Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Marina Raboteg Božiković

PROCESI MEĐUDJELOVANJA NJUŠKE TUČKA I PELUDI, ANALIZA RODITELJSTVA I KLJUČNIH GENA U REGULACIJI REPRODUKTIVNE KOMPATIBILNOSTI MASLINE (*OLEA EUROPAEA* L.)

Doktorski rad

Osijek, 2025.

Ocjena rada u tijeku!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorski rad**
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, poljoprivreda

PROCESI MEĐUDJELOVANJA NJUŠKE TUČKA I PELUDI, ANALIZA RODITELJSTVA I KLJUČNIH GENA U REGULACIJI REPRODUKTIVNE KOMPATIBILNOSTI MASLINE (*OLEA EUROPAEA* L.)

Marina Raboteg Božiković

Doktorski rad je izrađen u: Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu
Mentor/i: dr. sc. Gabriela Vuletin Selak

Kratki sažetak doktorskog rada:
Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od najznačajnijih mediteranskih voćnih vrsta. U ovom istraživanju primijenjene su fenološke, mikroskopske, genomske i transkriptomske metode s ciljem utvrđivanja samoinkompatibilnosti te međusortne kompatibilnosti sorti 'Lastovka' i 'Oblica' s različitim oprašivačima te identifikacije gena koji sudjeluju u regulaciji tih reproduktivnih procesa. Utvrđena je nelinearna povezanost između klimatskih varijabli i vremena cvjetanja, pri čemu akumulacija hladnih sati nije imala značajniji utjecaj na grupiranje sorti. Sorta 'Levantinka' izdvojena je kao najuspješniji oprašivač sorte 'Lastovka' i 'Oblica'. Roditeljski test je dodatno potvrdio međusortnu kompatibilnost sorti 'Lastovka' i 'Levantinka', ali i izraženu samoinkompatibilnost sorte 'Lastovka'. Analizom transkriptoma, izdvojeno je 19 diferencijalno eksprimiranih gena među kojima su potencijalni geni kandidati odgovorni za regulaciju reproduktivnih procesa i mehanizama samoinkompatibilnosti (*CYP83B1*-like gen).

Broj stranica: 185
Broj slika: 30
Broj tablica: 29
Broj literaturnih navoda: 246
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: *Olea europaea* L., sorta 'Lastovka', sorta 'Oblica', reproduktivni procesi, međusortna kompatibilnost, samoinkompatibilnost, mikrosatelitni biljezi, analiza roditeljstva, RNA sekvenciranje

Datum javne obrane:
Povjerenstvo za javnu obranu:
1.
2.
3.
4.

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ocjena rada u tijeku!

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: biology, agronomy

POLLEN-PISTIL INTERACTIONS, PATERNITY ASSESSMENT AND IDENTIFICATION OF THE KEY GENES INVOLVED IN REPRODUCTIVE COMPATIBILITY OF OLIVE (*OLEA EUROPAEA* L.)

Marina Raboteg Božiković

Thesis performed at: Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation
Supervisor/s: Ph. D. Gabriela Vuletin Selak
Short abstract:
The olive (*Olea europaea* L.) is one of the most important Mediterranean fruit species. In this study, phenological, microscopic, genomic and transcriptomic methods were applied to determine self-incompatibility and inter-cultivar compatibility of the cultivars 'Lastovka' and 'Oblica' with different pollinizers, as well as to identify genes involved in the regulation of these reproductive processes. A nonlinear relationship was observed between climatic variables and flowering time, with chilling accumulation having no significant effect on cultivar classification. The cultivar 'Levantinka' was identified as the most effective pollinizer for both cultivars, 'Lastovka' and 'Oblica'. Paternity analysis further confirmed the inter-cultivar compatibility between 'Lastovka' and 'Levantinka', as well as the self-incompatibility of 'Lastovka'. Transcriptome analysis revealed 19 differentially expressed genes, among which potential candidate genes were identified as being involved in the regulation of reproductive processes and self-incompatibility mechanisms (*CYP83B1*-like gene).
Number of pages: 185
Number of figures: 30
Number of tables: 29
Number of references: 246
Original in: Croatian
Key words: *Olea europaea* L., cultivar 'Oblica', cultivar 'Lastovka', reproductive processes, cross-compatibility, self-incompatibility, microsatellites, seed paternity assignment, RNA sequencing

Date of the thesis defense:
Reviewers:
1.
2.
3.
4.

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Osjena rada u tijeku!

ZAHVALA

Ocjena rada u tijeku!

SADRŽAJ:

1. UVOD ... 1

1.1. Taksonomija, filogenija, morfologija i domestikacija masline (*Olea europaea* L.) ... 2

1.2. Pregled svjetskog maslinarstva ... 3

1.3. Maslinarstvo u Hrvatskoj ... 5

1.4. Fenologija cvatnje: indukcija cvjetanja i tijek cvatnje kod masline ... 7

1.5. Morfologija generativnih organa masline (*Olea europaea* L.) ... 8

1.6. Oprašivanje i oplodnja cvjetova masline ... 11

1.7. Stanična i molekularna regulacija interakcije pelud-tučak (fiziološko-biokemijski procesi) ... 12

1.8. Gametofitski i sporofitski sustav samoinkompatibilnosti ... 14

1.8.1. Samoinkompatibilnost i međusortna kompatibilnost masline (Olea europaea L.*)* ... 16

1.9. Metode istraživanja reproduktivne kompatibilnosti u biljnoj biologiji ... 20

1.9.1. Analiza rasta peludnih mješinica i analiza uspjeha zametanja plodova ... 20

1.9.2. Molekularni DNA biljezi ... 22

1.9.2.1. Mikrosatelitni biljezi ... 23

1.9.2.2. Primjena mikrosatelitnih biljega i roditeljskog testa u istraživanju reproduktivne kompatibilnosti masline ... 24

1.9.3. Sekvenciranje nove generacije (NGS) ... 26

1.9.3.1. Upotreba NGS metoda - RNA sekvenciranja u biljnoj biologiji ... 28

1.9.3.2. Upotreba metoda analize transkriptoma u istraživanjima vrste Olea europaea L. ... 30

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 33

3. MATERIJALI I METODE ... 34

3.1. Eksperimentalni nasad maslina u Kaštel Starom ... 34

3.2. Sortiment ... 35

3.3. Praćenje fenofaze cvatnje istraživanih sorti masline i dijagram cvatnje ... 37

3.4. Analiza fenoloških i klimatskih parametara ... 40

3.4.1. Statistička analiza fenoloških i klimatskih parametara ... 40

3.5. Kontrolirana oprašivanja ... 41

3.5.1. Priprema stabala i provedba kontroliranih oprašivanja ... 41

3.5.2. Priprema cvjetova za analizu pod fluorescentnim mikroskopom ... 43

3.5.2.1. Analiza reproduktivnih procesa u cvijetu masline pod fluorescentnim mikroskopom . 43

3.6. Roditeljski test ... 44

3.6.1. Izolacija DNA iz embrija i listova ... 44

3.6.2. Genotipizacija ... 47

3.6.2.1. Detekcija mikrosatelitnih alela kapilarnom elektroforezom ... 48

3.6.2.2. Statistička analiza ... 48

Ocjena rada u tijeku!

3.7. Analiza transkriptoma tkiva tučka masline nakon samooprašivanja i stranooprašivanja 50
3.7.1. Izolacija ukupne RNA iz tkiva masline 50
3.7.2. RNA sekvenciranje 52
3.7.2.1. Priprema knjižnice za sekvenciranje 53
3.7.2.2. Sekvenciranje 55
3.7.2.3. Predobrada podataka dobivenih sekvenciranjem 57
3.7.2.4. Bioinformatička obrada podataka dobivenih sekvenciranja RNA 58
4. REZULTATI 62
4.1. Trajanje cvatnje istraživanih sorti i meteorološki uvjeti tijekom fenofaze 62
4.2. Povezanost vremena cvjetanja i klimatskih parametara 65
4.2.1. Klaster analiza (engl. K-means clustering) i analiza stabla odluke (engl. decision tree) ... 65
4.3. Reproduktivni procesi 72
4.3.1. Klijavost peludi sorti oprašivača nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije 72
4.3.2. Analiza rasta peludnih mješinica kroz vrat tučka nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije 77
4.3.3. Analiza uspjeha oplodnje nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije 82
4.4. Analiza roditeljstva pomoću mikrosatelitnih biljega 86
4.4.1. Parametri genetske varijabilnosti mikrosatelitnih biljega 86
4.4.2. Genotipizacija i roditeljski test 88
4.5. Transkriptomska analiza nakon samooprašivanja i stranooprašivanja cvjetova masline 93
4.5.1. Izolacija i kvantifikacija ukupne RNA 93
4.5.2. Kontrola kvalitete podataka dobivenih sekvenciranjem 94
4.5.3. Analiza funkcionalne anotacije gena 96
4.5.4. Analiza diferencijalne ekspresije gena 98
5. RASPRAVA 102
6. ZAKLJUČCI 118
7. LITERATURA 120
8. SAŽETAK 144
9. SUMMARY 146
10. PRILOZI 148
11. ŽIVOTOPIS 182

Ocjena rada u tijeku!

POPIS KRATICA

AFLP, polimorfizam duljine amplificiranih fragmenata (*engl*. amplified fragment length polymorphism)

AGP, arabinogalaktanski proteini (*engl*. arabinogalactan-proteins)

cDNA, komplementarna DNA sintetizirana iz zrele mRNA (*engl*. complementary DNA)

CRP, cisteinom bogati proteini (*engl*. cysteine-rich proteins)

CH, akumulacija hladnih sati (*engl*. chilling hours)

COG (*engl*. Clusters of Orthologous Groups of proteins)

CTAB–PVP, cetil trimetil amonijev bromid–polivinilpirolidon (*engl*. cetyltrimethylammonium bromide–polyvinylpyrrolidone)

CU, akumulacija jedinica hlađenja (*engl*. chilling units)

DHMZ, Državni hidrometeorološki zavod

DNA, deoksiribonukleinska kiselina (*engl*. deoxyribonucleic acid)

DPC, broj dana u godini od 1. siječnja do početka razdoblja cvatnje

DSI, homomorfni dialelni sporofitski sustav inkompatibilnosti (*engl*. diallelic SSI)

EDTA, etilendiamintetraoctena kiselina (*engl*. ethylenediaminetetraacetic acid)

EP, vjerojatnost isključenja (*engl*. exclusion probability, EP)

EST sekvence (*engl*. expressed sequence tags)

EPP, efektivno vrijeme oprašivanja (*engl*. effective pollination period)

GDH, akumulacija sati toplinskih jedinica (*engl*. growing degree hours)

GSI, gametofitski sustav inkompatibilnosti (*engl*. gametophytic self-incompatibility)

H_o, opažena heterozigotnost (*engl*. observed heterozygosity)

He, očekivana heterozigotnost (*engl*. expected heterozygosity)

I, Shannonov informacijski indeks (*engl*. Shannon's information index)

IAA, indol-3-octena kiselina (*engl*. indole-3-acetic acid)

Ocjena rada u tijeku!

LOD vrijednost, logaritam omjera vjerojatnosti (*engl*. logarithm of the likehood ratio)

log_2FC, logaritamski omjer promjene ekspresije gena (*engl*. logarithmic fold change)

mRNA, glasnička RNA (*engl*. messenger RNA)

N_a, ukupan broja alela po lokusu (*engl*. number of alleles per locus)

N_e, broj efektivnih alela po lokusu (*engl*. effective number of alleles per locus)

ncRNA, nekodirajuća RNA (*engl*. non-coding RNA)

NGS, tehnologija nove generacije sekvenciranja (*engl*. next generation sequencing)

padj, prilagođena p-vrijednost (*engl*. adjusted p-value)

PASI, polialelni sporofitski sustav samoinkompatibilnosti (*engl*. poliallelic SSI)

PCR, lančana reakcija polimerazom (*engl*. polymerase chain reaction)

PI, vrijednost vjerojatnosti identiteta (*engl*. Probability of Identity, PI)

PRK, peludna receptor-kinaza (*engl*. pollen receptor kinases)

r, Pearsonov koeficijent korelacije (engl. Pearson correlation coefficient)

RAPD, metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (*engl*. Random Amplified Polymorphic DNA)

RFLP, polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta (*engl*. Restriction Fragment Length Polymorphism)

RLK, receptorska serin-treonin kinaza (*engl*. receptor-like serine-threonine kinase)

RNA, ribonukleinska kiselina (*engl*. ribonucleic acid)

RNA-Seq, RNA sekvenciranje (*engl*. RNA sequencing)

ROS, reaktivne kisikove vrste (*engl*. reactive oxygen species, ROS)

SBS, metoda sekvenciranja sintezom (*engl*. sequence by synthesis)

SCR/SP11, S-lokus cisteinom bogati protein (*engl*. S-locus cysteine-rich protein)

SDS, natrijev dodecil-sulfat (*engl*. sodium dodecyl sulfate)

SI, mehanizam samoinkompatibilnosti (*engl*. self-incompatibility)

Ocjena rada u tijeku!

SLF/SFB, S-lokus F-box protein (*engl*. S-locus F-box protein)

SLG, S-lokus glikoprotein (*engl*. S-locus glycoprotein)

SNP, polimorfizam pojedinačnog nukleotida (*engl*. Single Nucleotid Polymorphism)

SRK, S-lokus receptor kinaza (*engl*. S-locus receptor kinase)

SSI, sporofitski sustav inkompatibilnosti (*engl*. sporophytic self-incompatibility)

SSR, mikrosatelitni biljezi ili jednostavne ponavljajuće sekvence (*engl.* simple sequence repeats, SSR)

STS biljeg (*engl*. Sequence Tagged Site)

TGS, tehnologija treće generacije sekvenciranja (*engl*. third generation sequencing)

TRIS, tris(hidroksimetil)aminometan *(engl*. tris(hydroxymethyl)aminomethane)

Ocjena rada u tijeku!

1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od ekonomski najvažnijih voćnih vrsta jer se koristi za proizvodnju ulja visoke nutritivne vrijednosti. Uzgoj masline se proširio po cijelom svijetu, ali 95 % površina prekrivenih nasadima maslina i dalje se nalazi u mediteranskom području (FAOSTAT, 2023). U Hrvatskoj se maslina uglavnom uzgaja na krškim terenima, u obalnom području i na otocima gdje predstavlja glavnu poljoprivrednu kulturu. Godišnja proizvodnja plodova masline trostruko je porasla od početka devedesetih godina do danas, što je među ostalim, posljedica prelaska s monosortnih na višesortne nasade.

Unatoč ovom značajnom porastu proizvodnje, prinosi masline i dalje su nestabilni te često niski, ponajprije zbog ograničenja povezanih s reproduktivnim procesima. Maslina se odlikuje obilnom cvatnjom, nakon koje obično slijedi slabije zametanje plodova, što u konačnici rezultira niskim prinosima (Cuevas i Polito, 2004). Uspjeh oplodnje i produktivnost maslinika uvelike ovise o izboru sorti i njihovom rasporedu, a od osobite je važnosti međusortna kompatibilnost i istodobna cvatnja (Cuevas i sur., 2009). Osim navedenih čimbenika, okolišni čimbenici poput temperature zraka, oborina i vjetra mogu znatno utjecati na tijek cvatnje, proces oprašivanja i uspjeh oplodnje. Reproduktivni procesi biljaka među najosjetljivijima su na porast temperature zraka, što u današnjim uvjetima globalnog zatopljenja često može dovesti do smanjenja prinosa.

Kako bi se razjasnili čimbenici koji određuju oplodnju i zametanje plodova, u istraživanjima se sve češće primjenjuju suvremene metode, uključujući molekularne tehnike, mikrosatelitne biljege i roditeljski test (Mookerjee i sur., 2005; Vuletin Selak i sur., 2021). Ovi pristupi omogućuju preciznu procjenu međusortne kompatibilnosti, identifikaciju najučinkovitijih oprašivača i uvid u uspjeh samooplodnje.

Ipak, jedan od najvažnijih problema u uzgoju masline je samoinkompatibilnost (SI), mehanizam kojim maslina nastoji isključiti mogućnost samooplodnje i dati prednost stranooplodnji (De Nettancourt, 1977). Kao odgovor na problem sortne SI, u mnogim istraživanjima preporučuje se sadnja kompatibilnih sorti u maslinicima koje će služiti kao izvor peludi u stranooprašivanju te dovesti do uspješne oplodnje (Cuevas i sur., 2024a). Predlažu se najuspješnije kombinacije sorti za zajedničku sadnju, ali za puno sorti nema informacija te uspjeh pojedine kombinacije može značajno ovisiti o uvjetima uzgoja. Razjašnjavanje ovog složenog mehanizma omogućeno je provedbom kontroliranih oprašivanja u poljskim uvjetima,

Ocjena rada u tijeku!

uz primjenu fenoloških, mikroskopskih, genomskih i transkriptomskih metoda istraživanja reproduktivnih procesa, koje pružaju uvid u gene potencijalno uključene u SI mehanizam.

1.1. Taksonomija, filogenija, morfologija i domestikacija masline (*Olea europaea* L.)

Maslina predstavlja jednu od ključnih poljoprivrednih kultura mediteranske regije, s dugom tradicijom uzgoja i značajnim utjecajem na kulturu i gospodarstvo tog područja. Pripada porodici Oleaceae koja obuhvaća 27 rodova i oko 750 različitih vrsta rasprostranjenih na svim kontinentima osim Antarktike (Dupin i sur., 2020, 2024). Većina predstavnika ove porodice su drvenaste vrste poput masline, jasena, jasmina, forzicije, osmantusa, kaline i jorgovana.

Rod Olea obuhvaća približno 30-40 zimzelenih vrsta grmova i stabala. Dijeli se na tri podroda: Olea, Tetrapilus i Paniculatae, pri čemu se podrod Olea dijeli na dvije sekcije: Olea i Ligustrides (Green, 2002). Sekcija Olea obuhvaća kompleks *Olea europaea*, koji uključuje 6 podvrsta temeljenih na morfološkim razlikama i geografskoj rasprostranjenosti (Rubio de Casas i sur., 2006; Besnard i sur., 2018):

- subsp. *europaea*, rasprostranjena na području Mediterana;
- subsp. *cerasiformis*, obuhvaća Madeira otočje;
- subsp. *cuspidata*, rasprostranjena u jugoistočnoj Africi i jugozapadnoj Aziji;
- subsp. *guanchica*, značajna za Kanarske otoke;
- subsp. *laperrinei*, obuhvaća područje Sahare;
- subsp. *maroccana*, rasprostranjena u Maroku.

Sve su podvrste diploidne, osim subsp. *maroccana* (heksaploidna, 6x) i subsp. *cerasiformis* (tetraploidna, 4x) koje su poliploidne (Besnard i sur., 2008). Noviji filogenomski podaci upućuju na postojanje sedme podvrste *Olea europaea* subsp. *ferruginea* za azijske populacije koje su jasno odvojene od afričke podvrste *cuspidata* (Julca i sur., 2023).

Podvrsta subsp. *europaea* obuhvaća dva botanička varijeteta: kultivirane masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) i divlje masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Divlje masline pojavljuju se u dva oblika, kao pravi oleasteri te feralni oblici, nastali iz sjemenjaka kultiviranih maslina ili križanjima između pravih oleastera i kultiviranih sorti (Angiolillo i sur. 1999; Belaj i sur., 2007). Divlje masline odlikuju se grmolikim rastom,

Ocjena rada u tijeku!

manjim listovima i plodovima te znatno nižim udjelom ulja u plodu u odnosu na kultiviranu maslinu (Green, 2002).

Maslina je višegodišnje zimzeleno kserofitsko stablo s razgranjenom okruglastom krošnjom, nepravilnim i kvrgavim deblom te vretenastim i razgranjenim korijenom. Stablo masline može doseći visinu i od 15-20 m. U uzgojnim uvjetima, visina stabala se regulira redovitom rezidbom s ciljem olakšavanja berbe i održavanja produktivnosti. Iako se kod starijih stabala korijenov sustav razvija pretežno lateralno i plitko (60-70 cm dubine), u ranijim fazama razvoja, tijekom prvih 3-4 godine, korijen primarno raste u vertikalnom smjeru, nakon čega dolazi do formiranja bočnog korijenja koje postupno preuzima dominantnu funkciju u apsorpciji vode i hranjiva (Therios, 2009). Kod mladih stabala masline kora je glatka, sivo-zelene boje, dok kod starijih stabala postupno tamni, postaje hrapava, kvrgava, naborana. Krošnja masline je asimetrična s nasuprotno raspoređenim kožnatim listovima s kratkom peteljkom. Lice lista je glatko, tamno zelene boje, a naličje je dlakavo, srebrno-sive boje. Listovi masline završavaju svoj rast približno nakon dva tjedna od formiranja, a zadržavaju se na stablu od 2-3 godine (Martin i Sibbett, 2005).

Smatra se da je domestikacija masline započela prije otprilike šest tisuća godina na istočnoj obali Sredozemnog mora. Tijekom povijesti, maslinu su prema zapadu širili Feničani, a kasnije Grci i Rimljani diljem mediteranskog bazena. Molekularna istraživanja ukazala su na postojanje triju glavnih genofondova na Mediteranu: istočni (Q1), središnji (Q2) i zapadni (Q3). Navedeni genofondovi predstavljaju ključna područja podrijetla i diverzifikacije masline, uz značajan utjecaj lokalnih populacija oleastera koje su, putem introgresije, pridonijele prijenosu genetskog materijala iz divljih u kultivirane oblike (Breton i sur., 2008; Díez i sur., 2015; Besnard i sur., 2018).

1.2. Pregled svjetskog maslinarstva

Tijekom proteklih desetljeća uzgoj masline proširio se izvan Mediteranskog područja i danas zauzima važno mjesto u svjetskoj poljoprivrednoj proizvodnji. Prema najnovijim podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (*engl*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) ukupna svjetska površina pod maslinicima u 2023. godini u više od 40 država iznosila je približno 11,87 milijuna hektara, pri čemu se preko 90 % površine i dalje nalazi u zemljama mediteranskog bazena. Najveću površinu pod maslinicima ima Španjolska (oko 2.650,000 ha), na drugom mjestu je Tunis s 1.930,000 ha, a zatim slijede Maroko (1.210,000 ha) i Italija (1.080,000 ha). Ukupna svjetska proizvodnja plodova masline

Ocjena rada u tijeku!

u 2023. godini iznosila je oko 20,37 milijuna tona, dok je ukupna proizvodnja maslinova ulja dosegla približno 2,65 milijuna tona. U istoj godini, Španjolska kao najveći svjetski proizvođač maslinova ulja, proizvela je 845,000 tona maslinova ulja (33 % svjetske proizvodnje) i približno 5,1 milijun tona maslina (25 % svjetske proizvodnje) na površini od 2,65 milijuna hektara. Od ostalih vodećih proizvođača u 2023. godini, ističe se Italija s proizvedenih 328,500 tona maslinovog ulja (12,8 % svjetske proizvodnje), Portugal s 160,900 tona (6,3 %), Turska s 215,000 tona (8,4 %) te Grčka s 175,000 tona (6,8 %). Navedene zemlje čine približno 75 % ukupne svjetske proizvodnje maslinova ulja, što potvrđuje dominantnu ulogu mediteranskog bazena u globalnoj proizvodnji ove kulture. Tunis i Maroko istaknule su se kao zemlje s izrazito velikim površinama pod maslinicima, no prema podacima iz 2023. godine, ostvareni prinosi po hektaru u ovim zemljama znatno su niži u usporedbi s nekim drugim zemljama proizvođačima, što je zasigurno posljedica tradicionalnog ekstenzivnog uzgoja, ograničene upotrebe navodnjavanja i značajnog utjecaja klimatskih uvjeta. U svjetsku proizvodnju maslinovih ulja uključene su i brojne druge zemlje. Unutar Mediteranskog bazena ističu se Alžir, Egipat, Sirija, Libanon i Palestina, dok izvan mediteranske regije značajniji proizvođači uključuju Argentinu, SAD, Čile, Peru i Australiju. Manji proizvođači nalaze se i u brojnim drugim zemljama Južne Amerike i Bliskog Istoka, uključujući Uzbekistan, Saudijsku Arabiju, Kuvajt, Kinu, Irak, Iran, Afganistan i druge.

Osim gospodarskog značaja u svjetskoj proizvodnji, maslina ima izrazitu prehrambenu i zdravstvenu vrijednost. Od plodova masline dobivaju se dva glavna prehrambena proizvoda: stolne masline i maslinovo ulje. Iako maslinovo ulje dominira u ukupnoj proizvodnji i potrošnji, stolne masline također predstavljaju važan segment maslinarske industrije. Važnost maslinarstva proizlazi prvenstveno iz proizvodnje maslinova ulja, koje predstavlja glavni izvor nezasićene masne oleinske kiseline i antioksidansa te je ključan sastojak mediteranske prehrane. Nezasićene masne kiseline od osobite su važnosti zbog uloge u očuvanju staničnih membrana, regulaciji metabolizma lipida i smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti. Zahvaljujući prethodno navedenom i visokom sadržaju bioaktivnih spojeva, poput fenola, tokoferola, skvalena i sterola te izraženim nutritivnim i zdravstvenim koristima (Tresserra-Rimbau i sur., 2017), potrošnja ekstra djevičanskog maslinova ulja (*engl*. Extra Virgin Olive Oil, EVOO) u stalnom je porastu i u zemljama koje se ne ističu vlastitom proizvodnjom maslina.

Ocjena rada u tijeku!

1.3. Maslinarstvo u Hrvatskoj

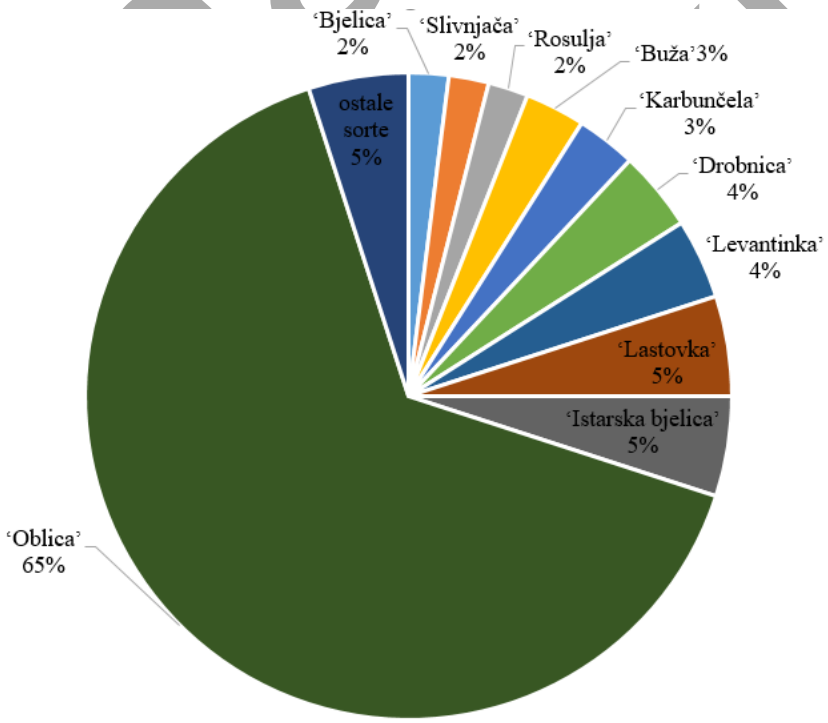
Hrvatska ima dugu maslinarsku tradiciju te se maslina (*Olea europaea* L.) uzgaja i više od 2000 godina (Miljković, 1991). Najveći razvoj maslinarstva zabilježen je krajem osamnaestoga stoljeća, kada se procjenjuje da je na području Hrvatske bilo oko 30 milijuna stabala maslina, a prosječna godišnja proizvodnja maslinova ulja iznosila je između 20-30 tisuća tona (Škarica i sur., 1996). U drugoj polovici devetnaestoga stoljeća, započinje postupni pad maslinarstva, prvenstveno uslijed promjene agrarno-gospodarskih uvjeta, osobito nakon pojave filoksere koja je poharala vinograde u Italiji, Francuskoj i Španjolskoj (Ozimec i sur., 2015), što je uzrokovalo preorijentaciju poljoprivrede prema vinogradarstvu i na hrvatskim prostorima (Kovačević i Perica, 1994). Daljnjem padu maslinarstva pridonijelo je širenje filoksere na naše prostore, kao i snažno iseljavanje stanovništva iz Dalmacije u prekooceanske zemlje, što je dovelo do napuštanja poljoprivrednih površina, uključujući i maslinike. Značajni suvremeni zamah u obnovi maslinarstva u Hrvatskoj zabilježen je tijekom 1980.-tih godina kroz projekt Programa Ujedinjenih naroda za razvoj i Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (UNDP/FAO), usmjeren na prijenos znanja i suvremenih tehnologija u maslinarstvu. Od tada pa sve do nekoliko posljednjih godina, maslinarstvo u Hrvatskoj bilježi kontinuiran razvoj, obilježen obnovom zapuštenih maslinika, podizanjem novih nasada, sve većom primjenom suvremenih agrotehničkih mjera te širenjem uzgoja kako autohtonih, tako i introduciranih sorti masline. Prema podacima iz 2023. godine, ukupna površina pod maslinicima u Hrvatskoj iznosila je 20.790 ha, s prosječnim prinosom od 1.435,8 kg/ha, pri čemu je ostvarena ukupna proizvodnja od 29,850 tona (FAOSTAT, 2023).

Ulaskom u Europsku Uniju, Hrvatska je postala dio zajednice koja čini 70 do 75 % svjetske proizvodnje maslinovog ulja, čime su domaći proizvođači stekli pristup mehanizmima potpore i sustavima kontrole kvalitete koji podupiru standardizaciju proizvodnje i zaštitu autentičnosti proizvoda. Sve veći broj proizvođača orijentira se na proizvodnju visokokvalitetnih ekstra djevičanskih maslinovih ulja, temeljenih na autohtnonim sortama, unutar sustava zaštićene oznake izvornosti (*engl*. Protected Designation of Origin; PDO).

Geografska podjela maslinarskih područja na južnu, srednju i sjevernu Dalmaciju, kvarnerske otoke, Istru i unutrašnjost Dalmacije (Strikić i sur., 2012), u velikoj je mjeri određena specifičnim mikroklimatskim uvjetima pojedinih regija, što se odražava i u sortnom sastavu, pri čemu su neke sorte vezane uz pojedina uža područja, dok su druge, poput sorte 'Oblica', rasprostranjene u gotovo svim regijama uzgoja.

Ocjena rada u tijeku!

Hrvatska nacionalna sortna lista uključuje 28 sorti masline, od kojih je 16 sorti autohtnog podrijetla, što čini 57,14 % ukupne proizvodnje u rasadnicima (HAPIH, 2021). Procjenjuje se da se na području Hrvatske ukupno uzgaja između 40 i 60 različitih sorti (Klepo i sur., 2024). Među svim sortama u svim uzgojnim područjima, najraširenija je sorta 'Oblica', koja zauzima više od 65 % ukupne proizvodnje maslina u zemlji (Slika 1). U Dalmaciji prevladavaju sorte s izraženim gospodarskim značajem: 'Oblica', 'Lastovka', 'Levantinka', 'Drobnica' i 'Bjelica'. Sorta 'Levantinka' glavna je sorta otoka Šolte, dok se sorta 'Drobnica' uglavnom uzgaja na otoku Korčuli. Za južnu Dalmaciju značajne su i sorte 'Grozdača', 'Dužica', 'Mezanica', 'Uljarica', 'Želudarica', 'Kosmača' i niz drugih sorti. Za područje južne Dalmacije karakteristične su i sorte 'Karbunčela', 'Krvavica', 'Puljka' i 'Oštrica'. U području Kvarnerskih otoka u uzgoju su i sorte 'Simjaca', 'Plomika' te 'Istarska bjelica'. U području Istre uvelike je zastupljena sorta 'Istarska bjelica', a uz nju i sorte 'Buža', 'Rošinjola' te 'Črnica' (Strikić i sur., 2012). Od introduciranih sorti, zastupljene su sorte 'Pendolino', 'Frantoio', 'Picholine', 'Santa Catarina', 'Ascolana tenera', 'Cipressino', 'Moraiolo', 'Maurino', 'Cucco', 'Itrana' i mnoge druge, dok je 'Leccino' najzastupljenija talijanska introducirana sorta.



Slika 1. Sortna struktura maslinika u Republici Hrvatskoj.

Površine pod maslinicima kontinuirano rastu, a godišnja prosječna proizvodnja maslina povećana je s oko 16.000 tona početkom devedesetih godina na približno 50.000 tona u posljednjem desetljeću. Dizajn maslinika također se značajno promijenio, što podrazumijeva

prijelaz s tradicionalnih monosortnih maslinika na višesortne maslinike. Nadalje, uvođenje stranih, introduciranih sorti u naša uzgojna područja bez znanja o njihovoj reproduktivnoj kompatibilnosti, može negativno utjecati na uspjeh zametanja plodova.

Jedan od najznačajnijih problema hrvatskog maslinarstva, koji izravno utječe na prinos, jest reproduktivna (ne)kompatibilnost između različitih sorti. Stoga je, prilikom uvođenja novih sorti u nova uzgojna područja, nužno provesti analize njihove kompatibilnosti, uz istovremeno praćenje njihove fenologije cvatnje, kako bi se osigurala stabilna rodnost i redoviti prinosi. Osim toga, razlike u vremenu cvatnje između sorti prisutnih u nasadu mogu dodatno ograničiti mogućnost međusobne oplodnje. Razumijevanje fenoloških svojstava i reproduktivne biologije ključno je za učinkovit izbor oprašivača i planiranje prostornog rasporeda u višesortnim maslinicima.

1.4. Fenologija cvatnje: indukcija cvjetanja i tijek cvatnje kod masline

Cvatnja predstavlja jednu od ključnih fenoloških faza u razvoju masline, jer u značajnoj mjeri određuje konačan prinos. Proces indukcije i diferencijacije cvjetnih pupova kod masline odvija se kroz dva uzastopna razdoblja. Tijekom proljeća i ljeta, dolazi do inicijalne stimulacije razvoja cvjetnih pupova kojom se inhibira njihova diferencijacija u lisne pupove. U drugom, jesensko-zimskom razdoblju, pod povoljnim okolišnim uvjetima, „kandidacijski“ pupovi ponovno se aktiviraju te nastavljaju diferencijaciju u cvjetne strukture (Lavee, 1996; Fabbri i Benelli, 2000). Na Slici 2 prikazane su faze razvoja cvijeta masline, od diferencijacije pupova do otvaranja cvjetova i oslobađanja peludi.

Slika 2. Razvoj cvijeta masline (preuzeto i prilagođeno prema Alagna i sur., 2016).

Tijekom razdoblja cvatnje masline, razlikujemo početak cvatnje, punu cvatnju i kraj cvatnje (Barranco i sur., 1994). U mediteranskim uvjetima, cvatnja masline obično se odvija u

Ocjena rada u tijeku!

svibnju i početkom lipnja, s trajanjem otprilike dva tjedna. Istovremeno cvjetanje različitih sorti glavni je preduvjet za njihovo uspješno međusobno oprašivanje (Cuevas i sur., 2009; Vuletin Selak i sur., 2021).

Na fenološki razvoj masline uvelike utječu klimatski parametri, među kojima su najznačajniji temperatura zraka, količina oborina, relativna vlažnost zraka, ali i topografske značajke nasada (Galán i sur., 2005; Oteros i sur., 2013). Uz klimatske uvjete, značajnu ulogu u fenološkom razvoju masline ima i genotip biljke.

Početak cvatnje masline i duljina trajanja cvatnje ovise o temperaturnim uvjetima u razdoblju koje joj prethodi (Galán i sur., 2005). Indukcija cvjetnih pupova odvija se tijekom ljetnih mjeseci prethodne vegetacijske sezone, dok je za prekid zimskog mirovanja pupova nužno razdoblje dulje izloženosti niskim temperatura (< 7,2 °C) (*engl*. Chilling Units, CU) (Orlandi i sur., 2010), nakon čega se akumulacijom viših temperatura (*engl*. Heat Requirements) (> 12,5 °C) potiče daljnji razvoj od prekida mirovanja do otvaranja cvjetova pri čemu više temperature potiču raniju cvatnju (Rallo i Martin, 1911). Zbog složenosti fenološkog razvoja masline, razvijeno je više različitih modela koji omogućuju procjenu potrebne akumulacije CU (kao što su *engl*. Chilling Hours model, Utah model, Dynamic model i dr.) te toplinskih jedinica (kao što su *engl*. Growing Degree Hours, GDH; Growing degree days, GDD) i uzimaju u obzir različite temperaturne pragove, trajanje akumulacije, genetsku specifičnost sorti te okolišnu varijabilnost (Richardson i sur., 1974; Weinberger, 1950; Anderson i sur., 1992; De Melo-Abreu, 2004).

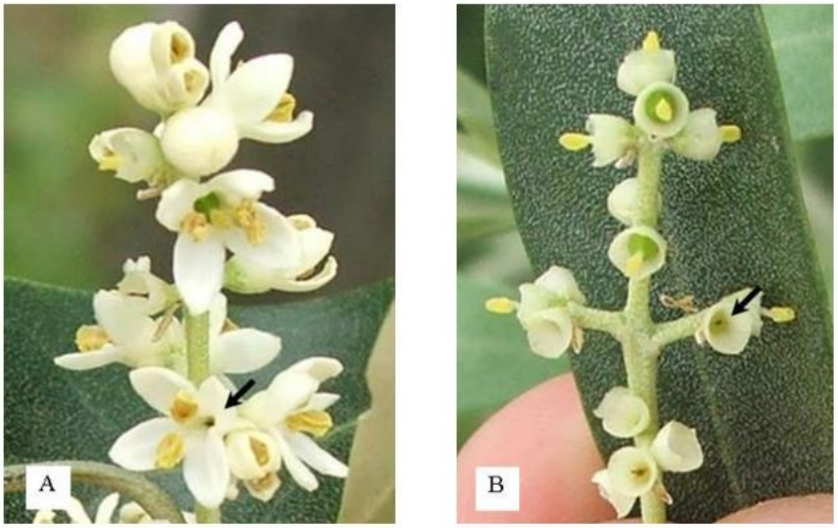
U uvjetima klimatskih promjena i globalnog zatopljenja, izraženi trendovi porasta temperatura i smanjenja količine oborine u mediteranskom području dovode do pomaka fenoloških faza, osobito u pogledu vremena početka i trajanja cvatnje. Osim toga, toplije zime mogu negativno utjecati na proces indukcije cvjetnih pupova, povišene temperature u proljeće mogu smanjiti vijabilnost peludnih zrnaca i tučka, dok visoke ljetne temperature mogu nepovoljno djelovati na diobu stanica tijekom razvoja ploda, što se može odraziti na akumulaciju i kvalitetu ulja (Ben-Ari i sur., 2021; Fraga i sur., 2021).

1.5. Morfologija generativnih organa masline (*Olea europaea* L.)

Cvatovi masline u obliku metlice razvijaju se u pazušcima listova na jednogodišnjim izbojcima. Duljina cvata varira ovisno o sorti te se kreće između 3 i 8 cm. Cvat masline obično sadrži između 15 i 30 cvjetova, također ovisno sorti i uvjetima uzgoja. U ranijim istraživanjima

Ocjena rada u tijeku!

sorte su prema broju cvjetova podijeljene u cvatu u tri skupine: s malim (10 - 14 cvjetova), srednje velikim (15 - 18 cvjetova) i velikim cvatovima (19 - 23 cvijeta) (Lavee i sur., 2002; Vuletin Selak i sur., 2012). Cvjetovi masline mogu biti dvospolni (hermafroditni ili potpuni) i funkcionalno muški (sterilni) cvjetovi kojih su plodnica i tučak nepotpuno razvijeni ili nedostaju (Slika 3). Dvospolni cvijet masline građen je od čaške s četiri srasla zelena lapa, vjenčića koji čine četiri bijele latice srasle pri dnu, dva nasuprotna prašnika s velikim prašnicama, tučka s izraženom velikom njuškom, kratkim vratom (prosječne duljine 0,4 mm) i nadrasle plodnice (prosječne duljine 3,3 mm) od dva plodna lista od kojih svaki ima dva sjemena zametka (Therios, 2009).



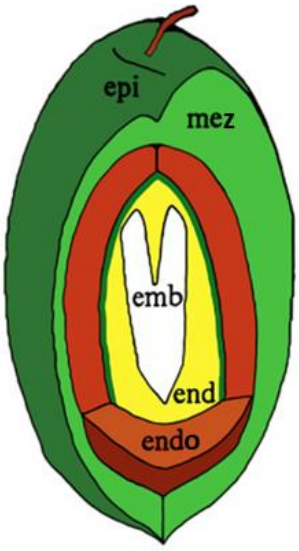
Slika 3. Cvat masline s hermafroditnim i sterilnim cvjetovima. A) Cvjetovi su prikazani s laticama; B) Cvjetovima su odstranjene latice radi boljeg prikaza. Strelicama su označeni sterilni cvjetovi na obje slike (preuzeto iz Seifi i sur. 2015).

Formiranje sterilnih cvjetova kod masline rezultat je složene integracije genetskih, okolišnih i fizioloških čimbenika. Njihov broj značajno varira ovisno o godini, sorti, pojedinačnim stablima, izbojima i unutar samih cvatova (Lavee, 1996; Fabbri i sur., 2004; Seifi i sur., 2015). Također, povećana učestalost sterilnih cvjetova često se bilježi u sušnim razdobljima te pri nedostatku hranjiva (Rosati i sur., 2011). Položaj cvijeta u cvatu ima važnu ulogu u njegovoj diferencijaciji, pri čemu se potpuni cvjetovi pretežno razvijaju na vrhovima cvatova ili njihovim primarnim pedicelima, dok su sterilni cvjetovi češće prisutni na lateralnim pedicelima (Cuevas i Polito, 2004; Seifi i sur., 2008). Takva raspodjela odražava kompeticiju za ograničene resurse unutar cvata, cvjetovi na povoljnijim pozicijama, s boljom opskrbom hranjivima i asimilatima, imaju veću vjerojatnost za potpuni morfološki i funkcionalni razvoj.

Ocjenjivanje u tijeku!

Prema podacima Vuletin Selak i sur. (2012), udio sterilnih cvjetova u cvatu kretao se u rasponu od 2,6 % kod sorte 'Leccino' u 2006. godini do 66 % kod sorte 'Oblica' u 2009. godini, ovisno o sorti, godini i lokaciji uzgoja. Unatoč morfološkim razlikama između sterilnih i hermafroditnih cvjetova, prašnici u obje vrste cvjetova proizvode sličan broj peludnih zrnaca, slične veličine, vijabilnosti i sposobnosti oplodnje (Cuevas i Polito, 2004). Međutim, zbog nedostatka tučka, sterilni cvjetovi nemaju sposobnost formiranja ploda te služe kao izvor peludi u oprašivanju drugih hermafroditnih cvjetova.

Nakon uspješnog oprašivanja i oplodnje iz hermafroditnog cvijeta masline razvija se plod. Plod masline je koštunica, okruglastog do ovalnog oblika. Građena je od vanjskog epikarpa (pokožica), mesnatog mezokarpa koji sadrži ulje (22 %), vodu (50 %), proteine (1,6 %), ugljikohidrate (19,1 %), celulozu (5,8 %) te minerale (1,5 %) i unutarnjeg endokarpa. Unutar endokarpa smješteno je sjeme, koje je obavijeno sjemenom ovojnicom te sadrži endosperm i embrij (Slika 4). U ranim fazama razvoja plod je zelene boje, dok tijekom dozrijevanja mijenja boju sve do tamnoljubičaste ili crne. Kod pojedinih sorti, plod može ostati zelen i u fazi potpune zrelosti (Therios, 2009).



Slika 4. Shematski prikaz ploda masline u fazi potpune zrelosti: epikarp (epi), mezokarp (mez), endokarp (endo), endosperm (end) i embrij (emb) (preuzeto i prilagođeno prema D'Angeli i sur., 2012).

Ocjena rada u tijeku

1.6. Oprašivanje i oplodnja cvjetova masline

Maslina je anemofilna vrsta kod koje se oprašivanje odvija prvenstveno pomoću vjetra, iako njeni cvjetovi imaju uočljiv bijeli vjenčić i otpuštaju ugodan miris kojim privlače insekte, ponajprije pčele. U godini visoke rodnosti (*engl*. tzv. ON godina) odraslo stablo masline može proizvesti i više od 500 000 cvjetova te oko 50 milijardi peludnih zrnaca koji bi potencijalno mogli izvršiti oplodnju (Cuevas i Polito, 2004; Rojas-Gómez i sur., 2023). Međutim, samo kod malog broja, svega od 1 do 2 % dolazi do zametanja plodova (Martin, 1990). Peludna zrnca masline mogu vjetrom prijeći i do 12 km, no istraživanja su pokazala da je efektivna udaljenost koja bi mogla rezultirati oplodnjom različitih sorti između 30-40 m (Fabbri i sur., 2004), dok su Cuevas i Pinillos (2009) utvrdili da je uspješno oprašivanje moguće na udaljenostima i do 250 m.

Peludna zrnca masline eliptičnog su oblika, a njihova vanjska ovojnica (egzina) sadrži tri uzdužne brazde koje dijele površinu peludnog zrnca na tri jednaka dijela. Duljina peludnih zrnaca iznosi između 23,42 µm-23,97 µm, dok je širina u rasponu od 17,54 µm-17,78 µm (Lanza i sur., 1996). Cjelokupan proces od oprašivanja do oplodnje reguliran je interakcijom pelud-njuška tučka, odnsono procesima koji upravljaju rastom peludnih mješinica. Kada pelud stigne na prijemčivu njušku tučka, dolazi do njenog prihvata i hidratacije zahvaljujući višestaničnim papilarnim stanicama sa sekretom kojima je prekrivena njuška tučka, nakon čega peludna zrnca proklijaju, tvoreći peludne mješinice koje rastu kroz sporofitna tkiva tučka koristeći vlastite energetske rezerve u početku (Herrero, 1992). Peludne mješinice prolaze kroz prijenosno tkivo u vratu tučka (*engl*. transmitting tissue) i kroz otvor, mikropilu, dolaze do embrionalne vreće. Jedna spermalna stanica spaja se s jajnom stanicom tvoreći diploidu zigotu, koja se dalje dijeli i razvija u zametak, dok se druga spermalna stanica spaja s dvjema polarnim jezgrama tvoreći triploidni sekundarni endosperm. Prijenosno tkivo u vratu tučka osigurava potrebne hranjive tvari i metaboličke prekursore koji omogućuju kontinuiran i pravilan rast peludnih mješinica te ima važnu ulogu u prianjanju, usmjeravanju i signalizaciji peludnih mješinica.

Uspjeh zametanja plodova ovisi o nizu reproduktivnih procesa od kojih su neki prethodno spomenuti u tekstu. Kako bi došlo do uspješne oplodnje, pelud mora stići na njušku tučka dok je ona još prijemčiva i može podržati klijanje peludi. Daljnji rast i razvoj peludnih mješinica, ovisi i o genotipu primatelja peludi i donora peludi. Rast peludnih mješinica kroz vrat tučka mora se odviti u vremenu unutar kojeg je očuvana vijabilnost sjemenog zametka. Iz

Ocjena rada u tijeku!

navedenih komponenti koje određuju uspjeh zametanja plodova - (i) prijemčivost njuške tučka, (ii) brzina rasta peludnih mješinica, (iii) vijabilnost sjemenih zametaka - može se izračunati efektivno vrijeme oprašivanja (*engl*. effective pollination period, EPP), razdoblje tijekom kojeg oprašivanje može rezultirati zametanjem plodova (Vuletin Selak i sur., 2014a; Riella i sur., 2022). U različitim istraživanjima utvrđeno je da EPP može varirati između 3 i 12 dana (Cuevas i sur., 2009; Vuletin Selak i sur., 2014a), ovisno o godini i sorti.

1.7. Stanična i molekularna regulacija interakcije pelud-tučak (fiziološko-biokemijski procesi)

Prihvaćanje kompatibilne peludi i sprječavanje klijanja vlastite peludi rezultat su složenih molekularnih interakcija između peludnog zrnca, koje predstavlja muški gametofit, i tučka kao ženskog reproduktivnog organa biljke. Maslina ima peludna zrnca bogata pričuvnim tvarima, koja lako klijaju u *in vitro* uvjetima i tijekom duljeg vremenskog razdoblja zadržavaju sposobnost klijanja. S druge strane, tučak posjeduje vlažni tip njuške prekrivene ekstracelularnim sekretom, čvrst uspravni vrat i kontinuitet između subpapilarnog tkiva njuške tučka i prijenosnog tkiva u vratu tučka (Serrano i sur., 2008). Peludna zrnca mijenjaju svoj metabolizam iz autotrofnog stanja na njušci tučka u potpuno heterotrofnu fazu, pri čemu ovise o rezervama ugljikohidrata u vratu tučka (Herrero i Arbeloa, 1989). Kada je klijanje peludi masline podržano, peludne mješinice rastu kroz prijenosno tkivo prema sjemenim zametcima kako bi izvršile oplodnju.

Tijekom inicijalnog prianjanja dolazi do stvaranja tzv. „peludnog stopala“, strukture koja nastaje međudjelovanjem lipida i proteina iz peludne ovojnice i stanica njuške tučka. Ta struktura ne samo da posreduje u prianjanju peludi na površinu njuške tučka, već služi i kao kanal za prijenos vode i hranjivih tvari u peludno zrnce te za razmjenu signalnih molekula između peludi i tučka. Istraživanja su pokazala da komponente staničnih stijenki u tučku sudjeluju u prijemčivosti, međustaničnom prepoznavanju, opskrbi hranjivim tvarima i regulaciji rasta peludnih mješinica. Biokemijski i genetski dokazi ukazuju na to da su proteini izlučeni iz tkiva tučka ključni za rast peludne mješinice i kemotropno usmjeravanje koje potiču sinergidne stanice sjemenih zametaka (Higashiyama, 2010; Kumar i McClure, 2010).

Tijekom kompatibilne interakcije pelud-tučak, razina reaktivnih kisikovih vrsta (*engl*. reactive oxygen species, ROS) na njušci tučka se smanjuje, što omogućuje učinkovitu hidrataciju peludi i inicijaciju rasta peludne mješinice kroz otvor egzine (Wang i sur., 2010).

Ocjena rada u tijeku!

Nakon hidratacije, važnu ulogu ima signalni protein LAT52, jedan od cisteinom bogatih proteina (*engl*. cysteine-rich peptide, CRP), koji se veže na LePRK receptor kinazu te potiče klijanje peludi i polarizirani rast peludne mješinice (Tang i sur., 2002; Higashiyama, 2010). Apikalni rast peludne mješinice reguliran je gradijentom kalcijevih iona (Ca^{2+}) koji koordinira egzocitozu vezikula, dinamiku aktinskog citoskeleta i modifikaciju stanične stijenke. Valdivia i sur. (2009) otkrili su da ekspanzin iz peludi i vrata tučka potiče probijanje i rast peludne mješinice kroz prijenosno tkivo u vratu.

Prijenosno tkivo u vratu tučka podržava rast peludnih mješinica zahvaljujući prisutnosti glikoproteina, polisaharida, glikolipida i arabinogalaktanskih proteina (AGP) (Pereira i sur., 2015). Arabinogalaktanski proteini, poput AGP6 i AGP11 imaju važnu ulogu u rastu peludnih mješinica, budući da reguliraju ekspresiju gena povezanih s Ca^{2+} signalizacijom te organizaciju komponenata stanične stijenke poput celuloze, pektina i kaloze, koje su nužne za održavanje strukturalne stabilnosti i funkcionalnosti peludnih mješinica (Costa i sur., 2013). Kod masline, prostorna i vremenska distribucija pektina i AGP pridonosi prepoznavanju peludi i hidrataciji (Suárez i sur., 2013). Kod modelne biljke *Arabidopsis thaliana*, regulator rasta peludnih mješinica je i γ-aminomaslačna kiselina (GABA), čija uloga uključuje regulaciju smjera i brzine rasta putem modulacije Ca^{2+} kanala na plazmatskoj membrani. Peludne mješinice usmjeravaju se nizom signala, uključujući ione poput K^+, Cl^- i Ca^{2+}, glikoproteine, ROS, dušikov (II) oksid (NO), peptide i druge složene signalne mreže koje još nisu u potpunosti razjašnjene (Lopes i sur., 2019).

U završnoj fazi rasta, sinergidne stanice luče peptidne atraktante, među kojima su najpoznatiji LURE peptidi koji usmjeravaju peludnu mješinicu prema mikropili (Takeuchi i Higashiyama, 2016). LURE peptidi se vežu na peludne-receptorske kinaze PRK (*engl*. pollen receptor kinases) na površini peludne mješinice, a njihovo djelovanje može biti pojačano putem AMOR glikana.

Oplođeni sjemeni zametak šalje signal preostalim peludnim mješinicama kako bi se spriječila višestruka oplodnja. Osim što sudjeluje u adheziji peludi i redukciji ROS-a, dušikov (II) oksid u kasnijim fazama djeluje kao negativni kemotropni signal, sprječavajući usmjerenje peludnih mješinica prema već oplođenom sjemenom zametku. Genetske analize upućuju na to da su takvi procesi pod kontrolom receptor kinaza, uključujući FERONIA (FER), HERCULES1 (HERK1) i ANJEA (ANJ) receptor kinaze (Robichaux i Wallace, 2021). FERONIA djeluje kao senzor peludne mješinice u sinergidnim stanicama, regulirajući njen rast,

Ocjena rada u tijeku!

prsnuće i oslobađanje spermalnih stanica. S njom su povezani receptori ANXUR1 (ANX1) i ANXUR2 (ANX2) koji održavaju integritet peludnih mješinica sve do dolaska do sjemenog zametka (Boisson-Dernier i sur., 2009). Prekomjerna ekspresija ANXUR receptorskih kinaza dovodi do pojačane egzocitoze, što rezultira akumulacijom komponenti stanične stijenke u izvanstaničnom matriksu te na taj način dolazi do narušavanja homeostaze apikalnog rasta i zaustavljanja elongacije peludne mješinice.

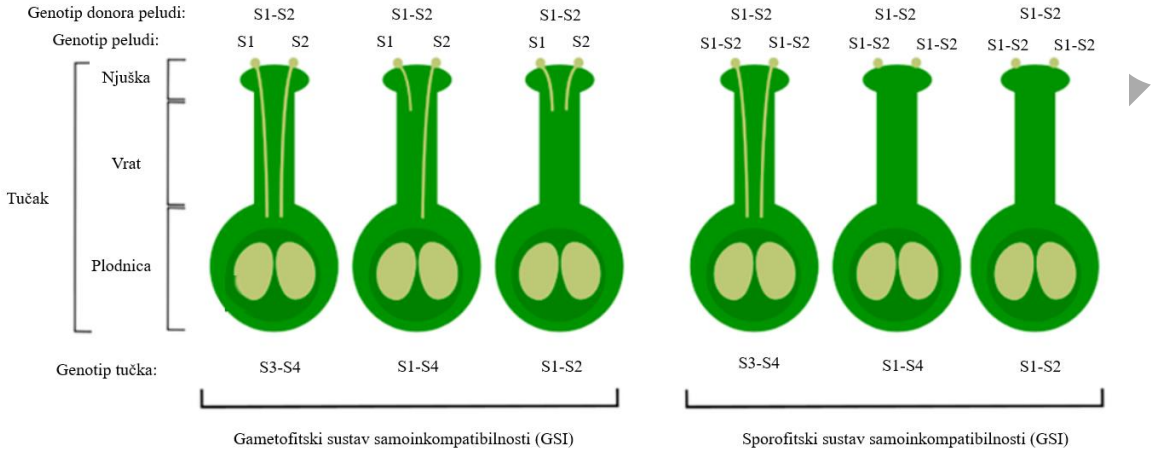
Nadalje, CRP-ovi zbog svoje specifičnosti predstavljaju skupinu visokopolimorfnih signalnih peptida visoke raznolikosti i brzog evolucijskog razvoja, zbog čega se smatra da imaju važnu ulogu u mehanizmima reproduktivne izolacije i specijacije. Unutar te skupine, određeni „reproduktivni CRP proteini“, poput DEFL (*engl.* Defensin-like), ključni su za prsnuće peludne mješinice, ali istovremeno pokazuju antifungalno djelovanje. S druge strane, RALF (*engl.* Rapid Alkalinization Factor) peptidi sudjeluju u očuvanju integriteta stanične stijenke peludne mješinice te kontroli njezina prsnuća, što je ključno za oslobađanje spermalnih stanica i ostvarenje oplodnje (Zhou i Dresselhaus, 2018).

