

UDK: 630*18:582.632.2(497.113)

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

OČUVANJE GENETIČKIH RESURSA HRASTA LUŽNJAKA (*QUERCUS ROBUR L.*) NA PODRUČJU JAVNOG PREDUZEĆA „VOJVODINAŠUME“

Srdan Stojnić¹, Branislav Trudić¹, Vladislava Galović¹, Đorđe Šimunovački²,
Božana Đorđević², Vid Rađević², Saša Orlović¹

Izvod: Šume hrasta lužnjaka predstavljaju jedne od najvrednijih šuma u Republici Srbiji. Na žalost, gazdovanje ovim šumama je u poslednjih nekoliko decenija opterećeno problemima koji se ogledaju kroz sušenje pojedinačnih i grupa stabala na čitavom području na kojem se hrast lužnjak javlja. Očuvanje genetičkih resursa, odnosno genetičke varijabilnosti sadržane u prirodnim populacijama, predstavlja osnovu za unapređenje postojećeg stanja šuma lužnjaka, kao i preduslov za dalje poboljšanje zdravstvenog stanja i vitalnosti istih. U radu su prikazane dosadašnje aktivnosti u vezi sa konzervacijom genetičkih resursa hrasta lužnjaka, na području kojim gazduju JP „Vojvodinašume“. Tokom više decenija, primenom različitih metoda *in situ* i *ex situ* konzervacije, izdvojeno je na desetine objekata za konzervaciju genetičkih resursa, među kojima najznačajnije mesto, svakako, zauzimaju semenske sastojine i semenske plantaže. Osim sa aspekta očuvanja biodiverziteta, ovi objekti imaju i veliki značaj za šumarsku struku s obzirom da se koriste za proizvodnju genetski kvalitetnog semena. Takođe, u radu su date i kratke preporuke vezano za dalje aktivnosti na očuvanju genetičkih resursa i oplemenjivanja hrasta lužnjaka, u svetlu klimatskih promena. Pored navedenog, u radu je napravljen i kratak osvrt na nova neobjavljena istraživanja koja u centru pažnje imaju molekularne analize, a čiji cilj jeste da se daju preporuke za razvijanje novih strategija očuvanja genofonda hrasta lužnjaka pomoću SSR marker sistema.

Ključne reči: hrast lužnjak, genetički resursi, konzervacija, *in situ*, *ex situ*, molekularne analize.

CONSERVATION OF PEDUNCULATE OAK (*QUERCUS ROBUR L.*) GENETIC RESOURCES AT THE TERRITORY OF PUBLIC ENTERPRISE "VOJVODINAŠUME"

Abstract: Oak forests represent one of the most valuable forests in the Republic of Serbia. Unfortunately, the management of these forests in the past few decades is affected by a

¹ Dr Srdan Stojnić, naučni saradnik; prof. dr Saša Orlović, naučni savetnik; Branislav Trudić, MSc, istraživač saradnik, dr Vladislava Galović, viši naučni saradnik; Univerzitet u Novom Sadu, Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, Antona Čehova 13, 21000 Novi Sad. e-mail: stojnics@uns.ac.rs

² Javno preduzeće „Vojvodinašume“, Preradovićeve 2, 21131 Petrovaradin.

number of problems that are reflected in the drying of individual and groups of trees throughout the area where the penduculate oak occurs. Conservation of genetic resources or genetic variability contained in natural populations is the basis for improving existing state of oak forests, as well as a prerequisite for further improvement of the health and vitality of the same. This paper describes the current activities related to the conservation of genetic resources of penduculate oak within the forest area managed by Public Enterprise "Vojvodinašume". Over decades, using different methods of in situ and ex situ conservation, aside numerous of objects (stands) aimed for conservation of genetic resources, among which the most important place, of course, take seed stands and seed orchards. Apart from the aspect of biodiversity conservation, these objects (stands) have a great importance for the forestry profession with regard of the production of genetically qualitative seed. Also, this paper provides the short list of recommendations et the end, needed in articulating future activities on conservation of genetic resources and breeding of oak, in the light of climate change. In addition, the paper made a brief review of the new research focus including the newest unpublished molecular analysis on penduculate oak, with the aim to provide recommendations for developing a new strategies for preservation of the gene pool of penduculate oak using SSR marker system.

Keywords: *penduculate oak, genetic resources, conservation, in situ, ex situ, molecular analysis.*

UVOD

Rod *Quercus* (hrast) pripada porodici *Fagaceae*, koja takođe obuhvata i rodove *Castanea* (kesten), *Fagus* (bukva), *Lithocarpus* (hrastovi sa tvrdim žirom sa ostrva Jave i susednih ostrva, eng. stone oaks) i *Castanopsis* (zimzeleno drvo). Među taksonomima, rod *Quercus* se često označava kao *crux botanicorum*. Sistematika ovog roda je komplikovana i kontroverzna i to se ogleda u različitom broju vrsta koje priznaju različiti autori. Karl Line je predložio 12 vrsta i od tada, broj hrastovih taksona je povećan na nekoliko stotina; Schwarz (1964) je 320 taksona smatrao odvojenim vrstama, plus mnoge oblike, varijetete ili subspecije. Među evropskim belim hrastovima (subgenus *Lepidobalanus*), vrste sa najvećim ekonomskim značajem i koje su zbog toga najintenzivnije proučavane su svakako *Quercus robur* L. i *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Nekoliko drugih taksona opisano je i otkriveno u prirodnim šumama po celoj Evropi (uglavnom istočnoj i zapadnoj): *Q. dalechampii* Ten., *Q. polycarpa* Schur., *Q. pedunculiflora* C. Koch. U mnogim florama (Grčka, Rumunija, Srbija, itd. čak i u flori Evrope, (Schwarz, 1964)) ovi taksoni su navedeni kao posebne vrste, ali ne postoji opšta saglasnost o njihovom taksonomskom statusu među botaničarima, pošto ih je zbog velike interspecijske morfološke varijabilnosti teško razlikovati. Zbog toga se oni često uključuju u *Q. robur* ili *Q. petraea*. Neki autori su čak zaključili da ih treba smatrati ekotipovima ili subspecijama unutar jedne kompozitne vrste *Q. robur* (Kleinschmit et al., 1995; Steinhoff, 1997; Gomory et al., 2001).

Vrste roda *Quercus* su diploidne ($2n = 24$). Sadržaj haploidne DNK varira između vrsta i kreće se od 539 Mb kod *Q. velutina* do 921 Mb kod *Q. coccifera* i *Q.*

illex, i 740 Mb kod *Q. robur*, odgovarajući petostrukoj veličini *Arabidopsis* genoma (koristeći procenu od 157 Mb iz Bennett et al., 2003) i približno dvostrukoj veličini genoma topole (koristeći procenu od 485 Mb iz Tuskan et al., 2006). Velike kolekcije hrastovih eksprimiranih sekvencnih tagova (ESTs) sakupljene su od različitih tkiva i iz različitih razvojnih etapa, uključujući 130,000 Sanger sekvenci i 2 M 454-očitavanja, kojima raspolažu javne baze podataka. Ovaj katalog predstavlja koristan izvor za otkrivanje kandidat gena koji kontrolišu osobine od interesa i za razvoj novih genetičkih markera za napredne genetičke pristupe (linkage mapiranje, detekcija QTL, asocijativno mapiranje) za disekciju genetičke arhitekture adaptivnih osobina. Međutim, malo se zna o ukupnoj strukturi genoma hrasta (Rampant et al., 2011).

Šume hrasta lužnjaka predstavljaju jedne od najvrednijih šuma u Republici Srbiji, posebno u kompleksu aluvijalno-higrofilnih tipova šuma (Banković et al., 2009). Međutim, gazdovanje ovim šumama opterećeno je pojavom propadanja i odumiranja stabala koje poprima sve veće razmere. Propadanje šuma hrasta lužnjaka u AP Vojvodini je problem koji je aktuelan duže od jednog veka. Prvo dokumentovano sušenje lužnjakovih šuma u Sremu vezuje se za razdoblje od 1910. do 1925. godine, da bi, zatim, opet bilo registrovano nakon 1950. godine, potom u periodu između 1983. i 1986. godine, a i danas je vrlo prisutno (Medarević et al., 2009). Na osnovu podataka iz Hrvatske, može se zaključiti da ovaj problem nije ograničen samo na područje AP Vojvodine, nego je prisutan u čitavom basenu hrasta lužnjaka. Na primer, prvo sušenje lužnjaka u Hrvatskoj pojavilo se početkom XX veka, tačnije 1902. godine, da bi nakon toga bilo dokumentovano nekoliko talasa sušenja (Kapeć, 2006), od kojeg najnoviji u periodu od 1996. – 2005. godine, kada je moralo biti posećeno 2,7 miliona m³ slučajnog prihoda, što je činilo oko 34% ukupnog lužnjakovog etata (Dubravac et al., 2011). Iako još nedovoljno proučeno, suša i mraz se smatraju među najčešćim abiotičkim faktorima koji vode propadanju stabala hrasta lužnjaka. Oni zajedno s drugim nepovoljnim faktorima (promena vodnog režima zemljišta, aerozagadenja, mehanička oštećenja, itd.) smanjuju vitalnost stabala, te stvaraju predispoziciju za delovanje drugih nepovoljnih činilaca, kao što su insekti i brojni patogeni slabosti (Tikvić et al., 2009). Osim navedenog, kao problem se javlja i biološka obnova lužnjakovih sastojina, s obzirom da periodicitet plodonošenja u sastojinama nije pravilan, a vremenski period do punog uroda semena se sve više produžuje (Kajba et al., 2011).

