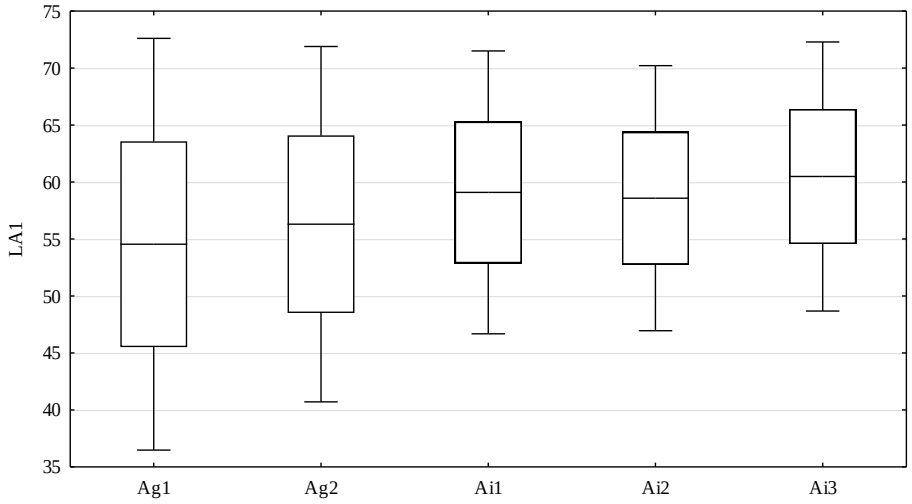
Slika 15. Osnovni statistički parametri za širinu plojke na 50 % dužine (LW1) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

Širina plojke na 90 % dužine plojke (LW2). Prosječna širina plojke na 90 % dužine plojke iznosila je u crne johe 3,22 cm, a u bijele johe 1,52 cm. Najveću širinu plojke na 90 % dužine plojke imala je populacija crne johe Ag2 iz Đurđevca (3,29 cm), dok je najmanja bila u populacije bijele johe Ai1 s Ormoškoga jezera (1,5 cm). Za ovu osobinu populacije bijele johe (CV = 29,89%) su bile značajno varijabilnije u odnosu na populacije crne johe (CV = 16,87%).

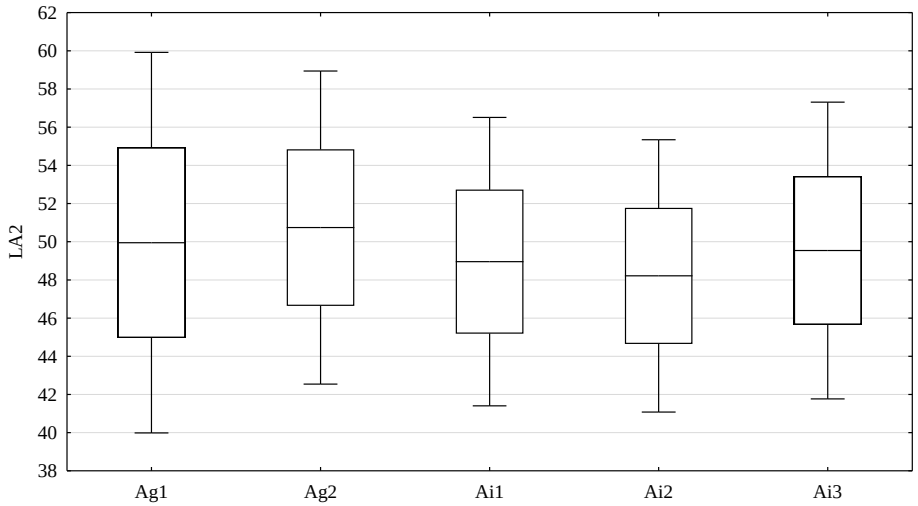


Slika 16. Osnovni statistički parametri za širinu plojke na 90 % dužine (LW2) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

Kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac definiran osnovom plojke i točkom na rubu lista, koja se nalazi na 10 % (LA1) i 25 % (LA2) dužine plojke. Prosječno najveći kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac definiran osnovom plojke i točkom na rubu lista, koja se nalazi na 10 % dužine plojke zabilježen je za populacije bijele johe. Drugim riječima, populacije bijele johe odlikovale su se zaobljenijom osnovom plojke. S druge strane, prosječne veće vrijednosti za značajku LA2 zabilježene su u populacijama crne johe. Za navedene značajke je karakterističan niski koeficijent varijacije.

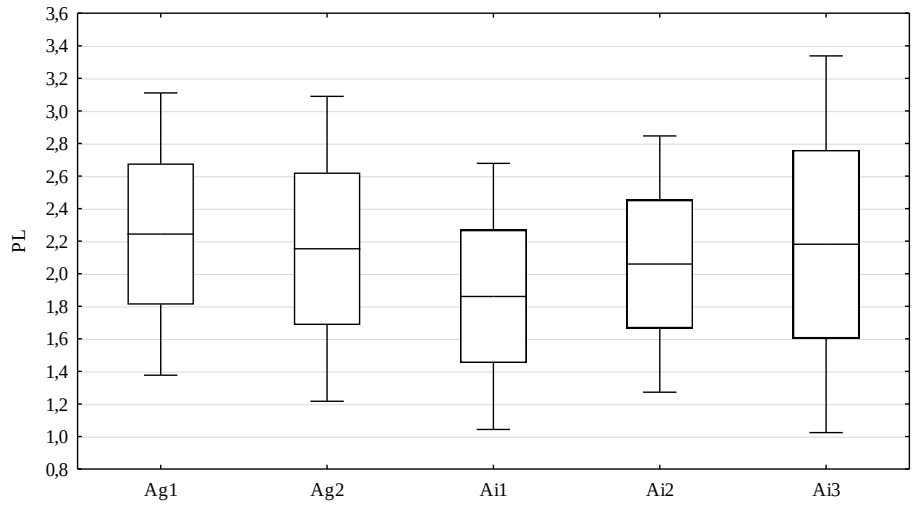


Slika17. Osnovni statistički parametri za kut LA1) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.



Slika18. Osnovni statistički parametri za kut LA2) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

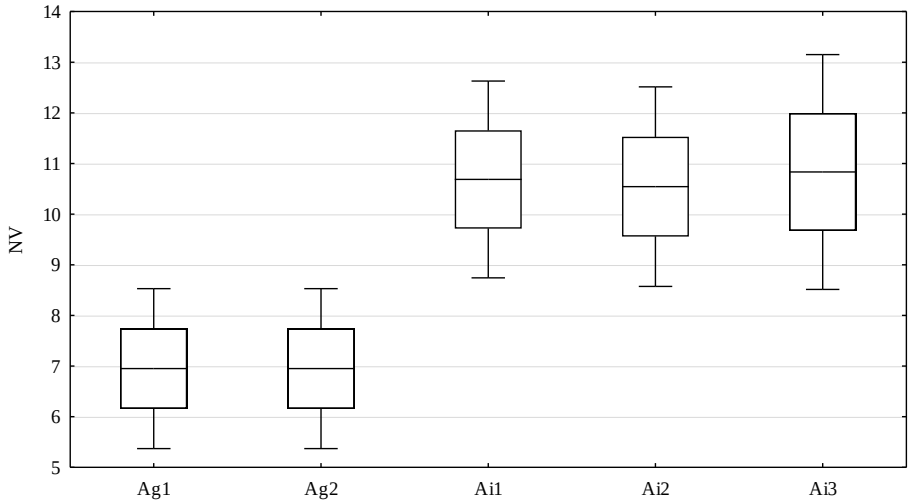
Dužina peteljke (PL). Prosječne vrijednosti za dužinu peteljke bile su slične u obje istraživane svojte. Najveća prosječna vrijednost za navedenu značajku zabilježena je u populaciji crne johe s područja Ormoškoga jezera (2,24 cm), a najmanja u populaciji bijele johe (1,86 cm), također sa područja Ormoškoga jezera. Varijabilnije peteljke svojstvene su populacijama bijele johe (CV = 24,10 %).



Slika19. Osnovni statistički parametri za dužinu peteljke (PL)) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

Broj lisnih žila (NLV). Kao i širina plojke na 90 % dužine plojke (LW2) i broj lisnih žila pokazivao je visoku razinu varijabilnosti između populacija crne i bijele johe. Najveći broj lisnih žila imala je populacija bijele johe Ai3 iz Donjeg Miholjca (10,83), a najmanji obje populacije crne johe s istim vrijednostima prosječnog broja lisnih žila (6,95).