1.8. Gametofitski i sporofitski sustav samoinkompatibilnosti

Većina kritosjemenjača razvija hermafroditne cvjetove u kojima se tučak i prašnici nalaze u neposrednoj blizini unutar istoga cvijeta, međutim, i unatoč tome u mnogim slučajevima ne dolazi do razvoja ploda nakon samooplodnje. Mehanizam samoinkompatibilnosti (SI) predstavlja najvažniju reproduktivnu barijeru kod brojnih kritosjemenjača, kojom se sprječava mogućnost samooplodnje, a prednost se daje stranooplodnji, koja je evolucijski povoljnija zbog očuvanja genetičke raznolikosti (De Nettancourt, 1977). Sustavi samoinkompatibilnosti mogu se razvrstati prema morfologiji cvijeta, na temelju genetske regulacije inkompatibilnosti i mjesta na kojem dolazi do inhibicije rasta peludnih mješinica. Na temelju morfologije cvjetova, SI sustavi mogu se podijeliti na heteromorfne i homomorfne sustave. Heteromorfni SI sustavi sprječavaju mogućnost samooplodnje pojavom distilije (dva morfološka oblika cvijeta) i tristilije (tri morfološka oblika cvijeta), a uspješno oprašivanje moguće je samo između različitih morfoloških oblika. Kod homomorfnog SI sustava, samooplodnja je onemogućena genetskim ili biokemijskim mehanizmima koji su neovisni o morfologiji cvijeta. Ovakvi sustavi najčešće su kontrolirani jednim multialelnim S-lokusom i u slučaju da pelud ima isti S-alel kao i njuška tučka, rast peludne mješinice bit će inhibiran te neće doći do oplodnje (Slika 5). Geni smješteni na S-lokusu kodiraju muške i ženske determinante autosterilnosti. Homomorfni SI sustavi dalje se

Ocjena rada u tijeku!

dijele na gametofitski (*engl*. gametophytic self-incompatibility, GSI) i sporofitski (*engl*. sporophytic self-incompatibility SSI) sustav inkompatibilnosti.



Slika 5. Kod gametofitskog sustava samoinkompatibilnosti (GSI), pelud nosi jedan od dva S-haplotipa roditeljske biljke, sa S1 ili S2-alelom. Ukoliko se S-alel peludi podudara s jednim od dva S-alela njuške tučka, doći će do zaustavljanja rasta peludne mješinice nakon prorastanja otprilike jedne trećine duljine vrata tučka. Kod sporofitskog sustava samoinkompatibilnosti (SSI), S-haplotip peludi određen je s oba S-haplotipa roditeljskog sporofita. Ako se S-haplotip donora peludi podudari s barem jednim S-haplotipom njuške tučka, doći će do reakcije inkompatibilnosti na površini njuške tučka, čime je spriječen rast peludne mješinice (preuzeto i prilagođeno prema Claessen i sur., 2019).

Gametofitski sustav samoinkompatibilnosti karakterističan je za porodice pomoćnica (Solanaceae), ružovki (Rosaceae), zijevalica (Scrophulariaceae), zvončika (Campanulaceae) i makova (Papaveraceae). Kod GSI sustava, haploidno peludno zrnce nosi samo jedan S-alel, a fenotip samoinkompatibilnosti određen je upravo tim S-alelom. U vratu tučka, S-lokus najčešće kodira za enzim S-RNazu, dok je mušku determinantu predstavlja SLF/SFB protein (*engl*. S-locus F-box protein) (Franklin-Tong i Franklin, 2003). U inkompatibilnoj reakciji, zbog alelne podudarnosti, SLF/SFB ne može prepoznati niti neutralizirati S-RNazu, koja time zadržava svoju citotoksičnu aktivnost. Posljedično, dolazi do razgradnje RNA u peludnoj mješinici te se aktivira signalni put koji vodi do programirane stanične smrti, čime se sprječava samooplodnja (Serrano i sur., 2010). Kod vrste *Papaver Roheas*, GSI sustav temelji se na kalcijevom kaskadnom mehanizmu i dvjema genetski povezanim S-determinantama: PrsS (*engl*. *Papaver rhoeas* stigma S-protein), sekretornom proteinu koji se eksprimira u njušci tučka, i PrpS (*engl*. *Papaver rhoeas* pollen S-protein), transmembranskom proteinu koji se eksprimira u peludi.

Ocjena u tijeku!

Njihova međusobna interakcija pokreće signalni put koji dovodi do zaustavljanja rasta peludne mješinice i programirane stanične smrti inkompatibilne peludi (Wang i sur., 2020).

Sporofitski sustav samoinkompatibilnosti (SSI) dobro je proučen kod porodice krstašica (Brassicaceae) i glavočika (Asteraceae), a nalazimo ga i kod porodica slakova (Convolvulaceae), breza (Betulaceae), karanfila (Caryophyllaceae), sljezovki (Malvaceae) te kod porodice Polemoniaceae (Hiscock i McInnis, 2003). U ovom sustavu, fenotip inkompatibilnosti peludi određen je diploidnim genotipom roditeljskog sporofita, točnije tapetalnim stanicama unutar peludnih vrećica, gdje se tijekom razvoja peludnih zrnaca eksprimiraju oba alela S-lokusa koja mogu biti u međusobnim dominantno-recesivnim odnosima. U vanjsku ovojnicu peludi ugrađuju se S-lokus cisteinom bogati proteini (*engl*. S-locus cysteine-rich protein, SCR/SP11), koji djeluju kao specifična muška determinanta SSI kod porodice Brassicaceae. S-lokus receptor kinaza (*engl*. S-locus receptor kinase, SRK) predstavlja specifičnu žensku determinantu koja kodira za različite alelne varijante serin-treonin receptor kinaza koje se eksprimiraju u papilarnim stanicama njuške tučka. Ekstracelularna domena SRK prepoznaje specifični SCR/SP11 protein s površine peludi, a njihova interakcija pokreće dimerizaciju SRK te autofosforilaciju serinskih i treoninskih ostataka u kinaznoj domeni, čime se aktivira signalna kaskada koja inhibira rast peludne mješinice te sprječava samooplodnju (Hiscock i McInnis, 2003; Nasrallah, 2019). Kod SSI mehanizma, inhibicija rasta peludnih mješinica odvija se već na površini njuške tučka. S-lokus glikoprotein (*engl*. S-locus glycoprotein, SLG) lokaliziran je u papilarnim stanicama njuške tučka i, iako nije nužan za samu funkciju prepoznavanja, smatra se da podržava i stabilizira SRK čime se povećava osjetljivost odgovora na inkompatibilnu pelud (Takasaki i sur., 2000).

Zanimljivo je da SCR/SP11 proteini pripadaju skupini cisteinom bogatih proteina, unutar koje se nalaze i brojni antimikrobni peptidi uključeni u imunološki odgovor biljaka, dok SRK pripada obitelji receptorskih serin-treonin kinaza (*engl*. receptor-like serine-threonine kinases, RLKs) koje također imaju ključnu ulogu u obrambenim odgovorima biljaka (Silverstein i sur., 2007).

1.8.1. Samoinkompatibilnost i međusortna kompatibilnost masline (Olea europaea L.*)*

Maslina je izrazito alogamna, odnosno stranooplodna voćna vrsta. U mediteranskom području, maslina se tradicionalno uzgajala u monosortnim nasadima u kojima je zbog izostanka uspješnog oprašivanja i zametanja plodova imala slabe prinose. U Dalmaciji je

Ocjena rada u tijeku!

najzastupljenija sorta bila 'Oblica'. U takvim monosortnim nasadima, posebno onima na izoliranim lokacijama, udaljenima od drugih nasada, gdje je samooprašivanje bila jedina mogućnost, zabilježeni su značajno niži prinosi u odnosu na višesortne nasade (Moutier, 2000; Cuevas i sur., 2001; Lavee i sur., 2002; Vuletin Selak i sur., 2011).

Dugo se smatralo da maslina posjeduje gametofitski sustav samoinkompatibilnosti (Wu i sur., 2002; Serrano i sur., 2010), temeljen ponajprije na morfološkim obilježjima različitih vrsta s GSI sustavom, kao što su dvostanična pelud i vlažna njuška tučka, a gdje do inhibicije rasta peludnih mješinica dolazi u prijenosnom tkivu u vratu tučka (Serrano i sur., 2008). Analize interakcije pelud-njuška tučka u istraživanju Sánchez-Estrada i Cuevas (2019) pokazale su da smanjeni rast peludnih mješinica i niski postotak oplodnje, negativno utječu na zametanje plodova i prinose u monosortnim nasadima, što upućuje na GSI mehanizam. Nadalje, Vuletin Selak i sur. (2014b) analizirali su reproduktivne značajke sorti ‘Lastovka’, ‘Leccino’ i ‘Oblica’ i utvrdili da nakon samooprašivanja dolazi do klijanja peludnih zrnaca, a da se inhibicija rasta peludnih mješinica događa nakon inicijalnog rasta peludnih mješinica. Također, S-aleli kod masline još uvijek nisu identificirani, iako je uočena RNa-zna aktivnost na njušci tučka i u peludnim mješinicama (Serrano i Olmedilla, 2012).

Nasuprot GSI, brojni znanstvenici zagovaraju postojanje sporofitskog sustava samoinkompatibilnosti kod masline. Obzirom na to da je SSI sustav već utvrđen kod vrsta rodova Fraxinus, Phillyrea i Ligustrum, pretpostavlja se da isti sustav djeluje i kod masline, budući da se sustavi inkompatibilnosti rijetko razlikuju unutar iste porodice (Cuevas i sur., 2024b). Dodatnu potporu daje identifikacija homolognih gena SRK, SLG i SCR, ključnih za SSI u porodici Brassicaceae, uz istovremeni neuspjeh u izolaciji S-RNaza i SLF/SFB proteina uključenih u GSI (Collani i sur., 2012). Breton i Bervillé (2012) predlažu postojanje polialelnog sporofitskog sustava samoinkompatibilnosti (*engl*. poliallelic SSI, PASI) na temelju eksperimentalnih podataka koji se zasnivaju na šest S-alela. Predloženi model uključuje dominaciju među S-alelima u peludnim zrncima, ali ne i u tučku, stoga kombinacija dviju sorti može biti međusobno kompatibilna u jednom smjeru, a u povratnom križanju inkompatibilna. U 2014. godini, Breton i suradnici odredili su S-alelne parove za više od 60 sorti, čime su omogućili precizniju procjenu međusortne kompatibilnosti i olakšali odabir najboljih oprašivača. Farinelli i sur. (2015) nadopunili su ovo istraživanje uključivanjem glavnih talijanskih sorti. Analizom peludi i tučka 16 h nakon oprašivanja, Saumitou-Laprade i sur. (2017a,b) potvrdili su postojanje homomorfnog dialelnog (*engl*. diallelic SSI, DSI) sustava

Ocjena rada u tijeku!

samoinkompatibilnosti kod samooprašenih cvjetova sličnog SSI sustavu kod srodnih vrsta poput *Phillyrea angustifolia* i *Fraxinus ornus* (Saumitou-Laprade i sur., 2010; Vernet i sur., 2016). Ovakav sustav pod kontrolom je jednog lokusa s dva alela (S1 i S2) pri čemu je S2 alel dominantan nad S1. Različiti genotipovi masline podijeljeni su u samo dvije skupine G1 s genotipom S1S2 i G2 s genotipom S1S1 (Saumitou-Laprade i sur., 2017a,b). Sorte koje pripadaju različitim skupinama su međusobno kompatibilne, a inkompatibilne su sorte unutar iste skupine. Nedavna istraživanja potvrđuju postojanje homomorfnog dialelnog SSI sustava kod masline, a lokus samoinkompatibilnosti mapiran je na 18. kromosomu i smješten u regiji genoma koja je visoko očuvana unutar porodice Oleaceae, a funkcionalno povezana s giberelinskim metaboličkim putem (Mariotti i sur., 2020a; Castric i sur., 2024; Raimondeau i sur., 2024). Breton i sur. (2021) predložili su model dvostruke sukcesivne selekcije (*engl*. dual-successive-screen model), koji podrazumijeva postojanje dvaju odvojenih genetičkih lokusa odgovornih za ekspresiju različitih mehanizama samoinkompatibilnosti. Prema tom modelu, prvi lokus djeluje na razini njuške tučka, gdje se inkompatibilnost regulira DSI sustavom, kojim se sorte svrstavaju u dvije skupine kompatibilnosti/inkompatibilnosti. Drugi lokus djeluje unutar plodnice, gdje se rast peludnih mješinica regulira PASI sustavom koji uključuje do dvadeset različitih skupina kompatibilnosti, što objašnjava složenost i varijabilnost u križanjima kod masline. Rezultati povratnih križanja, posebice između genetski blisko povezanih sorti poput sorte 'Sikitita' i njenog muškog roditelja - sorte 'Arbequina', pokazali su znatno smanjeno zametanje plodova, što se teško može uskladiti s pretpostavkama gametofitskog modela, u kojem bi se očekivalo da najmanje polovina peludnih zrnaca može ostvariti oplodnju (Cuevas i sur., 2024b), što dodatno podupire prisutnost SSI kod masline. U određenim uvjetima može se javiti *tzv*. pseudo-samoinkompatibilnost, koja omogućuje samooplodnju i formiranje ploda (Breton i sur., 2016; Alagna i sur., 2019).

Razumijevanje samoinkompatibilnosti i međusortne kompatibilnosti maslina nužno je kod planiranja podizanja nasada. Brojna su istraživanja bila usmjerena na utvrđivanje kompatibilnih kombinacija sorti kojima se preklapaju intervali pune cvatnje kako bi se osigurala uspješna oplodnja i redoviti prinosi (Moutier i sur. 2000; Lavee i sur., 2002; Vuletin Selak i sur., 2011). Moutier i sur. (2002) su u istraživanje uključili 16 sorti prisutnih u uzgoju u Francuskoj te su na temelju rezultata kontroliranih križanja i praćenja zametanja plodova dali pregled međusortne kompatibilnosti i učinkovitosti pojednih oprašivača. U istraživanju Cuevas i sur. (2024a) sorte 'Sikititia', 'Arbequina' i 'Koroneiki' pokazale su se kao učinkoviti oprašivači

Ocjena rada u tijeku!

za sortu 'Arbosana' stoga bi se mogle preporučiti za sadnju u superintezivnim monosortnim nasadima sorte 'Arbosana'.

U nekim slučajevima i nakon međusobnog oprašivanja dolazi do inkompatibilne reakcije, gdje imamo primjer sorti 'Manzanilla de Sevilla' i 'Mission' (Cuevas i Polito, 1997). Međutim, zbog neujednačenih rezultata različitih istraživanja, iste se sorte nerijetko opisuju kao samokompatibilne i kao samoinkompatibilne, što otežava donošenje pouzdanih zaključaka o njihovoj stvarnoj reproduktivnoj sposobnosti samooprašivanja. Primjerice, sorta 'Arbequina' prethodno je klasificirana kao samokompatibilna, dok su kasnija istraživanja pokazala da je zapravo samoinkompatibilna sorta (Díaz i sur., 2006; Marchese i sur., 2016; Sánchez-Estrada i Cuevas, 2018). Slično tome, sorta 'Frantoio' se u nekim istraživanjima opisuje kao samokompatibilna (Fabbri i sur., 2004), a u drugima kao samoinkompatibilna sorta (Wu i sur., 2002; Mookerjee i sur., 2005). Neki autori navode da je sorta 'Manzanillo' samoinkompatibilna, dok je drugi opisuju kao djelomično samoinkompatibilnu sortu obzirom da ne dolazi do potpunog sprječavanja rasta i razvoja vlastite peludi (Cuevas i Polito, 1997; Lavee i sur., 2002; Wu i sur., 2002). Sorta 'Manzanillo' se u novijim istraživanjima pokazala kao potpuno samoinkompatibilna sorta (Sánchez-Estrada i Cuevas, 2019). Varijabilnost dobivenih rezultata djelomično se može objasniti utjecajem specifičnih okolišnih čimbenika na istraživane sorte, razlikama u njihovoj genetskoj osnovi i /ili primjeni različitih metoda istraživanja.

Dodatno, pouzdanost usporedbe otežava činjenica da često dolazi do zamjene i neprecizne identifikacije sorti (Wu i sur., 2002; Yadav i sur., 2021). Procjenjuje se da u svijetu postoji više od 2000 sorti maslina, no točan broj otežava učestala pojava sinonimije i homonimije te unutarsortne raznolikosti (Barranco i sur., 2000). Upravo iz tog razloga posljednjih su desetljeća intenzivirani napori na sustavnom prikupljanju, očuvanju i molekularnoj karakterizaciji genetskih resursa masline. Kao odgovor na prijetnju genetske erozije i gubitka tradicionalnih sorti, uspostavljene su *ex situ* banke germplazme masline. Međunarodno vijeće za maslinu (*engl.* International Olive Council, IOC) od 1994. godine razvija mrežu koja danas obuhvaća 24 banke germplazme masline, s preko 1700 različitih sorti, a sastoji se od četiri svjetske kolekcije smještene u Córdobi (Španjolska), Marrakechu (Maroko) i Izmiru (Turska) te najnovija u 2025. godini na Kreti (Grčka) i 20 nacionalnih zbirki (Albanija, Alžir, Argentina, Hrvatska, Cipar, Egipt, Francuska, Grčka, Iran, Izrael, Italija, Jordan, Libanon, Libija, Crna Gora, Palestina, Portugal, Slovenija, Tunis i Urugvaj) (https://www.internationaloliveoil.org/the-ioc-network-of-germplasm-banks/).

Ocjena rada u tijeku!

1.9. Metode istraživanja reproduktivne kompatibilnosti u biljnoj biologiji

Metode koje se koriste za određivanje najuspješnijih kompatibilnih kombinacija sorti maslina postale su pitanje velikog znanstvenog interesa u programima oplemenjivanja (Díaz i sur., 2007; De la Rosa i sur., 2013) i određivanju reproduktivne kompatibilnosti (Seifi i sur., 2012). Za proučavanje kompatibilnosti među sortama masline koriste se: analiza rasta peludnih mješinica (Wu i sur., 2002; Vuletin Selak i sur., 2014b; Cuevas i sur., 2024a,b) i/ili određivanje uspjeha zametanja plodova nakon provedbe kontroliranih oprašivanja (Cuevas i sur., 2001; Vuletin Selak i sur., 2011; Cuevas i sur., 2024a,b) uz sprječavanje pristupa neželjene peludi okolnih sorti te novije metode koje se temelje na primjeni mikrosatelita te sekvenciranju nove generacije (*engl*. next generation sequencing, NGS) i analizi gena uključenih u mehanizme samoinkompatibilnosti.

1.9.1. Analiza rasta peludnih mješinica i analiza uspjeha zametanja plodova

Određivanje reproduktivne kompatibilnosti među sortama temelji se na analizi interakcije pelud-njuška tučka u uvjetima kontroliranog oprašivanja. Kako bi se spriječio pristup neželjene peludi na njuškama tučka, ova metoda zahtjeva korištenje papirnatih vrećica za izolaciju grana i daljnju analizu komponenti uključenih u interakciju pelud-njuška tučka (prianjanje peludi na njušci tučka, klijanje peludi, rast peludnih mješinica kroz vrat tučka i oplodnja sjemenih zametaka) te analizu početnog i konačnog uspjeha zametanja plodova (*engl*. initial and final fruit set). Navedene analize omogućuju prepoznavanje reakcija samoinkompatibilnosti usporedbom procesa u cvijetu koji je oprašen vlastitom peludi s onima koji su oprašeni s peludi drugih sorti korištenjem tehnika fluorescentne mikroskopije.

Vijabilnost peludi, odnosno sposobnost peludnog zrnca da proklija i proizvede funkcionalnu peludnu mješinicu, ovisi o genetskim osobinama sorte, razvojnom stadiju peludnih zrnaca, okolišnim uvjetima i kompatibilnosti peludi s njuškom tučka. Klijavost peludi opada s vremenom proteklim od oprašivanja, a visoke temperature dodatno ubrzavaju degeneraciju i smanjuju vijabilnost peludi. Prijemčivost njuške tučka predstavlja sposobnost njuške tučka da podrži hidrataciju, klijanje i rast kompatibilne peludi. Može trajati od nekoliko sati do nekoliko dana, ovisno o vrsti, razvojnom stadiju cvijeta i okolišnim čimbenicima (Sanzol i Herrero, 2001). Gubitak prijemčivosti njuške tučka odvija se postupno: prvo se gubi sposobnost prihvaćanja rasta peludne mješinice, zatim se gubi sposobnost podržavanja klijanja peludnog zrnca, a naposljetku nestaje i mogućnost prijanjanja peludi na površini njuške tučka (Sanzol i sur., 2003). Kod nekih vrsta, čak i degradirane njuške tučka mogu podržati prijanjanje

Ocjena rada u tijeku!

peludi, ali ne i rast peludnih mješinica. Visoke temperature ubrzavaju starenje njuške tučka, dok niže temperature održavaju njenu prijemčivost kroz dulje vremensko razdoblje (Sanzol i Herrero, 2001).

Analiza rasta peludnih mješinica korištena je u istraživanjima reproduktivne (in)kompatibilnosti kod mnogih voćnih vrsta poput marelice (Burgos i sur., 1993), kruške (Shaheen i sur., 2011), badema (Dicenta i sur., 2002), trešnje (Hedhly i sur., 2005) i mnogih drugih. Dinamika rasta peludnih mješinica ovisi o vrsti, sorti, podrijetlu peludi, nutritivnom stanju cvijeta i okolišnim uvjetima. Genotip peludi sorte oprašivača i sorte primatelja peludi utječu na dinamiku rasta peludnih mješinica. Brzina rasta peludnih mješinica mijenja se ovisno o tkivima tučka kroz koja prolazi (Sanzol i Herrero, 2001). Brojna istraživanja na maslini ukazuju na to da stranooprašivanje rezultira intenzivnijim rastom peludnih mješinica, većom brzinom rasta, ranijom oplodnjom i većim brojem oplođenih sjemenih zametaka u odnosu na samooprašivanje (Breton i Bervillé, 2012; Cuevas i sur., 2024a). Povišene temperature mogu pozitivno utjecati na brzinu rasta peludnih mješinica, skraćujući vrijeme koje je potrebno da peludna mješinica dođe do sjemenog zametka (Hedhly i sur., 2005). Međutim, istovremeno visoke temperature mogu nepovoljno utjecati na vijabilnost sjemenih zametaka i trajanje prijemčivosti njuške tučka (Hedhly i sur., 2003).

Određivanje reproduktivne kompatibilnosti analizom početnog i konačnog uspjeha zametanja plodova primjenom kontroliranih oprašivanja temelji se na kvantifikaciji zametnutih plodova nakon različitih kombinacija oprašivanja pri čemu se uspoređuju rezultati samooprašivanja i stranooprašivanja. Ova metoda omogućuje procjenu učinkovitosti donora peludi te identifikaciju kompatibilnih i nekompatibilnih sorti, analizom početnog uspjeha zametanja plodova u ranoj fazi, prije pojave opadanja plodova *tzv*. 'June drop', koje nastupa nakon početnog zametanja zbog izražene kompeticije među plodovima, kao i kasnijoj fazi, kada se bilježi konačni uspjeh zametanja plodova. Početni uspjeh zametanja plodova određuje se mjerenjem broja plodova u cvatovima na izoliranim granama i određuje se između 16-20 dana nakon pune cvatnje (Cuevas i sur., 2024b). Konačni uspjeh zametanja plodova određuje se 45 do 60 dana nakon pune cvatnje kada se završi redukcija broja plodova (Cuevas i sur., 2001; Vuletin Selak i sur., 2011) te se smatra pouzdanim pokazateljem za predviđanje konačnog prinosa, budući da kasnije opadanje plodova najčešće proizlazi iz djelovanja vanjskih čimbenika, kao što su nepovoljni klimatski uvjeti, štetnici ili bolesti, koji nisu izravno povezani s primijenjenim tretmanima oprašivanja. Prema dobivenim vrijednostima uspjeha zametanja

Ocjena rada u tijeku!

plodova može se izračunati pokazatelj stupnja samoinkompatibilnosti sorte (*engl*. self-incompatibility indeks, ISI) kao omjer konačnog uspjeha zametanja plodova nakon samooprašivanja i konačnog uspjeha zametanja plodova nakon stranooprašivanja za svaku eksperimentalnu godinu ili eksperimentalni nasad (Cuevas i sur., 2001). Sorte maslina kod kojih su dobivene ISI vrijednosti < 0,1 definiraju se kao potpuno samoinkompatibilne (Androulakis i Loupassaki, 1990).

1.9.2. Molekularni DNA biljezi

Molekularni DNA biljezi predstavljaju jedan od najučinkovitijih alata za detekciju genetskih polimorfizama na razini pojedinačnih lokusa i čitavog genoma, koji nastaju kao posljedica insercija, delecija, točkastih mutacija, duplikacija i translokacija (Nadeem i sur., 2017). Danas je dostupno mnoštvo različitih biljega koji se primjenjuju u genotipizaciji biljaka, pri čemu njihov odabir ovisi o istraživačkim ciljevima, kao i o tehničkim te financijskim mogućnostima. Za razliku od morfoloških i biokemijskih biljega, DNA biljezi nisu podložni utjecaju okolišnih čimbenika niti razvojne faze biljke, što ih čini izuzetno pouzdanima u analizi genetske varijabilnosti (Kordrostami i Rahimi, 2015).

Razvoj molekularnih biljega započeo je 1980-ih godina, pojavom RFLP biljega (*engl*. Restriction Fragment Length Polymorphism), koji se temelje na cijepanju deoksiribonukleinske kiseline (*engl*. deoxyribonucleic acid, DNA) na fragmente uz pomoć restrikcijskih enzima i njihovoj detekciji hibridizacijom s radioaktivno označenom sondom (Botstein i sur., 1980). Zahvaljujući otkriću lančane reakcije polimerazom (*engl*. Polymerase Chain Reaction, PCR), omogućen je brz, informativan i troškovno prihvatljiv pristup analizi genetske raznolikosti biljaka. Neki od daljnje razvijenih molekularnih biljega su RAPD (*engl*. Random Amplified Polymorphic DNA) koji se temelje na primjeni univerzalnih, nasumično odabranih oligonukleotida koji omogućuju amplifikaciju različitih dijelova genoma bez prethodnog poznavanja sekvence i AFLP (*engl*. Amplified Fragment Length Polymorphism) biljezi koji predstavljaju kombinaciju RFLP i PCR tehnike, a uključuju cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama i selektivnu amplifikaciju restrikcijskih fragmenata (Williams i sur. 1990; Vos i sur., 1995). Daljnji razvoj molekularnih tehnika omogućio je uvođenje naprednijih biljega poput mikrosatelitnih biljega ili jednostavnih ponavljajućih sekvenci (*engl.* Simple Sequence Repeats, SSR) te SNP biljega, temeljenih na polimorfizmu pojedinačnog nukleotida (*engl*. Single Nucleotid Polymorphism) (Litt i Luty, 1989; Deschamps i sur., 2012). SNP biljezi predstavljaju promjene u jednom nukleotidu na točno određenim mjestima unutar genoma, a

Ocjena rada u tijeku!

njihova identifikacija omogućena je primjenom različitih metoda sekvenciranja nove generacije (*engl*. Next Generation Sequencing, NGS).

Primjena molekularnih biljega, posebice mikrosatelita, u genetskim istraživanjima uvelike je doprinijela napretku u proučavanju masline, gdje se prethodno navedeni biljezi koriste u brojne svrhe, među kojima su:

1. analiza genetske varijabilnosti masline (Belaj i sur., 2003; Bandelj i sur., 2004);

2. filogenetska istraživanja (Besnard i Bervillé, 2002; Baldoni i sur., 2006; Belaj i sur., 2007; Baldoni i sur., 2009);

3. genotipizacija sorti i karakterizaciju genetskih izvora masline (Sefc i sur., 2000; Cipriani i sur., 2002; Owen i sur., 2005; Baldoni i sur., 2009);

4. upravljanje kolekcijskim nasadima (Muzzalupo i sur., 2014; Trujillo i sur., 2014);

5. analiza roditeljstva (De la Rosa i sur., 2004; Mookerjee i sur., 2005; Díaz i sur., 2007; Marchese i sur., 2016; Vuletin Selak i sur., 2021; Cuevas i sur., 2024a,b)

6. identifikacija podrijetla i sljedivosti maslinovog ulja (Pasqualone i sur., 2007; Montemurro i sur., 2015; Ben Ayed i sur., 2016).

1.9.2.1. Mikrosatelitni biljezi

Genotipizacija temeljena na SSR biljezima postala je široko prihvaćena metoda za identifikaciju kultivara, procjenu genetske sličnosti, analizu roditeljstva i srodstva različitih poljoprivrednih kultura u oplemenjivačkim programima (Yadav i sur., 2021). Mikrosateliti predstavljaju dijelove DNA sastavljene od tandemskih ponavljanja osnovnog motiva duljine 1-6 pb, koji se učestalo pojavljuju u prokariotskim i eukariotskim genomima. Prema broju nukleotida koji čine ponavljajući niz dijele se na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksanukleotide, dok se prema tipu ponavljanja osnovnog motiva dijele na: (i) potpune mikrosatelite koji se sastoje od jednog motiva koji se neprekidno ponavlja, (ii) nepotpune mikrosatelite kod kojih se nalazi jedan ili više parova baza različitih od osnovnog motiva, (iii) mikrosatelite prekinute sekvencom od nekoliko parova baza umetnutom u osnovni motiv te (iv) mikrosatelite složene od nekoliko osnovnih ponavljajućih motiva (Vieira i sur., 2016). Biljni genomi osobito su bogati AT ponavljanjima osnovnog motiva (Powel i sur., 1996). SSR biljezi

Ocjena rada u tijeku!

su prisutni kako u kodirajućim, tako i u nekodirajućim regijama te su ravnomjerno raspoređeni duž cijelog nuklearnog genoma, ali se mogu naći i u kloroplastnom i mitohondrijskom genomu (Kalia i sur., 2011).

Mikrosateliti se ubrajaju među najučinkovitije molekularne biljege zahvaljujući brojnim prednostima, među kojima se ističu visoka razina polimorfizma, informativnost, pouzdanost te mogućnost razlikovanja homozigotnih i heterozigotnih genotipova zbog svoje kodominantne prirode. Osim što su visoko zastupljeni i relativno ravnomjerno raspoređeni unutar eukariotskog genoma, njihova ponovljivost i prilagodljivost automatiziranim analizama, dodatno povećavaju njihovu mogućnost primjene u genetskoj karakterizaciji. Također, prednost mikrosatelita je i mogućnost provođenja *tzv*. multiplex reakcija korištenjem fluorescentno obilježenih početnica, čime se omogućuje istovremena amplifikacija više SSR lokusa, što značajno povećava učinkovitost analize i smanjuje troškove iste (Vieira i sur., 2016).

Unatoč brojnim prednostima SSR biljega, njihova sve intenzivnija primjena s vremenom je ukazala i na određene nedostatke, posebice u pogledu dosljednosti rezultata među različitim laboratorijima. Naime, metodološke razlike u određivanju veličine alela često su dovele do neskladnosti u interpretaciji podataka. Kako bi se povećala pouzdanost i usporedivost rezultata, razvijen je standardizirani skup SSR biljega koji se odlikuje visokom diskriminativnom moći, stabilnom amplifikacijom bez pojave *tzv*. stutter bandova, snažnim fluorescentnim signalom te izostankom nul alela. Temeljem navedenih kriterija definiran je referentni popis mikrosatelita koji se danas primjenjuju u genotipizaciji masline (Baldoni i sur., 2009; Yadav i sur., 2021).

1.9.2.2. Primjena mikrosatelitnih biljega i roditeljskog testa u istraživanju reproduktivne kompatibilnosti masline

Izbor sorti i njihov raspored određuju uspjeh oplodnje te produktivnost maslinika, što su preduvjeti uspješne maslinarske proizvodnje. Ipak, informacije o međusortnoj kompatibilnosti te uspjehu samooplodnje različitih sorti maslina, još uvijek su nedostatne, posebice u uvjetima pojačanog unošenja novih sorti u nova uzgojna područja. U tom kontekstu, mikrosatelitni biljezi u kombinaciji s roditeljskim testom pokazali su se kao pouzdana molekularna metoda za procjenu kompatibilnosti u istraživanjima reproduktivne biologije masline (Mookerjee i sur., 2005). DNA profiliranje (*engl*. DNA fingerprinting) i analiza roditeljstva mladih biljaka dobivenih klijanjem sjemena, sjemenjaka, vrlo su korisni i u

Ocjena rada u tijeku!

potvrđivanju križanja u oplemenjivačkim programima te utvrđivanju kompatibilnosti roditeljskih genotipova (De la Rosa i sur., 2004; Díaz i sur., 2007). Budući da se SSR biljezi nasljeđuju kodominantno u skladu s Mendelovim sustavom nasljeđivanja te su visoko polimorfni, svaki roditelj prenosi potomku jedan alel, stoga svaki potomak na određenom lokusu mora imati barem jedan alel kojeg nalazimo i kod roditelja (Sefc i sur., 2000; De la Rosa i sur., 2002). Ova se metoda pokazala osobito učinkovitom u uvjetima slobodnog oprašivanja, kada postoji više mogućih potencijalnih oprašivača cvjetova roditeljske biljke, za razliku od analize rasta peludnih mješinica i uspjeha zametanja plodova koji se provode u uvjetima kontroliranih oprašivanja. U takvim uvjetima, analize roditeljstva pomoću SSR biljega uključuju DNA profiliranje poznatog majčinskog genotipa, genotipova potencijalnih donora peludi i embrija. Na temelju dobivenih genotipova embrija, dodjeljuje se roditeljstvo određenom donoru peludi (Vuletin Selak i sur., 2021). U zadnje vrijeme, najčešće korišteni računalni programi za roditeljsku analizu kod masline su CERVUS 3.0 (Kalinowski i sur., 2007) i FaMoz (Gerber i sur., 2003).

U različitim istraživanjima za identifikaciju roditeljskih genotipova embrija ili mladih sjemenjaka korištena su dva (Montemurro i sur., 2019), četiri (De La Rosa i sur., 2004; Dìaz i sur., 2007), sedam (Baruca Arbeiter i sur., 2014; Vuletin Selak i sur., 2021), osam (Mookerjee i sur., 2005; Seifi i sur., 2012; Cuevas i sur., 2024a,b) do deset (Mariotti i sur., 2020b) mikrosatelitnih biljega. Analiza roditeljstva i genotipizacija pomoću SSR biljega može se koristiti za procjenu samoinkompatibilnosti pojedinih sorti i međusobne kompatibilnosti različitih sorti, što je potvrđeno na primjeru više talijanskih sorti masline (Montemurro i sur., 2019). Mookerjee i sur. (2005) koristili su mikrosatelitne biljege za identifikaciju potencijalnih donora peludi u uvjetima slobodnog oprašivanja za pet sorti u komercijalnom masliniku u Australiji te time pridonijeli boljem razumijevanju samoinkompatibilnosti i sortne kompatibilnosti. Seifi i sur. (2012) koristili su analizu roditeljstva i mikrosatelitne biljege za genotipizaciju embrija sorte 'Kalamata' i svih potencijalnih donora peludi, pri čemu su istaknuli ključnu ulogu odabira kompatibilnih oprašivača u postizanju uspješnog zametanja plodova i visokih prinosa. Díaz i sur. (2006) koristili su mikrosatelitne biljege u istraživanju samoinkompatibilnosti dviju glavnih španjolskih sorti, 'Picual' i 'Arbequina' u monosortnim i višesortnim nasadima, čime je dodatno potvrđena izražena samoinkompatibilnost navedenih sorti, ali i njihova međusobna inkompatibilnost. Baruca Arbeiter i sur. (2014) proveli su analizu roditeljstva u monosortnim nasadima 'Istarske bjelice' koristeći mikrosatelitne biljege i računalni programi FaMoz, pri čemu su identificirali najuspješnije (kompatibilne) donore

Ocjena rada u tijeku!

peludi te su na temelju genotipizacije embrija, procijenili udio samooplodnje. U istraživanje Vuletin Selak i sur. (2021) uključena je naša najzastupljenija sorta 'Oblica', a izolacijom DNA iz embrija i daljnjom genotipizacijom pomoću mikrosatelitnih biljega identificirani najuspješniji oprašivači ove sorte te je određen uspjeh samooplodnje. U superintezivnim nasadima u Španjolskoj često je zastupljena sorta 'Arbosana', za koju je kombinacijom metoda za određivanje kompatibilnosti - uključujući analizu uspjeha zametanja plodova, rasta peludnih mješinica i molekularnu analizu roditeljstva primjenom SSR biljega, utvrđeno da se radi o samoinkompatibilnoj sorti. Budući da se radi o uzgoju masline u jako gustom sklopu, nije moguće provesti nadosadnju sorti oprašivača, stoga autori preporučuju cijepljenje određenih grana unutar postojećih krošnji međusobno prikladnim, kompatibilnim sortama kako bi se osigurala učinkovita oplodnja i stabilni prinosi (Cuevas i sur., 2024a).

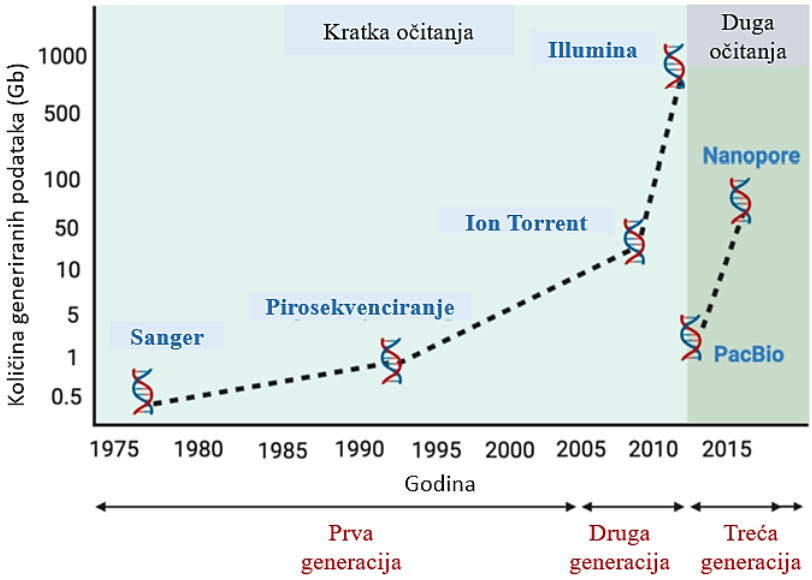
Pri odabiru sorti za nove nasade ili optimizaciji postojećih, osobitu pažnju treba posvetiti izboru učinkovitih oprašivača. Osim što bi trebali biti kompatibilni s glavnom sortom u nasadu, važno je i da se preklapaju u razdoblju cvatnje, ne pokazuju izraženu alternativnu rodnost te po mogućnosti, imaju jednaku namjenu - bilo kao stolna sorta ili sorta uljarica (Cuevas i sur., 2001; Mookerjee i sur., 2005). Nadalje, uspjeh oplodnje u uvjetima slobodnog oprašivanja, uvelike ovisi o brojnosti stabala i prostornom rasporedu potencijalnih donora peludi unutar nasadu. Sorte koje su u nasadu zastupljene s većim brojem stabala imaju veći potencijal da budu identificirane kao najvjerojatniji donori peludi, jer veća brojnost stabala povećava ukupnu količinu dostupne peludi dok je njuška tučka još uvijek prijemčiva. Uz to, ako se sorte nalaze u neposrednoj blizini i ako im se razdoblja cvatnje preklapaju, značajno raste i mogućnost da pelud učinkovito dospije do njuške tučka glavne sorte u nasadu. Budući da je maslina anemofilna vrsta, u obzir je potrebno uzeti i meteorološke podatke, smjer i jačinu vjetra te količinu padaline, koji dodatno mogu imati utjecaj na koncentraciju peludi u zraku, a time i na uspjeh oplodnje.

1.9.3. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Razvoj metoda sekvenciranja DNA, koje omogućuju određivanje redoslijeda nukleotida, jedan je od glavnih čimbenika napretka bioloških znanosti (Slika 6). Prva generacija sekvenciranja započela je krajem 1970.-tih, kada su Frederick Sanger i njegovi suradnici (1977) razvili metodu lančane terminacije, poznatu i kao dideoksi sekveciranje, dok su Alan Maxam i Walter Gilbert (1977) razvili metodu kemijskog cijepanja DNA. Ove metode imale su veliki utjecaj na molekularnu biologiju jer su po prvi puta omogućile određivanje potpune sekvence

Ocjena rada u tijeku!

gena, a kasnije i cijelih genoma. Sangerova metoda, zbog manje potrebe za upotrebom toksičnih kemikalija i radioizotopa u usporedbi s metodom Maxama i Gilberta, postala je dominantna metoda sekvenciranja DNA tijekom naredna dva i pol desetljeća. Razvojem automatiziranih instrumenata i uvođenjem paralelne obrade velikog broja uzoraka, laboratoriji su mogli značajno povećati propusnost sekvenciranja, čime je omogućeno brže i učinkovitije sekvenciranje.



Slika 6. Shematski prikaz razvoja tehnologija sekvenciranja - od prve do treće generacije (prilagođeno prema Satam i sur., 2023).

Zahvaljujući navedenim tehnološkim naprecima, gotovo potpune sekvence ljudskog genoma objavljene su 2001. godine (Venter i sur., 2001), a Sangerova metoda naposljetku je omogućila završetak sekvenciranja 2004. godine, projekta koji je trajao 13 godina s procijenjenim troškom od 2,7 milijardi američkih dolara (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Nakon uspješnog sekevenciranja ljudskog genoma, potražnja za bržim i jeftinijim metodama sekvenciranja znatno je porasla. Upravo je ta potreba potaknula razvoj tehnologija sekvenciranja nove generacije - druge generacije. Za usporedbu, već 2008. godine ljudski genom je sekvenciran u roku od pet mjeseci, uz značajno smanjeni trošak od oko 1,5 milijuna dolara (Wheeler i sur., 2008). Tehnologije sekvenciranja druge generacije odlikuju se nizom prednosti, među kojima se ističu: mogućnost istodobnog sekvenciranja više milijuna DNA fragmenata, značajno kraće trajanje samog postupka, znatno niži troškovi u usporedbi s konvencionalnim metodama te mogućnost izravnog očitanja sekvence bez potrebe za

Ocjena u tijeku!

elektroforetskim razdvajanjem produkta. Jedna od dodatnih prednosti NGS platformi jest pojednostavljena priprema knjižnice DNA, pri čemu nije potrebno kloniranje DNA fragmenata. Primjenom NGS tehnologija omogućena je sveobuhvatna analiza cijelih genoma, egzoma i velikih genetskih panela, kao i potpunih RNA transkriptoma. Komercijalno dostupne platforme za sekvenciranje druge generacije temelje se na različitim metodama DNA ili RNA očitanja, među kojima su najznačajnije pirosekvenciranje (Roche/454), sekvenciranje sintezom (*engl*. Sequence By Synthesis, SBS) koje koristi Illumina tehnologija, sekvenciranje ligacijom karakteristično za ABI/SOLiD (Sequence By Ligation, SBL) te Ion Torrent koji detektira promjene pH tijekom inkorporacije nukleotida (Voelkerding i sur., 2009). Tehnologije treće generacije sekvenciranja (*engl*. third generation sequencing, TGS) predstavljaju značajan iskorak u analizi nukleinskih kiselina, ponajprije zahvaljujući mogućnosti očitanja iznimno dugih fragmenata, često duljih od deset tisuća baza. Ove metode omogućuju sekvenciranje bez prethodne amplifikacije, čime se uvelike smanjuje mogućnost pogreške, skraćuje vrijeme analize te povećava propusnost i učinkovitost. Dvije najzastupljenije TGS platforme uključuju tehnologiju *Single-Molecule Real-Time* (SMRT), razvijenu od strane tvrtke Pacific Biosciences (PacBio), te nanopornu tehnologiju koju je komercijalizirala tvrtka Oxford Nanopore Technologies (ONT). Usporedno s razvojem metoda sekvenciranja, neophodan je i kontinuiran razvoj bioinformatičkih alata ključan za upravljanje velikim količinama podataka koje generiraju NGS platforme.

1.9.3.1. Upotreba NGS metoda - RNA sekvenciranja u biljnoj biologiji

Prije uvođenja NGS tehnologija, u analizama ekspresije gena najčešće su se koristile EST sekvence dobivene Sangerovom metodom (*engl*. Expressed Sequence Tags) i mikročipovi (*engl*. microarrays) (Alba i sur., 2004). Međutim, zbog ograničene osjetljivosti, nemogućnosti kvantifikacije nisko zastupljenih transkripata i detekcije novih ili slabije zastupljenih transkripata, ove metode pokazale su značajna ograničenja u sveobuhvatnoj analizi transkriptoma (Wang i sur., 2009). Sekvenciranje nove generacije značajno je unaprijedilo genomiku, omogućivši dublje razumijevanje strukture, funkcije i dinamike genoma te je potaknulo razvoj transkriptomike, epigenomike, metagenomike i drugih *omics* pristupa.

Transkriptom predstavlja sve prisutne transkripte u stanici, tkivu ili organizmu u određenom razvojnom stadiju ili fiziološkom stanju. RNA sekvenciranje (*engl*. RNA sequencing, RNA-Seq), suvremeni pristup analizi transkriptoma, značajno je unaprijedilo razumijevanje raznolikosti, složenosti i regulacije RNA molekula u eukariotskim stanicama.

Ocjena rada u tijeku!

Ciljevi transkriptomike obuhvaćaju identifikaciju i klasifikaciju svih vrsta transkripata, uključujući glasničku RNA (mRNA), nekodirajuće RNA i male RNA molekule, određivanje transkripcijske strukture gena, što uključuje analizu mjesta početka transkripcije, 5' i 3' krajeva transkripata, obrazaca alternativnog prekrajanja i posttranslacijskih modifikacija, kao i kvantifikaciju genske ekspresije između različitih razvojnih stadija i eksperimentalnih uvjeta (Wang i sur., 2009). Ovisno o dostupnosti referentne genomske sekvence u RNA-Seq analizama, transkriptom se može rekonstruirati poravnanjem očitanja na referentni genom ili primjenom *de novo* pristupa, što je posebno važno kod organizama s nedovoljno istraženim genomom.

Različita genomska i transkriptomska istraživanja provedena su na brojnim biljnim vrstama s ciljem razumijevanja regulatornih mreža i biokemijskih puteva koji upravljaju staničnim procesima i omogućuju prilagodbu biljaka na promjenjive okolišne uvjete. RNA-seq često je korištena metoda u istraživanjima na modelnim biljkama, uključujući biljke *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., poznatu i kao Thalijev ili talijin uročnjak, *Oryza sativa* - riža, *Zea mays* - kukuruz, *Solanum lycopersicum* - rajčica te mnoge druge. Kod prethodno navedenih biljnih vrsta, RNA-Seq metoda uvelike je korištena u analizama genske ekspresije u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa, s ciljem identifikacije gena uključenih u odgovore na stres, razjašnjavanja molekularnih mehanizama prilagodbe te boljeg razumijevanja uloge signalnih i regulatornih puteva u obrambenim reakcijama biljaka (Yang i sur. 2015; Baldoni i sur., 2016; Coolen i sur., 2016; Lu i sur., 2017). Osim u analizama odgovora na stres, RNA-seq metoda primijenjena je i u istraživanjima reproduktivnih procesa kod biljaka. Klepikova i sur. (2015) analizirali su dinamiku genske ekspresije u meristemskom tkivu tijekom prijelaza iz vegetativne faze u fazu cvatnje, pri čemu je zabilježen nagli porast diferencijalno eksprimiranih gena. Različite metode analize transkriptoma korištene su u istraživanju mehanizama razvoja prašnika i muške sterilnosti mnogih jednosupnica i dvosupnica poput vrsta *Arabidopsis thaliana* (Chen i sur., 2010), *Gossypium spp.* (Ma i sur., 2012) i drugih.

U svrhu razjašnjavanja molekularnih mehanizama samoinkompatibilnosti (SI), provedena su mnoga istraživanja kod biljnih vrsta s različitim mehanizmima SI sustavima, poput *Camellia oleifera* (He i sur., 2020), *Citrus clementin*a (Caruso i sur., 2012), *Solanum lycopersicum* (Zhao i sur., 2015), *Dendrobium officinale* (Chen i sur., 2021), *Erigeron breviscapus (*Zhang i sur., 2015). U svom radu, Zhao i sur. (2015) proveli su transkriptomsku analizu tučka kod samokompatibilne (*Solanum pimpinellifolium*) i samoinkompatibilne vrste

Ocjena rada u tijeku!

rajčice (*Solanum chilense*). Autori su pokazali kako su diferencijalno eksprimirani geni povezani s metabolizmom cisteina i metionina, kao i s prijenosom signala biljnih hormona te da ti procesi vjerojatno imaju važnu ulogu u regulaciji rasta peludnih mješinica kod samoinkompatibilnih vrsta. Rezultati navedenih istraživanja naglašavaju vrijednost ove metode kao snažnog alata u biljnoj biologiji koji omogućuje detaljno proučavanje regulacije gena u različitim fiziološkim procesima.

1.9.3.2. Upotreba metoda analize transkriptoma u istraživanjima vrste Olea europaea L.

Razvojem RNA-seq tehnologije omogućena je globalna i kvantitativna analiza transkriptoma masline u različitim tkivima i fazama razvoja, što je dodatno pridonijelo razumijevanju molekularnih osnova adaptacije biljaka u stresnim uvjetima, genetičke raznolikosti ove vrste te rasvjetljavanju reproduktivnih procesa. Veliki broj transkriptomskih istraživanja, uključujući i ona temeljena na RNA-seq metodi, obuhvatio je analize podrijetla i domestikacije masline (Gros-Balthazard i sur., 2019), fiziološke i molekularne promjene tijekom dozrijevanja (Serrano i sur., 2024), kao i različite obrasce genske ekspresije u specifičnim organima masline (Alagna i sur., 2016; Zafra i sur., 2017; Ramírez-Tejero i sur., 2020; Bullones i sur., 2023a).

RNA-seq metoda uspješno je primijenjena i za analizu odgovora na biotički i abiotički stres. Tako su, primjerice, Marchese i sur. (2023) analizirali transkriptomske promjene u lisnom tkivu nisko osjetljive sorte 'Koroneiki' i visoko osjetljive sorte 'Nocellara del Belice' nakon infekcije gljivicom *Spilocaea oleagina*, pri čemu je identificiran veliki broj diferencijalno eksprimiranih gena u stadijima prije i poslije vidljivih simptoma bolesti na listu. Leyva-Pérez i sur. (2014) analizirali su gensku ekspresiju sorte 'Picual' u uvjetima hladnoće te identificirali više od 6 300 diferencijalno eksprimiranih gena u navedenim uvjetima. Bullones i sur. (2023b) razvili su bazu podataka OliveAtlas u kojem je sadržano 70 RNA-seq eksperimenata provedenih na sorti 'Picual', koji obuhvaćaju glavne organe masline, procese klijanja peludi i rasta peludnih mješinica te odgovore na različite biotičke i abiotičke stresove.

Veliki je broj genomskih i transkriptomskih istraživanja koja su obuhvatila različite teme vezane uz reproduktivnu biologiju masline poput alternativne rodnosti (Turktas i sur., 2013; Dastkar i sur., 2020); rane juvenilne faze (Jiménez-Ruiz i sur., 2018); prijelaza iz juvenilne u reproduktivnu fazu (Fernández-Ocaña i sur., 2010); hidratacije i rasta peludi u *in vitro* uvjetima (Bullones i sur., 2023a).

Ocjena rada u tijeku!

Unatoč značajnom napretku metoda sekvenciranja, brojna su pitanja vezana uz reproduktivnu biologiju masline i dalje otvorena. Baza podataka ReprOlive, temeljena na transkriptomskim podacima iz reproduktivnih tkiva masline (Carmona i sur., 2015), zajedno s dostupnim sekvencama do sada objavljenih genoma masline (Cruz i sur., 2016; Unver i sur., 2017; Jiménez-Ruiz i sur., 2020; Rao i sur., 2021; Sebastiani i sur. 2024), predstavljaju iznimno vrijedne resurse za identifikaciju kandidat gena uključenih u reproduktivne procese kod masline. U 2016. godini, sekvenciran je prvi genom kultivirane masline (*Olea europaea* L. subsp. *sativa*) sorte 'Farga' (Cruz i sur., 2016), čija je kvaliteta poboljšana povezivanjem s genetičkom kartom, što je omogućilo precizno mapiranje sekvenciranih regija na kromosome (Julca i sur., 2020). Godinu dana kasnije, objavljen je genom divlje masline (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) s područja Turske (Unver i sur., 2017), no kasnija istraživanja ukazala su na to da bi analizirana jedinka mogla pripadati feralnoj populaciji, a ne divljoj maslini (Julca i sur., 2020). Nadalje, genomske sekvence sorti maslina 'Picual' i 'Arbequina' postale su dostupne u 2020., odnosno 2021. godini (Jiménez-Ruiz i sur., 2020; Rao i sur., 2021), a nedugo zatim i za sorte 'Leccino' i 'Frantoio' (Sebastiani i sur. 2024).

Analize transkriptoma otkrivaju širok spektar gena kandidata koji mogu imati ulogu u mehanizmima kontrole (in)kompatibilnosti, a koji utječu na sposobnost njuške tučka da odbije ili prihvati pelud. Osobito, transkriptomske analize peludi postale su ključni alat za razumijevanje razvoja gameta, specifične genske ekspresije peludi, dinamike rasta peludnih mješinica te međudjelovanje peludi i njuške tučka, ali i za identifikaciju gena kandidata uključenih u mehanizme samoinkompatibilnosti. S ciljem boljeg razumijevanja mehanizama uključenih u klijanje peludi i rasta peludnih mješinica kod masline, Iaria i sur. (2016) su primjenom RNA-seq metode i *de novo* pristupa sastavljanja transkriptoma analizirali ekspresijske profile peludnih mješinica u različitim kombinacijama pelud-tučak iz samokompatibilnih i samoinkompatibilnih sorti masline 'Nocellara del Belice' i 'Nera di Gannos'. Nadovezujući se na ova istraživanja, Bullones i sur. (2023a) proveli su sveobuhvatnu analizu dinamike transkriptoma peludnih mješinica u *in vitro* uvjetima kroz četiri uzastopne razvojne faze peludnih mješinica. Analiziran je transkriptom peludi s ukupno 22 148 transkripata, od kojih je 5364 bilo diferencijalno eksprimirano, uključujući i potencijalne transkripcijske faktore koji nemaju ortologe u drugim biljnim vrstama. Uz analizu peludi i peludnih mješinica, istraživanja usmjerena na različite organe masline pokazala su da tkiva cvijeta pokazuju najveći broj organ-specifičnih gena, od kojih su mnogi izravno povezani s razvojem reproduktivnog sustava, poput gena *CALS11* i *CALS12* koji kodiraju kalozne sintaze

Ocjena rada u tijeku!

koje su potrebne u formiranju kaloznih stijenki i odvajanje tetrada tijekom razvoja peludnih zrnaca. Osim toga, posebno su istaknuti i MS1 geni koji kodiraju transkripcijske faktore odgovorne za aktivaciju razvoja prašnika, sazrijevanje peludnih zrnaca i kontrolu razvoja tapetuma (Ramírez-Tejero i sur., 2020).

Međutim, sveobuhvatna istraživanja transkriptoma kojima bismo usporedili kompatibilne i inkompatibilne procese u cvijetu masline nakon provedbe kontroliranih oprašivanja među sortama ili samooprašivanja još uvijek nedostaju, a takva istraživanja mogla bi otkriti specifične gene kandidate koji upravljaju tim oprečnim reakcijama. Situacija kod masline osobito je složena zbog širokog spektra mogućnosti stranooprašivanja među sortama, uz prisutnost samooplodnje. Stoga su potrebni značajni napori kako bi se razjasnili procesi koji kontroliraju interakciju pelud-tučak. U ovoj doktorskoj disertaciji, izvršit će se identifikacija i karakterizacija transkripata cvjetova masline uključenih u interakciju peludi i tučka te će biti identificirani diferencijalno eksprimirani geni te povezani s kompatibilnim ili inkompatibilnim odgovorima.

Ocjena rada u tijeku!

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Provedbom ovog istraživanja primijenjeni su novi alati i pristupi u analizi samoinkompatibilnosti i sortne kompatibilnosti masline. Definirani su sljedeći specifični ciljevi:

- Utvrditi fenološke i klimatske parametre koji određuju početak cvatnje;
- Odrediti vrijeme cvjetanja sorti prisutnih u eksperimentalnim nasadima;
- Analizirati procese međudjelovanja njuške tučka sorti primatelja i sorti donora peludi nakon kontroliranih oprašivanja;
- Odrediti stupanj samoinkompatibilnosti sorti ‘Oblica’ i ‘Lastovka’;
- Izdvojiti najuspješnije oprašivače sorte ‘Lastovka’ u poljskim uvjetima određivanjem roditeljstva iz embrija;
- Povezati kompatibilan/nekompatibilan odgovor nakon provedbe kontroliranih oprašivanja s promjenama u transkriptomu te izdvojiti ključne gene specifičnih odgovora;
- Predložiti najuspješnije kombinacije sorti kod planiranja podizanja nasada.

