

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Josip Tadić

**Otpornost divljih i kultiviranih genotipova masline na povišeni
salinitet i sušu**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Josip Tadić

**Otpornost divljih i kultiviranih genotipova masline na povišeni
salinitet i sušu**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2022.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

University of Dubrovnik

Ruđer Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study Molecular
Biosciences

Josip Tadić

**Resistance of wild and cultivated olive genotypes to increased
salinity and drought**

DOCTORAL THESIS

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Josip Juraj Strossmayer Sveučilište u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstveno polje: biologija, poljoprivreda

Doktorska disertacija

OTPORNOST DIVLJIH I KULTIVIRANIH GENOTIPOVA MASLINE NA POVIŠENI SALINITET I SUŠU

Josip Tadić

Disertacija je izrađena u: Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Sandra Radić Brkanac

Mentor: Prof.dr.sc. Zlatko Liber

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj abiotičkih stresova povišenog saliniteta i suše na divlje i kultivirane masline te povezati morfološke, fiziološke i biokemijske promjene uvjetovane stresom s potvrđenom genetskom specifičnošću kultiviranih i divljih maslina. Analizom uzoraka identifikacijom alela 12 SSR-lokusa potvrđeno je bogatstvo germplazme hrvatskih autohtonih divljih i kultiviranih maslina. Dužina, suha masa izboja te površina lista signifikantni su morfometrijski pokazatelji razine stresa. Genotipovima osjetljivim na povišeni salinitet potrebno duže vrijeme za akumulaciju Na⁺ i Cl⁻ do stabilne razine nego genotipovima otpornim na povišeni salinitet. Relativan sadržaj K⁺ u korijenu signifikantno se smanjio u gotovo svakom promatranom genotipu neovisno o primjenjenom tretmanu. Aktivnosti enzima SOD, sadržaju klorofila *a* i koncentracija prolina sugeriraju da ti parametri mogu poslužiti kao indikatori abiotskog stresa povišenog saliniteta, a posebice stresa suše. Genotipovi LA 13, PLJ 18 i PLJ 7 svojim kontinuirano zadovoljavajućim rezultatima morfometrijskih mjerenja i biokemijskih analiza, zaslužuju daljnja istraživanja na bazi genotipske karakterizacije.

Broj stranica: 145

Broj slika: 28

Broj tablica: 22

Broj literaturnih navoda: 144

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: maslina, abiotski stres, salinitet, suša, otpornost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences
Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Field: Biology, agronomy

PhD Thesis

RESISTANCE OF WILD AND CULTIVATED OLIVE GENOTYPES TO INCREASED SALINITY AND DROUGHT

Josip Tadić

Thesis performed at: Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation

Supervisor: Ph.D. Sandra Radić Brkanac, Associate Professor

Supervisor: Ph.D. Zlatko Liber, Full Professor

Short Abstract:

The aim of the research is to determine the impact of abiotic stresses of increased salinity and drought on wild and cultivated olives and to link the morphological, physiological and biochemical changes caused by the stress with the confirmed genetic specificity of cultivated and wild olives. Analysis of samples and identification of alleles of 12 SSR loci confirmed the richness of the germplasm of Croatian autochthonous wild and cultivated olives. The length, dry weight of shoots and leaf surface are significant morphometric indicators of stress level. Genotypes sensitive to increased salinity need a longer time to accumulate Na⁺ and Cl⁻ to a stable level than genotypes resistant to increased salinity. The relative content of K⁺ in the roots decreased significantly in almost every observed genotype, regardless of the applied treatment. SOD enzyme activity, chlorophyll a content and proline concentration suggest that these parameters can serve as indicators of abiotic stress of elevated salinity, and especially drought stress. The genotypes LA 13, PLJ 18 and PLJ 7, with their continuously satisfactory results of morphometric measurements and biochemical analyses, deserve further research based on genotypic characterization.

Number of pages: 145

Number of figures: 28

Number of tables: 22

Number of references: 144

Original in: Croatian

Key words: olive, abiotic, salinity, drought, resistance

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, UI. 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

ZAHVALA

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	3
3. PREGLED LITERATURE	4
3.1. Maslina na Mediteranu	4
3.1.1. Izazovi uzgoja masline.....	7
3.1.2. Posljedice klimatskih promjena	9
3.1.2.1. Dugotrajna sušna razdoblja	10
3.1.2.2. Povećanje saliniteta tla i vode	11
3.2. Maslina u uvjetima abiotskog stresa povišenog saliniteta i suše.....	13
3.2.1. Osmotski stres	14
3.2.2. Oksidativni stres.....	16
3.2.3. Ionski stres	17
3.3. Molekularni pristup u istraživanju raznolikosti biljnih genetičkih izvora.....	20
3.3.1. Genetički biljezi	20
3.3.2. Mikrosateliti	21
4. MATERIJAL, METODE I PLAN ISTRAŽIVANJA.....	23
4.1. Biljni materijal.....	23
4.1.1. Ukorijenjivanje reznica i presađivanje sadnica.....	25
4.1.2. Priprema sadnica za provedbu eksperimenta	26
4.1.3. Eksperimentalni objekt i sustav za fertirigaciju.....	27
4.1.4. Priprema hranjive otopine za proces aklimatizacije i tretmane	28
4.1.5. Primijenjeni tretmani i eksperimentalni dizajn	28
4.2. Morfometrijska mjerenja	30
4.3. Fiziološki parametri	31
4.4. Genetska raznolikost.....	34
4.4.1. Izolacija ukupne stanične DNA	34
4.4.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA.....	35
4.4.3. Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimeraze.....	35
4.4.4. Detekcija mikrosatelitnih alela elektroforezom u agaroznom gelu	36
4.4.5. Detekcija mikrosatelitnih alela kapilarnom elektroforezom.....	37
4.4.6. Statistička obrada molekularno-genetskih podataka.....	37
4.5. Biokemijske analize.....	39

4.5.1. Priprema ekstrakata za mjerenje ukupnih topivih proteina, aktivnosti enzima i koncentracije MDA.....	39
4.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih topivih proteina.....	40
4.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	40
4.5.4. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaza	42
4.5.5. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA).....	43
4.5.6. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata.....	44
4.5.7. Određivanje koncentracije aminokiseline prolina.....	45
4.6. Statistička analiza za morfometrijske, fiziološke i biokemijske parametre.....	46
5. REZULTATI.....	47
5.1. Genetska raznolikost.....	47
5.1.1. Genetska udaljenost i klaster analiza	50
5.1.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA).....	52
5.1.3. Populacijska struktura	53
5.2. Morfometrijska mjerenja	57
5.2.1. Relativna dužina izboja izdanka	58
5.2.2. Relativna površina lista izboja.....	60
5.2.3. Relativna suha masa izboja izdanka	62
5.2.4. Relativna površina izboja, promjer izboja i suha masa korijena	64
5.3. Sadržaj iona u listu i korijenu masline.....	69
5.3.1. Relativan sadržaj natrija u listu izboja	69
5.3.2. Relativan sadržaj natrija u korijenu	71
5.3.3. Relativan sadržaj klora u listu.....	73
5.3.4. Relativan sadržaj klora u korijenu	75
5.3.5. Relativan sadržaj iona magnezija, kalcija i kalija te curenje kalija u listu.....	77
5.3.6. Relativan sadržaj iona magnezija, kalcija i kalija u korijenu.....	83
5.4. Biokemijske analize.....	89
5.4.1. Relativna aktivnost superoksid dismutaze	89
5.4.2. Relativna aktivnost gvajakol peroksidaze.....	91
5.4.3. Relativan sadržaj malondialdehida	93
5.4.4. Relativan sadržaj prolina.....	95
5.4.5. Relativan sadržaj fotosintetskih pigmenata	97
6. RASPRAVA.....	101
6.1. Genetska raznolikost.....	101

6.2. Morfometrijska mjerenja	104
6.3. Sadržaj iona u listu i korijenu masline.....	106
6.4. Biokemijske analize.....	110
7. ZAKLJUČCI.....	116
8. LITERATURA.....	119
9. SAŽETAK.....	135
10. SUMMARY	138
11. ŽIVOTOPIS	141
12. PUBLIKACIJE I SIMPOZIJI	142
13. PRILOZI.....	145

1. UVOD

Područje Mediterana karakteristično je po malim količinama padalina, visokoj sunčevoj radijaciji i visokim temperaturama, što vegetaciju tog područja čini osjetljivijom na sušu i na klimatske promjene (Brito i sur., 2019). Kultivirana maslina (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) se odlikuje kulturnom i ekonomskom važnošću kao jedna od najstarijih poljoprivrednih kultura na Mediteranu (Belaj i sur., 2011). Pretpostavlja se da je selekcija masline neovisno započela u svakom naseljenom području što je rezultiralo velikim brojem kultivara (Lavee, 2013). Belaj i sur. (2011) navode kako se osim kultivirane masline za istraživanje i oplemenjivanje koriste i divlje masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*).

Genetska raznolikost divljih maslina nadmašuje onu pronađenu kod kultiviranih, a bogatstvo germplazme kultiviranih maslina smatra se jedinstvenim slučajem u hortikulturnoj praksi (Leon i sur., 2018). Opis i procjena morfoloških i agronomskih svojstava tradicionalan je postupak prilikom odabira roditeljskih genotipova u svrhu križanja (Belaj i sur., 2011). Pretpostavlja se da je nasljednost mnogih kvantitativnih morfoloških i agronomskih svojstava uglavnom niska zbog velikog utjecaja okolišnih uvjeta na ekspresiju svojstava (Lavee, 2013). Stoga se uz opis i procjenu svojstava koriste i molekularni biljezi u svrhu procjene genetske raznolikosti i utvrđivanja srodstvenih odnosa. Potomstvo dobiveno križanjem divljih i kultiviranih maslina ima kraći juvenilni period, brojniju cvatnju od potomstva kultiviranih maslina te bolje podnose različite stresove (Leon i sur., 2018).

Maslina se smatra srednje otpornom biljnom vrstom na sušu i na povišeni salinitet u tlu (Chartzoulakis, 2005). Prinos najviše ovisi o jesenskim/proljetnim padalinama čija je značajna uloga u ispiranju akumulirane soli u dublje slojeve tla, što biljci omogućuje novi sezonski porast (Melgar i sur., 2009). Padaline i temperatura ključni su čimbenici za određivanje zemljopisnog područja uzgoja maslina, koje je gotovo ograničeno na sušna područja, blagih zima i umjerenih količina padalina (Gucci i Caruso, 2011). Abiotski stresovi povišenog saliniteta i dugotrajne suše sve više postaju problemi u modernim nasadima, gustog sklopa, gdje je evapotranspiracijska potražnja visoka i gdje se manje kvalitetna voda (bočata ili slana) upotrebljava za navodnjavanje kao i korištenje vodotopivih hraniva. Usprkos prilagodbi svih organa biljke na prirodno nepovoljne uvjete Mediteranskog područja (Rapoport i sur., 2016), abiotički stresovi ostaju ograničavajući faktor vegetativnog rasta i prinosa (Gucci i Caruso,

2011). Vodni stres kao rezultat dugotrajnih suša i smanjene količine padalina postaje sve veći problem za prirodne ekosustave i usjeve zbog degradacije zemljišta i procesa dezertifikacije Mediterana koji se već odvija u južnim dijelovima Europe i sjeverne Afrike (Gao i Giorgi, 2008; Hoerling i sur., 2012). Zbog toga je Mediteranu dodijeljena titula „žarišta klimatskih promjena (Schneider, 2011).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja doktorskog rada je utvrditi utjecaj abiotičkih stresova povišenog saliniteta i suše na divlje (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) i kultivirane masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*).