S obzirom da hrast lužnjak spada među ugrožene vrste, do sada su se činili veliki naponi da se on očuva kroz različite oblike *in situ* i *ex situ* konzervacije (Orlović et al., 2008). Isajev et al., (2009) smatraju da genetički diverzitet igra ključnu ulogu u adaptacionim procesima, odnosno da bi bez odgovarajućeg genetičkog diverziteta adaptacioni procesi bili nezamislivi. Iz tog razloga, Milad et al., (2011) ističu da će upravo postizanje visokog nivoa diverziteta biti ključna mera u očuvanju prirode. U radu su prikazane dosadašnje aktivnosti na očuvanju genetičkih resursa lužnjaka, na području kojim gazduju JP „Vojvodinašume“. Tokom više decenija, izdvojeno je na desetine objekata za konzervaciju genetičkih

resursa, među kojima najznačajnije mesto, svakako, zauzimaju semenske sastojine i semenske plantaže. Dodatni značaj ovako izdvojenih konzervacionih područja, odnosno osnovanih objekata, predstavlja i činjenica da oni služe za proizvodnju genetski kvalitetnog reproduktivnog materijala, koji se koristi za potrebe komercijalnog šumarstva. Pored navedenog, u radu je napravljen i osvrt na nova istraživanja koja u centru pažnje imaju molekularne analize, a čiji cilj jeste da se daju preporuke za razvijanje novih strategija očuvanja genofonda hrasta lužnjaka pomoću SSR marker sistema koji na molekularnom nivou dezoksiribonukleinske kiseline, daje dublji uvid u genetički polimorfizam i genotipski profil jedinki koje ulaze u sastav populacija i sastojina.

KONZERVACIJA ŠUMSKIH GENETIČKIH RESURSA

Šumski genetički resursi se mogu kratko definisati kao „genetička varijabilnost drveća, koja je od potencijalne ili trenutne koristi za ljude“ (Mataruga et al., 2013). Generalno posmatrano, šumski genetički resursi su danas izloženi brojnim opasnostima koje se ogledaju kroz uništavanje staništa, njegovu fragmentaciju, zagađivanje, loše gazdovanje i upotrebu sadnog materijala slabog kvaliteta i adaptiranosti na postojeće uslove (Koskela et al., 2007). S toga se očuvanje šumskih genetičkih resursa nameće kao jedan od primarnih zadataka, ne samo za šumarsku struku, nego i društvo u celini. Imajući u vidu gore navedeno, počev od 1972. godine do danas, konzervacija šumskih genetičkih resursa je bila predmet brojnih međunarodnih inicijativa i usvojenih dokumenta, koji su, na direktan ili indirektan način, regulisali njihovo očuvanje, manipulaciju, korišćenje, modifikaciju i uključivanje u komercijalne tokove (Milovanović et al., 2012).

Kada se govori o konzervaciji šumskih genetičkih resursa, u osnovi se razlikuju dva osnovna metoda, u zavisnosti od toga da li proces konzervacije omogućava adaptaciju i promene frekvencije gena u skladu sa lokalnim selektivnim pritiscima ili je proces konzervacije planiran sa ciljem očuvanja trenutne frekvencije gena, pri čemu izostaju efekti genetičkih procesa (videti: Šijačić-Nikolić i Milovanović, 2007). U prvom slučaju govorimo o dinamično-evolutivnoj (*in situ*) konzervaciji, dok se u drugom slučaju radi o statičnoj (*ex situ*) konzervaciji. *In situ* konzervacija podrazumeva očuvanje genetičkih resursa u njihovom prirodnom okruženju. Tu spadaju: nacionalni parkovi, nacionalni rezervati, semenske sastojine, grupe stabala i pojedinačna stabla. *Ex situ* konzervacija označava očuvanje genetičkih resursa van originalnog staništa, osnivanjem za to specijalnih objekata, kao što su: semenske plantaže, testovi potomstva, arboretumi, žive arhive i provenijenični testovi (Isajev et al., 2009).

***In situ* konzervacija genetičkih resursa hrasta lužnjaka**

Među pomenutim oblicima *in situ* konzervacije genetičkih resursa, najznačajnije mesto svakako zauzimaju semenske sastojine. Za svaku vrstu drveća,

broj semenskih sastojina treba da bude određen na bazi realnog stanja na terenu (ukoliko sastojine zaista ispunjavaju kriterijum da budu semenske) i stvarnih potreba, koje se zasnivaju na obimu pošumljavanja, melioracija i podizanja namenskih kultura za minimum pet godina, smeštajnih kapaciteta i uslova čuvanja u skladištima, kao i potrebama izvoza (Isajev et al., 2003).

Objekti ove vrste, pored značajnog ekonomskog efekta za biljnu proizvodnju u šumarstvu, od izuzetnog su značaja i kao oblik očuvanja biodiverziteta šumskih vrsta drveća (Isajev et al., 2008). Orlović et al., (2008) navode da semenske sastojine hrasta lužnjaka predstavljaju najbolje oblike očuvanja genetičkog diverziteta ove vrste, dok Kabja et al., (2011) iznose podatak da se kod potomstva proizvedenog u ovakvim objektima ostvaruje i genetska dobit u odnosu na matičnu sastojinu. Sve izdvojene semenske sastojine lužnjaka, kojima gazduju JP Vojvodinašume, nalaze se na područjima ŠG Sremska Mitrovica i ŠG Sombor. Na osnovu podataka iz „Registra selekcionisanih semenskih objekata“ Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine, Uprave za šume, na području kojim gazduju JP Vojvodinašume, postoji ukupno 12 objekata za proizvodnju selekcionisanog³ (10 objekata) i kvalifikovanog reproduktivnog materijala (2 objekta). Ukupna površina ovih objekata iznosi 715,09 ha, od čega se najveći deo nalazi na teritoriji kojom gazduje ŠG Sremska Mitrovica (702,32 ha), dok se ostatak nalazi na području ŠG Sombor (12,77 ha)⁴. Pored pomenutih objekata, prema podacima iz „Registra semenskih objekata poznatog porekla“, na području JP Vojvodinašume su izdvojena i 32 objekta za proizvodnju reproduktivnog materijala poznatog porekla hrasta lužnjaka. Ukupna površina ovih objekata je 15.395,88 ha. Kao i u prethodnom slučaju, najveći deo se nalazi u ŠG Sremska Mitrovica (14.508,83 ha), dok se manji deo nalazi na teritoriji kojom gazduje ŠG Sombor (887,05 ha). U tabeli 1 je prikazana količina sakupljenog žira u semenskim sastojinama kojima gazduje ŠG Sremska Mitrovica, u periodu od 2006-2014. godine.

³ Zakon o reproduktivnom materijalu šumskog drveća Republike Srbije definiše četiri kategorije reproduktivnog materijala (Član 6.). To su: 1) reproduktivni materijal poznatog porekla, 2) selekcionisan reproduktivni materijal, 3) kvalifikovan reproduktivni materijal, 4) testiran (sortni) reproduktivni materijal.

Reproduktivni materijal *poznatog porekla* je reproduktivni materijal koji potiče od stabla ili iz sastojine, čija su nadmorska visina i region provenijencije poznati.

Selekcionisan reproduktivni materijal je reproduktivni materijal koji je proizveden u semenskoj sastojini.

Kvalifikovan reproduktivni materijal je reproduktivni materijal koji je proizveden od roditeljskih stabala, klonova, klonskih smeša ili u semenskim plantažama, fenotipski odabranih na nivou individue.

Testiran (sortni) reproduktivni materijal je reproduktivni materijal koji je proizveden u semenskim sastojinama, semenskim plantažama, od roditeljskih stabala, klonova ili klonskih smeša, čija superiornost mora biti dokazana u uporednim testovima u skladu sa propisima iz oblasti priznavanja sorti šumskog bilja ili je procenjena na osnovu genetske ocene delova polaznog materijala („Službeni glasnik Republike Srbije“, broj 135/04, 8/2005-ispr. i 41/2009).

⁴ Na području kojim gazduje ŠG Sombor izdvojene su jedna semenska sastojina, koja se nalazi u GJ Zaštićene šume, odeljenje 10b i grupa od 10 stabala koja se nalazi na području GJ Subotičke šume, odeljenje 38k.

Tabela 1. Količina sakupljenog semena (kg) u semenskim sastojinama hrasta lužnjaka na području ŠG Sremska Mitrovica u periodu od 1952-2014. godine.

Table 1. The amount of collected seed (kg) in seed orchards of *Penduculate oak* on the territory of Forest Estate Sremska Mitrovica, from 1952 to 2014.

Godina sakupljanja <i>Year of collection</i>	Količina sakupljenog semena (kg) <i>The amount of collected acorns (kg)</i>	Godina sakupljanja <i>Year of collection</i>	Količina sakupljenog semena (kg) <i>The amount of collected acorns (kg)</i>
1952	552,206	1984	0
1953	18,370	1985	323,508
1954	5,454	1986	12,667
1955	9,532	1987	212,184
1956	0	1988	0
1957	11,884	1989	165,867
1958	0	1990	181,558
1959	1,231	1991	169,830
1960*	0	1992	12,968
1961*	0	1993	0
1962*	0	1994	2,350
1963*	0	1995	279,741
1964*	0	1996	53,688
1965*	0	1997	0
1966	164,576	1998	184,691
1967	157,018	1999	0
1968	138,339	2000	171,590
1969	149,177	2001	0
1970	182,010	2002	259,120
1971	3,869	2003	283,126
1972	1,500	2004	9,747
1973	327,076	2005	262,763
1974	245,669	2006	175,932
1975	261,973	2007	0
1976	144,441	2008	180,616
1977	154,744	2009	7,500
1978	610,074	2010	453,603
1979	3,000	2011	306,816
1980	0	2012	3,860
1981	464,771	2013	366,920
1982	0	2014	343,039
1983	354,329		

* u periodu od 1960-1965. godine žir nije sakupljan

* in the period from 1960-1965 the acorns were not collected.

