

Usporedba genetičke raznolikosti između i unutar kontinentalnih i primorskih populacija pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj

Dvorski, Matija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:876036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Matija Dvorski

**Usporedba genetičke raznolikosti između i unutar kontinentalnih i primorskih
populacija pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju za Filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**USPOREDBA GENETIČKE RAZNOLIKOSTI IZMEĐU I UNUTAR
KONTINENTALNIH I PRIMORSKIH POPULACIJA PITOMOG KESTENA
(*Castanea sativa* Mill.) U HRVATSKOJ**

Matija Dvorski
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Genetička raznolikost jedan je od najvažnijih elemenata prilagodbe svih živih bića na neprestane promjene u okolišu. Intenzivno iskorištavanje kestenovih šuma i bolest poznata kao rak kestenove kore ostavili su trajne negativne posljedice na populacije europskog pitomog kestena. Svaka spoznaja o genetičkoj varijabilnosti europskog pitomog kestena izravno doprinosi razvoju učinkovitijih planova zaštite i gospodarenja ovom vrstom. Cilj ovog diplomskog rada je bio usporediti genetičku raznolikost između i unutar tri kontinentalne (Bilogora, Medvednica, Moslavačka gora) i tri primorske populacije (Poreč, Buje, Cres) pitomog kestena u Hrvatskoj analizom devet SSR i devet EST-SSR mikrosatelitnih biljega. Dobiveni rezultati nisu potvrdili jasnu genetičku diferencijaciju kontinentalnih i primorskih populacija pitomog kestena u Hrvatskoj. Svojom genetičkom raznolikošću populacije Medvednica, Bilogora, Moslavačka gora i Buje ukazivale su na prirodno podrijetlo, dok su populacije Poreč i Cres ukazivale na jako veliki antropogeni utjecaj u njihovom formiranju. Protok gena iz nasada lovranskih maruna u prirodnu populaciju Cres moguće je objašnjenje specifične genetičke raznolikosti ove populacije, dok bi populacija Poreč mogla biti kombinacija gena talijanskih prirodnih populacija i/ili kultivara, istarskih prirodnih populacija i lovranskog maruna. U odvojenim SSR i EST-SSR analizama svi dobiveni populacijsko-genetički parametri bili su gotovo isti pa se u budućim istraživanjima preporučuje analiza ujedinjenih podataka.

(58 stranica, 12 slika, 9 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: pitomi kesten, genetička raznolikost, mikrosatelitni biljezi

Voditelj: prof. dr. sc. Zlatko Liber

Ocjenitelji: 1. prof. dr. sc. Zlatko Liber (mentor)
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Rad prihvaćen: 18. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

COMPARISON OF GENETIC DIVERSITY BETWEEN AND WITHIN CONTINENTAL AND COASTAL POPULATIONS OF EUROPEAN SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) IN CROATIA

Matija Dvorski

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genetic diversity is one of the most important elements in adapting of all living beings to the continual changes in the environment. The intensive exploitation of chestnut forests and the disease known as chestnut blight have left negative effects on the populations of European chestnut. Any knowledge of the genetic variability of the chestnut directly contributes to the development of more effective conservation and management plans for this species. The aim of this thesis was to compare genetic diversity between and within three continental (Bilogora, Medvednica, Moslavačka gora) and three coastal populations (Poreč, Buje, Cres) of European chestnut in Croatia using nine SSR and nine EST-SSR microsatellite markers. The obtained result did not confirm the clear genetic differentiation between continental and coastal populations of European chestnut in Croatia. Due to their genetic diversity, the populations of Medvednica, Bilogora, Moslavačka Gora and Buje indicated their natural origin, while the populations of Poreč and Cres indicated a very large anthropogenic influence during their formation. Gene flow from Lovran Marron plantations to the natural population of Cres is a possible explanation for the specific genetic diversity of this population, while the population Poreč could be a combination of the genes of Italian natural populations and / or cultivars, Istrian natural populations and Lovran Marron. In the separate SSR and EST-SSR analyzes, all obtained population-genetic parameters were almost the same, so the recommendation is that in the future data analysis should be applied on the combined data set.

(58 pages, 12 figures, 9 tables, 56 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: European chestnut, genetic diversity, microsatellite markers

Supervisor: Full Professor Zlatko Liber, PhD

Reviewers: 1. Full Professor Zlatko Liber, PhD (supervisor)
2. Associate Professor Vesna Petrović Peroković, PhD
3. Assistant Professor Mirela Sertić Perić, PhD

Thesis accepted: 18. rujna 2019.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. TAKSONOMIJA, EVOLUCIJA, RASPROSTRANJENOST, MORFOLOŠKE OSOBINE I EKOLOGIJA PITOMOG KESTENA | 2 |
| 1.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST..... | 7 |
| 1.3. MIKROSATELITI KAO GENETIČKI BILJEZI | 10 |
| 1.4. STATISTIČKE METODE U ANALIZI GENETIČKE RAZNOLIKOSTI | 13 |
| 1.4.1. Deskriptivna statistika | 13 |
| 1.4.2. Faktorijalna analiza korespodencije (FCA) | 15 |
| 1.4.3. Bayesovska analiza populacijske strukture | 15 |
| 2. CILJ RADA | 17 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 19 |
| 3.1. BILJNI MATERIJAL | 20 |
| 3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA | 21 |
| 3.3. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA..... | 24 |
| 3.4. STATISTIČKA ANALIZA..... | 29 |
| 4. REZULTATI..... | 30 |
| 4.1. DETEKCIJA MIKROSATELITNIH ALELA I INFORMATIVNOST BILJEGA | 31 |
| 4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST | 33 |
| 4.3. FAKTORIJALNA ANALIZA KORESPODENCIJE (FCA)..... | 35 |
| 4.4. BAYESOVSKA ANALIZA GENETIČKE STRUKTURE | 36 |
| 5. RASPRAVA | 38 |
| 6. ZAKLJUČCI | 42 |
| 7. ZAHVALA..... | 44 |
| 8. POPIS LITERATURE | 46 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 53 |
| 10. PRILOZI | 55 |

1. UVOD

1.1. TAKSONOMIJA, EVOLUCIJA, RASPROSTRANJENOST, MORFOLOŠKE OSOBINE I EKOLOGIJA PITOMOG KESTENA

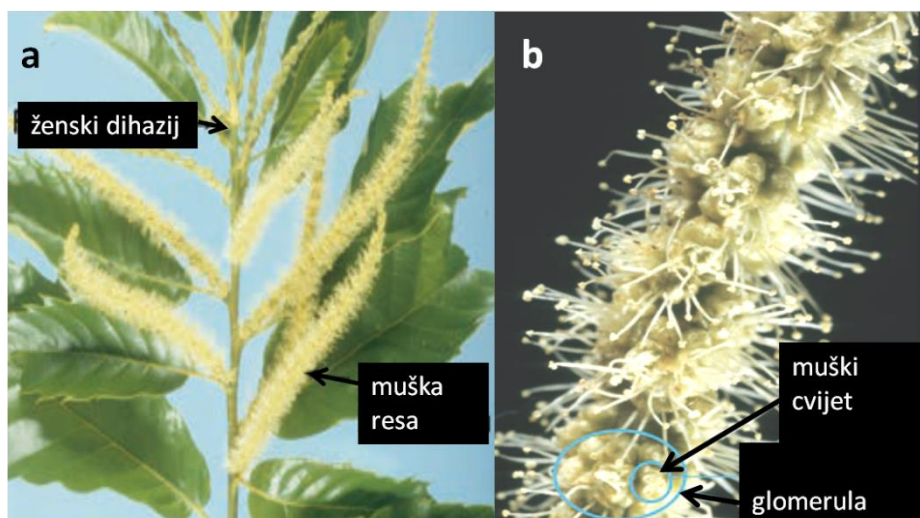
Castanea sativa Mill. (europski pitomi kesten) je vrsta kritosjemenjača unutar središnjih dvosupnica, reda Fagales, porodice Fagaceae (bukve) i roda *Castanea* Mill. (pitomi kesten) (APG IV. 2016, Poljak 2014, Domac 2002). Porodica Fagaceae obuhvaća sedam rodova i više od tisuću vrsta. Broj vrsta unutar većine rodova još je nedefiniran i jako ovisan o pojedinom autoru: *Castanea* (12), *Castanopsis* (100 – 200), *Chrysolepis* (2), *Fagus* (11), *Lithocarpus* (300), *Quercus* (450 – 600), *Trigonobalanus* (3) (Kremer i sur. 2007).

Iako najstariji fosilni ostaci pronađeni u Sjevernoj Americi i Europi datiraju iz vremena gornjeg eocena i kasnog oligocena (prije oko 25 milijuna godina), pretpostavlja se da se porodica Fagaceae pojavila na prijelazu mezozoika u kenozoik prije više od 65 milijuna godina. Rezultati filogenetskih istraživanja dobiveni analizom kloroplastne i nuklearne DNA sugeriraju da se diferencijacija u različite rodove odvijala ekstremno brzo tijekom srednjeg tercijara (prije 33,9 do 5,3 milijuna godina). Rod *Fagus* je divergirao od zajedničkog pretka ranije nego rodovi *Quercus*, *Castanea*, *Lithocarpus* i *Castanopsis* između kojih postoji veća genetička sličnost. Analizom molekularnog sata temeljenoj na divergenciji cpDNA utvrđeno je da su se interspecifična odvajanja unutar rodova *Quercus*, *Fagus* i *Castanea* dogodila u periodu od prije 22 do 3 milijuna godina. Relativno nedavna i slaba genetička divergencija između različitih rodova nedavno je potvrđena uspješnom primjenom istih genetičkih biljega na različite rodove ove porodice (Kremer i sur. 2007).

Rod *Castanea* (pitomi kesten) uz rodove *Fagus* (bukva) i *Quercus* (hrast) od velike je ekonomske važnosti, prije svega zbog drvene mase i jestivih plodova, ali i od ekološke važnosti jer je sastavni dio većeg broja šumskih zajednica diljem svijeta. Iz navedenog razloga nije iznenađujuće da gotovo sve vrste ovog roda predstavljaju velik interes šumarske i agronomske struke i raznih područja svjetske znanosti. U ovome diplomskom radu objekt istraživanja je europski pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.).

Europski pitomi kesten jedina je europska autohtona vrsta iz roda *Castanea* Mill. (Conedera i sur. 2016). Listopadna je drvenasta vrsta koja doseže visinu od 30 metara, a iznimno i više (Prgomet i sur. 2013). Cvijeta nakon listanja, u lipnju. Cvjetovi su jednospolni i jednodomni (monecični) te aktinomorfne simetrije. Po tri ili više muških

cvjetova nalaze se zajedno u glavičastim skupinama (glomerule), koje su raspoređene spiralno u dugačkim i uspravnim resama (Sl. 1a). Pri bazi muških resa nalaze se po tri ženska cvijeta u dihajalnim cvatovima ovijenim udubljenom cvjetnom osi (kupola), a ponekad i muški cvijet sa zakržljanim tučkom (hermafroditan cvijet). Perigon muških i ženskih cvjetova najčešće je sastavljen od tri jajasta i zelenkasta listića u dva kruga, koji su na bazi međusobno srasli. U svakom se muškom cvijetu obično nalazi 6 do 15 prašnika. Antere prašnika smještene su na dugačkim i bijelim prašničkim nitima (filamentima), koje su kao prilagodba na oprašivanje vjetrom (anemofilia), znatno duže od listića perigona (Sl. 1b).



Slika 1. a) Ogranak vrste roda *Castanea* s razvijenim muškim i ženskim cvatovima, b) dio muškog cvata s muškim cvjetovima u glavičastim skupinama koje su spiralno raspoređene duž dugačke uspravne rese (Preuzeto i izmijenjeno iz Miller i sur. (2014)).

Oprašivanje se uglavnom vrši vjetrom, a sekundarno i kukcima koji skupljaju ljepljivi pelud s muških cvjetova, što kesten čini medonosnom biljkom. Plodnica je podrasla, srasla s perigonom i sastavljena od tri plodna lista pri čemu se samo jedan sjemeni zametak razvije u sjemenku tvoreći plod jednosjemeni orah. U zajedničkoj se kupoli ili ježici nalaze po 3 jednosjemena oraha (Sl. 2). Kupola je kuglasta i u zreom stanju na površini obrasla brojnim stršećim i oštrim ježastim bodljama. Nakon dozrijevanja plodova, krajem rujna i u listopadu, kupole se raspucavaju na dva ili četiri jednaka dijela (Poljak 2014; Prgomet i sur. 2013; Nikolić 2013).

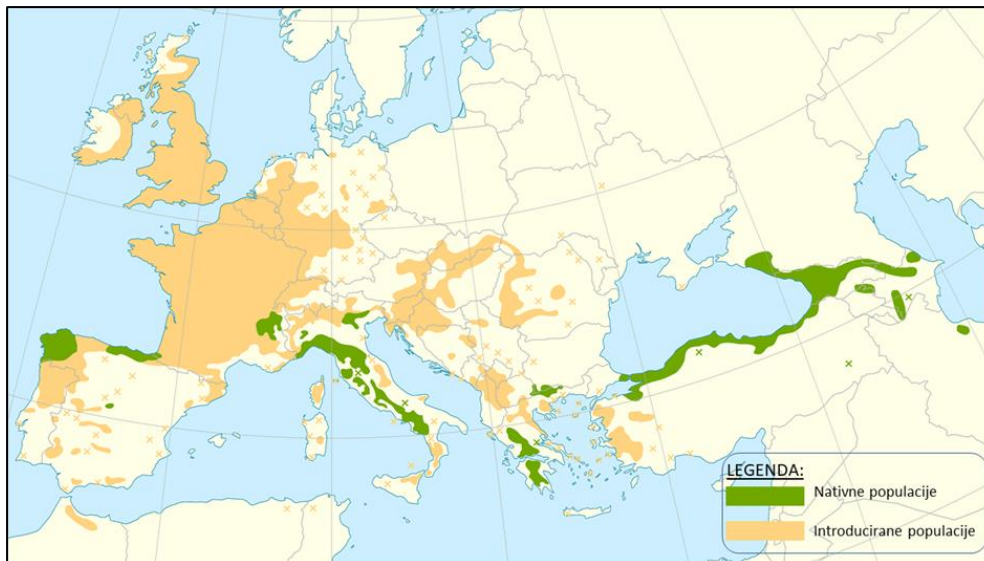


Slika 2. *Castanea* sp. – bodljasta kupola ili ježica s tri jednosjemena oraha (Preuzeto iz: <https://bestlandscapeideas.com/sweet-chestnut-growing-planting-care/>).