Prosječan broj žila populacije bijele johe iz Slatine bio je 10,54, a s Ormoškoga jezera 10,68. Koeficijenti varijacije ove značajke bili su najveći za populacije crne johe (CV = 11,36%) te nešto manji za populacije bijele johe (CV = 8,96 %).



Slika 20. Osnovni statistički parametri za broj lisnih žila (NLV)) prikazani *Box & Whiskers* dijagramima. *Box*: aritmetička sredina ± standardna devijacija, *whiskers*: aritmetička sredina ± 2×standardne devijacije.

4.1.2. Analiza varijance (ANOVA)

Rezultati provedene analize varijance prikazani su u tablicama 6-8. Crvenom bojom označene su statistički značajne p vrijednosti. Analizom varijance utvrđeno je da se istraživane vrste (crna i bijela joha), razlikuju u sljedećim značajkama: dužina plojke (LL), širina plojke mjerena na 90 % dužine plojke (LW2), kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac definiran osnovom plojke i točkom na rubu lista, a koja se nalazi na 10 % dužine plojke (LA1) i broj lisnih žila (NV). Najveći udio u ukupnoj varijabilnosti za značajke širina plojke mjerena na 90 % njezine dužine i broj lisnih žila odnosio se na varijabilnost između istraživanih vrsta. Nakon što je provedena analiza varijance posebno za bijelu i posebno za crnu johu, utvrđeno je da su populacije crne johe gotovo uniformne dok su se populacije bijele johe signifikantno razlikovale u šest od deset istraživanih značajki lista. U obje vrste utvrđena je značajno veća unutarpopulacijska nego međupopulacijska varijabilnost s tim da se najveći udio od ukupne varijance ipak odnosio na komponentu ostataka tj. varijabilnost listova unutar stabla.

Tablica 6. ANOVA – analiza varijance.

Značajka	Sastavnice varijance	df	F	Postotak varijabilnosti	P-vrijednost
LA	Vrsta	1	0,31	0,00	0,614716
	Populacija (Vrsta)	3	3,55	2,84	0,017200
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	8,53	26,57	0,000000
	Ostatak	1938		70,59	
LL	Vrsta	1	11,074	17,42	0,044517
	Populacija (Vrsta)	3	3,54	3,00	0,017531
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	8,29	21,22	0,000000
	Ostatak	1938		58,37	
MLW	Vrsta	1	7,95	12,38	0,066421
	Populacija (Vrsta)	3	3,07	2,71	0,031546
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	9,17	24,62	0,000000
	Ostatak	1938		60,29	
PMLW	Vrsta	1	2,66	2,26	0,200625
	Populacija (Vrsta)	3	2,27	1,81	0,085583
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	8,32	25,69	0,000000
	Ostatak	1938		70,24	
LW1	Vrsta	1	9,70	14,03	0,052338
	Populacija (Vrsta)	3	2,77	2,34	0,045487
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	9,44	24,83	0,000000
	Ostatak	1938		58,80	
LW2	Vrsta	1	453,454	82,45	0,000210
	Populacija (Vrsta)	3	1,30	0,09	0,277816
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	12,16	6,26	0,000000
	Ostatak	1938		11,20	
LA1	Vrsta	1	16,20	12,81	0,026842
	Populacija (Vrsta)	3	1,04	0,13	0,376352
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	15,83	37,07	0,000000
	Ostatak	1938		49,98	
LA2	Vrsta	1	5,97	4,75	0,091013
	Populacija (Vrsta)	3	1,02	0,06	0,386846
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	17,10	42,48	0,000000
	Ostatak	1938		52,72	
PL	Vrsta	1	1,60	2,30	0,294801
	Populacija (Vrsta)	3	5,66	6,49	0,001290
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	8,81	25,59	0,000000
	Ostatak	1938		65,62	
NLV	Vrsta	1	1160,93	88,34	0,000048
	Populacija (Vrsta)	3	0,82	0,00	0,485132
	Stablo (Vrsta*Populacija)	97	11,90	4,09	0,000000
	Ostatak	1938		7,57	

Crvenom bojom označene su statistički značajne p vrijednosti.

Tablica 7. ANOVA - analiza varijance (*Alnus glutinosa*).

Značajka	Sastavnice varijance	df	F	Postotak varijabilnosti	P-vrijednost
	Populacija	1	0,53	0,00	0,471817
LA	Stablo (Populacija)	38	10,64	32,22	0,000000
	Ostatak	760		67,78	
	Populacija	1	1,78	1,50	0,189836
LL	Stablo (Populacija)	38	12,14	35,24	0,000000
	Ostatak	760		63,26	
	Populacija	1	0,02	0,00	0,900901
MLW	Stablo (Populacija)	38	10,77	32,19	0,000000
	Ostatak	760		67,81	
	Populacija	1	0,27	0,00	0,604660
PMLW					
	Stablo (Populacija)	38	12,72	36,47	0,000000
	Ostatak	760		63,53	
	Populacija	1	0,00	0,00	0,988823
LW1	Stablo (Populacija)	38	11,10	32,92	0,000000
	Ostatak	760		67,08	
	Populacija	1	1,79	1,25	0,188677
LW2	Stablo (Populacija)	38	8,91	27,99	0,000000
	Ostatak	760		70,76	
	Populacija	1	0,85	0,00	0,361189
LA1	Stablo (Populacija)	38	18,76	46,93	0,000000
	Ostatak	760		53,07	
	Populacija	1	0,53	0,00	0,471625
LA2	Stablo (Populacija)	38	23,47	52,59	0,000000
	Ostatak	760		47,41	
	Populacija	1	1,43	0,59	0,239334
PL	Stablo (Populacija)	38	7,31	23,84	0,000000
	Ostatak	760		75,57	
	Populacija	1	0,00	0,00	1,000000
NLV	Stablo (Populacija)	38	11,48	33,74	0,000000
	Ostatak	760		66,26	

Crvenom bojom označene su statistički značajne p vrijednosti.

Tablica 8. ANOVA - analiza varijance (*Alnus incana*).

Značajka	Sastavnice varijance	df	F	Postotak varijabilnosti	P-vrijednost
	Populacija	2	6,42	6,49	0,002997
LA	Stablo (Populacija)	59	6,98	21,51	0,000000
	Ostatak	1178		72,00	
	Populacija	2	4,53	4,28	0,014755
LL	Stablo (Populacija)	59	6,77	21,36	0,000000
	Ostatak	1178		74,35	
	Populacija	2	5,80	6,25	0,005005
MLW	Stablo (Populacija)	59	7,90	24,06	0,000000
	Ostatak	1178		69,69	
	Populacija	2	4,07	3,53	0,022188
PMLW	Stablo (Populacija)	59	6,06	19,46	0,000000
	Ostatak	1178		77,01	
	Populacija	2	5,50	5,94	0,006473
LW1	Stablo (Populacija)	59	8,04	24,51	0,000000
	Ostatak	1178		69,55	
	Populacija	2	1,09	0,09	0,343566
LW2	Stablo (Populacija)	59	14,88	41,02	0,000000
	Ostatak	1178		58,89	
	Populacija	2	1,42	0,85	0,250183
LA1	Stablo (Populacija)	59	12,66	36,57	0,000000
	Ostatak	1178		62,58	
	Populacija	2	1,63	1,22	0,204902
LA2	Stablo (Populacija)	59	12,55	36,20	0,000000
	Ostatak	1178		62,58	
	Populacija	2	7,12	9,09	0,001710
PL	Stablo (Populacija)	59	9,77	27,68	0,000000
	Ostatak	1178		63,23	
	Populacija	2	1,05	0,15	0,356617
NLV	Stablo (Populacija)	59	11,95	35,26	0,000000
	Ostatak	1178		64,59	

Crvenom bojom označene su statistički značajne p vrijednosti.

4.1.3. Diskriminantna analiza

Cjelokupni rezultati diskriminantne analize nam ukazuju na činjenicu da je razlikovanje između istraživanih populacija signifikantno: Wilksova $\lambda = 0,02905$; $F(40,335) = 12,942$; $p < 0,00001$.

Pokazatelji diskriminantne analize prikazani su u tablici 9. Na temelju vrijednosti parcijalne Wilksove λ može se zaključiti da varijable NLV (broj lisnih žila) i LW2 (širina plojke na 90 % dužine plojke) najviše doprinose razlikovanju populacija crne i bijele johe (najniža vrijednost parcijalne λ). S druge strane, sljedeće značajke ne doprinose razlikovanju istraživanih populacija na statistički značajno razini: kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac definiran osnovom plojke i točkom na rubu lista, koja se nalazi

na 25 % dužine plojke (LA), dužina plojke (LL) i širina plojke mjerena na 50 % dužine plojke (LW1).