Glavni cilj ostvariti će se kroz sljedeće pod-ciljeve:

- utvrditi utjecaj povišenog saliniteta i suše na morfološke i fiziološke pokazatelje sadnica maslina
- utvrditi utjecaj povišenog saliniteta i suše na biokemijske pokazatelje
- povezati morfološke, fiziološke i biokemijske promjene uvjetovane stresom s potvrđenom genetskom specifičnošću kultiviranih i divljih maslina

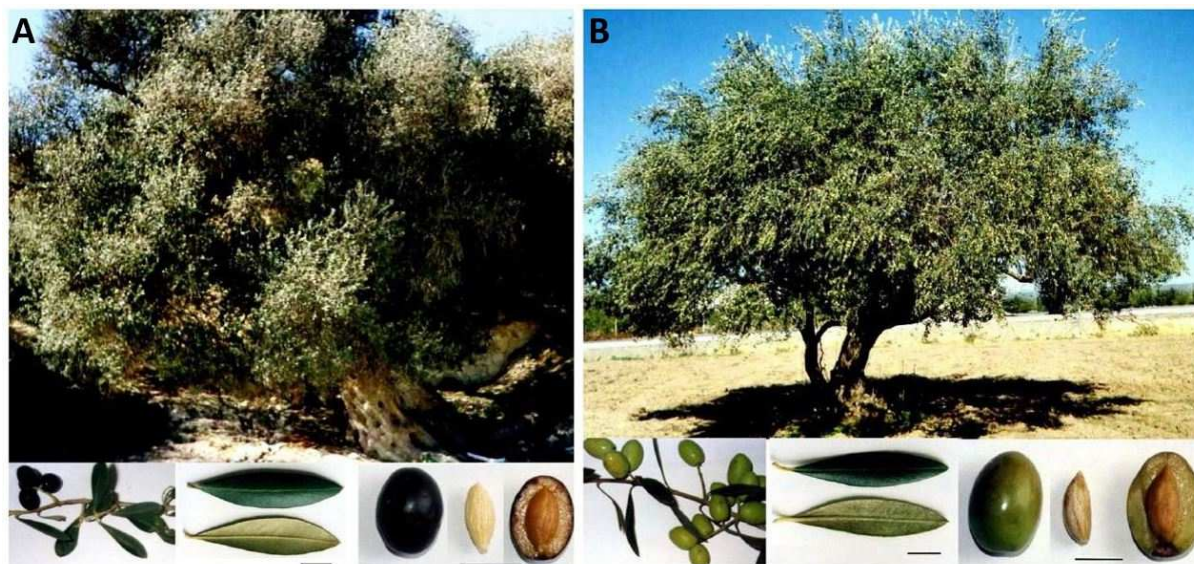
3. PREGLED LITERATURE

3.1. Maslina na Mediteranu

Maslina (*Olea europaea* L.) je srednje velika zimzelena stablašica koja prirodno raste u suhim i manje povoljnim uvjetima Mediteranskog područja (Rapoport i sur., 2016; Besnard i sur., 2018). Krošnja je asimetrična s nasuprotno raspoređenim kožnatim listovima s kratkom peteljkom. Lice lista je glatko, tamno zelene boje, dok je naličje srebreno-sive boje gusto prekriveno dlakama. Cvat masline raste iz pazušca lista s prosječno 25 cvijetova; cvijet je radijalno simetričan, dvospolan ili muški sa sterilnim tučkom (Free, 1993). Morfološka sterilnost cvijeta manifestira se kao nepotpuno razvijena plodnica smanjujući mogućnost samooprašivanja maslina preferirajući druge kultivare za redovitu rodnost u maslinicima (Benčić, 1991). Kao drvenasta kultura maslina je karakteristična po jako dugom juvenilnom periodu (od 10 do 15 godina kod normalnih uvjeta uzgoja), nakon čega stablo ima mogućnost cvjetanja odnosno generativnog razmnožavanja.

Svi organi biljke od kore, listova, ploda i korijena strukturno su građeni kao kserofiti što im omogućava manji gubitak vode u nepovoljnim uvjetima (Rapoport i sur., 2016). Maslina pripada porodici Oleaceae s ukupno 29 rodova i više od 600 vrsta stablašica (Besnard i sur., 2009). Vrsta *Olea europaea* L. trenutno ima šest podvrsta (Zohary, 1994; Green, 2002), a njihova in-situ distribucija na Mediteranu prikazana je na slici 2.

Sve podvrste su sve diploidne, osim subsp. *maroccana* (6x) i *cerasiformis* (4x) koje su poliploidne (Besnard i sur., 2008). Kod podvrste *Olea europaea* subsp. *europaea* razlikujemo dva varijeteta iste vrste identičnog broja kromosoma ($2n=46$, Green, 2002), kultivirane masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) i divlje masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Podaci jezgrene i kloroplastne DNA ukazuju da je glavni predak kultivirane masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) (Angiolillo i sur., 1999; Besnard i sur., 2007) izvorno divlja samonikla mediteranska maslina poznatija pod nazivom oleaster (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) (Slika 1).



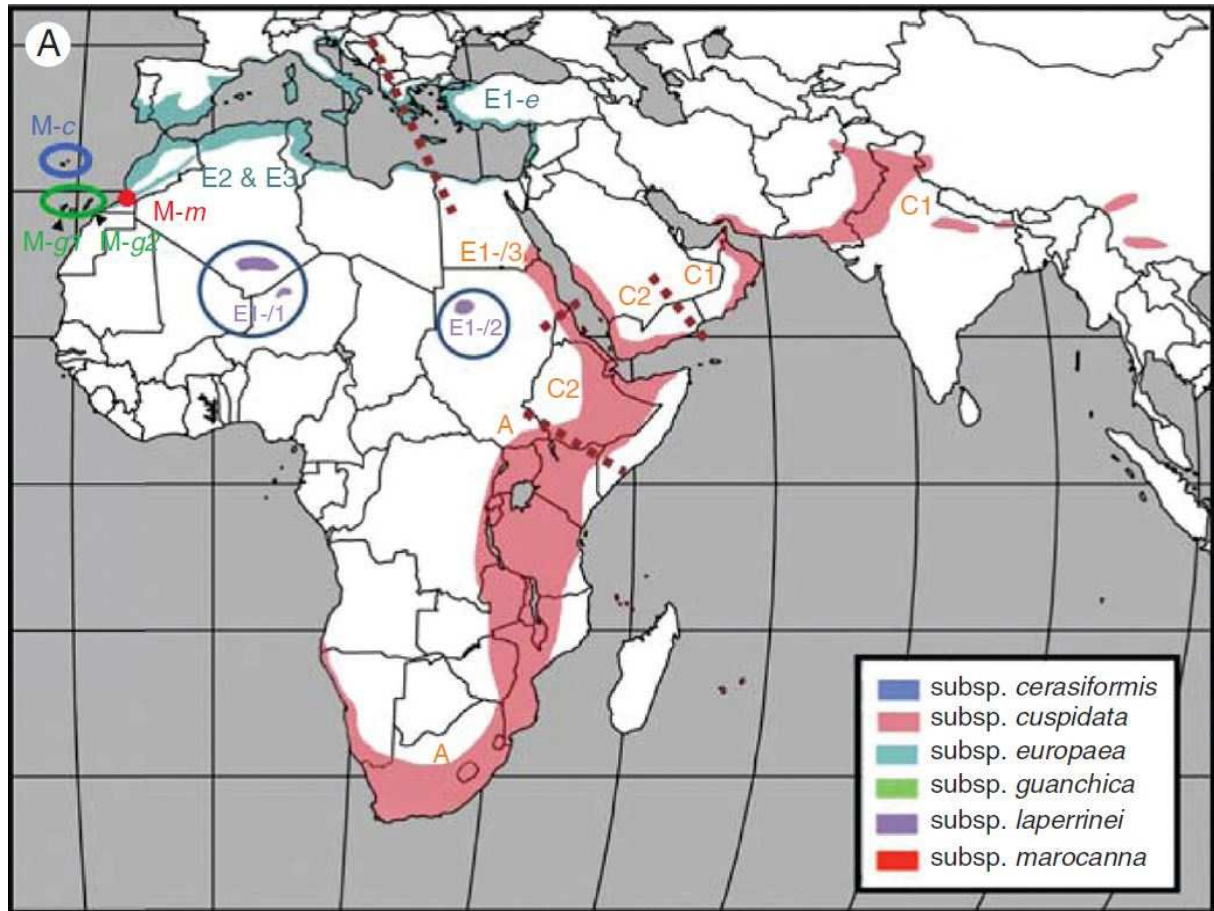
Slika 1: Divlja maslina *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (A) i kultivirana maslina *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea* (B) (preuzeto od Hannachi i sur., 2017). Crtica označava duljinu od 1 cm.

O podrijetlu, širenju i rasprostranjenosti divljih i kultiviranih maslina dvije su teorije: monocentrična i multicentrična (Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007; Besnard i sur., 2016, 2018). Monocentrična teorija pretpostavlja da su izvorno divlje masline oleasteri rasprostranjene samo u istočnom Sredozemlju, dok su divlje masline u zapadnom dijelu Mediterana sjemenjaci kultiviranih maslina istočnog Sredozemlja ili sjemenjaci križanja tih kultivara i autohtonih divljih maslina poznati kao olivasteri (Angiolillo i sur., 1999; Lumaret i sur., 2004). Prema multicentričnoj teoriji izvorno divlje masline oleasteri prisutni su u cijelom Mediteranu i postoji mogućnost da su neki kultivari nastali udomaćivanjem i selekcijom lokalnih divljih maslina (Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007; Klepo, 2014; Besnard i sur., 2016, 2018).

Bolja produktivnost, veća dimenzija ploda, veći udio ulja u plodu kao i otpornost na nepovoljne okolišne uvjete osnovna su agronomska svojstva na temelju kojih se pretpostavlja da su izdvojene iznadprosječne jedinice iz populacija divljih maslina koje nazivamo kultivarima (Barranco, 2008; Besnard i sur., 2013; Lavee, 2014).