Ocjena rada u tijeku!

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalni nasad maslina u Kaštel Starom

Istraživanje je provedeno tijekom 2019., 2020. i 2021. godine u eksperimentalnom nasadu Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Kaštel Starom (43°33'26" N, 16°21'8" E) (Slika 7). U nasadu su zastupljene autohtone sorte masline (‘Drobnica’, ‘Karbunčela’, ‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’). U neposrednoj blizini nasada nalazi se i kolekcija (udaljena 50 m) koja broji 22 introducirane (strane) sorte maslina (‘Alveriano grionl’, ‘Canino’, ‘Chemlali’, ‘Cipressino’, ‘Colombino’, ‘Farga’, ‘Fasolino’, ‘Favarol’, ‘Frantoio’, ‘Grignan’, ‘Koroneiki’, ‘Leccino’, ‘Maurino’, ‘Moraiolo’, ‘Olivastra Seggianese’, ‘Parmesana’, ‘Pendolino’, ‘Picholine’, ‘Rosciola’, ‘Santa Caterina’, ‘Sigoise’, ‘Taggiasca’). Na Slici 8 prikazana je shema nasada autohtonih i introduciranih sorti iz koje se može vidjeti da su određene sorte zastupljene s većim brojem stabala u nasadu, ali postoje i sorte sa svega jednim stablom u nasadu.

Slika 7. Položaj eksperimentalnog maslinika u Kaštel Starom. Narančastom bojom označen je nasad s introduciranim sortama, a crvenom bojom označen je nasad s autohtonim sortama (preuzeto i prilagođeno prema: https://earth.google.com/web/).

Ocjena rada

4	4	4	4	4	4	4	4	4	
4									
4		22	22	22	22	22	22		Sorta:
4			15	23	15	25	15		‘Alveriano grionl’ (1)
4		8	8	1		2			‘Canino’ (2)
4		26	26	15	23	3	3		‘Chemlali’ (3)
4		20	20	20	20	7	7		‘Cipressino’ (4)
4		27	27	27		27	27		‘Colombino’ (5)
4		17	17	17		17	15		‘Drobnica’(6)
4			21		5	5	15		‘Farga’ (7)
4		15	15	24	24	24	24		‘Fasolino’ (8)
4		18	18	18	18	18	18		‘Favarol’ (9)
4		9	9	9	9	9	9		‘Frantoio’ (10)
4		13		11	11	11	11		‘Grignan’ (11)
4		15	15	15	15		15		‘Karbunčela’ (12)
4		10	10	10	10	10			‘Koroneiki’ (13)
									‘Lastovka’ (14)
									‘Leccino’ (15)
		16	14	19	19	6	6		‘Levantinka’ (16)
		16	14	19	19	6	6		‘Maurino’ (17)
		16	14	19	19	6	6		‘Moraiolo’ (18)
		16	14	19	19	6	6		‘Oblica’ (19)
		16	14	19	19	6	6		‘Olivastra Seggianese’ (20)
		16	14	19	19	6	6		‘Parmesana’ (21)
		16	14	19	19	6	6		‘Pendolino’ (22)
		16	14	19	19	6	6		‘Picholine’ (23)
		16	14	19	19	6	6		‘Rosciola’ (24)
		16	14	19	19	6	6		‘Santa Caterina’ (25)
		16	14	19	19	6	6		‘Sigoise’ (26)
		16	14	19	19	6	6		‘Taggiasca’ (27)
		16	14	19	19	6	6	12	

Slika 8. Shema nasada autohtonih (crvana boja) i introduciranih sorti (narančasta boja) maslina u Kaštel Starom. Sorta ‘Cipressino’ zastupljena je u vjetrozaštitnom pojasu oko nasada introduciranih sorti, s ukupno 100 stabala, dok su ostale sorte na shemi prikazane prema stvarnom broju stabala unutar nasada. Praznine predstavljaju nepopunjena mjesta u nasadu.

3.2. Sortiment

Istraživanjem su obuhvaćene četiri najznačajnije autohtone sorte masline te 22 introducirane sorte masline. Sorte ‘Lastovka’, ‘Levantinka’, ‘Oblica’ i talijanska sorta ‘Leccino’ uključene su u analizu reproduktivnih procesa u cvijetu masline. Kod određivanja najuspješnijih oprašivača sorte ‘Lastovka’ korištenjem roditeljskog testa, uz prethodno navedene sorte, uključene su sve sorte u okruženju sorte ‘Lastovka’ koje su mogle biti potencijalni donori peludi. Obzirom da je ‘Oblica’ najzastupljenija, vodeća sorta u hrvatskim maslinicima na kojoj je provedeno i najviše istraživanja, a da se nju često uzgaja i autohtona sorta ‘Lastovka’, ovo je istraživanje usmjereno upravo na te dvije sorte.

Ocjena rada u tijeku!

Izdvojene istraživane sorte:

Autohtone sorte masline (Kovačević i Perica, 1994.; Barranco i sur., 2000; Bakarić i sur., 2007; Ozimec i sur., 2015)

‘Lastovka’ je sorta uljarica. Možemo je naći u području južne i srednje Dalmacije, na otocima Šolti, Hvaru i Braču te u Crnogorskom primorju. Vodeća je sorta otoka Korčule, gdje predstavlja 80 % ukupnog sortimenta. Srednje je bujnog, okruglastog rasta krošnje koji podsjeća na otvoreni kišobran. List je sitan, kopljast, tamnozelene boje lica. Plod je srednje veličine, prosječne mase oko 3 g. Karakterizira je redoviti i obilan prinos, a sadržaj ulja u plodu kreće se između 16 i 24 %. Smatra se lako ukorjenjivom sortom s godišnjom proizvodnjom oko 50 000–70 000 sadnica. Veoma je osjetljiva na niske temperature i bakterijsku bolest rak masline.

‘Levantinka’ (*sinonim*: ‘Šoltanka’) je sorta uljarica koju možemo naći u području južne i srednje Dalmacije, posebice na otoku Šolti. Razvija bujnu, okruglastu krošnju. Dugačkog je i širokog, na dnu blago uvijenog lista s tamnozelenim licem, a bjelkastim naličjem. Plod je duguljast, srednje veličine, prosječne mase oko 4 g. Redovitog je i obilnog uroda sa sadržajem ulja u plodu između 16 i 22 %. Smatra se teško ukorjenjivom sortom s godišnjom proizvodnjom od nekoliko tisuća sadnica. Veoma je osjetljiva na sušu i niske temperature.

‘Oblica’ (*sinonimi*: ‘Krupnica’, ‘Orbula’, ‘Velika’, ‘Orkula’, ‘Pitoma’, ‘Velika’, ‘Bračka’…) je naša najvažnija i najrasprostranjenija sorta prisutna u cijelom uzgojnom području masline u Hrvatskoj, ali i u Bosni i Hercegovini te Crnoj Gori. Razvija bujnu, okruglu krošnju. Ima široki, kopljasti list srednje veličine. Krupnog je i okruglog ploda, prosječne mase oko 4 g. Sadržaj ulja u plodu kreće se između 17 i 22 %. Obzirom na navedeno, koristi se za proizvodnju ulja, ali i kao stolna sorta. Za sortu ‘Oblica’ karakteristična je pojava alternativne rodnosti. Ubraja se među lako ukorjenjive sorte s godišnjom proizvodnjom oko 150–200 000 sadnica. Otporna je prema niskim temperaturama i suši, a osjetljiva na napade maslinine muhe.

Introducirane sorte maslina

‘Leccino’ je talijanska sorta koja predstavlja najzastupljeniju stranu sortu u Hrvatskoj. Sorta uljarica, prisutna u Istri od 1940. godine. Bujnog je rasta, guste krošnje. Listovi su svijetlozeleni, srednje veličine, eliptično-kopljasti. Jajoliki plodovi srednje su veličine, prosječne mase oko 2,5 g. Količina ulja u plodu može doseći do 20 %. Odlikuje se dobrom i

Ocjena rada u tijeku!

redovitom rodnošću. Pokazuje visoku tolerantnost na niske temperature, bolest paunovog oka i raka masline.

Strana kolekcija broji još 16 talijanskih sorti (‘Canino’, ‘Cipressino’, ‘Colombino’, ‘Fasolino’, ‘Favarol’, ‘Frantoio’, ‘Grignan’, ‘Leccino’, ‘Maurino’, ‘Moraiolo’, ‘Olivastra Seggianese’, ‘Parmesana’, ‘Pendolino’, ‘Rosciola’, ‘Santa Caterina’, ‘Taggiasca’). U kolekciji se nalazi sorta ‘Chemlali’ iz Tunisa, španjolska sorta ‘Farga’, grčka sorta ‘Koroneiki’, francuska sorta ‘Picholine’, ‘Sigoise’ iz Alžira te sorta ‘Alveriano grionl’ koja je u postojećim shemama nasada navedena pod tim imenom, no ovaj naziv nije potvrđen u znanstvenoj literaturi.

3.3. Praćenje fenofaze cvatnje istraživanih sorti masline i dijagram cvatnje

Tijekom mjeseca svibnja i lipnja 2019., 2020., i 2021. godine praćeno je trajanje fenofaze cvatnje svih sorti uključenih u istraživanje prema RESGEN metodologiji za sekundarnu karakterizaciju masline (Barranco i sur., 1994). Svakoga dana u razdoblju cvatnje, bilježene su promjene na stablima vizualnim pregledom stabala sa svih strana krošnje.

U fenofazi cvatnje, razlikuju se četiri razvojna stadija:

1. uočava se odvajanje čaške cvijeta i vijenčića te se izduljuje cvjetna stapka (oznaka stadija = **E**);

2. početak cvatnje: otvaranje prvih cvjetova u cvatu masline nakon promjene boje iz zelene u bijelu - „faza bijelih glavica“ (oznaka stadija = **F**) (Slika 9);

3. puna cvatnja: otvorena je većina cvjetova u cvatu (oznaka stadija = **F1**) (Slika 10);

4. kraj cvatnje: latice poprimaju smeđu boju i otpadaju (oznaka stadija = **G**) (Slika 11).

Svakoga dana ocijenjen je najraniji stadij cvatnje prisutan na određenom stablu (lijeva oznaka), najprisutniji stadij cvatnje (središnja oznaka) i najodvedeniji stadij cvatnje (desna oznaka): npr. F-F1-G. Na ovaj način pokušalo se izbjeći eventualne pogreške jer se u isto vrijeme na stablu mogu naći otvoreni i zatvoreni cvjetovi u ovisnosti o svjetlosti.

Ocjena rada u tijeku!

Slika 9. Početak cvatnje (F).

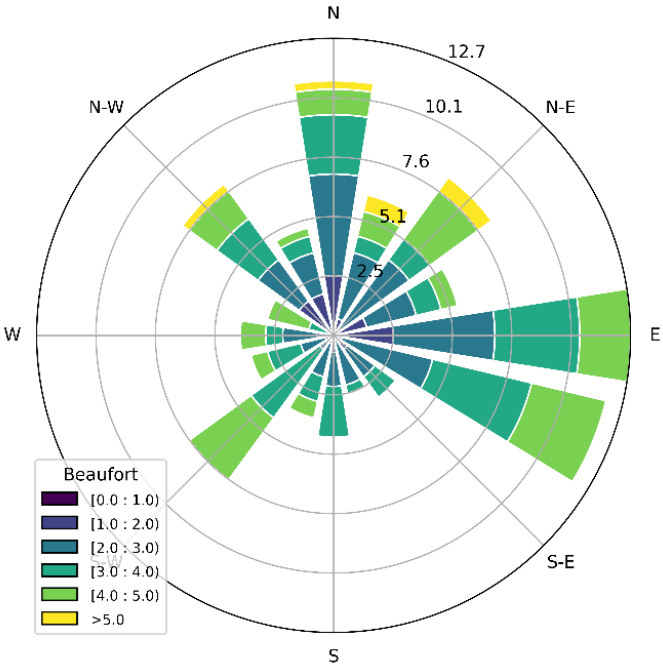
Slika 10. Puna cvatnja (F1).

Ocjenjivanje u tijeku!

Slika 11. Kraj cvatnje (G).

Nakon završetka praćenja fenofaze cvatnje, izrađen je dijagram cvatnje za sve istraživane sorte masline te su posebno naznačena razdoblja pune cvatnje u kojima se intenzivno odvija stranooprašivanje među sortama.

S obzirom da je riječ o anemofilnoj vrsti, podaci o smjeru i jačini vjetra (Beaufortova skala) u 2019., 2020. i 2021. godini preuzeti su od strane Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ, postaja Kaštela) kako bi se procijenio mogući utjecaj vjetra na smjer i uspjeh prijenosa peludi i tumačenje rezultata analize roditeljstva u poglavlju „Rasprava“ (Slika 12).



Slika 12. Ruža vjetrova za mjesec svibanj - razdoblje cvatnje (2019., 2020, 2021. godina).

Ocjena rada u tijeku!

3.4. Analiza fenoloških i klimatskih parametara

Podaci o dnevnim satnim temperaturama u vrijeme cvatnje i periodu koji prethodi cvatnji u tri eksperimentalne godine (2019. godina, 2020. godina i 2021. godina) prikupljeni su putem meteorološke postaje Split - Marjan i ustupljeni od strane DHMZ. U podacima je postojao veoma mali broj praznina koje su popunjene tako da je za svaku prazninu korištena aritmetička sredina krajnjih vrijednosti koje je okružuju. Na taj način osiguran je vremenski kontinuitet bez značajnih odstupanja u odnosu na izvorne podatke.

Akumulacija hladnih sati izračunata je prema modificiranom 'Chilling hours' modelu (Weinberger, 1950), u kojem su svi sati s temperaturom ≤ 7,2 °C smatrani učinkovitima za akumulaciju hladnih sati. Budući da su negativne temperature u analiziranom razdoblju bile rijetke i s malim odstupanjima od 0 °C, u izračun su uključene zajedno s pozitivnim temperaturama. Izračun akumulacije započeo je 1. studenog svake godine, a vrijednosti su određene zasebno za razdoblja koja završavaju krajem siječnja (CH1), veljače (CH2), ožujka (CH3) i travnja (CH4).

Nakon završetka razdoblja akumulacije hladnih sati, praćena je faza akumulacije sati toplinskih jedinica. Izračun sati toplinskih jedinica potrebnih za ulazak pojedine sorte u razdoblje cvatnje započeo je od 1. ožujka. Akumulacija sati toplinskih jedinica izračunata je prema pojednostavljenom (linearnom) 'GDH modelu' (Richardson i sur., 1975), pri čemu je za svaku satnu vrijednost višu od bazne temperature (T_b) toplinska akumulacija određena kao razlika između zabilježene temperature i bazne vrijednosti. U analizi je korišteno pet baznih temperatura: 8° C; 9,2 °C; 10 °C; 11 °C i 12,5 °C (GDH8; GDH9,2; GDH10; GDH11; GDH12,5), odabranih prema prethodnim istraživanjima o toplinskim zahtjevima masline (Galán i sur., 2005; Vuletin Selak i sur., 2018), dok je vrijednost 8 °C uključena kao dodatni prag u ovom istraživanju. Dobivene satne vrijednosti su zbrojene kako bi se odredila ukupna akumulacija sati toplinskih jedinica (GDH).

3.4.1. Statistička analiza fenoloških i klimatskih parametara

Za grupiranje sorti masline prema fenološkim i klimatskim parametrima provedena je K-means klaster analiza. U analizu je uključeno 27 sorti masline. Podaci o svakoj sorti prikupljeni su tijekom tri uzastopne godine istraživanja (2019., 2020. i 2021.), čime je formirana ukupno 81 kombinacija sorta x godina, a osnovna jedinica analize bila sorta. Kao varijable su korištene: (i) broj dana u godini od 1. siječnja do početka razdoblja cvatnje (DPC), (ii)

Ocjena rada u tijeku!

akumulirani sati toplinskih jedinica izračunati prema GDH modelu za pet temperaturnih pragova (8 °C (GDH8), 9,2 °C (GDH9,2), 10 °C (GDH10), 11 °C (GDH11) i 12,5 °C (GDH12,5)) te (iii) akumulacija hladnih sati, pri čemu CH1, CH2, CH3 i CH4 predstavljaju akumulirane hladne sate u razdoblju od 1. studenog do kraja siječnja, veljače, ožujka, odnosno travnja.

Analize su provedene u programskom jeziku Python (verzija 3.x), korištenjem paketa scikit-learn (verzija 1.7.2; Pedregosa i sur., 2011), a za K-means klaster analizu korišten je modul sklearn.cluster. Za svaki od 6 klastera izračunate su centroidne vrijednosti, definirane kao prosječne vrijednosti uključenih parametara za sorte unutar određenog klastera, a iste su vizualizirane su u obliku heat mape primjenom skale boja (plava-žuta-crvena).

Za dodatnu interpretaciju čimbenika koji određuju grupiranje sorti provedena je analiza stabla odluke (*engl*. Decision tree Classifier) korištenjem modula sklearn.tree unutar paketa scikit-learn (verzija 1.7.2; Pedregosa i sur., 2011) u programskom jeziku Python (verzija 3.x). Kao kriterij podjele korišten je Gini indeks, a maksimalna dubina stabla postavljena je na 6.

3.5. Kontrolirana oprašivanja

U svrhu istraživanja reproduktivnih procesa (uspjeh klijanja, rast (prorastanje) i razvoj peludnih mješinica te uspjeh zametanja plodova) u 2020. i 2021. godini, provedena su kontrolirana oprašivanja sorte ‘Lastovka’ i sorte ‘Oblica’ u razdoblju punce cvatnje.

3.5.1. Priprema stabala i provedba kontroliranih oprašivanja

Neposredno pred cvatnju, izdvojeno je pet stabala sorte ‘Lastovka’ i pet stabala sorte ‘Oblica’ koja su se istaknula velikim brojem formiranih cvatova. Na svakom stablu odabrane su četiri grane s najvećim brojem cvjetova u fazi pred otvaranjem (najmanje 10 cvatova po grani) te su im uklonjeni već otvoreni cvjetovi. Grane su izolirane papirnatim vrećicama koje omogućuju izmjenu plinova, štite od kiše i ulaska strane peludi (Slika 13). Sljedećeg dana prikupljena je pelud svih sorti oprašivača. S izoliranih grana uklonjeni su zatvoreni cvjetovi, a otvoreni cvjetovi oprašeni su pomoću kista, nanošenjem peludi na njušku tučka (Slika 14) te su grane ponovno izolirane. Sorta ‘Lastovka’ oprašena je sa vlastitom peludi (‘Lastovka’ (La) x La), s peludi sorte ‘Oblica’ (La x ‘Oblica’ (O)) te s peludi sorte ‘Levantinka’ (La x ‘Levantinka’ (Le)). Sorta ‘Oblica’ oprašena je s vlastitom peludi (O x O), s peludi sorte ‘Lastovka’ (O x La),

Ocjena rada u tijeku!

‘Levantinka’ (O x Le) te sorte ‘Leccino’ (O x ‘Leccino’ (Lec)). U slučaju samooplodnje, trebalo je paziti da se pelud prikupila sa stabla na kojem se izvodilo oprašivanje.

Slika 13. Grane masline izolirane papirnatim vrećicama.

Slika 14. Provedba kontroliranih oprašivanja nanošenjem peludi kistom na njušku tučka.

Ocjenjivanja

3.5.2. Priprema cvjetova za analizu pod fluorescentnim mikroskopom

Svakoga dana, tijekom četiri uzastopna dana nakon oprašivanja (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) prikupljeno je 20 cvjetova po tretmanu oprašivanja koji su fiksirani u prethodno pripremljen FAA fiksativ (formalin, ledena octena kiselina, 70% etanol u omjeru 1:2:17) prema Cuevas i sur. (1994b).

Prije analize reproduktivnih procesa pod fluorescentnim mikroskopom, cvjetove treba pripremiti prema predloženoj metodologiji:

1. Ispiranje fiksativa 2-3 sata pod laganim mlazom vode;

2. Omekšavanje cvjetova u 0,8 M natrijevoj lužini (NaOH) tijekom 4-6 h modificirano iz Cuevas i sur. (1994b). Dulje omekšavanje cvjetova u NaOH ili korištenje veće koncentracije NaOH negativno utječe na tkivo jer postaje mekano i krhko čime se otežava rad;

3. Ispiranje 0,8 M NaOH iz cvjetova pod laganim mlazom vode 12-24 h;

4. Razdvajanje njuške i vrata tučka od plodnice te izdvajanje četiri sjemena zametka iz plodnice pod stereomikroskopom Stemi DV4 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany);

5. Bojanje njuške i vrata tučka i sjemenih zametaka u 0,1 % anilin blue boji pripremljenoj u fosfatnom puferu (pH=11,7).

3.5.2.1. Analiza reproduktivnih procesa u cvijetu masline pod fluorescentnim mikroskopom

Uspjeh klijanja peludi na njušci tučka, rast i razvoj peludnih mješinica u vratu tučka te dolazak peludnih mješinica do sjemenog zametka (oplodnja) analizirani su pod fluorescentnim mikroskopom Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Germany) uz korištenje Carl Zeiss filter seta 18 (FT 425 nm, LP 450 nm) i Zen software-a za analizu slike (Carl Zeiss, Germany).

Određen je broj peludnih zrnaca i broj proklijalih peludnih zrnaca na jednoj strani njuške tučka. Kako bi se odredio ukupan broj peludnih zrnaca i ukupan broj proklijalih peludnih zrnaca na ukupnoj površini njuške tučka, bilo je potrebno dobivene vrijednosti na jednoj strani njuške tučka uvećati dva puta. U slučaju prevelikog broja peludnih zrnaca, odredio se broj peludnih zrnaca i proklijalih peludnih zrnaca na tri vidna polja sa desne i lijeve strane tučka te u dnu vrata tučka. Za izračun ukupnog broja peludnih zrnaca napravilo se preračunavanje na ukupnu površinu njuške tučka prema Griggs i sur. (1975). Zahvaljujući ovim podacima, odredio se postotak klijavosti na njuški tučka kod obje sorte u različitim vremenima. Za potrebe analize

Ocjena rada u tijeku!

rasta i razvoja peludnih mješinica, napravio se tzv. „squash“ preparat njuške i vrata tučka laganim pritiskom preko pokrovnog stakalca. Rezultat je izražen kao postotak cvjetova kod kojih je zabilježen rast peludne mješinice do dna vrata tučka nakon 24 h, 48 h, 72 h i 96 h. Uspjeh oplodnje izražen je kao postotak cvjetova kod kojih je najmanje jedna peludna mješinica uspjela doći do mikropile određenog sjemenog zametka nakon 24 h, 48 h, 72 h i 96 h. Dobiveni rezultati obrađeni su analizom varijance (ANOVA) pomoću statističkog programa SPSS (IBM, i.21), pri čemu su kao čimbenici uključeni oprašivač i vrijeme nakon oprašivanja. Značajnost razlika između srednjih vrijednosti utvrđena je LSD testom ($p < 0,05$).

3.6. Roditeljski test

U svrhu određivanja potencijalnih roditelja plodova sorte ‘Lastovka’, prikupljeno je od 50 - 69 plodova s pet odabranih majčinskih stabala na kojima su primijećeni visoki prinosi u listopadu 2019. i 2020. godine. Plodovi su prikupljeni sa svih strana krošnje (sjever, jug, istok, zapad), a na raspolaganju je bilo ukupno 619 plodova (embrija): 329 iz 2019. godine i 290 iz 2020. godine.

3.6.1. Izolacija DNA iz embrija i listova

Za izolaciju DNA iz embrija masline korištena je modificirana metoda prema Guerin i Sedgley (2007). U 4. i 6. koraku produljeno je vrijeme centrifugiranja, a u 5. koraku produljeno je vrijeme inkubacije u zamrzivaču s 30 min na 1,5 h.

Postupak izolacije DNA iz embrija masline uključuje sljedeće korake:

1. Plodovima masline skalpelom se odstrani mezokarp te se pomoću škripca razbije endokarp. Skalpelom se prepolovi endosperm te se embrij pincetom prenese u „safe lock“ 2 mL mikroepruvetu (Slika 15).

2. Tkivo se homogenizira pomoću plastičnog tučka uz dodatak 500 µl ekstrakcijskog pufera [100 mM tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS-HCl; pH 8,0), 20 Mm etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; pH 8,0) i 4 mg/ml natrijevog dietilditiokarbamata, koji se doda pred upotrebu]. Tako pripravljen uzorak pohrani se na ledu, dok se ne pripreme svi uzorci.

3. Uzorci se inkubiraju u vodenoj kupelji 10 min pri 65 ºC. Zatim se uzorcima doda 500 µl lizirajućeg pufera [100 mM (TRIS-HCl; pH 8,0), 20 mM (EDTA; pH 8,0), 1 M natrijev klorid (NaCl), 2 % natrijev dodecil-sulfat (SDS) te 1 % natrijev metabisulfit, koji se doda pred

Ocjena rada u tijeku!

upotrebu]. Uzorci se ponovno inkubiraju u vodenoj kupelji 30 min pri 65 ºC, pri čemu ih potrebno lagano promiješati svakih 10 min.

4. Mikroepruvete se kratko prenesu na led (dok se ne priprave svi uzorci) te se uzorku doda 1 ml fenol-kloroform-izoamilnog alkohola, pripravljenog u omjeru 25:24:1, a zatim se vorteksiraju. Uzorci se centrifugiraju (Hettich Universal 320 R, Njemačka) 20 min brzinom od 14 000 x g pri 4 ºC. Ovaj korak ponovi se dva puta.

5. Supernatant se prenese u novu mikroepruvetu od 1,5 ml te mu se doda 500 µl ledeno hladnog izopropanola. Uzorci se inkubiraju 1 h i 30 min na –20 ºC.

6. Uzorci se kratko ostave na sobnoj temperaturi te se vorteksiraju. Slijedi centrifugiranje uzoraka 15 min na 14 000 × g pri 4 ºC.

7. Supernatant se otpipetira, a DNA ispere pomoću 1 ml 76 % etanola. Laganim pokretom po mikroepruveti, DNA se odvoji od nje te se centrifugira 5 min brzinom od 14 000 × g pri 4 ºC.

8. Etanol se odbaci te se talog DNA posuši stajanjem na zraku. DNA se otopi u 50 µl TE-pufera [10 mM (TRIS-HCl; pH 8,0), 1 mM (EDTA; pH 8,0)]. Ostavi se preko noći pri 4 ºC kako bi se sva otopila, a potom se pohrani u zamrzivaču pri -20 ºC.

Slika 15. Prvi korak izolacije DNA iz embrija masline (Baruca Arbeiter, 2017).

Original rad!

Obzirom da je tkivo embrija bogato polisaharidima i fenolnim spojevima koji ometaju amplifikaciju biljega, uzorke DNA bilo je potrebno dodatno pročistiti kako bi dobili visokokvalitetnu DNA i dovoljne koncentracije DNA potrebne za uspješnu PCR amplifikaciju (Zienkiewicz i sur., 2014; Zafra i sur., 2018) prema cetil trimetil amonijev bromid–polivinilpirolidon (CTAB–PVP) protokolu (Japelaghi i sur., 2011) uz modifikacije opisane u Miklavčič Višnjevec i sur. (2017).

Postupak je sadržavao sljedeće korake:

1. Prethodno izolirana DNA pročisti se pomoću 400 µL CTAB–PVP ekstracijskog pufera [(2% (w/v) CTAB, 2% (w/v) topivi PVP, 2 M NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 300 mM Tris–HCl (pH 8.0), 2% (w/v) β-merkaptoetanol).

2. Uzorci se inkubiraju 10 min pri 65 ºC, a zatim se doda 200 µL fenol-kloroform-izoamilnog alkohola (25:24:1). Kratko se vorteksiraju, a potom centrifugiraju 10 min brzinom 14,000 × g. Ovaj korak se ponovi još jednom. Po završetku, supernatant se prenese u mikroepruvetu od 1,5 mL.

3. Taloženje DNA postiže se pomoću 30 µL 3 mM natrijevog acetata i 300 µL ledenog hladnog izopropanola. Uzorci se vorteksiraju i pohrane 30 min u zamrzivaču na -80 ◦C, a zatim slijedi centrifugiranje 30 min brzinom 14,000 × g.

4. Supernatant se odbaci, a DNA talog se ispere pomoću 500 µL 70% etanola. DNA se laganim pokretom po mikroepruveti odvoji od nje te se centrifugira 5 min brzinom 14 000 × g i pri 4 ºC.

8. Etanol se odbaci te se talog DNA posuši stajanjem na zraku. DNA se otopi u 50 µl TE-pufera [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Ostavi se preko noći na 4 ºC kako bi se sva otopila, potom se pohrani u zamrzivaču na -20 ºC.

Uz plodove, u nasadu su uzorkovani listovi svih sorti potencijalnih donora peludi koji su pohranjeni u frižideru na 4 ºC do izolacije DNA narednog dana. Ukupna DNA iz listova izolirana je pomoću CTAB–PVP protokola (Japelaghi i sur., 2011) uz modifikacije opisane u Miklavčič Višnjevec i sur. (2017).

Mjerenje koncentracije i čistoća izolirane DNA svih uzoraka određena je korištenjem Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotometra (Thermo Scientific, SAD).

Ocjena rada u tijeku!

3.6.2. Genotipizacija

Uzorci embrija i listova potencijalnih donora peludi analizirani su pomoću sedam mikrosatelitnih biljega: ssrOeUA-DCA-(3, 9, 11, 16) (Sefc i sur., 2000), GAPU101 (Carriero i sur., 2002), EMO3 (De La Rosa i sur., 2002) i UDO99–019 (Cipriani i sur., 2002). Reakcijska smjesa za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa za jedan uzorak od 15 µl sadržavala je 1x reakcijski pufer; 2 mM $MgCl_2$; 0,2 mM mješavinu deoksiribonukleozid trifosfata - dNTP-ova (Promega); 1,25 jedinica Taq polimeraze (Promega); 0,2 µM svake oligonukleotidne specifične početnice (forward i reverse); 0,25 µM treće univerzalne početnice M13(−21) (Schuelke, 2000) obilježene sa 6-FAM, VIC, PET ili NED fluorescentnom bojom (Applied Biosystems, SAD) te 40 ng DNA svakog od potencijalnih donora peludi ili 4 µl nerazrijeđene DNA embrija masline. Umnožavanje mikrosatelitnih regija (Tablica 1) lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u uređaju Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, SAD) prema tzv. *two-step touch down* protokolu: početna denaturacija 5 minuta na 94 ºC, zatim 5 ciklusa ponavljanja tri temperature: 30 sekundi na 94 ºC, 30 sekundi na 57 ºC i elongacija 30 sekundi na 72 ºC (uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1 °C). Drugi korak amplifikacije podrazumijeva 30 ciklusa 30 sekundi na 94 ºC, 30 sekundi na 52 ºC i 30 sekundi na 72 ºC. Završni korak elongacije izveden je 8 min na 72 ºC. *Touch down* faza podrazumijeva postupno snižavanje temperature u svakom sljedećem ciklusu i omogućuje specifičnije vezanje početnica na DNA kalup te poboljšava ukupnu amplifikaciju fragmenata.

Tablica 1. Popis korištenih mikrosatelitnih biljega i njihove sekvence.

Mikrosatelitni lokus	Sekvenca početnice (5'-3')	Ponavljajući motiv
ssrOeUA-DCA-3	F: *CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC R: TGCTTTTGTCGTGTTTGAGATGTTG	$(GA)_{19}$
ssrOeUA-DCA-9	F: *AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTCG R: GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	$(Ga)_{23}$
ssrOeUA-DCA-11	F: *GATCAAACTACTGCACGAGAGAG R: TGTCTCAGTGAACCCTTAAACC	$(GA)_{26}(GGGA)_4$
ssrOeUA-DCA-16	F: *TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG R: TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC	$(GT)_{13}(GA)_{29}$
GAPU101	F: *CATGAAAGGAGGGGGACATA R: GGCACTTGTTGTGCAGATTG	$(GA)_8(G)_3(AG)_3$
EMO3	F: *GGTGTAGCCCAAGCCCTTAT R: GCATGACCGTGGTGTAAGT	$(CA)_7$
UDO99-019	F: *CCCTTGTAGCCTCGTCTTG R: GGCCTGATCATCGATACCTC	$(GT)_{20}(AT)_5$

* - SSR biljezi su produljeni za M13 (-21) 18 pb sekvencu (5’-TGTAAAACGACGGCCAGT-3’) na 5’ kraju

Ocjena rada u tijeku!

3.6.2.1. Detekcija mikrosatelitnih alela kapilarnom elektroforezom

Umnoženi mikrosatelititni produkti detektirani su pomoću automatskog sekvencera SeqStudioTM Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD). 1 µl umnoženih mikrosatelitnih produkata nakon lančane reakcije polimerazom smješteno je u ABI mikrotitarske ploče s 96 mjesta, a zatim je svaki uzorak pomiješan s 10,7 µl Hi-Di™ formamida i 0,5 µl GeneScan™ 500 LIZ standarda (Thermo Fisher Scientific, SAD). Na ploču se stavi poklopac i kratko centrifugira. Reakcijska smjesa denaturirana je tijekom 3 minute na 95 °C i prenesena u zamrzivač 10 min. Duljine mikrosatelita umnoženih lančanom reakcijom polimerazom detektirane su pomoću kapilarne elektroforeze, a rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka. Pregledavanje elektroferograma i utvrđivanje alelnih vrijednosti (*engl*. allele scoring) izvršeno je softverskim paketom GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, USA).

3.6.2.2. Statistička analiza

U prvom dijelu analize, dobiveni su referentni profili svih potencijalnih donora peludi, a zatim su genotipizirani svi embriji. U drugom dijelu, provedena je roditeljska analiza svih embrija uključenih u istraživanje zahvaljujući kojoj su identificirani svi potencijalni donori peludi koristeći program CERVUS 3.0 (Kalinowski i sur., 2007). Na temelju podataka dobivenih genotipizacijom pomoću sedam mikrosatelitnih biljega, izračunati su parametri genetske varijabilnosti i informativnosti mikrosatelitnih lokusa za embrije u obje eksperimentalne godine i za 27 potencijalnih oprašivača. Za analizu je korišten računalni program GenAlEx v.6.5.1 (Peakall i Smouse, 2006; 2012). Izračunati su sljedeći parametri:

- ukupan broja alela po lokusu (N_a);

- broj efektivnih alela po lokusu (N_e), koji se razlikuje od stvarnog broja alela po lokusu jer uključuje frekvenciju (učestalost) pojedinih alela i računa se prema formuli:

$$N_e = (\sum p_i^2)^{-1}$$

gdje je p_i frekvencija tog i alela na promatranom lokusu (Morgante i sur., 1994);

- opažena heterozigotnosti (H_o), definirana kao omjer broja heterozigotnih jedinki i ukupnog broja genotipova za svaki lokus;

Ocjena rada u tijeku!

- očekivana heterozigotnosti (H_e), odnosno udio jedinki koje bi bile heterozigotne pod uvjetom da se između njih dogodi slučajno križanje (Nei, 1987), prema formuli:

$H_e = 1 - \sum p_i^2$.

Na temelju svih analiziranih mikrosatelitnih lokusa za potencijalne oprašivače izračunata su i tri dodatna parametra:

- Shannonov informacijski indeks (I), mjera genetske raznolikosti među različitim alelima na određenom lokusu (Shannon, 1949);

- vrijednost vjerojatnosti identiteta (*engl*. Probability of Identity, PI), koja prikazuje vjerojatnost da će dvije nasumično odabrane jedinke imati isti genotip na promatranom lokusu (Paetkau i sur., 1995), prema formuli:

$\sum p_i^4 - \sum \sum (2p_i p_j)^2$

p_i i p_j frekvencije različitih i i j alela;

- vjerojatnost isključenja (*engl*. Exclusion Probability, EP), mjeri sposobnost molekularnog biljega da isključi pogrešno dodijeljeno roditeljstvo (Jamieson i Taylor, 1997).

U CERVUS 3.0 programu provedena je simulacija za koju je definiran broj potomaka (100 000), udio muških roditelja potencijalnih donora peludi (80 %), broj genotipova potencijalnih donora peludi (27) i stopa pogrješke kod dodjele najvjerojatnijeg donora peludi (1 %). Kao kriterij konačnog dodjeljivanja roditeljstva korištena je kritična LOD (*engl*. logarithm of the likehood ratio) vrijednost dobivena simulacijom uz višu razinu pouzdanosti (95%). Svim embrijima je bio poznat genotip majke - sorta 'Lastovka'. Genotip potencijalnog donora peludi s najvećom LOD vrijednosti poviše praga (koji je definiran na temelju simulacije) za određeni par roditelj-potomak smatrao se najvjerojatnijim polen donorom. LOD vrijednosti uspoređuju vjerojatnost da je određeni potencijalni donor peludi stvaran donor za određeni embrij s vjerojatnošću da su donor peludi i embrij nepovezani.

Odnos između broja embrija dobivenim oprašivanjem i oplodnjom sorte 'Lastovka' s određenim donorom peludi i broja stabala kojima je svaki potencijalni donor peludi zastupljen u nasadu, broja embrija dobivenim oprašivanjem i oplodnjom sorte 'Lastovka' s određenim donorom peludi i udaljenosti stabala potencijalnih donora peludi i sorte 'Lastovka' te odnos broja embrija dobivenim oprašivanjem i oplodnjom sorte 'Lastovka' s određenim donorom peludi i broja dana u zajedničkoj cvatnji određenog donora peludi sa sortom 'Lastovka'

Ocjena rada u tijeku!

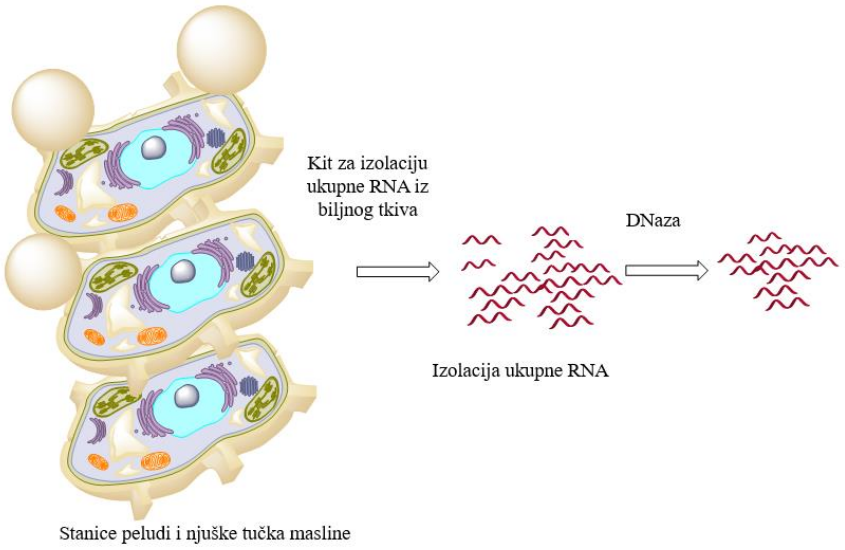
prikazani su pomoću korelacijske analize. Za potrebe analize, izračunata je udaljenost (m) od središnjeg stabla sorte 'Lastovka' do najbližeg stabla svakog potencijalnog donora peludi. Statistička obrada i Pearsonov koeficijent korelacije (r) dobiveni su korištenjem statističkog programa SPSS (IBM, i.21).

3.7. Analiza transkriptoma tkiva tučka masline nakon samooprašivanja i stranooprašivanja

U svrhu određivanja transkriptoma tkiva tučka nakon tretmana samooprašivanja sorte 'Oblica' ('Oblica' x 'Oblica'; O x O) i stranooprašivanja sorte 'Oblica' s peludi sorte 'Levantinka' (O x L), provedena su navedena kontrolirana oprašivanja u svibnju 2019. godine. Prikupljena je pelud ove dvije sorte, cvjetovi sorte 'Oblica' su emaskulirani (odstranjeni su im prašnici), odstranjene su im latice te je oprašivanje provedeno uz pomoć kista. Sedam sati nakon oprašivanja, prikupljeni su cvjetovi, fiksirani u tekućem dušiku i pohranjeni na –80 ºC do daljnje analize.

3.7.1. Izolacija ukupne RNA iz tkiva masline

Ekstrakcija ukupne RNA iz tkiva tučka provedena je koristeći *RNeasy Plant mini kit* (Qiagen, Njemačka) za izolaciju ukupne RNA iz biljnih stanica i tkiva filamentoznih gljiva prema uputama proizvođača. RNA je izolirana iz ukupno 18 uzoraka. Shematski prikaz izolacije ukupne RNA nalazi se na Slici 16.



Slika 16. Izolacija ukupne RNA molekule i tretman DNazom.

Ocjena rada u tijeku!

Protokol za izolaciju ukupne RNA

1. Usitnjavanje biljnog materijala

• Odvaže se otprilike 70 miligrama tkiva tučka masline i prenese u prethodno autoklavirane tarionike. Tkivo se usitni uz dodatak tekućeg dušika i prenese u mikroepruvete od 2 mL.

2. Liziranje i homogeniziranje biljnog materijala

• Doda se 450 µL pufera za lizu stanica RLT, u koji je prethodno dodan β-merkaptoetanol (u omjeru 10 µl β-merkaptoetanola na 1 mL pufera RLT), nakon čega se sadržaj mikroepruvete homogenizira vorteksiranjem.

• Uzorci se kratko inkubiraju (1-3 min) na 65 °C u uređaju Dry Block Heating Thermostat, BioSan.

• Sadržaj iz epruveta se prenese u kolone namijenjene homogeniziranju uzoraka (QIA shredder, Qiagen) te se centrifugira 2 min brzinom na maksimalnoj brzini uz hlađenje pri 4 °C. Ovim postupkom uklone se grubi stanični dijelovi te se postiže dodatna homogenizacija uzorka. Dobiveni supernatanti određenog volumena preneseni su u nove mikroepruvete, pri tom pazeći da ne se ne dotakne talog te se svaki pomiješa s 0,5 volumena (obično oko 225 µl) 96-100 % etanola i promiješa uz pomoć pipete. Na ovaj način stvore se uvjeti za selektivno vezanje RNA molekula na membrane od silika gela.

3. Vezanje RNA na membranu od silika-gela

• Cijeli sadržaj uzorka iz mikroepruvete (otprilike 650 µl) prenese se na kolonu s RNeasy membranom od silika-gela stavljenu na mikroepruvetu od 2 mL i centrifugira 15 s pri 8000 × g. Dobiveni eluat se odbaci, a kada je početni volumen veći od 700 µl, ponovi se ovaj postupak.

Radi uklanjanja potencijalno zaostalih molekula DNA prilikom izolacije RNA, nastavi se s s RNase-Free DNase protokolom (Qiagen, Njemačka).

D1. Doda se 350 µl pufera RW1 na kolonu s RNeasy membranom od silika-gela te se nakon 1 min centrifugira 15 s brzinom 8000 × g nakon čega se eluat ukloni iz mikroepruvete kako bi se mogla ponovno koristiti.

D2. Doda se 10 µl stock otopine DNAaze 1 u 70 µl pufera RDD te se lagano promiješa okretanjem.

Ocjena rada u tijeku!

D3. 80 µl pripremljene otopine DNAaze 1 i 80 µl pufera RDD doda se direktno na membranu te inkubira 20 min pri temperaturi od 20-30 ºC.

D4. Nakon dodatka 350 µl pufera RW1 na membranu treba pričekati 3 min te centrifugirati 15 s brzinom 10 000 × g. Eluat/filtrat se odbaci te se na kolonu stavi nova mikroepruveta od 2 mL.

D5. Doda se 500 µl pufera RPE (u koji se prethodno doda etanol u omjeru 1 : 4) na membranu te se centrifugira 15 s brzinom 10 000 × g i po završetku se odbaci eluat.

D6. Još jednom se doda 500 µl pufera RPE te se centrifugira 2 min na maksimalnoj brzini kako bi se uklonio sav etanol s membrane. Eluat se odbaci te se na kolonu stavi nova mikroepruveta od 1,5 mL.

D7. RNA se eluira s 30 µl ultra-čiste vode (RNase free-water) centrifugiranjem 1 min brzinom 10 000 × g.

Koncentracija i kvaliteta izolirane RNA izmjeri se spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer N60 (Implen, Njemačka).

3.7.2. RNA sekvenciranje

Određivanje primarne strukture transkriptoma nakon tretmana samoprašivanja (O x O) i stranoprašivanja (O x L) s ciljem identifikacije specifičnih kandidat gena koji sudjeluju u regulaciji samoinkompatibilnosti kod masline metodom RNA sekvenciranja (RNA-seq) obavljeno je u MGX-Montpellier GenomiX servisu (Francuska). Iako je RNA izolirana iz većeg broja uzoraka, sekvencirano je ukupno 6 uzoraka s tri različita stabla sorte 'Oblica' koji su ispunjavali standarde visoke čistoće, koncentracije i kvalitete, uključujući 3 uzorka tretmana samoprašivanja i 3 uzorka tretmana stranoprašivanja (Tablica 2).

Tablica 2. Odabrani RNA uzorci iz tretmana samoprašivanja (O x O) i stranoprašivanja (O x L). Prvi broj unutar oznake tretmana označava red u nasadu u kojem se nalazi stablo, a drugi broj predstavlja redni broj stabla u pojedinom redu.

Uzorak	Oznaka tretmana
2	3/3 O x O
4	4/8 O x O
7	4/8 O x L
11	3/1 O x L
14	3/8 O x O
16	3/3 O x L

Ocjena rada u tijeku!

3.7.2.1. Priprema knjižnice za sekvenciranje

Knjižnica za sekvenciranje pripremljena je korištenjem komercijalnog kompleta Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation (Illumina, SAD) prema uputama proizvođača. Protokol uključuje navedene korake:

1. Obogaćenje (*engl*. enrichment) mRNA molekula pomoću oligo(dT) početnica imobiliziranih na magnetnim zrncima;

2. Kemijska fragmentacija odabranih mRNA molekula;

3. Prevođenje fragmenata mRNA molekula u jednolančane cDNA molekule pomoću nasumičnih početnica i SuperScript II reverzne transkriptaze u prisutnosti aktinomicina D, čime se inhibira DNA-ovisna transkripcija i povećava specifičnost lanca (*engl.* strand specificity);

4. Sinteza drugog lanca cDNA fragmenata uz korištenje dUTP-a (deoksiuridin-trifosfata) umjesto dTTP-a (deoksitimidin-trifosfata) čime se onemogućuje daljnja amplifikacija u kasnijim koracima;

5. Adenilacija 3' krajeva cDNA fragmenata kako bi se spriječilo njihovo međusobno vezivanje tijekom ligacije adaptorskih sekvenci i fosforilacija 5' kraja;

6. Ligacija specifičnih adaptorskih sekvenci na oba kraja cDNA fragmenata koji omogućuju imobilizaciju na protočnim ćelijama (*engl.* flow-cell) Illumina platforme za sekvenciranje;

7. PCR amplifikacija. Ovaj proces omogućuje selekciju i amplifikaciju samo onih cDNA fragmenata koje su pravilno pripremljene s adaptorima na oba kraja;

8. Kvalitativna i kvantitativna validacija knjižnice za sekvenciranje uz pomoć Fragment Analyzer uređaja uz uporabu komercijalno dostupnog Standard Sensitivity NGS kompleta prema preporukama proizvođača i qPCR uređaja (ROCHE Light Cycler 480).

<u>Adaptorske sekvence</u>

Za izradu knjižnice za sekvenciranje korišteni su jedinstveni dvojni (*engl*. unique dual, UD) index adaptori, čime je omogućeno višestruko sekvenciranje (multiplexiranje) i sigurno razdvajanje pojedinih uzoraka:

Ocjena rada u tijeku!

Index 1 (i7) adaptori

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC(i7)ATCTCGTATGCCGTCTTCTG CTTG

Index 2 (i5) adaptori

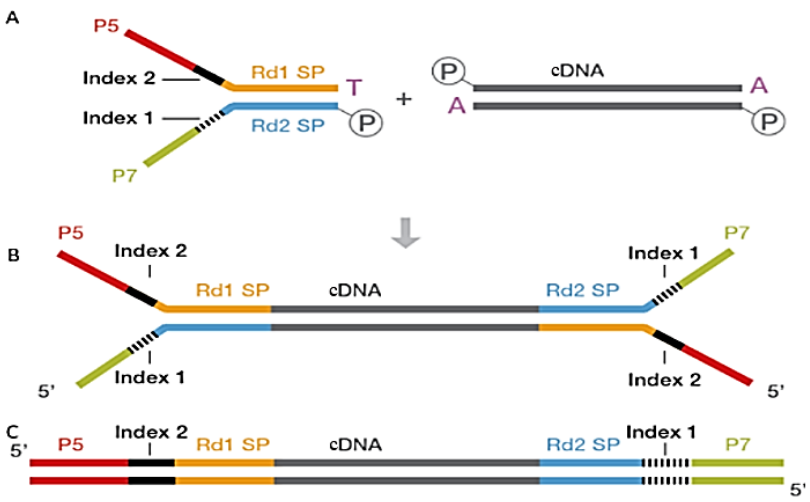
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC(i5)ACACTCTTTCCCTACACGACGCTC TTCCGATCT

Knjižnica za sekvenciranje obilježena je barkodovima (*engl.* index), i7 i i5, specifičnim sljedovima od 8 nukleotida kako bi se mogla odrediti pripadnost pojedinog fragmenta izvornom uzorku (Tablica 3). Shematski prikaz dodavanja adaptora u procesu pripreme knjižnice za sekvenciranje nalazi se na Slici 17. Iako je knjižnica za sekvenciranje pripremljena s dvojnim index adaptorima, u ovom istraživanju korištena je metoda sekvenciranja samostalnih sljedova (*engl*. single-end) pri čemu se koristila samo jedna sekvencijska početnica (Rd1 SP ili Rd2 SP).

Tablica 3. Barkodovi korišteni za označavanje uzoraka u procesu izrade knjižnice za sekvenciranje.

Uzorak	Index 1	Index 2
2	TCTCTACT	CGCGGTTC
4	CTCTCGTC	TATAACCT
7	CCAAGTCT	AAGGATGA
11	TTGGACT	GGAAGCAG
14	GGCTTAAG	TCGTGACC
16	AATCCGGA	CTACAGTT

Ocjena rada u tijeku!



Slika 17. Shematski prikaz dodavanja adaptora u procesu pripreme knjižnice za sekvenciranje. A) Priprema cDNA adenilacijom 3' kraja i fosforilacijom 5' kraja. B) Vezanje P5 i P7 sekvenci na cDNA fragmente čime je omogućeno vezanje na površinu protočne ćelije tijekom sekvenciranja. C) Pripremljena DNA knjižnica spremna za sekvenciranje (Preuzeto i prilagođeno prema: Illumina, 2020).

3.7.2.2. Sekvenciranje

Formiranje klastera i sekvenciranje provedeni su pomoću uređaja NovaSeq 6000 (Illumina, SAD) koristeći SBS metodu sekvenciranja sintezom uz uporabu komercijalnog kompleta kemikalija za sekvenciranje NovaSeq Reagent tijekom 100 ciklusa.

<u>Generiranje klastera i amplifikacija (Shematski prikaz na Slici 18 A):</u>

1. Denaturacija dvolančanih cDNA fragmenata i hibridizacija s oligonukleotidima na površini protočne ćelije koji su komplementarni adaptorskim sekvencama P5 i P7.

2. Sinteza komplementarnog reverse lanca fragmenta uz pomoć polimeraze.

3. Denaturacija dvolančanih lanaca i ispiranje originalnog forward lanca čime je omogućena hibridizacija s drugim tipom oligonukleotida prisutnih na protočnoj ćeliji.

4. Stvaranje DNA mostova i klonska amplifikacija fragmenata uz pomoć polimeraze i formiranje komplementarnog lanca. Ovaj proces se ponavlja dok god ima slobodnih oligonukleotida na površini protočne ćelije te se odvija istovremeno za milijune klastera.

Ocjena rada u tijeku!

5. Linearizacija DNA mostova, cijepanje reverse lanaca zahvaljujući restrikcijskom mjestu na P5 oligonukleotidu.

Sekvenciranje sintezom (Shematski prikaz na Slici 18 B):

Molekule cDNA unutar klastera služile su kao kalup u sekvenciranju sintezom. Knjižnice su sekvencirane na jednom kanalu protočne ćelije NovaSeq SP (*engl*. single-read prime) primjenom metode sekvenciranja samostalnih sljedova (*engl*. single-end) s duljinom očitanja od 100 nukleotida po fragmentu. U ovoj metodi koristi se samo jedna početnica koja očitava jedan kraj svakog fragmenta.

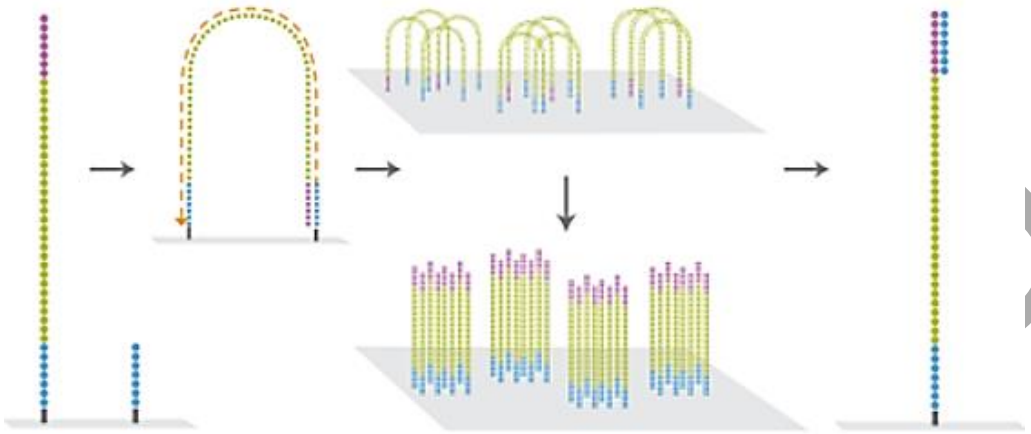
Tijekom svakog ciklusa, fluorescentno obilježeni nukleotidi ugrađuju se na temelju komplementarnosti s fragmentima unutar pojedinog klastera. Svaki nukleotid emitira karakteristični fluorescentni signal određen specifičnom valnom duljinom i intenzitetom, što omogućuje preciznu detekciju redoslijeda nukleotida. Istovremeno se očitavaju svi identični fragmenti unutar pojedinog klastera.

Svaki nukleotid ima blokadu na 3' kraju, što sprječava dodavanje novog nukleotida prije odcjepljenja reverzibilnog terminatora, čime se omogućuje kontrolirana sinteza jedne baze po ciklusu. Uređaj NovaSeq 6000 koristi dvokanalnu metodu sekvenciranja sintezom (*engl*. two - channel sequencing by synthesis) koja omogućuje detekciju svih četiriju baza korištenjem dvije fluorescentne boje i dvije snimke po ciklusu. Takav pristup ubrzava proces sekvenciranja i obrada podataka, uz održavanje visoke preciznosti i točnosti.

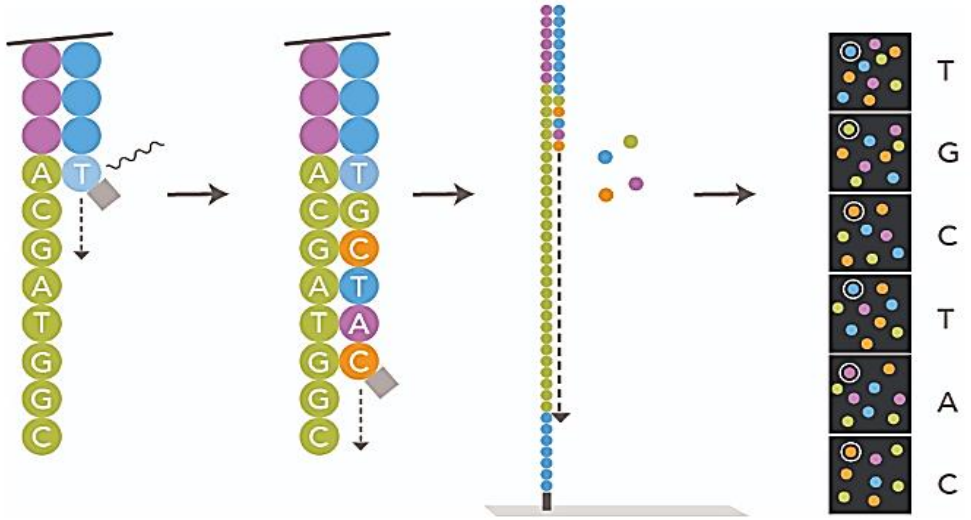
U primijenjenoj metodi, svaki klaster DNA fragmenata snima se u dvije različite valne duljine. Klasteri vidljivi samo u crvenom kanalu interpretiraju se kao C (citozin), oni vidljivi u zelenom kanalu kao T (timin) dok kombinacija crvenog i zelenog signala označava A (adenin) i vizualno se prikazuje kao žuti klaster. Klasteri bez fluorescentnog signala interpretiraju se kao G (gvanin).