Tablica 9. Pokazatelji diskriminantne analize, po varijablama.

Značajka	Wilksova λ	Parcijalna λ	F	p-vrijednost
NLV	0,041694	0,696650	9,579684	0,000002
LW2	0,036564	0,794390	5,694201	0,000401
PMLW	0,035188	0,825455	4,651981	0,001875
MLW	0,034281	0,847292	3,965081	0,005260
LA	0,033390	0,869907	3,290052	0,014603
LA1	0,033134	0,876614	3,096559	0,019576
PL	0,032825	0,884859	2,862712	0,027886
LW1	0,031620	0,918598	1,949534	0,109283
LL	0,030473	0,953162	1,081066	0,370838
LA2	0,029626	0,980412	0,439546	0,779703

Crvenom bojom označene su statistički značajne p vrijednosti.

Za sedam varijabla ($p < 0,05$) i pet grupa, kanoničkom analizom dobivene su četiri diskriminacijske funkcije (broj funkcija = manji broj između broja varijabla i broja grupa minus jedan). Nakon toga je utvrđen doprinos svake pojedine varijable razlikovanju definiranih grupa. Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli prikazani su u tablici 10. Što je veći standardizirani koeficijent po svojoj apsolutnoj vrijednosti to je i veći doprinos pripadne varijable razlikovanju grupa koje je definirano dotičnom diskriminacijskom funkcijom. Ista tablica sadrži i svojstvene vrijednosti te kumulativni udio varijabilnosti za svaku funkciju. Iz tablice se može vidjeti da prva funkcija sadrži 96,5 % objašnjene varijabilnosti, dok je doprinos ostalih funkcija zanemariv, preostalih 3,5 %.

Tablica 10. Standardizirani koeficijenti kanoničkih varijabli.

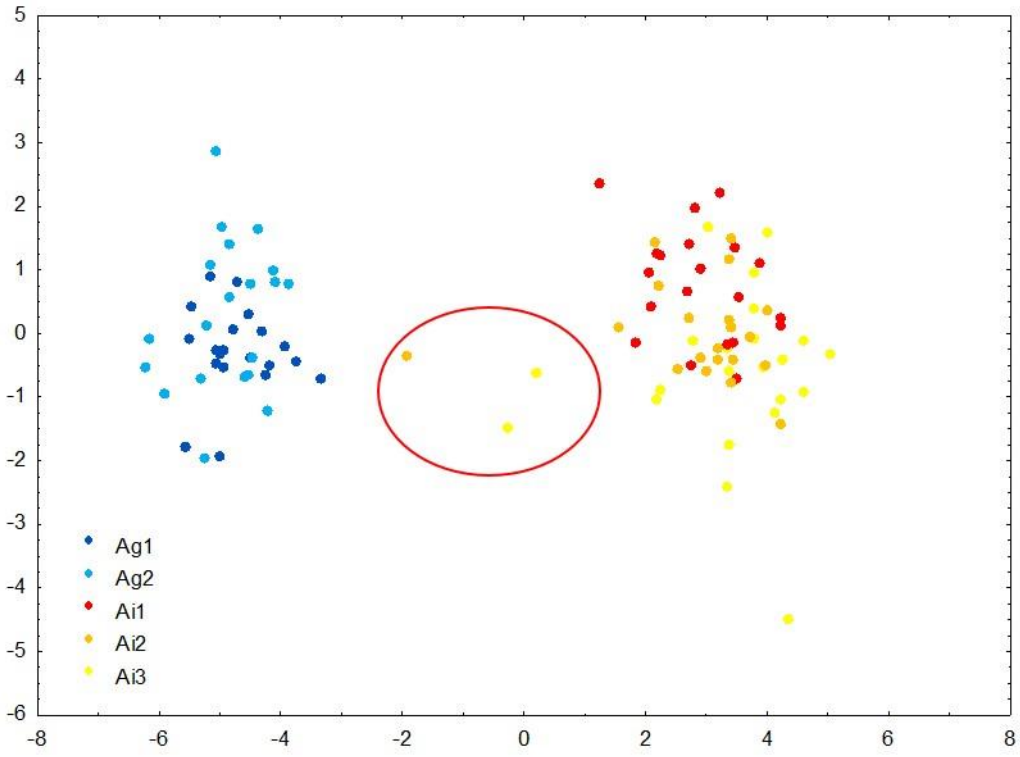
Značajka	DF1	DF2	DF3	DF4
LA	-0,21666	-0,945286	3,12705	2,91762
MLW	0,07356	0,304916	-1,11587	-3,59894
PMLW	0,84711	0,100768	-2,59705	0,07232
LW2	-0,81247	0,177012	-0,07055	0,43635
LA1	0,63302	0,063242	-1,67794	0,19425
PL	0,00610	-0,718048	-0,36074	-0,01306
NLV	0,60460	0,091854	-0,14764	-0,15093
Svojstvena vrijednost	15,53660	0,241664	0,19897	0,12335
Kumulativna proporcija	0,96497	0,979981	0,99234	1,00000

Nakon što je utvrđeno koja svojstva lista i u kojoj mjeri doprinose razlikovanju istraživanih grupa duž prve i druge kanoničke osi pristupilo se određivanju sredina kanoničkih varijabli kako bi se utvrdilo koje se grupe međusobno razlikuju po pojedinim funkcijama. Iz tablice 11 može se vidjeti da prva diskriminacijska funkcija u najvećoj mjeri razlikuje populacije bijele i crne johe.

Tablica 11. Sredine kanoničkih varijabli za dvije diskriminacijske funkcije, po grupama.

Grupa	DF1	DF2	DF3	DF4
Ag1	-4,68656	-0,317338	0,465153	0,347895
Ag2	-4,87365	0,269407	-0,445829	-0,363455
Ai1	2,93055	0,747854	0,449047	-0,047774
Ai2	2,90802	-0,004634	-0,580367	0,452751
Ai3	3,38331	-0,632081	0,101815	-0,354016

Na slici 22 prikazane su projekcije kanonskih varijabla za prve dvije diskriminacijske funkcije. Iako se iz grafičkog prikaza, jedinke crne i bijele johe međusobno jasno odvajaju, odnosno na lijevoj strani dijagrama grupiraju se jedinke crne, a na desnoj strani jedinke bijele johe, vidljivo je da jedna jedinka iz populacije Ai2 i dvije jedinke iz populacije Ai3 zauzimaju središnji prostor između ove dvije velike skupine. S obzirom na to da su ove tri jedinke morfološki intermedijarne u odnosu na dvije istraživane vrste možemo pretpostaviti da su hibridne.



Slika 22. Grafički prikaz prve i druge diskriminacijske funkcije. Crveno okruženi genotipovi označavaju potencijalno hibridne jedinke.

4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST POPULACIJA

4.2.1. Deskriptivna statistika

Osnovni populacijski parametri koji opisuju unutarpopulacijsku genetičku raznolikost dvije populacije crne johe i tri populacije bijele johe prikazani su u Tablici 12. Vrijednosti svih mjerenih populacijsko-genetičkih parametara bili su izrazito viši u populacijama crne u odnosu na populacije bijele johe. Broj alela neovisan o broju uzoraka u analiziranoj populaciji (alelno bogatstvo, N_{ar}) kretao se od 3,674 (Ai1) do 7,000 (Ag1). Po bogatstvu jedinstvenih alela najsiromašnija populacija bila je Ai2 (0,018), a najbogatija je bila populacija Ag1 (1,248). Zapažena heterozigotnost (H_O) se kretala od 0,435 (Ai1) do 0,684 (Ag1). Očekivane heterozigotnosti (H_E) su se kretale od 0,438 (Ai1) do 0,740 (Ag2). Multilokusnim testom utvrđeno je signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u populacijama Ag2 (manjak heterozigota) i Ai2 (višak heterozigota).

Tablica 12. Genetička raznolikost dvije populacije crne i tri populacije bijele johe upotrebom 12 SSR mikrosatelitnih biljega.