Kako bi semenske sastojine očuvale svoju primarnu funkciju, u njima je neophodno sprovesti uzgojne mere sa ciljem poboljšanja genetičkog kvaliteta sastojina. Tzv. "genetičke melioracije" predstavljaju radove u semenskim sastojinama koji za cilj imaju unapređenje proizvodnje genetički kvalitetnog semena (npr. prorede kojima se favorizuju odabrani genotipovi, a uklanjaju nepoželjni, uzimajući u obzir ne samo svojstva kao što su debljinski i visinski prirast, nego i sterilnost, odnosno stabla sa nedostacima u formiranju cvetova i plodova) (Mataruga et al., 2010). Kada se govori o semenskim sastojinama lužnjaka, na području JP "Vojvodinašume", u budućnosti je potrebno izvršiti kandidovanje novih sastojina za semenske sastojine, iz starosne grupe srednjedobnih i dozrevajućih.

Prema Orlović et al., (2008), osnovni problemi koji se javljaju u vezi sa gazdovanjem semenskim sastojinama mogli bi se sistematizovati u tri grupe: a) potrebu stalnih intervencija kroz uklanjanje suvih stabala, b) nemogućnost sprovođenja mera zaštite od bolesti i štetnih insekata i c) urod žira, koji je u semenskim sastojinama u nepravilnim intervalima. Kako bi se u što većoj meri redukovali pomenuti problemi, a pre svega problem sa periodicitetom uroda žira, pristupilo se izradi projekata za osnivanje namenskih zasada za proizvodnju žira.

Ex situ konzervacija genetičkih resursa hrasta lužnjaka

Semenske plantaže

Semenske plantaže, prema svom poreklu, mogu biti vegetativne (klonske) i generativne. Bez obzira o kom tipu se radi, zajedničko za obe jeste da se osnivaju od fenotipski i genetički najboljih individua unutar jedne vrste (Šijačić-Nikolić i Milovanović, 2010). Služe za potrebe dugoročnog očuvanja genetičkog diverziteta vrste, kao i za višegodišnju proizvodnju genetski kvalitetnog semena. Cilj proizvodnje semena u plantažama jeste da se ostvari veća genetska dobit u potomstvu, nego što je to slučaj sa potomstvom poreklom iz semenskih sastojina (Kajba et al., 2011). Naime, za razliku od semenskih sastojina gde ne postoji kontrola oprašivanja i gde je poznata isključivo majčinska jedinka, u semenskim plantažama imamo određenu vrstu polukontrolisanog oprašivanja, gde je seme poreklom od selekcionisanih roditelja. Pored navedenog, za proizvodnju genetski kvalitetnog semena neophodno je i da postoji visok nivo genetičke raznolikosti između roditeljskih stabala koja učestvuju u oprašivanju, što se postiže uključivanjem većeg broja genotipova u plantažu (pojedini autori predlažu minimalno između 20-60 genotipova) (Franjić et al., 2011).

Danas, na području kojim gazduju JP „Vojvodinašume“, postoji dve semenske plantaže hrasta lužnjaka, od kojih je jedna osnovana vegetativnim putem (kalemljenjem), a druga generativnim (setvom žira). Obe plantaže se nalaze na području ŠG Sremska Mitrovica, s tim što je klonska semenska plantaža osnovana na teritoriji ŠU Višnjicevo, dok je generativna plantaža osnovana na teritoriji ŠU Klenak. U obe semenske plantaže su zastupljena sva četiri varijeteta lužnjaka, koji se javljaju i u prirodnim populacijama: rani (*Q. robur var. praecox*), tipičan (*Q.*

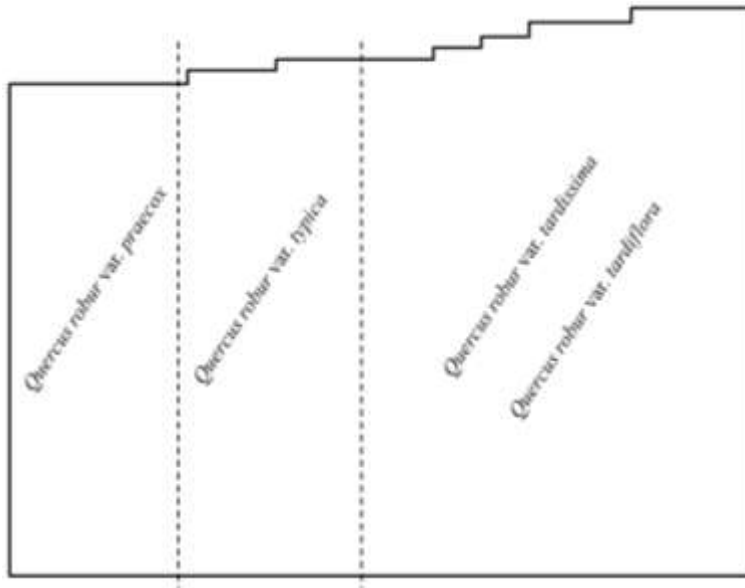
robur var. *typica*) i dva varijeteta kasnog lužnjaka (*Q. robur* var. *tardiflora* i *Q. robur* var. *tardissima*) (Orlović et al., 2002). Sinhronizovana biologija cvjetanja između individua u plantaži je značajna sa aspekta međusobnog oprašivanja, kao garanta proizvodnje genetički kvalitetnog semena (Franjić et al., 2011). Takođe, Batos et al., (2014) navode da je poznavanje individualne fenološke varijabilnosti značajno u kontekstu otpornosti biljnih vrsta na patogene, o čemu će kasnije biti više reči.

Klonska semenska plantaža je osnovana u periodu od 1979 – 1983. godine (Erdeši, 1996). Radovi na odabiranju "plus" stabala su otpočeli 1968., a završeni 1978. godine, kada je sa površine od 42.000 ha odabrano 86 "plus" stabala - genotipova, uglavnom starijih od 110 godina. Ovo izdvajanje je trajalo dosta dugo, prvenstveno iz razloga što je površina na kojoj su odabrani "plus" genotipovi velika, kao i zbog potrebe da se odrede fenofaze listanja i cvjetanja odabranih genotipova. Osnovni kriterijumi za izdvajanje ovih stabala su bili: dimenzije (brzina rasta), pravost debela, grananje (monopodijalnost) i osetljivost prema pepelnici (*Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam) (Orlović et al., 2008). Površina same plantaže iznosi 5.72 ha i sastoji se od 86 genotipova koji su umnoženi u 2520 remeta. Razmak između stabala u plantaži iznosi 5 x 5 m. Prilikom osnivanja plantaže, korišćeno je pet metoda kalemljenja: jednostavno spajanje, englesko spajanje, kalemljenje u mjesok (mešok-džakčić), klinasto cepljenje i kalemljenje "kozja noga" (Orlović et al., 1999). Kako bi se dobio uvid u genetičku strukturu i diverzitet u klonskoj semenskoj plantaži, 2010. godine su počela molekularna istraživanja čiji je cilj bila karakterizacija genetičke strukture u vezi sa različitim fenotipijom uzorkovanih genotipova hrasta, koristeći uspostavljen sistem mikrosatelitnih molekularnih markera. Za analize genetičke strukture i utvrđivanja genetičke varijabilnosti korišćeno je sedam dinukleotidnih kodominantnih markera dizajniranih po Kampfner-u i saradnicima 1998. godine. Uzorkovano je lisno tkivo sa 80 individua sa četiri različita varijeteta hrasta lužnjaka (*praecox*, *typica*, *tardiflora* i *tardissima*). Uzorkovane individue su pokazale visok nivo polimorfizma sugerišući da su ovi markeri odgovarajući za studije genetskog diverziteta u okviru populacija hrasta i između samih varijeteta. Uspešna amplifikacija svih posmatranih mikrosatelitnih lokusa je otkrila alelni polimorfizam između i u okviru svih varijeteta, uspostavivši varijabilnost genetičke strukture ukazujući na razlike u genetičkoj osnovi fenoloških varijeteta (Galović et al., 2014).

Generativna semenska plantaža je podignuta u periodu od 2000-2004. godine, na površini od 10 ha (Orlović et al., 2014). Osnovana je setvom žira, koji je sakupljen iz klonske semenske plantaže i fenotipski superiornih genotipova iz prirodnih populacija, koje se nalaze u GJ „Vinična-Žeravinac-Puk“, odeljenja 18, 30 i 31 i GJ „Blata-Malovanci“, odeljenja 19 i 32. Razmak između stabala u plantaži je 7 x 5 m. Plantaža se sastoji od ukupno 129 familija, koje su zastupljene u različitom broju ponavljanja (minimalno šest ponavljanja), tako da ukupan broj genotipova u plantaži iznosi 2585.

Prilikom osnivanja semenske plantaže, pažnja je posvećena i prostornom rasporedu različitih varijeteta u pogledu fenologije cvjetanja, kako bi se omogućilo

nesmetano oprašivanje između individua. Raspored genotipova u generativnoj plantaži je baziran na vremenskoj ujednačenosti receptivnosti ženskih cvetova i truenja polena, tako da prvi deo površine (prvu trećinu) čini varijetet *praecox*, na njega se nastavlja deo površine sa varijetetom *typica* (druga trećina), dok se poslednji i najveći deo površine nalazi pod varijetetom *tardiflora/tardissima* (Slika 1). Kako navode Bobinac et al., (2012), kasni varijeteti hrasta lužnjaka se karakterišu boljim razvojnim potencijalom i većom otpornošću na napad patogena. U rano proleće, lišće stabala ranog hrasta ima manji sadržaj kondenzovanih tanina koju su nepoželjni u ishrani gusenica malog mrazovca (*Operophtera brumata* L.). Dakle, stabla koja ranije započinju fenološki ciklus više stradaju od defolijatora usled sinhronizovanosti između fenofaza i razvojnog ciklusa defolijatora (Batoš et al., 2014).