Ocjena rada u tijeku!

A



B



Slika 18. Shematski prikaz procesa sekvenciranja. A) Jednolančane cDNA molekule, prethodno modificirane adaptorima, hibridiziraju s komplementarnim oligonukleotidima na površini protočne ćelije. Slijedi amplifikacija i formiranje DNA mostova tijekom koje se stvaraju kopije identičnih molekula, klasteri. B) Sekvenciranje sitezom. Tijekom svakog ciklusa, fluorescentno označeni nukleotid ugrađuje se u molekulu, emitirajući specifičan signal koji se bilježi visoko osjetljivim kamerama, dok se 3' blokator uklanja prije ugradnje sljedećeg nukleotida (Westbury, 2018).

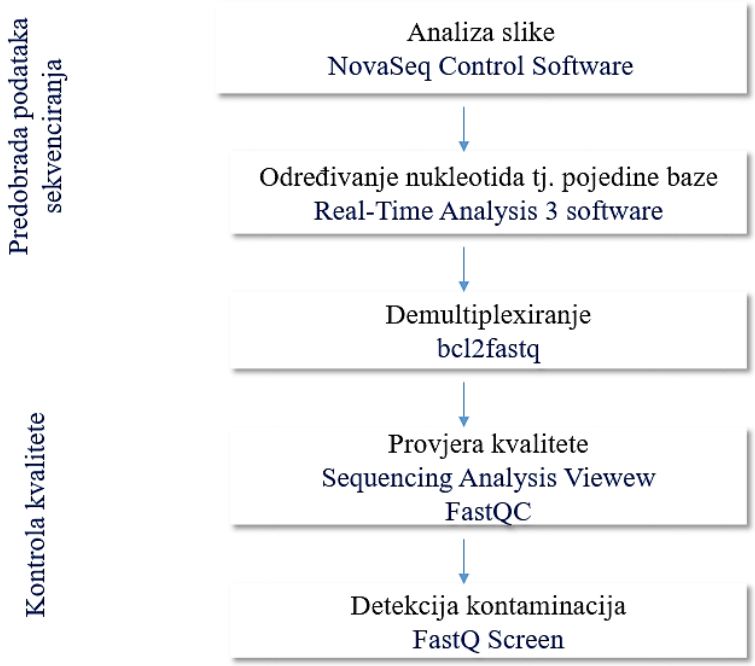
3.7.2.3. Predobrada podataka dobivenih sekvenciranjem

Obrada sirovih podataka započela je analizom slika pomoću NovaSeq upravljačkog software-a, koja je obuhvatila identifikaciju klastera na protočnoj ćeliji, mjerenje intenziteta fluorescentnih signala i procjenu prisutnih neželjenih signala. Na temelju tih mjerenja, Real-

Time Analysis (RTA) Software (Illumina) proveo je određivanje baza (*engl*. base calling) u svakom klasteru povezivanjem izmjerenih intenziteta fluorescentnih signala s odgovarajućim nukleotidnim bazama.

Demultiplexiranje (razdvajanja očitanja prema barkodu) i generiranje fastq datoteka provedeno je pomoću bcl2fastq (v2.20.0.422) software-a. Sekvence adaptora uklonjene su iz očitanja s 3' kraja sekvenci (*engl*. trimming). Sekvence sastavljene od približno 35 parova baza odgovaraju adaptorskim dimerima.

Uzorcima je prije demultipleksiranja dodan PhiX kontrolni genom, koji se koristi se za procjenu stope pogrešaka i za kalibraciju instrumenta tijekom sekvenciranja. Nakon demultipleksiranja, kontrolne PhiX sekvence uklonjene su iz uzoraka. Na Slici 19 prikazan je sažeti pregled koraka predobrade podataka i kontrole kvalitete sekvenci.



Slika 19. Predobrada i kontrola kvalitete sekvenci.

3.7.2.4. Bioinformatička obrada podataka dobivenih sekvenciranja RNA

Provjera kvalitete neobrađenih sekvenci provedena je pomoću FastQC programskog alata (v0.11.8) (Andrews, 2010). Među analiziranim parametrima bili su: Phred vrijednost, koja predstavlja mjeru kvalitete sekvenci i vjerojatnost pogreške u očitanju određene baze (Cock i sur., 2010), prosječna kvaliteta sekvenci (*engl*. sequences quality), zastupljenost svakog pojedinog nukleotida (A, T, C, G), sadržaj GC parova, udio neimenovanih baza (N) u sekvenci,

distribucija duljina sekvenci te zastupljenost dupliciranih sekvenci i prekomjerno zastupljenih sekvenci.

Analiza i identifikacija mogućih kontaminacija u sekvenciranim podacima provedena je pomoću programskog alata FastQ Screen, koji omogućuje detekciju potencijalnih kontaminacija u uzorcima (Wingett i Andrews, 2018). FastQ Screen koristi Bowtie2 alat za poravnanje (*engl*. sequence alignment) kratkih očitanja (Langmead i Salzberg, 2012) s nizom referentnih genoma.

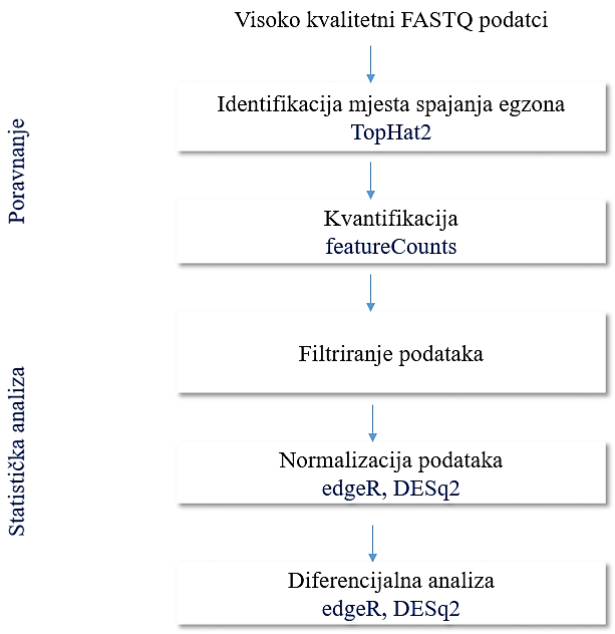
U ovom istraživanju, korišteni su sljedeći referentni genomi: humani genom (Hg38), miš (*Mus musculus*), vinska mušica (*Drosophila melanogaster*), talijin uročnjak (*Arabidopsis thaliana*), govedo (*Bos taurus*), domaća kokoš (*Gallus gallus*), oblić (*Caenorhabditis elegans*), kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*), gljivica (*Candida albicans*), plijesan (*Aspergillus niger*) te bakterije (*Escherichia coli*; *Streptococcus pyogenes; Chlamydia trachomatis; Enterococcus faecalis; Cutibacterium acnes; Staphylococcus aureus; Staphylococcus epidermis*). Uključeni su i genomi bakterija iz roda Mycoplasma te skup sekvenci rRNA različitih vrsta. Također su testirani PhiX bakteriofag te Illumina adapteri (TrueSeq i Nextera).

Daljnji tijek obrade podataka dobivenih sekvenciranjem prikazan je na Slici 20. Poravnanje, odnosno mapiranje (*engl*. allignment) *tzv*. single end sekvenci duljine 100 nukleotida na referentni genom masline (*Olea europaea* L., PRJNA350614) provedeno je pomoću TopHat2 algoritma, koji se temelji na Bowtie2 alatu za poravnanje sekvenci. TopHat2 analizira rezultate poravnanja te omogućuje identifikaciju mjesta spajanja egzona (*engl*. splice junctions) nakon izrezivanja introna, što je od ključne važnosti za analizu genske ekspresije i alternativnog prekrajanja (Kim i sur., 2013).

Za generiranje, sortiranje i indeksiranje BAM datoteka korišten je SAMtools paket 1.9 (Li i sur., 2009). Vizualizacija poravnanja sekvenci na referentni genom masline provedena je pomoću programskog alata Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson i sur., 2011).

Kvantifikacija ekspresije gena, tj. broj očitanja mapiranih na pojedini gen, provedena je pomoću programskog alata featureCounts (Liao i sur., 2014). Za potrebe daljnjih analiza i statističke obrade korišten je programski jezik R (v.3.6.2).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 20. Obrada podataka dobivenih sekvenciranjem.

Prije diferencijalne analize ekspresije gena, odnosno analize gena sa značajno promijenjenom razinom ekspresije, provedeno je filtriranje podataka uklanjanjem svih gena s niskom razinom ekspresije, odnosno onih koji su imali manje od 15 očitanja u svim uzorcima. Nakon toga je provedena normalizacija podataka između uzoraka, kojom su korigirane razlike u ukupnom broju očitanja, varijabilnosti ekspresije gena i veličini transkripata između različitih eksperimentalnih uvjeta.

Analiza diferencijalne ekspresije gena između dva različita tretmana korištena u ovom istraživanju, samooprašivanja i stranooprašivanja, provedena je pomoću programskih paketa DESeq2 1.26.0. (Love, Huber i Anders, 2014) i EdgeR 3.28.0 (Robinson i sur., 2010; McCarthy i sur., 2012) u okviru programskog jezika R. Za procjenu promjena u ekspresiji gena između uzoraka koristi se logaritamska skala (*engl. logarithmic fold change*, $\log_2$FC) temeljena na generaliziranom linearnom modelu (*engl.* generalized linear model, GLM). Za svaki gen testirana je nulta hipoteza koja pretpostavlja odsutnost razlike u ekspresiji gena između dva uvjeta, a za procjenu statističke značajnosti primijenjen je Waldov test kojim se izračunava p-vrijednost. Radi ispravka pogrešaka povezanih s višestrukim testiranjem, p-vrijednosti su prilagođene prema Benjamini-Hochbergovoj korekciji (1995), kojom se kontrolira stopa lažnog otkrića (*engl.* false discovery rate, FDR) (Reiner, Yekutieli i Benjamini, 2003). Geni s prilagođenom p-vrijednošću manjom od 0,05 (padj < 0,05) smatrani su statistički značajno diferencijalno eksprimiranim genima.

Ocjena u tijeku!

Funkcionalna anotacija eksprimiranih gena provedena je prema rezultatima homologije s već poznatim i anotiranim genima pohranjenim u bazama podataka: neredundantna NCBI (*engl*. NCBI non-redundant protein sequences) (Deng i sur., 2006), Swiss-Prot (Apweiler i sur., 2004), KEGG (*engl*. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa i Goto, 2000) i COG (*engl*. Clusters of Orthologous Groups of proteins) (Tatusov i sur., 2000). Geni su potom raspoređeni u različite COG kategorije na temelju svojih funkcija u pojedinim biološkim procesima (Tablica 4).

Tablica 4. Klasifikacija gena prema COG kategorijama.

Funkcionalna kategorija	COG oznaka	Opis funkcije gena
Stanični procesi i signalizacija	D	Kontrola staničnog ciklusa, dioba stanica, raspodjela kromosoma
	M	Biogeneza stanične stijenke, membrane i ovojnice
	N	Stanična pokretljivost
	O	Posttranslacijske modifikacije, degradacija proteina, šaperoni
	T	Mehanizmi prijenosa signala
	U	Međustanična komunikacija, sekrecija i vezikularni transport
	V	Obrambeni mehanizmi
	W	Vanstanične strukture
Pohrana i obrada informacija	A	Uređivanje RNA i modifikacija
	J	Translacija, struktura i biogeneza ribosoma
	K	Transkripcija
	L	Replikacija, rekombinacija i popravak DNA
Metabolizam	C	Proizvodnja i pretvorba energije
	E	Transport i metabolizam aminokiselina
	F	Transport i metabolizam nukleotida
	G	Transport i metabolizam ugljikohidrata
	H	Transport i metabolizam koenzima
	I	Transport i metabolizam lipida
	P	Transport i metabolizam anorganskih iona
	Q	Biosinteza, transport i katabolizam sekundarnih metabolita
Slabo okarakterizirani geni	R	Predviđanje opće funkcije

Ocjena rada u tijeku!

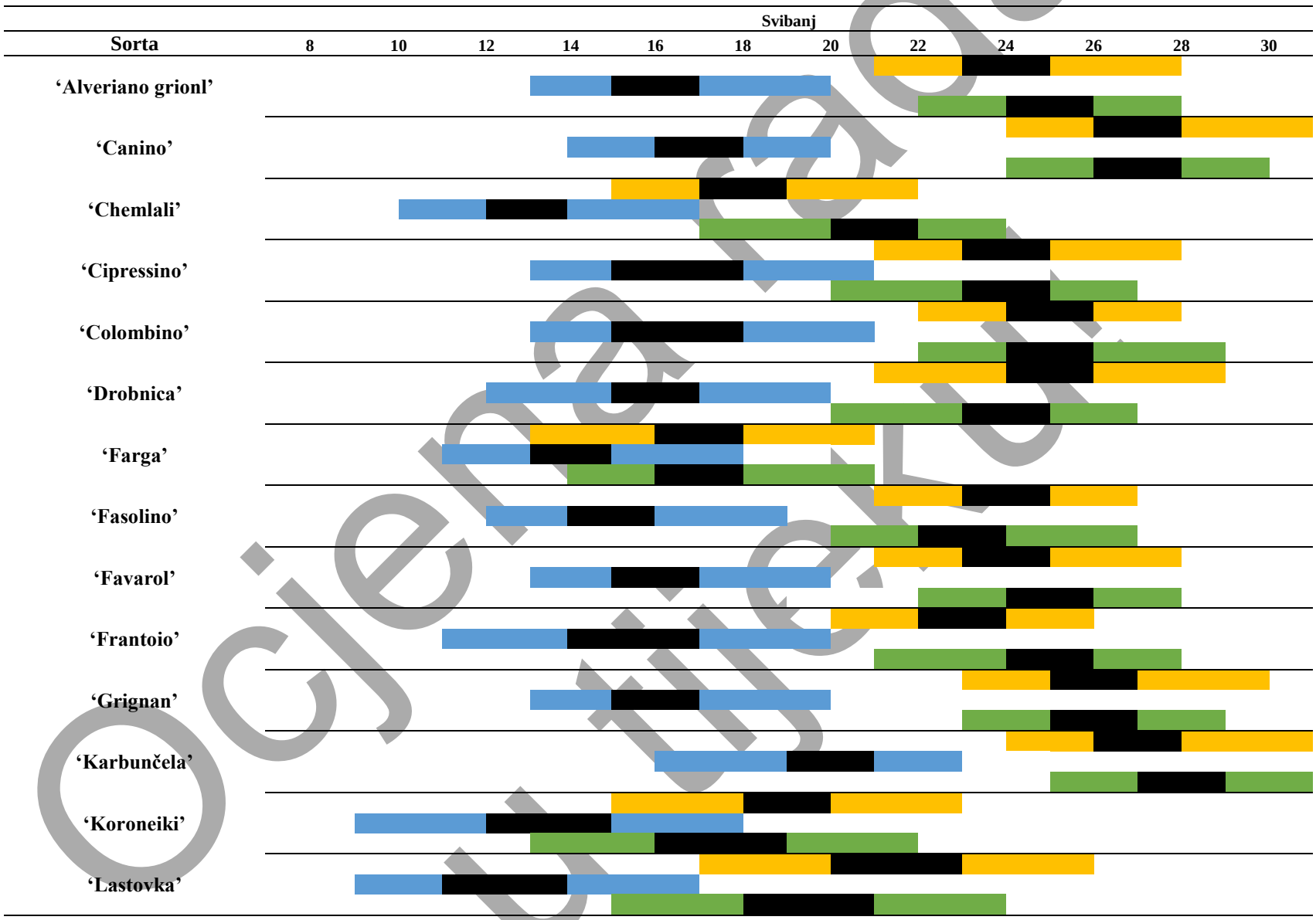
4. REZULTATI

4.1. Trajanje cvatnje istraživanih sorti i meteorološki uvjeti tijekom fenofaze

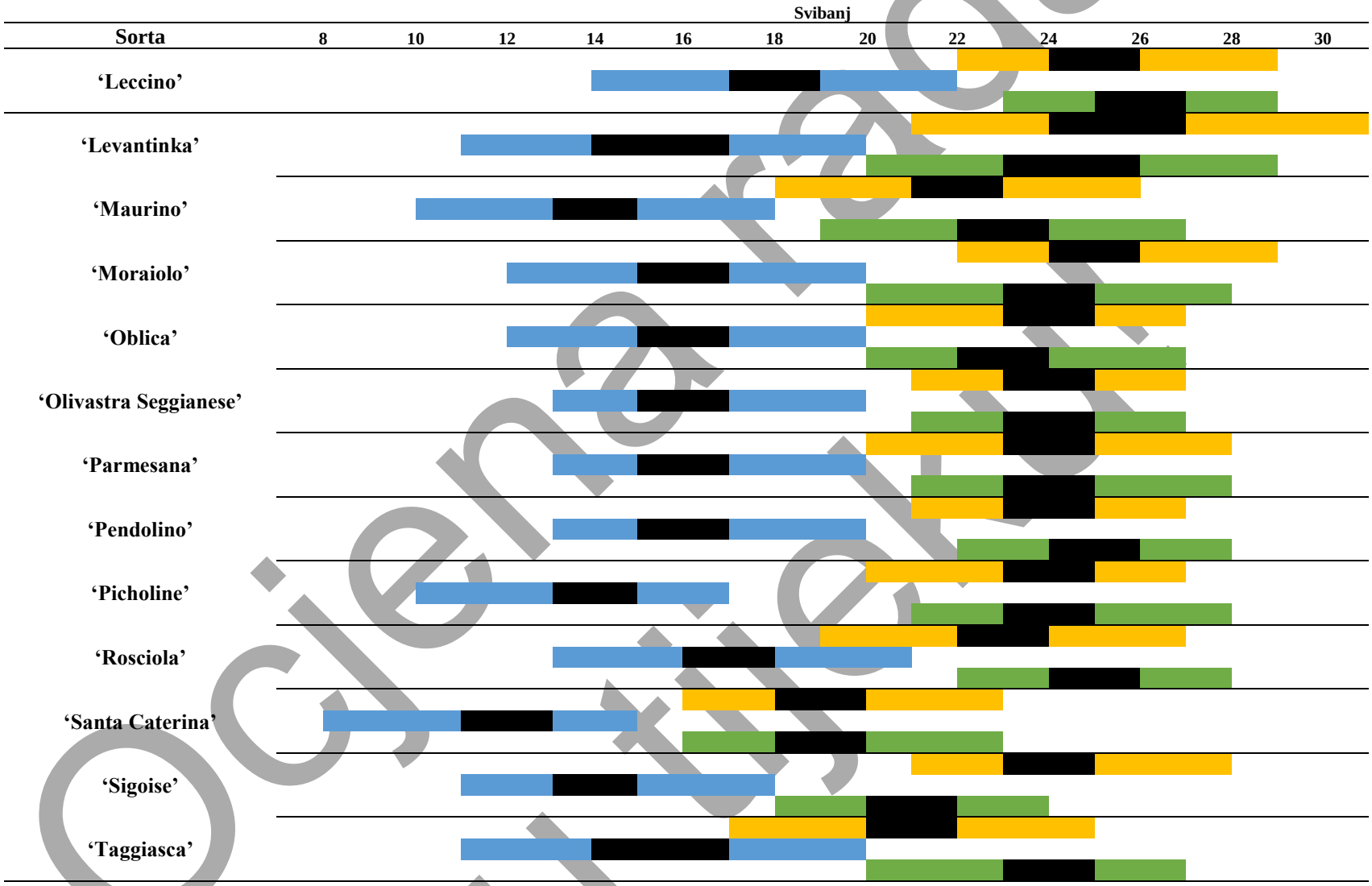
Razdoblja cvatnje istraživanih sorti maslina djelomično su se preklopila u sve tri eksperimentalne godine (Slika 21). Iako se datum početka cvatnje razlikovao između godina, redoslijed cvatnje sorti ostao je dosljedan. Cvatnja je trajala najkraće šest (Pendolino, 2019.), a najdulje deset dana (Levantinka, 2019.). Razdoblja cvatnje u 2019. i 2021. godini su se odvijala u istom vremenskom okviru, pri čemu je u 2019. godini najranije procvjetala sorta 'Farga', a u 2021. godini sorta 'Koroneiki'. Kraj cvatnje u 2019. godini zabilježen je 31. svibnja za sorte 'Canino', 'Levantinka' i 'Karbunčela', a u 2021. godini zabilježen za sortu 'Karbunčela'. U 2020. godini, fenofaza cvatnje je započela pet dana ranije (9. svibnja, 'Santa Caterina'), a trajala je do 23. svibnja ('Karbunčela').

Tijekom sve tri eksperimentalne godine, u 2019., 2020. i 2021. godini, kod sorte 'Lastovka' fenofaza cvatnje je započela ranije nego kod sorte 'Oblica' (18. svibnja; 10. svibnja; 16. svibnja). U 2019. godini sorte 'Oblica', 'Levantinka' i 'Leccino' započele su cvatnju uzastopno, s razmakom od jednog dana (21. svibnja; 22. svibnja; 23. svibnja) te su se intervali pune cvatnje sa sortom 'Oblica' preklopili tijekom jednog dana, što je omogućilo njihovo intenzivnije međusobno oprašivanje. U istoj godini, sorta 'Levantinka', 'Cipressino' i 'Drobnica' imale su zajedničkih pet dana u cvatnji sa sortom 'Lastovka'. U 2020. godini, sorta 'Levantinka' započela je cvatnju dva dana nakon sorte 'Lastovka' (12. svibnja), dok je kašnjenje u početku cvatnje sorte 'Oblica' za sortom 'Lastovka' iznosilo tri dana, a sorte 'Leccino' pet dana. U sve tri eksperimentalne godine, sorta 'Leccino' nalazila se na početku cvatnje, dok je sorta 'Lastovka' istovremeno bila pri kraju cvatnje, što je značajno smanjilo mogućnost njihovog međusobnog oprašivanja. U 2020. godini, sorta 'Drobnica' preklopila se pet dana u cvatnji sa sortom 'Lastovka', a sorta 'Cipressino' jedan dan kraće. U 2021. godini, sorta 'Levantinka' i sorta 'Oblica' započele su cvatnju istovremeno (21. svibnja), a sorta 'Leccino' 24. svibnja. U ovoj godini produljena su razdoblja istovremenog cvjetanja sorti 'Oblica' i 'Levantinka' sa sortom 'Lastovka' u trajanju od četiri dana. Sorta 'Leccino' preklopila se u cvatnji sa sortom 'Oblica' tijekom četiri dana te je imala kratko vrijeme cvatnje u trajanju od šest dana. Intervali pune cvatnje sorti 'Oblica' i 'Levantinka' preklopili su se tijekom jednoga dana.

Ocjena rada u tijeku!



Ocjena rada u tiskanom



Slika 21. Dijagram cvatnje svih sorti potencijalnih oprašivača tijekom 2019. (označeno žutom bojom), 2020. (označeno plavom bojom) i 2021. godine (označeno zelenom bojom). Faza pune cvatnje označena je crnom bojom.

Ocjena rada u tiskanom

4.2. Povezanost vremena cvjetanja i klimatskih parametara

U analizu fenoloških i klimatskih parametara (DPC, GDH i CH) bilo je uključeno 27 sorti masline, pri čemu je svaka sorta bila zastupljena s podacima iz tri godine istraživanja (2019., 2020. i 2021.), što je ukupno činilo ukupno 81 kombinaciju sorta x godina. Ukupni raspon početka cvatnje tijekom istraživanog razdoblja kretao se od 129. (2020.) i 146. dana (2021.) u godini, što odgovara kalendarskom rasponu od 9.-26. svibnja. Vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica pri pet različitih temperaturnih pragova kretale su se u širokom rasponu tijekom istraživanog trogodišnjeg razdoblja, od 3767,8 (GDH12,5; 2021. godina) do 13576,8 (GDH8; 2019. godina). U najkraćem razdoblju (CH1, studeni - siječanj) vrijednosti akumulacije hladnih sati kretale su se od 229 (2020.) do 702 (2019.) sata, dok su u najduljem razdoblju (CH4, studeni - travanj) iznosile od 386 (2020.) do 821 (2019.) sati, pri čemu je maksimalna vrijednost (821 sati) postignuta već do kraja ožujka navedene godine (CH3).

4.2.1. Klaster analiza (engl. K-means clustering) i analiza stabla odluke (engl. decision tree)

Na temelju dobivenih raspona vrijednosti GDH i CH određenih za sve sorte, provedena je K-means klaster analiza kojom je izdvojeno je šest skupina (klasteri od 0 do 5). Dobivene skupine razlikovale su se prema datumu početka cvatnje izraženom kao broj dana u godini od 1. siječnja do početka cvatnje (DPC), akumuliranim satima toplinskih jedinica pri pet različitih temperaturnih pragova (GDH8; GDH9,2; GDH10; GDH11; GDH12,5) te akumuliranim satima hlađenja izračunatim za razdoblja od 1. studenog do kraja siječnja (CH1), veljače (CH2), ožujka (CH3) i travnja (CH4). Rezultati su prikazani u tablici u formi heat mape, pri čemu je gradacija boja omogućila lakšu usporedbu relativno niskih, srednjih i visokih vrijednosti navedenih varijabli između različitih klastera (Tablica 5.).

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 5. Vrijednosti fenoloških (DPC) i klimatskih varijabli (GDH, CH) za šest klastera (0-5) izdvojenih K-means klaster analizom, prikazane u obliku heat mape. Najniže vrijednosti označene su plavom bojom, niske svijetloplavom bojom, srednje žutom bojom, visoke narančastom bojom, a najviše vrijednosti crvenom bojom.

Klaster	0	1	2	3	4	5
DPC	142	131	142	134	137	136
GDH8	11069	11196	12820	12072	11732	9771
GDH9,2	9106	9345	10536	10136	9589	7970
GDH10	7909	8156	9057	8890	8200	6881
GDH11	6536	6743	7287	7405	6540	5644
GDH12,5	4742	4840	4884	5395	4300	4053
CH1	379	229	686	229	702	379
CH2	532	290	781	290	794	532
CH3	662	356	813	356	821	662
CH4	710	386	815	386	821	710

Analiza klastera pokazala je da se isti ili sličan početak cvatnje javljao pri različitim kombinacijama vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica i akumuliranih sati hlađenja. Raspon početka cvatnje između klastera iznosio je 11 dana, od 131. do 142. dana od početka kalendarske godine.

Najkasnija cvatnja zabilježena je u klasterima 0 i 2 (142 dana od početka kalendarske godine do početka cvatnje), ali uz različite kombinacije klimatskih parametara. U klasteru 0 prevladavale su uglavnom niže vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica i prosječne vrijednosti akumuliranih sati hlađenja, dok je u klasteru 2 cvatnja nastupila istoga dana pri gotovo najvišim vrijednostima GDH te istodobno visokim CH vrijednostima.

Za razliku od klastera 4, u kojem je kasnija cvatnja (137 dana od početka kalendarske godine do početka cvatnje) nastupila pri vrlo visokim vrijednostima akumuliranih sati hlađenja i prosječnim vrijednostima gotovo svih GDH, u klasteru 5 cvatnja je zabilježena samo jedan dan ranije (136. dan), ali pri najnižim vrijednostima akumuliranih sati toplinskih jedinica i prosječnim vrijednostima CH. Rana cvatnja zabilježena je u klasterima 1 i 3 (131. dan i 134. dan), pri čemu su oba klastera imala vrlo niske vrijednosti akumuliranih sati hlađenja. Razlikovali su se u toplinskim zahtjevima: u klasteru 1 ranija cvatnja (131. dan) nastupila je pri prosječnim vrijednostima GDH, dok je u klasteru 3 nešto kasnija cvatnja (134. dan) bila povezana s visokim vrijednostima GDH.

Ocjena da u tijeku.

Broj uzorka po klasterima bio je različit. Najviše uzoraka pripalo je klasteru 2 (21) i klasteru 0 (20), dok je u klastere 3 (16) i 1 (11) svrstan nešto manji broj uzoraka. Najmanje uzoraka pripalo je klasterima 4 (7) i 5 (6). Većina sorti svrstana je u različite klastere tijekom tri godine istraživanja (npr. sorta 'Oblica'). Detaljan prikaz svih uzoraka (sorta x godina) i njihova pripadnost određenom klasteru prikazana je u Tablici 6. Razlike u pripadnosti sorti određenim klasterima, dodatno će se protumačiti u poglavlju „Rasprava".

Analiza stabla odluke provedena je kako bi se utvrdilo koje fenološke i klimatske varijable (DPC, GDH i CH) najbolje razdvajaju sorte u istraživanom skupu podataka (Slika 22). Detaljan popis svih krajnjih čvorova, odnosno završne točke stabla odluke u kojima se nalaze uzorci (sorta x godina) prikazani su u Tablici 6.

Varijabla GDH11 na prvom nivou stabla bila primarni kriterij razdvajanja sorti: 8,64 % sorti izdvojilo se u jednu granu, dok je većina (91,36 %) sorti pripala drugoj. Manja skupina obuhvatila je ukupno 7 uzoraka, pri čemu su u njoj bile zastupljene četiri sorte u različitim godinama istraživanja: 'Canino' (2019., 2020.), 'Karbunčela' (2019., 2020., 2021), 'Grignan' (2019.) i 'Leccino' (2020.).

Na drugom nivou stabla razdvajanje je određeno varijablom GDH12,5. U manjoj skupini iz prvog grananja izdvojena je sorta 'Grignan' (2019.), dok su preostale sorte ostale zajedno u drugoj podskupini. Veća skupina također se razdvojila prema istom kriteriju: 20,27 % uzoraka činilo je jednu, a 79,73 % drugu podskupinu.

Na trećem nivou stabla odluke slijedila su dodatna grananja prema varijabli DPC. Unutar veće skupine, odnosno njenih podskupina, razdvajanja su ostvarena pri vrijednostima DPC = 138 i DPC = 143, dok je u manjoj skupini daljnje razdvajanje ostvareno pri DPC = 136. Ovim kriterijem u manjoj skupini izdvojene su sorte 'Canino' (2020.) i 'Leccino' (2020.). U većoj skupini isti kriterij uzrokovao je daljnje grananje podskupina, pri čemu je 26,67 % uzoraka pripalo prvoj, a 73,33 % drugoj podskupini.

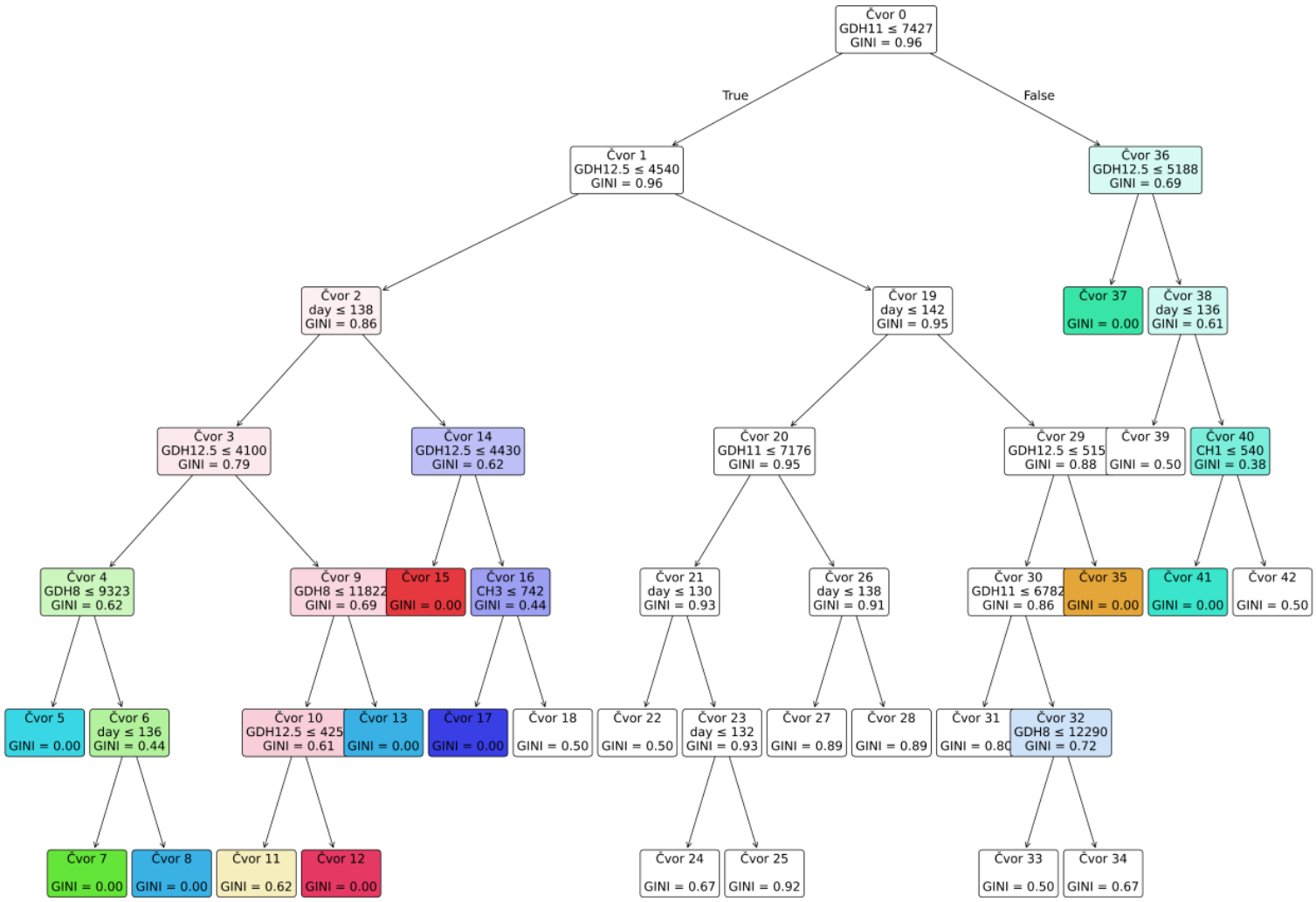
Nakon toga, na četvrtom nivou stabla u većoj skupini, ponovno je uslijedila temperaturna podjela, pri čemu GDH12,5 odvaja sorte koje pokazuju raniju cvatnju, a u njoj se nalazila sorta 'Sigoise' (2021.). Preostale sorte unutar ove skupine razdvojene su prema varijablama GDH11 i GDH12,5. Na istom nivou stabla, unutar manje skupine sorti, po prvi puta se kao kriterij razdvajanja pojavila varijabla CH1, odnosno akumulacija sati hlađenja do kraja siječnja. Ovim razdvajanjem izdvojila se sorta 'Karbunčela' (2020., 2021.).

Ocjena rada u tijeku!

Na petom nivou stabla, unutar veće skupine odjeljka koji obuhvaća sorte s ranijom cvatnjom, kao kriterij se razdvajanja primijenjena je varijabla GDH8. Ovim razdvajanjem izdvojene su sorte 'Koroneiki' (2021.) te sorta 'Lastovka' (2019.). U istom nivou, razdvajanje je ostvareno i prema varijabli CH3, čime su odvojena svega tri uzorka, odnosno dvije sorte, 'Maurino' (2019., 2021.) i 'Taggiasca' (2019.).

Unutar veće skupine jasno su se izdvojile sorte s ranijom cvatnjom te središnji dio stabla odluke u kojem su sve preostale sorte, što ukazuje na relativno malu varijabilnost u zadanim parametrima potrebnu za njihovo razdvajanje. Kao završni ishod analize stabla odluke, unutar odjeljka veće skupine s ranijom cvatnjom, izdvojile su se sorte 'Santa Caterina' (2019., 2020., 2021), 'Chemlali' (2019., 2021), 'Koroneiki' (2019.), 'Lastovka' (2021.) te 'Farga' (2019., 2021). Veći broj sorti u središnjem dijelu stabla odluke ostao je nerazdvojen, što će se dodatno razmotriti u poglavlju „Rasprava".

Ocjena rada u tijeku!



Slika 22. Prikaz stabla odluke temeljenog na fenološkim i klimatskim varijablama

Tablica 6. Rezultati stabla odluke i klasterske analize: uzorci s pripadajućim krajnjim čvorovima i klasterima.

Uzorak br.	Sorta	Godina	Krajnji čvor*	Klaster	Uzorak br.	Sorta	Godina	Krajnji čvor*	Klaster
1	‘Alveriano grionl’	2019	28	2	24	‘Rosciola’	2019	25	2
2	‘Canino’	2019	42	2	25	‘Santa Caterina’	2019	12	4
3	‘Chemlali’	2019	11	4	26	‘Sigoise’	2019	28	2
4	‘Cipressino’	2019	28	2	27	‘Taggiasca’	2019	18	4
5	‘Colombino’	2019	34	2	28	‘Alveriano grionl’	2020	27	3
6	‘Drobnica’	2019	28	2	29	‘Canino’	2020	39	3
7	‘Farga’	2019	7	4	30	‘Chemlali’	2020	24	1
8	‘Fasolino’	2019	28	2	31	‘Cipressino’	2020	27	3
9	‘Favarol’	2019	28	2	32	‘Colombino’	2020	27	3
10	‘Frantoio’	2019	25	2	33	‘Drobnica’	2020	25	3
11	‘Grignan’	2019	37	2	34	‘Farga’	2020	25	1
12	‘Karbunčela’	2019	42	2	35	‘Fasolino’	2020	25	3
13	‘Koroneiki’	2019	11	4	36	‘Favarol’	2020	27	3
14	‘Lastovka’	2019	13	4	37	‘Frantoio’	2020	25	1
15	‘Leccino’	2019	34	2	38	‘Grignan’	2020	27	3
16	‘Levantinka’	2019	28	2	39	‘Karbunčela’	2020	41	3
17	‘Maurino’	2019	18	4	40	‘Koroneiki’	2020	22	1
18	‘Moraiolo’	2019	34	2	41	‘Lastovka’	2020	22	1
19	‘Oblica’	2019	25	2	42	‘Leccino’	2020	39	3
20	‘Olivastra Seggianese’	2019	28	2	43	‘Levantinka’	2020	25	1
21	‘Parmesana’	2019	25	2	44	‘Maurino’	2020	24	1
22	‘Pendolino’	2019	28	2	45	‘Moraiolo’	2020	25	3
23	‘Picholine’	2019	25	2	46	‘Oblica’	2020	25	3

Ocjena rada u tijeku!

Uzorak br.	Sorta	Godina	Krajnji čvor*	Klaster	Uzorak br.	Sorta	Godina	Krajnji čvor*	Klaster
47	‘Olivastra Seggianese’	2020	27	3	65	‘Grignan’	2021	33	0
48	‘Parmesana’	2020	27	3	66	‘Karbunčela’	2021	41	2
49	‘Pendolino’	2020	27	3	67	‘Koroneiki’	2021	5	5
50	‘Picholine’	2020	24	1	68	‘Lastovka’	2021	8	5
51	‘Rosciola’	2020	27	3	69	‘Leccino’	2021	33	0
52	‘Santa Caterina’	2020	12	1	70	‘Levantinka’	2021	25	0
53	‘Sigoise’	2020	25	1	71	‘Maurino’	2021	17	0
54	‘Taggiasca’	2020	25	1	72	‘Moraiolo’	2021	25	0
55	‘Alveriano grionl’	2021	31	0	73	‘Oblica’	2021	25	0
56	‘Canino’	2021	35	0	74	‘Olivastra Seggianese’	2021	25	0
57	‘Chemlali’	2021	11	5	75	‘Parmesana’	2021	25	0
58	‘Cipressino’	2021	25	0	76	‘Pendolino’	2021	31	0
59	‘Colombino’	2021	31	0	77	‘Picholine’	2021	25	0
60	‘Drobnica’	2021	25	0	78	‘Rosciola’	2021	31	0
61	‘Farga’	2021	7	5	79	‘Santa Caterina’	2021	11	5
62	‘Fasolino’	2021	25	0	80	‘Sigoise’	2021	15	5
63	‘Favarol’	2021	31	0	81	‘Taggiasca’	2021	25	0
64	‘Frantoio’	2021	25	0					

* Krajnji čvor = završna točka stabla odluke u kojoj je uzorak razvrstan.

Ocjena rada u tijeku!

4.3. Reproduktivni procesi

Tijekom dvije godine istraživanja analizirani su reproduktivni procesi (uspjeh klijanja, prorastanje peludnih mješinica kroz vrat tučka te uspjeh oplodnje) nakon provedbe kontroliranih oprašivanja cvjetova sorti ‘Lastovka’ i ‘Oblica’.

4.3.1. Klijavost peludi sorti oprašivača nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije

Tijekom 2020. i 2021. godine analiziran je utjecaj istraživanih faktora - oprašivača i vremena proteklog od oprašivanja do prikupljanja i fiksiranja cvjetova - na uspjeh klijanja peludi sorti oprašivača na njušci tučka sorti primatelja peludi (sorte ‘Lastovka’ i ‘Oblica’).

U 2020. godini, cvjetovi sorte ‘Lastovka’ oprašeni su s peludi tri sorte oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’, ‘Oblica’). Najveći uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ zabilježen je nakon stranooprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ (54,74 %), dok je značajno manji uspjeh zabilježen nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Oblica’ (31,68 %) (Tablica 7). Uspjeh klijanja vlastite peludi nakon samooprašivanja (50,20 %) bio je značajno veći u odnosu na klijanje peludi sorte ‘Oblica’ nakon stranooprašivanja, ali i značajno manji u odnosu na tretman stranooprašivanja sa sortom ‘Levantinka’.

Tablica 7. Klijavost peludi (%) sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

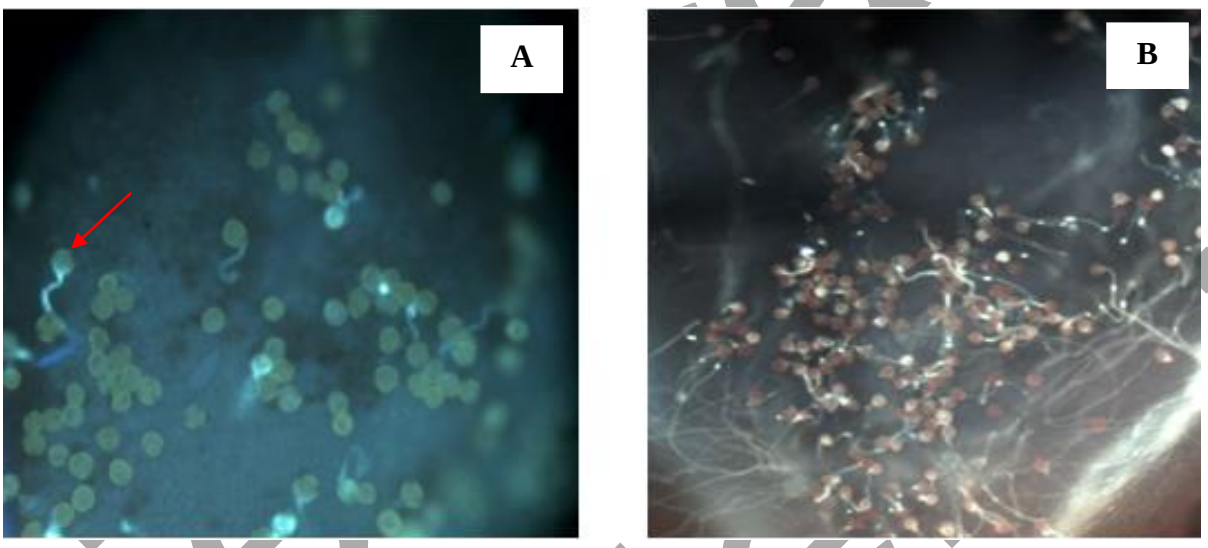
	Klijavost peludi (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	40,80±1,65 b*A[z]	43,76±3,54 bA	39,14±2,70 aA	41,23±1,57 b
48	39,35±1,54 bB	45,62±2,02 bA	29,70±1,95 bC	38,23±1,35 b
72	62,47±2,06 aA	62,34±2,22 aA	28,79±1,27 bB	51,20±2,33 a
96	58,19±1,29 aB	67,22±1,83 aA	29,08±1,34 bC	51,50±2,28 a
$\bar{x}$ Oprašivač	50,20±1,41 B	54,74±1,68 A	31,68±1,05 C	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

Uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ analiziran je s obzirom i na vrijeme proteklo od oprašivanja do prikupljanja cvjetova. Značajno najveći uspjesi klijanja zabilježeni su 72 h (51,20 %) i 96 h (51,50 %) nakon oprašivanja. Uspjesi klijanja nakon 24 h i 48 h nisu se značajno razlikovali.

Ocjena rada u tijeku!

Kada je riječ o samooprašivanju sorte ‘Lastovka’, uspjeh klijanja peludi kretao se od 39,35 % (48 h) do 62,47 % (72 h). Najveći uspjeh klijanja zabilježen nakon 72 h nije se značajno razlikovao od uspjeha zabilježenog 96 h nakon oprašivanja (58,19 %). Uspjeh klijanja peludi sorte ‘Levantinka’ na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ kretao se u rasponu od 43,76 % (24 h) do 67,22 % (96 h). Značajne razlike u uspjehu klijanja su se pojavile 48 h nakon oprašivanja. Kod stranoprašivanja sortom ‘Oblica’, najveći uspjeh klijanja zabilježen je nakon 24 h (39,14 %), dok se uspjesi klijanja nakon 48 h, 72 h i 96 h nisu značajno razlikovali. Na Slici 23 prikazana je razlika između dobrog i lošeg uspjeha klijavosti peludi na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ u ovisnosti o oprašivaču.



Slika 23. Loš uspjeh klijavosti peludnih zrnaca sorte ‘Oblica’ na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ (A). Strelicom je označena proklijala peludna mješinica. Dobra klijavost na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ nakon stranooprašivanja sortom ‘Levantinka’.

U razdoblju cvatnje 2021. godine, korišteni su isti oprašivači kao i u 2020. godini. Uspjeh klijanja uspoređen je između oprašivača (Tablica 8) te su među njima pronađene značajne razlike. Najveći uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ zabilježen je za pelud sorte ‘Oblica’ (64,70 %), dok je najmanji uspjeh zabilježen za pelud sorte ‘Levantinka’ (57,86 %). Vlastita pelud sorte ‘Lastovka’ klijala je uspješnije (61,81 %) od peludi sorte ‘Levantinka’, ali lošije od peludi sorte ‘Oblica’. Jedan dan nakon oprašivanja na njuški tučka sorte ‘Lastovka’ zabilježen je značajno najveći uspjeh klijanja peludi sorte ‘Oblica’(70,16 %), u odnosu na pelud druga dva istražena oprašivača (49,98 %, vlastita pelud; 47,12 %, pelud sorte ‘Levantinka’). Analizom vremena proteklog od oprašivanja do prikupljanja cvjetova, značajne razlike u uspjehu klijanja pojavile su se 48 h nakon oprašivanja njuški tučaka sorte ‘Lastovka’, a zadržale su se 72 h i 96 h nakon oprašivanja.

Ocjena u tijeku

Tablica 8. Klijavost peludi (%) sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) na njušci tučka sorte ‘Lastovka’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Klijavost peludi (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	49,98±2,03 c*B[z]	47,12±2,73 bB	70,16±1,83 aA	55,75±1,84 b
48	64,94±1,66 abA	58,12±2,10 aB	63,13±1,81 bAB	62,06±1,12 a
72	62,95±1,95 bA	63,83±2,04 aA	62,14±2,13 bA	62,97±1,16 a
96	69,36±2,37 aA	62,37±1,63 aB	63,39±2,61 bB	65,04±1,33 a
$\bar{x}$ Oprašivač	61,81±1,28 B	57,86±1,29 C	64,70±1,10 A	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

Tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine, cvjetovi sorte ‘Oblica’ oprašeni su s peludi četiri sorte oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’). Uspjeh klijanja peludi analiziran je s obzirom na sortu oprašivača (Tablica 9). Značajno najmanji uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte ‘Oblica’ zabilježen je nakon samooplodnje za vlastitu pelud (18,22 %). Najveći uspjeh klijanja na njušci tučka sorte ‘Oblica’ pronađen je za pelud sorte ‘Levantinka’ (28,29 %), iako se nije značajno razlikovao od uspjeha klijanja peludi nakon stranooprašivanja sa sortom ‘Lastovka’ (26,05 %) i ‘Leccino’ (25,21 %). Sorta ‘Levantinka’ pokazala je statistički značajno najveću klijavost 24 h nakon oprašivanja (40,05 %) u odnosu na sve navedene oprašivače u istom vremenu.

Najveći uspjeh klijanja zabilježen je 24 h nakon oprašivanja kod svih sorti (29,53 %), dok je najniži zabilježen 96 h nakon oprašivanja (20,58 %). U slučaju samooprašivanja najveći uspjeh klijanja zabilježen je 24 h nakon oprašivanja (20,91 %), no on se nije značajno razlikovao u usporedbi s uspjehom klijanja nakon 48 h, 72 h, niti 96 h. Kod sorte ‘Leccino’ uspjeh klijanja se nije značajno razlikovao između istraživanih vremena. Klijavost peludi sorti ‘Lastovka’ i ‘Levantinka’ na njušci tučka sorte ‘Oblica’ opadala je s vremenom, uz statistički značajne razlike između pojedinih vremena.

Pelud istih oprašivača kao i u 2020. godini korištena je u oprašivanju cvjetova sorte ‘Oblica’ u razdoblju cvatnje 2021. godine (Tablica 10). Analizom oprašivača zabilježen je značajno veći uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte ‘Oblica’ nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Lastovka’ (32,92 %) i sorte ‘Levantinka’ (32,18 %) u odnosu na pelud sorte ‘Leccino’ (28,30 %), dok je značajno najniži uspjeh zabilježen nakon oprašivanja vlastitom peludi (25,61 %). Analizom vremena proteklog od oprašivanja primjećuje se značajano najveći uspjeh

Ocjena rada u tijeku!

klijanja 96 h nakon oprašivanja (34,68 %). Nakon stranooprašivanja sortom ‘Leccino’ značajna razlika u klijavosti peludi na njušci tučka sorte ‘Oblica’ zabilježena je 72 h nakon oprašivanja (32,66 %), dok se nakon stranooprašivanja sortom ‘Levantinka’ bilježi nakon 96 h.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 9. Klijavost peludi (%) sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) na njušci tučka sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

	Klijavost peludi (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	31,92±4,38 a*B[z]	25,23±1,96 aBC	40,05±2,43 aA	20,91±2,15 aC	29,53±1,64 a
48	25,91±3,81 abAB	24,21±2,12 aAB	28,64±2,32 bA	20,39±3,30 aB	24,79±1,50 b
72	25,35±3,38 abA	26,10±2,97 aA	22,24±1,70 bAB	17,84±2,04 aB	22,88±1,33 bc
96	21,02±2,32 bAB	25,32±2,77 aA	22,22±2,17 bA	13,74±1,57 aB	20,58±1,20 c
$\bar{x}$ Oprašivač	26,05±1,80 A	25,21±1,22 A	28,29±1,34 A	18,22±1,20 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Tablica 10. Klijavost peludi (%) sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) na njušci tučka sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Klijavost peludi (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	33,94±1,92 b*A	21,56±1,37 bC	28,94±1,13 bB	23,04±1,77 bC	26,87±0,95 c
48	28,98±1,16 cAB	24,98±1,22 bB	32,53±1,25 bA	26,06±1,77 abB	28,14±0,75 bc
72	30,47±1,44 bcA	32,66±1,55 aA	30,12±1,46 bA	24,06±1,29 bB	29,33±0,79 b
96	38,31±2,12 aA	34,02±1,39 aB	37,11±1,99 aAB	29,28±1,31 aC	34,68±0,94 a
$\bar{x}$ Oprašivač	32,92±0,93 A	28,30±0,90 B	32,18±0,81 A	25,61±0,81 C	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Ocjena rada u tijeku!

4.3.2. Analiza rasta peludnih mješinica kroz vrat tučka nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije

Tijekom 2020. i 2021. godine analiziran je utjecaj istraživanih faktora - oprašivača i vremena proteklog od oprašivanja do prikupljanja i fiksiranja cvjetova - na uspjeh rasta peludnih mješinica sorti oprašivača kroz vrat tučka cvjetova sorti 'Lastovka' i 'Oblica' (primatelja peludi).

U 2020. i 2021. godini njuške tučaka cvjetova sorte 'Lastovka' oprašene su s peludi oprašivača: 'Lastovka', 'Levantinka' i 'Oblica' (Tablica 11). Analizom podataka za 2020. utvrđeno je da je stranooprašivanje s peludi sorte 'Levantinka' rezultiralo najvišim uspjehom prorastanja peludnih mješinica do dna vrata tučka sorte 'Lastovka' (97,50 %). Ova kombinacija pokazala je statistički značajno veće uspjehe prorastanja peludnih mješinica u odnosu na pelud ostalih oprašivača u svim analiziranim vremenskim intervalima proteklima od oprašivanja (24 h do 96 h). Već 24 h nakon oprašivanja zabilježen je visok postotak peludnih mješinica u dnu vrata tučka, koji se zadržao i nakon 96 h.

Tablica 11. Prorastanje peludnih mješinica do dna vrata tučka (%) kod sorte 'Lastovka' 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača ('Lastovka', 'Levantinka' i 'Oblica') tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

	Prorastanje peludnih mješinica (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	'Lastovka'	'Levantinka'	'Oblica'	$\bar{x}$ Vrijeme
24	25,00 b*B[z]	90,00 aA	25,00 aB	46,67 b
48	45,00 abB	100,00 aA	50,00 aB	65,00 ab
72	60,00 aB	100,00 aA	35,00 aB	65,00 ab
96	70,00 aB	100,00 aA	50,00 aB	73,33 a
$\bar{x}$ Oprašivač	50,00 B	97,50 A	40,00 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

Tijekom cvatnje 2021. godine, cvjetovi sorte 'Lastovka' oprašeni su s peludi istih oprašivača kao i u 2020. godini. Analiziran je utjecaj oprašivača na uspjeh prorastanja peludnih mješinica (Tablica 12). Značajno veći postotak cvjetova s peludnom mješinicom u dnu vrata tučka sorte 'Lastovka' zabilježen je nakon stranooprašivanja u odnosu na samooprašivanje. Sorta 'Levantinka' se pokazala kao najuspješniji oprašivač u usporedbi s ostalim oprašivačima

Ocjena rada u tijeku!

kod svih istraživanih vremena, kao i prema ukupnom uspjehu prorastanja peludnih mješinica. Visok postotak prorastanja peludnih mješinica do dna vrata tučka sorte ‘Lastovka’ zabilježen je i nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Oblica’ (77,50 %), ali se značajno razlikovao u odnosu na oprašivanje s peludi sorte ‘Levantinka’. Najniži postotak zabilježen je nakon samooprašivanja (43,75 %), što je dvostruko manje u odnosu na oprašivanje s peludi sorte ‘Levantinka’.