Populacija	*n*	N_{ar}	N_{par}	H_O	H_E
Ag1	19	7.000	1.248	0.684	0.708
Ag2	21	6.770	0.792	0.667	0.740
Ai1	20	3.674	0.220	0.435	0.438
Ai2	20	3.949	0.018	0.530	0.471
Ai3	22	4.134	0.184	0.523	0.488

n - broj analiziranih jedinki, N_{ar} - alelno bogatstvo, N_{par} - bogatstvo jedinstvenih alela, H_O - zapažena heterozigotnost, H_E - očekivana heterozigotnost

4.2.2. Genetička diferencijacija

Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija nalazi se u Tablici 13. Uočene vrijednosti ukazuju na izrazitu diferencijaciju između istraživanih vrsta. Naime, vrijednosti F_{ST} između populacija crne johe s jedne strane i bijele johe s druge strane bile su izrazito veće i signifikantne, a između populacija iste vrste puno manje i nesignifikantne. Najveća vrijednost je zapažena između populacija Ag1 i Ai1 (0.332), a najmanja između dvije populacije crne johe (0,009).

Tablica 13. Matrica vrijednosti F_{ST} između populacija crne i bijele johe.

Populacija	Ag1	Ag2	Ai1	Ai2	Ai3
Ag1		ns	**	**	**
Ag2	0.009		**	**	**
Ai1	0.332	0.326		ns	ns
Ai2	0.312	0.299	0.016		ns
Ai3	0.308	0.307	0.011	0.027	

*** P <0,001; ** 0,001 < P < 0,01; * 0,01 < P < 0,05; ns P > 0,05

4.2.3. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

AMOVA analizom, ukupna genetička varijanca raščlanjena je u sastavnice varijance: A) između vrsta te između i unutar svih analiziranih populacija, B) između i unutar populacija vrste *A. glutinosa,* C) između i unutar populacija vrste *A. incana* (Tablica 14). Iz provedene tri analize vidljivo je da je većina ukupne genetičke raznolikosti uzrokovana međuvrsnom raznolikošću (*A. glutinosa* vs. *A. incana*: (31,49%) te raznolikošću unutar populacija (67.62% - 98,96%), dok je postotak varijance između populacija izrazito mali.

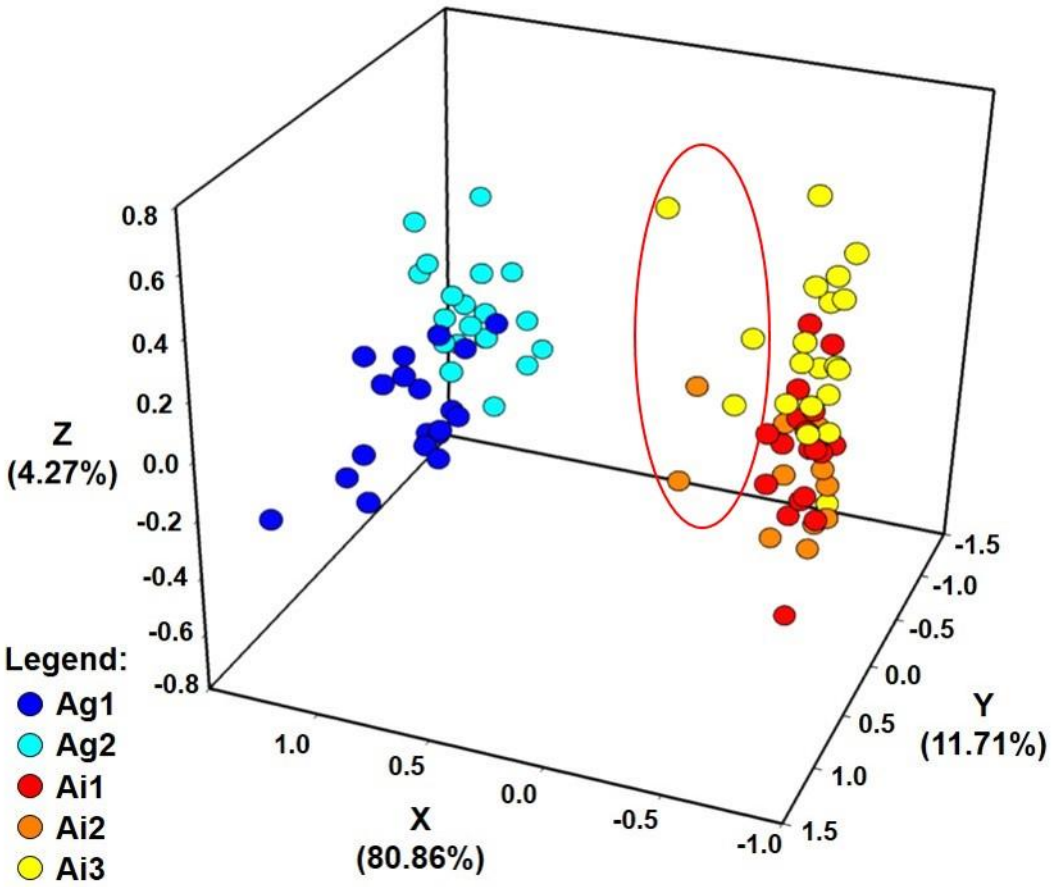
Tablica 14. Raspodjela raznolikosti na temelju Analize molekularne varijance: (A) između dvije vrste (*A. glutinosa* vs*. A. incana*)- između i unutar 5 populacija crne i bijele johe, (B) između i unutar dvije populacije crne johe, (C) između i unutar tri populacije bijele johe.

Analiza	Izvor	Sastavnice varijance	% Ukupne varijance	ϕ-statistika	$P(\phi)$
A Ag + Ai	Između vrsta	1,322	31,49	0,315	< 0.0001
	Između populacija	0,037	00,89	0,013	0.00188
	Unutar populacija	2,838	67,62	0,324	< 0.0001
B	Između populacija	0,038	1,04	0,010	0.09644
Ag	Unutar populacija	3,618	98,96		
C	Između populacija	0,040	1,67	0,017	0.00366
Ai	Unutar populacija	2,336	98,93		

$P(\phi)$ - signifikantnost ϕ-statistike nakon 10,000 slučajnih permutacija

4.2.4. Faktorijalna analiza korespodencije (FCA)

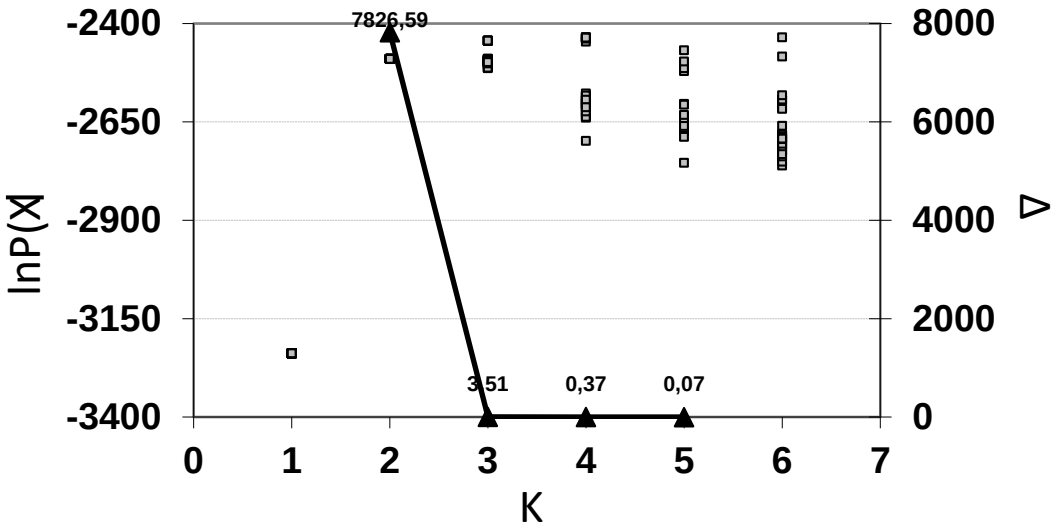
Faktorijalnom analizom korespondencije (FCA) prikazani su odnosi između 102 jedinke crne i bijele johe (Slika 23). Prve tri osi objašnjavaju 96,84 % ukupne varijance, s tim da prva os iznosi 80,86 %, druga 11,71 %, a treća 4,27 % ukupne varijance. Prva os razdvaja istraživane jedinke po vrstama (crna vs. bijela joha), druga donekle razdvaja dvije populacije crne johe, a treća os ne razdvaja jedinke niti po jednom jasnom kriteriju. Nekoliko jedinki iz populacija bijele johe našlo se više-manje na sredini razdvajanja po prvoj osi te se za njih može pretpostaviti da su hibridne jedinke.