Slika 1. Prostorni raspored varijeteta hrasta lužnjaka u generativnoj semenskoj plantaži.

Picture 1. Spatial distribution of different Pedunculata oak varieties in generative seed orchard.

Tokom 2014. godine izrađen je projekat generativne semenske plantaže i krenulo se u proceduru njenog priznavanja, sa ciljem da semenska plantaža uđe u „Registar regiona provenijencije i priznatog polaznog materijala za proizvodnju reproduktivnog materijala” kako bi seme sakupljeno unutar objekta imalo kategoriju *kvalifikovanog reproduktivnog materijala*.

Testovi potomstva

Savremene koncepcije očuvanja genetičkih resursa hrasta lužnjaka se u velikoj meri oslanjaju na ranu selekciju, bilo da se radi o genetičkim melioracijama u prirodnim sastojinama ili testiranju potomstva u ogledima osnovanim u poljskim uslovima. Testovi potomstva predstavljaju mogućnost za upoznavanje genetskog potencijala određene vrste, kao i metod očuvanja genetičke varijabilnosti sadržane u prirodnim populacijama. Glavna prednost ovih testova se ogleda u mogućnosti prepoznavanja genotipova sa poželjnim svojstvima u ranoj ontogenetskoj fazi razvića. Takođe, osim što pružaju informacije o osobinama samog potomstva koje se testira, testovi potomstva pružaju i informacije o genetičkom potencijalu matičnih stabala (Orlović et al., 2014a).

Kod ranih testova potomstva polazi se od pretpostavke da su proizvodne površine na kojima se obavlja testiranje ujednačene. U tom slučaju može se sa velikom verovatnoćom tvrditi da su razlike u ispitivanim osobinama (npr. visinski prirast, grananje, pravost, itd.) genetske prirode (Mikić, 2004). Radovi na osnivanju testova potomstva su započeti u 2012. godini, sakupljanjem žira sa stabala u generativnoj semenskoj plantaži. S obzirom da se radilo o godini kada je izostao obilan urod, sakupljanje žira je izvršeno sa svega 13 genotipova. Brojevi genotipova su bili sledeći: 1, 2, 4, 9, 35, 37, 43, 45, 72, 75, 94, 101 i 135. Navedeni genotipovi su pripadali sledećim varijetetima: rani (*praecox*) – 94; tipični (*typica*) – 1, 2, 32, 35, 43, 45 i 72 i kasni (*tardiflora* i *tardissima*) – 4, 9, 75, 101 i 135. Treba istaći da je prilikom sakupljanja žira zabeleženo da su genotipovi 72 i 94 imali odličan urod, kao i da oštećenja na žiru, od strane insekata, gotovo da nije bilo. Od sakupljenog žira je osnovan rani test potomstva u rasadničkim uslovima na Oglednom dobru Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Kaću.

U 2013. godini nastavljeno je sa aktivnostima na sakupljanju žira i osnivanju testova potomstva. Za razliku od 2012. godine, kada je žir sakupljen u semenskoj plantaži, u 2013. godini žir je sakupljan u prirodnim populacijama koje se nalaze na području ŠG Sombor i ŠG Sremska Mitrovica. U ŠG Sombor, žir je sakupljen na područjima ŠU Odžaci (GJ Branjevina, odeljenja 8e, 9h, 14j, 15c, 15g) i ŠU Bački Monoštor (GJ Karapandža, odeljenja 33i, 17b). Žir je sakupljen sa ukupno 28 plus stabala hrasta lužnjaka i razdvojen po familijama. U ŠG Sremska Mitrovica, žir je sakupljen na nivou populacije, sa 11 lokaliteta i uglavnom se radilo o žiru poreklom iz priznatih semenskih objekata. Osim navedenih semenskih objekata, žir je sakupljen i sa stabala u četiri gazdinske jedinice, koje se nalaze na području ŠU Višnjicevo: GJ Kućine-Naklo-Klještevica, GJ Varadin-Županja, GJ Vratična-Cer-Carevina i GJ Smogva-Grabova Greda. Kao i u slučaju testa potomstva osnovanog u 2012. godini, nakon trogodišnjih istraživanja u rasadničkim uslovima, najbolje familije i genotipovi biće preneti u tzv. „poljske uslove“, kako bi se nastavio rad sa njima.

Iako je oplemenjivanje šumskog drveća tradicionalno usmereno ka proizvodnji što kvalitetnijeg drveta, nova saznanja o potencijalnom uticaju klimatskih promena na drveće nameću potrebu za novim pristupom u

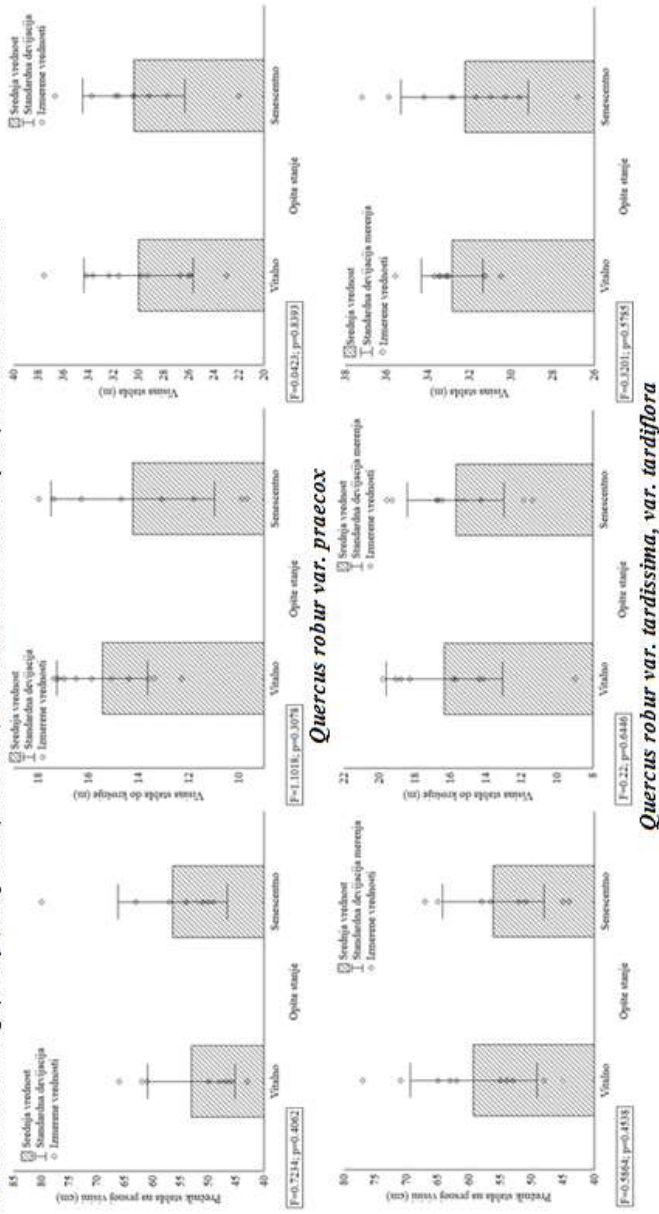
oplemenjivanju, koji neće imati za cilj isključivo selekciju na brzinu rasta i kvalitet drveta. Na primer, u izmenjenim klimatskim uslovima, varijabilnost biologije cvetanja omogućava proces adaptacije vrste i na taj način njeno preživljavanje (Aitken et al., 2008). Thompson, (2007) je diskutujući rezultate preživljavanja, visinskog prirasta i prolećne fenologije u provenijeničnom testu bukve, naglasio da prilikom izbora provenijencija za pošumljavanja, osim dobrog visinskog prirasta, treba voditi računa i o prolećnoj dinamici otvaranja pupoljaka i listanja, jer postoji opasnost od kasnih prolećnih mrazeva. Takođe, primenom sofisticiranih merenja moguće je proširiti saznanje o mehanizmima adaptacije i ispratiti fiziološke, biohemijske i molekularne procese koji tu adaptaciju prate. Na kraju, možda i najvažnije, održavanje široke genetičke baze smanjuje rizik od negativnog uticaja klimatskih promena i propadanja do tada optimalnih genotipova u izmenjenim uslovima (Kajba et al., 2012).

MORFOMETRIJSKA DETERMINACIJA KANDIDAT STABALA ZA MOLEKULARNO GENETIČKE ANALIZE

Početak vegetacionog perioda 2013. godine, na području ŠG Sremska Mitrovica, ŠU Morović, GJ Blata-Malovanci, izvršeno je kandidovanje 40 stabala lužnjaka, koja su na osnovu fenotipa podeljena na vitalna i senescentna. Kao glavni kriterijum, u određivanju pripadnosti stabala jednoj od navedenih grupa, bio je stepen oštećenosti krošnji. Kako navode Dubravac et al., (2011), među brojnim činiocima koji utiču na odumiranje stabala hrasta lužnjaka, najznačajniju ulogu zauzima upravo oštećenost krošnji, koja predstavlja prvi vidljivi simptom slabljenja vitalnosti stabla. Za potrebe istraživanja, stabla sa oštećenošću krošnje iznad 25% smatrana su značajno oštećenim stablima, dok su stabla sa oštećenjem krošnje do 25% smatrana neoštećenim, odnosno vitalnim stablima (videti: Dubravac et al., 2011). Kao dopunski kriterijumi u izboru stabala korišćena su i oštećenja nastala delovanjem patogena.