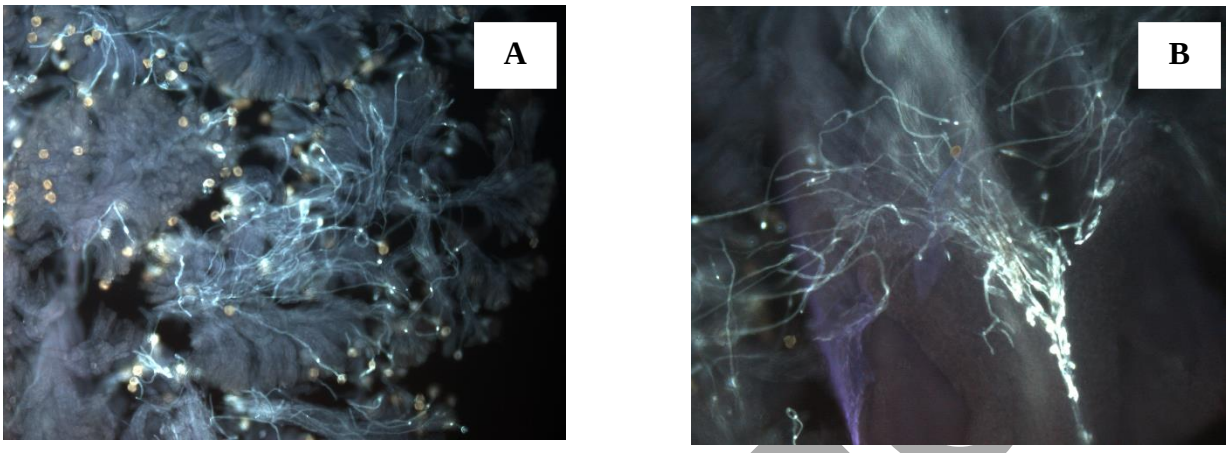
Tablica 12. Prorastanje peludnih mješinica do dna vrata tučka (%) kod sorte ‘Lastovka’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Prorastanje peludnih mješinica (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	25,00 b*C[z]	95,00 aA	55,00 bB	58,33 c
48	10,00 bC	100,00 aA	80,00 abB	63,33 bc
72	65,00 aB	95,00 aA	85,00 aAB	81,67 ab
96	75,00 aB	100,00 aA	90,00 aAB	88,33 a
$\bar{x}$ Oprašivač	43,75 C	97,50 A	77,50 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

U razdoblju od 24 h i 48 h nakon oprašivanja utvrđeni su značajno veći udjeli cvjetova s peludnom mješinicom u dnu vrata tučka kod stranooprašivanja u odnosu na samooprašivanje. Tijekom samoooprašivanja sorte ‘Lastovka’ prorastanje peludnih mješinica odvijalo se sporije, a izraženiji porast zabilježen je tek 72 h nakon oprašivanja. Razlike u intezitetu i brzini rasta peludnih mješinica između samooprašivanja i stranooprašivanja bile su jasno uočljive pod mikroskopom. Vrlo uspješan rast peludnih mješinica na njušci tučka te njihovo intenzivno prorastanje kroz vrat tučka zabilježen je kod stranooprašivanja (Slika 24), gdje se uočavala izražena kompeticija među peludnim mješinicama i smanjenje broja u donjem dijelu vrata tučka. Suprotno tome, nakon samooprašivanja broj peludnih mješinica koje su prorasle bio je znatno manji pa kompeticija u dnu vrata tučka nije bila izražena kao kod stranooprašivanja (Slika 25).

Ocjena rada u tijeku!



Slika 24. Veliki broj peludnih mješinica na njušci tučka nakon stranooprašivanja (A); izražena kompeticija među peludnim mješinicama u dnu vrata tučka nakon stranooprašivanja (B).

Slika 25. Izostanak izražene kompeticije među peludnim mješinicama nakon samooprašivanja.

U razdoblju cvatnje 2020. godine, cvjetovi sorte 'Oblica' oprašeni su s peludi sorti 'Lastovka', 'Leccino', 'Levantinka' i 'Oblica'. Pelud sorte 'Levantinka' pokazala je najveći uspjeh prorastanja peludnih mješinica do dna vrata tučka sorte 'Oblica' tijekom čitavog promatranog razdoblja (66,25 %) s jasno izraženim porastom uspjeha prorastanja kroz vrijeme (Tablica 13). Značajno najniži postotak cvjetova sorte 'Oblica' s peludnim mješinicama u dna vrata tučka utvrđen je nakon samooprašivanja (8,75 %). Veći udio cvjetova sorte 'Oblica' s peludnom mješinicom u dnu vrata tučka opažen je nakon oprašivanja s peludi sorte 'Lastovka', nego nakon oprašivanja s peludi sorte 'Leccino' (22,50 %). Statistički značajne razlike između oprašivača evidentirane su u svim vremenskim intervalima, a nakon 72 h od oprašivanja razlike su bile jasno izražene među svim oprašivačima.

Cvjetovi sorte 'Oblica' su u razdoblju cvatnje 2021. godine oprašeni s peludi sorti 'Lastovka', 'Leccino', 'Levantinka' i 'Oblica' (Tablica 14). Značajno najveći postotak cvjetova

Ocjenjivanje u tijeku!

sorte ‘Oblica’ s peludnom mješinicom u dnu vrata tučka zabilježen je nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ (75 %), dok se uspjeh prorastanja peludnih mješinica nakon oprašivanja ostalim sortama nije značajno razlikovao.

Nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ nije pronađena značajna razlika u uspjehu prorastanja peludnih mješinica do dna vrata tučka sorte ‘Oblica’ između svih istraživanih vremena, budući da je već 24 h nakon oprašivanja zabilježen vrlo visoki udio cvjetova s peludnom mješinicom u dnu vrata tučka (70 %) koji se nije mijenjao u kasnijim vremenima. Sličan trend primijećen je i nakon samooprašivanja, ali s izrazito niskim postotcima prorastanja peludnih mješinica. U svim istraživanim vremenima pelud sorte ‘Levantinka’ ostvarila je najveći uspjeh prorastanja do dna vrata tučka sorte ‘Oblica’, a sličan obrazac međusobnih razlika između oprašivača zadržao se tijekom svih istraživanih vremena.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 13. Prorastanje peludnih mješinica do dna vrata tučka (%) kod sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

	Prorastanje peludnih mješinica (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	10,00 a*ABz	5,00 bB	35,00 Ba	5,00 aB	13,75 c
48	20,00 aB	15,00 bB	60,00 abA	5,00 aB	25,00 bc
72	35,00 aB	20,00 abBC	80,00 Aa	5,00 aC	35,00 ab
96	40,00 aB	50,00 aB	90,00 Aa	20,00 aB	50,00 a
$\bar{x}$ Oprašivač	26,25 B	22,50 BC	66,25 A	8,75 C	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

zRazličita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Tablica 14. Prorastanje peludnih mješinica do dna vrata tučka (%) kod sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Prorastanje peludnih mješinica (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	5,00 b*Bz	25,00 bB	70,00 Aa	25,00 aB	31,25 a
48	5,00 bB	15,00 bB	70,00 Aa	10,00 aB	25,00 a
72	25,00 abAB	55,00 aAB	75,00 Aa	15,00 aB	42,50 a
96	35,00 aB	25,00 bB	85,00 Aa	35,00 aB	45,00 a
$\bar{x}$ Oprašivač	17,50 B	30,00 B	75,00 A	21,25 B	

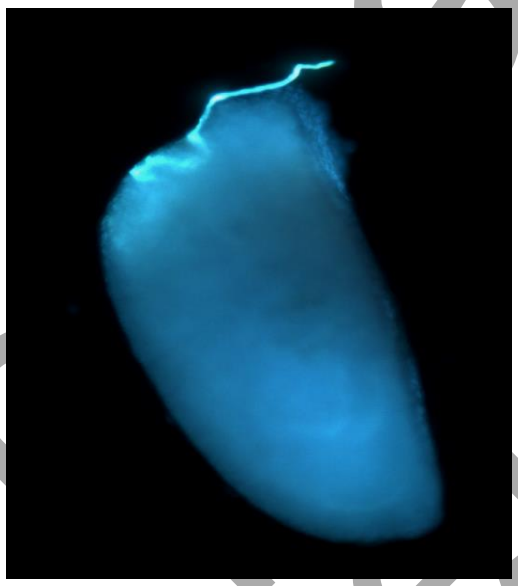
*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

zRazličita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Ocjena rada u tijeku!

4.3.3. Analiza uspjeha oplodnje nakon kontroliranih oprašivanja primjenom fluorescentne mikroskopije

Tijekom 2020. i 2021. godine analiziran je utjecaj istraživanih faktora - oprašivača i vremena proteklog od oprašivanja do prikupljanja i fiksiranja cvjetova - na uspjeh oplodnje sorti 'Lastovka' i 'Oblica'. Proces oplodnje analiziran je pomoću fluorescentnog mikroskopa, a uspjeh oplodnje zabilježen je u cvjetovima kod kojih je peludna mješinica doprijela do mikropile barem jednog od 4 sjemena zametka unutar plodnice (Slika 26).



Slika 26. Oplođeni sjemeni zametak izdvojen iz plodnice sorte 'Lastovka'.

Cvjetovi sorte 'Lastovka' oprašeni su s peludi sorte 'Lastovka', 'Levantinka' i 'Oblica' u razdoblju cvatnje 2020. i 2021. godine. Istražen je utjecaj oprašivača na uspjeh oplodnje. Značajno najveći uspjeh oplodnje u 2020. godini (Tablica 15) zabilježen je nakon stranooprašivanja s peludi sorte 'Levantinka' (41,25 %). Nije pronađena značajna razlika u uspjehu oplodnje nakon oprašivanja cvjetova sorte 'Lastovka' s peludi sorte 'Oblica' i samooprašivanja. Najveći udjeli oplođenih cvjetova dobiveni nakon oprašivanja s peludi svih sorti utvrđeni su 96 h nakon oprašivanja, a kretali su se od 30 % , nakon oprašivanja s peludi sorte 'Lastovka' i 'Oblica', do 70 % nakon oprašivanja s peludi sorte 'Levantinka'.

Ocjenjivanja u tijeku!

Tablica 15. Uspjeh oplodnje (%) kod sorte ‘Lastovka’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

	Uspjeh oplodnje (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	25,00 ab*A[z]	25,00 bA	5,00 bB	18,33 b
48	0,00 cB	25,00 bA	20,00 abA	15,00 b
72	10,00 bcB	45,00 abA	20,00 abB	25,00 b
96	30,00 aB	70,00 aA	30,00 aB	43,33 a
$\bar{x}$ Oprašivač	16,25 B	41,25 A	18,75 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

U cvatnji 2021. godine oprašivanje s peludi sorte ‘Oblica’ (Tablica 16) rezultiralo je najvećim uspjehom oplodnje (45 %), dok je nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ uspjeh oplodnje bio gotovo 2,5 puta veći (30,00 %) u odnosu na samooprašivanje (12,50 %). U slučaju samooprašivanja, u prvih 48 h nije došlo do oplodnje, a do značajnijeg porasta je došlo tek nakon 96 h od oprašivanja.

Tablica 16. Uspjeh oplodnje (%) kod sorte ‘Lastovka’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Uspjeh oplodnje (%)			
	Oprašivač			
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	0,00 b*B[z]	0,00 cB	40,00 aA	13,33 c
48	0,00 bC	20,00 bB	40,00 aA	20,00 bc
72	15,00 bB	35,00 bA	50,00 aA	33,33 ab
96	35,00 aB	65,00 aA	50,00 aAB	50,00 a
$\bar{x}$ Oprašivač	12,50 C	30,00 B	45,00 A	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi različitih sorti oprašivača ($P \leq 0.05$).

Uspjeh oplodnje u 2020. i 2021. godini analiziran je nakon oprašivanja sorte ‘Oblica’ s peludi sorte ‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’. U 2020. godini nije pronađena značajna razlika u uspjehu oplodnje nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Lastovka’, ‘Levantinka’ i ‘Leccino’ (Tablica 17). U istoj godini nakon samooprašivanja nije došlo do oplodnje ni u jednom od promatranih vremenskih intervala. Također, u prvih 24 h nakon oprašivanja s peludi ostalih sorti nije došlo do oplodnje.

Ocjena rada u tijeku!

U 2021. godini uspjeh oplodnje kretao se do 42,5 % te je zabilježen nakon oprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ (Tablica 18). Nakon 96 h od oprašivanja s peludi prethodno navedene sorte udio oplođenih cvjetova dosegao je 60 %. Uspjesi oplodnje nakon oprašivanja s peludi ostalih sorti nisu se statistički značajno razlikovali.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 17. Uspjeh oplodnje (%) kod sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2020. godine.

	Uspjeh oplodnje (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	0,00 c*A[z]	0,00 bA	0,00 cA	0,00 aA	0,00 b
48	5,00 bcA	15,00 abA	0,00 cA	0,00 aA	5,00 b
72	30,00 aA	20,00 abAB	30,00 bA	0,00 aB	20,00 a
96	25,00 abB	40,00 aAB	65,00 aA	0,00 aC	32,50 a
$\bar{x}$ Oprašivač	15,00 A	18,75 A	23,75 A	0,00 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Tablica 18. Uspjeh oplodnje (%) kod sorte ‘Oblica’ 24 h do 96 h nakon oprašivanja s peludi sorti oprašivača (‘Lastovka’, ‘Leccino’, ‘Levantinka’ i ‘Oblica’) tijekom razdoblja cvatnje 2021. godine.

	Uspjeh oplodnje (%)				
	Oprašivač				
Vrijeme (h)	‘Lastovka’	‘Leccino’	‘Levantinka’	‘Oblica’	$\bar{x}$ Vrijeme
24	5,00 a*B[z]	5,00 aB	35,00 aA	15,00 abAB	15,00 ab
48	0,00 aB	0,00 aB	40,00 aA	0,00 bB	10,00 b
72	15,00 aAB	20,00 aAB	35,00 aA	5,00 abB	18,75 ab
96	20,00 aB	10,00 aB	60,00 aA	25,00 aB	28,75 a
$\bar{x}$ Oprašivač	10,00 B	8,75 B	42,50 A	11,25 B	

*Različita mala slova u stupcima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).
[z]Različita velika slova u redovima pokazuju značajne razlike u klijavosti peludi sorte oprašivača u istraživanim vremenima ($P \leq 0.05$).

Ocjena rada u tijeku!

4.4. Analiza roditeljstva pomoću mikrosatelitnih biljega

Kako bi se uspješno proveo roditeljski test na embrijima sorte 'Lastovka', u analizu je uključeno ukupno 329 plodova u 2019. godini i 290 plodova u 2020. godini. Kvaliteta i količina izolirane DNA bila je dovoljna za nastavak laboratorijskog eksperimenta i uspješnu amplifikaciju mikrosatelitnih biljega.

4.4.1. Parametri genetske varijabilnosti mikrosatelitnih biljega

Odabrano je sedam visoko polimorfnih i informativnih mikrosatelitnih biljega na temelju njihove učinkovitosti amplifikacije i prethodno objavljenih genetskih parametara (Díaz i sur., 2006; Baldoni i sur., 2009, Baruca Arbeiter i sur. 2014). U Tablici 19 prikazani su parametri genetske varijabilnosti za sve uzorke embrija (a) te za 27 potencijalnih donora peludi (b). Vrijednosti statističkih parametara za sve uspješno amplificirane DNA uzorke embrija su povišene u 2020. godini u odnosu na 2019. godinu. Utvrđena je polimorfnost svih lokusa s ukupno 54 amplificirana alela (N_a) u 2019. godni i ukupno 57 alela u 2020. godini. Umnoženo je prosječno 7,71 različitih alela po lokusu, a broj efektivnih alela (N_e) po lokusu iznosio je u prosjeku 3,03 u 2019. godini; dok je u 2020. godini umnoženo prosječno 8,14 alela po lokusu te je dobiveno prosječno 3,14 efektivnih alela po lokusu. U 2019. godini umnoženo je minimalno 3 (UDO99-19), a maksimalno 10 alela (DCA11, DCA16, GAPU101), a u 2020. godini taj broj je narastao od minimalno 6 (DCA3) do maksimalno 12 različitih alela (DCA11). Opažena heterozigotnost (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_e) također su imale više vrijednosti u 2020. godini. U 2019. godini najveći broj heterozigotnih embrija zabilježen je na lokusu DCA3 (H_o = 0,929), a najmanji na lokusu UDO99-19 (H_o = 0,616). U sljedećoj godini, najveća heterozigotnost embrija zabilježena je na lokusu DCA9 (H_o = 0,962), a najmanja na lokusu UDO99-19 (H_o = 0,658).

U usporedbi s varijabilnošću mikrosatelitnih lokusa kod embrija, svi analizirani mikrosatelitni lokusi pokazali su veću varijabilnost kod svih 27 potencijalnih donora peludi. Umnoženo je ukupno 58 alela na svim analiziranim lokusima, najmanje 5 alela po lokusu (UDO99-19), a najviše 12 alela po lokusu (DCA16), odnosno prosječno 8,29 alela po lokusu. Najviša opažena heterozigotnost zabilježena je na lokusima DCA11 i GAPU101 (H_o = 1,000), a najniža na lokusu UDO99-19 (H_o = 0,630). Najveća očekivana heterozigotnost zabilježena je na lokusu GAPU101 (H_e = 0,842), a najniža na lokusu UDO99-19 (H_e = 0,575). Za potencijalne donore peludi, izračunate su i vrijednosti Shannonovog informacijskog indexa (I), vjerojatnosti

Ocjena rada u tijeku!

identiteta (PI) te vjerojatnosti isključenja (EP). Shannonov informacijski index kretao se od 1,128 (UDO99-19) do 1,952 (GAPU101), s prosječnom vrijednošću 1,680, što ukazuje na visoku genetsku raznolikost. Za većinu lokusa vrijednost PI je bila vrlo niska, u rasponu od 0,22 (UDO99-19) do 0,043 (GAPU101), što ukazuje da je vjerojatnost pogrešnog određivanja potencijalnih donora peludi jako niska. Vjerojatnost isključenja (EP) za pojedini mikrosatelitni lokus kretala se od 25 % do 51,8 %, dok je kumulativna vjerojatnost isključenja bila veća od 96,8 %, što nas upućuje da su odabrani mikrosatelitni biljezi vrlo učinkoviti u isključenju potencijalnih donora peludi koji nemaju dovoljno sličnosti s određenim embrijem.

Tablica 19. Parametri genetske varijabilnosti sedam mikrosatelitnih SSR biljega dobivenih između embrija (a) u 2019. i 2020. godini te između 27 potecijalnih donora peludi (b). Broj amplificiranih alela (N_a), efektivni broj alela (N_e), opažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_e), Shannonov informacijski index (I), vrijednost vjerojatnosti identiteta (PI), vjerojatnost isključenja (EP).

(a)

EMBRIJI								
	2019				2020			
Lokus	**N_a**	**N_e**	**H_o**	**H_e**	**N_a**	**N_e**	**H_o**	**H_e**
DCA3	7	2,584	0,929	0,613	6	2,072	0,839	0,517
DCA9	9	3,207	0,915	0,688	11	4,716	0,962	0,788
DCA11	10	3,733	0,880	0,732	12	3,472	0,837	0,712
DCA16	10	3,592	0,758	0,722	8	3,486	0,790	0,713
GAPU101	10	3,380	0,761	0,704	7	2,864	0,867	0,651
EMO3	5	2,733	0,718	0,634	7	3,120	0,769	0,679
UDO99-19	3	1,996	0,616	0,499	6	2,244	0,659	0,554
Prosjek/zbroj*	7,71/54*	3,03/21,23*	0,797	0,656	8,14/57*	3,14/21,97*	0,818	0,659

(b)

POTENCIJALNI OPRAŠIVAČI							
Lokus	**N_a**	**N_e**	**H_o**	**H_e**	**I**	**PI**	**EP**
DCA3	9	5,695	0,815	0,824	1,890	0,053	0,481
DCA9	10	4,614	0,963	0,783	1,884	0,065	0,433
DCA11	8	4,326	1,000	0,769	1,679	0,082	0,390
DCA16	12	4,119	0,815	0,757	1,873	0,078	0,399
GAPU101	8	6,339	1,000	0,842	1,952	0,043	0,518
EMO3	6	2,809	0,778	0,644	1,357	0,157	0,250
UDO99-19	5	2,352	0,630	0,575	1,128	0,22	0,182
Prosjek/zbroj*	8,29/58*	4,32/30,25*	0,857	0,742	1,680	3,27 x 10-8**	0,968***

**Umnožak PI vrijednosti svih sedam lokusa.
***Kumulativna vrijednost svih sedam lokusa.

Ocjena rada u tijeku!

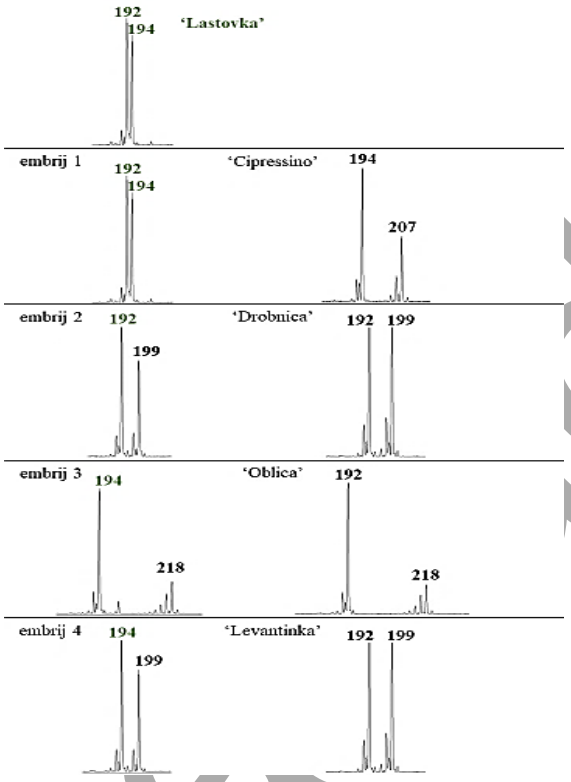
4.4.2. Genotipizacija i roditeljski test

Kako bi se odredili potencijalni donori peludi svakog uzorkovanog embrija, uspoređeni su podaci dobiveni genotipizacijom embrija i potencijalnih donora peludi uz pomoć programa Cervus. Mikrosatelitni biljezi nasljeđuju se po principu Mendelovog kodominantnog nasljeđivanja, stoga se kod svakog embrija na istom lokusu nalazi jedan naslijeđeni majčinski alel sorte 'Lastovka' te jedan alel naslijeđen od potencijalnog donora peludi što je potvrda stranooprašivanja. Ukoliko se na istom lokusu nalaze samo majčinski aleli, embrij je nastao kao rezultat samooplodnje, odnosno samooprašivanja (Tablica 20).

Tablica 20. Primjer analize roditeljstva koristeći mikrosatelitne biljege. Duljine alela (pb) izražene su brojčanim vrijednostima. Genotip majčinske biljke - sorta 'Lastovka' uključuje dva alela na analiziranom GAPU101 lokusu. Svaki od navedenih embrija naslijedio je jedan alel sorte 'Lastovka' (192 pb i 194 pb) i jedan alel odgovarajuće sorte donora peludi: 'Cipressino' (E1), 'Drobnica' (E2), Oblica' (E3) i 'Levantinka' (E4). Svi prikazani embriji rezultat su stranooprašivanja te je objašnjenje potkrijepljeno i pripadajućim elektroferogramima (Slika 27).

Donor peludi i duljine alela (pb)		**Majčinska biljka - sorta 'Lastovka'**	**Oznaka embrija**	**Genotip embrija**
'Cipressino'	194 207	192	E1	192 194
'Drobnica'	192 199		E2	192 199
'Oblica'	192 218	194	E3	194 218
'Levantinka'	192 199		E4	194 199

Ocjena rada u tijeku!



Slika 27. Prikaz elektoferograma za 4 embrija sorte 'Lastovka' navedena u Tablici 20.

U 2019. godini ukupno je genotipizirano 329 embrija izdvojenih iz plodova sorte 'Lastovka' (Tablica S1), a u 2020. godini ukupno je genotipizirano 290 embrija (Tablica S2). Potencijalni donori peludi određeni su prema LOD vrijednosti. Dobiveni podaci koji uključuju negativne LOD vrijednosti što podrazumijeva da je manje vjerojatno da je potencijalni donor peludi stvarni donor nego da nije, nisu uzeti u razmatranje, ali su prikazani u Tablici S1 i Tablici S2. Roditeljskom analizom temeljenom na simulaciji određen je prag LOD vrijednosti za identificiranje najvjerojatnijih donora peludi: 2,29 za 2019. godinu i 1,11 za 2020. godinu. U 2019. godini bio je određen donor peludi s LOD vrijednosti iznad praga za 221 embrij, što čini ukupno 67,17 % od ukupnog broja embrija. U 2020. godini taj broj iznosi 207, što čini 71,38 % embrija od ukupnog broja embrija.

Najvjerojatniji donori peludi, odnosno potencijalni muški roditelji analiziranih embrija u uvjetima slobodnog oprašivanja u kojem majčinska biljka ima mogućnost izbora peludi različitih sorti te broj embrija dodijeljen potencijalnim oprašivačima u 2019. i 2020. godini, prikazani su u Tablici 21.

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 21. Broj embrija dodijeljen potencijalnim oprašivačima u 2019. i 2020. godini. Definirani pragovi LOD vrijednosti = 2,29 za 2019. godinu; 1,11 za 2020. godinu.

Sorta potencijalni oprašivač	Broj embrija s LOD vrijednosti poviše praga		Broj embrija s LOD vrijednosti ispod praga	
	2019	2020	2019	2020
‘Alveriano grionl’	3	2	0	0
‘Canino’	0	0	0	0
‘Chemlali’	0	1	2	0
‘Cipressino’	**49**	9	6	0
‘Colombino’	2	1	1	0
‘Drobnica’	13	**25**	6	0
‘Farga’	2	8	0	0
‘Fasolino’	5	8	0	0
‘Favarol’	3	6	0	0
‘Frantoio’	1	0	0	0
‘Grignan’	4	6	0	0
‘Karbunčela’	0	8	0	0
‘Koroneiki’	5	15	0	1
‘Lastovka’	0	0	0	0
‘Leccino’	0	1	0	0
‘Levantinka’	**92**	**79**	55	0
‘Maurino’	1	0	0	0
‘Moraiolo’	7	3	0	0
‘Oblica’	3	11	0	0
‘Olivastra Seggianese’	2	13	0	0
‘Parmesana’	7	2	5	0
‘Pendolino’	1	1	0	0
‘Picholine’	1	0	0	0
‘Rosciola’	6	0	1	0
‘Santa Caterina’	0	2	1	0
‘Sigoise’	13	5	5	1
‘Taggiasca’	1	1	0	0
Ukupno	221	207	82	2

U 2019. godini, sorte ‘Cipressino’ i ‘Levantinka’ identificirane su kao vodeći donori peludi za sortu ‘Lastovka’ (Tablica 21). U 2020. godini, ‘Levantinka’ je ostala najzastupljeniji donor peludi, a nakon nje najveći broj embrija dodijeljen je sorti ‘Drobnica’. Udio embrija dodijeljenih sorti ‘Cipressino’ iznosio je 22,17 %, a za sortu ‘Levantinka’ 41,63 % u 2019. godini. U 2020. godini sorta ‘Levantinka’ bila je potencijalni muški roditelj 38,16 % embrija, a sorta ‘Drobnica’ 12,07 %. Nadalje, u 2019. godini, unatoč LOD vrijednostima ispod definiranog praga za pouzdanu identifikaciju potencijalnih oprašivača, sorta ‘Cipressino’

Ocjena rada u tijeku!

identificirana je kao najvjerojatniji donor peludi za 6 embrija, a sorta 'Levantinka' za 55 embrija. Osim prethodno spomenutih sorti, u 2019. godini kao donori peludi kod 5,88 % embrija zabilježene su i sorte 'Drobnica' te 'Sigoise', kao i sorte 'Moraiolo' i 'Parmesana' od kojih je svaka zastupljena kao oprašivač 3,17 % embrija. Bitno je naglasiti da u nasadu nalazi samo jedno stablo sorte 'Parmesana' (Tablica 22). U 2020. godini, sorte 'Koroneiki', 'Oblica' te 'Olivastra Seggianese' također su primijećeni kao visoko zastupljeni potencijalni oprašivači embrija u postotku od 7,25 %, 5,31 % te 6,28 %. Iako je zastupljena sa samo jednim stablom u nasadu, sorta 'Koroneiki' bila je visoko zastupljen potencijalni roditelj u 2020. godini, a u 2019. godini bila je identificirana kao potencijalni oprašivač 2,26 % embrija. Uz spomenute sorte, sorte 'Alveriano grionl', 'Canino', 'Karbunčela' također su bile zastupljene sa samo jednim stablom u nasadu. Od navedenih sorti, nijedan embrij nije bio rezultat oprašivanja sorte 'Lastovka' sortom 'Canino' u obje eksperimentalne godine. U 2019. godini sorta 'Karbunčela' nije bila potencijalni roditelj nijednog embrija, dok je u 2020. godini 8 embrija nastalo kao rezultat oprašivanja sortom 'Karbunčela'. Sorti 'Alveriano grionl' roditeljstvo je dodijeljeno za 3 embrija u 2019. godini, a u 2020. godini za 2 embrija. U obje godine, nijedan embrij nije bio rezultat samooplodnje, što ukazuje na snažan odgovor samoinkompatibilnosti sorte 'Lastovka'.

Analize korelacije pokazale su statistički značajnu povezanost između broja embrija dobivenih oprašivanjem i oplodnjom sorte 'Lastovka' s određenim donorom peludi i broja stabala kojima je svaki potencijalni donor peludi zastupljen u nasadu u 2019. godini (Tablica 22). U ovoj analizi, uključena je i sorta 'Lastovka' kao potencijalni donor peludi, čime se ukazuje na mogući slučaj samooplodnje. Koeficijent korelacije iznosio je $r = 0,478$ ($p < 0,05$). U slučaju isključenja sorte 'Lastovka' iz analize obzirom na prethodne rezultate koji potvrđuju samoinkompatibilnost navedene sorte koeficijent korelacije iznosio je $r = 0,483$ ($p < 0,05$), dok je u 2020. godini utvrđena pozitivna vrijednost povezanosti u oba slučaja, no ona nije bila statistički značajna ($r = 0,151$ i $r = 0,156$ u slučaju isključenja sorte 'Lastovka' iz analize). Također, udaljenost najbližeg stabla određenog potencijalnog donora peludi i središnjeg stabla sorte 'Lastovka' statistički je značajno utjecala na broj embrija dobivenih oprašivanjem i daljnjom oplodnjom s određenom sortom donorom peludi. Koeficijenti korelacije iznosili su $r = –0,393$ ($p < 0,05$) za 2019. godinu i $r = –0,595$ ($p < 0,05$) za 2020. godinu u slučaju isključenja sorte 'Lastovka' iz analize. U 2019. godini, kada je sorta 'Lastovka' uključena u analizu kao potencijalni donor peludi, utvrđena je negativna vrijednost povezanosti, no ona nije dosegla razinu statističke značajnosti ($r = –0,328$), dok je u 2020. godini je utvrđena značajna povezanost $r = –0,508$ ($p < 0,01$). Također, provedena je i analiza korelacije broja embrija

Ocjena rada u tijeku!

dobivenih oprašivanjem i daljnjom oplodnjom s određenom sortom donorom peludi i broja zajedničkih dana u cvatnji pojedinog potencijalnog oprašivača sa sortom ‘Lastovka’, a rezultati su potvrdili pozitivnu vrijednost uz izostanak značajne povezanosti u obje eksperimentalne godine (r = 0,01 za 2019. godinu i r = 0,141 za 2020. godinu).

Tablica 22. Popis potencijalnih oprašivača, broj stabala oprašivača u nasadu, udaljenost najbližeg stabla sorte oprašivača od središnjeg stabla sorte ‘Lastovka’ (m), broj embrija s LOD vrijednosti iznad definiranog praga u 2019. i 2020. godini dodijeljenih određenom oprašivaču te ukupan broj dana u cvatnji pojedinog potencijalnog oprašivača sa sortom ‘Lastovka’. Podaci su korišteni u korelacijskoj analizi.

Sorta potencijalni oprašivač	Broj stabala u nasadu	Udaljenost od središnjeg stabla sorte ‘Lastovka’ (m)	Broj embrija s LOD vrijednosti iznad definiranog praga		Zajednički dani u cvatnji sa sortom ‘Lastovka’	
			2019	2020	2019	2020
‘Alveriano grionl’	1	162,86	3	2	5	4
‘Canino’	1	165,02	0	0	2	3
‘Chemlali’	2	156,40	0	1	5	7
‘Cipressino’	100	135,92	49	9	5	4
‘Colombino’	2	123,20	2	1	4	4
‘Drobnica’	26	18,50	13	25	5	5
‘Farga’	2	149,71	2	7	4	6
‘Fasolino’	2	155,69	5	8	5	5
‘Favarol’	6	98,80	3	6	5	4
‘Frantoio’	5	75,49	1	0	6	6
‘Grignan’	4	90,82	4	6	3	4
‘Karbunčela’	1	47,70	0	8	1	2
‘Koroneiki’	1	92,00	5	15	6	8
‘Lastovka’	13	/	0	0	/	/
‘Leccino’	13	83,08	0	1	4	3
‘Levantinka’	13	5,80	92	79	5	6
‘Maurino’	4	130,28	1	0	8	7
‘Moraiolo’	6	105,96	7	3	4	6
‘Oblica’	26	5,80	3	12	6	6
‘Olivastra Seggianese’	4	145,99	2	13	5	4
‘Parmesana’	1	124,64	7	2	6	4
‘Pendolino’	6	177,77	1	1	5	4
‘Picholine’	2	154,38	1	0	6	7
‘Rosciola’	4	114,46	6	0	7	4

Ocjena rada u tijeku!

4.5. Transkriptomska analiza nakon samooprašivanja i stranooprašivanja cvjetova masline

Nakon provedenih kontroliranih tretmana samooprašivanja sorte 'Oblica' te stranooprašivanja sorte 'Oblica' s peludi sorte 'Levantinka', provedena je transkriptomska analiza tkiva tučka s ciljem utvrđivanja razlika u genskoj ekspresiji.

4.5.1. Izolacija i kvantifikacija ukupne RNA

Izolacija RNA provedena je iz 18 uzoraka tkiva tučka sorte 'Oblica', koji su uključivali tretmane samooprašivanja i stranooprašivanja. U daljnji proces sekvenciranja bilo je uključeno ukupno 6 uzoraka zadovoljavajuće čistoće, koncentracije i kvalitete (Tablica 23). Uzorci 2 i 16 uzeti su s istoga stabla kao i uzorci 4 i 7 (Tablica 2), što se uzelo u obzir u daljnjoj statističkoj obradi podataka dobivenih sekvenciranjem. Koncentracija RNA spektrofotometrijski je određena uz pomoć uređaja NanoPhotometer N60 (Implen, Njemačka).

Tablica 23. Rezultati dobiveni analizom svih izoliranih RNA molekula (koncentracija (ng/µL), omjer apsorbancija 260/280 i 260/230, volumen (µL) te količina RNA (µg)). Plavom bojom označeni su uzorci koji su zadovoljili kriterije čistoće i koncentracije ukupne RNA te su mogli biti uključeni u daljnju pripremu cDNA knjižnica za sekvenciranje.

Uzorak	Koncentracija RNA (ng/µl)	260/280	260/230	Volumen (µL)	Količina RNA (µg)
1	286,8	2,204	2,454	22	6,309
2	227,5	2,187	2,028	20	4,550
3	158,00	2,188	2,158	20	3,160
4	210,1	2,193	2,215	21	4,4121
5	227,2	2,208	2,446	21	4,7712
6	358,9	2,215	2,423	20	7,178
7	144,8	2,181	1,89	20	2,896
8	137,6	2,176	1,581	22	3,0272
9	110,6	2,18	1,948	22	2,4332
10	46,1	2,2	0,507	20	0,922
11	91,4	2,169	2,293	22	2,0108
12	85,2	2,188	1,99	21	1,7892
13	50,5	2,22	1,309	22	1,111
14	163,8	2,191	2,284	21	3,4398
15	314,9	2,21	2,464	21	6,6129
16	121,8	2,165	2,677	21	2,5578
17	101,7	2,181	1,423	22	2,2374
18	100,3	2,214	0,328	22	2,2066

Ocjena rada u tijeku!

4.5.2. Kontrola kvalitete podataka dobivenih sekvenciranjem

Rezultati sekvenciranja, odnosno dobivena očitanja (*engl*. reads), predstavljaju sekvence transkripata aktivnih gena u analiziranim uzorcima. Sekvenciranje je provedeno na NovaSeq 6000 Illumina platformi, pri čemu je ukupno generirano 470,4 x 10^6 klastera koji su zadovoljili Illumina filtere kvalitete (Tablica 24).

Tablica 24. Broj klastera koji su zadovoljili Illumina filtere kvalitete.

Uzorak	PF
2	78 862 374
4	52 714 939
7	95 083 179
11	89 853 313
14	83 482 469
16	70 419 715
Ukupno	470 415 989

Udio PF sekvenci u odnosu na ukupne (neobrađene) klastere iznosio je više od 77 %, što ukazuje na visoku učinkovitost sekvenciranja. FASTQ datoteke, korištene za daljnju analizu, sadržavale su isključivo očitanja iz klastera koji su prošli Illumina filtere kvalitete. Proces sekvenciranja protekao je uspješno te je generiran veliki broj visokokvalitetnih očitanja, iako je zabilježena neujednačenost u broju očitanja po uzoku.

Kvaliteta neobrađenih sekvenci provjerena je pomoću programskog alata FastQC. Kvaliteta očitanja svake baze određuje se na temelju pridružene Phred vrijednosti, koja se izražava na logaritamskoj skali i predstavlja vjerojatnost pogreške u očitanju pojedine baze. Više Phred vrijednosti ukazuju na veću pouzdanost očitanja određene baze; primjerice, vrijednost 30 odgovara jednoj pogrešno određenoj bazi na 1000, odnosno preciznosti od 99,9 %.

Rezultati analize pokazali su da su očitanja baza u svim uzorcima bila vrlo visoke kvalitete, pri čemu je ukupna kvaliteta sekvenci, određena na temelju pouzdanosti očitanja svake baze, bila zadovoljavajuća za daljnju obradu podataka. Tijekom sekvenciranja ponekad dolazi do nemogućnosti očitanja određene baze, koja se u sekvenci označava slovom „N“. Tijekom procesa uklanjanja adaptera (*engl*. trimming), sekvence duljine od 35 nukleotida, sastavljene isključivo od adaptorskih sekvenci označene su nizom od 35 „N“. U svrhu kontrole kvalitete, provjeren je i udio „N“ očitanja u sekvencama. Nijedan uzorak nije pokazao negativne

Ostena rada u tiseku!

efekte uzrokovane gubitkom baza, što ukazuje na stabilnost i točnost sekvenciranja svih uzoraka.

Kontrola kvalitete uključila je i analizu distribucije duljina sekvenci. Nakon procesa demultipleksiranja i uklanjanja adaptorskih sekvenci, većina očitanja u uzorcima bila je duljine oko 100 nukleotida.

Analiza i identifikacija mogućih kontaminacija u sekvenciranim uzorcima potvrdila je da se svi uzorci odnose na vrstu *Olea europaea* L. te da nije utvrđena prisutnost kontaminacija.

U Tablici 25 prikazani su rezultati sekvenciranja koji uključuju poravnanje sekvenci s referentnim genomom masline (*Olea europaea* L., PRJNA350614). Poravnata očitanja (*engl*. gene counts) predstavljaju broj očitanja koja su mapirana na specifične egzone u referentnom genomu. Neporavnata očitanja (*engl*. no feature) označavaju broj očitanja koja su mapirana izvan specifičnih egzonskih regija i pripadaju intronima ili drugim nepoznatim dijelovima genoma. Preklapajuća očitanja (*engl*. ambiguity) predstavljaju broj očitanja koja su mapirana na više specifičnih egzonskih regija koje pripadaju različitim genima. Postotak (%) jedinstvenih očitanja (*engl*. proportion of reads aligned to a unique position, % uniq) označava postotak očitanja koja su mapirana na jedinstveno, točno određeno mjesto u genomu masline, u odnosu na broj očitanja koja su prošla filtere kvalitete.

Tablica 25. Rezultati RNA sekvenciranja i poravnanja sekvenci na anotirane gene referentnog genoma masline.

Uzorak	Poravnata očitanja	Neporavnata očitanja	Preklapajuća očitanja	% jedinstvenih očitanja
2	71 322 253	8 260 258	75 445	83,78 %
4	63 560 691	6 679 321	66 954	84,22 %
7	68 660 153	6 797 846	70 018	84,06 %
11	60 853 931	5 472 691	65 215	84,19 %
14	52 433 733	6 092 145	59 553	83,19 %
16	38 673 305	4 447 851	51 101	81,90 %

Zaključno, rezultati su ukazali na izvrsnu kvalitetu poravnanja, s visokom stopom jedinstvenih očitanja. Većina očitanja bila je pravilno mapirana na specifične egzonske regije, čime je osigurana precizna i pouzdana analiza transkriptoma.

Ocjena rada u tijeku!

Dobivene sekvence uspješno su poravnate na 36 600 gena identificiranih i anotiranih u referentnom genomu masline. Cjelokupni popis gena dostupan je na poveznici https://bit.ly/doktorskirad_RabotegBožiković.

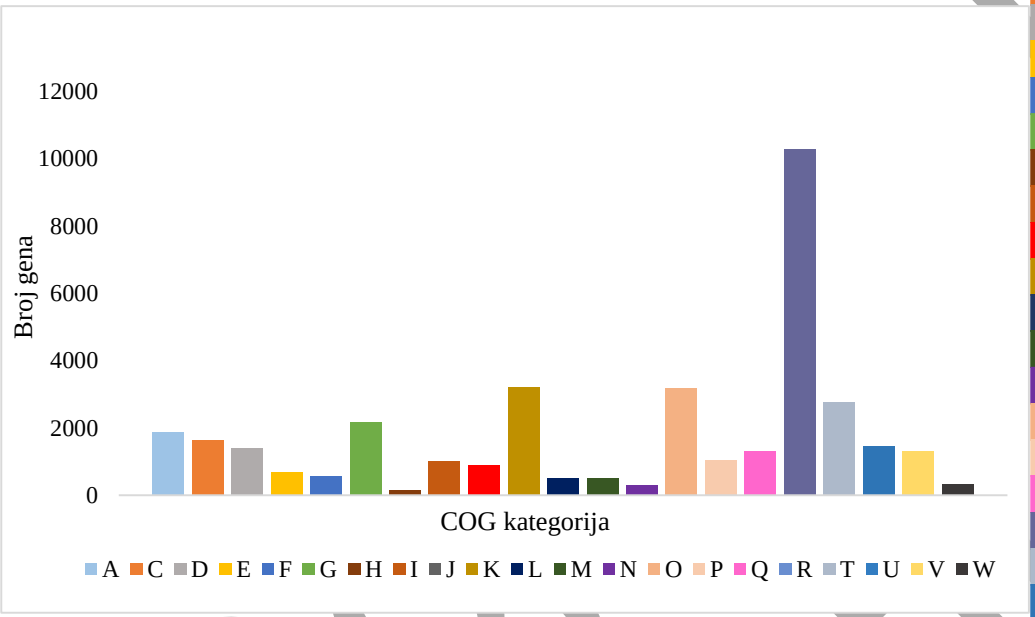
4.5.3. Analiza funkcionalne anotacije gena

Analiza funkcionalne anotacije ukupno 36 000 eksprimiranih gena, temeljena na klasifikaciji prema COG bazi podataka, pokazala je da je najveći udio gena (31,2 %; 11 232 gena) pripao funkcionalnoj kategoriji „Stanični procesi i signalizacija“. Slijedile su kategorije „Slabo okarakterizirani geni“ (28,57 %), „Metabolizam“ (23,84 %) te „Pohrana i obrada informacija“ (17,96 %).

Iako su činili vrlo mali udio od ukupnog broja gena, 0,1 % sekvenci dodijeljen je nedeterminiranim genima koji predstavljaju potencijalne orfanske gene (*engl*. orphan genes) koji nemaju homologne gene s drugim vrstama i čija funkcija još uvijek nije poznata. Prethodna istraživanja pokazala su da orfanski geni mogu činiti značajan udio genoma pojedinih vrsta, i do 30 % od ukupnog broja gena (Pereira i sur., 2024).

Unutar navedenih funkcionalnih kategorija, geni mogu obavljati specifične funkcije, ovisno o svojoj ulozi u biološkim procesima. Na Slici 28 prikazani su rezultati funkcionalne anotacije koji prikazuju raspodjelu broja anotiranih gena prema jasno definiranim COG kategorijama. Najzastupljenija COG kategorija „Predviđanje opće funkcije“ obuhvatila je 10 286 gena, odnosno 28,57 % od ukupnog broja gena. Slijedile su kategorije „Transkripcija“ (8,88 %; 3195 gena) te „Posttranslacijske modifikacije, degradacija proteina, šaperoni“ (8,82 %; 3175 gena). Nadalje, „Mehanizmima prijenosa signala“ pripalo je 2781 gena (7,73 %), a „Transportu i metabolizmu ugljikohidrata“ 2183 gena (6,06 %).

Ocjena rada u tijeku!



Opis:
- A: Uređivanje RNA i modifikacija
- C: Proizvodnja i pretvorba energije
- D: Kontrola staničnog ciklusa, dioba stanica, raspodjela kromosoma
- E: Transport i metabolizam aminokiselina
- F: Transport i metabolizam nukleotida
- G: Transport i metabolizam ugljikohidrata
- H: Transport i metabolizam koenzima
- I: Transport i metabolizam lipida
- J: Translacija, struktura i biogeneza ribosoma
- K: Transkripcija
- L: Replikacija, rekombinacija i popravak DNA
- M: Biogeneza stanične stijenke, membrane i ovojnice
- N: Stanična pokretljivost
- O: Posttranslacijske modifikacije, degradacija proteina, šaperoni
- P: Transport i metabolizam anorganskih iona
- Q: Biosinteza, transport i katabolizam sekundarnih metabolita
- R: Predviđanje opće funkcije
- T: Mehanizmi prijenosa signala
- U: Međustanična komunikacija, sekrecija i vezikularni transport
- V: Obrambeni mehanizmi
- W: Vanstanične strukture

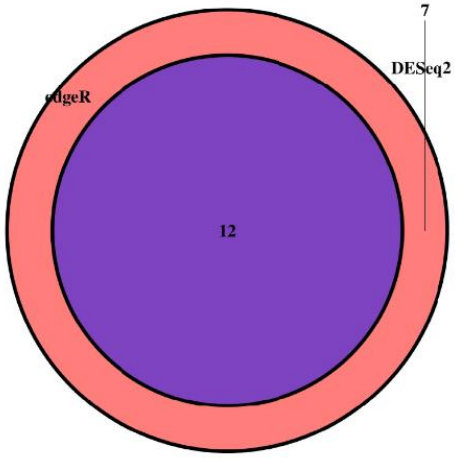
Slika 28. Funkcionalna analiza transkriptoma masline (*Olea europaea* L.).

Ocjena rada u tijeku!

4.5.4. Analiza diferencijalne ekspresije gena

U analizi diferencijalne ekspresije gena između dva različita tretmana, samooprašivanja i stranooprašivanja, korištena su dva paketa programskog jezika R, DESeq2 i EdgeR. Cilj analiza bio je identificirati gene sa značajno promijenjenom razinom ekspresije ovisno o tretmanu. Statistički značajnim diferencijalno eksprimiranim genima smatrani su oni geni kod kojih je prilagođena p-vrijednost (padj) iznosila manje od 0,05 (<0,05).

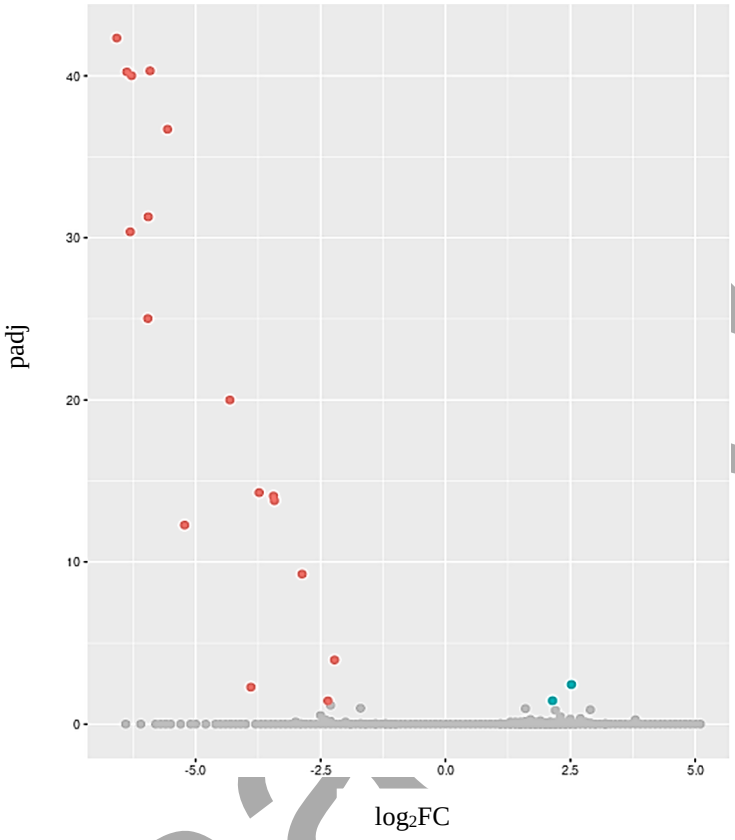
Pomoću DESeq2 alata identificirano je 19 gena koji su pokazali statistički značajnu diferencijalnu ekspresiju između tretmana. Analiza provedena alatom edgeR potvrdila je postojanje 12 zajedničkih gena koji su bili značajno diferencijalno eksprimirani u obje analize (Slika 29).



Slika 29. Usporedba edgeR i DESeq2 alata obzirom na diferencijalno eksprimirane gene O x O / O x L.

Diferencijalno eksprimirani geni dobiveni nakon korištenja DESeq2 alata između dvaju uvjeta (padj < 0,05) prikazani su u obliku vulkan grafa (Slika 30). Usporedba diferencijalne genske ekspresije između dvaju eksperimentalnih tretmana samooprašivanja i stranooprašivanja (O x O / O x L) pokazala je da je ukupno 19 gena imalo statistički značajnu promijenjenu ekspresiju, od čega 17 gena sa smanjenom ekspresijom te 2 gena s pojačanom ekspresijom.

Ocjena rada u tijeku!



Slika 30. Grafički prikaz logaritamski transformirane prilagođene p-vrijednosti (y-os) u odnosu na promjene ekspresije log_2FC (x-os). Crvenim točkama prikazani su geni sa smanjenom ekspresijom, dok je plavom bojom prikazano svega 2 gena s pojačanom ekspresijom.

Od svih gena, samo gen LOC111393867, ne kodira za proteine, već je označen kao ncRNA (*engl*. non-coding RNA). Od ukupnog broja gena, 17 gena je imalo negativnu log_2FC vrijednost, što upućuje na povećanu ekspresiju tih gena u kompatibilnom O x L tretmanu. Samo dva gena imala su pozitivnu log_2FC vrijednost, odnosno povećanu ekspresiju u nekompatibilnom O x O tretmanu. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost da pojačana ekspresija navedenih citokroma ima ulogu u blokiranju oplodnje u nekompatibilnom tretmanu. Potpuni nazivi gena prema engleskom jeziku navedeni su u Tablici 26.

Ocjena u tijeku!

Tablica 26. Popis diferencijalno eksprimiranih gena dobivenih usporedbom gena između dva različita tretmana O x O / O x L složenih prema padajućim log_2FC vrijednostima.

	Opis gena	Lokus	log_2FC	padj
1	cytochrome P450 *83B1-like*	LOC111384607	2,52	$3,64 \times 10^{-3}$
2	cytochrome P450 *83B1-like*	LOC111370351	2,14	$3,62 \times 10^{-2}$
3	major pollen allergen *Lig v 1-like*	LOC111375309	-2,22	$1,11 \times 10^{-4}$
4	nekarakteriziran gen	LOC111393867	-2,35	$3,69 \times 10^{-2}$
5	major pollen allergen *Ole e 1*	LOC111407021	-2,87	$5,58 \times 10^{-10}$
6	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111406051	-3,42	$1,64 \times 10^{-14}$
7	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407023	-3,44	$8,53 \times 10^{-15}$
8	major pollen allergen *Lig v 1*	LOC111375310	-3,73	$5,23 \times 10^{-15}$
9	cytochrome P450 *78A5-like*	LOC111372389	-3,89	$5,29 \times 10^{-3}$
10	major pollen allergen *Lig v 1-like*	LOC111402683	-4,32	$1,01 \times 10^{-20}$
11	receptor-like protein kinase *ANXUR1*	LOC111387789	-5,22	$5,27 \times 10^{-13}$
12	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407022	-5,56	$2,00 \times 10^{-37}$
13	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407025	-5,91	$4,90 \times 10^{-41}$
14	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407028	-5,95	$5,07 \times 10^{-32}$
15	anther-specific protein *LAT52-like*	LOC111400755	-5,96	$9,54 \times 10^{-26}$
16	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407026	-6,28	$9,90 \times 10^{-41}$
17	major pollen allergen *Lig v 1-like*	LOC111385849	-6,31	$4,25 \times 10^{-31}$
18	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111407024	-6,38	$5,81 \times 10^{-41}$
19	major pollen allergen *Ole e 1-like*	LOC111406052	-6,58	$4,71 \times 10^{-43}$

Ocjena rada u tijeku!

Tablica 27 prikazuje usporedbu diferencijalno eksprimiranih gena s homolognim genima identificiranim u drugim biljnim vrstama. Ova usporedba omogućuje bolju funkcionalnu interpretaciju njihovih mogućih uloga, što će biti detaljnije obrađeno u poglavlju „Rasprava“.

Tablica 27. Homologni geni diferencijalno eksprimiranih gena u različitim biljnim vrstama i njihova funkcija.

Gen	Vrsta	Funkcija	Referenca
Anther-specific protein *LAT52-like*	*Solanum lycopersicum L.*	Hidratacija i germinacija peludi te rast peludnih mješinica	Tang i sur., 2002.; Twell i sur., 1989
Cytochrome P450 83B1-*like*	*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh	Proizvodnja glukozinolata i biosinteza auksina; otpornost na patogene	Bak i sur., 2001.; Bak i Feyereisen, 2001.; Barlier i sur., 2000.; Naur i sur., 2003.
Cytochrome P450 *78A5-like*	*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh	Regulator rasta biljnih organa; otpornost na biotičke i abiotičke stresove	Adamski i sur., 2009.; Anastasiou i sur., 2007.; Cornet i sur.2021; Jiang i sur. 2021.
Major pollen allergen *Lig v 1-like*	*Ligustrum vulgare* L.	Uključeni u rast peludnih mješinica	Batanero i sur., 1996.
Major pollen allergen *Ole e 1*	*Olea europaea* L.	Regulacija procesa prije klijanja peludi, formiranje, signalizacija i usmjeravanje peludnih mješinica, održavanje osmotskog gradijenta unutar peludnih mješinica	Alché i sur., 1999.; Alché i sur., 2004.
Receptor-like protein kinase *ANXUR1*	*Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh*	Regulacija integriteta stanične stijenke i rasta peludnih mješinica	Boisson-Dernier i sur., 2009. Miyazaki i sur., 2009.

Ocjena rada u tijeku!

5. RASPRAVA

U ovom poglavlju objedinjeni su i interpretirani rezultati koji pružaju sveobuhvatan uvid u reproduktivnu biologiju masline (*Olea europaea* L.), a obuhvaćaju analizu fenoloških i klimatskih čimbenika, reproduktivnih procesa u cvijetu masline, identifikaciju najuspješnijih donora peludi sorte 'Lastovka' i 'Oblica' u uvjetima slobodnog oprašivanja primjenom metoda koje uključuju praćenje procesa u cvijetu, mikrosatelitne biljege i roditeljski test te analizu ekspresije gena uključenih u mehanizme samoinkompatibilnosti.

Početak razdoblja cvatnje razlikovao se između sorti. U 2019. i 2021. godini cvatnja je započela istoga dana, 14. svibnja, dok je u 2020. godini cvatnja započela pet dana ranije, 9. svibnja. Tijekom zimskog razdoblja koje prethodi cvatnji, stabla masline trebaju biti izložena niskim temperaturama radi akumulacije hladnoće potrebne za prekid mirovanja (dormancija) i nastavak razvoja cvjetnih pupova (Orlandi i sur., 2004). Temperaturni prag od 7,2 °C, prema Rallo i Martin (1991), smatra se učinkovitom za ispunjenje zahtjeva za akumulacijom niskih temperatura i prekid mirovanja, čime se omogućuje nastavak razvoja cvjetnih pupova. Nakon dormancije, pupovi su spremni za aktivaciju cvatnje i akumulaciju toplinskih jedinica potrebnih za početak metaboličke aktivnosti i razvoj cvatova. Budući da su toplinski zahtjevi genetski određeni, različite sorte pokazuju varijacije u zahtjevima za akumulacijom niskih i visokih temperatura zraka, što dovodi do razlika u fenološkom razvoju i vremenu početka cvatnje (Alcalá i Barranco, 1992; De Melo-Abreu i sur., 2004).

U ranijim istraživanjima fenologije masline korišteni su različiti temperaturni pragovi za izračun vrijednosti akumuliranih toplinskih i hladnih jedinica, koji odražavaju razlike u metodološkim pristupima i klimatskim uvjetima istraživanih područja. Primjerice, Vuletin Selak i sur. (2018) koristili su tri granične temperature za izračun toplinskih jedinica (9 °C, 11 °C i 12,5 °C) koje su potrebne različitim sortama maslina u Hrvatskoj, dok su Galán i sur. (2005) predložili optimalne temperaturne pragove ovisno o regiji uzgoja u Španjolskoj: Cordoba (12,5 °C), Málaga (10 °C), Priego (5 °C), Jaén (7 °C).