Slika 23. Prikaz odnosa između 102 jedinke iz dvije populacije crne johe (Ag = *A. glutinosa*) i tri populacije bijele johe (Ai = *A. incana*) u koordinatnom sustavu određenom s prve tri osi faktorijalne analize korespondencije (FCA). Pojedinačni genotipovi prikazani su obojanim krugovima ovisno o populacijskoj pripadnosti. Crveno okruženi genotipovi označavaju potencijalno hibridne jedinke.

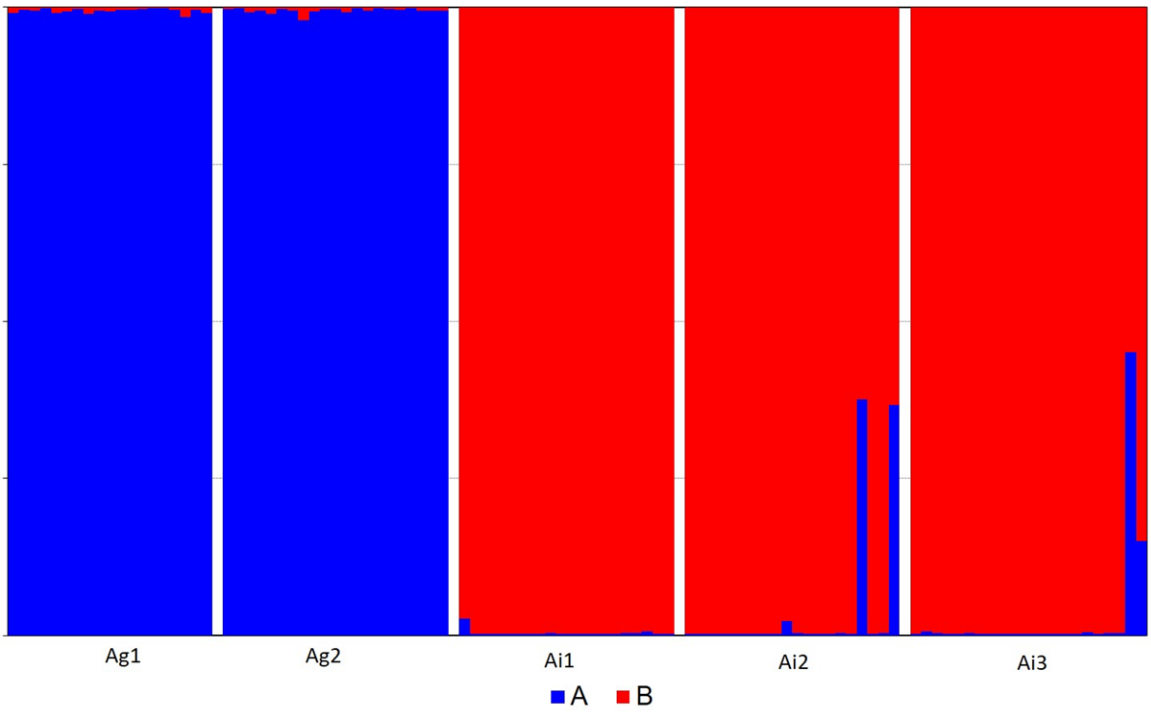
4.2.5. Bayesovska analiza genetičke strukture

Genetička struktura populacija procijenjena je Bayesovskom analizom u računalnom programu STRUCTURE ne uzimajući u obzir prethodne informacije o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki u svrhu definiranja skupina, niti informacije o geografskoj lokaciji prikupljenih populacija. Na temelju usporedbe posteriornih vjerojatnosti podaka [ln$P(X|K)$] za svaku pretpostavljenu vrijednost K dobivene su najvjerodostojnije hipoteze za K = 1 do 10. Također je izbor najvjerodostojnije hipoteze proveden izračunom vrijednosti ΔK pri čemu je najveća vrijednost dobivena za K = 2 (Slika 24), što sugerira da su analizirane populacije najvjerojatnije potekle iz dvije izvorne populacije (Slika 25).



Slika 24. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE: Posteriorna vjerojatnost podataka (*K* – optimalan broj skupina; ln*P*(*X*|*K*) = posteriorna vjerojatnost podataka; Δ*K* vrijednosti su ispisane na vrhovima pikova za (*K* = 2 – 10).

Struktura izvornih populacija s udjelom svih jedinki u svakom genskom skupu za vrijednosti *K* = 2 prikazana je na slici 25. Kod *K* = 2 jedinke su podijeljene po pripadnosti vrsti. Unutar populacija Ai2 i Ai3 detektirana su po dva genotipa (= jedinke) koja su pretežno genetički bijela joha *A. incana,* ali s dosta velikim udjelom genoma crne johe (*A. glutinosa*). Na ovaj način upotrebom Bayesovske analize genetičke strukture za četiri jedinke nesumnjivo je potvrđen hibridni karakter i pripadnost svojti *Alnus* × *pubescens* Tausch.



Slika 25. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE pri *K* = 2. Svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koja potječe iz određene izvorne populacije. (Ag1 i Ag2 populacije crne johe, Ai1, Ai2 i Ai3 populacije bijele johe).

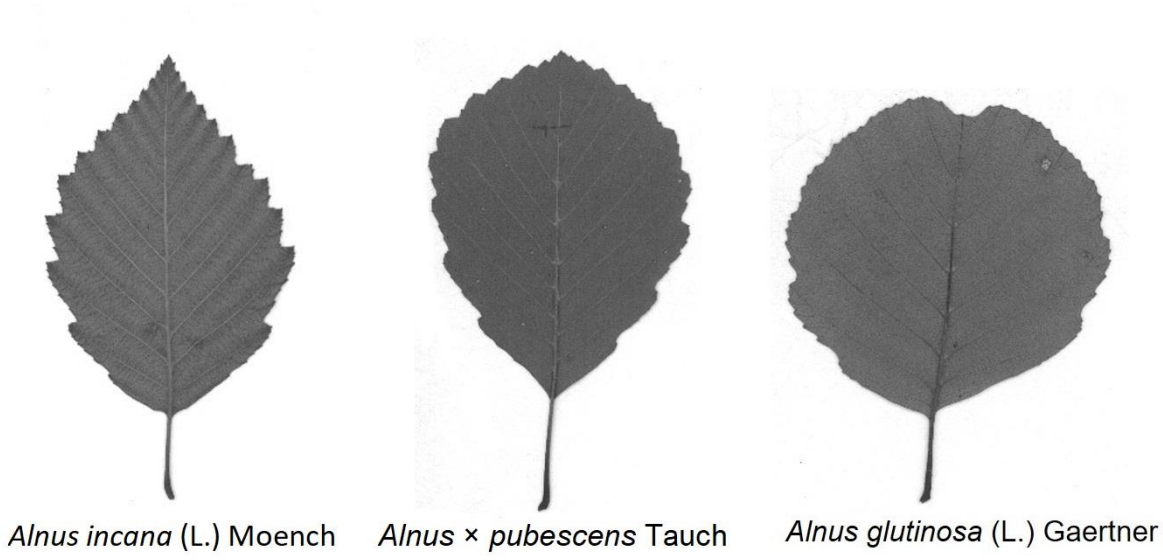
4.3. MORFOLOŠKE OSOBINE LISTA HIBRIDNIH JEDINKI SVOJTE *Alnus* x *pubescens* Tausch

Hibridne jedinke bijele i crne johe po određenim morfološkim osobinama su sličnije bijeloj johi (prosječna dužina lisne plojke /LL/), po drugima crnoj johi (maksimalna širina plojke /MLW/ i širina plojke na 50 % dužine plojke /LW1/), neke osobine su naglašenije u hibridnih jedinki u odnosu na roditeljske vrste (površina plojke /LA/, dužina plojke mjerena od osnove plojke do mjesta najveće širine plojke /PMLW/ i dužina peteljke /PL/), a neke su intermedijarne s obzirom na roditeljske vrste (širina plojke na 90 % dužine plojke /LW2/, broj lisnih žila /NLV/, kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista koja se nalazi na 10 % dužine plojke /LA1/, kut koji zatvaraju glavna lisna žila i pravac koji prolazi kroz osnovu plojke i točku na rubu lista koja se nalazi na 25 % dužine plojke /LA2/ i broj lisnih žila /NLV/) (Tablica 15). Navedene morfološke osobine lista križanaca i njegov cjeloviti izgled u odnosu na listove roditeljskih vrste prikazan je na slici 26.