Pitomi kesten je heliofitna biljka, stoga za uspješan razvoj ploda zahtijeva puno svjetla. Najviše mu odgovara umjerenokontinentalna i mediteranska klima s prosječnim godišnjim temperaturama od 10 °C do 16 °C. Da bi uspješno urodio plodom, mora biti izložen temperaturama koje nisu niže od -26 °C, odnosno više od 40 °C. Potrebno mu je dugo vegetacijsko razdoblje od 6 do 7 mjeseci s prosječnom temperaturom višom od 10 °C. Zahtijeva 800 do 1600 mm oborina godišnje, umjerenu vlažnost tla i zraka te tople i sunčane jeseni. S obzirom na kasnu cvatnju, početkom lipnja, dobro podnosi kasne proljetne mrazove. Niske ranojesenske temperature u kontinentalnim područjima, mogu nepovoljno utjecati na dozrijevanje plodova i jednogodišnjih izbojaka. Jača strujanja zraka isušuju tučak i smanjuju vjerojatnost za oplodnju, a također pospješuju i evapotranspiraciju što je posebno kobno za one jedinke koje rastu na plitkom tlu na kojem nema mogućnosti navodnjavanja. Kesten je acidofilna vrsta, te stoga preferira tla čija se pH-vrijednost kreće u području od 4,0 do 6,0. Najbolje uspijeva na dubokim, aeriranim i kiselim tlima u kojima se visoka razina podzemnih voda ne zadržava dugo. Pogoduju mu eruptivne i silikatne podloge, škriljci i pješčanici te tla s pjeskovitom glinasto-ilovastom strukturom. Na vapnenačkim podlogama dolazi samo ukoliko je došlo do dekalifikacije dubljeg sloja tla, kao u slučaju istarske crvenice (Prgomet 2011, 2013).

Kada govorimo o rasprostranjenosti, širenju i domestikaciji europskog pitomog kestena jedna od najšire prihvaćenih teorija jest da potječe iz Male Azije, gdje je u

početku domesticiran i pod utjecajem čovjeka proširen do antičke Grčke, Apeninskog poluotoka i drugih dijelova Europe (Sl. 3).

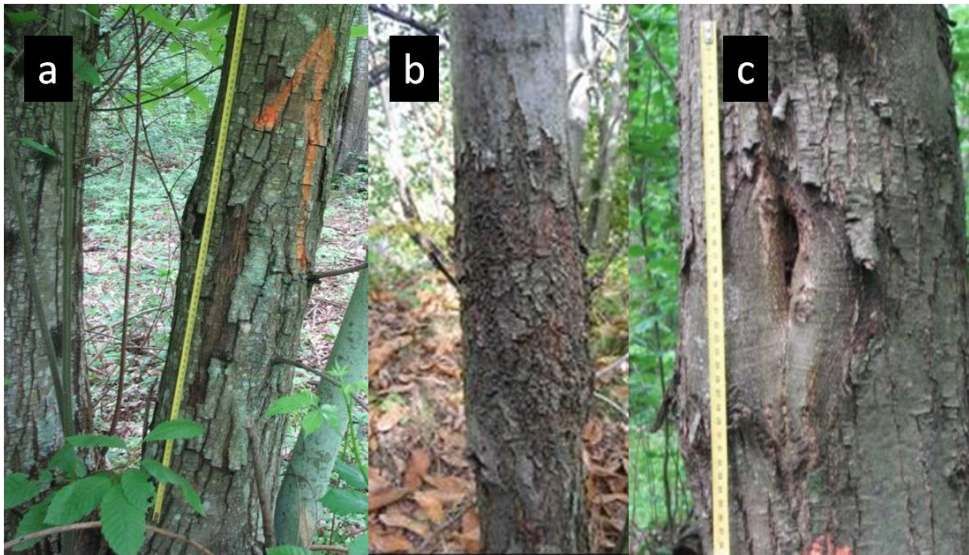


Slika 3. Rasprostranjenost europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Europi i zapadnoj Aziji (Preuzeto i izmijenjeno iz: <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/forestry/gr-tree-project/sweet-chestnut>).

Iako se vjerovalo da su najvećim dijelom antički Grci i Rimljani bili odgovorni za ekspanziju kestena u Europu, najveći se interes za kultivaciju pitomog kestena dogodio u srednjem vijeku. Rimljani su možda uveli ideju o uzgoju i korištenju europskog pitomog kestena, i povremeno introducirali ovu vrstu na određena područja, no nema dokaza o sustavnoj sadnji pitomog kestena u rimsko doba. Na temelju palinoloških podataka, prva ozbiljna ekspanzija kestena pod utjecajem čovjeka odvijala se prije 3700 godina na području današnje Turske, sjeveroistočne Grčke i jugoistočne Bugarske (Poljak 2017). Pitomi kesten je na područje Republike Hrvatske introduciran krajem rimske vladavine i u tursko doba (Prgomet 2011). Pitomi kesten raste u šumama brežuljkastog područja kontinentalnog dijela Hrvatske, u Istri te na otocima Krku i Cresu. U kontinentalnom dijelu Hrvatske kestenove šume zauzimaju različite ekspozicije i dolaze na različitim tipovima tla. Na sjevernim ekspozicijama su mezofilne, dok se na suhim južnim padinama razvijaju acidofilne kestenove šume. U mediteranskom području kestenove šume isključivo se razvijaju na sjevernim i istočnim ekspozicijama (Anić 1940, 1953; Medak 2004; Medak i Perić 2007).

Početkom 20. stoljeća prenesena je iz Azije u Sjevernu Ameriku fitopatogena gljiva mješinaraka, *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr., uzročnik raka kore pitomog kestena

(eng. *chestnut blight*). Azijske vrste pitomog kestena, najvjerojatnije zbog dugog vremena koevolucije, otporne su na infekciju ovom gljivom, dok američke i europska vrsta pitomog kestena obolijevaju (Ježić 2013). Spore ove gljive lako se mogu prenijeti vjetrom, kišom, pticama i kukcima na površinska oštećenja na stablima uzrokovana biotičkim i abiotičkim čimbenicima. Rak kore pitomog kestena opasna je bolest koja uzrokuje nekrozu kore i rak na deblu i granama, nakon čega dolazi do sušenja (Sl. 4).



Slika 4. Oštećenja na kori pitomog kestena zaraženog s gljivom *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. (a = virulentni soj gljive, b = hipovirulentni soj gljive i c = zarasla rak rana (kalus) (Preuzeto iz Nuskern (2017)).

Ova biljna bolest je početkom 20. stoljeća gotovo u potpunosti uništila šume američkog pitomog kestena, a potom se tijekom Prvog svjetskog rata proširila Europom gdje je imala sličan negativni efekt. U Hrvatsku se proširila preko Italije i Slovenije, a prvi slučaj bolesti zabilježen je 1950. nedaleko Rijeke (Poljak 2014; Prgomet i sur. 2011). Istraživanje ove bolesti i mogućnost borbe protiv nje danas su predmetom brojnih znanstvenih istraživanja (Nuskern i sur. 2018; Vuković i sur. 2019).

1.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST

Pod genetičkom raznolikošću obično podrazumijevamo raznolikost gena između jedinki, populacija i različitih taksonomskih kategorija. Genetička raznolikost jedan je od najvažnijih adaptabilnih prilagodbi neke vrste na promjenjive uvjete okoliša. Naime, pretpostavlja se da u genetički raznolikim populacijama postoji dovoljan broj alela koji mogu biti presudni za otpornost populacije na bolesti, štetočine, promjenu klime, utjecaj čovjeka i druge stresove. U ekstremnim situacijama (npr. dugotrajna suša, epidemije bolesti i sl.) stupanj genetičke raznolikosti neke populacije može značiti njezin opstanak ili izumiranje.

Populacijska genetika je grana biologije koja proučava genetičku raznolikost, odnosno učestalost alela i njihovu razdiobu unutar i između populacija. Četiri su osnovna evolucijska procesa koja su uključena u oblikovanje populacijske strukture svake vrste: prirodna selekcija, mutacije, protok gena i genetički pomak (eng. *genetic drift*). Istraživanje genetičke raznolikosti izvrstan je alat za otkrivanje različitih osobina jedinki, populacija, podvrste ili vrste kojoj istraživane populacije pripadaju. Tako istraživanjem genetičke raznolikosti možemo dobiti uvid u:

1. *srodstvene i taksonomske odnose* (npr. pripadaju li istraživane jedinke ili populacije istoj ili različitim vrstama ili podvrstama, kod biljaka koje se mogu razmnožavati nespolno jesu li istraživane jedinke klonovi ili su genetički različite, postoji li u nekoj populaciji križanje u bliskom srodstvu (eng. *inbreeding*), jesu li istraživane jedinke hibridi (između populacija, podvrsta ili vrsta) te koliki je stupanj srodstvene veze s bilo kojim roditeljem, identifikacija kultivara kada su iz bilo kojeg razloga izgubljeni podaci o sadnji, kod osnivanja novih plantaža ili kod projekata obnove kada su te informacije inače nedostupne itd.),
2. *razinu genetičke raznolikosti* (npr. koliko genetske raznolikosti postoji kod istraživane vrste te kakva je ona kad se uspoređi s drugim populacijama ili vrstama, mijenja li se genetička raznolikost tijekom vremena ili zbog prakse upravljanja nekim prostorom, je li genetička raznolikost smanjena u izoliranim populacijama itd.),
3. *utvrđivanje prostorne dinamike vrste* (npr. kako biljke neke populacije međusobno komuniciraju i migriraju tijekom vremena, kako utjecaji na jednu biljnu populaciju (npr. pretvorba staništa) mogu utjecati na ostale populacije, kakav je utjecaj peluda

uzgajanih biljnih vrsta (npr. GMO vrste) na populacije drugih kultiviranih ili divljih srodnika, putuju li geni u okolišu majčinski (sjemenkama i plodovima) ili očinski (peludom), koliko daleko pelud ili sjemenke i plodovi putuju tijekom jedne generacije itd.),

4. *projektiranje, procjenu i zaštitu kolekcija sjemena* (npr. gdje i kako sakupljati sjeme za kolekciju, procjena reprezentativnosti povijesnih zbirki te kakvi su učinci dugotrajnog skladištenja itd.),

5. *razumijevanje karakteristika vrsta i rješavanje ekoloških odnosa* (npr. kakav je odnos križanja u bliskom srodstvu i stranooprašivanja (eng. *inbreeding* vs. *outcrossing*), spolnog i nespolnog razmnožavanja, utvrđivanje genetičkog uskog grla (eng. *bottleneck*) tijekom evolucijske prošlosti vrste, te posredno tko su oprašivači i rasprostranjivači te stanovnici, nametnici i uzročnici bolesti istraživane vrste itd.),

6. *praćenje širenja alohtonih vrsta* (određivanje podrijetla invazivnih biljnih vrsta, pomoć u identificiranju jedinki ilegalno prikupljenih u zaštićenim područjima itd.)

U populacijsko-genetičkim istraživanjima kao alat za utvrđivanje genetičke raznolikosti upotrebljavaju se različiti genetički biljezi (eng. *genetic markers*), koji predstavljaju neki oblik nasljednog polimorfizma koji se može lako pratiti i mjeriti kod jedne ili više populacija. Različiti oblici biljega nazivaju se alelima, a mjesto biljega na kromosomu lokusom. Tradicionalno se genetički biljezi dijele na morfološke i molekularne, ali se unapređenjem metoda molekularne biologije morfološki biljezi gotovo više ne upotrebljavaju, a zbog mogućnosti otkrivanja genetičke raznolikosti izravno na razini DNA, molekularnim biljezima smatramo uglavnom različite tipove DNA biljega. Danas se za proučavanje genetičke raznolikosti vrsta s dobro proučenim genomom kao DNA biljezi najčešće upotrebljavaju mikrosateliti ili jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. *Simple Sequence Repeats*, skraćena SSR) (Moxon i Willis 1999) i polimorfizam pojedinačnih nukleotida (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, skraćena SNPs) te, za slabo proučavane genome, AFLP biljezi ili raznolikost duljine PCR umnoženih restrikcijskih fragmenata DNA (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos i sur. 1995).

Iako je u posljednjih nekoliko godina napisano više znanstvenih studija o genetičkoj raznolikosti pitomog kestena, bilo lokalnog karaktera koje se odnose na pojedine

zemlje ili onih kojima su obuhvaćena veća područja njegove rasprostranjenosti, za područje Republike Hrvatske i ostalog dijela jugoistočne Europe takvih istraživanja je do sada bilo jako malo (Poljak 2014, Poljak i sur. 2017). Stoga bi bilo jako zanimljivo istražiti na hrvatskim populacijama pitomog kestena kako se odnosi genetička raznolikost kontinentalnih prema primorskim populacijama i ima li tu jasne diferencijacije, imaju li kakav genetički utjecaj na prirodne populacije nasadi maruna i obratno, postoji li upliv stranog sjemena u hrvatskim populacijama kao dokaz povijesnih prilika na nekom području, kakav je utjecaj raka kore pitomog kestena na genetičku raznolikost i jesu li populacije veće genetičke raznolikosti otpornije na ovu bolest itd. Budući da su mikrosatelitni biljezi u dosadašnjim studijama genetičke raznolikosti prirodnih populacija i kultivara pitomog kestena pokazali visoku informativnost primijenjeni su i u ovom diplomskom radu.