Studija je obuhvatila 20 stabala ranog hrasta (var. *praecox*) i 20 stabala kasnog i kasnijeg hrasta lužnjaka (var. *tardissima* i *tardiflora*). Na svim stablima su izmereni prsni prečnik, visina stabla do krošnje i apsolutna visina. Visina stabala je izmerena uređajem "Vertex III" (Haglöf Sweden AB). Podaci merenja su obrađeni u statističkom programskom paketu "Statistica 12" (StatSoft, Inc.), primenom analize varijanse (ANOVA). Na grafikonu 1 prikazana je uporedna analiza između vitalnih i senescentnih individua, u odnosu na tri pomenuta morfometrijska parametra za kandidovanih 40 stabala hrasta lužnjaka. Ekspresiona analiza odabranih kandidat gena dobijeni iz kodirajućeg dela genoma hrasta lužnjaka, iz postojećih baza podataka, će dalje razviti/potvrditi hipotezu da stabla koja pokazuju klasične znake senescentnosti, usled suše i nedostatka vode u zemljištu, se upravo mogu i kandidovati kao takva. Sa genetičko-oplemenjivačkog aspekta, ta stabla mogu predstavljati nepoželjan genofond koja bi trebalo izbegavati prilikom selekcionisanja reproduktivnog materijala kod osnivanja semenskih plantaža i drugih sastojina.

Grafikon 1. Usporedna analiza vitalnih i senescentnih stabala u odnosu na tri morfometrijska parametra (prečnik stabla na prsnoj visini, visina stabla do krošnje i ukupna visina stabla) kod ranog (*var. praecox*) i kasnog (*var. tardissima* i *var. tardiflora*) hrasta lužnjaka.
Graph 1. Comparative analysis between vital and senescent in relation to the three morphometric parameters (trunk diameter at breast height, tree height to crown and total tree height) early (*var. praecox*) and late (*var. tardissima* and *var. tardiflora*) Pedunculata oak trees.



Jedino objedinjene genetičke analize ekspresije kandidat gena, polimorfizma mikrosatelitnih lokusa i više morfometrijskih parametara mogu dati detaljnu procenu genotipova na individualnom nivou u okviru neke populacije i time osigurati tačnu procenu germplazme koja je poželjna za selekcionisanje.

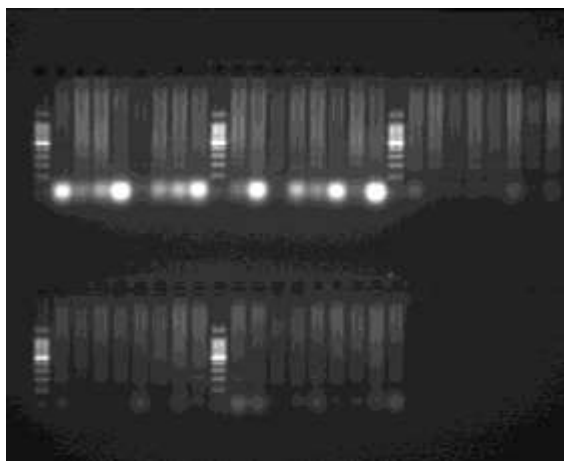
SAVREMENI PRISTUP OČUVANJU/OPLEMENJIVANJU GENOFONDA HRASTA LUŽNJAKA NA PODRUČJU JP „VOJVODINAŠUME“

U protekle dve godine, na Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu iz Novog Sada, inicirana su nova istraživanja koja u centru pažnje imaju molekularne analize, a čiji cilj jeste da se daju preporuke za razvijanje novih strategija očuvanja genofonda hrasta lužnjaka korišćenjem adekvatnih molekularnih metoda, počev od istraživanja postojeće genetičke varijabilnosti korišćenjem kodominantnih marker sistema do ispitivanja odgovora različitih fenoloških grupa lužnjaka na abiotske stresove korišćenjem metoda genomike i funkcionalne genomike. Za tu svrhu četrdeset uzoraka lišća hrasta lužnjaka iz ŠG Sremska Mitrovica, ŠU Morović, GJ Blata-Malovanci je bilo podvrgnuto izolaciji ukupne DNK pomoću komercijalnog INVITEK izolacionog kita. Zatim je sprovedena kontrola kvaliteta i količina izolovane DNK pomoću NanoDrop spektrofotometra i provera stepena degradiranosti ukupne genomske DNK na 1% agaroznom gelu. Za tri odabrana SSR markera (Tabela 2).

Tabela 2. Tri SSR markera korišćeni u preliminarnom DNK profilisanju hrasta lužnjaka iz Morovića.

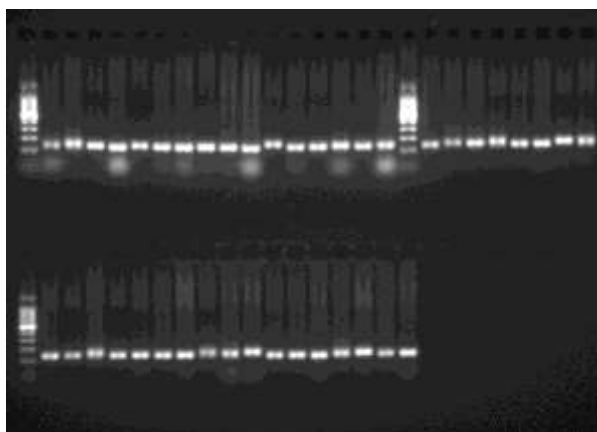
Table 2. Three SSR makers used in preliminary DNA profiling of Penduculate oak from Morović

Lokus <i>Loci</i>	ssrQpZAG96	ssrQpZAG104	ssrQpZAG46
Ponavljajući motiv <i>Repetative motif</i>	(TC) ₂₀	(AG) ₁₆ AT(GA) ₃	(AG) ₁₃
Veličina [bp] <i>Size in base pairs</i>	135-194	176 – 196	190 – 222
Forward Primer <i>sequence (5'-3')</i>	CCCAGTCACATCCACT ACTGTCC	ATAGGGAGTGAGGA CTGAATG	CCCCTATTGAAGTCC TAGCCG
Reverse Primer <i>sequence (5'-3')</i>	GGTTGGGAAAAGGAG ATCAGA	GATGGTACAGTAGCA ACATTC	TCTCCCATGTAAGTA GCTCTG
Referenca <i>Reference</i>	Kampfer et al. 1998	Steinkellner et al. 1997	Steinkellner et al. 1997
PCR program <i>PCR programme</i>	Micro 110-suber	Micro 110-suber	Micro 110-suber
Pojedinačni/multi-plex <i>Single/multiplex PCR</i>	Pojedinačni <i>Single</i> PCR	Pojedinačni <i>Single</i> PCR	Pojedinačni <i>Single</i> PCR



Slika 2. Elektorforegram ZAG46 SSR markera (nakon svakih 8 uzoraka ide standardna ladder DNK rezolucije 100bp).

Picture 2. Electrophoregram of ZAG46 SR marker (after every 8 samples goes the standard DNA ladder of 100 bp resolution).

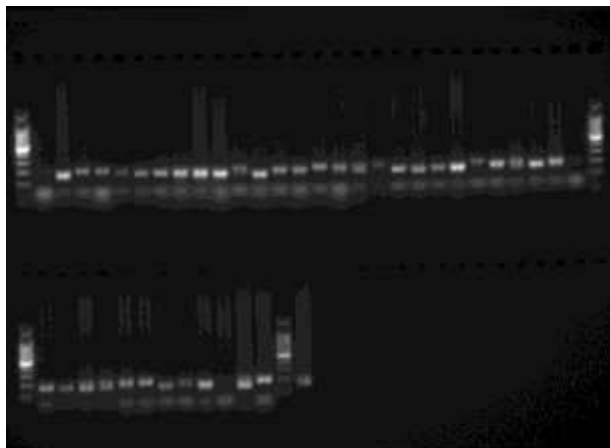


Slika 3. Elektorforegram ZAG96 SSR markera (nakon prvih 16 uzoraka, pa drugih 8, ide standardna ladder DNK rezolucije 100bp).

Picture 3. Electrophoregram of ZAG96 SSR marker (after the first 16 samples, and then the other eight, goes standard DNA ladder of 100 bp resolution).

PCR amplifikacija se pokazala uspešnom što je registrovano na 2% agaroznim gelovima. Uzorci su bili sakupljeni sa 20 jedinki varijeteta ranog hrasta lužnjaka *Q. robur var. praecox* (10 sa vitalnih i 10 sa onih na kojima su registrovani simptomi sušenja) i sa 20 jedinki varijeteta kasnog hrasta lužnjaka *Q. robur var.*

tardissima (10 sa vitalnih i 10 sa onih na kojima su registrovani simptomi sušenja). Uzorkovanje je obavljeno u periodu 15.04.-15.05.2013. godine kada je bio zabeležen period listanja oba varijeteta hrasta lužnjaka.



Slika 4. Elektroforegram ZAG104 SSR markera (nakon svakih 28 uzoraka, pa 12, ide standardna ladder DNK rezolucije 100bp).

Picture 4. Electrophoregram of ZAG104 SSR marker (after every 28 samples, and afterward 12, goes standard DNA ladder of 100 bp resolution).