Tablica 15. Deskriptivna statistika listova populacija bijele (*A. incana*) i crne johe (*A. glutinosa*) i njihovih hibrida

Takson	Deskriptivni pokazatelj	Značajka									
		LA (cm2)	LL (cm)	MLW (cm)	PMLW (cm)	LW1 (cm)	LW2 (cm)	LA1 (°)	LA2 (°)	PL (cm)	NLV
Alnus incana	M	22,64	6,75	4,88	3,21	4,69	1,52	59,56	48,88	2,03	10,80
	Median	22,58	6,76	4,93	3,18	4,72	1,46	60,00	49,00	1,97	11,00
	Mod	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	62,00	49,00	Multiple	11,00
	x_{min}	6,04	3,18	2,69	1,12	2,55	0,44	38,00	38,00	0,78	7,00
	x_{max}	43,36	9,79	7,13	5,27	7,07	3,74	73,00	58,00	4,90	15,00
	SD	6,25	1,06	0,73	0,62	0,70	0,46	6,05	3,81	0,49	0,97
	CV (%)	27,62	15,66	15,05	19,14	15,03	29,89	10,16	7,80	24,10	8,96
Alnus × *pubescens*	M	25,57	6,78	5,36	3,60	5,19	2,43	57,42	49,56	2,22	9,05
	Median	24,64	6,76	5,42	3,64	5,29	2,37	57,00	50,00	2,25	9,00
	Mod	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	1,87	56,00	50,00	Multiple	9,00
	x_{min}	14,80	5,27	3,95	2,43	3,67	1,46	40,00	42,00	1,16	7,00
	x_{max}	42,11	8,85	7,03	5,42	6,97	4,40	69,00	56,00	3,36	11,00
	SD	6,40	0,93	0,74	0,61	0,74	0,69	5,30	3,34	0,48	0,91
	CV (%)	25,03	13,77	13,80	16,85	14,16	28,51	9,23	6,73	21,51	10,08
Alnus glutinosa	M	23,60	6,07	5,36	3,41	5,18	3,22	55,42	50,35	2,20	6,95
	Median	22,62	6,01	5,31	3,36	5,16	3,18	56,00	51,00	2,22	7,00
	Mod	Multiple	Multiple	Multiple	Multiple	5,40	Multiple	61,00	51,00	Multiple	7,00
	x_{min}	8,31	3,70	3,18	1,94	3,04	1,87	30,00	36,00	0,93	5,00
	x_{max}	53,88	9,37	8,37	5,44	8,03	5,02	74,00	61,00	3,96	9,00
	SD	7,01	0,89	0,84	0,61	0,84	0,54	8,48	4,58	0,45	0,79
	CV (%)	29,68	14,67	15,74	17,98	16,30	16,87	15,29	9,09	20,61	11,36

Multiple – Multimodalna distribucija.



Slika 26. Tipični oblik lista roditeljskih vrsta (*Alnus incana* i *Alnus glutinosa*) i njihovog hibrida *Alnus* × *pubescens* na primjeru skeniranih herbarijskih listova.

5. RASPRAVA

Na području Europe križanci bijele i crne johe (*Alnus pubescens* Tausch) do sada su utvrđeni na području Bjelorusije, Latvije, Poljske, Češke, Švedske i Irske (Banaev i Bazant 2007). Premda su hibridne jedinke ovih vrsta zabilježene i u Hrvatskoj (Alegro i sur. 2006; Poljak i sur. 2014a) sustavna istraživanja do sada nisu provedena. Cilj ovog diplomskog rada je bio morfometrijskim i molekularnim pristupom potvrditi ili osporiti postojanje hibridnih jedinki bijele i crne johe u pet populacija iz Podravine. Na samom početku istraživanja navedena metodologija je primijenjena za razlučivanje populacija roditeljskih vrsta. Naime, bez mogućnosti jasnog morfološkog i molekularnog razlikovanja roditeljskih vrsta dokazivanje hibridnih jedinki bilo bi jako otežano, ako ne i nemoguće (Radosavljević i sur. 2019).

Istraživanjem 10 morfoloških varijabla listova na ukupno 102 jedinke iz tri populacije bijele i dvije populacije crne johe ukupno je analizirano 2040 listova (20 listova po jedinci). Sve upotrijebljene statističke analize pokazale su trend odvajanja u dvije skupine koje su se u potpunosti poklapale s ishodišno sakupljenim vrstama: crnom i bijelom johom. Od 10 morfoloških osobina lista najveću diskriminantnu vrijednost za odvajanje vrsta imale su varijabla NLV (broj lisnih žila) i LW2 (širina plojke na 90% dužine plojke). Na istom uzorku jedinki provedena je i molekularna analiza upotrebom mikrosatelitnih biljega pri čemu je dobiven gotovo identičan rezultat. Isto tako dokazana je izrazito veća unutarpopulacijska varijabilnost od međupopulacijske bez obzira o kojoj se vrsti radi. Velika unutarpopulacijska varijabilnost upućuje na slobodan protok gena između populacija. Slične rezultate su dobili i drugi autori prilikom istraživanja morfološke varijabilnosti listova drvenastih vrsta (Franjić 1996; Kajba 1996; Škvorc 2003; Idžojtić i sur. 2006; Zebec i sur. 2010; Poljak i sur. 2013, 2014a, 2018b).

Ono što je u ovom istraživanju razlikovalo populacije crne i bijele johe je veća genetička raznolikost crne johe i nešto veća morfološka raznolikost bijele johe. Po dobivenim rezultatima za genetičku raznolikost i bogatstvo jedinstvenih alela (H_E i N_{par}) populacije crne johe su starije od populacija bijele johe te su se u njima uspjeli nakupiti rijetki aleli, a istovremeno zbog njihove veličine nije došlo do smanjenja genetičke raznolikosti uslijed oplodnje u bliskom srodstvu. S druge strane populacije bijele johe su po genetičkim podacima vjerojatno mlađe te su nastale širenjem iz manjeg broja jedinki pa im je genetička raznolikost u startu bila skromnija, a rijetki aleli se nisu uspjeli nakupiti. Veća varijabilnost morfoloških osobina bijele johe možda je i rezultat introgresija crne johe u genom bijele johe ili pak fenotipska plastičnost koja ne mora

imati svoje podrijetlo u genetičkoj nego u epigenetičkoj raznolikosti zbog promjenjivih okolišnih uvjeta (Bossdorf i sur 2008; Zhang i sur. 2013). U prilog ovom posljednjem zaključku idu rezultati dobiveni fitocenološkim istraživanjem šuma bijele johe u Podravini. Naime, prema tom istraživanju veliki antropogeni zahvati i promjene namjene zemljišta doveli su do toga da su šume bijele johe doživjele regresivne promjene u rasprostranjenosti i flornom sastavu pa ih se može smatrati ugroženima (Vukelić i sur. 2018).

Iako je trend odvajanja u dvije skupine bio očit, i u morfološke i u molekularne analize je uočeno nekoliko jedinki bijele johe koje po svojim morfološko-molekularnim osobinama nisu pripadale ni jednoj vrsti. Od ukupno istraživane 102 jedinke hibridno podrijetlo je sigurno potvrđeno za samo tri jedinke. Glavni razlog ovako malom broju hibrida treba tražiti u vremenskom pomaku u cvjetanju roditeljskih vrsta (Yurkevich i sur.1963; Parfenov 1980). Naime, neka eksperimentalna istraživanja su pokazala kako bijela joha cvjeta tjedan dana ranije nego crna (Luchnik 1974), ali da vrijeme cvatnje nije potpuno uniformno unutar samih populacija te da pojedine jedinke bijele johe, bilo uslijed biološke specifičnosti ili posebnih mikroklimatskih uvjeta, mogu cvjetati u isto vrijeme kad i jedinke crne johe (Banaev i Bazant 2007).