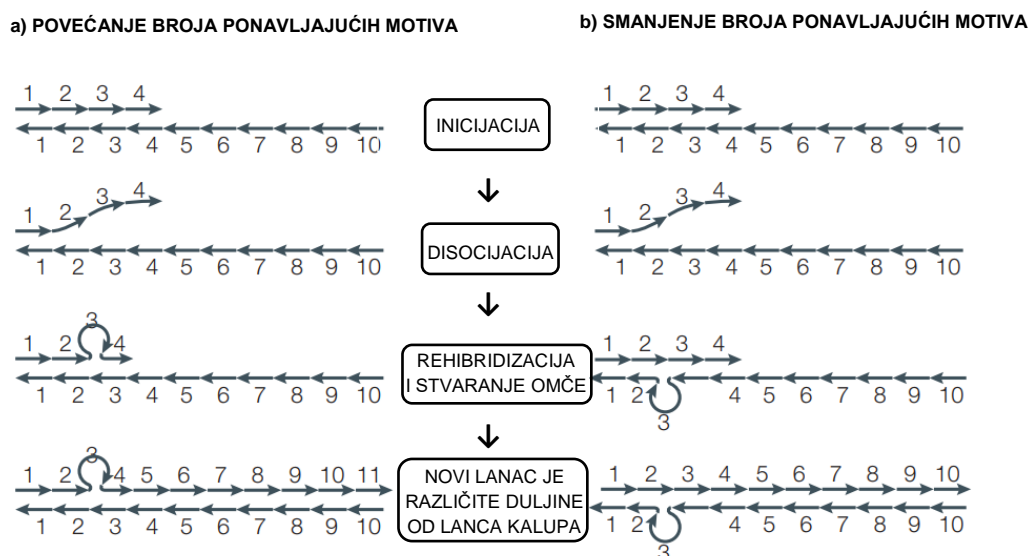
1.3. MIKROSATELITI KAO GENETIČKI BILJEZI

Mikrosateliti, poznati i kao jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. SSR – *Simple Sequence Repeats*) ili kratka uzastopna ponavljanja (eng. STR - *Short Tandem Repeats*), najčešće su upotrebljavani molekularni ili DNA biljezi u genetičkim istraživanjima. Njihova se primjena temelji na lančanoj reakciji polimerazom, a razvijaju se iz genomskih knjižnica ili uz pomoć sekvenciranja nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing*, skraćenica NGS). Mikrosatelitni biljezi se koriste u mnogim područjima genetike uključujući konzervacijsku i populacijsku genetiku, molekularno oplemenjivanje, utvrđivanje očinstva itd. (Oliveira i sur. 2006; Moxon i Willis 1999).

Mikrosateliti se mogu klasificirati prema tipu ponavljanja sekvence na: savršene, nesavršene, prekinute i složene mikrosatelite. U savršenim mikrosatelitima, ponavljajuća sekvenca nije prekinuta niti jednom bazom koja ne pripada motivu (npr. TATATATATATATA), dok se kod nesavršenog mikrosatelita, između ponavljajućih motiva nalazi isto veliki motiv koji ne odgovaraju sekvenci mikrosatelitnog motiva (npr. TATATATA**CT**ATATA). U slučaju prekinutih mikrosatelita, između ponavljajuće sekvence nalazi se mala sekvenca koja ne odgovara najčešće ni veličini ni sastavu mikrosatelitnog motiva (TATATA**CGTGT**ATATATATA), dok se kod složenih mikrosatelita sekvenca sastoji od dva ili više mikrosatelitnih motiva (npr. **TATATATATAGTGTGTGTGTGT**) (Oliveira i sur. 2006).

Mikrosatelitni motivi se nalaze u genomu prokariota i eukariota u kodirajućim, ali češće u nekodirajućim DNA regijama. Najčešće su sastavljene od uzastopno ponavljajućih motiva koji su građeni do 1 do 6 nukleotida (Field i Wills 1998; Tóth i sur. 2000). Mikrosateliti su kodominantni, višeealelni, visoko ponovljivi i vrlo informativni, a to ih čini idealnim genetičkim biljezima (Oliveira i sur. 2006). Nedostatak im je što su visoko vrsno specifični, a njihov razvoj je laboratorijski vrlo zahtjevan i skup (Šatović 1999). Jednom razvijeni mikrosatelitni biljezi (određen redosljed nukleotida za PCR početnice koje omeđuju desetak ili više mikrosatelitnih lokusa) jednostavni su za primjenu i jeftini jer se vrijeme i trošak istraživanja svodi na lančanu reakciju polimerazom i detekciju na kapilarnoj elektroforezi.

Stopa mutacije u mikrosatelitnoj regiji je znatno veća nego u ostatku genoma te iznosi od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotida po lokusu po generaciji, što ih čini iznimno varijabilnima, a samim time i vrlo informativnima (Jarne i Lagoda, 1996; Sia i sur. 2000; Radosavljević 2012). Jedan od najvažnijih mehanizama koji se smatra odgovornim za ovako visoku stopu mutacije je replikacijsko klizanje (eng. *replication slippage*). Tijekom replikacije mikrosatelitne regije, zbog nesavršenosti rada DNA polimeraze, osobito u ponavljajućem mikrosatelitnom motivu, dolazi do pomaka ili „proklizavanja“ jednog lanca u odnosu na drugi što dovodi do pogriješke u sparivanju baza, a to za posljedicu ima stvaranje omče s jednim ili dva ponavljanja „viška“ na jednom lancu. Ukoliko se omča nalazi na komplementarnom lancu, u sljedećem replikacijskom ciklusu ona će poslužiti kao kalup za sintezu novog lanca što će rezultirati insercijom određenog broja kopija mikrosatelitnih motiva, a ako se omča nalazi na rastućem lancu, u sljedećem replikacijskom ciklusu doći će do delecije određenog broja kopija mikrosatelitnih motiva, a time i do nastanka novog alela (Sl. 5). Većinu ovih mutacija može popraviti tzv. sustav za popravak krivo sparenih baza (eng. *mismatch repair system*), tako da će samo mali broj njih završiti kao mutacijski događaj (Oliveira i sur. 2006; Radosavljević 2012; Greguraš 2013).



Slika 5. Shematski prikaz replikacijskog klizanja. (Preuzeto i izmijenjeno iz Ellegren (2004).)

Mikrosateliti se najčešće nalaze u nekodirajućim dijelovima genoma, gdje je stopa točkastih mutacija znatno viša nego u kodirajućim regijama. Što su vrste

srodstveno udaljenije, mogućnost uporabe istih mikrosatelitnih biljega se smanjuje jer se povećava stopa mutacija na mjestu vezanja početnice. Regije koje omeđuju mikrosatelit, a prema kojima se sintetiziraju početnice za umnažanje lokusa od interesa, nisu toliko podložne mutacijama kao sama mikrosatelitna sekvenca. No ipak, u nekim lokusima može doći do mutacija, stoga se početnica neće moći vezati, a aleli određenog mikrosatelitnog lokusa umnožiti. Takvi aleli koji se tijekom analize ne mogu umnožiti, nazivaju se nul-alelima. Ukoliko je jedinka homozigot za nul-alel, taj se alel neće moći umnožiti, a ako je jedinka heterozigot s jednim nul-alelom, nakon provedene PCR reakcije, biti će pogrešno prikazana kao homozigot (Radoslavljević 2012).

Mikrosatelitni biljezi koji se nalaze u kodirajućim dijelovima genoma te su podložni manjim stopama mutacija od SSR-a nazivaju se EST-SSR biljezi (eng. *Expressed Sequence Tag*). Zbog manje stope mutacija ovaj tip mikrosatelitnih biljega je manje vrsno specifičan od „običnih“ mikrosatelitnih biljega (Chagne i sur. 2004). Za razliku od SSR-a, osim što su manje varijabilni EST-SSR biljezi su i pod većim selekcijskim pritiskom (Martin i sur. 2010). Njihov razvoj je brz i jeftin jer su EST-SSR zapravo nusprodukt dostupnih rezultata EST regija (eksprimirajućih regija genoma) koje se čuvaju u bankama gena kao što je GenBank®¹, no nedostatak je njihova ograničena dostupnost jer su istraživanja EST regija primarno usmjerena na ekonomski značajne biljne vrste (Radoslavljević 2012).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

1.4. STATISTIČKE METODE U ANALIZI GENETIČKE RAZNOLIKOSTI

1.4.1. Deskriptivna statistika

Cilj deskriptivne statistike je analizirati informativnost mikrosatelitnih biljega i genetičku raznolikost unutar populacija. Analiza se zasniva na izračunu jednostavnih statističkih parametara, kao što su ukupan broj alela po biljegu (N_a), broj jedinstvenih alela (N_{pr}), zapažena (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_E) te informacijski sadržaj polimorfizma (PIC).

Informativnost pojedinih mikrosatelitnih biljega procjenjuje se na temelju informacijskog sadržaja polimorfizma i ukupnog broja učenih alela u analiziranoj populaciji. Informacijski sadržaj polimorfizma (eng. *Polymorphism Information Content*, skraćenica PIC) (Botstein i sur. 1980) predstavlja mjeru broja i učestalosti alela na nekom lokusu. Procjenjuje se na temelju sljedeće jednadžbe:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^I p_i^2 \sum_{j=1}^{I-1} p_j^2 p_j^2$$

Pri čemu je,

p_i - učestalost alela i ,

$p_i^2 \times p_j^2$ - umnožak kvadratne učestalosti za svaki par alela,

I - ukupan broj alela.

Genetička raznolikost unutar populacije određuje se na temelju prosječnog broja alela po mikrosatelitnom biljegu ili alelnom bogatstvu (N_{ar}) (El Mousadik i Petit 1996), broja jedinstvenih alela (N_{pr}), zapaženoj (H_o) i očekivanoj heterozigotnosti (H_E). Alelno bogatstvo predstavlja prosječan broj alela u populaciji pri čemu broj jedinki unutar različitih populacije nije bitan jer se broj jedinki u svim populacijama svodi na broj jedinki u najmanje brojnoj populaciji. Procjenjuje se na temelju rarefakcijskog indeksa prema sljedećoj jednadžbi:

$$N_{ar} = \sum_{i=1}^{n_i} \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Pri čemu je,

N – broj uzorkovanih jedinki,

$2N$ – broj uzorkovanih alela,

N_i – broj alela i u populaciji,

n – broj poduzorkovanih jedinki (veličina najmanjeg uzorka u analizi),

$2n$ – broj poduzorkovanih alela.

Jedinstveni aleli (N_{pr}) su aleli koji su karakteristični za jedinke samo u jednoj od analiziranih populacija i jednostavno se prebrojavaju. Zapažena heterozigotnost (eng. *observed heterozygosity*, H_o) predstavlja udio heterozigotnih jedinki u analiziranim populacijama, prebrojava se nakon što su aleli detektirani kapilarnom elektroforezom. Očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozygosity*, H_E) predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne nakon jedne generacije nasumične oplodnje, odnosno vjerojatnost da su dva nasumično odabrana alela iz analizirane populacije međusobno različita. Očekivana heterozigotnost može se izračunati pomoću nepristrane formule po Nei ju (Poljak 2014, Vidak 2019), koja uključuje korekciju za male uzorke:

$$H_E = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 - \frac{H_o}{2n} \right)$$

Pri čemu je,

H_E – nepristrana genetička raznolikost po Nei ju,

n – veličina uzorka,

p_i = učestalost alela i u populaciji,

l – ukupan broj alela,

H_o – zapažena heterozigotnost

Uz pomoć računalnog programa FSTAT, primjenom nepristranog procjenitelja θ po metodi Weir i Cockerham (1984), utvrđen je Indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija te njegova signifikantnost pomoću permutacija.

1.4.2. Faktorijalna analiza korespodencije (FCA)

Faktorijalna analiza korespodencije (eng. *Factorial Correspondence Analysis*) je višedimenzionalna statistička metoda koja se koristi za sažimanje informacija i prikaza odnosa između genotipova na temelju simultane analize većeg broja biljega. FCA je slična Analizi glavnih sastavnica (eng. *Principal Component Analysis; PCA*) pri čemu se PCA koristi u slučaju kvantitativnih svojstava, dok se FCA temelji na tablicama kontingencije nastalih unakrsnim tabeliranjem (eng. *cross-tabulation*). Cilj analize je pronaći kompozitne osi dobivene kombinacijom alela, a koje objašnjavaju dio ukupne opažene inercije tablice. Na taj se način jedinke nanose na dvije složene osi koje optimiziraju razlike između analiziranih jedinki koristeći prosječnu inerciju predefiniranih skupina (Tančević i sur. 2011, Mendes-Moreira i sur. 2017).

1.4.3. Bayesovska analiza populacijske strukture

Cilj Bayesovske analize populacijske strukture je odrediti optimalan broj skupina K u svrhu razvrstavanja jedinki u genetički diferencirane skupine, na način da unutar svake skupine bude maksimalizirana Hardy-Weinbergova ravnoteža i ravnoteža vezanosti gena (eng. *linkage equilibrium*). Analiza se temelji na Bayesovom teoremu:

$$P(H|D) = \frac{P(D|H)P(H)}{P(D)}$$

Pri čemu je,

$P(H|D)$ - posteriorna vjerojatnost hipoteze H istinita uz dane podatke D ,

$P(D|H)$ - uvjetna vjerojatnost podatka D uz danu hipotezu H ,

$P(H)$ - priorna vjerojatnost hipoteze H ,

$P(D)$ - marginalna vjerojatnost podatka D ,

D - multilokusni genotipovi jedinki u analizi.

Nakon što se odredi optimalan broj skupina K , pripadnost jedinki pojedinim skupinama određuje se izračunom udjela genoma svake pojedine jedinke, koji potječe iz određene skupine, odnosno izvorne populacije. Pretpostavlja se postojanje 1 do N skupina K , te se za svaku hipotezu provede odgovarajući broj neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastoji od velikog broja ponavljanja (npr. 200 000) tijekom perioda zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*), dok se podatci o posteriornoj vjerojatnosti podataka $\ln P(X|K)$ prikupljaju tijekom ponavljanja (npr. 1 000 000) algoritma Markovljevog lanca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*). Usporedbom posteriornih vrijednosti podataka $\ln P(X|K)$ za svaku vrijednost K (Pritchard i sur. 2000), te izračunom stope promjene posteriornih vrijednosti ΔK između uzastopnih vrijednosti K , moguće je odabrati najvjerodostojnije hipoteze, a jedinke pridružiti pojedinim skupinama.

$$\Delta K = \frac{L_{K-1} + L_{K+1} - 2 \times L_K}{sd_K}$$

Pri čemu je,

L_K - prosječna posteriorna vrijednost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina K izračunata na temelju više prohoda,

L_{K-1} - prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K-1$,

L_{K+1} - prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K+1$,

sd_K - standardna devijacija posteriornih vrijednosti podataka za broj skupina K

(Poljak 2014, Greguraš 2013).