Prema Kampfer et al., (1998) razvijen je sistem od 32 SSR markera za *Q. robur* vrstu, kako bi se konstruisala genetska linkage mapa. Oni su dali detaljne informacije o mikrosatelitnim markerima, uključujući i bazni sastav sekvence. Za naše uzorke smo koristili prajmere za lokuse ZAG46 (290-222 bp), ZAG96 (135-194 bp) i ZAG104 (176-196 bp) (Slike 2, 3 i 4). Ovakav pristup određivanja mogućeg polimorfizma uzorkovanog hrasta će omogućiti tačniji pristup diskutovanju rezultata jer je neophodno konstruisati genetičku mapu i molekularno-taksonomski profil vrste. Sa slika sva tri elektroforegrama možemo zapaziti sigurnu uspešnu amplifikaciju ZAG96 i ZAG104 markera, dok je ZAG46 pokazao slabiji prinos iako se detaljnim posmatranjem mogu uočiti trake amplifikacije kod svih uzoraka hrasta. Za ovaj mikrosatelit je neophodno ponoviti PCR i prilagoditi protokol radi dobijanja jačeg signala i većeg prinosa reakcije. Na elektroforegramima se mogu primetiti suptilne razlike u visini amplikona. Ova preliminarna amplifikacija tri mikrosatelita mogu da ukažu na relativno srodno poreklo uzorkovanih individua, mada je neophodno proširiti analize na bar još sedam odabranih mikrosatelita i analizirati tačne dužine pojedinačnih fragmenata zajedno sa analizom određivanja sekvencnog sastava amplikona. Tada bismo dobili detaljniji uvid u populacijsku genetiku uzorkovanih jedinki i generisali DNK fingerprint ličnu kartu hrasta lužnjaka iz Morovića.

Prva strategija za molekularno genetička ispitivanja su objavljena od strane Trudić i sar. (2013). Ova strategija je predstavila prvi korak ka održivom planiranju očuvanja genofonda hrasta lužnjaka sa područja Morovića, gde je istaknut metodološki korak neophodan za adekvatan početak marker-asistirane selekcije ove vrste na području Vojvodine. Za početak je odabrano 40 pomenutih stabala koji bi trebali da se podvrgnu PCR analizi 10 mikrosatelitnih markera koji će dati osnovu za razvoj svih ostalih populaciono-genetičkih analiza koje mogu usloviti dalji razvoj svih ostalih molekularno genetičkih analiza (QTL, heterozigotnost, polimorfizam, roditeljske linije, detaljne DNK lične karte vrste i prostorna genetika, hibridizacija itd.). Čini se da je hibridizacija unutar roda *Quercus* L. ekstenzivna, a izveštaji variraju od uočavanja pojedinih hibridnih stabala do malog broja pojedinačnih hibridnih stabala unutar populacije, do populacije sa karakteristikama sitnih razmera (npr. *Q. robur* i *Q. petraea* u Hurepoix, Francuska) i introgresije velikih srazmera (npr. *Q. robur* i *Q. petraea* u Škotskoj) i u nekim slučajevima pojave hibridnih sojeva (npr. *Q. douglasii* i *Q. turbinelia* subsp. *californica* u Kaliforniji). Ovo je nateralo neke autore da preispitaju postojeći koncept formalnih vrsta u rodu i da predlože alternative. Dokazi koji podržavaju ove slučajeve hibridizacija su detaljno ispitani. Većina izveštaja o hibridima između *Quercus* vrsta bazira se samo na analizi morfoloških podataka koristeći razne univarijante, bivarijante i, još efektivnije, statistike multivarijanti, dok se drugi oblici dokaza, kao što su procena plodnosti kod tobožnjih hibrida, resinteze hibrida, karakteristika staništa tobožnjih hibrida i segregacije F2 roditeljskih tipova samo povremeno koriste. Podaci iz hemotaksonomskih istraživanja sumnjivih hibrida *Quercus*-a (uglavnom izozimi i fenolna jedinjenja) u nekim slučajevima podržavaju morfološke dokaze, ali su u nekim drugim slučajevima kontradiktorni; hemijski podaci su takođe bili promenljivi i možda povezani sa varijacijama u okruženju, što ograničava njihovu korisnost. Zaključeno je da se, pre nego što se pristupi bilo kakvoj radikalnoj reviziji roda, u kojoj su specifična ograničenja redefinisana, primeni šira aplikacija mogućih tehnika za ispitivanje hibrida, u cilju razjašnjavanja pravog stepena protoka gena između *Quercus* vrsta (Rush ton, 1993).

Buschbom et al., (2011) su analizirali protok gena prenošen polenom na veliku razdaljinu u izolovani preživeli zasad koji se sastojao od 7 individua *Quercus robur* L. bazirano na ukupnom uzorku od 177 stabala i 9 mikrosatelitskih lokusa. Oni su pokazali da doprinos protoka gena posredstvom polena na razdaljinu veću od 80 km kod ove drvenaste vrste oprašene vetrom, iznosi najmanje 35% svih uspešnih polinacija u ispitivanim izolovanim i malim zasadima hrasta na istočnoj granici distribucije vrste. Posmatrana imigracija polena oblikovala je genetičku divergentnost potomaka žira u zasadu i može da objasni uporedno visoki genetički diverzitet u postojanoj odrasloj populaciji. U zaključku, autori istraživanja su uočili da je efikasan protok gena na velike razdaljine ekstenzivan i da značajno doprinosi genetičkoj divergentnosti analiziranih grupa potomaka u intenzivno proučavanom, malom i izolovanom zasadu hrasta u St. Sibay-u istočno od Uralskih planina. Rezultati su pokazali da znatan uticaj imigracije polena na velike razdaljine sa

veoma različitih izvora polena, predstavlja značajan faktor za dugotrajni opstanak ovog preživelog zasada (B u s c h b o m et al., 2011).

ZAKLJUČAK

Aktivnosti na očuvanju genetičkih resursa hrasta lužnjaka, na području kojim gazduju JP „Vojvodinašuma“, imaju tradiciju dugu više od pola veka. Primenom dinamično-evolutivnih (*in situ*) i statičnih (*ex situ*) metoda konzervacije, izdvojen je veliki broj semenskih sastojina, odnosno, osnovane su dve semenske plantaže, vegetativnog i generativnog porekla. Semenske sastojine hrasta lužnjaka predstavljaju resurs od evropskog značaja, s obzirom da omogućavaju očuvanje prirodne genetičke varijabilnosti i široke genetičke baze, što će biti od primarnog značaja u ublažavanju negativnog uticaja klimatskih promena na ovu vrstu. Takođe, osnivanjem semenskih plantaža, sačuvan je veliki deo najvrednijeg genetičkog materijala koji je sadržan u prirodnim populacijama. Osim toga, značaj ovih objekata leži i u činjenici da se u njima proizvodi genetički kvalitetno seme, adaptirano na lokalne stanišne uslove. Testovi potomstva, iako su tek u začetku, potencijalno bi mogli da predstavljaju značajan resurs u daljoj selekciji lužnjaka. Tu se pre svega misli na implementaciju novih, sofisticiranijih merenja, koja bi omogućila prepoznavanje genotipova otpornijih na abiotičke uslove stresa (pre svega sušu) u ranoj ontogenetskoj fazi razvića. Nakon izvršenih molekularnih analiza za potvrđivanje taksonomske pripadnosti i DNK profilisanja, dobijene rezultate je moguće upotrebiti u razvoju novih sorti i selekciji genotipova iz prirodnih populacija koji pokazuju veći alelni polimorfizam.

Što se tiče daljih koraka u pravcu unapređenja očuvanja genetičkih resursa lužnjaka, kao i na celokupno oplemenjivanje vrste, u budućnosti bi trebalo nastaviti rad na selekciji genotipova sa željenim osobinama, kao i razvijanje metoda njihovog vegetativnog umnožavanja. Takođe, s obzirom na predviđanja vezano za klimatske promene, biće potrebno uraditi dodatnu selekciju stabala u postojećim plantažama, gde bi se akcenat stavio na praćenje onih grupa parametara koji upućuju na otpornost na sušu. Tu se pre svega misli na biohemijske i fiziološke parametre, funkcionalnu anatomsku građu drveta, otpornost na kavitaciju, itd. Kada je reč o metodama molekularne genetike, predlažemo sledeće mere i ciljeve:

- Neophodno je izvršiti genotipizaciju svih postojećih jedinki hrasta lužnjaka na navedenim lokalitetima, koristeći postojeće marker sisteme (mahom SSR). Ovo je neophodno radi dobijanja slike o genetičkom profilu postojećih populacija na regionalnom ekosistemskom nivou. Ovo će omogućiti dobijanje dublje genetičke slike na nivou polimorfizma, heterozigotnosti, protoka gena i populacijske genetike.
- Neophodno je izvršiti masovno (uključiti što veći broj individualnih stabala u postojećim genofondovima hrasta lužnjaka) sekvenciranje dobijenih mikrosatelitnih lokusa kako bi se utvrdio polimorfizam na nivou pojedinačnih baza unutar sekvenci. Ova dva parametra će omogućiti

dobijanje kompletne genetičke strukture nekodirajućeg dela genoma i lične karte hrasta lužnjaka sa područja kojim upravljaju JP „Vojvodinašume“. Ovo je jedan od preduslova unapređivanja sortnog i klonskog oplemenjivanja hrasta lužnjaka i tačnog determinisanja polaznog genetičkog materijala koji će ubrzati dalje priznavanje naših sorti i klonova hrasta lužnjaka na nacionalnom i međunarodnom nivou.