Multicentrična teorija podržana je analizom mikrosatelitnih biljega i rezultatima prijašnjih neovisnih istraživanja. Danas razlikujemo tri genetska centra kultiviranih maslina koje odgovaraju trima zemljopisnim područjima: zapadni Mediteran Q1, središnji Mediteran Q2 i istočni Mediteran Q1 i dva genetska centra divljih maslina zapadnog Mediteranskog bazena

WW i istočnog Mediteranskog bazena WE (Besnard i sur., 2001b, 2013b, 2018; Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007, 2011; Díez i sur., 2014).



Slika 2: Prirodna distribucija podvrsta *Olea europaea* L. (Preuzeto i prilagođeno od Besnard i sur., 2018).



Slika 3: Gen centri divljih maslina (slika lijevo) i gen centri kultiviranih maslina (desno) (Preuzeto od Besnard i sur., 2018).

3.1.1. Izazovi uzgoja masline

Kultivirana maslina se u svijetu uzgaja na 10 578 246 hektara s godišnjom proizvodnjom od 19 464 495 tona sa Španjolskom kao najvećim proizvođačem, dok se u Republici Hrvatskoj maslina uzgaja na 18 610 hektara i godišnjom proizvodnjom od 33 220 tona (FAOSTAT, 2019). Moderniji sustavi uzgoja maslina podrazumijevaju uzgoj u jako gustom sklopu (superintezivni nasad) s razmakom od 3-4 m između redova i 1-1,5 m unutar reda, što čini sklop od 1650 maslina/ha (De la Rosa i sur., 2014) sa sustavima navodnjavanja i prihrane vodotopivim gnojivima (www.agromillora.com).

Tradicionalni sustavi uzgoja masline polako se istiskuju, a samim time se ograničava broj kultivara koji se može prilagoditi modernim uzgojnim oblicima. Osim takve selekcije, širenjem uzgojnog područja na nove kontinente prvenstveno na Južnu Ameriku i Australiju na indirektan način potiče se sadnja komercijalno najisplativijih kultivara. Time se dodatno zanemaruje bogatstvo drugih manje poznatih lokalnih kultivara dovodeći do opasnosti od gubitka genetske raznolikosti. Klonska selekcija i potencijal kultivara ograničen je genetskom kompozicijom u kojoj su iznadprosječne jedinice genetski jako malo ili gotovo nepromijenjene od matičnog kultivara (Lavee, 2013).

Istraživanja provedena na divljim maslinama pokazala su poželjna agronomska svojstva koja su manje izražena kod kultiviranih maslina. Divlje masline pokazale su prilagodljivost na razne okolišne uvjete (Murrilo i sur., 2005), izvrsnu regeneracijsku sposobnost nakon požara ili smrzavanja (Mulas, 1999), dobru otpornost na gljivičnu infekciju verticiliozom (*Verticillium dahliae*, Kleb) i napad maslinine muhe (*Bactrocera oleae*, Rossi), kao i kraći juvenilni period (Baldoni i Belaj, 2009; Klepo i sur., 2013). Sve ove osobine čine divlje masline jako zanimljivim u budućim oplemenjivačkim programima.

Vremenski period potreban za dobivanje iznadprosječnih klonova (Slika 4) često je jako dug, od 20 do 30 godina, (Bellini i sur., 2008; Rallo i sur., 2018) te vrlo često izdvojeni klonovi ne postižu zadovoljavajuće rezultate (Lavee, 2013). Moderni oplemenjivački programi stoga se usredotočuju na pronalazak ili stvaranje kultivara sljedećih osobina:

- kratak juvenilni period
- smanjen vigor
- otpornost na abiotske i biotske stresove

Prema Lavee (2013), svaki oplemenjivački program mora se bazirati na dva osnovna principa (Slika 4):

1. jasan cilj koji se mora ispuniti oplemenjivačkim pothvatom,
2. definirani ili široki izvor genetskog materijala za ostvarenje cilja,

a što je navedeno u protokolu oplemenjivačkog programa maslina



Slika 4: Protokol oplemenjivačkog programa maslina (Rallo i sur., 2018).

Predpostavlja se da je problem što je nasljednost mnogih kvantitativnih morfoloških i agronomskih svojstava uglavnom niska tj. pod utjecajem okolišnih uvjeta (Lavee, 2013). Nekoliko programa oplemenjivanja kultiviranih maslina u Španjolskoj, Italiji i Izraelu dalo je određene rezultate vezane uz generativno razmnožavanje, međutim značajan heterosis kod novih kultivara nije zabilježen.

Abiotски stresovi povišenog saliniteta i dugotrajne suše sve više postaju problemi u modernim nasadima, gustog sklopa, gdje je evapotranspiracijska potražnja visoka i gdje se manje kvalitetna voda (bočata ili slana) upotrebljava za navodnjavanje i primjena vodotopivih hraniva. Usprkos prilagodbi svih organa biljke na prirodno nepovoljne uvjete mediteranskog područja

(Rapoport i sur., 2016), abiotički stresovi ostaju ograničavajući faktor vegetativnog rasta i prinosa (Gucci i Caruso, 2011).

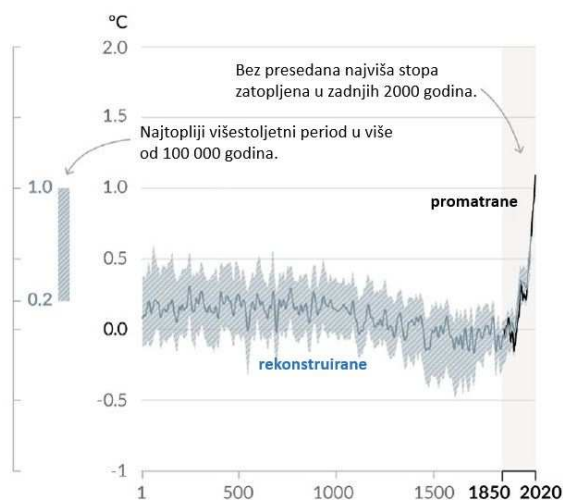
3.1.2. Posljedice klimatskih promjena

Područje Mediterana karakteristično je po visokoj sunčevoj radijaciji i visokim temperaturama, što vegetaciju tog područja čini osjetljivom na klimatske promjene (Brito i sur., 2019). Zbog sve veće međugodišnje varijabilnosti u količini oborina i dugih razdoblja s malom količinom padalina suše su sve češće u Mediteranu (Guevania i sur., 2016). Najnovije studije, koje su uključivale najsuvremenije modele praćenja klimatskih uvjeta, potvrdile su značajno povećanje učestalosti sušnih događaja. Prema svim pokazateljima ovaj trend je između ostalog i rezultat povećanja količine stakleničkih plinova uvjetovanih ljudskom aktivnošću (Hoerling i sur., 2012; Guevania i sur., 2016).

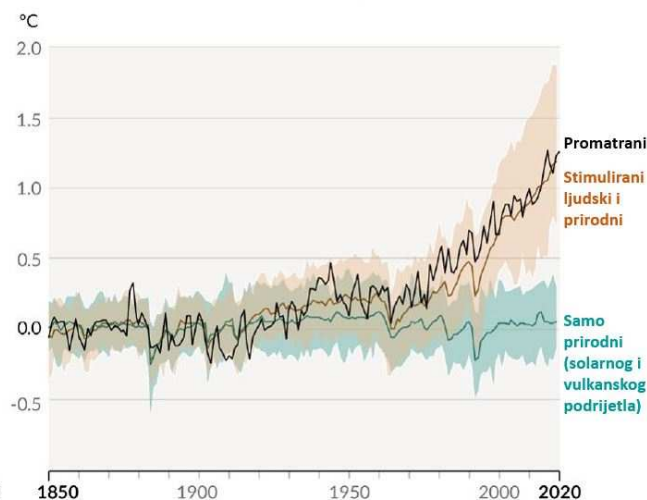
Prema Međuvladinom panelu o klimatskim promjenama (eng. Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC), klimatske promjene su bilo kakve promjene u statusu klime tijekom vremena s naglaskom na utjecaj ljudskih aktivnosti pored prirodne varijabilnosti klimatskih promjena (<https://www.ipcc.ch>). Klimatske su promjene postale „jedno od najozbiljnijih izazova s kojima se ljudi suočavaju u dvadeset prvom stoljeću” (Schneider, 2011). Opaženo povećanje koncentracije stakleničkih plinova od 1750. godine nedvojbeno su uzrokovane ljudskim aktivnostima. Prema petom izvješću od 2011. godine koncentracije stakleničkih plinova su se nastavile povećavati, dosegaši koncentracije koje nisu zabilježene na Zemlji u zadnjih 800 000 godina (IPCC 2021, 2021). Od 1850. godine posljednja četiri desetljeća (1981.-2021.) bila su toplija od bilo kojeg desetljeća koja su im prethodila (Slika 5).

Da bi se zadovoljila globalna potreba za hranom u svijetu do 2050. godine, poljoprivredna proizvodnja morala bi se povećati od 25% do 75% (Hunter i sur., 2017). Povećanja prinosa sa sobom vjerojatno nosi i povećanje poljoprivrednih površina koje trenutno nisu u upotrebi zbog dugotrajnih suša ili tala s povišenim salinitetom kao i upotrebu zaslanjene vode za navodnjavanje (Harper i sur., 2021). Salinizacija označava proces migracije vodotopivih soli od izvora soli do područja koja su izvorno bila bez soli (Matternicht, 2017; Oosterbaan, 2020). Dominacija zaslanjenih tala zabilježena je u sušnim i polusušnim područjima s malom količinom padalina (Matternicht, 2017) kao i u obalnim područjima gdje i uz veliku godišnju količinu padalina dolazi do zaslanjena tla zbog podizanja razine mora (Gould i sur., 2021).

a) Promjene u globalnim površinskim temperaturama (prosjek desetljeća) **rekonstruirane** (1.-2000.) i **promatrane** (1850.-2020.)



b) Promjene u globalnim površinskim temperaturama (prosjek godine) **promatrane** i **simulirane** koristeći **ljudske i prirodne** i **samo prirodne** faktore (1850.-2020.)



Slika 5: Promjene u globalnim površinskim temperaturama i mogući scenariji u budućnosti.

a) Promjene globalne površinske temperature rekonstruirane iz paleoklimatskih arhiva (puna siva linija, 1–2000) i **izravnih opažanja** (puna crna linija, 1850–2020) prema prosjeku desetljeća. Okomita traka s lijeve strane prikazuje procijenjenu temperaturu (*vrlo vjerojatan* raspon) tijekom najtoplijeg višestoljetnog razdoblja u najmanje posljednjih 100 000 godina, koje se dogodilo prije otprilike 6500 godina tijekom sadašnjeg međuglacialnog razdoblja (holocen). Posljednji međuglacial, prije oko 125 000 godina, sljedeći je najnoviji kandidat za razdoblje više prosječne temperature. Posljednja topla razdoblja bila su uzrokovana sporim (višemilenijskim) orbitalnim varijacijama. Sivo zasjenjivanje s bijelim dijagonalnim crtama prikazuje *vrlo vjerojatne* rasponse za rekonstrukciju temperature.

b) Promjene globalne površinske temperature u posljednjih 170 godina (crna linija) prema godišnjem prosjeku u usporedbi sa simulacijama klimatskih scenarija (slika 5a) temperaturnog odgovora na ljudske i na prirodne pokretače (smeđa), te samo na prirodne pokretače (solarna i vulkanska aktivnost, zelena). Pune boje pokazuju prosjek više modela, a obojene nijanse *vrlo vjerojatan* raspon simulacija (prilagođeno prema IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)). Cambridge University Press. In Press.