2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti genetičku raznolikost između i unutar tri kontinentalne (Bilogora, Medvednica, Moslavačka gora) i tri primorske populacije (Poreč, Buje, Cres) europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj analizom 9 SSR i 9 EST-SSR mikrosatelitnih lokusa. Na ovaj način pokušat će se utvrditi: (1) kakav je odnos genetičke raznolikosti kontinentalnih prema primorskim populacijama i ima li tu jasne diferencijacije, (2) postoji li vidljiv antropogeni utjecaj na genetički profil istraživanih populacija, (3) postoji li kakav dokaz upliva stranog sjemenskog materijala, (4) kakva je razlika u dobivenoj genetičkoj raznolikosti s obzirom na upotrijebljeni tip mikrosatelitnih biljega (SSR vs. EST-SSR).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal za molekularnu analizu je sakupljen iz 3 kontinentalne i 3 primorske populacije pitomog kestena na području Republike Hrvatske (Sl. 6, Tablica 1). U svakoj analiziranoj populaciji sakupljeni su uzorci lisnih pupova sa 17 stabala međusobno udaljenih više od 50 m i odmah na terenu pohranjeni u plastičnim vrećicama sa silika gelom. Nakon 24 sata stajanja u silika gelu lisno tkivo je trebalo biti potpuno suho i nepromijenjene boje da bi uzorak bio odgovarajući za izolaciju ukupne stanične DNA.



Slika 6. Geografska pozicija istraživanih populacija.

Tablica 1. Oznaka, naziv, broj analiziranih jedinki (*n*) i zemljopisna širina i dužina istraživanih populacija.

| Oznaka | Naziv | <i>n</i> | Zemljopisna dužina (<i>E</i>) | Zemljopisna širina (<i>N</i>) |
|--------|-----------------|----------|---------------------------------|---------------------------------|
| P01 | Medvednica | 17 | 15,94250000 | 45,86638889 |
| P02 | Bilogora | 17 | 16,85916667 | 46,07583333 |
| P03 | Moslavačka gora | 17 | 16,75527778 | 45,59000000 |
| P04 | Buje | 17 | 13,77527778 | 45,44000000 |
| P05 | Poreč | 17 | 13,71777778 | 45,30694444 |
| P06 | Cres | 17 | 14,32638889 | 45,12305556 |

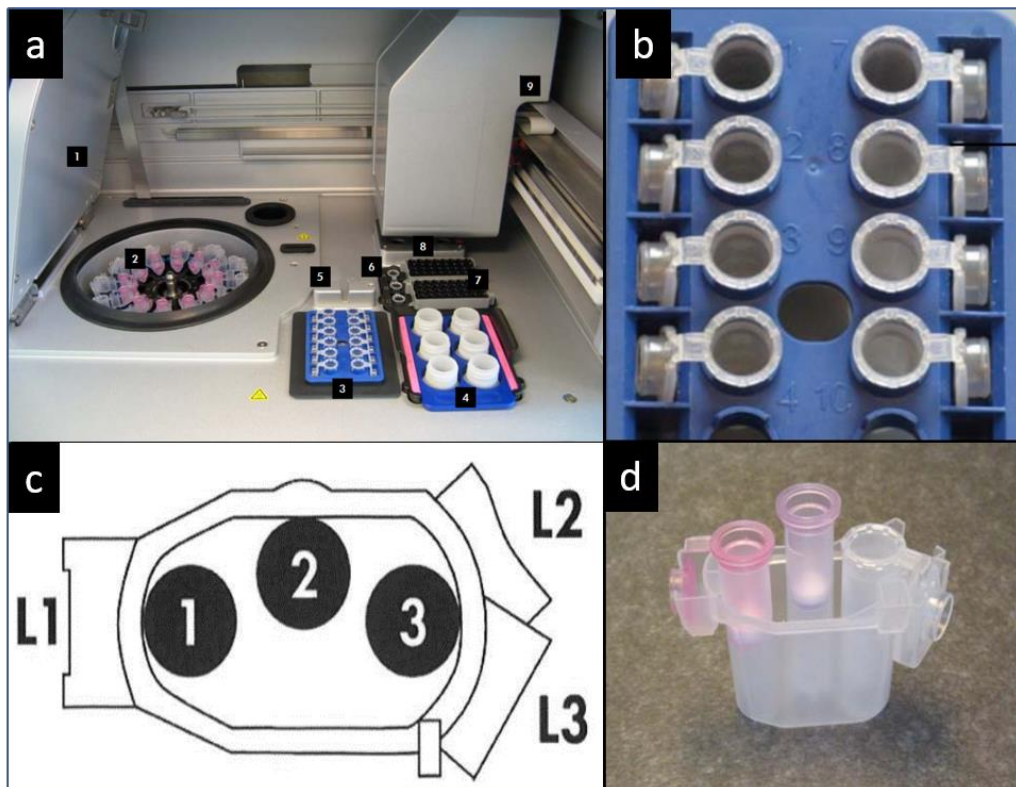
3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA

Izolacija ukupne genomske DNA provedena je upotrebom izolacijskog kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) i uređaja za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen®).

1. Izvaže se 25 – 30 mg u silika gelu osušenih lisnih pupova i pomoću sterilne pincete stavi u epruvetu od 2 mL (Safe-lock 2 mL tube, Eppendorf®), u koju se još doda sterilizirana čelična kuglica (d = 5 mm) za usitnjavanje;
2. Sadržaj epruvete usitni se u uređaju Tissue Lyser (Qiagen®), 1 min na frekvenciji od 30 Hz/s;
3. Na usitnjeno biljno tkivo doda se 500 µL AP1 pufera, 5 mg PVP-a (polivinilpirolidona) i 5 µL 2-merkaptoetanol te 6 µL RNaze A. Smjesa se promiješa treskanjem epruvete te dobro izmiješa na „vorteks“ miješalici (GVLab-Gilson®);
 - AP1 (otopina deterdženta i proteinaze) - razgrađuje stanične membrane
 - 2-merkaptoetanol - sprječava oksidaciju
 - PVP - inhibitor fenola (fenoli se, odmah nakon lize stanica, vežu vodikovim vezama za DNA i proteine te tako utječu na njihova svojstva i uspješnost ekstrakcije)
 - RNaza A – uklanja RNA tijekom procesa izolacije genomske DNA
4. Dobiveni homogenat inkubira se 10 minuta na 65 °C uz povremeno miješanje na „vorteks“ miješalici (GVLab-Gilson®);
 - U ovom koraku dolazi do lize stanica.
5. Doda se 162,5 µL P3 pufera, sadržaj dobro promiješa na vorteks miješalici (GVLab-Gilson®) i stavi 7 minuta na -20 °C;
 - U ovom koraku dolazi do taloženja deterdženta, proteina i polisaharida.
6. Uzorci se potom centrifugiraju (centrifuga 5415 D-Eppendorf®) 5 min na 16 000 x g;
7. 500 µL gornjeg vodenog sloja prenese se u novu epruvetu od 2 mL (Safe-lock 2 mL tube, Eppendorf®);

Sljedeći koraci načinjeni su u QIAcube uređaju, robotskoj radnoj stanici za automatizirano pročišćavanje nukleinskih kiselina i proteina, koja odjednom može obraditi 12 uzoraka. Uređaj se sastoji od mikrocentrifuge, robotske ruke koja sadrži mikropipetu, hvataljke za prenošenje „spin“ kolona, inkubatora za mikroeprevete, te „vorteks“ miješalice. Uređaj koristi već postojeće QIAGEN-ove protokole i kitove za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (McGraw i sur. 2014).

8. Epruvete se stave u QIAcube uređaj u područje označeno oznakom **3** (Sl. 7a, b);



Slika 7. a) Prikaz unutrašnjosti radne jedinice QIAcube uređaja; b) „Vorteks“ miješalice uređaja s ispravno umetnutim epruvetama s uzorcima; c) Shematski prikaz rotor adaptera: na poziciju **1** stavi se DNeasy Mini spin kolona, na poziciju **2** QIAshredder spin kolona (odstrani se originalan poklopac kolone), a na poziciju **3** epruveta od 1,5 mL za prikupljanje izolata DNA (poklopac epruvete se umetne u utor označen oznakom **L3**); d) Rotor adapter s ispravno umetnutim DNeasy Mini spin i QIAshredder spin kolonama te epruvetom od 1,5 mL.

9. U rotor QIAcube uređaja (**2**) stavi se 12 adaptera koji se sastave prema slici 7. c), d);

- Na poziciju označenu oznakom **1** stavi se DNeasy Mini spin kolona (bijela), a njen se poklopac utakne u utor označen oznakom **L1**.
- Na poziciju označenu oznakom **2** stavi se QIAshredder spin kolona (ljubičasta), a njen se poklopac mora u potpunosti ukloniti.
- Na poziciju označenu oznakom **3** stavi se epruveta od 1,5 mL, a njen se poklopac utakne u utor označen oznakom **L3**.

*Napomena! Broj epruvete od 1,5 mL u adapteru mora odgovarati broju pozicije na rotoru i broju uzorka u „Vorteks“ miješalici (**3**).*

10. U područje QIAcube uređaja označeno oznakom **4** na poziciju 1 stavi se pufer AW1, na poziciju 2 pufer AW2, a na poziciju 3 pufer AE. Neposredno prije početka rada, uklone se čepovi s bočica pufera;

- AW1 pufer - svojim kemijskim sastavom i pH omogućava vezanje DNA na membranu DNeasy Mini spin kolone
- AW2 pufer - ispiranje DNA vezane na koloni od raznih sekundarnih kemijskih spojeva
- AE pufer (Tris-EDTA) – pufer za ispiranje s kolone čistog DNA izolata (Tris održava pH iznad 8, čime se sprječava degradacija DNA kroz duži vremenski period, a EDTA veže metalne katione te sprječava rad DNaza)

11. U područje QIAcube uređaja označeno oznakom **7** stave se dva nosača za nastavke napunjena s filter-nastavcima od 1000 µL;

12. Zatvore se vrata QIAcube uređaja i na zaslonu na glavnom izborniku odabere protokol: „Purification of total DNA from plant cells and tissues”, a u podizborniku „DNeasy® Plant Mini Kit“;

- Tijekom oko jedan sat rada QIAcube uređaja molekule DNA se pročišćavaju, vežu na DNeasy Mini spin kolone, ispiru, suše i na kraju ispiru s kolone kao čisti izolat DNA.

13. Kada protokol završi (oko 1 sat) na ekranu se prikaže poruka da su uzorci obrađeni, otvore se vrata QIAcube uređaja i izvade adapteri iz rotora, a iz adaptera se izvade i zaklope epruvete od 1,5 mL s pročišćenom DNA;

14. Izolirana DNA pohrani se u zamrzivač na -20 °C.

3.3. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA

Prije umnožavanja mikrosatelitnih lokusa izmjerena je koncentracija izoliranih DNA pomoću spektrofotometra NanoPhotometer P300 (Implen®). Za mjerenje koncentracije DNA na ovom uređaju nisu potrebne dodatne kemikalije, a koncentraciju je moguće izmjeriti iz samo 1,5 µL izolata DNA. Prije početka mjerenja, bez obzira na broj uzoraka DNA, potrebno je kalibrirati uređaj pomoću AE pufera koji se koristio u zadnjem koraku izolacije DNA. Kako bi se dodatno potvrdila vjerodostojnost mjerenja, poslije mjerenja koncentracija izoliranih DNA izmjerena je koncentracija λ-DNA poznate koncentracije (100 ng µL⁻¹). Osim što je za sve uzorke izmjerena koncentracija, određen je i omjer apsorbancije 260/280 kao mjera čistoće izoliranih DNA.

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženo je devet SSR (Marinoni i sur. 2013; Buck i sur. 2003; Gobbin i sur. 2007) i devet EST-SSR (Martin i sur. 2010, Martin i sur. 2017, Cuestas i sur. 2017) mikrosatelitnih lokusa. Nazivi mikrosatelitnih lokusa, sekvence početnica i očekivane duljine umnoženih fragmenata i ponavljajući motivi DNA navedeni su u Tablici 2 i 3.

PCR otopina za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa za jedan uzorak ukupnog volumena 20 µL imala je sljedeći sastav:

- 9,1 µL H₂O (sterilizirana, deionizirana)
- 2,0 µL 10 × PCR pufer (TAKARA®)
- 1,6 µL dNTP (TAKARA®)
- 0,2 µL BSA (20 µg/mL)
- 0,1 µL Taq Hs (TAKARA®)
- 5,0 µL otopine DNA (2 µg/mL)
- 1,0 µL početnica F (Forward)
- 1,0 µL početnica R (Reverse)

Umnožavanje mikrosatelitnih SSR regija lančanom reakcijom polimerazom provedeno je u uređaju GeneAmp 9700 (Applied Biosystems®) prema programu:

- inicijalni korak denaturacije: 9 minuta na 95 °C,
- 28 ciklusa ponavljanja tri temperature: 50 sekundi na 94 °C (denaturacija), 45 sekundi na temperaturi karakterističnoj za pojedinu početnicu (vezanje PCR početnice na DNA kalup), 90 sekundi na 72 °C (sinteza novih DNA lanaca),
- završni korak elongacije od 7 minuta na 72 °C (Marinoni i sur. 2003),
a EST-SSR regija u istom uređaju prema programu:
- inicijalni korak denaturacije: 5 minuta na 94 °C,
- 30 ciklusa ponavljanja tri temperature: 30 sekundi na 94 °C (denaturacija), 45 sekundi na 56 °C (vezanje PCR početnice na DNA kalup), 45 sekundi na 72 °C (sinteza novih DNA lanaca),
- 15 ciklusa ponavljanja tri temperature: 30 sekundi na 94 °C (denaturacija), 45 sekundi na 53 °C (vezanje PCR početnice na DNA kalup), 45 sekundi na 72 °C (sinteza novih DNA lanaca),
- završni korak elongacije od 5 minuta na 72 °C (Martin i sur. 2017).