Tek nakon primjene Bayesovske analize populacijske strukture na mikrosatelitnim podacima bilo je moguće dobiti detaljniji uvid u genetičku strukturu hibridnih jedinki. Na ovaj način je u jedinkama br. 17 i 20 iz populacije bijele johe Ai2 (Slatina) i jedinci br. 21 iz populacije Ai3 (Donji Miholjac) utvrđena introgresija genoma crne johe (36.7 do 45,1 %; Slika 25). Budući da po definiciji introgresija ili introgresijska hibridizacija predstavlja povratno križanje međuvrsnog hibrida s biljkom roditeljske vrste (Harrison i Larson 2014), hibridne jedinke iz Podravine su vjerojatno rezultat povratnog križanja s bijelom johom kao roditeljskom vrstom. Mogućnost da su hibridne jedinke povratni križanci s bijelom johom u potpunosti potvrđuju rezultati morfološke analize po kojima su tri utvrđene hibridne jedinke morfološki i genetički specifične, ali ipak sličnije jedinkama bijele johe (Slika 22). Zašto su hibridne jedinke sličnije bijeloj johi moglo bi se objasniti i rezultatima istraživanja Kundzinsh-a (1968) koji je zaključio da do uspješne hibridizacije među ovim vrstama može doći samo onda ako je bijela joha majčinska biljka. Slijedeći ovu logiku možemo pretpostaviti da hibridne jedinke obitavaju samo u populacijama bijele johe te dalje povratnim križanjem s jedinkama unutar populacije bijele johe formiraju križance koji su genomom srodniji, a morfologijom sličniji jedinkama bijele johe. U svakom slučaju za siguran zaključak o

pripadnost hibridnih jedinki određenoj generaciji hibrida morale bi se uporabiti dodatne molekularne i statističke metode (Anderson i Thompson 2002).

Bez obzira kakvi su hibridi prisutni (F_1, F_2 ili različiti tipovi povratnih križanaca) u istraživanim populacijama, dobiveni rezultati su omogućili isključivanje tri jedinke iz populacija bijele johe i njihovo tretiranje u morfološkoj analizi kao treće svojte, hibrida *Alnus* × *pubescens* Tausch (Tablica 15). Ovako provedena morfološka analiza potvrdila je jasnu morfološku specifičnost hibridnih jedinki koje su posjedovale veću površinu plojke lista, dužu plojku mjerenu od osnove do mjesta najveće širine lista te dužu peteljku od roditeljskih vrsta. Ostalih sedam mjerenih osobina su bile sličnije jednoj odnosno drugoj roditeljskoj vrsti ili su bile intermedijarne u odnosu na njih. Zanimljivo je da sve ove navedene morfološke osobine lista zajedno rezultiraju karakterističnim listom koji je već na prvi pogled različit od listova jedinki roditeljskih vrsta (Slika 26). Ipak, treba naglasiti da su na mlađim ograncima pojedinih hibridnih jedinki uz ovakve „hibridne“ oblike listova neki autori uočili i listove karakteristične za roditeljske vrste (Banaev i Bazant 2007).

Različitim antropogenim zahvatima na području nizinskih šumskih ekosustava u Podravini mijenjaju se stanišne prilike, pri čemu propadaju i nestaju mnogi članovi ekosustava, što dovodi do gubitka biološke raznolikosti. Izgradnjom hidroelektrana i uređivanjem vodotokova smanjuje se razina podzemnih voda, koje su uz poplavne vode temeljni čimbenik u formiranju šumskih zajednica u nizinskim šumskim ekosustavima (Vukelić i Rauš 1998). Budući da su navedene promjene u staništima nepovratne, a za križance crne i bijele johe se u literaturi navodi da imaju veću otpornost na sušu, na bolesti korijena, da su manji zahtjevi za kvalitetom tla od crne i bijele johe te da posjeduju dobra fizičko-tehnička svojstva drva (Poljak i sur. 2014a; Kajba 1990; Mejnartowicz 2008; Banaev i Bazant 2007; Uri i sur. 2003; Ruņģis i sur. 2010), pošumljavanje ovih staništa hibridnim jedinkama čini se izglednom opcijom u budućnosti.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedene morfometrijske i genetičke analize populacija bijele i crne johe iz Podravine mogu se izvući sljedeći najvažniji zaključci:

1) sve primijenjene statističke metode ukazivale su na trend odvajanja istraživanih jedinki u dvije skupine koje se mogu poistovjetiti sa ishodišno skupljenim vrstama: bijelom i crnom johom,
2) u crne johe je zapažena veća genetička, a u bijele johe nešto veća morfološka raznolikost,
3) iako je trend odvajanja u dvije skupine bio očit, i u morfološke i u molekularne analize je uočeno nekoliko jedinki unutar populacija bijele johe koje po svojim morfološko-molekularnim osobinama nisu pripadale ni jednoj vrsti,
4) od ukupno istraživane 102 jedinke hibridno podrijetlo (*Alnus* × *pubescens* Tausch) je dokazano za tri jedinke iz populacija bijele johe (mogući razlog tako malog broja jedinki hibridnog porijekla je vremenski pomak u cvjetanju roditeljskih vrsta),
5) hibridne jedinke iz Podravine su vjerojatno rezultat povratnog križanja s bijelom johom kao roditeljskom vrstom, ali za siguran zaključak o pripadnost hibridnih jedinki određenoj generaciji hibrida morale bi se upotrijebiti dodatne molekularne i statističke metode,
6) nakon primjene Bayesovske analize populacijske strukture na molekularnim podacima utvrđena je introgresija genoma crne johe u intermedijarnim jedinkama (36.7 do 45,1 %),
7) hibridne jedinke se razlikuju od obje roditeljske vrste po većoj površini plojke, dužini plojke mjerenoj od osnove do mjesta najveće širine te po dužini peteljke (ostalih sedam mjerenih osobina su bile sličnije jednoj odnosno drugoj roditeljskoj vrsti ili su bile intermedijarne u odnosu na njih).

8. POPIS LITERATURE

Alegro A., Marković Lj., Antonić O., Bogdanović S. (2006): Historical and functional aspects of plant biodiversity – an example on the flora of the Vukova Gorica region (Central Croatia). Candollea **61(1)**: 135–166.

Anderson E.C., Thompson E.A. (2002): A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. Genetics **160**: 1217-1229.

Banaev E., Bazant V. (2007): Study of natural hybridization between *Alnus incana* (L.) Moench. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Journal of Forest Science **53**: 66-73.

Bednorz L. (2006): Morphological variability of leaves of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz in Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae **75 (3)**: 233-243.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Catch F. (2004): GENETIX 4.05, Population genetics software forWindowsTM. Université de Montpellier II. Montpellier. (http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.html)

Benson D., Vanden B., Potter D. (2004): Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. 15. In: Gillings M, Holmes A (eds) Plant microbiology. Garland Science/BIOS Scientific, London/New York, pp 97-128.

Bossdorf O., Richards C.L., Pigliucci M. (2008): Epigenetics for ecologists. Ecol Lett. **11**: 106–115

Bruschi P., Grossoni P., Bussotti F. (2003): Within- and among-tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. natural populations. Trees **17**: 164-172.

Byng J., Chase M., Christenhusz M., Fay M., Judd W., Mabberley D., Sennikov A., Soltis D., Soltis P., Stevens P. (2016): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society **181 (1)**: 1–20, doi:10.1111/boj.12385

Conover W.J. (1980): Practical Nonparametric Statistics, 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York.

Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B. (1994): Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**: 3166–3170.

Drašnarová A., Krak K., Vit P., Doudová J., Douda J., Hadincová V., Zákravský P., Mandák B. (2014): Cross-amplification and multiplexing of SSR markers for *Alnus glutinosa* and *A. incana*. Tree Genetics & Genomes **10**: 865–873.

Ellegren H.(2002): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics **5(6)**: 435-445.

Everitt B. S. (1981): Cluster analysis. Heinemann Educational Books, London.

Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics **131**: 479-91.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online **1**: 47-50.

Franjić J. (1996): Morfometrijska analiza varijabilnosti lista posavskih i podravskih populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L., *Fagaceae*) u Hrvatskoj. Glasnik za šumske pokuse **32**: 153-214.

Glaubitz J.C. (2004): convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Molecular Ecology Notes **4**: 309-310.

Goudet J. (1995): FSTAT: a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity, **86**: 485-486.

Harrison R., Larson E. (2014): Hybridization, Introgression and the Nature of Species Boundaries. Journal of Heredity **105(S1)**: 795-809.

Hempel G., Wilhelm K. (1889): Die Bäume und Sträucher des Waldes - In Botanischer und Forstwirtschaftlicher Beziehung. Verlag von ed. Hölzel, Wien.

Hiltbrunner E., Aerts R., Bühlmann T., Huss-Danell K., Magnusson B., Myrold D.D., Reed S.C., Sigurdsson B.D., Körner C. (2014): Ecological consequences of the expansion of N2-fixing plants in cold biomes. Oecologia **176**: 11–24.