Analiza temperaturnih zahtjeva masline temeljena na vrijednostima akumuliranih sati toplinskih jedinica (GDH) pri pet temperaturnih pragova (8 °C; 9,2 °C; 10 °C, 11 °C i 12,5 °C) te akumuliranim satima hlađenja (CH) za temperature ispod 7,2 °C u četiri vremenska razdoblja (CH1 studeni-siječanj; CH2 studeni-veljača; CH3 studeni-ožujak; CH4 studeni-travanj) te broju dana u godini od 1. siječnja do početka razdoblja cvatnje (DPC), pokazala je jasne razlike između sorti u fenološkom odgovoru. Analiza stabla odluke omogućila je grupiranje sorti

Ocjena rada u tijeku!

masline u tri skupine: (i) sorte s ranom cvatnjom, (ii) sorte s kasnom cvatnjom, (iii) sorte s fenološkom plastičnosti. Rezultati su pokazali da je varijabla GDH11 imala najveću diskriminacijsku snagu, budući da je jasno razdvojila sorte s ranijom i kasnijom cvatnjom. Sorte koje su do početka cvatnje akumulirale više od 7427.1 sati toplinskih jedinica veći (GDH11 > 7427.1) cvjetale su kasnije, dok su one s nižim vrijednostima ostvarile raniji početak cvatnje (Slika 22). Sorta 'Karbunčela' dosljedno je svrstana u skupinu sorti s kasnom cvatnjom, dok je sorta 'Santa Caterina' pripala skupini sorti s ranijom cvatnjom u trogodišnjem razdoblju (2019.-2021.), s manjom količinom akumuliranih sati toplinskih jednica potrebnih za početak cvatnje. Obje sorte karakterizira stabilan fenološki odgovor i visoka otpornost na temperaturne oscilacije, što odražava njihovu nisku fenološku plastičnost.

Vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica pri temperaturnom pragu od 12,5 °C pokazale su se iznimno važnima za razlikovanje sorti unutar skupine sorti s ranijom cvatnjom. Taj temperaturni prag omogućio je jasnu podjelu između sorti s ranim cvjetanjem i onih s promjenjivim početkom cvatnje. Alcalá i Barranco (1992) su istaknuli da upravo 12,5 °C najbolje opisuje fiziološki odgovor masline tijekom razvoja cvijeta, dok su Rallo i Martin (1991) utvrdili da ta temperatura omogućuje završetak akumulacije niskih temperatura i predstavlja optimalan temperaturni prag za nastavak rasta i diferencijaciju cvjetnih pupova. Važnost varijable GDH12,5 u ovom istraživanju potvrđuje fiziološku ulogu temperature od 12,5 °C kao graničnog praga ključnog za prelazak pupova iz stadija mirovanja u aktivno stanje, čime se objašnjavaju razlike u vremenu početka cvatnje među sortama.

Akumulacija hladnih sati izračunata je pomoću 'Chilling hours' modela (≤ 7,2 °C), koji je potvrđen kao najprikladniji za procjenu zahtjeva za niskim temperaturama u mediteranskim klimatskim uvjetima (Rojo i sur., 2020). Budući da su zime u mediteranskom području blage, niži temperaturni prag od 7,2 °C pokazao se dovoljno osjetljivim za detekciju stvarne izloženosti pupova učinkovitim niskim temperaturama potrebnima za prekid dormancije. Ipak, analiza stabla odluke pokazala je da varijable povezane s akumulacijom hladnih sati (CH) nisu imale značajnu ulogu u razdvajanju sorti, dok su vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica predstavljale glavni kriterij klasifikacije (Slika 22). Slične rezultate zabilježili su i Rojo i sur. (2020) te El Yaacoubi i sur. (2014), koji su istaknuli važniju ulogu toplinskih zahtjeva u određivanju početka cvatnje u odnosu na zahtjeve za niskim temperaturama.

Grupiranje sorti u skupinu ranog cvjetanja, središnju skupinu sorti koje pokazuju izraženu fenološku plastičnost i skupinu kasnog cvjetanja pokazala je relativnu stabilnost kroz promatrano razdoblje (2019.-2021.). Sorte 'Chemlali', 'Farga', 'Koroneiki', 'Lastovka' i

Ocjena rada u tijeku!

‘Maurino’ pripale su skupini sorti s ranijom cvatnjom u 2019. i 2021. godini, dok su u 2020. godini pokazale pomak prema skupini sorti s fenotipskom plastičnosti, čime su ukazale na sposobnost djelomične prilagodbe promjenjivim uvjetima prije cvatnje. Veći broj sorti zadržao se nerazdvojen u središnjem dijelu stabla odluke. U toj su skupini bile zastupljene sorte ‘Alveriano grionl’, ‘Cipressino’, ‘Colombino’, ‘Drobnica’, ‘Fasolino’, ‘Favarol’, ‘Frantoio’, ‘Levantinka’, ‘Moraiolo’, ‘Oblica’, ‘Olivastra Seggianese’, ‘Parmesana’, ‘Pendolino’, ‘Picholine’, ‘Rosciola’ koje su tijekom čitavog promatranog razdoblja (2019.-2021.) pripale skupini sorti s izraženom fenotipskom plastičnosti. Njihova zadržana pozicija u središnjem dijelu stabla odluke pokazuje da GDH, CH i DPC vrijednosti nisu bile dovoljno divergentne da bi omogućile njihovo razdvajanje u skupine ranih ili kasnih sorti.

Cvatnja masline u mediteranskom području odvija se između kraja travnja i početka lipnja. Porast temperature tijekom zime i proljeća potiče raniji početak cvatnje. Klasterska analiza provedena u ovom istraživanju na objedinjenim podacima za razdoblje od 2019.-2021. godine omogućila je grupiranje sorti masline prema sličnostima u GDH, CH i DPC vrijednostima. Dobiveni rezultati pokazuju da se isti ili sličan datum početka cvatnje može ostvariti pri različitim CH i GDH vrijednostima, što potvrđuje da njihov učinak na fenologiju cvatnje nije linearan.

Primjerice, kasnija cvatnje (142. dan) zabilježena je i pri niskim GDH uz prosječne CH vrijednosti (klaster 0), kao i pri visokim GDH uz visoke CH vrijednosti (klaster 2). U prvom slučaju, unatoč dovoljnoj akumulaciji CH, ograničena akumulacija GDH tijekom proljeća usporila je prijelaz pupova u aktivnu fazu rasta, što je rezultiralo kasnijim početkom cvatnje. U drugom slučaju, iako su vrijednosti GDH bile visoke, dugo i hladno zimsko razdoblje uz visoku akumulaciju CH moglo je produljiti trajanje dormancije, čime je odgođen fiziološki odgovor i početak cvatnje.

Suprotno tome, rana cvatnja (131. i 134. dan) je zabilježena pri niskim CH vrijednostima, ali uz različite toplinske zahtjeve, od prosječnih (klaster 1) do visokih (klaster 3) GDH vrijednosti. Kod prve kombinacije, iako razdoblje akumulacije hladnih sati nije bilo izraženo, umjereno visoke proljetne temperature omogućile su aktivaciju pupova i rani početak cvatnje. U drugoj kombinaciji, vrlo visoke GDH vrijednosti omogućile su raniji početak cvatnje unatoč nedostatku hladnih sati, jer su visoke temperature ubrzale akumulaciju toplinskih jedinica tijekom blage zime.

Ocjena rada u tijeku!

Slično, klasteri 4 i 5 razlikovali su se samo jedan dan u početku cvatnje, premda su imali različite kombinacije GDH i CH (više CH i prosječne GDH u klasteru 4, naspram prosječnih CH i najnižih GDH u klasteru 5). U klasteru 4, viša akumulacija CH vjerojatno je produljila fazu zimskog mirovanja, ali je nakon ispunjenja zahtjeva za niskim temperaturama omogućila brži izlazak pupova iz dormancije pri porastu temperatura. U klasteru 5, iako je akumulacija toplinskih jedinica bila niska, dovoljan broj akumuliranih hladnih sati omogućio je prekid dormancije.

Za razliku od rezultata Alcalá i Barranco (1992) te Vuletin Selak i sur. (2018), prema kojima je najmanja vrijednost akumuliranih hladnih jedinica bila povezana s najranijim početkom cvatnje, dok su kasniji datumi cvatnje bili zabilježeni u godinama s većom akumulacijom hladnih jedinica, u ovom istraživanju zabilježen je nelinearan odnos između CH i GDH vrijednosti koji određuje vrijeme početka cvatnje. Kasnija cvatnja može nastupiti i pri niskim i pri visokim GDH vrijednostima što ukazuje na složen i nelinearan fiziološki odgovor masline na temperaturne promjene.

U 2020. godini zabilježene su najniže vrijednosti akumulacije hladnih sati, kada su zimske temperature bile više u odnosu na preostale godine istraživanja. Unatoč tome, cvatnja je nastupila ranije, što se može objasniti bržom akumulacijom toplinskih jedinica tijekom proljetnog razdoblja. Ovaj rezultat naglašava da dinamika cvatnje ovisi o međudjelovanju niskih i visokih temperatura zraka, pri čemu se niža akumulacija hladnih jedinica može nadoknaditi ubrzanom akumulacijom toplinskih jedinica.

Kao što je već ranije navedeno, sorta 'Karbunčela' pokazala je izrazitu fenološku stabilnost (Tablica 6) temeljenu na rezultatima stabla odluke. Međutim, u klasterskoj analizi svrstana je različite klastere ('Karbunčela' (2019.) i 'Karbunčela' (2021.) - klaster 2; 'Karbunčela' (2020.) – klaster 3). Navedena sorta odlikuje se stabilnim fenološkim odgovorom i umjerenom prilagodljivošću klimatskim uvjetima, što odražava njezinu genetski uvjetovanu prirodu sorte i relativnu otpornost na temperaturne oscilacije. Sve ostale sorte mijenjale su klastersku pripadnost između godina, što pokazuje njihovu izraženu fenološku plastičnost, odnosno sposobnost sorti da prilagode dinamiku akumulacije CH i GDH promjenjivim klimatskim uvjetima.

Iako se analiziralo trogodišnje razdoblje (2019.–2021.), rezultati klasterske analize pokazali su da se uzorci (sorta x godina) nisu grupirali isključivo prema godinama, već prema sličnostima u kombinacijama akumuliranih CH i GDH. Primjerice, uzorci iz 2019. godine

Ocjena rada u tijeku!

rasporedili su se u više klastera (npr. klaster 2 i klaster 4), stoga sve sorte unutar iste sezone nisu jednako reagirale na klimatske uvjete. Prema tome, genetski uvjetovani temperaturni zahtjevi sorti za akumulaciju hlađenja i topline, imaju značajniju ulogu u oblikovanju fenološkog odgovora od međugodišnjih klimatskih razlika.

Razumijevanje mehanizama oprašivanja i oplodnje kod masline ključno je za uspješno zametanje plodova te ostvarivanje stabilnih i visokih prinosa. Uspješna maslinarska proizvodnja temelji se na odabiru sorti koje su međusobno kompatibilne u vremenu cvatnje, oprašivanju i oplodnji. U ovom istraživanju primijenjene su različite metode za određivanje reproduktivne kompatibilnosti između sorti masline. Analizirani su reproduktivni procesi u cvijetu masline (*Olea europaea* L.), s posebnim naglaskom na klijanje peludi na njušci tučka dviju autohtonih sorti, 'Oblica' i 'Lastovka', prorastanje peludnih mješinica u vratu tučka navedenih sorti te uspjeh oplodnje nakon oprašivanja s peludi različitih sorti oprašivača.

Genotip njuške tučka utjecao je na uspjeh klijanja peludi sorti oprašivača. Uspjeh klijanja peludi sorti oprašivača ('Lastovka', 'Levantinka' i 'Oblica') na njušci tučka sorte 'Lastovka' u obje eksperimentalne godine (2020. i 2021. godina) bio je općenito dobar, iako su se među sortama oprašivačima uočile razlike u intezitetu klijanja na njušci tučka. Ipak, u 2020. godini, u razdoblju cvatnje sorte 'Lastovka' (10.–17. svibnja), zabilježene su više srednje dnevne temperature (do 23,5 °C) uz izostanak oborine, što je rezultiralo kraćim trajanjem cvatnje i time skraćenim efektivnim razdobljem oprašivanja. Takvi topliji i sušni uvjeti vjerojatno su doveli do bržeg isušivanja njuške tučka i njene smanjene prijemčivosti, čime je smanjena klijavost peludi na njušci tučka u odnosu na 2021. godinu, kada su temperature bile umjerenije, a mikroklimatski uvjeti povoljniji za oprašivanje i oplodnju. U obje godine najbolji uspjeh klijanja postignut je pri stranooprašivanju cvjetova sorte 'Lastovka' (2020. s peludi sorte 'Levantinka'; 2021. s peludi sorte 'Oblica'). Budući da pelud u početnoj fazi klijanja koristi vlastite energetske rezervne tvari (Herrero, 1992), inicijalno klijanje na njušci tučka ne odražava u potpunosti stvarnu kompatibilnost između genotipova, već prije svega vijabilnost peludi pojedine sorte oprašivača. Razlike među oprašivačima postale su izraženije tijekom analize prorastanja peludnih mješinica kroz vrat tučka i uspjeha oplodnje, gdje je stranooprašivanje s peludi sorte 'Levantinka' pokazalo najbolje rezultate i ukazalo na međusortnu kompatibilnost (Tablica 11; Tablica 12). Sorta 'Levantinka' istaknula se kao najprikladniji oprašivač sorte 'Lastovka' pa se može preporučiti proizvođačima pri planiranju novih nasada u cilju povećanja uspjeha oplodnje i prinosa. Pelud sorte 'Lastovka' ostvarila je slabiji uspjeh prorastanja

Ocjena rada u tijeku!

peludnih mješinica i oplodnje u odnosu na pelud sorti oprašivača u uvjetima stranooprašivanja, što je bilo osobito izraženo u 2021. godini.

Kod sorte 'Oblica' u obje godine istraživanja zabilježene su više vrijednosti svih promatranih reproduktivnih značajki, klijanja peludi na njušci tučka, rasta peludnih mješinica i uspjeha oplodnje pri stranooprašivanju sa sortama 'Lastovka', 'Leccino' i 'Levantinka' u odnosu na samooprašivanje, budući da je strana pelud pokazala je veći uspjeh klijavosti i veći udio peludnih mješinica koje su prorasle do dna vrata tučka, što je rezultiralo i većim uspjehom oplodnje. Slično, u istraživanju Vuletin Selak i sur. (2014b) kod svih sorti i svih godina u kojima je provedeno istraživanje, pelud oprašivača stranog genotipa bolje je klijala na njušci tučka od peludi koja je bila istog genotipa kao i tučak. Dobivene razlike u uspjehu stranooprašivanja, Vuletin Selak i sur. (2011) povezali su s rezultatima uspjeha zametanja plodova te utvrdili da je sorta 'Oblica' kompatibilna sa sortama 'Levantinka' i 'Leccino'. Niže vrijednosti klijanja peludi pri samooprašivanju upućuju na aktivnost mehanizama samoinkompatibilnosti. Budući da i nakon samooprašivanja ipak dolazi do klijanja vlastite peludi, a inhibicija rasta peludnih mješinica nastupa tek nakon inicijalnog prorastanja, dobiveni rezultati upućuju na to da se kod masline mehanizam samoinkompatibilnosti odvija prema gametofitskom modelu (GSI).

U prethodnim eksperimentima provedena su kontrolirana križanja, u kojima je pelud sorti oprašivača bila izravno nanesena na njuške cvjetova sorti 'Oblica' i 'Lastovka', dok je drugi dio ovog istraživanja temeljen na analizi roditeljstva embrija nastalih u uvjetima slobodnog oprašivanja, čime je omogućeno utvrđivanje stvarnih kombinacija oprašivanja koje su dovele do oplodnje i formiranja plodova u poljskim uvjetima.

Budući da mnoge sorte pokazuju izraženu samoinkompatibilnost, prisutnost genetski kompatibilnih oprašivača uz glavnu sortu u nasadu presudna je za oplodnju i produktivnost nasada. Razvoj molekularnih metoda, osobito analiza roditeljstva pomoću kodominantnih mikrosatelitnih biljega, omogućio je precizno utvrđivanje kompatibilnih kombinacija sorti masline i roditeljskih odnosa, kako u oplemenjivačkim programima, tako i u procjeni učinkovitosti oprašivanja u postojećim nasadima (Díaz i sur., 2007; Seifi i sur., 2012; De la Rosa i sur., 2013).

U ovom istraživanju roditeljski test temeljen na SSR biljezima omogućio je genotipizaciju i identifikaciju potencijalnih donora peludi za sortu 'Lastovka', prateću sortu uz dominantnu sortu 'Oblica', glavnu sortu u hrvatskim maslinicima i do sada najčešće istraživanu sortu (Vuletin Selak i sur., 2014; 2021). Tijekom cvatnje u svibnju, cvjetovi sorte 'Lastovka'

Ocjena rada u tijeku!

bili su izloženi slobodnom oprašivanju peludi 27 sorti masline, uključujući i vlastitu pelud (samooprašivanje). U vrijeme berbe u 2019. i 2020. godini, DNA je izolirana iz 621 ploda s majčinskih stabala sorte 'Lastovka' prema postupku ranije primijenjenom na sortama 'Istarska bjelica' i 'Oblica' (Baruca Arbeiter i sur., 2014; Vuletin Selak i sur., 2021).

Visoka polimorfnost i informativnost sedam korištenih SSR biljega omogućila je preciznu identifikaciju donora peludi, potvrdivši da pažljivo odabran, relativno malen set lokusa može pružiti potrebnu razlučivost za pouzdanu analizu roditeljstva. Iako je istraživanje provedeno u istom nasadu u obje godine, zabilježene su razlike u broju i raspodjeli alela na pojedinim SSR lokusima. U 2020. godini evidentirane su nešto više vrijednosti broja amplificiranih alela i efektivnog broja alela, uz neznatno višu opaženu heterozigotnost, dok je očekivana heterozigotnost ostala gotovo nepromijenjena u odnosu na 2019. godinu u populaciji embrija (Tablica 19).

Svi parametri genetske varijabilnosti, bili su niži kod embrija nego kod roditeljske populacije, budući da su svi embriji dijelili isti majčinski genotip. Kod roditeljske populacije, izračunata su još tri dodatna parametra: Shannonov informacijski index (I), vrijednost vjerojatnosti identiteta (PI) i vjerojatnost isključenja (EP), koji služe za procjenu prikladnosti primijenjenih molekularnih biljega u analizi roditeljstva. Vrijednost Shannonovog informacijskog indeksa (I=1,680) ukazuje na visoku alelnu raznolikost i ravnomjernu raspodjelu učestalosti alela, što je u skladu s visokom vrijednošću parametra EP (0,968), koja potvrđuje da je odabrani set biljega bio sposoban isključiti gotovo sve (96,8 %) donore peludi koji nisu imali genetsku sličnost s analiziranim embrijima. Još veća vrijednost EP (0,9968) zabilježena je u istraživanju Seifi i sur. (2012) koja dodatno potvrđuje visoku diskriminacijsku sposobnost SSR biljega u roditeljskim testovima. Niske vrijednosti parametra PI ukazuju na vrlo malu vjerojatnost pogrešnog određivanja donora peludi. Kombinacija sedam odabranih SSR lokusa bila je dovoljna za pouzdano određivanje donora peludi, kao i u ranijim istraživanjima na maslini, u kojima je relativno mali broj mikrosatelitnih lokusa bio dovoljan za pouzdane roditeljske testove (De La Rosa i sur., 2004; Mookerjee i sur., 2005; Dìaz i sur., 2007; Seifi i sur., 2012; Baruca Arbeiter i sur., 2014; Montemurro i sur., 2019; Vuletin Selak i sur., 2021; Mariotti i sur., 2020b; Cuevas i sur., 2024a,b).

Nijedan embrij nije nastao kao rezultat samooplodnje, što ukazuje na snažan odgovor koji se pripisuje samoinkompatibilnosti sorte 'Lastovka'. Mookerje i sur. (2005) su pomoću SSR biljega analizirali roditeljstvo sorti 'Barnea', 'Corregiola', 'Kalamata', 'Koroneiki' i 'Mission' te su, od ukupno 800 analiziranih plodova, utvrdili da su samo dva ploda nastala

Ocjena rada u tijeku!

samooplodnjom, čime je naglašena važnost prisutnosti kompatibilnih oprašivača za uspješnu oplodnju i zametanje plodova. Nadalje, analiza roditeljstva u istraživanju Baruca Arbeiter i sur. (2014) provedena na sorti 'Istarska bjelica' nije potvrdila nijedan embrij koji je nastao kao rezultat samooplodnje, već su svi analizirani embriji potjecali od različitih donora peludi, među kojima su sorte 'Leccino' i 'Leccio del Corno' bile identificirane kao najuspješniji kompatibilni oprašivači sorte 'Istarska bjelica'. Mariotti i sur. (2020b) su potvrdili odsutnost samooplodnje kod 1440 analiziranih embrija u uvjetima slobodnog oprašivanja različitih sorti masline. Slično je potvrđeno i kod sorte 'Oblica', gdje u analizi 622 embrija također nije utvrđen nijedan slučaj samooplodnje, kao ni u istraživanjima španjolskih sorti 'Arbosana' i 'Sikitita' (Vuletin Selak i sur., 2021; Cuevas i sur., 2024 a,b). Cuevas i sur. (2024b) utvrdili su međusobnu reproduktivnu kompatibilnost sorte 'Sikitita' i sorte 'Arbosana'. Prema rezultatima roditeljskog testa u istraživanju Seifi i sur. (2012), sorta 'Kalamata' pokazala je kompatibilnost sa sortama 'Barnea', 'Benito' i 'Katsourela', dok je bila nekompatibilna sa sortama 'Arbequina', 'Azapa' i 'Picual'. Na temelju svega navedenoga, može se zaključiti da maslina, neovisno o sorti i lokaciji istraživanja, pokazuje izraženu samoinkompatibilnost te da je stranooprašivanje od presudne važnosti za produktivnost maslinika, osobito u izoliranim nasadima i novim uzgojnim područjima, gdje uspjeh ovisi o dizajnu nasada i izboru kompatibilnih sorti masline.

Analiza roditeljstva omogućila je preciznu identifikaciju sorti koje su sudjelovale u oprašivanju i oplodnji sorte 'Lastovka'. Dobiveni rezultati jasno su pokazali da su u 2019. godini sorte 'Cipressino' i 'Levantinka' predstavljale vodeće donore peludi, dok je u 2020. godini sorta 'Levantinka' zadržala status dominantnog donora, a značajnu ulogu preuzela je i sorta 'Drobnica' (Tablica 21). Udio pojednih sorti u oprašivanju i oplodnji može se znatno razlikovati među godinama, iako se radi o istom eksperimentalnom nasadu i istim potencijalnim donorima peludi.

Učinkovitost oprašivanja uvjetovana je složenom interakcijom niza čimbenika, među kojima se ističu prostorna raspodjela i brojnost stabala kompatibilnih sorti, preklapanje u vremenu cvatnje, kao i meteorološki uvjeti tijekom razdoblja oprašivanja. Posebno su značajni čimbenici poput temperature zraka, količine oborine te smjera i jačine vjetra, koji neposredno određuju vijabilnost peludi, trajanje prijemčivosti njuške tučka te uspjeh rasta peludnih mješinica. Preklapanje u vremenu cvatnje pokazalo se jednim od ključnih preduvjeta za ostvarivanje oplodnje (Vuletin Selak i sur., 2021). Iako genetska kompatibilnost između dviju sorti postoji, oplodnja neće nastupiti ukoliko peludna zrnca dospiju na njušku tučka istraživane sorte izvan razdoblja njezine prijemčivosti. Stoga nedostatno preklapanje u cvatnji može

Ocjena rada u tijeku!

objasniti izostanak određenih potencijalno kompatibilnih donora peludi u roditeljskoj analizi. Praćenjem vremena cvatnje svih sorti u nasadu, potvrđeno je da su sorte identificirane kao najuspješniji oprašivači imale barem djelomično preklapanje u cvatnji sa sortom 'Lastovka', jednom od najranije cvjetajućih sorti u nasadu. Preklapanje u vremenu cvatnje sorti u nasadu važan je čimbenik uspješnog oprašivanja, čak i kada se ono ne odvija potpuno istovremeno, već se samo djelomično podudara. Tako je u 2019. godini sorta 'Lastovka' dosegnula fazu pune cvatnje u razdoblju od 21. do 23. svibnja, dok su sorta 'Cipressino' i sorta 'Levantinka' u punu cvatnju ušle nekoliko dana kasnije, ostvarivši pritom 4, odnosno 6 dana preklapanja u cvatnji sa sortom 'Lastovka'. U 2020. godini, najučinkovitiji potencijalni oprašivači, sorta 'Levantinka' i sorta 'Drobnica', imale su 6, odnosno 5 dana preklapanja u cvatnji sa sortom 'Lastovka'. Slična opažanja zabilježena su i u istraživanju Biton i sur. (2020) te Cuevas i sur. (2024a) u kojima se cvatnja potencijalnih donora peludi djelomično preklopila sa cvatnjom glavnih sorti u njihovim nasadima, 'Souri' i 'Arbosana'. U istraživanju provedenom na sortama 'Picual' i 'Barnea', došlo je do kratkog preklapanja razdoblja cvatnje tek pri završetku cvatnje sorte 'Barnea', a unatoč tome sorta 'Picual' bila je identificirana kao glavni donor peludi, što pokazuje važnost preklapanja efektivnog vremena oprašivanja (Shermer i sur., 2014).

Obzirom da je maslina anemofilna vrsta, vjetar predstavlja ključni mehanizam prijenosa peludi, a početak i trajanje cvatnje masline uvelike ovise o temperaturama u mjesecima koji joj prethode te o dnevnim oscilacijama u proljetnom razdoblju (Lavee i sur., 2002; Orlandi i sur., 2004). Analiza meteoroloških podataka pokazala je da su u 2019. godini tijekom cvatnje sorte 'Lastovka' (18.-26. svibnja) prevladavali promjenjivi vjetrovi, s čestim izmjenama istočnih, južnih i sjevernih struja (Slika 12). U takvim uvjetima najveći doprinos ostvarile su sorte u neposrednoj blizini ('Levantinka') te sorte iz sjeverno smještenog susjednog nasada ('Cipressino'). Presudnu ulogu imali su istočni i jugoistočni vjetrovi koji su pogodovali prijenosu peludi sa sorte 'Drobnica' smještene istočno od sorte 'Lastovka'.

Unatoč gotovo istovremenoj cvatnji sorte 'Maurino' i sorte 'Chemlali' sa sortom 'Lastovka', svega jedan plod u slučaju obje sorte u dvije godine bio je rezultat njihovog oprašivanja sorte 'Lastovka'. Ovakav rezultat upućuje na važnost prostornog rasporeda stabala u nasadu: obje sorte bile su zastupljene tek s manjim brojem stabala i smještene u udaljenim dijelovima nasada, što je značajno smanjilo vjerojatnost da će njihova pelud dospjeti do cvjetova sorte 'Lastovka', unatoč vremenskom preklapanju u cvatnji. Sve su sorte u ovom istraživanju bile smještene unutar raspona do 250 m (Cuevas i Pinillos, 2009), što se smatra učinkovitim za međusobno oprašivanje i oplodnju kompatibilnih sorti. Međutim,

Ocjena rada u tijeku!

najučinkovitija udaljenost oprašivanja za postizanje maksimalnog prinosa smatra se između 30 - 40 m (Fabbri i sur., 2004), dok su sorte ‘Maurino’ i ‘Chemlali’ bile smještene znatno dalje od tog optimuma.

U istraživanju Vuletin Selak i sur. (2021) provedenom na sorti ‘Oblica’ nije utvrđena značajna povezanost između udaljenosti stabala donora peludi od središnjeg stabla sorte ‘Lastovka’ i broja embrija nastalih njihovim oprašivanjem, što je suprotno rezultatima ovog istraživanja u kojima je prikazan značajan negativan utjecaj (2019. godina: $r = -0{,}393$ ($p < 0{,}05$); 2020. godina: $r = -0{,}595$ ($p < 0{,}05$)). U analizi roditeljstva embrija sorte ‘Istarska bjelica’ utvrđeno je da je veći broj embrija bio oplođen s peludi sorte ‘Leccio del corno’, koja se nalazila u njenoj neposrednoj blizini i time bila glavni donor peludi (Baruca Arbeiter i sur., 2014).

Dominantna uloga sorte ‘Levantinka’ u oprašivanju sorte ‘Lastovka’, zabilježena u obje godine istraživanja, u skladu je s njezinom blizinom i relativno visokom zastupljenosti u nasadu. Međutim, činjenica da se sorta ‘Oblica’, unatoč dvostruko većem broju stabala i jednakoj, maloj udaljenosti od središnjeg stabla sorte ‘Lastovka’ (Tablica 22), pokazala kao izrazito slab donor peludi, upućuje na utjecaj dodatnih čimbenika. Jedno od mogućih objašnjenja je izraženo svojstvo izmjenične (alternativne) rodnosti sorte ‘Oblica’. Naime, izmjena „on“ i „off“ godina kod navedene sorte povezana je s varijabilnim intezitetom cvatnje koji utječe na količinu proizvedene peludi i njenu koncentraciju u zraku te posljedično na njenu ulogu u oprašivanju. Poznato je da količina proizvedene peludi i intezitet cvatnje značajno variraju između godina (Cuevas i Polito, 2004), što može objasniti slabiju zastupljenost sorte ‘Oblica’ kao potencijalnog donora peludi u analiziranim embrijima.

Na uspjeh oprašivanja presudno utječe i brojnost stabala sorte donora peludi. To se jasno očitovalo na primjeru sorte ‘Cipressino’, koja se, unatoč većoj udaljenosti od sorte ‘Lastovka’, pokazala kao jedan od najučinkovitijih oprašivača. Veliki broj stabala sorte ‘Cipressino’ u nasadu (100) osigurao je obilnu proizvodnju peludi, stoga nizak udio embrija oplođenih nekim drugim sortama, ne upućuje nužno na njihovu inkompatibilnost, već na njihovu sekundarnu ulogu u oprašivanju u odnosu na dominantnije donore peludi, koji su zbog brojnosti ili pak blizine imali znatno veći doprinos. Zanimljivo je da su u pojednim slučajevima i pojedinačna stabla mogla doprinijeti oprašivanju sorte ‘Lastovka’. Sorta ‘Koroneiki’ koja je bila prisutna sa samo jednim stablom u nasadu, sudjelovala je u oplodnji većeg broja embrija. Nasuprot tome, sorte zastupljene također s pojedinačnim stablima, ali na većim udaljenostima, poput sorti ‘Canino’ i ‘Santa Caterina’, nisu zabljježene kao donori peludi.

Ocjena rada u tijeku!

Rezultati dobiveni analizom reproduktivnih procesa u cvijetu pomoću fluorescentne mikroskopije u skladu su s rezultatima dobivenima analizom roditeljstva u ovom istraživanju. Sorta 'Levantinka' pokazala se najuspješnijim oprašivačem koristeći obje metode istraživanja reproduktivne kompatibilnosti masline: u kontroliranim križanjima, gdje je ostvarila najveći uspjeh klijanja peludi na njušci tučka sorte 'Lastovka', prorastanja peludnih mješinica i oplodnje, kao i u uvjetima slobodnog oprašivanja, gdje je potvrđena kao najuspješniji donor peludi sorti 'Lastovka'. Roditeljska analiza potvrdila je i samoinkompatibilnost sorte 'Lastovka'. Integrirani pristup, koji objedinjuje fiziološke i genetske pokazatelje kompatibilnosti, ključan je za identifikaciju učinkovitih oprašivača i donošenje preporuka za podizanje višesortnih nasada masline.

Iako je SI kod masline potvrđena primjenom kontroliranih oprašivanja, praćenjem reproduktivnih procesa i analizama zametanja plodova, molekularna pozadina tog procesa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Vuletin Selak i sur., 2014b; Breton i Bervillé, 2012; Saumitou-Laprade i sur., 2017b). Dosadašnja istraživanja uglavnom su se oslanjala na molekularne biljege i ograničene transkriptomske podatke, obzirom da da referentni genomi masline nisu bili u potpunosti dostupni (Cruz i sur., 2016; Unver i sur., 2017).

U ovom istraživanju, RNA-seq metoda primijenjena je na uzorke tučkova sorte 'Oblica' nakon kompatibilnog stranooprašivanja s peludi sorte 'Levantinka' i nekompatibilnog samooprašivanja s ciljem identifikacije gena uključenih u mehanizme samoinkompatibilnosti. Dobiveni transkriptomski podaci, koji obuhvaćaju ukupno 36 600 eksprimiranih gena, proširuju dostupne genomske resurse masline i omogućuju dublje razumijevanje molekularne regulacije reproduktivnih procesa. Osim temeljne znanstvene vrijednosti, oni imaju i praktičan značaj u oplemenjivanju, posebice kroz odabir kompatibilnih oprašivača i optimizaciji sortimenta u maslinicima (Cuevas i sur.; 2024b). Interakcija peludi i njuške tučka ovisi o precizno koordiniranoj staničnoj signalizaciji i međustaničnoj komunikaciji, stoga transkriptomski podaci pružaju osnovu za razmatranje funkcionalnih skupina gena koje sudjeluju u tim procesima i njihovoj mogućoj ulozi u regulaciji mehanizma samoinkompatibilnosti.

Klasifikacija gena prema COG kategorijama pokazala je da najveći udio gena pripada skupini „Predviđanje opće funkcije" (Slika 28), što je u skladu s ranijim transkriptomskim istraživanjima provedenima na različitim vrstama, poput *Camellia oleifera*, *Dendrobium officinale*, *Erigeron breviscapus* (Chen i sur., 2021; He i sur., 2020; Zhang i sur., 2015). Ova funkcionalna COG kategorija odražava ograničenja postojećih baza podataka, jer značajan broj

Ocjena rada u tijeku!

gena još uvijek nema jasno definiranu biološku ulogu. Nasuprot tome, kategorija „Stanični procesi i signalizacija“, obuhvatila je najveći broj gena s jasnom funkcionalnom anotacijom, čime je naglašena njihova ulogu u regulaciji reproduktivnih procesa kod masline.

Kod vrste *Erigeron breviscapus* diferencijalno eksprimirani geni bili su povezani s međustaničnom komunikacijom, prijenosom signala i procesima oprašivanja (Zhang i sur., 2015), dok su kod vrste *Dendrobium officinale* geni kandidati povezani sa SI bili uključeni u ionski transport i metabolizmom, uređivanje i modifikaciju RNA te mehanizmime prijenosa signala (Chen i sur., 2021). Analize provedene na vrsti *Camellia oleifera* pokazale su da geni povezani s međustaničnom komunikacijom i signalizacijom imaju poseban značaj u proučavanju interakcije peludi i njuške tučka te razumijevanju samoinkompatibilnosti, pri čemu izvanstanični signali putem fosforilacije i defosforilacije pokreću stanične odgovore (He i sur., 2020). Ovakva podudarnost u funkcionalnim skupinama upućuje na to da su određeni mehanizmi regulacije samoinkompatibilnosti evolucijski očuvani, ali i da postoje razlike specifične za pojedine vrste koje je potrebno dodatno istražiti.

Rezultati ovog istraživanja nadovezuju se na prethodna istraživanja i pružaju novi uvid u molekularnu osnovu samoinkompatibilnosti kod masline. Diferencijalna analiza gena izdvojila je 19 kandidata sa značajnim promjenama u ekspresiji nakon kompatibilnog i nekompatibilnog tretmana oprašivanja (Tablica 26). Ti su geni svrstani u nekoliko COG funkcionalnih kategorija: „Proizvodnja i pretvorba energije“, „Kontrola staničnog ciklusa, dioba stanica, raspodjela kromosoma“, „Međustanična komunikacija, sekrecija i vezikularni transport“, „Mehanizmi prijenosa signala“, dok je jedan gen anotiran kao gen nepoznate opće funkcije. Međutim, još uvijek nije razjašnjeno u kojoj mjeri uloge tih gena kod masline odgovaraju homolognim genima u drugim biljnim vrstama, što naglašava potrebu za daljnjim istraživanjima radi preciznijeg određivanja njihove funkcije.

Citokromi P450 čine jednu od najvećih i najraznovrsnijih obitelji biljnih enzima iz klase oksidoreduktaza. Oni sudjeluju u širokom rasponu staničnih funkcija koje izravno utječu na rast, razvoj i prilagodbu biljaka. Posebno su značajni u biosintezi sekundarnih metabolita poput terpenoida, flavonoida, steroida, alkaloida, fenilpropanoida, glukozinolata i cijanogenih glikozida, ali i u stvaranju lignina, biljnih hormona te različitih zaštitnih spojeva. Na taj način P450 enzimi povezuju primarni i sekundarni metabolizam s regulacijom rasta, diferencijacije i obrambenih reakcija biljke. Njihova važnost očituje se i u ulozi u biosintezi auksina te u regulaciji signalnih puteva koji prate reproduktivne procese (Chakraborty i sur., 2023).

Ocjena rada u tijeku!

Prethodna istraživanja pokazala su da je auksinska signalizacija usko povezana s interakcijama tučka i peludi. Prema Solfanelli i sur. (2006), raspodjela indol-3-octene kiseline (IAA, prirodni auksin) u tučku povezana je s uspjehom oplodnje i ima važnu ulogu u regulaciji samoinkompatibilnosti kod masline pa se može pretpostaviti da se ključni signalni događaji odvijaju u ženskim reproduktivnim tkivima i imaju važnu ulogu u usmjeravanju rasta peludnih mješinica.

Povećana ekspresija dvaju gena koji kodiraju proteine slične citokromima P450 83B1-like (LOC111384607 i LOC111370351) u nekompatibilnom tretmanu samooprašivanja, upućuje na njihovu potencijalnu ulogu u regulaciji odgovora povezanih sa SI. Ovi geni homologni su *CYP83B1* genu iz biljke *Arabidopsis thaliana* (Barlier i sur., 2000; Bak i sur., 2001.; Bak i Feyereisen, 2001.; Naur i sur., 2003), koji je identificiran kao ključni regulator biosinteze indol-glukozinolata. Njegova funkcija temelji se na metabolizmu indol-3-acetaldoksima, zajedničkog prekursora za sintezu IAA i glukozinolata. Poznato je da gubitak funkcije gena *CYP83B1* dovodi do povećane akumulacije IAA i fenotipova obilježenih slabljenjem apikalne dominacije, dok njegova prekomjerna ekspresija uzrokuje smanjenje razina IAA i pojačanu apikalnu dominaciju (Bak i sur., 2001). Dok je kod vrste *Camellia oleifera* smanjena auksinska signalizacija tijekom samooprašivanja bila posljedica snižene ekspresije *AUX/IAA*, *ARF*, *GH3* i *SAUR* gena (He i sur., 2020), kod masline se isti ishod može povezati s pojačanom ekspresijom *CYP83B1* gena, koji kodira citokrome P450 uključene u metabolizam i razgradnju auksina. To također dovodi do efektivnog slabljenja auksinskog signala, što može rezultirati inhibicijom rasta peludne mješinice i posljedičnim blokiranjem oplodnje u nekompatibilnim križanjima.

U stranooprašivanju je, međutim, uočena povećana ekspresija drugog gena iz obitelji citokroma P450 (LOC111372389) koji pokazuje homologni odnos s *CYP78A5* genom iz biljke *Arabidopsis thaliana* (Anastasiou i sur., 2007; Adamski i sur., 2009; Cornet i sur., 2021). Ovaj gen, poznat i pod nazivom gen *KLUH* (*KLU*), identificiran je kao ključni regulator rasta organa i razvoja ploda, budući da je njegova ekspresija u unutarnjim integumentima sjemenog zametka povezana sa stimulacijom proliferacije i drugih stanica izvan mjesta vlastite ekspresije (Adamski i sur., 2009). Povećana ekspresija *CYP78A5* homologa kod masline mogla bi se tumačiti kao aktivacija razvojnih procesa u ženskim reproduktivnim tkivima, koji stvaraju povoljne uvjete za elongaciju peludnih mješinica, uspješnu oplodnju te kasniji razvoj ploda. Budući da je kod biljke *Arabidopsis thaliana* pokazano kako povećana ekspresija *KLU* dovodi do formiranja većeg sjemena i višeg sadržaja ulja u plodu (Adamski i sur., 2009), moguće je

Ocjena rada u tijeku!

pretpostaviti da bi slični mehanizmi mogli biti uključeni i kod masline, s posljedičnim učinkom na kvalitetu ploda. Dodatno, interakcija *KLU* sa signalnim mrežama strigolaktona (Cornet i sur., 2021), kao i njegova povezanost s povećanom otpornošću na patogene i abiotički stres (Maeda i sur., 2019; Jiang i sur. 2020), upućuju na to da ovaj gen može imati višestruku ulogu u očuvanju funkcionalnosti reproduktivnih tkiva u uvjetima stresa. Takva integracija razvojnih i zaštitnih funkcija pruža dodatno objašnjenje zašto je povećana ekspresija *CYP78A5* homologa povezana upravo s kompatibilnim oprašivanjem.

U ovom istraživanju analiza diferencijalne ekspresije gena utvrdila je povećanu ekspresiju *LAT52*-like gena (LOC111400755) u uvjetima stranooprašivanja, što se može povezati s njegovom važnom ulogom u kompatibilnim interakcijama peludi i tučka. U rajčici (*Solanum lycopersicum*) je pokazano da homologni gen *LAT52* kodira mali cisteinom bogati sekretorni protein LAT52 koji tvori kompleks s receptorskom kinazom LePRK2, smještenom u membrani peludnih mješinica te da navedena interakcija predstavlja ključni signalni mehanizam koji regulira hidrataciju i klijanje peludi te rast peludnih mješinica (Twell i sur., 1989; Muschietti i sur., 1998; Tang i sur., 2002). Pelud s potisnutom ekspresijom *LAT52* gena pokazuje abnormalan rast i ne može ostvariti oplodnju, čime je potvrđena njegova esencijalna uloga u reprodukciji. U istraživanju Alagna i sur. (2016) homologni geni za *LAT52* i *PRK* receptorske kinaze, koji su nužni za rast peludnih mješinica u rajčici, identificirani su u EST knjižnicama masline, što upućuje da je ovaj signalni mehanizam konzerviran i kod masline. Autori su također pokazali da je LAT52 visoko eksprimiran u prašnicima u odnosu na tučak, što je u skladu s njegovom funkcijom sekretornog proteina peludi. Ovakvi rezultati podupiru pretpostavku da interakcija između LAT52 i receptorskih kinaza predstavlja ključni element kompatibilnih interakcija peludi i tučka te ima presudnu ulogu u osiguravanju uspješne oplodnje kod masline.

Poznata je homologija LAT52 proteina sa specifičnim proteinom peludi Zm13 iz kukuruza (32%) (Hanson i sur., 1989), PS1 proteinom iz riže (36%) te Ole e 1 iz masline (Villalba i sur., 1993; Zou i sur., 1994). Među diferencijalno eksprimiranim genima u stranooprašivanju identificiran je jedan *Ole e 1* gen te čak osam gena iz skupine *Ole e 1*-like gena koji kodiraju cisteinom bogate proteine Ole e 1, glavne alergene peludi masline (Alché i sur., 1999). Ole e 1-like proteini imaju ključnu ulogu u regulaciji procesa prije klijanja peludi, formiranju, signalizaciji i usmjeravanju peludnih mješinica, kao i održavanju osmotskog gradijenta unutar peludnih mješinica (Alché i sur., 2004). Nadalje, prisutnost Ole e 1 proteina u eksini peludnog zrnca upućuje na njihovu moguću ulogu u procesima prepoznavanja peludi i njuške tučka te između peludnih mješinca i stanica vrata tučka (Alché i sur., 2004; Fernández-González i sur.,

Ocjena rada u tijeku!

2020). Diferencijalna ekspresija ovih gena nakon tretmana stranooprašivanja ukazuje na njihovu ključnu ulogu u uspostavi kompatibilne interakcije pelud-tučak, osobito kroz regulaciju hidracije, signalizacije i usmjeravanja peludnih mješinica. Takav ekspresijski odgovor sugerira da Ole e 1 i srodni proteini ne djeluju isključivo kao alergeni, već predstavljaju signalne molekule uključene u regulaciju reproduktivnih procesa. Obzirom na njihovu homologiju s LAT52 proteinom iz rajčice, moguće je da imaju sličnu regulatornu ulogu i kod masline. Ipak, homologni receptori kod masline još nisu identificirani, stoga su nužna daljnja funkcionalna istraživanja kako bi se razjasnila njihova uloga u molekularnim mehanizmima samoinkompatibilnosti.

Uz do sada navedene gene, identificirani su je i *Lig v* 1 gen i tri *Lig v 1*-like gena, također diferencijalno eksprimirana nakon stranooprašivanja. Proteini koje kodiraju ovi geni pripadaju istoj obitelji Ole e 1-like proteina. Eksprimiraju se tijekom razvoja prašnika, pohranjuju u endoplazmatski retikulum i sudjeluju u rastu peludnih mješinica (Batanero i sur., 1996; Barderas i sur., 2005). Njihova zajednička aktivacija u uvjetima stranooprašivanja podupire hipotezu da Ole e 1-like proteini predstavljaju konzerviranu skupinu signalnih molekula unutar porodice Oleaceae, čija je uloga ključna u uspostavi kompatibilnih interakcija pelud-tučak i uspješnom rastu peludnih mješinica kod masline.

LAT52, Ole e 1 i Lig v 1 pripadaju skupini CRP proteina koji se u biljkama javljaju kao ključne signalne molekule. Njihova aktivacija povezana je ne samo s regulacijom procesa klijanja peludi, usmjeravanja rasta peludnih mješinica i uspostave kompatibilnih interakcija pelud-tučak, već i s antimikrobnim funkcijama. Na temelju svega navedenoga, CRP proteini s jedne strane mogu djelovati kao posrednici međustanične komunikacije u kompatibilnom stranooprašivanju, dok s druge strane njihova ekspresija može pridonijeti mehanizmima kojima biljka blokira samooplodnju, potvrđujući njihovu potencijalnu ulogu u regulaciji samoinkompatibilnosti.

Receptorske serin-treonin kinaze transmembranski su proteini koji prepoznaju i vežu specifične signale putem izvanstaničnih domena, a svojim kinaznim domenama pokreću niz unutarstaničnih signalnih puteva. Identificirani *ANXUR1* gen kodira ANXUR1 receptore eksprimirane u peludnim mješinicama koji imaju ključnu ulogu u regulaciji integriteta stanične stijenke i rasta peludnih mješinica (Boisson-Dernier i sur., 2009; Miyazaki i sur., 2009). Njihova aktivacija povezuje se s djelovanjem NADPH oksidaza i proizvodnjom ROS-a, koje otvaraju Ca^{2+} kanale u plazmalemi peludnih mješinica i omogućuju održavanje stabilnog, vršno usmjerenog Ca^{2+} gradijenta bitnog za rast. Budući da Ca^{2+} dodatno stimulira aktivaciju ROS-a, jasno je da ANXUR1 receptori sudjeluju u održavanju međusobno povezane ROS-Ca^{2+}

Ocjena rada u tijeku!

signalne mreže (Boisson-Dernier i sur., 2009). U našem istraživanju povećana ekspresija *ANXUR1* gena u uvjetima stranooprašivanja kod masline sugerira da upravo takvi receptori imaju ključnu ulogu u uspostavi funkcionalne homeostaze potrebne za kontroliran rast peludnih mješinica, dok njihova sporedna uloga u samooprašivanju može dovesti do destabilizacije signalne mreže i neuspješne oplodnje.

Osim kodirajućih RNA (mRNA), nekodirajuće RNA prepoznate su kao važne regulatorne molekule u interakcijama tučka i peludi. U ovom istraživanju jedan od diferencijalno izraženih gena anotiran je kao ncRNA („Slabo okarakteriziran gen“), što otvara mogućnost njegove uloge u kontroli samoinkompatibilnosti kod masline. Međutim, ovo područje još uvijek je nedovoljno istraženo te zahtjeva dodatna istraživanja za preciznije razumijevanje SI mehanizma.

Nova saznanja o genetskoj osnovi dialelnog sustava samonekompatibilnosti (Saumitou-Laprade i sur. 2017b) omogućuju značajan iskorak u određivanju kompatibilnosti među sortama masline kroz primjenu molekularnih biljega. Primjena razvijenog STS (*engl*. Sequence Tagged Site) biljega, u kombinaciji s identificiranim SNP biljezima, omogućuje brzo, precizno i pouzdano genotipiziranje sorti te određivanje njihove pripadnosti jednoj od dviju poznatih grupa nekompatibilnosti -G1 ili -G2 (Saumitou-Laprade i sur. 2017b). Time se znatno pojednostavljuje proces selekcije kompatibilnih genotipova za međusortna križanja, što je posebno važno za planiranje novih nasada i poboljšanje učinkovitosti oprašivanja. Osim što omogućuje rano prepoznavanje kompatibilnih kombinacija u oplemenjivačkim programima, ova metodologija ima i praktičnu primjenu za maslinare, jer omogućuje optimalan raspored sorti u nasadima, čime se povećava uspjeh zametanja plodova i ukupni prinos.

U novijim istraživanjima pokazano je da je lokus samoinkompatibilnosti strukturiran kao hemizigotni segment (~500-700 kb) smješten na 18. kromosomu (Mariotti i sur., 2020a; Castric i sur., 2024; Raimondeau i sur., 2024). Ova nova saznaja otvaraju mogućnost ciljanog proučavanja gena unutar hemizigotne regije različitih sorti masline kako bi se utvrdile razlike u prisutnosti i ekspresiji ključnih gena povezanih s regulacijom giberelina i brasinosteroida. Takva istraživanja mogla bi doprinijeti molekularnoj karakterizaciji SSI genotipova, razjašnjavanju evolucijske i funkcionalne povezanosti hormonske signalizacije s mehanizmima samoinkompatibilnosti te razvoju novih biljega za učinkovito prepoznavanje kompatibilnih kombinacija u nasadima.

Ocjena rada u tijeku!

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Primjena različitih metoda u istraživanju reproduktivne kompatibilnosti masline, uključujući kontrolirana križanja i fluorescentnu mikroskopiju u proučavanju reproduktivnih procesa (prijemčivost njuške tučka, rast peludnih mješinica i uspjeh oplodnje), genotipizaciju pomoću mikrosatelitnih biljega i roditeljski test pomoću te metode istraživanja transkriptoma, dala je komplementarne rezultate koji su omogućili utvrđivanje kompatibilnih i nekompatibilnih kombinacija oprašivanja i razumijevanje mehanizama samoinkompatibilnosti.

2. Tijekom sve tri godine istraživanja (2019.-2021.) razdoblja cvatnje sorti 'Lastovka' i 'Oblica' djelomično su se preklopila s razdobljima cvatnje većine sorti prisutnih u nasadu, čime je ispunjen važan za preduvjet za međusortno oprašivanje i uspješnu oplodnju.

3. Uspjeh klijanja peludi sorte oprašivača na njušci tučka sorte primatelja peludi, rast peludnih mješinica i uspjeh oplodnje nakon oprašivanja ovisili su o genotipu donora peludi, pri čemu su neke kombinacije sorti pokazale veći uspjeh klijanja i veću međusortnu kompatibilnost od drugih.

4. Stranooprašivanje se pokazalo uspješnijim od samooprašivanja, neovisno o genotipu sorte, što potvrđuje prisutnost samoinkompatibilnosti kod sorti 'Lastovka' i 'Oblica'.

5. Analizom stabla odluke potvrđeno je da varijable povezane s akumulacijom sati toplinskih jedinica (GDH) imaju najveću diskriminacijsku snagu u razlikovanju sorti, dok zahtjevi za akumulacijom hladnih sati (CH) imaju znatno manji utjecaj. Time je dodatno naglašena ključna uloga toplinskih zahtjeva u određivanju vremena cvatnje masline.

6. Utvrđen je nelinearan odnos između vrijednosti akumuliranih sati toplinskih jedinica (GDH) i akumuliranih hladnih sati (CH) koji određuje vrijeme početka cvatnje. Kasnija cvatnja može nastupiti i pri niskim i pri visokim vrijednostima GDH, što ukazuje na složen i nelinearan fiziološki odgovor masline na temperaturne promjene.

7. Roditeljskom analizom pomoću mikrosatelitnih biljega nije potvrđena samooplodnja sorte 'Lastovka', što ukazuje na potrebu za kompatibilnim oprašivačima. Najuspješniji oprašivači bile su sorte 'Levantinka', 'Cipressino' i 'Drobnica', pri čemu je 'Levantinka' u obje godine imala vodeću ulogu. Čimbenici za koje je utvrđen utjecaj na uspjeh oplodnje u uvjetima

Ocjena rada u tijeku!

slobodnog oprašivanja su brojnost stabala oprašivača, udaljenost stabla sorte oprašivača od majčinskog stabla sorte primatelja peludi, preklapanje razdoblja cvatnje glavne (majčinske) sorte s ostalim sortama prisutnima u nasadu te meteorološkim čimbenicima, osobito smjeru i jačini vjetra.

8. Sorta 'Levantinka' najuspješniji je oprašivač sorti 'Lastovka' i 'Oblica', što je potvrđeo analizom reproduktivnih procesa, a u slučaju sorte 'Lastovka' i roditeljskim testom. Navedena sorta može se preporučiti kao kompatibilan i učinkovit oprašivač sorti 'Lastovka' i 'Oblica'.

9. Na temelju provedenih transkriptomskih analiza može se zaključiti da 19 diferencijalno eksprimiranih gena između kompatibilnog i nekompatibilnog tretmana predstavlja potencijalne gene kandidate uključene u regulaciju reproduktivnih procesa i mehanizama samoinkompatibilnosti kod masline. Pojačana ekspresija dvaju gena koji kodiraju proteine homologne citokromima P450 u nekompatibilnom tretmanu samooprašivanja povezana je s regulacijom auksinskog puta i mehanizama samoinkompatibilnosti.

Ocjena rada u tijeku!

7. LITERATURA

1. Adamski, N. M., Anastasiou, E., Eriksson, S., O'Neill, C. M., Lenhard, M. (2009) Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **106**, 20115-20120.

2. Alché, J. D. D., M'rani-Alaoui, M., Castro, A. J., Rodríguez-García, M. I. (2004) Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1149-1157.

3. Alché, J. D. D., Jesús Castro, A., Olmedilla, A., Fernández, M. D. C., Rodríguez, R., Villalba, M., Rodríguez-García, M. I. (1999) The major olive pollen allergen (Ole e I) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J. Cell Sci.* **112**, 2501-2509.

4. Alba, R., Fei, Z., Payton, P., Liu, Y., Moore, S. L., Debbie, P., Cohn, J., D'Ascenzo, M., Gordon, J. S., Rose, J. K. C., Martin, G., Tanksley, S. D., Bouzayen, M., Jahn, M. M., Giovannoni, J. (2004) ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: Tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J.* **39**, 697–714.

5. Alagna, F., Caceres, M.E., Pandolfi, S., Collani, S., Mousavi, S., Mariotti, R., Cultrera, N.G.M., Baldoni, L. Barcaccia, G., (2019) The paradox of self-fertile varieties in the context of self-incompatible genotypes in olive. *Front. Plant Sci.* **10**, 1425.

6. Alagna, F., Cirilli, M., Galla, G., Carbone, F., Daddiego, L., Facella, P., Lopez, L., Colao, C., Mariotti, R., Cultrera, N., Rossi, M., Barcaccia, G., Baldoni, L., Muleo, R., Perrotta, G. (2016) Transcript analysis and regulative events during flower development in olive (*Olea europaea* L.). *PLoS ONE* **11**, e0152943.

7. Alcalá, A.R., Barranco, D. (1992) Prediction of Flowering Time in Olive for the Cordoba Olive Collection. *HortScience* **27**, 1205-1207.

8. Anastasiou, E., Kenz, S., Gerstung, M., MacLean, D., Timmer, J., Fleck, C., Lenhard, M. (2007) Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Dev. Cell* **13**, 843–856.

9. Anderson, J. L., Seeley, S. D. (1992) Modelling strategy in pomology: Development of the Utah models. *Acta Hortic.* **313**, 297–306.

Ocjena rada u tijeku!

10. Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Wingett, S. (2010) *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* (Computer software). Babraham Bioinformatics, Babraham Institute.

11. Androulakis, I. I., Loupassaki, M. H. (1989) Studies on the self-fertility of some olive cultivars in the area of Crete. *Acta Hortic.* **286**, 159–162.

12. Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L. (1999) Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* **98**, 411-421.

13. Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M. (2004) UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **32**, D115–D119.

14. Bak, S., Tax, F. E., Feldmann, K. A., Galbraith, D. W., Feyereisen, R. (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant cell* **13**,101-111.

15. Bak, S., Feyereisen, R. (2001) The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant physiol.* **127**, 108-118.