3.1.2.1. Dugotrajna sušna razdoblja

Dugotrajne suše na Mediteranu tijekom ljeta imaju najveći negativan utjecaj na vegetaciju, prinos kultiviranih biljnih vrsta te značajno pridonose gubitku površine pod šumama zbog pojačanog rizika od šumskih požara (Pellizzaro i sur., 2007; Schillinger i sur., 2008; Camarero i sur., 2013). Vodni stres kao rezultat dugotrajnih suša i smanjene količine padalina postaje sve veći problem za prirodne ekosustave i usjeve zbog degradacije zemljišta i procesa dezertifikacije. Budući da su ove pojave već odvijaju u južnim dijelovima Europe i sjeverne

Afrike (Gao i Giorgi, 2008; Hoerling i sur., 2012), Mediteranu je dodijeljena titula „žarišta“ klimatskih promjena (Schneider, 2011). Ukoliko se trend klimatskih promjena, odnosno globalnog zatopljenja nastavi predviđanja su da će Mediteran u budućnosti bilježiti najveća sušna razdoblja od svih 26 regija svijeta (Giorgi, 2006). Na području Mediterana je u razdoblju od 1990 do 2010 zabilježeno 10 od 12 najsušnijih zima u posljednjih 120 godina. Kao suprotnost tome u sjevernoj Europi se tijekom istog razdoblja povećala količina padalina (Hoerling i sur., 2012).

3.1.2.2. Povećanje saliniteta tla i vode

Definicija zaslanjenog tla je varijabla koja ovisi o korištenoj metodi mjerenja kao i državi u kojoj se mjerenje obavlja. Kroz prizmu omjera salinitet tla može označavati balans razlike unosa i iznosa vode i soli u profilu tla ili sistema tla (Harper i sur., 2021). Salinitet u poljoprivredi označava vrijednost topljivih soli u tlu ili otopini. Ne postoji univerzalna vrijednost koja označava nepogodne uvjete za hortikulturnu proizvodnju iz razloga što biljke imaju različite granične vrijednosti otpornosti na visoke koncentracije soli u tlu. Osim koncentracije važan faktor je prevladavajuća vrsta soli u tlu ili otopini jer sve soli nemaju jednako štetan utjecaj na biljke. Salinitet tla ovisi i o tipu tla. Čestice pijeska imaju veću sposobnost zadržavanja i adsorpcije iona od čestica gline što dovodi do povećane koncentracije soli u pjeskovitom tlu iako se radi o primjeni iste količine soli na obje vrste tla (Rhoades, 1996).

Za hortikulturnu proizvodnju postoje manje štetne soli poput: NaHCO_3 , MgCO_3 , $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$, CaSO_4 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, i više štetne soli: NaCl , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 (Matternicht, 2017). Procesi salinizacija mogu biti primarni ili prirodni (A) i sekundarni ili antropogeni (B) (Matternicht, 2017; Oosterbaan, 2020; Harper i sur., 2021; Yuvaraj i sur., 2021).

a) Primarni ili prirodni procesi salinizacije

U prirodni proces salinizacije uključeni su klimatski faktori poput visokih temperatura, male količine padalina, te dugotrajnih suša koje posljedično pridonose učinku evaporacije, povećavajući koncentraciju vodotopivih soli u svim profilima tla (Yuvaraj i sur., 2021). Prema FAO podacima (FAO; 2017) u zadnjih 100 godina razina mora se povećala za 16 do 21 cm, a prema šestom izvješću IPCC-a do 2100 godine predviđa se nastavak rasta razine mora za 61 do 110 cm (IPCC, 2021). Prirodno prodiranje podzemne slane ili umjereno zaslanjene vode ili mora u unutrašnjost ima za posljedicu kontakt s površinskom nezaslanjenom vodom, plitkim

rezervoarima nezaslanjene vode ili u ekstremnim slučajevima kontakt s profilom tla u zoni korijena biljaka (Mateo-Sagasta i Burke, 2010; de Louw i sur., 2011). Salinizaciji pridonosi i erozija i ispiranja matičnih stijena i minerala kao hidropedološki faktor te geomorfologija područja (Yuvaraj i sur., 2021). Obalna područja te područja nekoliko kilometara od mora su u visokom riziku od povišenog saliniteta i zbog posolice koja nastaje kao prirodna pojava podizanja kapljica mora vjetrom (Gould i sur., 2021).

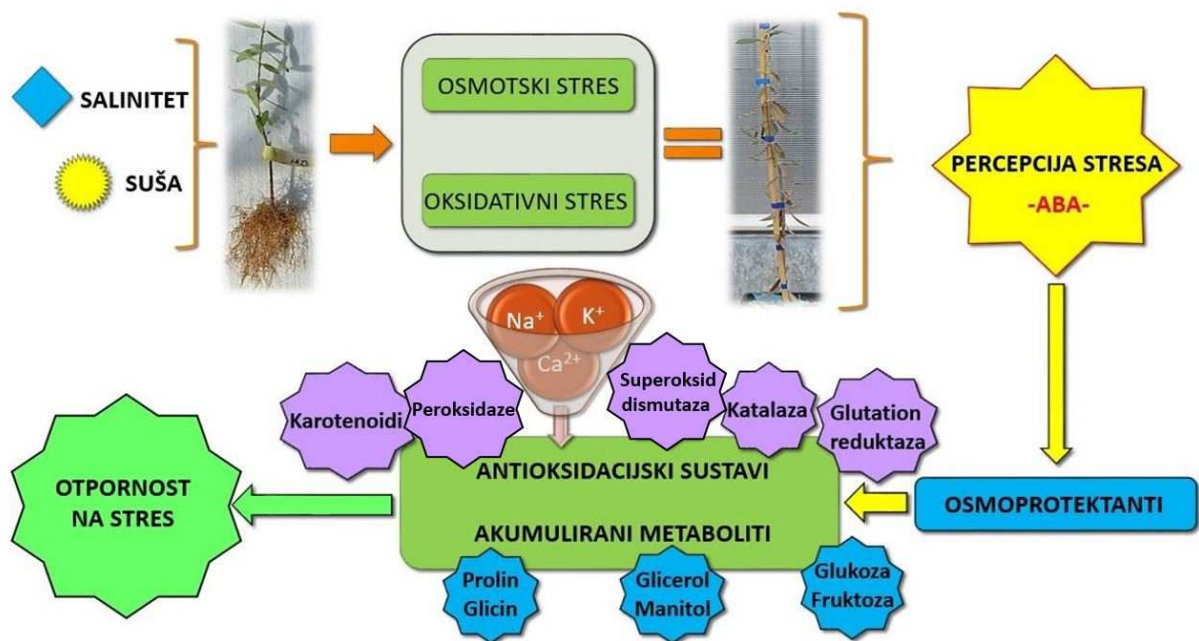
b) Sekundarni ili antropogeni procesi salinizacije

Pod sekundarne ili antropogene procese salinizacije većinom se uvrštavaju aktivnosti čovjeka koje na direktan ili indirektan način povećavaju salinitet tla. Razvijanje sustava navodnjavanja u sušnim područjima predstavlja doprinos globalnoj potrebi za hranom, međutim ovakvi sustavi se suočavaju s problemom povišenog saliniteta tla i vode. Zbog štetnog potencijala koji dovodi do smanjenja prinosa stupanj saliniteta vode je najvažniji parametar za određivanje kvalitete vode za navodnjavanje (Mateo-Sagasta i Burke, 2010).

Prema Oosterbaan (2020), indirektan način povećanja saliniteta tla je navodnjavanje nezaslanjenom, odnosno „slatkom vodom“. Naime nezaslanjena voda sadrži određenu količinu soli s prosječnom koncentracijom od 0,3 g/L vrijednosti oko 0,5 dS/m, te ukoliko se površina navodnjava s malom do prosječnom količinom „slatke vode“ od 10 000 m³/ha godišnje, unos soli u tlu može doseći 3 000 kg/ha. Ukoliko tlo nema mogućnost odvođenja ili drenaže viška vode, salinitet tla može se povećati evaporacijom vode te podizanjem podzemnih voda do mjere da se značajno smanji prinos uzgojne kulture. Kvalitetni drenažni sustav s odvodnjom od 10 do 20 % je primarna metoda kontrole saliniteta tla navodnjavanih površina (Oosterbaan, 2020). Međutim, najčešća aktivnost koja povećava salinitet tla u poljoprivrednoj proizvodnji je navodnjavanje manje kvalitetnom (drenažnom) ili slabo zaslanjenom (>2 dS/m) odnosno boćatom vodom (Matternicht, 2017; Oosterbaan, 2020; Harper i sur., 2021; Yuvaraj i sur., 2021, Vellinga i sur., 2021).

3.2. Maslina u uvjetima abiotskog stresa povišenog saliniteta i suše

Padaline i temperatura ključni su čimbenici za određivanje zemljopisnog područja uzgoja maslina, koje je gotovo ograničeno na sušna područja, blagih zima i umjerenih količina padalina (Gucci i Caruso, 2011). Maslina se smatra srednje otpornom biljnom vrstom na sušu i na povišeni salinitet u tlu. Prinos najviše ovisi o jesenskim/proljetnim padalinama čija je značajna uloga u ispiranju akumulirane soli u dublje slojeve tla, što biljci omogućuje novi sezonski porast (Chartzoulakis, 2005; Melgar i sur., 2009). Osmotski i oksidativni stres javljaju se u odgovoru masline na povišeni salinitet i sušu (slika 6), a intenzitet stresa ovisi o stupnju saliniteta odnosno koncentraciji iona Na^+ i Cl^- te vremenskom periodu trajanja suše (Munns, 2008; Chartzoulakis, 2005).



Slika 6: Pojednostavljeni prikaz reakcije masline na uvjete abiotskih stresova povišenog saliniteta i suše (prilagođeno prema Singh i sur., 2015).