Tablica 2. Nazivi SSR lokusa, sekvence fluorescentno označenih početnica, ponavljajući SSR motiv, temperatura vezanja početnice T_A očekivane duljine umnoženih SSR lokusa u parovima baza (bp).

| Br. | SSR lokus | Sekvenca početnice (5' -3') | SSR motiv | T_A (°C) | Očekivana duljina (bp) |
|-----|-----------|------------------------------|---|------------|------------------------|
| 1. | CsCAT16F | HEX-CTCCTTGACTTTGAAGTTGC | TC | 50 | cca 143 |
| | CsCAT16R | CTGATCGAGAGTAATAAAG | | | |
| 2. | EMCs15F | FAM-CTCTTAGACTCCTTCGCCAATC | CAC | 55 | cca 90 |
| | EMCs15R | CAGAATCAAAGAAGAGAAAGGTC | | | |
| 3. | CsCAT1F | 6-FAM-GAGAATGCCCACTTTTGCA | (TG) ₅ TA(TG) ₂₄ | 50 | cca 220 |
| | CsCAT1R | GCTCCCTTATGGTCTCG | | | |
| 4. | OALF | NED-CAATCTGAAAAGGTAATAGCCAGT | (CT) ₁₆ AGT(CT) ₂ | 60 | cca 300 |
| | OALR | CCCAGGACATAAAATAGAAGCTG | | | |
| 5. | CsCAT2F | VIC-GTAACTTGAAGCAGTGTGAAC | AG | 55 | cca 206 |
| | CsCAT2R | CGCATCATAGTGAGTGACAG | | | |
| 6. | CsCAT14F | HEX- CGAGGTTGTTGTTTCATCATTAC | CA | 58 | cca 164 |
| | CsCAT14R | GATCTCAAGTCAAAGGTGTC | | | |
| 7. | CsCAT3F | HEX -CACTATTTTATCATGGACGG | AG | 50 | cca 224 |
| | CsCAT3R | CGAATTGAGAGTTCATACTC | | | |
| 8. | CsCAT4F | NED-CATAGGTTCAAACCATAACCCGTG | CA | 55 | cca 243 |
| | CsCAT4R | CTCATCTTTGTAGGGTATAATACC | | | |
| 9. | CsCAT6F | 6-FAM-AGTGCTCGTGGTCAGTGAG | (AC) ₂₄ AT(AC) ₄ | 50 | cca 180 |
| | CsCAT6R | CAACTCTGCATGATAAC | | | |

Tablica 3. Nazivi EST-SSR lokusa, sekvence fluorescentno označenih početnica, ponavljajući SSR motiv, i očekivane duljine umnoženih SSR lokusa u parovima baza (bp).

| Br. | EST-SSR lokus | Sekvenca početnice (5' -3') | SSR motiv | Očekivana duljina (bp) |
|-----|---------------|--------------------------------|--------------------|------------------------|
| 1. | WAG11F | FAM-AAAAACCCCATTTACCCCTC | (CT) ₉ | 235-252 |
| | WAG11R | TTTGAGAACTTTGGCCACC | | |
| 2. | PIE233F | VIC- CATCAATATCCATGGCAGCA | (CCA) ₈ | 162-168 |
| | PIE233R | GAAGCTGGGAAAGAAGCAGA | | |
| 3. | PIE228F | NED-TGGAGGAGCACTGCATATTG | (AGA) ₈ | 177-196 |
| | PIE228R | CACTGTGGCTGGAGCATCTA | | |
| 4. | PIE227F | PET-ACCATGATCTGGGAAGCAAC | (TGG) ₈ | 154-179 |
| | PIE227R | AAGGGCTTGTTGGGTTAGT | | |
| 5. | WAG004F | VIC-AAAGCAATTCAACTGGGACG | (TTC) ₇ | 260-271 |
| | WAG004R | ACGACACCGTTTGTTCCCTTC | | |
| 6. | PORO009F | VIC-GGAGGCTTGTGTAGGACTCG | (AG) ₁₁ | 122-140 |
| | PORO009R | AGGGCTCTCTCGTTTCACCT | | |
| 7. | FIRO30F | NED-GGACATATTTATCTAGGAGACGAGGT | (AG) ₇ | 168-173 |
| | FIRO30R | ATGTCCCATAGCACAGAGCA | | |
| 8. | PORO26F | PET-CAATCCCCACATCCAAGTTT | (TC) ₈ | 137-148 |
| | PORO26R | TTGCTGTTGCTTGTTTTTGC | | |
| 9. | PIE260F | FAM-TTCCTTACTCCTTTCCCACTTC | (AG) ₉ | 154-168 |
| | PIE260R | TGGCTGTTCCAAATCTTCAA | | |

Za preliminarnu provjeru umnožavanja mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom upotrebljena je elektroforeza na agaroznom gelu. Od svakog PCR uzorka (ukupno 20 μ L) 5 μ L je pomiješano s 1 μ L boje za nanošenje na gel (6x MassRuler DNA Loading Dye, Thermo Scientific®) i stavljeno u jažice gela. Elektroforeza je trajala 30 minuta uz napon od 100 V. Nakon elektroforeze gel je uronjen u otopinu boje GelRed™ (Biotinum®) na 30 minuta kako bi se DNA fragmenti pripremili za detekciju pod UV svjetlom transiluminatora. Uzorci koji su na gelu pokazivali DNA trakicu u veličinskom rasponu od 100 - 300 bp poslani su na detekciju kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) u DNA servisu Macrogen (Seoul, Južna Koreja). Nakon kapilarne elektroforeze rezultati svih analiziranih uzoraka 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).

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati kapilarne elektroforeze mikrosatelitnih alela u obliku .fsa računalnih podataka očitani su računalnim programom GeneMapper (Applied Biosystems®).

Ukupan broj alela po biljegu (N_a) i informacijski sadržaj polimorfizma (eng. *Polymorphism Information Content*, skraćena *PIC*) svakog mikrosatelitnog biljega izračunati su uz pomoć računalnog programa PowerMarker (Liu i Muse 2005). Ukupan broj alela, zapažena heterozigotnost (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_E), izračunati su za svaki mikrosatelitnih lokus u svakoj populaciji pomoću računalnog programa GENEPOP 4.0 (Raymond i Rousset 1995). Alelno bogatstvo (N_{ar}) ili broj alela koji je neovisan o veličini uzorka izračunat je u programu FSTAT (Goudet 1995), a broj jedinstvenih alela (N_{pr}) u programu MICROSAT (Minch i sur. 1997). U računalnom programu FSTAT, pomoću nepristranog procjenitelja θ po metodi Weira i Cockerhama (1984), izračunat je indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija kao i njegova signifikantnost pomoću permutacija.

Faktorijalna analiza korespondencije (eng. *Factorial Correspondence Analysis*; FCA) provedena je pomoću programa Genetix 4.05 (Belkhir i sur. 2004).

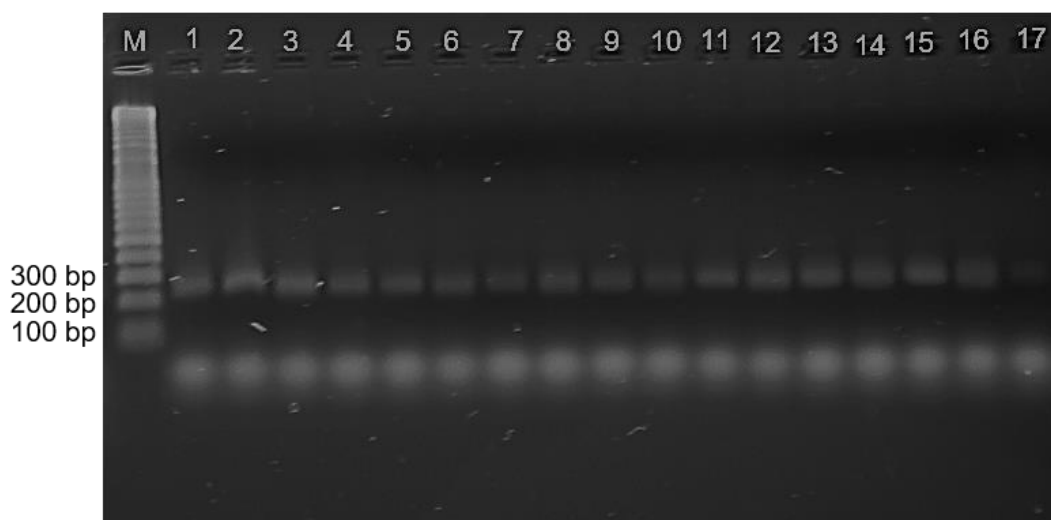
Bayesovska analiza populacijske strukture provedena je pomoću računalnog programa STRUCTURE (Pritchard i sur. 2000, Hubisz i sur. 2009). Broj pretpostavljenih skupina bio je od 1 do 10 ($K = 1 - 10$) te je za svaku hipotezu provedeno 10 neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastojao od 200 000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*). Podaci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljeni 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

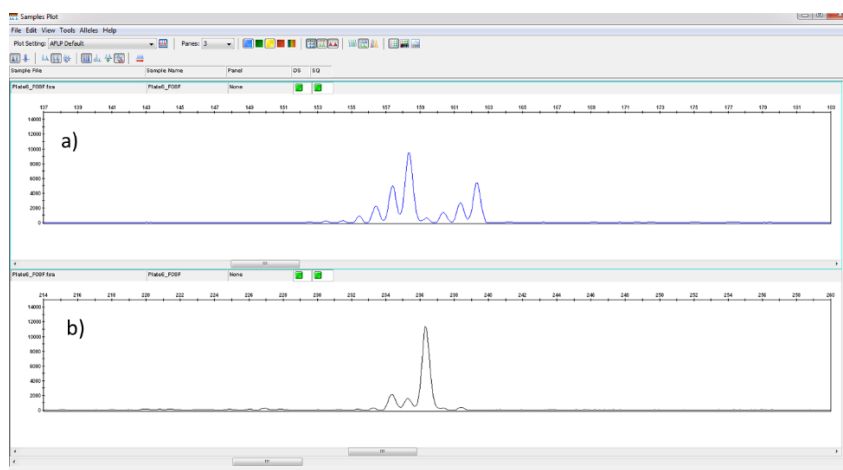
4.1. DETEKCIJA MIKROSATELITNIH ALELA I INFORMATIVNOST BILJEGA

Ukupna stanična DNA uspješno je izolirana primjenom izolacijskog kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) i uređaja za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen®). Koncentracije izoliranih DNA kao i omjer apsorbancija na 260 i 280 nm ukazivali su na visokopolimernu DNA i na dobro pročišćen izolat (Prilog: Tablica 1).

Elektroforezom na agaroznom gelu uspješno je provedena preliminarna analiza PCR-umnoženih mikrosatelitnih lokusa (Sl. 8), a nakon kapilarne elektroforeze očitavanje mikrosatelitnih alela uspješno je provedeno računalnim programom GeneMapper (Applied Biosystems®) (Sl. 9). Analizom 18 mikrosatelitnih lokusa u 102 jedinke pitomog kestena detektiran je ukupno 141 alel (Tablica 4). EST-SSR lokusi su s 49 detektiranih alela bili izrazito manje polimorfni od SSR lokusa na kojima je ukupno detektirano 92 alela. Kad se pogleda polimorfnost svih lokusa, bez obzira jesu li EST-SSR ili SSR, zaključak je da su međusobno vrlo raznoliki. Tako je najmanji broj alela (3) utvrđen na EST-SSR lokusima FIRO30 i PIE233, a najveći na SSR-lokusu CsCAT3 (19). Kako broj alela tako su i PIC vrijednosti informativnosti biljega bile u vrlo širokom rasponu od 0,354 (EST-SSR lokus FIRO30) do 0,852 (SSR lokus CsCAT6).



Slika 8. Agarozna gel-elektroforeza mikrosatelitnog lokusa CsCAT4, 17 jedinki populacije Bilogora, umnoženog lančanom reakcijom polimerazom. M = DNA Standard (MassRuler™ DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific®).



Slika 9. Prikaz kapilarne elektroforeze u računalnom programu GeneMapper (Applied Biosystems®) dva lokusa: a) heterozigotnog CsCAT6 (158 bp i 162 bp) i homozigotnog CcCAT4 (236 bp) jedinke br. 8 iz populacije Poreč.

Tablica 4. Svojstva 18 mikrosatelitnih lokusa analiziranih u 6 populacija pitomog kestena.

| SSR lokus | Fluorescencijska oznaka | Vrsta SSR-a | SSR motiv | Očekivana duljina (bp) | N_a | PIC |
|-----------|-------------------------|-------------|---|------------------------|-------|-------|
| WAG11 | FAM | EST-SSR | CT | 217-241 | 7 | 0,521 |
| PIE233 | VIC | EST-SSR | CCA | 162-168 | 3 | 0,450 |
| PIE228 | NED | EST-SSR | AGA | 175-193 | 5 | 0,676 |
| PIE227 | PET | EST-SSR | TGG | 155-185 | 8 | 0,698 |
| WAG004 | VIC | EST-SSR | TTC | 260-272 | 4 | 0,388 |
| PORO009 | VIC | EST-SSR | AG | 120-140 | 5 | 0,720 |
| FIRO30 | NED | EST-SSR | AG | 166-172 | 3 | 0,354 |
| PORO26 | PET | EST-SSR | TC | 123-161 | 10 | 0,549 |
| PIE260 | FAM | EST-SSR | AG | 153-165 | 4 | 0,476 |
| CsCAT16 | HEX | SSR | TC | 127-155 | 7 | 0,660 |
| EMCs15 | FAM | SSR | CAC | 81-90 | 4 | 0,407 |
| CsCAT1 | FAM | SSR | (TG) ₅ TA(TG) ₂₄ | 176-222 | 10 | 0,754 |
| OAL | NED | SSR | (CT) ₁₆ AGT(CT) ₂ | 299-333 | 7 | 0,442 |
| CsCAT2 | VIC | SSR | AG) | 196-234 | 15 | 0,874 |
| CsCAT14 | HEX | SSR | CA | 132-162 | 10 | 0,819 |
| CsCAT3 | HEX | SSR | AG | 190-286 | 19 | 0,820 |
| CsCAT4 | NED | SSR | CA | 212-238 | 6 | 0,652 |
| CsCAT6 | FAM | SSR | (AC) ₂₄ AT(AC) ₄ | 158-196 | 14 | 0,852 |
| Prosječno | | | | | 7,83 | 0,617 |
| Ukupno | | | | | 141 | |

N_a - ukupan broj alela po biljegu, PIC – informacijski sadržaj polimorfizma

4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST

Osnovni populacijski parametri koji opisuju unutarpopulacijsku raznolikost svih šest populacija pitomog kestena prikazani su u Tablici 5. Broj alela neovisan o broju uzoraka u analiziranoj populaciji (alelno bogatstvo, N_{ar}) kretao se od 3,889 (Cres) do 5,222 (Bilogora). Ukupno je utvrđeno 33 jedinstvena alela. Broj jedinstvenih alela je bio najveći u populaciji Buje (8 alela), a najmanji u populacijama Medvednica, Moslavačka gora i Cres (4 alela). Zapažena heterozigotnost (H_o) se kretala od 0,552 (Cres) do 0,696 (Medvednica). Očekivane heterozigotnosti (H_E) su se kretale od 0,536 (Cres) do 0,661 (Medvednica). Multilokusnim testom nije utvrđeno signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ni u jednoj istraživanoj populaciji ($F_{is} = -0,053 - 0,069$; P - nesignifikantan).