16. Bakarić, P. (2007) *Maslina i maslinovo ulje A–Ž,* Naklada Zadro/Grafički zavod Hrvatske, Zagreb.

17. Baldoni, E., Bagnaresi, P., Locatelli, F., Mattana, M., Genga, A. (2016) Comparative leaf and root transcriptomic analysis of two rice japonica cultivars reveals major differences in the root early response to osmotic stress. *Rice* **9**, 25.

18. Baldoni, L., Cultrera, N. G., Mariotti, R., Ricciolini, C., Arcioni, S., Vendramin, G. G., Buonamici, A., Porceddu, A., Sarri, V., Ojeda, M. A., Trujillo, I., Rallo, L., Belaj, A., Perri, E., Salimonti, A., Muzzalupo, I., Casagrande, A., Lain, O., Messina, R., Testolin, R. (2009) A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Mol. Breed.* **24**, 213–231.

19. Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Pannelli, G., Germanà, M. A., Mulas, M., Porceddu, A. (2006) Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean Basin. *Ann. Bot.* **98**, 935–942.

20. Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B. (2004) Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica* ***136***, 93-102.

Ocjena rada u tijeku!

21. Barlier, I., Kowalczyk, M., Marchant, A., Ljung, K., Bhalerao, R., Bennett, M., Bellini, C. (2000) The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 14819–14824.

22. Barranco, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F., Trujillo, I. (2000) *World catalogue of olive varieties.* International Olive Oil Council, Madrid.

23. Barranco, D., Milona, G., Rallo, L. (1994) Épocas de floración de cultivares de olivo en Córdoba. *Invest. Agrar. Prod. Prot. Veg* **9**, 213-220.

24. Baruca Arbeiter, A., Jakše, J., Bandelj, D. (2014) Paternity analysis of the olive variety "Istrska belica" and identification of pollen donors by microsatellite markers. *Sci. World J.* **2014**,, 208590.

25. Batanero, E., De La Pena, M. G., Villalba, M., Monsalve, R. I., Martin-Esteban, M., Rodríguez, R. (1996) Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 1401-1410.

26. Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D., Šatovic, Z. (2007) Genetic diversity and population structure of wild olives from the north-western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann. Bot.* **100**, 449-458.

27. Belaj, A., Cipriani, G., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I. (2003) Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **50**, 39–49.

28. Ben-Ari, G., Biton, I., Many, Y., Namdar, D., Samach, A. (2021) Elevated temperatures negatively affect olive productive cycle and oil quality. *Agronomy* **11**, 1492.

29. Ben Ayed, R., Ben Hassen, H., Ennouri, K., Ben Marzoug, R., Rebai, A. (2016) OGDD (*Olive Genetic Diversity Database*): A microsatellite markers' genotypes database of worldwide olive trees for cultivar identification and virgin olive oil traceability. *Database* **2016**, bav090.

30. Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B* **57**, 289–300.

31. Besnard, G., Terral, J. F., Cornille, A. (2018) On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Ann. Bot.* **121**, 385-403.

Ocjena rada u tijeku!

32. Besnard, G., Garcia-Verdugo, C., Rubio de Casas, R., Treier, U. A., Galland, N., Vargas, P. (2008) Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea*): evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Ann. Bot.* **101**, 25-30.

33. Besnard, G., Bervillé, A. (2002) On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 1157-1163.

34. Biton, I., Many, Y., Mazen, A., Ben-Ari, G. (2020) Compatibility between "Arbequina" and "Souri" olive cultivars may increase souri fruit set. *Agronomy* **10**, 910.

35. Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M. A., Jaciubek, M., Schroeder, J. I., Grossniklaus, U. (2009) Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge. *Development* **136**, 3279-3288.

36. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314.

37. Breton, C. M., Farinelli, D., Koubouris, G., Famiani, F., Raymond, M., Bervillé, A. (2021) A dual-successive-screen model at pollen/stigma and pollen tube/ovary explaining paradoxical self-incompatibility diagnosis in the olive tree—an interpretative update of the literature. *Plants* **10**, 1938.

38. Breton, C. M., Farinelli, D., Koubouris, G., Bervillé, A. (2016) A model based on S-allele dominance relationships to explain pseudo self-fertility of varieties in the olive tree. *Euphytica* **210**, 105-117.

39. Breton, C. M., Farinelli, D., Shafiq, S., Heslop-Harrison, J. S., Sedgley, M., Bervillé, A. J. (2014) The self-incompatibility mating system of the olive (*Olea europaea* L.) functions with dominance between S-alleles. *Tree Genet. Genomes* ***10***, 1055-1067.

40. Breton, C. M., Bervillé, A. (2012) New hypothesis elucidates self-incompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. *C. R. Biol.* **335**, 563-572.

41. Breton, C., Pinatel, C., Medail, F., Bonhomme, F., Berville, A. (2008) Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant Sci.* **175**, 524-532.

Ocjena rada u tijeku!

42. Bullones, A., Castro, A. J., Lima-Cabello, E., Fernandez-Pozo, N., Bautista, R., Alché, J. D. D., Claros, M. G. (2023a) Transcriptomic Insight into the Pollen Tube Growth of *Olea europaea* L. subsp. *europaea* Reveals Reprogramming and Pollen-Specific Genes Including New Transcription Factors. *Plants* **12**, 2894.

43. Bullones, A., Castro, A. J., Lima-Cabello, E., Alché, J. D. D., Luque, F., Claros, M. G., Fernandez-Pozo, N. (2023b) OliveAtlas: A gene expression atlas tool for olea europaea. *Plants* **12**, 1274.

44. Burgos, L., Berenguer, T., Egea, J. (1993) Self- and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience* **28**, 148-150.

45. Carmona, R., Zafra, A., Seoane, P., Castro, A. J., Guerrero-Fernández, D., Castillo-Castillo, T., Medina-García, A., Cánovas, F. M., Aldana-Montes, J. F., Navas-Delgado, I., Alché, J. D., Claros, M. G. (2015) ReprOlive: A database with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Front. Plant Sci.* **6**, 625.

46. Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. (2002) Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* **104**, 301-307.

47. Caruso, M., Merelo, P., Distefano, G., La Malfa, S., Lo Piero, A. R., Tadeo, F. R., Talon, M., Gentile, A. (2012) Comparative transcriptome analysis of stylar canal cells identifies novel candidate genes implicated in the self-incompatibility response of *Citrus clementina*. *BMC Plant Biol.* **12**, 20.

48. Castric, V., Batista, R. A., Carré, A., Mousavi, S., Mazoyer, C., Godé, C., Gallina, S., Ponitzki, C., Theron, A., Bellec, A., Marande, W., Santoni, S., Mariotti, R., Rubini, A., Legrand, S., Billiard, S., Vekemans, X., Vernet, P., Saumitou-Laprade, P. (2024) The homomorphic self-incompatibility system in Oleaceae is controlled by a hemizygous genomic region expressing a gibberellin pathway gene. *Curr. Biol.* **34**, 1967–1976.e6.

49. Chen, Y., Hu, B., Zhang, F., Luo, X., Xie, J. (2021) Cytological observation and transcriptome comparative analysis of self-pollination and cross-pollination in *Dendrobium officinale*. *Genes* **12**, 432.

50. Chen, C., Farmer, A. D., Langley, R. J., Mudge, J., Crow, J. A., May, G. D., Huntley, J., Smith, A. G., Retzel, E. F. (2010) Meiosis-specific gene discovery in plants: RNA-Seq applied to isolated *Arabidopsis* male meiocytes. *BMC Plant Biol.* **10**, 280.

Ocjena rada u tijeku!

51. Cipriani, G., Marrazzo, M. T., Marconi, R., Cimato, A., Testolin, R. (2002) Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor. Appl. Genet*. **104**, 223-228.

52. Claessen, H., Keulemans, W., Van de Poel, B., De Storme, N. (2019) Finding a compatible partner: Self-incompatibility in European pear (*Pyrus communis*); molecular control, genetic determination, and impact on fertilization and fruit set. *Front. Plant Sci.* **10**, 407.

53. Collani, S., Galla, G., Ramina, A., Barcaccia, G., Alagna, F., Cáceres, E.M., Baldoni, L., Muleo, R., Perrotta, G. (2012) Self-incompatibility in olive: A new hypothesis on the S-locus genes controlling pollen–pistil interaction. *Acta Hortic.* **967**, 133–140.

54. Coolen, S., Proietti, S., Hickman, R., Davila Olivas, N. H., Huang, P.-P., Van Verk, M. C., Van Pelt, J. A., Wittenberg, A. H. J., De Vos, M., Prins, M., Van Loon, J. J. A., Aarts, M. G. M., Dicke, M., Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M. (2016) Transcriptome dynamics of *Arabidopsis* during sequential biotic and abiotic stresses. *Plant J.* **86**, 249–267.

55. Cornet, F., Pillot, J. P., Le Bris, P., Pouvreau, J. B., Arnaud, N., de Saint Germain, A., Rameau, C. (2021) Strigolactones (SLs) modulate the plastochron by regulating KLUH (KLU) transcript abundance in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **232**, 1909-1916.

56. Costa, M., Nobre, M. S., Becker, J. D., Masiero, S., Amorim, M. I., Pereira, L. G., Coimbra, S. (2013) Expression-based and co-localization detection of arabinogalactan protein 6 and arabinogalactan protein 11 interactors in *Arabidopsis* pollen and pollen tubes. *BMC Plant Biol.* **13**, 7.

57. Cruz, F., Julca, I., Gómez-Garrido, J., Loska, D., Marcet-Houben, M., Cano, E., Galán, B., Frías, L., Ribeca, P., Derdak, S., Gut, M., Sánchez-Fernández, M., García, J. L., Gut, I. G., Vargas, P., Alioto, T. S., Gabaldón, T. (2016) Genome sequence of the olive tree, *Olea europaea*. *GigaScience* **5**, 29.

58. Cuevas, J., Chiamolera, F. M., Pinillos, V., Rodríguez, F., Salinas, I., Cabello, D., Baruca Arbeiter, A., Bandelj, D., Raboteg Božiković, M., Vuletin Selak, G. (2024a) Arbosana olive is self-incompatible, but inter-compatible with some other low-vigor olive cultivars. *Horticulturae* **10**, 739.

59. Cuevas, J., Chiamolera, F. M., Pinillos, V., Rodríguez, F., Salinas, I., Cabello, D., Baruca Arbeiter, A., Bandelj, D., Raboteg Božiković, M., Vuletin Selak, G. (2024b) Backcrossing

Ocjena rada u tijeku!

Failure between Sikitita Olive and Its Male Parent Arbequina: Implications for the Self-Incompatibility System and Pollination Designs of Olive Orchards. *Plants* **13**, 2872.

60. Cuevas, J., Pinillos, V., Polito, V. S. (2009) Effective pollination period for 'Manzanillo' and 'Picual' olive trees. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **84**, 370-374.

61. Cuevas, J., Polito, V. S. (2004) The role of staminate flowers in the breeding system of *Olea europaea* (Oleaceae): an andromonoecious, wind-pollinated taxon. *Ann. Bot.* **93**, 547-553.

62. Cuevas, J., Diaz-Hermoso, A. J., Galian, D., Hueso, J. J., Pinillos, V., Prieto, M., Sola, D., Polito, V. S. (2001) Response to cross pollination and choice of pollinisers for the olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Manzanilla de Sevilla', 'Hojiblanca' and 'Picual'. *Olivae* **85**, 26–32.

63. Cuevas, J., Polito, V. S. (1997) Compatibility relationships in 'Manzanillo' olive. *HortScience* **32**, 1056–1058.

64. Cuevas, J., Rallo, L., Rapoport, H.F. (1993) Staining procedure for the observation of olive pollen tube behaviour. *Acta Hortic.* **356**, 264–267.

65. D'Angeli, S., Falasca, G., Matteucci, M., Altamura, M. M. (2012) Cold perception and gene expression differ in *Olea europaea* seed coat and embryo during drupe cold acclimation. *New Phytol.* **197**, 123-138.

66. Dastkar, E., Soleimani, A., Jafary, H., Alché, J. D. D., Bahari, A., Zeinalabedini, M., Salami, S. A. (2020) Differential expression of genes in olive leaves and buds of ON- versus OFF-crop trees. *Sci. Rep.* **10**, 15762.

67. De la Rosa, R., Belaj, A., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., Ortíz-Martín, I., González-Plaza, J. J., Valpuesta, V., Beuzón, C. R. (2013) Development of EST-derived SSR markers with long-core repeat in olive and their use for paternity testing. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **138**, 290–296.

68. De la Rosa, R., James, C. M., Tobutt, K. R. (2004) Using microsatellites for paternity testing in olive progenies. *HortScience* **39**, 351–354.

69. De la Rosa, R., James, C. M., Tobutt, K. R. (2002) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Mol. Ecol. Notes* **2**, 265-267.

Ocjena rada u tijeku!

70. De Melo-Abreu, J. P., Barranco, D., Cordeiro, A. M., Tous, J., Rogado, B. M., Villalobos, F. J. (2004) Modelling olive flowering date using chilling for dormancy release and thermal time. *Agric. For. Meteorol.* **125**, 117-127.

71. De Nettancourt, D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant Reprod.* **10**, 185-199.

72. Deng, Y. (2006) Integrated NR database in protein annotation system and its localization. *Comput. Eng.* **32**, 71–74.

73. Díaz, A., Martín, A., Rallo, P., De la Rosa, R. (2007) Cross-compatibility of the parents as the main factor for successful olive breeding crosses. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **132**, 830–835.

74. Díaz, A., Martín, A., Rallo, P., Barranco, D., De la Rosa, R. (2006) Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olive assessed by SSR markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **131**, 250-255.

75. Díez, C. M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., Gaut, B. S. (2015) Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytol.* **206**, 436-447.

76. Dicenta, F., Ortega, E., Cánovas, J. A., Egea, J. (2002) Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breed.* **121**, 163-167.

77. Dupin, J., Hong-Wa, C., Gaudeul, M., Besnard, G. (2024) Phylogenetics and biogeography of the olive family (Oleaceae). *Ann. Bot.* **134**, 577-592.

78. Dupin, J., Raimondeau, P., Hong-Wa, C., Manzi, S., Gaudeul, M., Besnard, G. (2020) Resolving the phylogeny of the olive family (Oleaceae): confronting information from organellar and nuclear genomes. *Genes* **11**, 1508.

79. El Yaacoubi, A.; Malagi, G.; Oukabli, A.; Hafidi, M.; Legave, J.M. (2014) Global warming impact on floral phenology of fruit trees species in Mediterranean region. *Sci. Hortic.* **180**, 243–253.

80. Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., Kailis, S. (2004) *Olive propagation manual*. Landlinks Press, Collingwood.

81. Fabbri, A., Benelli, C. (2000) Flower bud induction and differentiation in olive. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **75**, 131-141.

Ocjena rada u tijeku!

82. FAOSTAT (2023) *Statistička baza podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO)*. Dostupno na: https://www.fao.org/faostat/ (Pristupljeno 07. svibnja 2025).

83. Farinelli, D., Breton, C. M., Famiani, F., Bervillé, A. (2015) Specific features in the olive self-incompatibility system: A method to decipher S-allele pairs based on fruit settings. *Sci. Hortic. 181*, 62-75.

84. Fernández-González, M., González-Fernández, E., Fernández-González, D., Rodríguez-Rajo, F.J. (2020) Secondary outcomes of the Ole e 1 proteins involved in pollen tube development: Impact on allergies. *Front. Plant Sci.* **11**, 974.

85. Fernández-Ocaña, A., García-López, M. C., Jiménez-Ruiz, J., Saniger, L., Macías, D., Navarro, F., Oya, R., Belaj, A., De la Rosa, R., Corpas, F. J., Barroso, J. B., Luque, F. (2010) Identification of a gene involved in the juvenile-to-adult transition (JAT) in cultivated olive trees. *Tree Genet. Genomes* **6**, 891–903.

86. Fraga, H., Moriondo, M., Leolini, L., Santos, J. A. (2020) Mediterranean olive orchards under climate change: A review of future impacts and adaptation strategies. *Agronomy* **11**, 56.

87. Franklin-Tong, N.V., Franklin, F.C.H. (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends Plant Sci.* **8**, 598–605.

88. Galán, C., García-Mozo, H., Vázquez, L., Ruiz, L., De la Guardia, C. D., Trigo, M. M. (2005) Heat requirement for the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in several sites in Andalusia and the effect of the expected future climate change. *Int. J. Biometeorol.* **49**, 184–188.

89. Green, P.S. (2002) A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull.* **57**, 91–140.

90. Griggs, W. H., Hartmann, H. T., Bradley, M. V., Iwakiri, B. T., Whisler, J. E. (1975) *Olive pollination in California*, Bulletin No. 869, University of California Agricultural Experiment Station, Berkeley.

91. Gros-Balthazard, M., Besnard, G., Sarah, G., Holtz, Y., Leclercq, J., Santoni, S., Wegmann, D., Glémin, S., Khadari, B. (2019) Evolutionary transcriptomics reveals the origins of olives and the genomic changes associated with their domestication. *Plant J.* **100**, 143–157.

Ocjena rada u tijeku!

92. Guerin, J., Sedgley, M. (2007) *Cross-pollination in olive cultivars*, Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT.

93. Hanson, D.D., Hamilton, D.A., Travis, J.L., Bashe, D.M., Mascarenhas, J.P., (1989) Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell* **1**, 173-179.

94. He, Y., Song, Q., Chen, S., Wu, Y., Zheng, G., Feng, J., Yang, Z., Lin, W., Li, Y., Chen, H. (2019) Transcriptome analysis of self- and cross-pollinated pistils revealing candidate unigenes of self-incompatibility in *Camellia oleifera*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*. **95**, 19–31.

95. Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. (2005) Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. *J. Evol. Biol.* **18**, 1494-1502.

96. Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. (2003) The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Environ*. **26**, 1673-1680.

97. Herrero, M. (1992) Mechanisms in the pistil that regulate gametophyte population in peach (*Prunus persica*). U: *Angiosperm pollen and ovules: New perspectives* (Ottaviano, E., Mulcahy, D. L., Sari Gorla, M., Mulcahy, G. B., ured.), Springer, New York, str. 377–381.

98. Herrero, M., Arbeloa, A. (1989) Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *Am. J. Bot.* **76**, 1441-1447.

99. Higashiyama, T. (2010) Peptide signaling in pollen–pistil interactions. *Plant Cell Physiol.* **51**, 177-189.

100. Hiscock, S. J., McInnis, S. M. (2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: Brassica and beyond. *Trends in plant science* **8**, 606-613.

101. HAPIH (2021) Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. *Sortna lista Republike Hrvatske*. Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo, Osijek.

102. Iaria, D., Chiappetta, A., Muzzalupo, I. (2016) De novo transcriptome sequencing of *Olea europaea* L. to identify genes involved in the development of the pollen tube. *Sci. World J.* **2016**, 4305252.

Ocjena rada u tijeku!

103. Illumina (2020) How short inserts affect sequencing performance. <https://support.illumina.com/ko-kr/bulletins/2020/12/how-short-inserts-affect-sequencing-performance.html>. Pristupljeno 12. svibnja 2025.

104. International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945.

105. Jamieson, A., CS Taylor, S. (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* **28**, 397-400.

106. Japelaghi, R. H., Haddad, R., Garoosi, G. A. (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol. Biotechnol.* **49**, 129-137.

107. Jiang, L., Yoshida, T., Stiegert, S., Jing, Y., Alseekh, S., Lenhard, M., Pérez-Alfocea, F., Fernie, A. R. (2021) Multi-omics approach reveals the contribution of KLU to leaf longevity and drought tolerance. *Plant Physiol.* **185**, 352–368.

108. Jiménez-Ruiz, J., Ramírez-Tejero, J. A., Fernández-Pozo, N., Leyva-Pérez, M. de la O., Yan, H., de la Rosa, R., Belaj, A., Montes, E., Rodríguez-Ariza, M. O., Navarro, F., Barroso, J. B., Beuzón, C. R., Valpuesta, V., Bombarely, A., Luque, F. (2020) Transposon activation is a major driver in the genome evolution of cultivated olive trees (*Olea europaea* L.). *The Plant Genome* **13**, e20010.

109. Jiménez-Ruiz, J., de la O Leyva-Pérez, M., Vidoy-Mercado, I., Barceló, A., Luque, F. (2018) Transcriptomic time-series analysis of early development in olive from germinated embryos to juvenile tree. *BMC genomics* **19**, 1-14.

110. Julca, I., Vargas, P., Gabaldón, T. (2023) Phylogenomics of the *Olea europaea* complex using 15 whole genomes supports recurrent genetic admixture together with differentiation into seven subspecies. *BMC Biol.* **21**, 85.

111. Julca, I., Marcet-Houben, M., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Gaut, B. S., Díez, C. M., Gut, I. G., Alioto, T. S., Vargas, P., Gabaldón, T. (2020) Genomic evidence for recurrent genetic admixture during the domestication of Mediterranean olive trees (*Olea europaea* L.). *BMC Biol.* **18**, 148.

112. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* **177**, 309-334.

Ocjena rada u tijeku!

113. Kanehisa, M., Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27-30.

114. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. (2013) TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.

115. Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**, 1099-1106.

116. Klepikova, A. V., Logacheva, M. D., Dmitriev, S. E., Penin, A. A. (2015) RNA-seq analysis of an apical meristem time series reveals a critical point in *Arabidopsis thaliana* flower initiation. *BMC genomics* **16**, 466.

117. Klepo, T., Benčić, Đ., Liber, Z., Belaj, A., Strikić, F., Kević, N., Šatović, Z. (2024) Revealing the diversity and complex relationships of Croatian olive germplasm. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 3170.

118. Kovačević, I., Perica, S. (1994) *Suvremeno maslinarstvo*, Avium, Split.

119. Kordrostami, M., Rahimi, M. (2015) Molecular markers in plants: concepts and applications. *Genet. Third Millenn.* **13**, 4024-4031.

120. Kumar, A., McClure, B. (2010) Pollen–pistil interactions and the endomembrane system. *J. Exp. Bot.* **61**, 2001-2013.

121. Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359.

122. Lanza, V., Marsilio, N., Martinelli, G. (1996) Olive pollen ultrastructure: characterization of exine pattern through image analysis–scanning electron microscopy (IA-SEM). *Sci. Hortic.* **65**, 283–294.

123. Lavee, S., Taryan, J., Levin, J., Haskal, A. (2002) The significance of cross-pollination for various olive cultivars under irrigated intensive growing conditions. Olivae **91**, 25–36.

124. Lavee, S. (1996) Biology and physiology of the olive. U: *World Olive Encyclopedia* (IOOC, ured.), International Olive Oil Council, Madrid, str. 59–110.

Ocjena rada u tijeku!

125. Leyva-Pérez, M. de la O., Valverde-Corredor, A., Valderrama, R., Jiménez-Ruiz, J., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., Barroso, J. B., Mercado-Blanco, J., Luque, F. (2015) Early and delayed long-term transcriptional changes and short-term transient responses during cold acclimation in olive leaves. *DNA Res.*, **22**, 1–11.

126. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079.

127. Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W. (2014) featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930.

128. Litt, M., Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiacmuscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 397-401

129. Lopes, A. L., Moreira, D., Ferreira, M. J., Pereira, A. M., Coimbra, S. (2019). Insights into secrets along the pollen tube pathway in need to be discovered. *J. Exp. Bot.* **70**, 2979-2992.

130. Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.

131. Lu, X., Zhou, X., Cao, Y., Zhou, M., McNeil, D., Liang, S., Yang, C. (2017) RNA-seq Analysis of Cold and Drought Responsive Transcriptomes of *Zea mays* ssp. *mexicana* L. *Front. Plant Sci.* **8**, 136.

132. Ma, J., Wei, H., Song, M., Pang, C., Liu, J., Wang, L., Zhang, J., Fan, S., Yu, S. (2012) Transcriptome profiling analysis reveals that flavonoid and ascorbate–glutathione cycle are important during anther development in upland cotton. *PLoS ONE* **7**, e49244.

133. Maeda, S., Dubouzet, J.G., Kondou, Y., Jikumaru, Y., Seo, S., Oda, K., Matsui, M., Hirochika, H., Mori, M. (2019) The rice *CYP78A* gene *BSR2* confers resistance to *Rhizoctonia solani* and affects seed size and growth in *Arabidopsis* and rice. *Sci. Rep.* **9**, 587.

134. Malik, A. U., Hussain, S., Ullah, S., Khan, M. I. (2017) Genetic variability and heritability estimates of yield and related traits in olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Aust. J. Crop Sci.*, **11**, 450–456.

Ocjena rada u tijeku!

135. Marchese, A., Balan, B., Trippa, D. A., Bonanno, F., Caruso, T., Imperiale, V., Marra, F. P., Giovino, A. (2023) NGS transcriptomic analysis uncovers the possible resistance mechanisms of olive to *Spilocaea oleagina* leaf spot infection. *Front. Plant Sci.* **14**, 1219580.

136. Mariotti, R., Fornasiero, A., Mousavi, S., Cultrera, N.G.M., Brizioli, F., Pandolfi, S., Passeri, V., Rossi, M., Magris, G., Scalabrin, S., Scaglione, D., Di Gaspero, G., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P., Alagna, F., Morgante, M., Baldoni, L. (2020a) Genetic mapping of the incompatibility locus in olive and development of a linked sequence-tagged site marker. *Front. Plant Sci.* **10**, 1760.

137. Mariotti, R., Pandolfi, S., De Cauwer, I., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P., Rossi, M., Baglivo, F., Baldoni, L., Mousavi, S. (2020b) Diallelic self-incompatibility is the main determinant of fertilization patterns in olive orchards. *Evol. Appl.* **14**, 140–152.

138. Martin, G.C., Sibbett, G.S. (2005) Botany of the olive. U: Olive Production Manual (Sibbett, G.S., Ferguson, L., Coviello, J.L., Lindstrand, M., ured.), University of California, Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA, str. 15–19.

139. Martin, G. C. (1990) Olive flower and fruit population dynamics. *Acta Hortic.* **286**, 141–153.

140. Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 560–564.

141. Miljković, I. (1991) *Suvremeno voćarstvo*, Nakladni zavod Znanje, Zagreb.

142. Miklavčič Višnjevec, A., Ota, A., Skrt, M., Butinar, B., Smole Možina, S., Gunde Cimerman, N., Nečemer, M., Baruca Arbeiter, A., Hladnik, M., Krapac, M., Ban, D., Bučar-Miklavčič, M., Poklar Ulrih, N., Bandelj, D. (2017) Genetic, biochemical, nutritional and antimicrobial characteristics of pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in Istria. F*ood Technol. Biotechnol.* **55**, 171–180.

143. Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Hasebe, M. (2009). *ANXUR1* and 2, sister genes to *FERONIA/SIRENE*, are male factors for coordinated fertilization. *Curr. Biol.* **19**, 1327-1331.

Ocjena rada u tijeku!

144. Montemurro, C., Miazzi, M. M., Pasqualone, A., Fanelli, V., Sabetta, W., Di Rienzo, V. (2015) Traceability of PDO olive oil "Terra di Bari" using high resolution melting. *J. Chem.* **2015**, 1–7.

145. Mookerjee, S., Guerin, J., Collins, G., Ford, C., Sedgley, M. (2005) Paternity analysis using microsatellite markers to identify pollen donors in an olive grove. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 1174-1182.

146. Morgante, M., Rafalski, A., Biddle, P., Tingey, S., Olivieri, A. M. (1994) Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* **37**, 763-769.

147. Moutier, N. (2000) Self-fertility and inter-compatibilities of sixteen olive varieties. *Acta Hortic.* **586**, 209–212.

148. Muschietti, J., Eyal, Y., McCormick, S. (1998) Pollen Tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2. *Plant Cell* **10**, 319–330.

149. Muzzalupo I., Lombardo N., Musacchio A., Noce M.E., Pellegrino G., Perri E., Sajjad A. (2006) DNA sequence analysis of microsatellite markers enhances their efficiency for germplasm management in an Italian olive collection. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **131**, 352–359.

150. Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N. (2017) DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **32**, 261–285.

151. Nasrallah, J. B. (2019) Self-incompatibility in the Brassicaceae: regulation and mechanism of self-recognition. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **131**, 435-452.

152. Naur, P., Petersen, B. L., Mikkelsen, M. D., Bak, S., Rasmussen, H., Olsen, C. E., Halkier, B. A. (2003) CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 63-72.

153. Nei, M. (1987) Genetic distance and molecular phylogeny. U: *Population genetics and fishery management* (Ryman, N., Utter, F., ured.), University of Washington Press, Seattle, WA, str. 193–223.

Ocjena rada u tijeku!

154. Orlandi, F., Garcia-Mozo, H., Ezquerra, L. V., Romano, B., Dominguez, E., Galán, C., Fornaciari, M. (2004) Phenological olive chilling requirements in Umbria (Italy) and Andalusia (Spain). *Plant Biosyst.* **138**, 111-116.

155. Oteros, J., García-Mozo, H., Vázquez, L., Mestre, A., Domínguez-Vilches, E., Galán, C. (2013) Modelling olive phenological response to weather and topography. *Agric. Ecosyst. Environ.* **179**, 62-68.

156. Owen, C. A., Bita, E.-C., Banilas, G., Hajjar, S. E., Sellianakis, V., Aksoy, U., Hepaksoy, S., Chamoun, R., Talhook, S. N., Metzidakis, I., Hatzopoulos, P., Kalaitzis, P. (2005) AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.* **110**, 1169–1176.

157. Ozimec, R., Karoglan Kontić, J., Maletić, E., Matotan, Z., Strikić, F. (2015) *Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije*. Program Ujedinjenih naroda za razvoj (UNDP), Zagreb.

158. Pasqualone, A., Montemurro, C., Summo, C., Sabetta, W., Caponio, F., Blanco, A. (2007) Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of protected designation of origin extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3857-3862.

159. Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* **4**, 347-354.

160. Peakall, R. O. D., Smouse, P. E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 288-295.

161. Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., Duchesnay, É. (2011) Scikit-learn: Machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **12**, 2825–2830.

162. Pereira, A. M., Lopes, A. L., Coimbra, S. (2016) Arabinogalactan proteins as interactors along the crosstalk between the pollen tube and the female tissues. *Front. Plant Sci.* **7**, 1895.

163. Powell, W., Machray, G. C., Provan, J. (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* **1**, 215-222.

164. Raimondeau, P., Ksouda, S., Marande, W., Fuchs, A.-L., Gryta, H., Theron, A., Puyoou, A., Dupin, J., Cheptou, P.-O., Vautrin, S., Valière, S., Manzi, S., Baali-Cherif, D., Chave,

Ocjena rada u tijeku!

J., Christin, P.-A., Besnard, G. (2024) A hemizygous supergene controls homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems in Oleaceae. *Curr. Biol.* **34**, 1977–1986.e8.

165. Rallo, L., Martin, G. C. (1991) The role of chilling in releasing olive floral buds from dormancy. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. **116**, 1058-1062.

166. Ramírez-Tejero, J. A., Jiménez-Ruiz, J., Leyva-Perez, M. D. L. O., Barroso, J. B., Luque, F. (2020) Gene expression pattern in olive tree organs (*Olea europaea* L.). *Genes* **11**, 544.

167. Rao, G., Zhang, J., Liu, X., Lin, C., Xin, H., Xue, L., Wang, C. (2021) De novo assembly of a new *Olea europaea* genome accession using nanopore sequencing. *Hortic. Res.* **8**, 64.

168. Reiner, A., Yekutieli, D., Benjamini, Y. (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**, 368-375.

169. Richardson, E. A., Seeley, S. D., Walker, D. R., Anderson, J. L., Ashcroft, G. L. (1975) Pheno-climatography of spring peach bud development. *HortScience* **10**, 236–237.

170. Riella, V., Borges, A., Arias-Sibillotte, M., Speroni, G., Speranza, P. (2022) The effective pollination period of the olive cultivar 'Arbequina'(*Olea europaea* L.) in a non-traditional production region. *S. Afr. J. Bot.* **151**, 246-254.

171. Robichaux, K. J., Wallace, I. S. (2021) Signaling at physical barriers during pollen–pistil interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12230.

172. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., Mesirov, J. P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26.

173. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140.

174. Rojas-Gómez, M. D. L. M., Moral, J., López-Orozco, R., Cabello, D., Oteros, J., Barranco, D., Galán, C., Díez, C. M. (2023) Pollen production in olive cultivars and its interannual variability. *Ann. Bot.*, **132**, 1145-1158.

175. Rojo, J., Orlandi, F., Ben Dhiab, A., Lara, B., Picornell, A., Oteros, J., Msallem, M., Fornaciari, M., Pérez-Badia, R. (2020) Estimation of Chilling and Heat Accumulation Periods Based on the Timing of Olive Pollination. *Forests*, **11**, 835.

Ocjena rada u tijeku!

176. Rosati, A., Caporali, S., Paoletti, A., Famiani, F. (2011) Pistil abortion is related to ovary mass in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic*. **127**, 515–519.

177. Rubio de Casas, R., Besnard, G., Schönswetter, P., Balaguer, L., Vargas, P. (2006) Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. *Theor. Appl. Genet*., **113**, 575-583.

178. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463–5467.

179. Saumitou-Laprade, P., Vernet, P., Vekemans, X., Castric, V., Barcaccia, G., Khadari, B., Baldoni, L. (2017a) Controlling for genetic identity of varieties, pollen contamination and stigma receptivity is essential to characterize the self-incompatibility system of *Olea europaea* L. *Evol. Appl.* **10**, 860-866.

180. Saumitou-Laprade, P., Bakkali, A., Barcaccia, G., Alagna, F., Mariotti, R., Cultrera, N. G. M., Pandolfi, S., Rossi, M., Khadari, B., Baldoni, L. (2017b) Elucidation of the genetic architecture of self-incompatibility in olive: Evolutionary consequences and perspectives for orchard management. *Evol. Appl.* **10**, 867–880.

181. Saumitou-Laprade, P., Vernet, P., Vassiliadis, C., Hoareau, Y., de Magny, G., Dommée, B., Lepart, J. (2010) A self-incompatibility system explains high male frequencies in an androdioecious plant. *Science* **327**, 1648-1650.

182. Sánchez-Estrada, A., Cuevas, J. (2019) Pollination strategies to improve fruit set in orchards of 'Manzanillo' olive in a nontraditional producing country, Mexico. *HortTechnology* **29**, 258-264.

183. Sánchez-Estrada, A., Cuevas, J. (2018) 'Arbequina'olive is self-incompatible. *Sci. Hortic*. **230**, 50-55.

184. Sanzol, J., Rallo, P., Herrero, M., (2003) Stigmatic receptivity limits the effective pollination period in "Agua de Aranjuez" pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **128**, 458–462.

185. Sanzol, J., Herrero, M. (2001) The "effective pollination period" in fruit trees. *Sci. Hortic*. **90**, 1-17.

186. Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., Malonia, S. K. (2023) Next-generation sequencing technology: Current trends and advancements. *Biology* **12**, 997.

Ocjena rada u tijeku!

187. Schuelke, M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* **18**, 233-234.

188. Sebastiani, L., Sarfraz, I., Francini, A., Celii, M., Wing, R. A., Zuccolo, A. (2024) PacBio genome assembly of *Olea europaea* L. subsp. *europaea* cultivars 'Frantoio' and 'Leccino' reveal main structural differences in key genes related to salt stress. *Scientific Data* **12**, 1095.

189. Sefc, K. M., Lopes, M. S., Mendonça, D., Santos, M. R. D., Machado, M. L. D. C., Machado, A. D. C. (2000) Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* **9**, 1171-1173.

190. Seifi, E., Guerin, J., Kaiser, B., Sedgley, M. (2015) Flowering and fruit set in olive: A review. *Iran. J. Plant Physiol*. 5, 1263–1272.

191. Seifi, E., Guerin, J., Kaiser, B., Sedgley, M. (2012) Sexual compatibility of the olive cultivar 'Kalamata' assessed by paternity analysis. *Span. J. Agric. Res.* **10**, 731-740.

192. Seifi, E., Guerin, J., Kaiser, B., Sedgley, M. (2008) Inflorescence architecture of olive. Sci. Hortic. **116**, 273–279.

193. Serrano, I., Suárez, C., Olmedilla, A., Rapoport, H. F., Rodríguez-García, M. I. (2008) Structural organization and cytochemical features of the pistil in olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual at anthesis. *Sex. Plant Reprod.* **21**, 99-111.

194. Serrano, A., García-Martín, J., Moret, M., Martínez-Rivas, J. M., Luque, F. (2024) Transcriptomic Analysis During Olive Fruit Development and Expression Profiling of Fatty Acid Desaturase Genes. *Int. J. Mol. Sci. 25*, 11150.

195. Serrano, I., Olmedilla, A. (2012) Histochemical location of key enzyme activities involved in receptivity and self-incompatibility in the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Sci.* **197**, 40-49.

196. Serrano, I.; Pelliccione, S.; Olmedilla, A. (2010) Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination. *Plant Cell Rep.* **29**, 561–572.

197. Shaheen, M. A., Essa, M. A., Sayed, R. A., Abd El-Aziz, Y. S. G. (2011) Sexual compatibility of LeConte pear cultivar. *J. Hortic. Sci. Ornamental Plants* **3**, 99–105.

Ocjena rada u tijeku!

198. Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* **27**, 379–423, 623–656.

199. Shemer, A., Biton, I., Many, Y., Vaknin, Y., Lavee, S., Avidan, B., Ben-Ari, G. (2014) The olive cultivar 'Picual' is an optimal pollen donor for 'Barnea'. *Sci. Hortic.* **175**, 155–160.

200. Silverstein, K. A., Moskal Jr, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., VandenBosch, K. A. (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.* **51**, 262-280.

201. Solfanelli, C., Bartolini, S., Vitagliano, C. and Lorenzi, R. (2006) Immunolocalization and quantification of IAA after self-and free-pollination in *Olea europaea* L. *Sci. Hortic*. **110**, 345-351.

202. Strikić, F., Gugić, J., Klepo, T. (2012) Stanje hrvatskog maslinarstva. *Glasilo biljne zaštite* **12**, 271–276.

203. Suárez, C., Zienkiewicz, A., Castro, A. J., Zienkiewicz, K., Majewska-Sawka, A., Rodríguez-García, M. I. (2013) Cellular localization and levels of pectins and arabinogalactan proteins in olive (*Olea europaea* L.) pistil tissues during development: implications for pollen–pistil interaction. *Planta* **237**, 305-319.

204. Škarica, B., Žužič, I., Bonifačić, M. (1996) *Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj*, Hrvatski izdavač, Zagreb.

205. Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. *Nature* **403**, 913-916.

206. Takeuchi, H., Higashiyama, T. (2016) Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*. *Nature* **531**, 245-248.

207. Tang, W., Ezcurra, I., Muschietti, J., McCormick, S. (2002) A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. *Plant Cell* **14**, 2277-2287.

208. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., Koonin, E. V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28,** 33-36.

Ocjena rada u tijeku!

209. Therios, I.N. (2009) *Olives (Crop Production Science in Horticulture, No. 18)*, CAB International, Wallingford, UK.

210. Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventós, R.M. (2017) Olives and olive oil: A Mediterranean source of polyphenols. U: *Olives and olive oil as functional foods: Bioactivity, chemistry and processing* (Shahidi, F., Kiritsakis, A., ured.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, str. 417–428.

211. Turktas, M., Inal, B., Okay, S., Erkilic, E. G., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G., Unver, T. (2013) Nutrition metabolism plays an important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.). *PLoS ONE* **8**, e59876.

212. Trujillo, I., Ojeda, M. A., Urdiroz, N. M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez, C. M. (2014) Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genet. Genomes* **10**, 141-155.

213. Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J., McCormick, S. (1989) Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 240-245.

214. Unver, T., Wu, Z., Sterck, L., Van de Peer, Y. (2017) Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E9413–E9422.

215. Valdivia, E. R., Stephenson, A. G., Durachko, D. M., Cosgrove, D. (2009) Class B β-expansins are needed for pollen separation and stigma penetration. *Sex. Plant Reprod*. **22**, 141-152.

216. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., i sur. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **292**, 1304–1351.

217. Vernet, P., Lepercq, P., Billiard, S., Bourceaux, A., Lepart, J., Dommée, B., Saumitou-Laprade, P. (2016) Evidence for the long-term maintenance of a rare self-incompatibility system in Oleaceae. *New Phytol.* **210**, 1408-1417.

218. Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., Munhoz, C. D. F. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* **39**, 312-328.

Ocjena rada u tijeku!

219. Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L. M., Monsalve, R. I., González de la Peña, M. A., Lahoz, C., Rodríguez, R. (1993) Amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.* **213,** 863-869.

220. Voelkerding, K. V., Dames, S. A., Durtschi, J. D. (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* **55**, 641-658.

221. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407–4414.

222. Vuletin Selak, G., Baruca Arbeiter, A., Cuevas, J., Perica, S., Pujić, P., Raboteg Božiković, M., Bandelj, D. (2021) Seed paternity analysis using SSR markers to assess successful pollen donors in mixed olive orchards. *Plants* **10**, 2356.

223. Vuletin Selak, G., Goreta Ban, S., Perica, S. (2018) Onset of flowering in olive cultivars in relation to temperature. *Acta Hortic.* **1229**, 127–134.

224. Vuletin Selak, G., Cuevas, J., Pinillos, V., Goreta Ban, S., Poljak, M., Perica, S. (2014a) Assessment of effective pollination period in olive (*Olea europaea*) by means of fluorescence microscopy and plant response to sequential pollinations: limitations and drawbacks of current methodologies. *Trees* **28**, 1497-1505.

225. Vuletin Selak, G., Cuevas, J., Ban, S. G., Perica, S. (2014b) Pollen tube performance in assessment of compatibility in olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* **165**, 36-43.

226. Vuletin Selak, G., Perica, S., Goreta Ban, S., Bucan, L., Poljak, M. (2012) Flower sterility and the germination ability of pollen as genetic traits of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars grown in Croatia. J. *Hortic. Sci. Biotechnol*. **87**, 237-242.

227. Vuletin Selak, G. , Perica, S., Ban, S. G., Radunic, M., Poljak, M. (2011) Reproductive success after self-pollination and cross-pollination of olive cultivars in Croatia. *HortScience* **46**, 186-191.

228. Wang, L., Triviño, M., Lin, Z., Carli, J., Eaves, D. J., Van Damme, D., Nowack, M. K., Franklin-Tong, V. E., Bosch, M. (2020) New opportunities and insights into *Papaver* self-incompatibility by imaging engineered *Arabidopsis* pollen. *J. Exp. Bot.* **71**, 2451–2463.

Ocjena rada u tijeku!

229. Wang, H.J., Huang, J.C., Jauh, G.Y. (2010) Pollen germination and tube growth. U: *Advances in botanical research* (Cheung, A.Y., Gilroy, S.L., ured.), Academic Press, London, Vol. 54, str. 1–52.

230. Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57-63.

231. Weinberger, J. H. (1950) Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **56**, 122–128.

232. Westbury, M. V. (2018) *Unraveling evolution through next generation sequencing*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Copenhagenu, Danska. <https://www.researchgate.net/publication/325184342_Unraveling_evolution_through_Next_Generation_Sequencing>. Pristupljeno 25. svibnja 2025.

233. Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y.-J., Makhijani, V., Roth, G. T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C. L., Irzyk, G. P., Lupski, J. R., Chinault, C., Song, X., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D. M., Margulies, M., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Rothberg, J. M. (2008) The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* **452**, 872–876.

234. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.

235. Wingett, S. W., Andrews, S. (2018) FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* **7**, 1338.

236. Wu, S. B., Collins, G., Sedgley, M. (2002) Sexual compatibility within and between olive cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **77**, 665-673.

237. Xu, X. H., Chen, H., Sang, Y. L., Wang, F., Ma, J. P., Gao, X. Q., Zhang, X. S. (2012) Identification of genes specifically or preferentially expressed in maize silk reveals similarity and diversity in transcript abundance of different dry stigmas. *BMC genomics* **13**, 294.

Ocjena rada u tijeku!

238. Yadav, S., Carvalho, J., Trujillo, I., Prado, M. (2021) Microsatellite markers in olives (*Olea europaea* L.): Utility in the cataloging of germplasm, food authenticity and traceability studies. *Foods* **10**, 1907.

239. Yang, Y.-X., Wang, M.-M., Yin, Y.-L., Onac, E., Zhou, G.-F., Peng, S., Xia, X.-J., Shi, K., Yu, J.-Q., Zhou, Y.-H. (2015). RNA-seq analysis reveals the role of red light in resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in tomato plants. *BMC Genomics* **16**, 120.

240. Zafra, A., M'rani-Alaoui, M., Lima, E., Jimenez-Lopez, J. C., Alché, J. D. D. (2018) Histological features of the olive seed and presence of 7S-type seed storage proteins as hallmarks of the olive fruit development. *Front. Plant Sci.* **9**, 1481.

241. Zafra, A., Carmona, R., Traverso, J. A., Hancock, J. T., Goldman, M. H. S., Claros, M. G., Hiscock, S. J., Alché, J. D. (2017) Identification and functional annotation of genes differentially expressed in the reproductive tissues of the olive tree (*Olea europaea* L.) through the generation of subtractive libraries. *Front. Plant Sci*. **8**, 1576.

242. Zhang, W., Wei, X., Meng, H. L., Ma, C. H., Jiang, N. H., Zhang, G. H., Yang, S. C. (2015) Transcriptomic comparison of the self-pollinated and cross-pollinated flowers of *Erigeron breviscapus* to analyze candidate self-incompatibility-associated genes. *BMC Plant Biol.* **15**, 248.

243. Zhao, P., Zhang, L., Zhao, L. (2015) Dissection of the style's response to pollination using transcriptome profiling in self-compatible (*Solanum pimpinellifolium*) and self-incompatible (*Solanum chilense*) tomato species. *BMC Plant Biol.* **15**, 119.

244. Zhou, L. Z., Dresselhaus, T. (2019) Friend or foe: signaling mechanisms during double fertilization in flowering seed plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* **131**, 453-496.

245. Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Rejón, J. D., de Dios Alché, J., Castro, A. J., Rodríguez-García, M. I. (2014) Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *J. Exp. Bot.* **65**, 103-115.

246. Zou, J.T., Zhan, X.Y., Wu, H.M., Wang, G., Cheung, A.Y., (1994) Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression. *Am. J. Bot.* **81**, 552-561.

Ocjena rada u tijeku!

8. SAŽETAK

Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura mediteranskog dijela Hrvatske, čiji uzgoj ima dugu tradiciju i snažan utjecaj na kulturu i gospodarstvo. Jedan od ključnih izazova predstavlja samoinkompatibilnost većine sorti te reproduktivna inkompatibilnost među sortama, koje mogu ograničiti uspjeh oplodnje i posljedično utjecati na konačan prinos. Stoga je pri uključivanju novih sorti u uzgoj, radi osiguranja redovitih prinosa, potrebno provesti analize međusortne kompatibilnosti te provjeru samoinkompatibilnosti pojedinih sorti, uz istodobno praćenje vremena cvatnje.

U okviru ove doktorske disertacije primijenjene su različite metode istraživanja reproduktivne kompatibilnosti masline s naglaskom na autohtone sorte 'Lastovka' i 'Oblica'. Fenološka promatranja cvatnje svih sorti uključenih u istraživanje provedena su tijekom tri godine istraživanja, a vrijednosti akumuliranih hladnih sati (CH), toplinskih jedinca (GDH) te broja dana u godini od 1. siječnja do početka razdoblja cvatnje (DPC) analizirane su primjenom modela stabla odluke i klasterske analize kako bismo parametre klime povezali s fenologijom cvjetanja. Parametri povezani s akumulacijom hladnih sati nisu imali presudan utjecaj na razdvajanje sorti na rane, kasne i plastične, odnosno one prilagodljive na promjene analiziranih parametara, dok je klasterska analiza ukazala na nelinearnu povezanost između klimatskih i fenoloških varijabli.

S ciljem procjene međusortne kompatibilnosti i potvrde samoinkompatibilnosti, provedena su kontrolirana oprašivanja cvjetova sorti 'Lastovka' i 'Oblica' s peludi odabranih donora peludi. Tijekom eksperimenta su praćeni ključni reproduktivni procesi: klijavost peludi sorti oprašivača na njušci tučka, rast peludnih mješinica u vratu tučka te uspjeh oplodnje. Svi su navedeni procesi analizirani primjenom fluorescentne mikroskopije u različitim vremenskim intervalima nakon oprašivanja (24 h-96 h). Stranooprašivanje je u većini slučajeva rezultiralo većom klijavošću peludi, bržim prorastanjem peludnih mješinica te većim uspjehom oplodnje u odnosu na stranooprašivanje.

U svrhu identifikacije uspješnih donora peludi sorte 'Lastovka' i potvrde inkompatibilnosti među sortama u uvjetima slobodnog oprašivanja, provedena je genotipizacija svih potencijalnih donora peludi iz višesortnog nasada i embrija iz plodova sorte 'Lastovka' korištenjem sedam mikrosatelitnih biljega. Analiza roditeljstva provedena pomoću programa CERVUS 3.0 omogućila je preciznu identifikaciju sorti koje su sudjelovale u oprašivanju i oplodnji sorte 'Lastovka'. Sorta 'Levantinka' istaknula se kao najuspješniji oprašivač sorte

Ocjena rada u tijeku!

‘Lastovka’ nakon analize reproduktivnih procesa, kao i korištenjem roditeljskog testa, dok smo kod nekih oprašivača imali odstupanja, čime je naglašena važnost integriranog pristupa i potvrde rezultata korištenjem više metoda u procjeni međusortne kompatibilnosti.

U završnom dijelu istraživanja primijenjena je RNA-seq metoda na uzorcima tučkova cvjetova sorte ‘Oblica’ nakon tretmana samoooprašivanja vlastitom peludi (nekompatibilna reakcija) i stranooprašivanja s peludi sorte ‘Levantinka’ (kompatibilna reakcija), s ciljem identifikacije gena uključenih u mehanizme samoinkompatibilnosti. Analiza je pokazala povećanu ekspresiju dvaju gena homolognih genu *CYP83B1* koja ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u samoinkompatibilnosti putem metabolizma i razgradnje auksina.

Ocjena rada u tijeku!

9. SUMMARY

The olive (*Olea europaea* L.) is one od the most important agricultural crops in the Mediterranean region of Croatia, with a long tradition of cultivation and strong influence on both, culture and economy. One of the key challenges is the self-incompatibility of the most cultivars and reproductive incompatibility between cultivars, which can limit fertilization success and consequently affect the final yield. Therefore, when introducing new cultivars into cultivation, it is necessary to conduct analyses of inter-cultivar compatibility and verify self-incompatibility of individual cultivars, while simultaneously monitoring the flowering period.

In this doctoral dissertation, various methods were applied to study the reproductive compatibility of olive, with an emphasis on the autochthonous cultivars 'Lastovka' and 'Oblica'. Phenological observations of flowering for all studied cultivars were conducted over a three-year period, while the values of accumulated chilling hours (CH), growing degree hours (GDH), and the number of days in the year from January 1st to the beginning of flowering (DPC) were analyzed using decision tree method and cluster analysis in order to relate climatic parameters to phenological variables. Parameters associated with the accumulation of the chilling hours did not have a decisive influence on the separation of cultivars into early-flowering, late-flowering groups and cultivars characterized by strong phenological plasticity, with the latter showing greater adaptability to climatic variation, while cluster analysis indicated a nonlinear relationship between climatic and phenological variables.

To assess inter-cultivar compatibility and confirm self-incompatibility, controlled pollinations were performed on flowers of cultivars 'Lastovka' and 'Oblica' using pollen from selected donors. During the experiment, key reproductive processes were monitored: pollen germination of donor cultivars on the stigma, pollen tube growth in the style and fertilization success. All these processes were analyzed by fluorescence microscopy at different time intervals after pollination (24 h-96 h). Cross-pollination generally resulted in higher pollen germination, faster pollen tube growth and greater fertilization success compared to self-pollination.

In order to identify successful pollen donors of the cultivar 'Lastovka' and to confirm inter-cultivar incompatibility under open-pollination conditions, genotyping was performed on all potential pollen donors from a mixed orchard and embryos from the fruits of the cultivar 'Lastovka' using seven microsatellite markers. Paternity analysis conducted with the software CERVUS 3.0 enabled preccise identification of cultivars that participated in pollination and

Ocjena rada u tijeku!

fertilization of ‘Lastovka’. The cultivar ‘Levantinka’ proved to be the most effective pollinizer of ‘Lastovka’, as confirmed both by the analysis of reproductive processes and by the paternity test, while certain discrepancies among other pollinizers highlighted the importance of an integrated approach and validation of results using multiple methods in assessing inter-cultivar compatibility.

In the final part of the study, RNA-seq analysis was applied to pistil samples of cultivar ‘Oblica’ after self-pollination with its own pollen (incompatible reaction) and cross-pollination with pollen of ‘Levantinka’ (compatible reaction), aiming to identify genes involved in self-incompatibility mechanisms. The analysis revealed increased expression of two genes homologous to *CYP83B*-like gene, suggesting their potential role in self-incompatibility through auxin metabolism and degradation.

Ocjena rada u tijeku!

10. PRILOZI

Tablica S1. Popis svih embrija sorte ‘Lastovka’ s LOD vrijednostima, pripadajućim genotipskim profilima i najvjerojatnijim donorima peludi u 2019. godini.