3.2.1. Osmotski stres

Osmotski stres nastupa trenutno, promjenom u vodnim odnosima, pri čemu pad vodnog potencijala i turgora u biljci dovodi do zatvaranja puči i ograničenja izmjene plinova (Munns, 2002). Biljka receptorima prima signale te hormonalnom reakcijom pokreće niz procesa prilagodbe na novonastale uvjete uključujući smanjenu stopu rasta (Munns i Tester, 2008; Chartzoulakis, 2005). Sklerofilni listovi masline imaju gusto pakirani mezofil koji može ograničavati ulazak CO₂ u kloroplast, samim time i fotosintezu iako učinak smanjene aktivnosti fotosinteze varira ovisno o vremenskom periodu suše i/ili izloženosti povišenoj koncentraciji soli (Bongi i Loreto, 1989; Tattini i sur., 1995; Chartzoulakis i sur., 2002). U uvjetima povišenog saliniteta, listovi masline postaju deblji i sukulentniji (Bongi i Loreto, 1989). Povećavajući debljinu lista još više se može smanjiti provodnost mezofila povećavajući i otežavajući put CO₂ do kloroplasta (Evans i sur., 1994; Syversten i sur., 1995).

Snažna i prolazna smanjenja brzine ekspanzije listova nakon naglih porasta saliniteta zabilježeni su ne samo na maslini nego i na pšenici, ječmu, kukuruzu i riži (Cramer i Bowman, 1991; Neumann, 1993; Yeo i sur., 1991; Passioura i Munns, 2000). Isti učinak se postiže primjenom kalijevog klorida, manitola ili polietilen glikola (PEG) što pokazuje da reakcije nisu specifične samo za sol, odnosno natrijev klorid. Smanjenje vegetativnog rasta je trenutno i prolazno, a oporavak nastupa isključivo zbog promjena u odnosima vode sa stanicama (Passioura i Munns, 2000).

Rana reakcija masline na povišeni salinitet je redukcija vodnog potencijala (ψ_w) i relativnog sadržaja vode (RWC) kao u mnogim drvenastim kulturama, ali bez paralelnog pada osmotskog potencijala (ψ_π) (Tattini i sur., 1997; Gucci i sur., 1997a). Promjene u vodnom potencijalu (ψ_w), relativnom sadržaju vode (RWC) i usvajanju vode događaju se pri višim koncentracijama soli kod masline nego kod drugih voćnih kultura (Gucci i sur., 1997a). Visoka elastičnost listova masline i dehidracija lista objašnjavaju značajno smanjenje ψ_w tijekom uvjeta povišenog saliniteta i sposobnosti lista da se oporavi nakon stresa (Chartzoulakis i sur., 2002).

Kod masline se osmotska prilagodba najčešće ostvaruje povećanim usvajanjem anorganskih iona, prvenstveno kalija (K⁺) zbog niskih energetske troškova, što je zabilježeno kod otpornih i osjetljivih kultivara (Goreta i sur., 2007), ali i akumulacijom osmoprotektanata (Farooq i sur., 2009). Akumulacijom metabolita koji djeluju kao kompatibilna otapala u citosolu stanice, ne

remete se metabolički procesi štiteći strukture i osmotski potencijal koji osigurava neometan (ili smanjen) tok vode u biljci. Proučavani metaboliti s osmotskom funkcijom uključuju aminokiseline prolin i glicin, šećerne alkohole glicerol i manitol, te šećere glukozu i fruktozu, a količina je proporcionalna promjeni u vanjskom osmotskom okruženju do granica određenih za svaku vrstu (Hasegawa i Bresan, 2000). Koncentracija K^+ , aminokiseline prolina, drugih kompatibilnih otapala i anorganskih iona u mladim listovima masline mogu poslužiti kao indikatori intenziteta osmotskog stresa (Goreta i sur., 2007; Perica i sur., 2008).

Osim što djeluje kao izvrstan osmoprotektant, smatra se da prolin tijekom stresa može služiti kao metalni kelator, kao neenzimski antioksidans ali i kao signalna molekula (Hayat i sur., 2012). U uvjetima abiotskog stresa dolazi do prekomjerne proizvodnje te aminokiseline koja omogućava stanici toleranciju na stres održavanjem turgora ili osmotske ravnoteže, stabiliziranjem membrana (čime se sprječava istjecanje elektrolita), te održavanjem koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) unutar normalnih raspona (Hayat i sur., 2012). Vrste iz porodice *Oleaceae* imaju sposobnost u uvjetima suše sintetizirati alkohole i šećere (Sheveleva i sur., 1997), koji imaju ulogu osmoprotektanata u stanicama biljaka izloženih stresu povišenog saliniteta (Tattini i sur., 1996).

Sinteza manitola je predložena kao zamjenski mehanizam za rasipanje reducirajuće energije (NADPH) koja se akumulira prilikom svjetlosnih reakcija fotosinteze (Loescher, 1987). Akumulacija manitola i fotokemijsko rasipanje energije smatra se prednošću u uvjetima povišenog saliniteta i suše kada dolazi do zatvaranja stoma i smanjenja razine internog CO_2 (Everard i sur., 1994). Genotipska varijacija u odgovoru na osmotski stres ne postoji neovisno o biljnoj vrsti uključujući maslinu (Melgar i sur., 2009; Munns; Farooq i sur., 2009).

3.2.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres pojavljuje se paralelno s osmotskim stresom te označava prekomjerno stvaranje ROS u koje se ubraja superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH), vodikov peroksid (H_2O_2), alkoksilni radikal (RO) i singletni kisik (O^1_2) (Hasegawa i Bresan, 2000). ROS se formiraju kao međuprodukti transportnog sustava elektrona kloroplasta, mitohondrija i plazma membrane te uzrokuju lipidnu peroksidaciju, degradaciju proteina i deaktivaciju enzima pri čemu je količina nastalih ROS linearna s razinom intenziteta stresa [Hasegawa i Bresan, 2000; Farooq i sur., 2009]. ROS mogu nastati u enzimskim reakcijama putem različitih oksidaza te mogu poslužiti kao signal ili posrednik u generalnom metabolizmu, razvoju i stresnim odgovorima (Mittler i sur., 2011). Male koncentracije ROS utječu na ekspresiju nekih gena čime se može ublažiti i spriječiti peroksidacija lipidne membrane (Alscher i sur., 2002).

Biljke su razvile učinkovite i vrlo kompleksne mehanizme obrane od oksidativnog stresa u cilju održavanja homeostaze stanice. Antioksidacijski sustav u biljaka sadrži enzimске komponente među kojima su najvažnije superoksid dismutaza (SOD), katalaza, nespecifične peroksidaze (POD), askorbat peroksidaza i glutation reduktaza, te ne-enzimske komponente koje uključuju askorbinsku kiselinu, tokoferol, reducirani glutation i karotenoide (Hasegawa i Bresan, 2000; Foyer i Noctor, 2009). Superoksidni radikali mogu biti direktno uklonjeni antioksidansima kao što je reducirani askorbat i glutation, ili se mogu razgraditi do vodikovog peroksida (H_2O_2) pomoću superoksid dismutaze (SOD; $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Nadalje, H_2O_2 se potom razgrađuje do vode putem katalaza i peroksidaza. Stoga se enzimi SOD smatraju važnim regulatorima stanične redoks homeostaze i signalizacije (Holzmeister i sur., 2015). Goreta i sur. (2007) su utvrdili da je pretpostavljena otpornost masline određena periodom potrebnim biljci da poveća koncentraciju SOD u tkivu; prema tome osjetljiviji genotipovi masline akumuliraju veće koncentracije SOD u kraćem vremenskom periodu što indicira raniji ulazak u oksidativni stres.

3.2.3. Ionski stres

U ionskom stresu biljka reagira na povišenu koncentraciju soli usvajanjem vode te isključivanjem primanja iona Na^+ i Cl^- odnosno njihovog nakupljanja u mladim listovima (Munns i Tester, 2008; Munns i sur., 2019). Utvrđeno je da je isključivanje natrija iz rastućih izboja, potaknuto drastičnim padom protoka vode, dugoročno neodrživa strategija za većinu jednogodišnjih usjeva izloženih visokom salinitetu (Munns, 2005). Rast izboja je pod većim stresom od rasta korijena, slično kao i kod suše te varira od genotipa pa čak i populacije biljne vrste (Munns i Tester, 2008; Chartzoulakis, 2005; Perica i sur., 2008; Tattini i Traversi, 2009). Relativna redukcija rasta izboja i površine lista u odnosu na stopu rasta korijena smanjuje gubitke vodom i zadržava vlagu te sprječava povećanje koncentracije soli u tlu (Munns i Tester, 2008).

Učinkovitost masline da zaštiti osjetljive izboje od štetnih učinaka visoke koncentracije toksičnih iona može biti posljedica umjerenog rasta i smanjenog transporta vode iz zone korijena s povišenom NaCl koncentracijom tj. "niske strategije natrija" (Chartzoulakis, 2005; Melgar i sur., 2006). Nasuprot tome, osmotske komponente visokog saliniteta mogu biti manje važne za većinu zimzelenih sklerofilnih biljaka, kao što je maslina, koje su se razvile u uvjetima sušnog stresa i nedostatka hranjivih tvari u tlu; zimzelene sklerofilne biljke imaju nasljedno niske stope ukupne CO_2 asimilacije i proizvodnje biomase (Loreto i Bonghi, 1987; Gucci i Tattini 1997a; Testi i sur., 2006). Biljke izložene velikom nedostatku vode uzrokovanog viškom soli drastično smanjuju ukupno usvajanje ugljika, što zauzvrat značajno smanjuje proizvodnju biomase (Tattini i Traversi, 2009).

Ipak, u promjenjivom slanom okruženju na mediteranskim geografskim širinama, kasne ljetne i rane jesenje padaline dopuštaju biljci asimilaciju CO_2 i proizvodnju novog porasta u značajnoj količini (ukoliko su temperatura zraka i sunčeva radijacija u optimalnim granicama) (Tattini i Traversi, 2009). Kada je koncentracija soli (Na^+) u listu umjerena, značajan porast otpornosti mezofila u kombinaciji s povećanjem otpornosti stoma smanjuje koncentraciju kloroplastnog CO_2 i ograničava fotosintezu. Ograničenje u fotosintezi je djelomično povratno ukoliko se smanji akumulacija soli u listovima biljke, a biljka se nastavi navodnjavati nezaslanjenom vodom (Delfine i sur., 1999).

Stupanj otpornosti masline na povišenu koncentraciju Na^+ i Cl^- u tkivima određen je i sposobnošću akumulacije anorganskih iona, prvenstveno K^+ i Ca^{2+} u vakuolama stanica (Melgar i sur., 2009; Perica i sur., 2008). U tipičnim uvjetima biljka održava visoki K^+/Na^+ u citosolu s relativnom visokim K^+ (100-200 mM) i niskim Na^+ (5-10 mM) koncentracijama, gdje Na^+ održava osmotski balans u rastućim tkivima te se kontrolira Na^+/H^+ antiport nosačima. Balans se narušava povećanjem koncentracije iona Na^+ i Cl^- u otopini tla, pri čemu ioni ulaze u stanice korijena pasivno niz narušeni H^+ elektrokemijski gradijent preko visokoselektivnih K^+ nosača, neselektivnih kationskih i anionskih kanala te ostalih ionskih kanala (Munns i sur., 2019).