- Razvijati banke gena sa kodirajućeg dela genoma i njihove diferencijalne ekspresije određene pod uticajem stresa suše. Ovo je preporučljivo da se uradi za što veći broj gena za koje je ranije u međunarodnim istraživanjima utvrđeno da imaju jasnu ulogu u ekofiziologiji hrasta lužnjaka tokom uticaja stresa suše na ontogenezu biljke.
- Kreirati jasne morfometrijske, genetičke i hemotaksonomske kriterijume u oceni kvaliteta stabala hrasta lužnjaka na području kojom gazduju JP „Vojvodinašume“, kako bi se ubrzala taksonomska i oplemenjivačka praksa ove vrste.
- Kreirati eksperimente i projekte koji će raditi komparativnu genetičku, hemijsku i morfometrijsku analizu hrasta lužnjaka u prirodnim uslovima, staklenicama i u *in vitro* kulturi. Razviti protokole za unapređenje umnožavanja i proizvodnje hrasta lužnjaka u *in vitro* kulturi kako bi se dobio čisti klonski sadni materijal neophodan za testove ove vrste i buduće epigenetičke analize hrasta lužnjaka poreklom iz kulture *in vitro*. Isto tako, nakon kreiranja kolekcije hrasta lužnjaka u kulturi *in vitro*, ispitati morfometrijske i ekspresione promene na nivou individua u kulturi pod uticajem različitog intenziteta stresa suše u kulturi.
- Kreirati uslove za razvoj polazne, mapping populacije hrasta lužnjaka na teritoriji Vojvodine kako bi se pratio razvoj i nasleđivanje kvantitativnih svojstava koja su pod regulacijom više gena. Ovo je projekat koji će obezbediti opstanak ove vrste i unaprediti njenu oplemenjivačku praksu za naredne generacije.
- Fokusirati se na ispitivanje genetičke osnove različitih fenoloških faza između gorespomenutih varijeteta hrasta lužnjaka. Ovo uključuje ekspresione analize kandidat gena odgovornih za fenologiju hrasta lužnjaka.
- Uključiti marker-asistirano determinaciju mogućih hibrida između različitih vrsta hrasta. Ovo će unaprediti konzervaciju i određivanje aktuelnog stanja botaničkog diverziteta roda *Quercus* na teritoriji Vojvodine.
- Razviti „on line“ bazu podataka dobijenih rezultata iz oplemenjivačke, rasadničke i genetičke prakse za hrast lužnjak.
- Revidirati postojeće klasične oplemenjivačke prakse hrasta lužnjaka u skladu sa dobijenim preporukama ekoloških ispitivanja ekosistema, molekularne i populacione genetike i napraviti master plan očuvanja vrsta roda *Quercus*.

Zahvalnica

Ovaj rad je realizovan u okviru projekta „Unapređenje gajenja nizijskih šuma“ koji finansira Javno preduzeće „Vojvodinašume“.

Mikrosatelitna analiza uzoraka hrasta lužnjaka je urađena u okviru kratke naučne misije u Institute of Biosciences and BioResources, Division of Florence, National Research Council, Firenca, Italija, u okviru COST Action FP1202: „Strengthening conservation: a key issue for adaptation of marginal/peripheral populations of forest trees to climate change in Europe (MaP-FGR)“.

LITERATURA

- Aitken, S.N., Yeaman, S., Holliday, A.J., Wang, T., McLane, S. (2008): Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1: 95-111.
- Banković, S., Medarević, M., Pantić, D., Petrović, N. (2009): Nacionalna inventura šuma Republike Srbije – šumski fond Republike Srbije. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za šume, Beograd. str. 244.
- Batos, B., Ninić-Todorović, J., Miljković, D. (2014): Population and individual variability of the leafing phenophase of pedunculate oak in three successive years. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 109: 9-32.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., Johnston, J.S. (2003): Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany* 91: 547-557.
- Bobinac, M., Batos, B., Miljković, D. (2012): Polycyclism and phenological variability in common oak (*Quercus robur* L.). *Archives of biological sciences* 64: 97-105.
- Buschbom, J., Yanbaev, Y., Degen, B. (2011): Efficient Long-Distance Gene Flow into an Isolated Relict Oak Stand. *Journal of Heredity* 102: 464-472.
- Dubravac, T., Dekanić, S., Roth, V. (2011): Dinamika oštećenosti i struktura krošanja stabala hrasta lužnjaka u šumskim zajednicama na gredi i u nizi – rezultati motrenja na trajnim pokusnim plohama. *Šumarski list – posebni broj*: 74-89.
- Erdeši, J. (1996): Vegetativna semenska plantaža hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) – izvođački projekat. JP „Srbijašume“ Beograd, Šumsko gazdinstvo Sremska Mitrovica. Sremska Mitrovica.
- Franjić, J., Sever, K., Bogdan, S., Škvorc, Ž., Krstonošić, D., Alešković, I. (2011): Fenološka neujednačenost kao ograničavajući čimbenik uspešnog oprašivanja u klonskim sjemenskim plantažama hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). *Croatian Journal of Forest Engineering* 32: 141-156.

- Galović V., Orlović S., Zorić M., Kovačević B., Vasić S. (2014): Different phenology induced genotype diversity of *Q. robur* L. in the seed orchard in Srem provenance, Republic of Serbia. International Conference „Natural resources, green technology, and sustainable development“, Zagreb, November 26-28 2014: 133.
- Gomory, D., Yakovlev, I., Zhelev, P., Jedinâkovâ, J., Paule, L. (2001): Genetic differentiation of oak populations within the *Quercus robur/Quercus petraea* complex in Central and Eastern Europe. *Heredity* 86: 557-563.
- Isajev, V., Ivetić, V., Vukin, M. (1998): Značaj semenskih objekata Zlatara za šumarstvo Srbije. *Šumarstvo* 3: 91-102.
- Isajev, V., Ivetić, V., Vukin, M. (2003): Prirodni semenski objekti bukve u Srbiji – osnova za unapređenje proizvodnje semena i sadnica. *Šumarstvo* 1-2: 85-96.
- Isajev, V., Ivetić, V., Lučić, A., Rakonjac, Lj. (2009): Gene pool conservation and tree improvement in Serbia. *Genetika* 41: 309-327.
- Kajba, D., Katičić, I., Šumanovac, I., Žgela M. (2011): Važnost klonskih sjemenskih plantaža u sjemenarstvu i očuvanju genofonda šumskih vrsta drveća u Hrvatskoj. *Radovi Hrvatskog šumarskog instituta* 44: 37–52.
- Kampfer, S., Lexer, C., Glossl, J., Steinkellner, H. (1998): Characterization of (GA)_n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129: 183-186.
- Kapac, D. (2006): Utjecaj intenziteta sušenja, mikroreljefa i savske poplavne vode na stanje i strukturu sastojina hrasta lužnjaka u gospodarskoj jedinici „Žutica“. *Šumarski list* 9-10: 425-443.
- Kleinschmit, J.R.G., Kremer, A., Roloff, A. (1995): Sind Stieleiche und Traubeneiche zwei getrennte Arten? *AFZ/Der Wald* 26: 1453-1456.
- Koskela, J., Buck, A., Teissier du Cros, E. (2007): Climate change and forest genetic diversity: Implications for sustainable forest management in Europe. *Biodiversity International*, Rome, Italy. 111 pp.
- Mataruga, M., Isajev, V., Ilić, B., Cvjetković, B. (2010): Značaj genetičkih melioracija u sjemenskim sastojinama hrasta kitnjaka (*Quercus petraea/Matt/Liebl*) u svijetlu klimatskih promena. *Works of the Faculty of Forestry University of Sarajevo* 2: 71-86.
- Mataruga, M., Isajev, V., Orlović, S. (2013): Šumski genetički resursi. Univerzitet u Banjoj Luci Šumarski fakultet, Banja Luka. str. 397.
- Medarević, M., Banković, S., Cvetković, Đ., Abjanović, Z. (2009): Problem sušenja šuma u Gornjem Sremu. *Šumarstvo* 3-4: 61-73.
- Mikić, T. (2004). Primena selekcije u rasadničkoj proizvodnji šumskih voćkarica. *Topola* 173/174: 45-60.
- Milad, M., Schaich, H., Bürgi, M., Konold, W. (2010): Climate change and nature conservation in Central European forests: A review of consequences, concepts and challenges. *Forest Ecology and Management* 261: 829–843.
- Milovanović, J., Šijačić-Nikolić, M., Nonić, M., Radojević, U. (2012): Šumski genetički resursi u međunarodnim procesima i zakonskoj regulativi. *Šumarstvo* 3-4: 111-132.

- Orlović S., Radivojević S., Erdeši J., Obućina Z., Janjatović, G. 1999 - Seed orchards of intra-species forms as a way for maintain and increasing genetic variability of Pedunculate oak in Yugoslavia. International Conference "Recent advances on oak health in Europe", Book of abstracts. Warsaw: 31.
- Orlović, S., Erdeši, J., Radivojević, S., Obućina, Z., Janjatović, G. (2001): Semenske plantaže hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) – osnov za dalje oplemenjivanje u ravnom Sremu. Šumarstvo 1: 1-9.
- Orlović S., Klačnja B., Galić Z., Pilipović A. 2002 - Conservation of Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in Yugoslavia. DYGEN Conference "Dynamics and conservation of genetic diversity in forest ecosystems". Proceedings: 210.
- Orlović, S., Šimunovački, Đ., Đorđević, Z., Pilipović, A., Radosavljević, N. (2008): Očuvanje genofonda i proizvodnja semena hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). U: Tomović, Z., Orlović, S., Janjatović, G., Jezdić, D., Dobrojević, P., Ivanišević, P. (ed.). Monografija 250 godina šumarstva Ravnog Srema, JP Vojvodinašume: 161-168.
- Orlović, S., Stojnić, S., Pilipović, P., Pekeč, S., Mataruga, M., Cvjetković, B., Miljković, D. (2014a): Variation in leaf photosynthetic traits of wild cherry (*Prunus avium* L.) families in a nursery trial. Šumarski list 7-8: 381-386.
- Orlović, S., Drekić, M., Matović, B., Poljaković-Pajnik, L., Stevanov, M., Stojanović, D., Stojnić, S. (2014b): Šumarstvo Srbije – postizanje milenijumskih ciljeva u eri klimatskih promena i globalizacije. Glasnik Šumarskog fakulteta – Specijalno izdanje povodom naučnog skupa "Šume Srbije i održivi razvoj": 89-112.
- Rampant, P., Lesur, I., Boussardon, C., Bitton, F., Martin-Magniette, M-L., Bodenes, C., Le Provost, G., Berges, H., Fluch, S., Kremer, A., Plomion, C. (2011): Analysis of BAC end sequences in oak, a keystone forest tree species, providing insight into the composition of its genome. BMC Genomics 12: 292.
- Rushton, B.S. (1993): Natural hybridization within the genus *Quercus* L. Annals of Forest Science 50: 73-90.
- Schwarz, O. (1964): *Quercus* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (eds). Flora Europaea, vol. 1: *Lycopodiaceae* to *Platanaceae*, pp. 61-64. Cambridge University Press, Cambridge.
- StatSoft, Inc. (2013): STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com
- Steinhoff, S. (1997): Results of *Quercus* hybridization work from 1989 to 1996 at Escherode (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L.). In: Steiner, K. C. (ed.) Diversity and Adaptation in Oak Species. The Pennsylvania State University, Pennsylvania.: 156-164.
- Šijačić-Nikolić, M., Milovanović, J. (2007): Konzervacija i usmereno korišćenje šumskih genetičkih resursa. Glasnik Šumarskog fakulteta u Beogradu 95: 7-21.