Hubisz M., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. (2009): Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular ecology resources **9**: 1322-1332.

Idžojtić M., Zebec M., Drvodelić D. (2006): Varijabilnost populacija brekinje u kontinentalnom dijelu Hrvatske prema morfološkim obilježjima lišća i plodova, Glasnik za šumske pokuse, posebno izdanje **5**: 305–314

Kajba D. (1990): Mogućnosti kloniranja obične breze (*Betula pendula* Roth) i crne johe (*Alnus glutinosa* /L./ Gaertn.). Magisterij, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kajba, D. (1996): Međupopulacijska i unutarpopulacijska varijabilnost breze (*Betula pendula* Roth.) u dijelu prirodne rasprostranjenosti u Republici Hrvatskoj, Glasnik za šumske pokuse **33**: 53–108.

Kalinowski S.T. (2004): HP-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Molecular Ecology Notes.

Kimura M., Crow J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics **49**, 725-738.

Kundzinsh A.V. (1968): Experiments on Artificial Hybridization of Alder. Gain in Forest Productivity. Riga, Zinatne: 69–99.

Legendre P., Legendre L. (1998): Numerical ecology. Amsterdam, Elsevier Science B. V., str.853.

Lepais O., Bacles C.F.E (2011): De Novo Discovery and Multiplexed Amplification of Microsatellite Markers for Black Alder (Alnus glutinosa) and Related Species Using SSR-Enriched Shotgun Pyrosequencing. Journal of Heredity **102(5)**: 627–632.

Luchnik Z.I. (1974): Introduction of Trees and Shrubs in the Altai Krai. Moskva, Kolos: 656.

Mejnartowicz L. (2008): Genetic variation within and among naturally regenerating populations of alder (*Alnus glutinosa*). Acta Societatis Botanicorum Poloniae **77 (2)**: 105–110.

Melville R.(1937): The accurate definition of leaf shapes by rectangular coordinates. Annals of Botany NS.**1**: 673-680.

Melville R. (1939): The application of biometrical methods to the study of elms. Proc. Linn. Soc. Bot. **151**: 152-159.

Moxon E.R., Wills C. (1999): DNA microsatellites: agents of evolution? Scientific American **280 (1)**: 94–99.

Nikolić T. ur. (2015): Rasprostranjenost *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. u Hrvatskoj, Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 06.04.2020).

Ohta T., Kimura M. (1973): A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetics Research **22**: 201-204.

Parfenov V.I. (1980): Dependence of distribution and adap-tation of plant species on the area borders. Minsk, Nauka i tekhnika: 205.

Poljak I., Idžojtić M., Zebec M., Strižić A., Tomić J. (2013): Variation of the Almond Leaved Pear (*Pyrus spinosa* Forssk.) in Croatia according to the morphology of leaves. 4. Hrvatski Botanički Simpozij s međunarodnim sudjelovanjem, Knjiga sažetaka, Alegro A., Boršić I. (ur.), Zagreb: MTG, str.195-196.

Poljak I., Idžojtić M., Šapić I., Vukelić J., Zebec M. (2014a): Population variability of grey (*Alnus incana*/L./Moench) and black alder (*Alnus glutinosa*/L./Gaertn.) in the Mura and Drava region according to the leaf morphology. Šumarski list **138 (1-2)**: 7-17.

Poljak I., Idžojtić M., Zebec M. (2014b): Leaf Morphology of the Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) - a Methodological Approach. Acta Hort. **1043**: 211-218.

Poljak I., Idžojtić M., Alegro A., Šapić I., Orešković M., Vukelić J. (2018a): Distribution, habitat and population variability of green alder (*Alnus alnobetula* (Ehrh.) K.Koch subsp. *alnobetula*) in Croatia. Proceedings: Natural resources green technology and sustainable development, Radojčić Redovniković I., Jakovljević T., Petravić Tominac V., Panić M., Stojaković R., Erdec D., Radošević K., Gaurina Sarček V., Cvjetko Bubalo M., (ur.), Zagreb: Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, str. 156-160.

Poljak I., Idžojtić M., Šapić I., Korijan P., Vukelić J. (2018b): Diversity and Structure of Croatian Continental and Alpine-Dinaric Populations of Grey Alder (*Alnus incana* /L./ Moench subsp. *incana*): Isolation by Distance and Environment Explains Phenotypic Divergence. Šumarski list **142 (1-2)**: 19-32.

Potočić Z. (1980): Šumarska enciklopedia 1. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb.

Pritchard J., Stephens MJ., Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics **155**: 945-59.

Prpić B., Milković I. (2005): Rasprostranjenost poplavnih šuma u prošlosti i danas. U: J. Vukelić (ur.), Poplavne šume u Hrvatskoj, Akademija šumarskih znanosti, Zagreb, str. 23–39.

Radosavljević I., Bogdanovic S., Celep F., Filipović M., Šatović Z., Surina B., Liber Z. (2019): Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill. Scientific Reports **9 (1)**: 3276.

Raymond M., Rousset F.(1995): Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity **86**: 248-249.

Ruņģis D., Veinberga I., Voronova-Petrova A., Daugavietis M. (2010): Correlation of allelic content with tree characteristics in a hybrid alder stand. Mežzinātne. Forest Science **21 (54)**: 56–64.

Sharma S. (1996): Applied Multivariate Techniques. John Wiley & Sons, Inc.

Snedecor G. W., Cochran W. C. (1971): Statistical Methods, 6th edition. Iowa State, University Press, str.593.

Sokal R.R., Rohlf F.J. (2012): Biometry: the principles and practice of statistics in biological research, 4th edition, W.H. Freeman and Co., 937 pp., New York.

StatSoft, Inc. (2001): STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.

Šatović Z. (1999): Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo **1-2**: 73-96

Škvorc Ž. (2003): Morfološka i genetička varijabilnost hrasta medunca (*Quercus pubescens* Willd.) i duba (*Q. virgiliana* /Ten./Ten.) u Hrvatskoj. Magistarski rad, Šumarski fakultet, Zagreb.

Trinajstić I., Kovačić S., Šimić D. (2001): Are there any morphometrical differences in the leaves of two shoot types of silver birch (Betula pendula Roth, Betulaceae). Glasnik za šumske pokuse **38**: 77-87.

Turchetto C., Segatto A.L.A., Mäder G., Rodrigues D.M., Bonatto S.L., Freitas L.B. (2016): High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: Implications for conservation. AoB PLANTS 8, 2016, plw002, https://doi.org/10.1093/aobpla/plw002

Uri V., Tullus H., Lõhmus K. (2003): Nutrient allocation, accumulation and above-ground biomass in grey alder and hybrid alder plantations. Silva Fennica **37 (3)**: 301–311.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zubeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nuclear Acids Research **23 (21)**: 4407-4414.

Vukelić J., Rauš Đ. (1998): Šumarska fitocenologija i šumske zajednice u Hrvatskoj. Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str.310.

Vukelić J., Baričević D., List Z., Šango M. (2006): Prilog fitocenološkim istraživanjima šuma crne johe (*Alnus glutinosa* Geartn) u Podravini. Šumarski list **130 (11–12)**: 479–492.

Vukelić J., Baričević D., Poljak I., Vrček M., Šapić I. (2018): Fitocenološka analiza šuma bijele johe (*Alnus incana* /L./ Moench subsp. *incana*) u Hrvatskoj. Šumarski list **142 (3-4)**: 123-135.

Weber J. L., May P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics **44**: 388- 396.

Weir B.S., Cockerham C.C.(1984): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution **38**: 1358-1370.

WinFolia ™, 2001: Regent Instruments Inc., Quebec, Canada, version PRO 2005b.

Yurkevich I.D., Gheltman V.S., Parfenov V.I. (1963): Speckled Alder Forests and Economic Use of Them. Minsk, AS BSSR: 142.

Zebec M., Idžojtić M., Poljak I., Mihaldinec I. (2010): Varijabilnost nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo) na području hrvatske Podravine prema morfološkim svojstvima listova. Šumarski list **134 (11–12)**: 569–580.

Zhang Y.-Y., Fischer M., Colot V., Bossdorf O. (2013): Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. New Phytologist **197**: 314–322.

9. ŽIVOTOPIS

Barbara Viljevac (Virovitica, 10. lipnja 1992.). Nakon završene Prirodoslovno-matematičke gimnazije Petra Preradovića upisuje integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Zanimanje za edukaciju djece izražava sudjelovanjem u studentskoj sekciji za edukaciju i radom kao vodič u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.