Usvajanje Na^+ je u kompetenciji s drugim kationima, osobito K^+ . Na^+ može ući u stanicu preko K^+ nosača s visokim afinitetom ili preko kanala niskog afiniteta koji se nazivaju neselektivni kationski kanali koji su snažno pod utjecajem Ca^{2+} . Ti kationski kanali mogli bi dopustiti ulaženje velikih količina Na^+ iz tla s visokom koncentracijom soli ukoliko nisu adekvatno regulirani (Amtmann i Sanders, 1999). Na^+ se može odstraniti iz citoplazme preko Na^+/H^+ anti-nosača, potaknutih pH gradijentom preko plazma membrane. Navedeni transportni procesi zajedno sudjeluju u kontroli brzine ulaska Na^+ u stanicu. Unutarstanično razdjeljivanje odvija se vakuolarnim Na^+/H^+ anti-nosačima, potaknutih pH gradijentom preko tonoplasta. U nekim vrstama, Cl^- transport je povezan s otpornosti na soli (Blumwald i sur., 2000). Interakcije Na^+ i Ca^{2+} su od ključnog značaja u odgovorima glikofita i halofita na visoke koncentracije NaCl u zoni korijena (Tester i Davenport, 2003).

Kod biljaka Ca^{2+} je esencijalni makronutrijent koji ima dvostruku funkciju kao strukturna komponenta staničnih stijenki i membrana te kao međustanični glasnik (Marschner, 1995.; White i Broadley, 2003; Thor, 2019). Dokazano je da povećana dostupnost iona Ca^{2+} u zoni korijena (općenito nije veća od 10,0 mM) ublažava štetne učinke povišenog saliniteta u većini biljnih vrsta (Davenport i sur., 1997; Cramer, 2002; Tuna i sur., 2007). Povećanom opskrbom Ca^{2+} u zaslanjenim tlima zaštićuje se integritet staničnih membrana i sprječava deficijencija Ca^{2+} , pojačava se selektivnost za unos i transport K^+ , inhibirajući pritom jednosmjerni priljev Na^+ u korijen i smanjujući Na^+ -stimulirani izljev K^+ . Povećanjem citoplazmatskog Ca^{2+} mogu se aktivirati protein kinaze ovisne o Ca^{2+} i Ca^{2+} - kalmodulin ovisnu PP-2B protein fosfatazu, koja je sposobna za modificiranje sustava uzimanja Na^+ i K^+ da imaju visok afinitet za K^+ (Zhu, 2001). Smatra se da su ti mehanizmi aktivirani s Ca^{2+} uglavnom odgovorni za povećanu otpornost soli u biljkama tretiranim visokim Ca^{2+} (Bressan i sur., 1998). Prednost masline u

odnosu na druge voćne kulture je prirodno stanište u vapnenačkim tlima s dostupnim Ca^{2+} (Melgar i sur., 2009; Perica i sur., 2008).

U cilju zaštite izboja i mladih listova, maslina preferencijalno skladišti ione soli u korijenu biljke, zatim u stabljici te, ukoliko opterećenje postane preveliko, u starim listovima (Chartzoulakis, 2005; Tattini i Traversi, 2009). Potvrđena je varijacija kultivara u sposobnosti zadržavanja Na^+ i Cl^- gdje osjetljivi kultivari nakon određenog vremena akumuliraju više iona u izbojima i listovima te ukoliko je senescencija listova veća od stope rasta novih, dolazi do potpunog venuća biljke (Melgar i sur., 2009; Farooq i sur., 2009; Tattini i Traversi, 2009).

3.3. Molekularni pristup u istraživanju raznolikosti biljnih genetičkih izvora

Očuvanje i korištenje genetičkih izvora neophodni su za kontinuirano održavanje i unapređivanje poljoprivredne proizvodnje. Znanstvenici se u zadnjih pola stoljeća sve više koriste molekularnim biljezima u svrhu pravilnog određivanja kultivara kao i izazova stvaranja novih. Karakterizacija genotipova koji se čuvaju u bankama gena te razjašnjenje sinonimije i homononimije u kolekcijama i rasadnicima upotrebom molekularnih biljega predstavljaju osnovni korak za njihovu upotrebu u različitim programima selekcije i oplemenjivanja (Rebourg i sur., 2001; Zeng i sur., 2007; Barranco, 2008; Lavee i sur., 2014; Leon i sur., 2020).

3.3.1. Genetički biljezi

Genetički biljezi su geni ili sekvence DNA koji se nalaze na specifičnim mjestima na kromosomima i povezani su s pojavom određenih osobina. Oni odražavaju genetičke razlike između različitih vrsta ili jedinki iste vrste, na osnovu kojih se indirektno dobiva informacija o genima (ili dijelovima genoma) odgovornih za istraživane osobine. Prema Smith-u (1987) idealan biljeg trebao bi imati sljedeća svojstva:

- polimorfizam
- uočljivost u ranim fazama razvitka
- ravnomjerni raspored u genomu
- kodominantno nasljeđivanje
- biti bez negativnog utjecaja na rast i razvoj jedinke

Genetičke biljege je moguće klasificirati kao morfološke (a), biokemijske (b) i molekularne (c).

a) Morfološki biljezi

Biljezi koji su vezani za morfološke i agronomске osobine čije je nasljeđivanje moguće pratiti istraživanjem određenog fenotipa (Tanksley, 1983). Oni su često pod utjecajem okoliša pa njihova varijabilnost ne odgovara uvijek varijabilnosti na nivou genoma. Zbog toga je ova vrsta biljega nepouzdana i subjektivna (Dorado i sur., 2005). Broj morfoloških biljega je jako ograničen, a neki od njih se pojavljuju kasno u razvoju biljke (npr. boja cvjetova) pa je nemoguće provesti rano mjerenje osobine. Osim toga, pojedini morfološki biljeg može utjecati na drugi biljeg ili svojstvo od znanstvenog interesa uslijed pleiotrofnog efekta (Poehlman, 1995).

b) Biokemijski biljezi

Biljezi koji se temelje na polimorfizmu proteina i obuhvaćaju strukturne proteine, skladišne proteine sjemena i izoenzime. Izoenzimi predstavljaju različite molekulske forme jednog enzima s istom katalitičkom funkcijom, a razlikuju se u pH vrijednosti i koncentraciji supstrata pri kojoj pokazuju enzimski efekt. Izoenzimi su alelne varijante enzima kodirane strukturnim genima. Od pojave elektroforeze proteina šezdesetih godina prošlog stoljeća, izoenzimi su se intenzivno upotrebljavali za procjenu genetičke varijabilnosti unutar i među biljnim populacijama (Brown, 1979; Gerić i sur., 1989). Osnovni nedostatak izoenzima je njihov relativno mali broj, nizak nivo polimorfizma i nepokrivanje cijelog genoma (Trujillo i sur., 1995).

c) Molekularni biljezi

Predstavljaju DNA sekvence čije se nasljeđivanje može jednostavno pratiti. Upotreba molekularnih biljega je zasnovana na DNA polimorfizmu, koji čini osnovu u dizajniranju strategija za njihovo korištenje u određene svrhe. DNA biljezi su se pokazali kao najbolji alat za efikasnu evaluaciju i selekciju biljnog materijala. Za razliku od proteinskih biljega, DNA biljezi nisu pod utjecajem okoliša, lako se izoliraju iz biljnog materijala, a analize su prilično jednostavne i efikasne. Danas je za detekciju polimorfizma na nivou DNA na raspolaganju širok opseg molekularnih tehnika (Weising i sur., 1995).

3.2.2.2. Mikrosateliti

Mikrosateliti (Litt i Luty, 1989) poznati su još i pod nazivom jednostavne ponavljajuće sekvence (engl. *Simple Sequence Repeats*, SSR). To su dijelovi DNA koji se sastoje od tandemskih ponavljajućih mono-, di-, tri-, tetra- ili pentanukleotida raspoređenih kroz genom većine vrsta eukariota (Powell i sur., 1996). Zbog njihovog visokog stupnja varijabilnosti mikrosatelitni biljezi su pogodni za razlikovanje srodnih genotipova pa se često koriste u analizama varijabilnosti populacija (Smith i Devey, 1994) kao i za identifikaciju blisko povezanih sorti (Vosman i sur., 1992).

Najvećih prednosti mikrosatelita kao biljega je njihova kodominantnost, česta prisutnost i slučajna distribucija u genomima eukariota (Morgante i sur., 2002; Barcaccia i sur., 2006). Daljnja prednost mikrosatelita je detekcija alela primjenom lančane reakcije polimerazom (eng.

Polymerase Chain Reaction, PCR) za koju su dovoljne male količine DNA (1 - 10 ng po reakciji). Isto tako zbog primjene dugih sekvenci PCR-početnica, reproducibilnost mikrosatelitnih biljega je visoka, a zbog kratkoće umnoženih mikrosatelitnih regija (100 – 300 bp) ne postavljaju se visoki zahtjevi za visokom polimernom DNA i s tim povezanom čistoćom izolata DNA. Do nedavno jedan od glavnih nedostataka mikrosatelitnih biljega bio je visoki trošak dizajniranja početnica za novo proučavane vrste. Danas je ovaj problem uvelike riješen mogućnošću sekvenciranja cjelokupnih genoma primjenom novih generacija sekvenciranja (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS). Osim navedenog mikrosatelitni biljezi se smatraju idealnim biljezima za mapiranje gena (Jarne i Lagoda, 1996), procjenu genetičke varijabilnosti kolekcija germplazme (Mohammadi i Prasanna, 2003) te ako su vezani za gene poznate funkcije mogu se povezati s fenotipskim varijacijama i nekim drugim biološkim funkcijama (Ayers i sur., 1997).

Kod masline mikrosateliti se najčešće koriste za utvrđivanje genetičke raznolikosti i genetske strukture divljih maslina, identifikaciju kultivara, konstrukciju genetskih mapa, a najveću korist su pokazali pri potvrđivanju roditeljstva u oplemenjivačkim programima (Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2011; Klepo i sur., 2013; Trujillo i sur., 2013). Zbog ovih razloga mikrosatelitni biljezi su korišteni u najvećem projektu karakterizacije, identifikacije i usporedbe primki dviju najvećih *ex situ* banki germplazme masline u svijetu (*World Olive Germplasm Bank*, WOGBC u IFAPA centru „Alameda del Obispo“ u Cordobi, Španjolska i *World Olive Germplasm Bank*, WOGBM u Marrakechu, Maroko) (Bakkali i sur., 2019). Ovim istraživanjem potvrđena je važnost i vrijednost mikrosatelitnih biljega:

- od svih analiziranih primki u obje kolekcije 672 se smatra zasebnim genotipovima, a 130 genotipova je prisutno u obje kolekcije,
- kombinacijom mikrosatelitnih biljega i osobina endokarpa identificirano je 535 kultivara (126 zajedničkih) i 120 jedinstvenih unutar kolekcija,
- otkriveno je 192 krivo označena kultivara od čega 72 u kolekciji WOGBM, a 120 u kolekciji WOGBC,
- utvrđeno je da je čak 228 genotipova zapravo molekularna varijanta 72 kultivara,
- potvrđeno je 79 sinonima i 39 homonima

Ovo istraživanje je preliminarni korak u upravljanju i istraživanju genetičke raznolikosti obje kolekcije kao i uputa za izradu genetskih mapa te poticaj za razmjenu primki između različitih kolekcija.