- Šijačić-Nikolić, M., Milovanović, J. (2010): Konzervacija i usmereno korišćenje šumskih genetičkih resursa. Univerzitet u Beogradu Šumarski fakultet. Beograd. pp. 200.
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., Glössl, J. (1997): Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology* 6: 1189-1194.
- Thompson, D. (2007): Provenances of beech best suited for Ireland. <http://www.coford.ie/media/coford/content/publications/projectreports/cofordconnects/ccnbeechfinal.pdf>
- Tikvić, I., Zečić, Ž., Ugarković, D., Posarić, D. (2009): Oštećenost stabala i kakvoća drvnih sortimenata hrasta lužnjaka na spačvanskom području. *Šumarski list* 5-6: 237-248.
- Trudić, B., Galović, V., Orlović, S., Pap, P., Pekeč, S. (2013): A strategy for the identification of candidate gene for drought induced stress in penduculate oak (*Quercus robur* L. (*Q. Pendunculata* EHRH.)), Fagaceae. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences* 19: 338-246.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Henrissat, B. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Vidaković, M. (1996): Podizanje klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka. U: Oplemenjivanje hrasta lužnjaka u Hrvatskoj - proslav. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj: pp. 95
- Vlada RS (2004): Zakon o reproduktivnom materijalu šumskog drveća. „Službeni glasnik Republike Srbije“ br. 135/04, 8/05, 41/09. Vlada Republike Srbije, Beograd.

Summary

CONSERVATION OF PEDUNCULATE OAK (*QUERCUS ROBUR L.*) GENETIC RESOURCES AT THE TERRITORY OF PUBLIC ENTERPRISE "VOJVODINAŠUME"

Srđan Stojnić, Branislav Trudić, Vladislava Galović, Đorđe Šimunovački, Božana Đorđević, Vid Rađević, Saša Orlović

Oak forests represent one of the most valuable forests in the Republic of Serbia, especially in complex of alluvial hygrophile forest types (Banković et al., 2009). However, the management of these forests is complicated by the appearance of collapse and death of trees which is getting wider and wider. The decline of oak forest in the AP Vojvodina is a problem that has been present for more than a century (Medarević et al., 2009).

This paper describes the current activities in the conservation of genetic resources of oak, on the forest area managed by PE "Vojvodinašume". Over decades, numerous stands are selected for the conservation of genetic resources, among which the most important place, of course, take seed stands and seed orchards. In addition, the paper put to the new research focus the molecular analysis which have a goal to provide recommendations for the development of new strategies to preserve gene pool of pedunculate oak using SSR marker systems at the molecular level of deoxyribonucleic acid, giving a deeper insight into the genetic polymorphism and genetic profile of individuals that constitute the population and stands.

Table 1 shows the amount of collected acorns from the FE Sremska Mitrovica seed stands managed for conservation, in the period from 2006 to 2014. Data for FE Sombor is not shown at all, since these seed stands for years did not give any seeds, so there is even possibility of its removal from the Register.

During the establishment of generative seed orchards, attention is paid to the spatial distribution of different varieties in terms of phenology, to allow unhindered pollination between individuals. The schedule of genotypes in seed orchard is based on temporal uniformity of receptivity of female flowers and shedding of pollen, so the first part of the surface (first third) makes a variety *praecox*, then continuing to the surface with the variability *typica* (one third), while the last and largest part of area is under the type variety *tardiflora/tardissima* (Figure 1).

From the collected acorns, early progeny tests in nursery conditions, in the area of experimental Institute of Lowland Forestry and Environment in Kac, were established. The first progeny test was established in 2012, including acorn collected from the generative seed orchard. The experiment involved acorn originating from 13 genotypes. In 2013, within FE Sombor, acorns were collected in the area including MU Odžaci (GJ Branjevina, sections 8e, 9h, 14j, 15c, 15g) and MU Bački Monoštor (GJ Karapandža, sections 33i, 17b). The acorn was collected from a total of 28 plus pedunculate oak trees and separated by families. In the FE Sremska Mitrovica the acorn was collected at populational level, on 11 locations and it was mainly about the acorn originating from seed stands. In addition to the above mentioned seed objects, acorns were collected from trees in four management units, which are located in FA Višnjićevo: GJ Kućine-Naklo-Klještevica, GJ Varadin-Županja, GJ Vratična-Cer-Carevina i GJ Smogva-Grabova Greda.

Morphometric study of candidate trees for molecular genetic analysis included 20 early oak trees (var. *praecox*) and 20 trees of late and the subsequent common oak (var.

tardissima and *tardiflora*). Pelvic diameter, tree height to crown and altitude were measured for all individual trees. Figure 4 shows the comparative analysis between the vital and senescent individuals, in relation to the three mentioned morphometric parameters of the nominated 40 pedunculate oak trees.

According to Kampfer et al., (1998) they developed a system of 32 SSR markers for *Q. robur* species, in order to construct a genetic linkage map. They provided detailed information for microsatellite markers, including base composition and sequences. For our samples, we used primers for loci ZAG46 (290-222 bp), ZAG96 (135-194 bp) and ZAG104 (176-196 bp). Preliminary molecular genetic study included three selected SSR markers (Table 2), where PCR amplification proved successful, which is registered on 2% agarose gels. Samples were collected from 20 specimens of early varieties of oak *Q. robur* var. *praecox* (with 10 vital and 10 with registered symptoms of drying) and 20 individuals with late varieties of oak *Q. robur* var. *tardissima* (with 10 vital and 10 with registered symptoms of drying). Pictures from 2-4 represents electrophoregrams of those three SSR markers used in preliminary study of possible polymorphism within selected part of Morović pedunculate oak population.

By using dynamically-evolving (*in situ*) and static (*ex situ*) conservation methods, specified number of seed stands, respectively, were established in two seed orchards, of vegetative and generative origin. Pedunculate oak seed stands represents the resource of European importance, since it allows the preservation of the natural genetic variability and broad genetic base, which will be of primary importance in mitigating the negative impacts of climate change on this particular species. Also, with the establishment of seed orchards, a large portion of the most valuable genetic material contained in natural populations will be preserved.

Progeny tests, although they are still in the beginning of development, potentially could represent a significant resource in the further selection of oak. After molecular analysis aimed to confirm the taxonomic belonging and DNA profiling of oaks, the results can be used in the development of new varieties and selection of genotypes from natural populations that are showing higher allelic polymorphism.

When it comes to the methods of molecular genetics, we suggest the following measures and aims:

- It is necessary to perform genotyping of all existing pedunculate oak individuals in these localities, using existing marker systems (mainly SSR). This is necessary in order to obtain entire picture of the genetic profile of the existing population in the regional ecosystem level. This will allow us to obtain deeper insight at the level of genetic polymorphism, heterozygosity, gene flow and population genetics.
- It is necessary to carry out mass (include as many individual trees as possible from existing gene pools of pedunculate oak) sequencing of microsatellite loci in order to determine the polymorphism at the level of individual base pairs of DNA within the SSR sequences.
- To develop a bank of genes from the coding part of the genome and their differential expression under the influence of certain influence of drought stress. This is recommended to be done for a large number of genes for which the earlier international studies found to have a clear role in the ecophysiology of pedunculate oak with the clear registered impact of drought stress on the ontogenesis of plants.
- Create clear morphometric, genetic and chemotaxonomic criteria in assessing the quality of oak trees in the area which is managed by PE "Vojvodinašume" to accelerate the taxonomic and breeding practices of this species.

- *Create experiments and projects that will work in comparative genetic, chemical and morphometric analysis of penduculate oak in natural conditions, greenhouses and in vitro culture. Develop protocols to improve the reproduction and production of penduculate oak in in vitro culture in order to obtain pure clonal planting material required for these types of tests and future epigenetic analysis of penduculate oak originating from cultures in vitro. Also, after creating a collection of penduculate oak in vitro, to examine the morphometric and expression changes at the level of individuals in culture under the influence of different intensities of drought stress in culture.*
- *Create the conditions for the development of new starting, mapping oak populations in Vojvodina in order to monitor the development and inheritance of quantitative traits that are regulated by multiple genes. This is a project that will ensure the survival of this species and improve its plant breeding practices for the next generation.*
- *Focus on examining the genetic basis of different phenological phases between the above mentioned varieties of common oak. This includes expression analysis of candidate genes responsible for the phenology of penduculate oak.*
- *Include marker-assisted determination of possible hybrids between different species of oak. This will promote conservation and exact determination of the current state of the botanical diversity of the genus *Quercus* in AP Vojvodina.*
- *Develop an "on line" database of the results obtained from the breeding, nursery and genetic practices for penduculate oak.*
- *Revise the existing classical breeding practices of penduculate oak in accordance with the recommendations made by environmental studies of ecosystems, molecular and population genetics, and create a master plan for the conservation of species of the genus *Quercus*.*