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
1	1_3	228	236	172	193	152	184	154	174	190	194	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
2	1_4	228	236	162	193	146	184	145	16	190	192	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
3	1_5	228	236	162	193	146	166	145	154	190	192	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
4	1_6	228	236	162	193	152	166	145	150	190	190	211	215	131	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
5	1_8	228	236	162	185	152	184	145	150	190	198	211	217	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
6	1_9	228	236	162	193	152	166	154	174	192	198	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
7	1_10	228	236	162	193	146	166	154	174	192	198	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
8	1_17	228	236	162	185	152	184	150	154	190	192	217	217	131	145	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
9	1_19	228	236	162	185	152	166	154	174	192	198	0	0	99	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
10	1_20	228	236	162	193	152	166	154	174	190	190	211	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
11	1_21	228	236	162	185	152	166	154	174	190	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
12	1_22	228	238	162	185	146	152	150	164	192	205	211	217	131	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
13	1_24	228	238	162	185	146	152	150	154	190	192	217	217	131	145	‘Colombino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
14	1_25	228	236	162	193	146	184	145	150	190	190	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
15	1_28	228	236	162	185	146	152	150	150	184	192	215	215	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
16	1_29	228	238	162	185	132	152	150	150	192	192	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
17	1_33	228	238	185	193	146	146	150	154	192	192	215	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
18	1_34	228	228	162	185	146	152	154	154	190	190	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
19	1_37	228	236	162	185	146	184	150	174	190	198	211	217	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
20	1_38	228	236	162	185	146	184	145	150	190	198	217	217	131	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
21	1_39	228	228	162	193	146	146	150	150	190	205	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
22	1_40	228	236	162	193	152	184	154	174	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
23	1_41	228	236	172	185	146	152	154	162	192	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
24	1_42	228	238	162	193	146	146	150	154	192	205	211	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
25	1_44	228	236	162	185	146	184	145	154	192	198	215	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
26	1_45	228	236	162	162	146	146	150	150	192	198	0	0	0	0	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
27	1_48	228	240	185	193	146	152	150	164	190	205	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
28	1_50	228	236	162	185	152	184	150	174	190	190	217	217	131	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
29	1_55	228	236	162	185	146	166	145	154	190	190	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
30	1_58	228	238	185	185	146	152	150	150	192	192	211	217	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
31	1_61	228	236	185	185	146	152	150	154	190	192	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
32	1_63	228	240	162	185	132	146	150	154	192	205	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
33	1_68	228	236	162	193	146	166	145	154	190	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
34	1_69	228	236	162	185	146	184	145	154	192	198	211	217	99	131	‘Favarol’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
35	2_2	228	236	185	185	146	184	150	174	190	190	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
36	2_3	228	228	162	193	152	184	150	154	192	198	206	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
37	2_4	228	228	162	193	146	184	150	150	192	205	206	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
38	2_6	228	236	162	185	152	166	145	154	190	198	211	215	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
39	2_8	228	236	162	193	152	184	154	174	190	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
40	2_10	228	238	185	193	146	146	150	154	190	205	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
41	2_14	228	236	162	185	146	184	145	150	190	192	215	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
42	2_15	228	236	162	193	152	166	145	154	192	198	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
43	2_16	228	240	185	193	170	146	150	164	192	192	217	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
44	2_19	228	236	162	193	146	166	145	150	190	192	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
45	2_20	228	236	162	185	146	152	150	174	190	190	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
46	2_22	228	236	162	185	146	166	145	154	190	190	211	217	99	131	‘Grignan’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
47	2_24	228	236	162	193	146	184	145	150	190	190	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
48	2_30	228	236	162	185	146	180	150	154	190	192	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
49	2_29	228	234	162	185	136	152	150	154	190	192	209	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
50	2_32	228	236	162	193	146	166	150	154	190	192	211	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
51	2_31	228	236	162	193	170	184	150	154	190	192	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
52	2_35	228	240	162	185	146	166	150	154	190	190	211	215	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
53	2_37	228	236	162	185	146	184	150	154	190	192	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
54	2_61	228	236	162	185	152	166	145	154	192	198	211	217	131	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
55	2_41	228	238	162	185	146	152	150	154	192	198	211	215	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
56	2_40	228	236	162	185	152	166	145	154	192	198	215	217	131	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
57	2_42	228	228	185	193	146	152	150	154	192	205	206	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
58	2_43	228	238	162	193	146	146	150	150	192	192	211	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
59	2_45	228	240	185	185	146	146	154	164	190	192	211	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
60	2_49	228	240	162	193	146	146	150	164	190	192	211	215	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
61	2_51	228	236	162	185	146	184	150	174	192	198	211	215	99	131	'Picholine'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
62	2_53	228	236	162	193	152	184	145	154	190	198	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
63	2_54	228	236	162	185	146	166	150	174	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
64	2_56	228	236	162	193	146	184	150	174	190	190	211	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
65	2_58	228	236	162	193	146	166	145	150	192	198	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
66	3_5	228	240	162	193	136	146	150	154	190	190	215	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
67	3_9	228	240	185	185	146	146	150	154	192	205	215	217	131	145	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
68	3_11	228	236	181	193	136	152	150	154	190	198	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
69	3_12	228	228	185	193	146	152	154	154	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
70	3_13	228	236	162	185	146	166	145	154	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
71	3_16	228	236	162	193	146	166	150	174	190	190	211	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
72	3_18	228	236	162	185	146	166	150	174	190	198	211	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
73	3_23	228	236	162	193	146	166	154	174	190	190	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
74	3_24	228	228	162	185	146	184	150	154	190	198	206	215	131	131	'Parmesana'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
75	3_25	228	236	162	193	152	184	145	154	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
76	3_27	228	238	162	185	146	152	150	164	192	205	211	217	131	145	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
77	3_28	228	236	162	185	146	166	154	174	190	192	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
78	3_29	228	236	162	185	146	166	145	154	192	198	211	215	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
79	3_31	228	240	162	193	146	146	150	154	190	192	211	215	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
80	3_32	228	236	162	193	146	184	154	178	192	198	217	217	131	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
81	3_10	228	238	162	193	132	146	150	164	192	205	211	215	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
82	3_35	228	240	185	193	132	152	150	154	190	192	215	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
83	3_38	228	236	162	193	152	184	150	174	190	190	211	215	131	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
84	3_39	228	236	162	185	152	184	150	174	190	192	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
85	3_40	228	236	162	193	146	184	150	174	190	192	211	215	131	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
86	3_42	228	236	162	185	152	166	145	154	192	198	215	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
87	3_43	228	236	162	193	146	184	150	174	190	198	217	217	99	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
88	3_44	228	228	162	185	146	152	154	154	190	192	217	217	131	145	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
89	3_45	228	246	162	185	146	166	125	150	190	198	206	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
90	3_46	228	236	162	185	146	166	150	174	190	190	215	217	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
91	3_47	228	238	162	185	146	152	150	164	190	205	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
92	3_48	228	250	162	203	146	180	154	154	190	198	211	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
93	3_49	228	236	185	193	146	166	145	150	190	192	215	217	131	131	‘Pendolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
94	3_50	228	236	176	185	152	184	150	150	190	190	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
95	3_51	228	238	162	193	146	146	150	164	192	205	217	217	99	145	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
96	3_52	228	236	162	185	146	166	150	174	190	192	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
97	3_56	228	236	162	185	146	166	145	150	190	198	211	215	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
98	3_57	228	236	162	185	146	166	145	154	192	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
99	3_2	228	236	193	193	146	152	154	154	190	198	206	215	99	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
100	3_3	228	236	162	185	146	184	145	150	190	190	211	215	99	131	'Parmesana'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
101	3_4	228	240	162	185	146	152	150	150	192	192	211	217	131	145	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
102	3_60	228	236	162	181	146	166	145	154	190	198	217	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
103	3_62	228	238	162	181	132	146	154	164	192	192	215	217	131	145	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
104	3_63	228	236	162	185	152	166	154	174	190	192	211	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
105	3_64	228	240	162	185	132	146	150	172	190	200	215	217	99	99	'Taggiasca'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
106	3_65	228	228	185	193	152	184	150	150	192	200	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
107	3_66	228	234	162	185	136	146	150	154	190	192	217	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
108	4_3	228	236	162	185	146	166	145	154	190	192	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
109	4_5	228	236	162	185	152	166	150	174	190	190	211	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
110	4_7	228	240	162	193	146	152	150	150	190	207	217	217	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
111	4_11	228	236	162	193	146	166	150	174	190	198	211	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
112	4_12	228	238	185	193	132	152	150	154	190	192	215	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
113	4_13	228	236	162	193	146	184	145	150	190	192	211	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
114	4_15	228	236	162	185	152	184	150	174	190	192	211	217	131	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
115	4_17	228	236	162	193	146	184	145	150	190	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
116	4_19	228	236	185	193	152	184	150	174	190	198	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
117	4_20	228	246	185	193	146	152	147	154	190	200	215	217	131	131	‘Maurino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
118	4_21	228	246	162	193	152	184	150	154	192	200	211	215	99	131	‘Colombino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
119	4_25	228	236	162	193	152	166	150	174	190	190	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
120	4_26	228	236	162	193	146	184	145	154	190	198	211	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
121	4_27	228	236	162	193	146	166	145	150	192	198	211	217	99	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
122	4_30	228	236	162	185	152	166	145	154	190	192	211	215	99	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
123	4_33	228	236	162	185	152	166	145	154	190	190	217	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
124	4_42	228	236	162	193	152	184	154	174	190	192	215	217	99	131	‘Frantoio’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
125	4_43	228	236	185	185	152	166	0	0	190	190	211	217	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
126	4_44	228	236	185	185	152	166	145	150	190	190	217	217	99	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
127	4_45	228	238	185	193	132	146	150	154	192	192	211	215	131	145	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
128	4_46	228	236	162	185	146	166	145	150	190	190	211	217	99	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
129	4_49	228	236	162	193	146	166	154	174	190	190	215	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
130	4_51	228	236	162	185	152	184	154	174	190	190	211	215	99	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
131	4_62	228	236	162	193	146	166	150	174	192	198	215	217	131	131	‘Grignan’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
132	4_63	228	238	162	185	132	152	150	154	190	192	211	215	131	145	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
133	9_1	228	236	162	185	146	166	150	174	190	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
134	9_2	228	236	162	193	152	166	154	174	190	190	211	217	131	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
135	9_3	228	236	0	0	152	184	150	174	192	198	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
136	9_5	228	236	193	193	146	166	150	174	190	190	217	217	131	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
137	9_6	228	236	162	185	152	166	145	150	190	192	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
138	9_7	228	236	162	185	152	166	145	150	190	190	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
139	9_8	228	236	162	193	152	166	154	174	190	198	217	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
140	9_9	228	236	162	193	152	184	145	150	190	198	215	217	131	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
141	9_12	228	236	162	185	152	184	145	154	190	198	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
142	9_13	228	240	162	185	146	152	150	154	192	192	211	215	131	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
143	9_19	228	236	162	185	146	170	154	174	192	198	211	217	99	131	'Moraiolo'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
144	9_21	228	236	162	185	152	166	154	174	190	198	211	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
145	9_22	228	228	162	193	146	184	150	150	192	200	215	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
146	9_28	228	236	162	193	146	184	154	174	190	198	211	217	131	131	'Rosciola'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
147	9_29	228	240	185	193	152	176	150	174	192	198	215	217	131	131	'Alveriano grionl'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
148	9_31	228	236	162	193	146	166	154	174	190	190	211	217	131	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
149	9_33	228	236	162	185	152	166	145	154	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
150	9_35	228	240	162	193	132	146	150	154	192	205	211	215	131	145	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
151	9_42	228	236	0	0	0	0	145	154	190	192	0	0	0	0	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
152	9_50	228	228	162	193	146	152	150	150	190	200	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
153	9_51	228	236	162	185	146	166	154	174	190	198	215	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
154	9_52	228	240	185	185	132	146	150	154	192	192	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
155	9_53	228	236	162	193	146	166	150	174	190	190	211	215	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
156	9_55	228	236	162	185	146	166	145	150	190	190	211	217	99	131	‘Koroneiki’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
157	9_56	228	236	162	185	146	166	154	174	192	198	211	215	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
158	9_57	228	234	162	193	136	146	154	172	184	192	211	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
159	9_58	228	236	162	193	152	184	145	154	190	190	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
160	9_62	228	240	162	193	152	184	150	178	190	205	211	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
161	9_64	228	240	162	185	146	146	154	164	192	205	217	217	99	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
162	9_65	228	240	185	193	146	152	150	164	192	192	215	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
163	9_66	228	240	183	185	132	146	150	154	190	192	211	215	99	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
164	2_63	228	238	185	193	132	146	150	154	190	192	217	217	99	145	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
165	2_68	228	236	162	193	152	166	145	150	190	198	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
166	2_70	228	236	162	193	146	184	150	154	190	192	206	215	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
167	1_31	228	236	162	185	152	166	150	174	190	190	211	217	131	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
168	1_32	228	236	162	193	152	184	145	154	192	198	211	215	131	131	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
169	1_36	228	240	162	185	152	180	150	154	192	198	211	217	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
170	1_53	228	240	162	185	146	152	150	164	190	205	211	217	99	145	‘Santa Caterina’	Negativna LOD vrijednost
171	1_54	228	240	162	185	146	152	154	164	190	205	217	217	131	145	‘Oblica’	Negativna LOD vrijednost

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
172	1_59	228	236	162	185	152	184	145	154	190	198	211	215	131	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
173	2_1	228	238	162	185	146	146	150	150	192	192	217	217	99	131	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
174	2_46	228	238	185	193	146	152	150	164	192	192	211	217	99	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
175	2_59	228	236	162	185	152	184	145	154	190	192	217	217	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
176	2_60	228	240	162	193	146	146	154	164	192	192	211	217	99	145	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
177	3_15	228	236	162	193	152	184	154	174	190	190	211	215	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
178	3_53	228	236	162	185	152	166	150	150	190	192	217	217	99	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
179	3_54	228	236	162	185	152	166	150	174	190	190	211	215	99	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
180	3_58	228	228	185	185	146	146	150	154	192	192	215	215	99	131	‘Oblica’	Negativna LOD vrijednost
181	3_1	228	250	162	193	146	180	150	154	192	198	215	217	99	131	‘Farga’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
182	3_61	228	228	162	193	152	184	125	150	192	200	206	217	131	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
183	4_8	228	236	162	185	146	184	145	154	190	190	211	215	131	131	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
184	4_18	0	0	185	193	132	146	0	0	0	0	217	217	131	145	‘Alveriano grionl’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
185	4_50	0	0	162	193	132	152	0	0	0	0	211	217	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
186	4_57	0	0	162	193	146	146	0	0	0	0	217	217	99	131	‘Grignan’	Negativna LOD vrijednost
187	4_61	0	0	162	185	146	166	0	0	0	0	211	215	99	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
188	9_14	228	240	181	193	146	176	150	150	190	198	217	217	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
189	9_36	228	236	185	205	152	184	145	150	190	192	217	217	99	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
190	9_37	228	238	185	185	146	146	150	154	192	192	211	217	99	145	‘Grignan’	Negativna LOD vrijednost

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
191	9_40	228	236	185	205	152	184	154	154	190	198	215	217	131	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
192	9_43	228	238	162	193	146	146	154	164	192	205	211	215	99	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
193	9_44	228	228	185	193	146	146	154	154	190	192	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
194	9_48	228	236	185	205	146	166	154	174	190	198	215	217	131	131	‘Cipressino’	Negativna LOD vrijednost
195	9_59	228	236	162	193	146	184	145	154	190	198	217	217	99	131	‘Sigoise’	Negativna LOD vrijednost
196	1_1	228	240	185	185	132	152	150	164	190	205	211	215	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
197	1_2	228	236	185	205	146	146	145	154	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
198	1_7	228	236	185	205	152	184	145	150	192	198	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
199	1_11	228	236	162	193	152	184	150	154	190	192	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
200	1_12	228	246	162	193	146	184	154	154	192	200	217	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
201	1_13	228	246	185	193	146	152	154	174	190	200	217	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
202	1_14	228	236	193	205	152	166	145	154	190	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
203	1_15	228	238	185	185	168	146	150	150	190	205	217	217	99	145	‘Olivastra Seggianese’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
204	1_18	228	238	162	193	146	146	154	164	192	192	215	217	131	145	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
205	1_23	228	236	162	193	146	166	145	154	190	198	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
206	1_26	228	250	193	193	152	166	154	154	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
207	1_27	228	236	162	193	136	146	150	150	190	198	211	217	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
208	1_30	228	240	162	185	132	146	150	150	190	205	215	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
209	1_35	228	246	185	193	146	184	154	154	190	200	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
210	1_43	228	236	185	205	152	166	145	150	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
211	1_46	228	234	162	193	146	152	150	154	190	196	209	215	99	99	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
212	1_47	228	236	183	185	146	152	150	150	184	190	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
213	1_49	228	246	162	193	152	184	125	150	184	192	215	217	99	99	‘Oblica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
214	1_51	228	236	162	185	146	152	0	0	192	198	215	217	131	131	‘Oblica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
215	2_25	228	228	162	193	146	146	150	154	190	192	215	217	131	131	‘Koroneiki’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
216	1_56	228	236	162	185	146	166	145	154	190	198	211	217	99	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
217	1_57	228	236	185	205	152	166	145	154	190	198	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
218	1_60	228	250	185	193	146	146	154	154	190	216	217	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
219	1_62	228	236	162	185	146	184	154	154	190	198	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
220	1_64	228	240	193	193	152	176	154	154	192	216	215	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
221	1_65	228	236	162	193	146	184	150	150	190	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
222	1_66	228	236	162	193	146	166	0	0	190	198	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
223	1_67	228	236	162	185	146	166	154	154	190	198	211	215	99	131	‘Favarol’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
224	2_5	228	238	0	0	0	0	150	150	192	192	0	0	0	0	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
225	2_7	228	236	0	0	0	0	154	174	192	198	0	0	0	0	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
226	2_11	228	236	0	0	0	0	150	150	192	198	0	0	0	0	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
227	2_12	228	236	0	0	0	0	150	150	190	190	0	0	0	0	‘Cipressino’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
228	2_13	228	236	162	193	152	184	145	154	190	192	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
229	2_17	228	236	162	185	152	166	154	154	192	198	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
230	2_18	228	236	162	193	146	184	154	154	190	190	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
231	2_21	228	236	162	185	146	166	150	150	190	190	211	215	99	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
232	2_23	228	236	162	185	146	184	150	150	192	198	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
233	2_26	228	234	162	193	146	146	150	154	184	192	209	217	99	99	‘Sigoise’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
234	2_27	228	236	162	185	146	152	150	150	190	198	206	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
235	2_28	228	236	162	185	152	184	150	150	192	198	215	217	131	131	‘Chemlali’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
236	2_33	228	228	185	193	152	184	125	154	190	198	206	215	131	131	‘Favarol’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
237	2_34	228	250	193	205	136	146	154	154	184	190	209	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
238	2_36	228	228	162	193	146	152	150	150	190	198	206	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
239	2_38	228	236	162	193	146	166	150	150	190	198	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
240	2_44	228	240	185	193	132	146	150	150	190	192	217	217	99	145	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
241	2_62	228	236	162	193	152	184	154	154	192	198	211	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
242	2_48	228	240	162	185	146	146	150	150	192	200	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
243	2_50	228	236	162	185	146	166	145	154	192	198	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
244	2_52	228	236	162	193	152	184	0	0	192	198	215	217	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
245	2_55	228	236	162	193	152	184	154	154	190	190	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
246	2_57	228	236	193	205	146	166	154	154	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
247	3_6	228	238	162	185	146	152	0	0	190	205	211	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
248	3_7	228	236	162	185	146	152	154	154	190	192	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
249	3_8	228	236	162	193	146	184	154	154	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
250	3_14	228	236	162	185	146	184	0	0	190	198	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
251	3_17	228	236	162	193	152	166	150	150	190	198	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
252	3_19	228	238	185	193	146	146	150	150	190	205	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
253	3_20	228	246	185	193	146	166	154	154	192	200	206	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
254	3_21	228	228	162	193	146	152	0	0	190	200	206	217	99	131	'Moraiolo'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
255	3_22	228	236	162	193	146	166	0	0	190	192	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
256	3_26	228	238	185	185	146	146	150	154	192	192	215	217	99	145	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
257	3_34	228	246	193	205	152	166	125	150	192	200	206	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
258	3_36	228	240	0	0	146	146	150	150	192	192	211	217	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
259	3_37	228	236	0	0	146	146	150	150	190	190	0	0	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
260	3_41	228	250	185	205	136	146	150	154	190	192	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
261	3_55	228	240	185	185	146	146	150	154	190	192	211	215	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
262	3_59	228	240	185	193	132	152	154	164	190	192	211	217	131	145	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
263	3_67	228	240	162	185	146	152	154	164	190	205	211	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
264	4_1	228	246	185	193	152	166	125	154	192	200	211	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
265	4_2	228	236	185	185	146	184	145	150	190	190	215	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
266	4_4	228	238	162	185	132	152	150	154	192	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
267	4_6	228	236	185	205	146	184	154	154	190	190	211	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
268	4_9	228	240	185	185	146	146	154	154	192	192	215	217	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
269	4_10	228	236	185	185	146	184	145	154	190	190	211	215	131	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
270	4_14	228	236	162	193	146	166	150	150	192	198	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
271	4_16	228	236	0	0	152	166	154	154	192	198	211	217	99	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
272	4_22	228	228	185	185	146	146	150	150	190	205	206	217	99	131	‘Alveriano grionl’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
273	4_23	228	236	162	193	146	184	150	150	190	190	217	217	131	131	‘Olivastra Seggianese’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
274	4_24	228	240	0	0	146	152	150	150	192	205	0	0	131	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
275	4_28	228	236	0	0	146	166	154	154	190	198	0	0	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
276	4_29	0	0	162	193	146	166	0	0	0	0	211	217	99	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
277	4_31	0	0	162	193	146	152	0	0	0	0	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
278	4_32	0	0	193	193	152	166	0	0	0	0	211	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
279	4_34	228	236	162	193	146	166	145	150	190	190	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
280	4_35	228	228	162	185	146	152	154	154	192	200	211	215	99	131	‘Colombino’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
281	4_36	228	236	162	185	146	146	150	178	190	190	211	217	131	131	‘Chemlali’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
282	4_37	228	240	162	185	146	146	150	150	192	198	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
283	4_38	228	246	181	193	152	152	125	154	192	200	217	217	99	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
284	4_39	228	236	185	205	146	146	154	178	190	192	211	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
285	4_40	228	250	193	193	146	152	150	174	190	216	217	217	131	131	‘Oblica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
286	4_41	228	236	162	193	152	152	154	154	192	194	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
287	4_47	228	236	162	193	146	166	145	154	190	190	211	217	131	131	'Drobnica'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
288	4_48	228	236	185	193	146	152	150	154	192	216	217	217	99	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
289	4_52	228	236	162	193	146	152	154	174	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
290	4_53	228	238	185	193	146	152	150	164	192	192	211	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
291	4_54	228	236	162	185	146	152	154	154	190	192	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
292	4_55	228	240	185	193	146	146	150	154	192	205	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
293	4_56	228	238	185	185	146	152	150	154	190	192	211	215	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
294	4_58	228	238	185	193	146	152	150	150	192	205	217	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
295	4_59	228	236	162	185	146	152	150	174	190	192	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
296	4_60	228	238	162	193	146	152	154	164	190	192	211	217	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
297	4_64	228	236	185	185	146	166	150	174	192	198	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
298	9_4	228	236	162	185	146	152	150	174	192	198	211	215	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
299	9_10	228	236	162	185	146	152	145	150	192	198	211	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
300	9_11	228	236	162	185	146	184	154	174	190	198	215	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
301	9_15	228	250	162	193	146	180	150	154	192	198	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
302	9_16	228	238	162	193	146	146	150	154	192	205	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
303	9_17	228	236	162	193	146	152	145	154	192	198	211	215	99	131	'Parmesana'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
304	9_18	228	236	162	193	146	166	145	154	190	198	211	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
305	9_20	228	240	185	193	146	152	150	164	192	192	211	217	99	145	‘Sigoise’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
306	9_24	228	236	162	185	152	166	150	174	190	192	211	215	99	131	‘Santa Caterina’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
307	9_25	228	228	162	185	146	184	154	154	190	192	206	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
308	9_26	228	228	185	193	146	152	150	150	190	205	217	217	99	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
309	9_27	228	236	181	185	152	176	150	154	192	216	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
310	9_30	228	238	162	193	146	152	150	154	190	205	211	215	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
311	9_32	228	240	162	185	146	152	150	154	190	205	211	217	131	145	‘Koroneiki’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
312	9_34	228	238	162	185	132	146	150	150	192	192	215	217	131	145	‘Sigoise’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
313	9_38	228	240	162	185	146	176	150	154	192	216	215	215	99	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
314	9_39	228	236	162	185	146	152	145	154	192	198	211	217	99	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
315	9_41	228	236	181	193	136	152	154	174	192	216	215	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
316	9_45	228	240	162	185	146	152	150	164	190	192	211	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
317	9_46	228	236	162	185	146	152	150	174	190	192	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
318	9_47	228	236	162	193	146	166	150	174	190	198	215	217	99	131	‘Rosciola’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
319	9_49	228	236	162	193	146	166	145	150	192	198	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
320	9_54	228	236	185	193	136	146	150	174	192	216	215	217	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
321	9_60	228	236	162	193	146	152	150	174	190	192	211	215	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
322	9_61	228	236	162	185	146	152	150	174	192	198	215	217	131	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
323	9_63	228	228	162	185	146	152	154	154	190	190	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
324	9_67	228	236	162	193	146	184	145	154	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
325	2_64	228	236	162	185	146	166	150	174	190	190	217	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
326	2_65	228	240	162	193	146	152	150	164	190	192	215	217	99	145	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
327	2_67	228	236	162	193	146	166	145	154	192	198	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
328	2_69	228	236	193	205	146	166	145	154	190	198	211	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost ispod praga (2,29)
329	2_71	228	236	162	185	146	152	145	150	192	198	211	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Tablica S2. Popis svih embrija sorte ‘Lastovka’ s LOD vrijednostima, pripadajućim genotipskim profilima i najvjerojatnijim donorima peludi u 2020. godini.

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
1	1_12	228	240	172	185	152	184	154	178	192	205	213	215	131	131	‘Moraiolo’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
2	1_13	228	228	185	203	146	152	150	154	190	192	215	217	99	145	‘Karbunčela’	Negativna LOD vrijednost
3	1_14	228	236	193	205	146	146	150	154	190	190	217	217	131	145	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
4	1_15	228	236	193	205	152	184	154	154	190	192	215	209	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
5	1_16	228	236	162	185	152	166	145	154	190	192	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
6	1_17	228	236	193	205	152	166	150	174	190	190	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
7	1_18	228	236	185	205	146	188	145	150	192	198	217	213	99	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
8	1_19	228	236	185	205	146	184	150	154	190	198	211	215	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
9	1_20	228	228	193	193	146	152	150	154	190	192	213	213	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
10	1_21	228	236	193	205	146	146	150	154	192	198	217	217	99	145	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
11	1_22	228	236	162	193	152	184	145	150	190	198	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
12	1_23	228	236	185	205	146	152	150	154	190	198	209	215	99	145	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
13	1_24	228	236	193	205	152	166	150	174	190	198	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
14	1_25	228	250	162	193	152	180	150	154	190	198	217	217	99	131	‘Pendolino’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
15	1_26	228	236	185	205	146	152	150	150	190	190	217	217	131	145	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
16	1_27	228	236	193	203	146	146	150	154	192	198	217	217	131	131	‘Colombino’	Negativna LOD vrijednost
17	1_28	228	236	162	193	146	184	154	174	190	190	213	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
18	1_29	228	236	162	185	146	184	145	150	190	192	213	215	99	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
19	1_30	228	228	193	193	146	146	150	154	192	198	209	217	131	131	‘Sigoise’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
20	1_38	228	236	162	185	146	184	145	150	190	198	217	217	131	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
21	1_39	228	228	162	193	146	146	150	150	190	205	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
22	1_40	228	236	162	193	152	184	154	174	192	198	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
23	1_41	228	236	172	185	146	152	154	162	192	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
24	1_42	228	238	162	193	146	146	150	154	192	205	211	217	99	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
25	1_44	228	236	162	185	146	184	145	154	192	198	215	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
26	1_45	228	236	162	162	146	146	150	150	192	198	0	0	0	0	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
27	1_48	228	240	185	193	146	152	150	164	190	205	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
28	1_50	228	236	162	185	152	184	150	174	190	190	217	217	131	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
29	1_55	228	236	162	185	146	166	145	154	190	190	217	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
30	1_58	228	238	185	185	146	152	150	150	192	192	211	217	99	131	‘Parmesana’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
31	1_61	228	236	185	185	146	152	150	154	190	192	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
32	1_63	228	240	162	185	132	146	150	154	192	205	215	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
33	1_68	228	236	162	193	146	166	145	154	190	198	217	217	131	131	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
34	1_69	228	236	162	185	146	184	145	154	192	198	211	217	99	131	‘Favarol’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
35	2_2	228	236	185	185	146	184	150	174	190	190	217	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
36	2_3	228	228	162	193	152	184	150	154	192	198	206	217	131	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
37	2_4	228	228	162	193	146	184	150	150	192	205	206	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)
38	2_6	228	236	162	185	152	166	145	154	190	198	211	215	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (2,29)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
39	1_50	228	228	185	195	146	146	150	154	192	198	215	217	131	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
40	1_51	228	236	162	185	152	166	145	154	190	198	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
41	1_52	228	236	162	193	152	166	154	174	192	198	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
42	1_53	228	236	193	205	152	184	145	150	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
43	1_55	228	236	162	185	146	184	154	174	190	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
44	1_56	228	236	193	193	136	146	150	154	192	216	215	217	99	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
45	1_58	228	236	162	185	152	184	154	174	190	190	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
46	1_59	228	236	193	203	146	184	154	154	190	192	215	217	131	131	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
47	1_60	228	228	185	185	146	146	154	154	190	192	215	217	99	99	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
48	1_61	228	236	193	205	146	184	150	174	192	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
49	1_62	0	0	185	203	146	184	0	0	0	0	215	217	99	145	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
50	1_63	0	0	193	193	146	166	0	0	0	0	213	217	131	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
51	2_1	0	0	193	205	152	184	0	0	0	0	213	215	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
52	2_2	0	0	193	205	146	152	0	0	0	0	209	215	131	145	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
53	2_3	228	238	162	193	146	146	154	164	192	192	215	217	131	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
54	2_4	228	236	185	205	146	184	145	154	192	198	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
55	2_5	228	236	185	205	146	184	145	154	190	192	213	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
56	2_6	228	228	185	203	146	184	150	154	190	198	209	217	131	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
57	2_7	228	246	193	207	146	184	125	150	190	198	209	217	99	131	'Alveriano grionl'	Negativna LOD vrijednost

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
58	2_8	228	228	193	203	146	184	150	154	192	198	209	217	131	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
59	2_9	228	236	193	205	146	166	150	174	190	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
60	2_10	228	240	162	193	152	152	150	174	190	200	213	217	131	131	'Rosciola'	Negativna LOD vrijednost
61	2_11	228	228	193	203	146	152	150	154	192	198	209	217	131	131	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
62	2_12	228	236	162	185	146	184	145	154	190	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
63	2_13	228	228	185	203	146	152	154	154	190	192	209	215	99	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
64	2_14	228	236	185	205	152	166	154	174	192	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
65	2_15	228	236	185	205	146	146	150	154	190	192	215	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
66	2_16	228	236	193	205	146	184	154	154	190	198	217	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
67	2_17	228	236	185	203	146	146	150	154	190	198	209	217	99	145	'Karbunčela'	Negativna LOD vrijednost
68	2_18	228	228	185	203	146	146	150	154	190	198	209	215	131	145	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
69	2_19	228	228	193	205	146	152	154	154	192	198	209	217	131	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
70	2_20	228	236	162	185	146	184	145	154	190	190	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
71	2_21	228	228	193	205	146	152	154	154	190	192	209	215	131	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
72	2_22	228	228	185	205	152	184	150	154	190	192	209	217	131	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
73	2_23	228	238	185	193	146	152	150	150	192	192	213	215	131	145	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
74	2_24	228	228	185	205	152	184	150	154	190	198	217	217	99	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
75	2_25	228	236	193	193	152	184	125	150	190	200	209	215	131	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
76	2_26	228	236	185	205	146	166	150	174	190	198	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
77	2_28	228	236	162	193	146	184	150	174	192	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
78	2_29	228	236	162	193	146	152	125	150	190	192	209	217	99	131	'Grignan'	Negativna LOD vrijednost
79	2_30	228	236	193	205	152	166	145	150	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
80	2_31	228	240	185	193	152	176	154	174	192	216	217	217	131	131	'Santa Caterina'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
81	2_33	228	236	193	203	146	146	150	154	190	190	217	217	99	131	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
82	2_34	228	228	193	203	146	152	150	154	190	198	217	217	99	145	'Karbunčela'	Negativna LOD vrijednost
83	2_35	228	236	185	205	146	152	154	154	190	192	215	217	99	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
84	2_36	228	228	162	185	146	146	154	154	192	192	215	215	131	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
85	2_37	228	236	185	203	152	184	154	154	190	192	209	215	131	145	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
86	2_38	228	236	162	193	152	166	145	154	190	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
87	2_39	228	236	193	203	152	184	150	154	190	190	209	215	99	145	'Oblica'	Negativna LOD vrijednost
88	2_40	228	236	185	205	152	184	154	174	190	198	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
89	2_41	228	236	193	207	146	166	145	154	190	198	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
90	2_43	228	228	162	185	146	146	150	154	192	192	215	217	99	131	'Moraiolo'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
91	2_44	228	228	185	193	152	152	150	150	190	192	217	217	99	131	'Santa Caterina'	Negativna LOD vrijednost
92	2_45	228	228	193	205	152	184	154	154	190	192	217	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
93	2_47	228	236	162	193	146	166	154	174	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
94	2_48	228	236	185	205	146	152	154	174	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
95	2_49	228	240	185	193	132	152	150	150	190	192	215	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
96	2_52	228	236	185	203	146	184	150	154	192	198	209	217	99	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
97	2_53	228	236	185	203	152	184	150	150	190	192	209	215	99	145	'Oblica'	Negativna LOD vrijednost
98	2_54	228	236	193	195	146	146	154	154	192	198	209	217	99	131	'Favarol'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
99	2_55	228	236	193	203	146	146	150	154	190	198	209	217	131	145	'Karbunčela'	Negativna LOD vrijednost
100	2_56	228	236	162	185	146	166	154	174	190	190	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
101	2_57	228	236	193	205	146	152	154	154	192	198	215	217	131	145	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
102	2_58	228	236	162	193	146	152	145	150	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
103	2_59	228	236	181	193	146	152	154	154	190	192	215	219	131	131	'Olivastra Seggianese'	Negativna LOD vrijednost
104	2_61	228	236	162	193	152	184	145	154	192	198	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
105	2_62	228	228	193	203	146	184	150	154	190	192	209	217	131	131	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
106	2_63	228	236	185	205	152	184	150	154	192	198	209	215	131	145	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
107	2_64	228	246	185	207	152	184	154	154	190	200	209	215	131	131	'Alveriano grionl'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
108	2_65	228	236	193	205	146	152	150	154	190	198	209	217	131	145	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
109	2_66	228	236	193	193	152	176	154	154	190	216	215	215	131	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
110	4_1	228	236	185	205	146	184	145	150	190	198	215	217	131	168	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
111	4_2	228	228	185	203	146	146	154	154	190	198	209	217	99	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
112	4_3	228	236	185	203	152	184	150	154	190	198	209	215	131	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
113	4_4	228	228	193	207	146	184	150	154	190	198	215	217	99	145	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
114	4_5	228	236	162	185	146	152	154	154	190	192	215	217	131	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
115	4_6	228	228	185	203	146	146	154	154	190	198	209	217	131	168	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
116	4_7	228	236	185	193	146	152	150	150	190	198	209	215	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
117	4_8	228	236	185	193	146	184	154	154	190	192	209	215	99	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
118	4_9	228	236	185	207	146	166	150	150	190	200	213	217	99	131	'Chemlali'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
119	4_10	228	236	162	193	146	166	154	174	190	190	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
120	4_11	228	236	193	205	146	152	150	154	192	198	209	217	99	131	'Colombino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
121	4_12	228	238	185	193	146	152	150	154	192	192	213	215	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
122	4_13	228	250	185	205	146	184	150	154	184	192	215	215	131	131	'Leccino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
123	4_14	228	246	193	195	152	166	154	154	192	198	209	217	99	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
124	4_15	228	236	162	185	146	152	154	154	190	190	213	215	131	131	'Grignan'	Negativna LOD vrijednost
125	4_16	228	236	185	207	146	146	150	154	192	198	209	217	99	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
126	4_17	228	228	185	203	146	184	150	154	190	192	215	217	99	135	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
127	4_18	228	236	185	193	136	146	150	150	192	198	215	217	131	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
128	4_19	228	236	193	207	146	152	150	154	190	192	209	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
129	4_20	228	228	185	203	146	152	150	154	192	198	209	217	131	131	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
130	4_21	228	236	193	205	146	152	150	154	190	198	217	217	99	145	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
131	4_22	228	236	185	205	146	152	150	154	190	198	215	217	99	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
132	4_23	228	240	162	185	132	152	150	164	192	205	213	217	99	131	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
133	4_24	228	236	162	185	146	184	150	174	190	190	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
134	4_25	228	236	162	193	152	184	145	154	190	198	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
135	4_26	228	228	193	203	152	184	154	154	190	192	209	215	131	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
136	4_31	228	236	162	185	146	146	154	154	190	192	209	215	99	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
137	4_32	228	236	185	205	152	166	150	150	190	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
138	4_33	228	238	185	193	132	146	150	154	192	192	213	217	99	145	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
139	4_34	228	236	185	205	146	166	150	174	192	198	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
140	4_35	228	236	185	205	152	166	150	174	192	198	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
141	4_36	228	228	193	205	146	184	154	154	190	198	209	215	99	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
142	4_37	228	236	185	207	152	184	154	154	192	198	215	217	99	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
143	4_38	228	236	193	203	146	146	154	154	192	198	209	217	99	131	'Favarol'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
144	4_39	228	236	185	193	146	152	145	154	190	190	213	217	99	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
145	4_40	228	228	185	203	146	146	150	150	190	192	209	217	99	135	'Karbunčela'	Negativna LOD vrijednost
146	4_41	228	240	193	193	152	176	154	154	192	216	215	215	131	131	'Sigoise'	Negativna LOD vrijednost
147	4_42	228	228	193	203	146	184	150	154	190	190	217	217	131	131	'Oblica'	Negativna LOD vrijednost
148	4_43	228	236	193	205	152	184	154	154	190	190	217	217	99	135	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
149	4_44	228	236	181	185	146	152	154	154	190	216	209	215	99	131	'Favarol'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
150	4_45	228	236	193	205	152	184	154	174	192	198	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
151	4_46	228	236	185	207	152	166	154	154	190	200	213	215	131	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
152	4_47	228	236	185	203	146	184	150	154	190	198	215	217	99	145	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
153	4_48	228	228	185	205	146	152	154	154	190	192	209	217	99	135	'Fasolino'	Negativna LOD vrijednost
154	4_49	228	228	185	185	146	152	154	154	192	192	215	217	131	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
155	4_50	228	236	162	185	152	166	150	174	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
156	4_51	228	228	185	203	152	184	154	154	192	198	217	217	99	135	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
157	4_52	228	236	193	205	146	184	150	174	192	198	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
158	4_53	228	236	193	203	146	146	150	154	190	198	209	215	99	135	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
159	4_54	228	228	185	195	146	146	150	150	190	190	209	217	99	135	'Fasolino'	Negativna LOD vrijednost
160	4_55	228	236	185	203	146	152	154	154	190	190	215	217	131	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
161	4_56	228	236	162	185	152	166	154	174	192	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
162	4_57	228	236	162	185	146	166	150	174	192	198	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
163	4_58	228	228	185	203	146	152	150	154	190	198	215	217	131	131	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
164	4_59	228	236	193	203	146	146	150	154	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
165	4_60	228	228	185	203	146	152	145	154	190	198	217	217	99	135	'Karbunčela'	Negativna LOD vrijednost
166	4_61	228	236	193	205	146	166	145	154	192	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
167	4_62	228	236	185	205	146	166	154	154	190	198	213	217	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
168	4_63	228	236	162	185	152	166	154	174	190	190	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
169	4_64	228	236	185	205	146	184	154	154	190	190	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
170	5_1	228	236	185	205	152	166	145	150	192	198	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
171	5_2	228	236	185	205	146	152	145	150	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
172	5_3	228	236	172	185	136	146	154	154	190	205	211	217	99	131	'Favarol'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
173	5_4	228	228	193	207	146	184	125	154	190	200	213	215	99	131	'Alveriano grionl'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
174	5_5	228	236	185	205	146	152	154	174	190	198	215	217	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
175	5_6	228	236	162	185	146	152	150	154	190	190	209	217	99	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
176	5_7	228	236	185	203	152	184	154	154	190	192	209	217	99	131	'Farga'	Negativna LOD vrijednost
177	5_8	228	236	162	193	146	184	150	174	190	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
178	5_9	228	236	185	193	146	184	154	154	190	198	213	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
179	5_10	228	236	193	203	152	184	150	150	190	198	215	217	99	131	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
180	5_11	228	240	162	185	132	170	150	154	192	192	217	217	99	99	'Cipressino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
181	5_12	228	236	185	193	146	146	150	154	190	198	215	217	99	131	'Sigoise'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
182	5_13	228	236	185	203	146	146	150	150	190	192	209	215	99	135	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
183	5_14	228	236	162	185	146	166	150	174	190	198	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
184	5_15	228	236	185	203	146	152	150	154	192	198	217	217	99	131	'Colombino'	Negativna LOD vrijednost
185	5_16	228	236	185	203	146	152	125	150	190	190	215	217	99	145	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
186	5_17	228	236	162	185	146	186	154	154	190	192	213	215	99	131	'Grignan'	Negativna LOD vrijednost
187	5_18	228	236	193	205	146	166	145	150	190	190	213	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
188	5_19	228	236	185	205	146	152	150	154	190	192	209	217	99	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
189	5_20	228	236	193	203	146	152	154	154	190	190	209	215	99	131	'Grignan'	Negativna LOD vrijednost
190	5_22	228	236	162	185	146	152	150	174	192	198	213	215	99	131	'Sigoise'	LOD vrijednost ispod praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
191	5_23	228	236	193	205	146	166	150	174	192	198	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
192	5_24	228	236	185	207	146	166	133	150	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
193	5_25	228	236	162	193	152	184	133	150	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
194	5_26	228	236	162	193	146	146	133	150	190	192	213	215	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
195	5_27	228	236	162	185	146	168	133	154	190	192	215	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
196	5_28	228	236	193	203	146	152	133	150	190	192	217	217	99	135	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
197	5_29	228	236	185	205	146	166	133	150	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
198	5_30	228	236	185	197	152	152	133	154	192	198	215	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	Negativna LOD vrijednost
199	5_31	228	236	162	185	146	152	133	154	190	192	215	217	99	135	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
200	5_32	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	209	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	Negativna LOD vrijednost
201	5_33	228	236	185	205	146	184	133	150	190	192	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
202	5_34	228	236	185	193	146	152	133	150	190	192	217	219	99	135	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
203	5_35	228	236	185	205	146	184	133	150	190	192	215	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
204	5_36	228	236	193	205	152	166	133	150	190	198	215	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
205	5_37	228	236	185	205	146	186	133	150	190	192	209	217	131	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
206	5_38	228	236	185	205	146	166	133	150	190	198	215	217	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
207	5_39	228	236	193	195	146	152	133	150	190	198	215	217	131	145	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
208	5_40	228	236	162	193	136	146	133	150	190	192	215	217	131	131	'Fasolino'	Negativna LOD vrijednost
209	5_41	228	236	162	193	146	146	133	154	190	192	209	215	99	135	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
210	5_42	228	236	162	193	146	146	133	154	190	192	213	215	99	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
211	5_43	228	236	185	205	152	184	133	154	190	192	217	217	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
212	5_44	228	236	185	195	146	146	133	150	190	192	209	215	131	131	'Farga'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
213	5_45	228	236	162	185	146	166	133	150	190	192	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
214	5_46	228	236	162	185	146	146	133	150	190	192	213	215	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
215	5_47	228	236	185	205	152	152	133	150	190	192	213	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
216	5_48	228	236	162	185	152	166	133	150	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
217	5_49	228	236	185	207	146	146	133	150	190	192	215	217	131	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
218	5_50	228	236	185	205	152	184	133	154	190	192	213	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
219	5_52	228	236	185	203	152	184	133	154	190	192	209	215	99	131	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
220	5_53	228	236	162	185	132	152	133	150	190	192	215	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost ispod praga (1,11)
221	5_54	228	240	162	193	146	184	133	150	190	192	213	217	99	131	'Moraiolo'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
222	5_55	228	236	193	205	146	184	133	154	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
223	5_56	228	236	162	193	146	184	133	154	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
224	5_57	228	236	162	193	146	152	133	154	190	192	215	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
225	5_58	228	236	162	185	146	152	133	154	190	192	215	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
226	5_59	228	236	193	205	146	152	133	154	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
227	5_60	228	236	193	205	146	184	133	150	190	192	213	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
228	5_61	228	236	162	193	152	166	133	150	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
229	5_62	228	236	185	193	146	184	133	154	192	198	213	215	131	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
230	6_1	228	236	193	203	146	152	133	154	190	192	209	217	99	135	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
231	6_2	228	236	185	193	152	166	133	154	190	192	215	217	99	131	'Grignan'	Negativna LOD vrijednost
232	6_3	228	236	162	185	152	166	133	150	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
233	6_4	228	236	162	193	146	186	133	154	190	192	213	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
234	6_5	228	240	181	185	152	176	133	154	190	192	215	217	131	131	'Olivastra Seggianese'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
235	6_6	228	236	185	205	146	186	133	154	190	192	209	215	131	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
236	6_7	228	236	185	205	152	166	133	150	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
237	6_8	228	236	162	185	146	186	133	154	190	192	209	217	99	135	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
238	6_9	228	236	162	185	152	184	133	154	190	192	215	217	99	135	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
239	6_10	228	236	185	193	152	166	133	150	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
240	6_11	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
241	6_12	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	213	217	131	145	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
242	6_13	228	236	193	205	146	146	133	150	190	192	217	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
243	6_14	228	236	162	193	146	146	133	150	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
244	6_15	228	236	162	193	152	184	133	154	190	192	213	215	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
245	6_16	228	236	185	193	146	166	133	154	190	192	213	217	99	131	'Grignan'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
246	6_17	228	236	185	193	136	152	133	150	190	192	217	217	99	131	'Drobnica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
247	6_18	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
248	6_19	228	236	162	185	132	146	133	150	190	192	213	217	99	135	‘Cipressino’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
249	6_20	228	236	185	185	132	152	133	150	190	192	213	215	131	131	‘Drobnica’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
250	6_21	228	236	185	205	146	186	133	150	190	192	215	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
251	6_22	228	236	185	193	146	152	133	150	190	192	209	217	99	135	‘Farga’	Negativna LOD vrijednost
252	6_23	228	236	185	193	146	146	133	154	190	192	213	217	99	131	‘Drobnica’	Negativna LOD vrijednost
253	6_24	228	236	185	205	146	186	133	154	190	192	215	217	99	135	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
254	6_25	228	236	193	205	152	184	133	154	192	192	217	217	131	145	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
255	6_26	228	236	193	203	152	166	133	150	190	192	213	217	99	131	‘Oblica’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
256	6_27	228	236	162	193	146	186	133	154	190	192	213	217	99	131	‘Olivastra Seggianese’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
257	6_28	228	236	162	185	146	184	133	150	190	192	209	217	99	131	‘Levantinka’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
258	6_29	228	236	162	185	146	186	133	150	190	192	213	217	131	131	‘Olivastra Seggianese’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
259	6_30	228	236	162	193	146	186	133	150	190	192	209	215	99	131	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
260	6_31	228	236	193	205	146	152	133	150	190	192	209	215	99	135	‘Fasolino’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
261	6_32	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	217	217	99	131	‘Koroneiki’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
262	6_33	228	236	185	193	146	152	133	150	192	192	215	215	131	131	‘Farga’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
263	6_34	228	236	162	193	152	166	133	154	190	192	215	217	131	131	‘Levantinka’	Negativna LOD vrijednost
264	6_35	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	209	217	99	131	‘Koroneiki’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
265	6_36	228	236	185	193	146	152	133	150	190	192	209	217	131	131	‘Farga’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
266	6_37	228	236	162	185	146	152	133	154	190	192	209	217	99	131	‘Olivastra Seggianese’	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
267	6_38	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	215	217	99	135	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
268	6_39	228	236	185	193	146	152	133	150	190	192	215	217	99	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
269	6_40	228	236	162	193	146	166	133	154	190	192	215	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
270	6_41	228	236	185	205	146	186	133	154	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
271	6_42	228	236	162	185	146	166	133	154	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
272	6_43	228	236	193	203	146	152	133	150	190	192	215	217	131	145	'Oblica'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
273	6_44	228	236	193	205	152	166	133	150	190	192	213	215	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
274	6_45	228	236	193	205	146	166	133	150	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
275	6_46	228	236	193	195	146	152	133	150	190	192	209	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
276	6_47	228	236	185	205	146	166	133	154	190	192	213	217	99	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
277	6_48	228	236	193	203	146	152	133	150	190	192	217	217	131	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
278	6_49	228	236	181	193	136	152	133	150	190	192	215	215	131	131	'Favarol'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
279	6_50	228	236	185	195	146	152	133	154	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
280	6_51	228	236	162	193	152	166	133	150	190	192	217	217	99	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
281	6_52	228	236	185	195	146	152	133	150	190	192	217	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
282	6_53	228	236	193	203	146	152	133	150	190	192	209	217	99	131	'Koroneiki'	Negativna LOD vrijednost
283	6_54	228	236	185	205	146	152	133	150	190	192	209	217	99	131	'Fasolino'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
284	6_55	228	236	185	205	152	166	133	150	190	192	217	217	131	131	'Levantinka'	Negativna LOD vrijednost
285	6_56	228	236	162	185	146	152	133	150	190	192	215	217	99	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

Broj uzorka	Oznaka uzorka	DCA3	DCA3	DCA9	DCA9	DCA11	DCA11	DCA16	DCA16	GAPU101	GAPU101	EMO3	EMO3	UDO99-19	UDO99-19	Stvarni roditelj	LOD vrijednost
286	6_57	228	236	193	203	146	146	133	150	190	192	215	217	131	131	'Koroneiki'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
287	6_58	228	236	185	193	146	146	133	150	190	192	215	217	131	131	'Drobnica'	Negativna LOD vrijednost
288	6_59	228	228	193	203	0	0	133	154	190	198	206	217	131	131	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
289	6_60	228	228	185	203	152	152	133	150	190	198	206	215	131	131	'Karbunčela'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)
290	2_51	228	236	185	193	152	166	154	174	190	190	211	217	131	131	'Levantinka'	LOD vrijednost poviše praga (1,11)

Ocjena rada u tijeku!

11. ŽIVOTOPIS

Marina Raboteg Božiković rođena je 04. veljače 1993. godine u Splitu. Nakon završene I. gimnazije u Splitu, upisala je preddiplomski i dipomski studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu. Diplomski rad pod naslovom „Hidroksilamin kao akceptor aminoacilne skupine kod adenilacijske domene tirocidin-sintetaze 1“ obranila je krajem 2016. godine. Tijekom studija ostvarila je više stipendija u kategoriji izvrsnosti, a 2017. godine, u sklopu Erasmus+ stručne prakse, boravila je Institutu za biomedicinska istraživanja u u Barceloni (IRB Barcelona), gdje je bila uključena u znanstveni rad iz molekularne biologije. Po povratku, radila je kao nastavnica iz prirode, biologije i kemije u osnovnoj školi te kao vanjski suradnik-asistent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu na kolegijima “Analitičke metode”, “Organska kemija“, „Kemija nutrijenata“ u okviru studija „Biologije i Kemije“ te studija „Nutricionizma“. Krajem 2018. godine zaposlila se kao asistent na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu na zavodu za Biljne znanosti pod vodstvom dr. sc. Gabriele Vuletin Selak. Paralelno je upisala poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Dobitnica je stipendije Veleposlanstva Francuske Republike u Republici Hrvatskoj (2019./2020.) te kratkoročne stipendije Federacije europskih društava za biljnu biologiju (*engl.* Federation of European Societies of Plant Bilogy, FESPB) u 2021. godini, zahvaljujući kojima se usavršavala na Sveučilištu u Lyonu (Laboratory Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557). Osim toga, tijekom 2020. i 2021. godine, boravkom na Sveučilištu u Primorskoj, na Institutu za mediteransku poljoprivredu i maslinarstvo, stekla je iskustvo u upotrebi molekularnih biljega u određivanju roditeljstva iz embrija masline. Sljedeće dvije godine (2022.-2023.) provela je na rodiljnom dopustu. Suradnica je na ukupno devet znanstvenih i stručnih projekata, domaćih i međunarodnih.

<u>Popis objavljenih publikacija:</u>

1. Cuevas, J., Chiamolera, F. M., Pinillos, V., Rodríguez, F., Salinas, I., Cabello, D., Baruca Arbeiter, A., Bandelj, D., Raboteg Božiković, M., Vuletin Selak, G. (2024a) Arbosana olive is self-incompatible, but inter-compatible with some other low-vigor olive cultivars. *Horticulturae* **10**, 739.

2. Cuevas, J., Chiamolera, F. M., Pinillos, V., Rodríguez, F., Salinas, I., Cabello, D., Baruca Arbeiter, A., Bandelj, D., Raboteg Božiković, M., Vuletin Selak, G. (2024b) Backcrossing

Ocjena rada u tijeku!

Failure between Sikitita Olive and Its Male Parent Arbequina: Implications for the Self-Incompatibility System and Pollination Designs of Olive Orchards. *Plants* **13**, 2872.

3. Rafels-Ybern, À., Torres, A.G., Camacho, N., Herencia-Ropero, A., Frigolé, H.R., Wulff, T.F., Raboteg, M., Bordons, A., Grau-Bové, X., Ruiz-Trillo, I., Ribas de Pouplana, L. (2019) The expansion of inosine at the wobble position of tRNAs and its role in the evolution of proteomes. *Mol. Biol. Evol.* **36**, 650–662.

4. Vuletin Selak, G., Baruca Arbeiter, A., Cuevas, J., Perica, S., Pujić, P., Raboteg Božiković, M., Bandelj, D. (2021) Seed paternity analysis using SSR markers to assess successful pollen donors in mixed olive orchards. *Plants* **10**, 2356.

5. Vuletin Selak, G. *, Raboteg Božiković*, M., Abrouk, D., Bolčić, M., Žanić, K., Perica, S., Normand, Pujić, P. (2022) *Pseudomonas* ST1 and *Pantoea* Paga strains cohabit in olive knots. Microorganisms **10**, 1529.

6. Vuletin Selak, G., Raboteg, M., Dubost, A., Abrouk, D., Žanić, K., Normand, P., Pujić, P. (2019) Whole-genome sequence of a *Pantoea* sp. strain isolated from an olive (*Olea europaea* L.) knot. *Microbiol. Resour. Announc.* **8**, e00978–19.

7. Vuletin Selak, G., Raboteg, M., Fournier, P., Dubost, A., Abrouk, D., Žanić, K., Perica, S., Normand, P., Pujić, P. (2019) Genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain ST1, isolated from olive (*Olea europaea* L.) knot galls in Croatia. *Microbiol. Resour. Announc.* **8**, e00986–19.

* dijeljeno prvo autorstvo

Predavanja i sudjelovanja na skupovima:

Raboteg, M.,Vuletin Selak, G., Bolčić, M., Perica, S., Pujic, P., Žanić, K. (2024) Nove spoznaje u detekciji i suzbijanju uzročnika raka masline. 26. Međunarodna manifestacija maslinara i uljara Noćnjak;

Jukić Špika, M., Radunić, M., Vuletin Selak, G., Tadić, J., Raboteg Božiković, M., Žanić, K., Žanetić, M., Perica, S. (2023) Diversity assessment of virgin olive oils from Croatian cultivated and wild olives by their chemical traits. Knjiga sažetaka - IX International Olive Symposium, Davis (CA), USA, str. 45-46 (poster);

Vuletin Selak, G., Liber Z., Jukić Špika, M., Miazzi, M.M., Raboteg Božiković, M., Radunić, M., Baruca Arbeiter, A., Bandelj, D., Tadić, J., Perica, S. (2023) SSR markers in traceability of

Ocjena rada u tijeku!

Croatian virgin olive oils. Knjiga sažetaka - IX International Olive Symposium, Davis (CA), USA, str. 1 (poster);

Predavanje "Genska ekspresija tijekom kompatibilnih i nekompatibilnih reproduktivnih procesa u cvijetu masline". Hrvatsko društvo za biljnu biologiju, 25.05.2023.;

Vuletin Selak, G., Radunić, M., Tadić, J., Jukić Špika, M., Žanetić, M., Raboteg Božiković, M., Perica, S. (2022) Genetic and phenotypic diversity of Croatian olive germplasm. Knjiga sažetaka - International Conference on Biodiversity and Molecular Plant Breeding. str. 2 (predavanje);

Predavanje "Uzročnici, prijenosnici, prevencija i bio-kontrola raka masline" u okviru projekta "Poboljšanje konkurentnosti maslinarske proizvodnje na programskom području kroz prekograničnu suradnju" (*engl*. Enhancing competitiveness of olive production in the program area through cross border cooperation), edukacije za maslinare, Split, 15.-16.10.2021.;

Raboteg, M., Glavinović, V., Klepo, T., Vuletin Selak, G. (2020). Reproduktivne značajke kultivara masline. Zbornik sažetaka 55. hrvatskog i 15. međunarodnog simpozija agronoma, Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 267-268. (predavanje);

Raboteg, M.; Glavinović, V., Klepo, T., Vuletin Selak, G. Vrijeme cvjetanja i sterilnost cvjetova različitih sorti maslina. 8. Hrvatski kongres studenata Doktorskog studija Molekularne bioznanosti, 03. listopada 2020, KKD Ivana Brlić Mažuranić, Slavonski Brod;

Raboteg, M., Vuletin Selak, G., Mandušić, M.; Perica, S., Pujic, P., Žanić, K. (2020) Uzročnici, prijenosnici, prevencija i bio-kontrola raka masline u maslinicima Splitsko-dalmatinske županije. 22. Međunarodna manifestacija maslinara i uljara Noćnjak;

Klepo, T., Radunić, M., Vuletin Selak., G., Raboteg, M., Glavinović, V. Potential of wild olives grown in Croatia (Potencijal divljih maslina u Republici Hrvatskoj). 14th Scientific and Expert Conference of Croatian fruit growers with International Participation, Tuheljske toplice, Hrvatska, 20.-21.11. 2019;

<u>Radionice/popularizacija znanosti:</u>

Sudjelovanje u organizaciji i provedbi aktivnosti u sklopu projekta Reconnect Science With The Blue Society - Blue- connect 2.0, 2024./2025.;

Ocjena rada u tijeku!

Sudjelovanje u organizaciji i provedbi aktivnosti u sklopu projekta Reconnect Science With The Blue Society (Blue-connect) (Noć istraživača) Potpora: Horizon Europe, MSCA, 2022./2023.;

Znanstveno popularno predavanje na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, Pujić. P.; Vuletin Selak, G.; Raboteg Božiković, M. "Sva bogatstva suradnje ostvarena kroz znanstvene projekte“, 2021.;

Radionica „Fenotipizacija visoke propusnosti“ („Workshop High throughput Plant Phenotyping“) Zagreb, Hrvatska, 28.-29.10.2021.;

Predavanje “Sve boje bolesti raka masline“ na 17. Festivalu znanosti održanom od 08.-13. travanja 2019. godine;

Sudjelovanje u ljetnoj školi „Primjena mikroskopijskih tehnika u prorodnim znanostima“ (Split Summer School „Application of Imaging Techniques in Life Sciences“), Split, 2.-6. rujna 2019.;

Provedba aktivnosti i predavanja u sklopu projekta Reconnect Science With The Blue Society (Blue-connect) (Noć istraživača) Potpora: Horizon Europe, MSCA 2018./2019.

Ocjena rada u tijeku!