4. MATERIJAL, METODE I PLAN ISTRAŽIVANJA

4.1. Biljni materijal

Uzorci listova i izboja raznovrsnih mediteranskih i kultivara masline lokalnog značaja prikupljeni su u svrhu istraživanja otpornosti na abiotske stresove povišenog saliniteta i suše. Genotipovi kultiviranih maslina (*Olea europaea subsp. europaea var. europaea*) prikupljeni su u poljskoj kolekciji Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša (IJK) na lokacijama Split (43.504678, 16.499206) i Kaštel Stari (43.557061, 16.348383) prikazani su u tablici 1.

Tablica 1: Kultivirane masline iz poljskih kolekcija IJK u Kaštelima i Splitu

Poljska kolekcija Kaštela		Poljska kolekcija Split	
Naziv kultivara	Oznaka kultivara	Naziv kultivara	Oznaka kultivara
'Gemlik'	KA 1	'Tanch'	ST 1
'Branquita'	KA 2	'Bosana'	ST 2
'Kalamon'	KA 3	'Nocellara etnea'	ST 3
'Ayvalik'	KA 4	'Gieraffa'	ST 4
'Sourani'	KA 5	'Nocellara Belice'	ST 5
'Chemlali'	KA 6	'Pendolino'	ST 6
'Ascolana tenera'	KA 8	'Cucco'	ST 7
'San Agustino'	KA 9	'Nocellara messinese'	ST 8
'Coratina'	KA 10	'Rosciola'	ST 9
'Koroneiki'	KA 11	'Carolea'	ST 10
'Gringan'	KA 12	'Itrana'	ST 11
'Favarol'	KA 13	'Picholine'	ST 12
'Mariola'	KA 14	'Lechin'	ST 13
'Parmesana'	KA 15	'Cipressino'	ST 14
'Colombino'	KA 16	'Mayatica'	ST 15
'Taggiasca'	KA 17	'Koroneiki'	ST 16
'Farga'	KA 18		
'Sigoise'	KA 19		
'Fasoline'	KA 20		
'Alveriano grionl'	KA 21		
'Canino'	KA 22		
'Picholine Maroken'	KA 23		
'Santa Catarina'	KA 24		
'Perišićeva mastrinka'	KASM		

* Nazivi kultivara pisani su u skladu sa Međunarodnim kodeksom za nomenklaturu kultiviranog bilja (International Code of Nomenclature for Cultivated Plant, ISHS, 2009) prema kojem se nazivi kultivara pišu između jednostrukih navodnika (').

Lokacije divljih maslina (*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris*) su odabrane na temelju istraživanja doktorske disertacije Klepo (2014.), tekućeg istraživanja u sklopu projekta „Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja“ (<http://biodiv.iptpo.hr>) te iz pregleda literature (Zec, 1951).

Prikupljanje divljih genotipova masline provedeno je na priobalnom području Republike Hrvatske tijekom tri godine (2016., 2017. i 2018.). Prikupljeno je 216 uzoraka (Slika 7). Temeljem morfološkog vrednovanja veličine lista i ploda, udaljenosti pronađenih jedinki maslina od starih ili zapuštenih maslinika kultiviranih maslina, izdvojeni su pretpostavljeno divlji genotipovi za testiranje otpornosti na sol i sušu. Za provedbu eksperimenta odabrane su ožiljene reznice prikupljene 2018. godine.



Slika 7: Karta Republike Hrvatske s lokacijama uzorkovanja divljih i kultiviranih maslina. (preuzeto i prilagođeno prema: <https://karta-hrvatske.com/hr/slijepa-karta-hrvatske>).

Sa svake lokacije prikupljeno je minimalno 25 uzoraka (genotipova) maslina kojima su pridruženi skraćeni nazivi i brojevi, tvoreći jedinstvenu oznaku uzorka svakog genotipa (Tablica 2).

Tablica 2: Oznake genotipova pretpostavljenih divljih maslina

Lokacija	Veliki Brijun	Pag	Dugi otok	Lastovsko otočje	Hvar	Šolta	Mljet	Pelješac
Oznaka	BR 1-25	LN 1-25	DO 1-25	LA 1-25	HV 1-25	SO 1-31	MLJ 1-36	PLJ 1 - 25

4.1.1. Ukorijenjivanje reznica i presađivanje sadnica

Reznice dužine 10 do 15 cm s jednim do dva lista, pripremljene su od izboja promjera 2-8 mm. Reznice su u potpunosti uronjene u sistemični fungicid Zino (Ningbo Synagrochem Co., LTD., Kina), te osušene. Bazalni dio reznica je zatim uronjen 2 cm u trajanju od 10 sekundi u otopinu indol-3 maslačne kiseline (IBA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD) koncentracije 2500 mg/kg. Otopina je pripremljena na način da je 0,25 g IBA otopljeno u 30 mL etilnog alkohola 96 % (Medimon d.o.o., Split, Hrvatska) i nadopunjeno do 100 mL s de-ioniziranom vodom. Reznice su zatim postavljene u stol za ukorjenjivanje u zaštićenom objektu srednje škole „Braća Radić“ u Kaštel Štafiliću (43.546738, 16.326957). Konstantna temperatura u stolu održavana je pomoću električnog podnog grijanja (Neotherm A/S, Frederikssund, Danska) koje je prekriveno „Agrilit 3“ perlitom (Perlite Italiana S.r.l., Corsico, Italija) debljine 20 cm. Stol je natkriven u luku polietilenskom folijom debljine 150 µm te s postavljenim sustavom za orošavanje. Reznice su postavljene u perlit na dubinu od 3 do 5 cm.

Proces ukorjenjivanja trajao je tri mjeseca na prosječnoj vlazi zraka od 90% i temperaturi dna stola od 30 °C tijekom kojeg se redovito nadziralo zdravstveno stanje reznica kao i tretiranje fungicidom „Pyrus 400 SC“ (Arysta Lifescience Benelux, Liège, Belgija) protiv pojave sive plijesni (*Botrytis cinerea*). Uspješno ukorijenjene reznice s razvijenih tri do šest korijenčića presađene su 11. i 12. siječnja 2018. u PE lončice volumena 0,33 L u mješavini perlita i supstrata „Brill TYPical 4“ (Brill Substrate GmbH & Co. KG, Georgsdorf, Njemačka) u omjeru 1:1 (v:v) i ostavljene unutar stola za orošavanje sa svrhom aklimatizacije na nove uvjete. Sadnice su transportirane u plastenik IJK u Splitu 7. i 8. ožujka 2018. i potom presađene u posude volumena pet litara u mješavini supstrata, perlita, zemlje (smeđe tlo na vapnencu i dolomitu) u omjeru 2:1:2 (v:v:v). Unutar plastenika biljke su se razvijale sve do početka procesa presađivanja u nove posude za potrebe pokusa.

4.1.2. Priprema sadnica za provedbu eksperimenta

Za provedbu pokusa odabrano je 11 divljih genotipova i 15 kultivara maslina s područja Mediterana (Tablica 3). Sorte koje su uključene u pokus odlikuju se otpornošću prema suši i solima, dok su kao kontrola odabrane Oblica (vodeća hrvatska sorta) i Leccino kao dokazano osjetljiva sorta na povišeni salinitet (Tattini i sur., 1992; Gucci i sur., 1997; Perica i sur., 2008; Rossi i sur., 2014; Rossi i sur., 2016). Odabrane biljke presađene su u nove posude volumena 3,6 L (Koplast d.o.o., Pazin, Hrvatska), dimenzija gornjeg otvora 15x15 cm, visine 20 cm. Na dno posuda postavljena je ekspanzirana glina (Laterlite S.P.A, Milan, Italija) veličine kuglica od 8 do 20 mm u količini od 350 ml u svrhu sprječavanja ispiranja anorganskog supstrata. Smjesa anorganskog supstrata dobivena je miješanjem perlita „Agrilit 3“ (Perlite Italiana S.r.l., Corsico, Italija) veličine od 3 do 5 mm i vermikulita „Agra Vermiculite“ (RHP, 's-Gravenzande, Nizozemska) veličine od 0 do 1,5 mm u omjer 1:1 (v:v). Za ravnomjerno promiješanu smjesu upotrebljena je miješalica zapremine 80 L u trajanju od pet minuta.

Tablica 3: Popis genotipova koji su zadovoljili kriterije eksperimenta

Divlje masline		Kultivirane masline	
Oznaka uzorka	Naziv i podrijetlo	Oznaka uzorka	Naziv i podrijetlo
MLJ 25	Mljet - Hrvatska	PA 17	'Pačica' - Hrvatska
MLJ 27	Mljet - Hrvatska	PIC 17	'Piculja' - Hrvatska
MLJ 28	Mljet - Hrvatska	KA 04	'Ayvalik' - Turska
MLJ 29	Mljet - Hrvatska	KA 05	'Sourani' - Sirija
LA 13	Lastovo - Hrvatska	KA 17	'Taggiasca' - Italija
LN 11	Lun - Hrvatska	KA 18	'Farga' - Španjolska
BR 19	Brijuni - Hrvatska	KA 19	'Sigoise' - Alžir
PLJ 7	Pelješac - Hrvatska	KA 20	'Fasolina' - Italija
PLJ 18	Pelješac - Hrvatska	KA 22	'Canino' - Italija
PLJ 22	Pelješac - Hrvatska	KA 23	'Picholine Maroken' - Maroko
Kasm 1.god.	'Perišićeva mastrinka' - Hrvatska	ST 02	'Bosana' – Španjolska
Kasm 2.god.	'Perišićeva mastrinka' - Hrvatska	ST 12	'Picholine' - Francuska
Kasm 3.god.	'Perišićeva mastrinka' - Hrvatska	ST 16	'Koroneiki' - Grčka
		OB	'Oblica' - Hrvatska
		LE	'Leccino' - Italija

Smjesa anorganskog supstrata u količini od 600 ml stavljena je na ekspanziranu glinu, nakon čega je postavljena biljka i dopunjeno supstratom do vrha posude. Nakon što su svi genotipovi bili presađeni, posude su navodnjavane vodovodnom vodom do trenutka istjecanja iz drenažnih

otvora kako bi se supstrat čim bolje priljubio uz korijen. Pripremljene biljke raspoređene su na uzgojne stolove u smjeru istok-zapad.