Prilikom odvojene analize SSR i EST-SSR mikrosatelitnih lokusa utvrđen je manji broj alela i manji broj jedinstvenih alela kod EST-SSR lokusa, ali to dovodi i do manje primijećene i očekivane heterozigotnosti te do istog rezultata, tj. do toga da F_{IS} vrijednosti nisu nikad signifikantno različite od nule, odnosno EST-SSR biljezi su jednako dobri za analizu Hardy-Weinbergove ravnoteže u istraživanim populacijama kao i SSR biljezi (Prilog: Tablica 2).2

Tablica 5. Genetička raznolikost šest populacija pitomog kestena upotrebom 9 SSR i 9 EST-SSR mikrosatelitnih biljega.

| Populacija | n | N_{ar} | N_{pr} | H_o | H_E | F_{is} | P |
|-----------------|-----|--------------|----------|--------------|--------------|----------|-----|
| Medvednica | 17 | 4,833 | 4 | 0,696 | 0,661 | -0,053 | ns |
| Bilogora | 17 | 5,222 | 7 | 0,592 | 0,635 | 0,069 | ns |
| Moslavačka gora | 17 | 4,111 | 4 | 0,624 | 0,610 | -0,023 | ns |
| Buje | 17 | 4,722 | 8 | 0,618 | 0,605 | -0,021 | ns |
| Poreč | 17 | 4,611 | 6 | 0,611 | 0,590 | -0,036 | ns |
| Cres | 17 | 3,889 | 4 | 0,552 | 0,536 | -0,031 | ns |
| Ukupno | | | 33 | | | | |

n – broj analiziranih jedinki, N_{ar} – alelno bogatstvo, N_{pr} – broj jedinstvenih alela, H_o – zapažena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{is} – fiksacijski indeks, P – nivo značajnosti; ns – nesignifikantno

Matrica vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija nalazi se u Tablici 6. Vrijednosti F_{ST} u svim parovima populacija su bile visokosignifikantne kod $P < 0,001$. Najveća vrijednost je zapažena između primorskih populacija Poreč i Cres (0,184), a najmanja između kontinentalnih populacija Medvednica i Moslavačka gora (0,052).

Prilikom odvojene F_{ST} analize SSR i EST-SSR mikrosatelitnih lokusa pokazalo se da je F_{ST} vrijednost i njegova signifikantnost za sve parove populacija gotovo ista bez obzira na tip upotrijebljenih biljega (Prilog: Tablica 3).

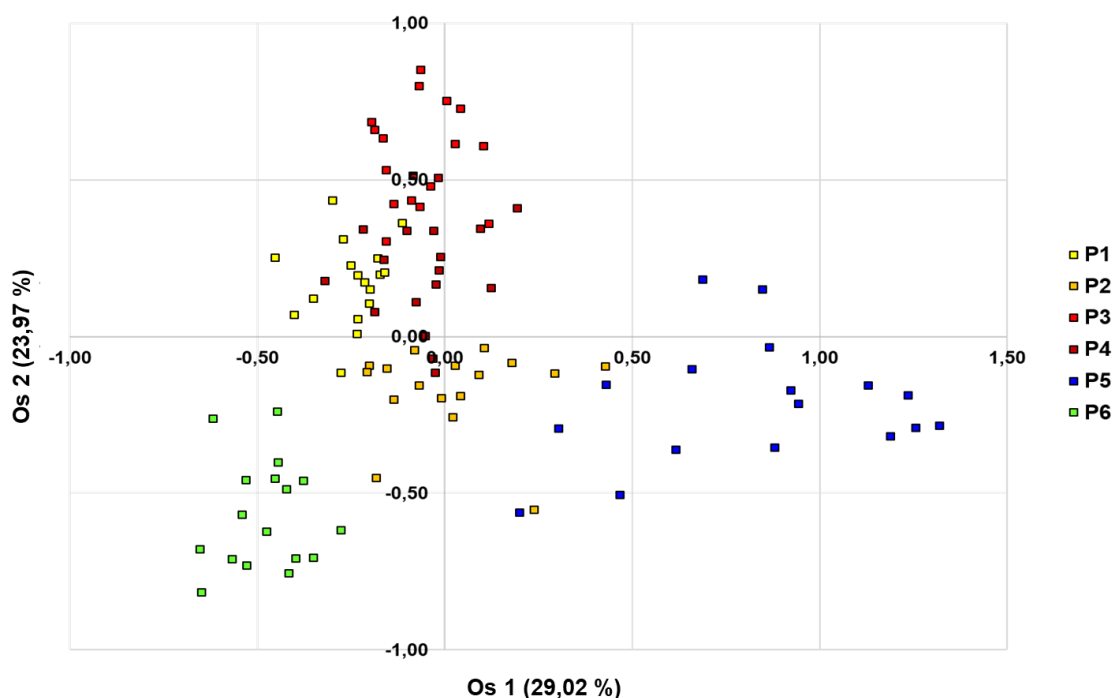
Tablica 6. Matrica vrijednosti F_{ST} između populacija pitomog kestena

| Populacija | Medvednica | Bilogora | Moslavačka gora | Buje | Poreč | Cres |
|-----------------|------------|----------|-----------------|-------|-------|------|
| Medvednica | | *** | *** | *** | *** | *** |
| Bilogora | 0,058 | | *** | *** | *** | *** |
| Moslavačka gora | 0,052 | 0,082 | | *** | *** | *** |
| Buje | 0,065 | 0,077 | 0,066 | | *** | *** |
| Poreč | 0,122 | 0,106 | 0,113 | 0,100 | | *** |
| Cres | 0,092 | 0,097 | 0,158 | 0,117 | 0,184 | |

Signifikantnost vrijednosti F_{ST} : *** $P < 0,001$

4.3. FAKTORIJALNA ANALIZA KORESPONDENCIJE (FCA)

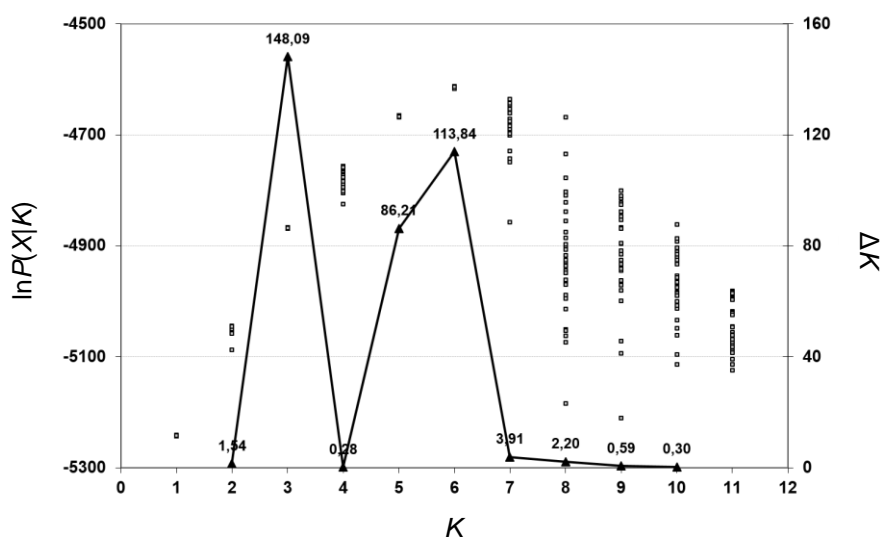
Faktorijalnom analizom korespondencije (FCA) prikazani su odnosi između 102 jedinice pitomog kestena (Slika 10). Prve dvije osi objašnjavaju 52,99 % ukupne varijance, s tim da prva os iznosi 29,02 %, a druga 23,97 % ukupne varijance ukazujući na veliku razinu raznolikosti između i unutar istraživanih populacija. Prva os razdvaja pitomi kesten na dvije skupine. Prvu skupinu su činile jedinice populacije Poreč (P05), a drugu skupinu sve ostale populacije. Druga os, za razliku od prve osi, razdvaja istraživane populacije u dvije nešto slabije razdvojene skupine. Prvu skupinu su činile jedinice populacije Cres (P6) dok su drugu, poprilično razvučenu skupinu, predstavljale jedinice iz svih ostalih populacija.



Slika 10. Prikaz odnosa između 102 jedinice iz šest populacija pitomog kestena u koordinatnom sustavu određenom prvim dvjema osima faktorijalne analize korespondencije (FCA). Pojedinačni genotipovi prikazani su kvadratima (Populacije: P1 = Medvednica, P2 = Bilogora, P3 = Moslavačka gora, P4 = Buje, P5 = Poreč, P6 = Cres).

4.4. BAYESOVSKA ANALIZA GENETIČKE STRUKTURE

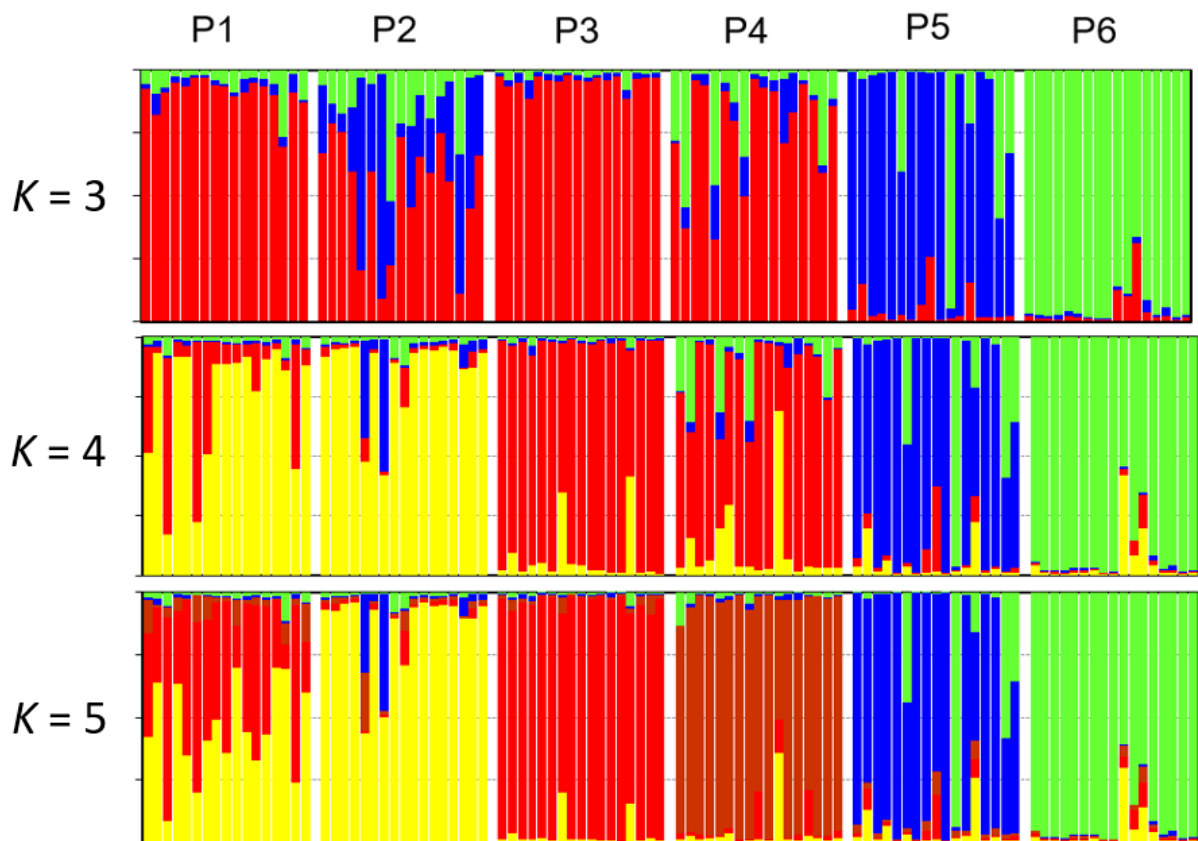
Genetička struktura populacija procijenjena je Bayesovskom analizom u računalnom programu STRUCTURE ne uzimajući u obzir prethodne informacije o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki u svrhu definiranja skupina, niti informacije o geografskoj lokaciji prikupljenih populacija. Na temelju usporedbe posteriornih vjerojatnosti podataka [$\ln P(X|K)$] za svaku pretpostavljenu vrijednost K dobivene su najvjerođostojnije hipoteze za $K = 1$ do 10. Također je izbor najvjerođostojnije hipoteze proveden izračunom vrijednosti ΔK pri čemu je najveća vrijednost dobivena za $K = 3$ (Sl. 11), što sugerira da su analizirane populacije najvjerođatnije potekle iz tri izvorne populacije (Sl. 12).



Slika 11. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE: Posteriorna vjerojatnost podataka (K – optimalan broj skupina; $\ln P(X|K)$ = posteriorna vjerojatnost podataka; ΔK vrijednosti su ispisane na vrhovima pikova za ($K = 2 - 10$).

Struktura izvornih populacija s udjelom svih jedinki u svakom genskom skupu tj. izvornoj populaciji za vrijednosti $K = 3$ do $K = 5$ prikazana je na Slici 12. Kod $K = 3$, podjele s najvećim ΔK , izdvojile su se populacija Poreč (P5) i populacija Cres (P6) te skupina od četiri preostale populacije Medvednica, Bilogora, Moslavačka gora i Buje (P1 - P4). Kod $K = 4$, podjele s izrazito niskim ΔK , vidljiva je podjela u skupini od četiri populacije pri čemu su se formirale dvije skupine po dvije populacije. U jednu skupinu ulaze populacije Medvednica i Bilogora (P1 i P2), a u drugu populacije Moslavačka gora i Buje (P3 i P4). Kod $K = 5$, podjele s jednim od najvećih ΔK , skupina u kojoj su bile

populacije Moslavačka gora i Buje razdvaja se na dva dijela pa jedinke iz populacije Moslavačka gora čine jednu skupinu, a jedinke iz populacije Buje drugu.



Slika 12. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE pri $K=3$ do 5. Svaka je jedinka predstavljena stupcem, a boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koji potječe iz određene izvorne populacije. (Populacije: P1 = Medvednica, P2 = Bilogora, P3 = Moslavačka gora, P4 = Buje, P5 = Poreč, P6 = Cres)

5. RASPRAVA

Genetička raznolikost jedan je od najvažnijih elemenata prilagodbe svih živih bića na neprestane promjene u okolišu. Šuma je životna zajednica u kojoj su drvenaste biljne vrste osnovno obilježje, ali je isto tako važna zbog prisutnosti izuzetno velikog broja drugih vrsta iz svih carstava života na Zemlji. Upravo zbog takve bioraznolikosti i činjenice da je oko trećina kopna na Zemlji pokrivena šumama, čini genetičku raznolikost šumskih drvenastih biljnih vrsta i njezino očuvanje izuzetno važnim na globalnoj razini.

Europski pitomi kesten je drvenasta biljna vrsta koja zbog vrlo kvalitetnog i vrijednog drveta i jestivih plodova ima višestruku gospodarsku vrijednost. Kako u Hrvatskoj, tako i u ostalim europskim zemljama, nekoć velike površine pod šumama i nasadima pitomog kestena danas su znatno smanjene. Do ovog smanjenja došlo je prije svega zbog pojave zarazne bolesti poznate kao rak kestenove kore uzorkovane gljivom *Cryphonectria parasitica*. Isto tako, intenzivno iskorištavanje kestenovih šuma ostavilo je trajne posljedice na njihovu fizionomiju, degradiralo je staništa, narušilo stabilnost ekosustava, a biološku raznolikost znatno smanjilo, osobito na mjestima gdje se podižu nasadi kultivara za proizvodnju jestivih plodova (Vukelić 1991). Zbog svega navedenoga svaka spoznaja o genetičkoj varijabilnosti pitomog kestena, bilo gdje u svijetu pa tako i u Hrvatskoj, izravno doprinosi razvoju učinkovitijih planova zaštite i gospodarenja.

Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti genetičku raznolikost između i unutar tri kontinentalne (Bilogora, Medvednica, Moslavačka gora) i tri primorske populacije (Poreč, Buje, Cres) pitomog kestena u Hrvatskoj analizom 9 SSR i 9 EST-SSR mikrosatelitnih lokusa. Na ovaj način pokušalo se utvrditi: (1) kakav je odnos genetičke raznolikost kontinentalnih prema primorskim populacijama, (2) postoji li vidljiv antropogeni utjecaj na genetički profil istraživanih populacija, (3) postoji li kakav dokaz upliva stranog sjemenskog materijala, (4) kakva je razlika u dobivenoj genetičkoj raznolikosti s obzirom na upotrebljeni tip mikrosatelitnih biljega (SSR vs. EST-SSR).

Dobiveni rezultati nisu potvrdili jasnu genetičku diferencijaciju kontinentalnih i primorskih populacija pitomog kestena u Hrvatskoj. Razlog tome prije svega leži u nedovoljnoj srodnosti primorskih populacija koje ne čine genetički kompaktnu skupinu. Tako se i po faktorijalnoj analizi korespodencije (Sl. 10) i Bayesovskoj analizi populacijske strukture (Sl. 12) populacija Buje (P4) pokazala srodnijom kontinentalnim

populacijama iz Središnje Hrvatske nego geografski bližim populacijama Poreč (P5) i Cres (P6). Kako objasniti ovaj rezultat? Imajući u vidu evolucijsku povijest europskog pitomog kestena (Poljak 2014), ali i antropogeni utjecaj na ovu vrstu (Poljak i sur. 2017) čini se da su populacija Buje i kontinentalne populacije „prirodne“ tj. one na čiji su populacijsko-genetički profil najvećim dijelom utjecale klimatske promjene u zadnjih 20 000 godina, dok su populacije Poreč i Cres produkt jako velikog antropogenog utjecaj u zadnjih 2500 godina.

Kao važan dokaz za ove hipoteze su i drugi rezultati ovog istraživanja. Naime, populacije Medvednica, Bilogora, Moslavačka gora i Buje su jako nalik prirodnim populacijama jer su u prosjeku imale veći broj alela, veći broj privatnih alela, veću primijećenu i osobito očekivanu heterozigotnost od populacija Poreč i Cres za koje smo pretpostavili da su pod jakim antropogenim utjecajem (Tablica 5). Slično mišljenje o hrvatskim kontinentalnim populacijama i njihovom podrijetlu iz glacijalnih utočišta na Apeninskom poluotoku daju istraživanja Krebs-a i suradnika (2004) te Poljaka i suradnika (2017). S druge strane potencijalno antropogene populacije Cres i Poreč pokazala su se kao populacije s najmanjim brojem zabilježenih alela, i najmanjom genetičkom raznolikošću tj. očekivanom heterozigotnošću u cijelom istraživanju (Tablica 5). Potvrdu navedene hipoteze o antropogeno uvjetovanim populacijama pitomog kestena u ovom istraživanju daju neka prijašnja populacijsko-genetička, morfološka i arheobotanička istraživanja. Tako su npr. rezultati peludne analize (Schmidt i sur. 2000) i analize biljnih makrofosila (Šoštarić i Küster 2001), pokazali da su europski pitomi kesten u mediteranski dio Hrvatske donijeli Grci i Rimljani još u antičko doba.

Kakav je tip antropogenog utjecaja mogao biti na populaciju Cres pokazalo je istraživanje morfologije ploda (Idžojić 2009) po kojem ova populacija ima najveće plodove i najuže listove, a to se uz kasnija genetička istraživanja (Poljak 2017) moglo povezati s protokom gena iz nasada lovranskih maruna u prirodnu populaciju Cres. Ako znamo da su kultivirani lovranski maruni (Idžojić i sur. 2012) bez fertilnih muških cvjetova, protok gena direktno iz maruna u prirodne populacije je moguć jedino preko plodova, ali budući da se iz plodova maruna mogu razviti posebne jedinice intermedijarnih morfoloških i kemijskih osobina u odnosu na prirodne populacije i marune tzv. marušnjaci (Poljak 2016), koje posjeduju fertilne muške cvjetove, protok gena prema divljim populacijama postaje moguć i peludom.

Što se tiče populacijsko-genetičkih osobina populacije Poreč i kod nje bi mogao biti prisutan antropogeni utjecaj, ali takav koji je doveo do toga da se ova populacija jako razlikuje od populacije Cres (Tablica 6), ali i od svih ostalih populacija u istraživanju (Sl. 10 i 12). Jedno od objašnjenja moglo bi biti da je ova populacija, s obzirom na blizinu Italije i povijesne veze s ovim područjem, kombinacija gena talijanskih prirodnih populacija i/ili kultivara, prirodnih istarskih populacija i nasada lovranskih maruna (Sl. 12). S obzirom da istraživanja talijanskih i hrvatskih populacija nisu nikada rađena u istom periodu, rezultati se ne mogu direktno uspoređivati. Za potpunu sigurnost u zaključivanju trebat će napraviti obimnije analize (isti set genetičkih biljega) s potencijalnim genetičkim izvorima ove populacije.

Premda su u ovom istraživanju upotrijebljena dva tipa mikrosatelitnih biljega, oni u nekodirajućem dijelu genoma (SSR) koji bi trebali biti selekcijski neutralni i oni u blizini kodirajućeg dijela genoma (EST-SSR) koji bi mogli biti ovisni o selekcijskom pritisku, osim zapaženog većeg broja alela unutar SSR lokusa svi važni populacijsko-genetički parametri kao što su npr. odstupanje od HW ravnoteže i F_{ST} vrijednosti za sve parove populacija bili su gotovo jednaki bez obzira na upotrijebljeni tip mikrosatelitnih biljega. Zaključak je da u budućim opsežnijim istraživanjima neovisne analize s obzirom na tip mikrosatelitnih biljega nisu opravdane.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih populacijsko-genetičkih analiza šest populacija pitomog kestena u kontinentalnom i primorskom dijelu Hrvatske može se zaključiti sljedeće:

- dobiveni rezultati nisu potvrdili jasnu genetičku diferencijaciju kontinentalnih i primorskih populacija pitomog kestena u Hrvatskoj,
- populacija Buje pokazala se srodnijom kontinentalnim populacijama iz Središnje Hrvatske nego geografski bližim populacijama Poreč i Cres,
- svojom genetičkom raznolikošću populacije Medvednica, Bilogora, Moslavačka gora i Buje ukazivale su na prirodno podrijetlo dok su populacije Poreč i Cres ukazivale na jako veliki antropogeni utjecaj u njihovom formiranju,
- budući da je najveća vrijednost genetičke diferencijacije između populacija u ovom istraživanju zabilježena između primorskih populacija Poreč i Cres vjerojatno je antropogeni utjecaj na ove dvije populacije bio prilično različit,
- protok gena iz nasada lovranskih maruna u prirodnu populaciju Cres moguće je objašnjenje specifične genetičke raznolikosti ove populacije
- jedno od objašnjenja antropogenog utjecaja na formiranje populacije Poreč moglo bi biti da je ova populacija kombinacija gena talijanskih prirodnih populacija i/ili kultivara, istarskih prirodnih populacija, a djelomično i protoka gena iz nasada lovranskog maruna,
- kako su u odvojenim analizama SSR i EST-SSR lokusa svi dobiveni populacijsko-genetički parametri bili gotovo isti, neovisne analize s obzirom na tip mikrosatelitnih biljega nisu se pokazale opravdanim.

7. ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svome mentoru prof. dr. sc. Zlatku Liberu na pruženoj prilici, razumijevanju, ogromnoj strpljivosti, nesebičnoj pomoći, utrošenom vremenu, svim korisnim savjetima, mogućnosti stjecanja vrijednog laboratorijskog znanja, dragocjenim savjetima prilikom pisanja ovog rada i ustupljenom laboratoriju kada mi je to bilo potrebno.

Veliko hvala prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću i Filipu Vargi, mag. biol. exp. na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

Ogromno hvala svim nastavnicima koji su me poticali na napredak i omogućili mi stjecanje dodatnih znanja i vještina.

I na kraju, najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima, te svima onima koji su mi na bilo koji način olakšali moje studentske dane.

8. POPIS LITERATURE

- Anić M. 1940. Pitomi kesten u Zagrebačkoj gori. Glasnik za šumske pokuse **7**: 103-312.
- Anić M. 1953. Pitomi kesten na Cresu. Glasnik za šumske pokuse **11**: 321-356.
- APG IV. 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 **161**: 105–121.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Catch F. 2004. GENETIX 4.05, Population genetics software for Windows™. Université de Montpellier II. Montpellier. (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>)
- Botstein D., White R. L., Sholnick M., David R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics **32**: 314–331.
- Buck E. J., Hadonou M., James J., Blakesley D., Russell K. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Molecular Ecology Notes **3**: 239-241.
- Chagne D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T. 2004. Crossspecies transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. Theoretical and Applied Genetics **109**: 1204–1214.
- Conedera M., Tinner W., Krebs P., De Rigo D., Caudullo G. 2016. Castanea sativa in Europe - distribution, habitat, usage and threats. U: San-Miguel-Ayanz J., de Rigo D., Caudullo G., Houston Durrant T., Mauri A. (ur.) European atlas of forest tree species, str. 78-79.
- Cuestas M. I., Mattioni C., Martín L. M., Vargas-Osuna E., Cherubini M., Martín M. A. 2017. Functional genetic diversity of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations from southern Spain. Forest Systems **26 (3)**, eSC06.
- Domac R. 2002. Flora Hrvatske: priručnik za određivanje bilja, 2. izdanje. Školska knjiga, Zagreb.
- El Mousadik A., Petit R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Morocco. Theoretical and Applied Genetics **92**: 832-839.

- Field D., Wills C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London* **263**: 209-215.
- Gobbin D., Hohl L., Conza L., Jermini M., Gessler C., Conedera M. 2007. Microsatellite based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* **50**: 1089-1103.
- Goudet J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* **86**: 485-486.
- Greguraš D. 2013. Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Hubisz, M. J., 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, 2009.
- Idžojić M., Zebec M., Poljak I., Medak J. 2009. Variation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations in Croatia according to the morphology of fruits. U: Turk R., Comes P. (ur.) Sauteria, Salzburg, Verlag Alexander Just Dorfbeuern, 323-333.
- Idžojić M., Zebec M., Poljak I., Šatović Z., Liber Z. 2012. Analiza genetske raznolikosti „lovranskog maruna“ (*Castanea sativa* Mill.) korištenjem mikrosatelitnih biljega. *Šum list* **136 (11-12)**: 577-585.
- Jarne P. i Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 424-429.
- Ježić M. 2013. Raznolikost gljive *Cryphonectria parasitica* Murrill Barr i njezin utjecaj na populacije pitomoga kestena (*Castanea sativa* Mill.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Krebs P., Conedera M., Pradella M., Torriani D., Felber M., Tinner W. 2004. Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* **13**: 145–160.

- Kremer A., Casasoli M., Barreneche T., Bodénès C., Sisco P., Kubisiak T., Scalfi M., Leonardi S., Bakker E., Buiteveld J., Romero-Severson J., Arumuganathan K., Derory J., Scotti-Saintagne C., Roussel G., Evangelista Bertocchi M., Lexer C., Porth I., Hebard F., Clark C., Carlson J., Plomion C., Koelewijn H.-P., Villani F. 2007. Fagaceae Trees. U: Kole C. (ur.) Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: Forest Trees. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, str. 161-162.
- Liu K., Muse S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* **21(9)**: 2128-2129.
- Marinoni D. T., Akkak A., Beltramo C., Guaraldo P., Boccacci P., Bounous G., Ferrara M., Ebone A., Viotto E., Botta R. 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes* **9 (4)**: 1017-1030.
- Martin M. A., Mattioni C., Cherubini M., Turchini D., Villani F. 2010. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomics* **6**: 735-744.
- Martin M. A., Mattioni C., Cherubini M., Villani F., Martin L. M. 2017. A comparative study of European chestnut varieties in relation to adaptive markers. *Agroforest Systems* **91**: 97-109.
- McGraw J., Tatipelli V. K., Feyijimi O., Traore M. C., Eangoor P., Lane S., Stollar E. J. 2014. A semi-automated method for purification of milligram quantities of proteins on the QIAcube. *Protein Expression and Purification* **96**: 48–53.
- Medak J. 2004. Fitocenološke značajke šuma pitomog kestena u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Medak J., Perić S. 2007. Šume pitomog kestena u Hrvatskoj - fitocenološke, ekološke i gospodarske karakteristike. U: Britvec M., Škvorc Ž. (ur.) Zbornik 2. botaničkog kongresa, Zagreb.
- Mendes-Moreira P., Šatović Z., Mendes-Moreira J., Sandos J., Nina Santos J., Pego S., Vaz Patto M. 2017. Maize participatory breeding in Portugal: Comparison of farmer's and breeder's on-farm selection. *Plant breeding* **136(6)**: 861-871.

- Miller A., Miller D. D., Pijut P. M. 2014. How a Flower Becomes a Chestnut Morphological Development of Chinese Chestnuts (*Castanea mollissima*). 103rd Annual Report of the Northern Nut Growers Association (Sept.): 27-33.
- Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza L. L. 1997. MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA. (hpgl.stanford.edu/projects/microsat)
- Moxon R., Wills C. 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? Scientific American. 94-99.
- Nikolić T. 2013. Sistematska botanika - Raznolikost i evolucija biljnog svijeta. Alfa d.d., Zagreb.
- Nuskern L. 2017. Biokemijske i epigenetičke promjene u gljive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr zaražene virusom *Cryphonectria hypovirus 1*. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Nuskern L., Ježić M., Liber Z., Mlinarec J., Čurković-Perica M. 2018. *Cryphonectria hypovirus 1* induced epigenetic changes in infected phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *Microbial Ecology* **75**: 790–798.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**: 294-307.
- Poljak I. 2014. Morfološka i genetska raznolikost populacija i kemijski sastav plodova europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) u Hrvatskoj. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Poljak I., Vahčić N., Gačić M., Idžojić M. 2016. Morphological characterization and chemical composition of fruits of the traditional Croatian chestnut variety 'Lovran Marron'. *Food Technology and Biotechnology* **54**: 189–199.

- Poljak I., Idžojić M., Šatović Z., Ježić M., Čurković-Perica M., Simovski B., Acevski J., Liber Z. 2017. Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genetics & Genomes* 13:18.
- Prgomet Ž., Mujić I., Bratović I., Novak Agbaba S., Pentek I., Šimunović V. 2011. Stanje i perspektiva uzgoja pitomog kestena u Istri. Skupština Istarske županije.
- Prgomet Ž., Prgomet I., Brana S. 2013. Pitomi kesten (*Castanea sativa*, Mill.). SKINK d.o.o. Rovinj, Rijeka.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Radosavljević I. 2012. Izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.; Lamiaceae). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Šatović Z. 1999. Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. *Sjemenarstvo* 1-2: 73-96.
- Schmidt R., Müller J., Drescher-Schneider R., Krisai R., Szeroczynska K., Barić A. 2000. Changes in lake level and trophy at Lake Vrane, a large karstic lake on the Island Cres (Croatia), with respect to paleoclimate and anthropogenic impacts during the last approx. 16,000 years. *J Limnol* 59: 113-130.
- Sia E. A., Butler C. A., Dominska M., Greenwell P., Fox T. D., Petes T. D. 2000. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 250-255.
- Šoštarić R., Küster H., 2001. Roman plant remains from Veli Brijun (island of Brioni), Croatia. *Vegetation History and Archaeobotany* 10: 227–233.

- Tančević Crmarić O., Štambuk S., Šatović Z., Kajba D. 2011. Genotipska raznolikost divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u dijelu prirodne rasprostranjenosti u Hrvatskoj. Šumarski list **11-12**: 543-555.
- Tóth G., Gáspari Z., Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* **10**: 967-981.
- Vidak M. 2019. Podrijetlo i raznolikost hrvatskih tradicijskih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23(21)**: 4407–4414.
- Vukelić J. 1991. Šumske zajednice i staništa hrasta kitnjaka. *Glas šum pokuse* 27: 1-82.
- Krebs P., Conedera M., Pradella M., Torrioni D., Felber M., Tinner W. 2004. Quaternary refugia of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): An extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany* **13**: 145-160.
- Vuković R., Liber Z., Ježić M., Sotirovski K., Čurković-Perica M. 2019. Link between epigenetic diversity and invasive status of south-eastern European populations of phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *Environmental Microbiology* (doi.org/10.1111/1462-2920.14742)
- Weir B. S., Cockerham A. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

9. ŽIVOTOPIS

Matija Dvorski rođen je 11. svibnja 1992. u Koprivnici. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završio je u Križevcima. 2014. upisuje se na integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije; smjer: nastavnički, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od samog početka studija posvećen je edukaciji i popularizaciji znanosti među djecom predškolske dobi i učenicima osnovnoškolskog i srednjoškolskog uzrasta. Trenutno je zaposlen kao nastavnik biologije u V. gimnaziji u Zagrebu.

10. PRILOZI

Tablica 1. Koncentracije izoliranih DNA i omjer apsorbancija na 260 i 280 nm.

| Populacija/broj uzorka | $\gamma/\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ | $A_{260/280}$ | Populacija/broj uzorka | $\gamma/\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ | $A_{260/280}$ | Populacija/broj uzorka | $\gamma/\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ | $A_{260/280}$ |
|------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------------|--------------------------------------|---------------|
| P1/01 | 63,20 | 1,810 | P3/01 | 46,40 | 1,790 | P5/02 | 62,00 | 1,570 |
| P1/02 | 97,10 | 1,820 | P3/03 | 73,60 | 1,810 | P5/03 | 117,00 | 1,560 |
| P1/03 | 134,70 | 1,820 | P3/04 | 61,90 | 1,890 | P5/04 | 85,00 | 1,650 |
| P1/04 | 166,66 | 1,840 | P3/06 | 50,60 | 1,870 | P5/05 | 51,00 | 1,729 |
| P1/05 | 133,33 | 1,920 | P3/07 | 38,80 | 1,890 | P5/06 | 44,00 | 1,660 |
| P1/07 | 90,50 | 1,880 | P3/08 | 38,80 | 1,840 | P5/07 | 61,00 | 1,452 |
| P1/08 | 131,90 | 1,980 | P3/09 | 94,50 | 1,980 | P5/08 | 106,00 | 1,435 |
| P1/09 | 64,30 | 1,920 | P3/10 | 42,50 | 1,810 | P5/09 | 65,00 | 1,512 |
| P1/10 | 76,40 | 1,900 | P3/11 | 35,90 | 1,830 | P5/10 | 57,00 | 1,606 |
| P1/11 | 1160 | 1,820 | P3/12 | 60,10 | 1,930 | P5/11 | 31,00 | 1,476 |
| P1/13 | 140,40 | 1,920 | P3/13 | 56,30 | 1,800 | P5/12 | 33,00 | 1,535 |
| P1/15 | 61,80 | 1,830 | P3/14 | 74,00 | 1,980 | P5/14 | 36,50 | 1,521 |
| P1/16 | 114,20 | 1,840 | P3/15 | 63,10 | 1,970 | P5/15 | 39,00 | 1,592 |
| P1/17 | 121,60 | 1,930 | P3/16 | 39,10 | 1,810 | P5/17 | 52,00 | 1,651 |
| P1/18 | 181,70 | 1,870 | P3/18 | 29,50 | 1,800 | P5/18 | 62,50 | 1,623 |
| P1/19 | 118,20 | 1,920 | P3/19 | 39,90 | 1,920 | P5/19 | 34,50 | 1,568 |
| P1/20 | 136,30 | 1,910 | P3/20 | 33,10 | 1,750 | P5/20 | 72,00 | 1,600 |
| P2/01 | 59,00 | 1,710 | P4/01 | 101,90 | 2,030 | P6/01 | 86,00 | 1,740 |
| P2/02 | 62,50 | 1,689 | P4/02 | 53,00 | 1,840 | P6/02 | 83,50 | 1,710 |
| P2/03 | 91,50 | 1,649 | P4/03 | 40,60 | 1,930 | P6/03 | 55,00 | 1,640 |
| P2/05 | 59,50 | 1,700 | P4/04 | 36,20 | 1,850 | P6/04 | 87,80 | 1,610 |
| P2/06 | 122,00 | 1,568 | P4/05 | 55,80 | 1,960 | P6/05 | 63,20 | 1,710 |
| P2/07 | 68,50 | 1,612 | P4/06 | 51,30 | 1,790 | P6/06 | 82,00 | 1,560 |
| P2/08 | 51,00 | 1,522 | P4/07 | 38,60 | 1,880 | P6/07 | 112,90 | 1,770 |
| P2/09 | 162,00 | 1,446 | P4/08 | 56,70 | 1,920 | P6/09 | 71,20 | 1,370 |
| P2/11 | 134,00 | 1,389 | P4/09 | 50,00 | 1,910 | P6/10 | 79,20 | 1,500 |
| P2/12 | 92,50 | 1,667 | P4/10 | 68,20 | 1,880 | P6/11 | 76,20 | 1,740 |
| P2/13 | 44,50 | 1,685 | P4/11 | 76,40 | 2,000 | P6/12 | 108,50 | 1,790 |
| P2/14 | 51,50 | 1,635 | P4/12 | 58,50 | 1,910 | P6/13 | 67,70 | 1,590 |
| P2/15 | 57,00 | 1,676 | P4/13 | 50,20 | 1,910 | P6/15 | 70,60 | 1,690 |
| P2/16 | 70,50 | 1,533 | P4/15 | 40,60 | 1,910 | P6/16 | 49,30 | 1,720 |
| P2/17 | 90,50 | 1,692 | P4/16 | 41,10 | 1,820 | P6/17 | 179,10 | 1,730 |
| P2/18 | 62,00 | 1,632 | P4/17 | 61,70 | 1,920 | P6/18 | 166,10 | 1,790 |
| P2/19 | 61,00 | 1,694 | P4/18 | 40,20 | 1,890 | P6/19 | 107,80 | 1,600 |

P1 – Medvednica, P2 – Bilogora, P3 – Moslavačka gora, P4 – Buje, P5 – Poreč, P6 - Cres

Tablica 2. Osnovni populacijsko genetički parametri svih populacija ovisno o upotrijebljenom setu biljega.

| Lokus | H_o | H_E | F_{is} | P |
|------------|-------|-------|----------|-----|
| EST-SSR1 | 0,618 | 0,541 | -0,142 | ns |
| EST-SSR2 | 0,422 | 0,470 | 0,104 | ns |
| EST-SSR3 | 0,726 | 0,693 | -0,046 | ns |
| EST-SSR4 | 0,794 | 0,699 | -0,135 | ns |
| EST-SSR5 | 0,373 | 0,377 | 0,013 | ns |
| EST-SSR6 | 0,745 | 0,707 | -0,053 | ns |
| EST-SSR7 | 0,441 | 0,420 | -0,050 | ns |
| EST-SSR8 | 0,510 | 0,519 | 0,018 | ns |
| EST-SSR9 | 0,578 | 0,526 | -0,100 | ns |
| SSR1 | 0,569 | 0,632 | 0,100 | ns |
| SSR2 | 0,461 | 0,426 | -0,080 | ns |
| SSR3 | 0,716 | 0,704 | -0,016 | ns |
| SSR4 | 0,441 | 0,438 | -0,006 | ns |
| SSR5 | 0,755 | 0,813 | 0,072 | ns |
| SSR6 | 0,618 | 0,692 | 0,107 | ns |
| SSR7 | 0,784 | 0,803 | 0,023 | ns |
| SSR8 | 0,657 | 0,633 | -0,037 | ns |
| SSR9 | 0,873 | 0,815 | -0,071 | ns |
| EST-SSR | 0,578 | 0,550 | -0,051 | ns |
| SSR | 0,653 | 0,662 | 0,014 | ns |
| Svi lokusi | 0,615 | 0,606 | -0,015 | ns |

ns = P > 0,05

Tablica 3. F_{ST} vrijednosti za sve parove populacija u slučaju analize svih lokusa i odvojeno za EST-SSR i SSR lokuse.

| Svi lokusi | Oznaka | Populacija | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
|------------|--------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | P1 | Medvednica | | *** | *** | *** | *** | *** |
| | P2 | Bilogora | 0,058 | | *** | *** | *** | *** |
| | P3 | Moslavačka gora | 0,052 | 0,082 | | *** | *** | *** |
| | P4 | Buje | 0,065 | 0,077 | 0,066 | | *** | *** |
| | P5 | Poreč | 0,122 | 0,106 | 0,113 | 0,100 | | *** |
| | P6 | Cres | 0,092 | 0,097 | 0,158 | 0,117 | 0,184 | |
| | | Srednja vrijednost | 0,099 | | | | | |
| | | Min | 0,052 | P1 | P3 | | | |
| | | Max | 0,184 | P5 | P6 | | | |

| EST-SSR | Oznaka | Populacija | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
|---------|--------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | P1 | Medvednica | | ** | *** | *** | *** | *** |
| | P2 | Bilogora | 0,025 | | *** | *** | *** | *** |
| | P3 | Moslavačka gora | 0,060 | 0,079 | | *** | *** | *** |
| | P4 | Buje | 0,039 | 0,054 | 0,065 | | *** | *** |
| | P5 | Poreč | 0,111 | 0,094 | 0,070 | 0,053 | | *** |
| | P6 | Cres | 0,100 | 0,093 | 0,201 | 0,101 | 0,203 | |
| | | Srednja vrijednost | 0,090 | | | | | |
| | | Min | 0,025 | P1 | P2 | | | |
| | | Max | 0,203 | P5 | P6 | | | |

| SSR | Oznaka | Populacija | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
|-----|--------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | P1 | Medvednica | | *** | *** | *** | *** | *** |
| | P2 | Bilogora | 0,086 | | *** | *** | *** | *** |
| | P3 | Moslavačka gora | 0,044 | 0,085 | | *** | *** | *** |
| | P4 | Buje | 0,088 | 0,097 | 0,067 | | *** | *** |
| | P5 | Poreč | 0,131 | 0,116 | 0,145 | 0,135 | | *** |
| | P6 | Cres | 0,086 | 0,100 | 0,122 | 0,130 | 0,171 | |
| | | Srednja vrijednost | 0,107 | | | | | |
| | | Min | 0,044 | P1 | P3 | | | |
| | | Max | 0,171 | P5 | P6 | | | |

Signifikantnost vrijednosti F_{ST} : *** $P < 0,001$