4.1.3. Eksperimentalni objekt i sustav za fertirigaciju

Eksperiment je postavljen u eksperimentalnom stakleniku IJK u Splitu. Eksperimentalni staklenik (SALCO Albenga, Albenga, Italija, Šestar ID: 3161, 43.504406, 16.498651) površine je 1200 m² (12 m x 60 m) i visine šest metara do sljemena, s mogućnošću reguliranja okolišnih čimbenika. Staklenik je opremljen s osam uzgojnih fiksnih stolova, pojedinačne površine 54 m². Kako bi se omogućilo nesmetano otjecanje drenaže iz uzgojnih posuda, postavljeni su blokovi kamene vune (Saint-Gobain Cultilene B.V., Rijen, Nizozemska) koji su prekriveni PE bijelo-crnom folijom (Easy Grow Ltd., Grimsby, Ujedinjeno Kraljevstvo). Navodnjavanje je provedeno paralelno na stolovima, a korištene su polietilenske cijevi (T.A.C. d.o.o., Seget Donji, Hrvatska).

Sustav za fertigaciju sastoji se od glavne dovodne cijevi promjera \varnothing 25 mm, dok su lateralne cijevi promjera \varnothing 20 mm. Postavljene su samokompenzirajuće kapaljke kapaciteta 4L/h (Toro Bloomington, MN, SAD) zbog ujednačenog navodnjavanja svake biljke s istom količinom otopine. Jedna kapaljka opskrbljivala je dvije biljke masline primjenom razdjelnika „Toro FBST1“ i kapilarne cjevčice „Black Spider“ dužine 80 cm koja završava kapaljkom za kapilaru „Toro IPS0301BQ“ (Toro, Bloomington, MN, SAD). Polietilenski spremnici „Elbi CP 2000“ (Elbi (Suisse) Sagl, Biasca, Švicarska) kapaciteta 2000 L korišteni su za pohranu otopina/tretmana primjenjivanih u pokusu. Automatski sustav upravljanja (Schneider Electric, Rueil-Malmaison, Francuska) omogućuje za svaku varijantu pokusa zasebno režim navodnjavanja kao i kontrolu unutarnje temperature, upravljajući sustavom prozračivanja bočnih i krovnih otvora. Otvori za prozračivanje (1,2m x 0,6m) nalaze se cijelom dužinom na obje strane krova, te na bočnim stranicama na visini 1 m od tla, čime je osigurano kvalitetno prozračivanje eksperimentalnog prostora.

4.1.4. Priprema hranjive otopine za proces aklimatizacije i tretmane

Za ishranu biljaka tijekom aklimatizacijskog perioda pripravljena je ½ Hoaglandova hranjiva otopina (½ HHO) pripravljena prema protoklu Hoagland i Arnon (1950). Za korekciju pH vrijednosti otopina (pH 5,5 do 6,5) upotrijebljena je 0,1M otopina sulfatne kiseline (H₂SO₄ 96%, Kemika, Zagreb). Tijekom aklimatizacijskog perioda od tri mjeseca (21. ožujka do 18. lipnja 2019.) biljke su navodnjavane ½ HHO (pH 5,5 do 6,5 i EC 1.8 dSm⁻¹) pet do sedam puta dnevno tijekom čega je dodano 333 do 466 mL hranjive otopine. Broj navodnjavanja ovisio je o razvojnom stadiju biljke, vremenskim prilikama i količini perkolata prethodnog dana koji se održavao na 20 do 30 % od dodane količine ½ HHO. Analiza perkolata obavljena je svakodnevno, a izmjereni su pH s pH-metrom Mettler Toledo MP 230 i elektrovodljivost s EC-metrom Mettler Toledo MC 226 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD).

4.1.5. Primijenjeni tretmani i eksperimentalni dizajn

U eksperimentu je istražen utjecaj abiotičkih stresova (povišeni salinitet i suša) na rast, fiziološke i biokemijske procese na 24 genotipa jednogodišnjih sadnica masline. Eksperimentalni dizajn postavljen je po principu slučajnog bloknoeg rasporeda u tri ponavljanja s dva nivoa abiotičkog stresa i kontrolnim (Slika 8). Svaki genotip zastupljen je s devet biljaka, s jednom biljkom po tretmanu unutar jednog ponavljanja, što je ukupno 252 biljke u eksperimentu. U svrhu ublažavanja rubnog efekta prilikom provedbe pokusa na početku i kraju svakog reda postavljene su po tri biljke (RB) kultivara 'Canino'.

SJEVER				
RB	SUŠA	SOL	KONTROLA	RB
RB	KONTROLA	SUŠA	SOL	RB
RB	SOL	KONTROLA	SUŠA	RB
JUG				

Slika 8: Shematski prikaz eksperimenta

Za sva tri tretmana (kontrola, povišeni salinitet i suša) tri spremnika od 50 L su pripravljena sa 100 puta koncentriranom otopinom (stock) čijim su razrjeđivanjem (1 L stocka u 100 L vodovodne vode) postignuti ciljani tretmani. Koncentracije natrijeva klorida i manitola izračunate su na temelju jednakih vrijednosti osmotskog potencijala ostvarenog kod biljaka. Polietilenski spremnici „Elbi CP 2000“ kapaciteta 2000 L korišteni su za pohranu razrjeđenih otopina za tretmane u pokusu, a automatski sustav upravljanja omogućio je za svaki tretman zasebni režim primjene.

Biljke u kontrolnom tretmanu tretirane su samo s ½ HHO pripremljenom kao u postupku aklimatizacije. Za izazivanje abiotičkog stresa povišenog saliniteta primijenjena je krupna morska sol bez dodanog joda (Solana Pag d.d., Hrvatska). Kako bi se postigao tretman 150 mM/L NaCl-a otopljeno je 8,77 g NaCl-a po litri vodovodne vode. Tretman suše iniciran je upotrebom šećernog alkohola manitola u prahu (Roquette, Lestrem, Francuska). Za postizanje istog osmotskog potencijala primijenjena je koncentracija od 300 mM/L manitola otapanjem 54,65 g manitola po litri vodovodne vode.

Tretmani su primijenjeni 18. lipnja 2019. na razmještene i adaptirane biljke, a primjenjivali su se tijekom 21 dana. U svrhu izbjegavanja osmotskog šoka kod biljaka, koncentracija soli odnosno manitola povećavala se tijekom tri dana za 50 odnosno 100 mM dnevno u odnosu. Korekcija pH vrijednosti napravljena je s 0,1M 96% sulfatnom kiselinom za sva tri spremnika do vrijednosti propisane Hoaglandovoj otopini (pH 5,5-6,5). Tretmani su se primjenjivali od sedam do deset puta na dan, u trajanju od jedne minute ovisno o klimatskim uvjetima i količini perkolata od 20 do 30 % (Slika 9).



Slika 9: Posložene biljke u tri ponavljanja u slučajnom bloknom rasporedu (izvor: J.Tadić)

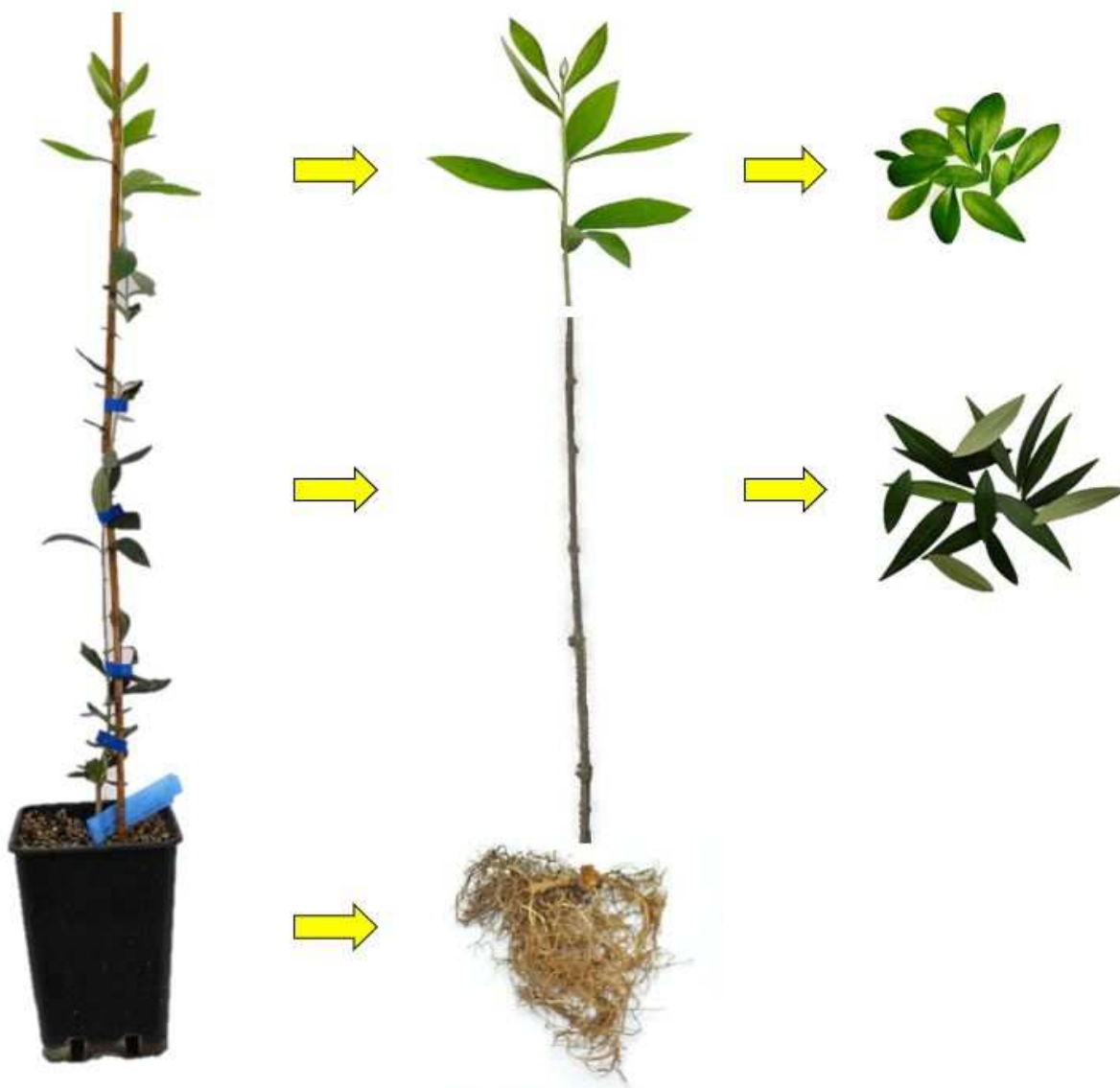
Meteorološka stanica „Vantage Vue“ (Davis Instruments, Hayward CA, SAD), bilježila je svakih sat vremena temperaturu i vlažnost zraka unutar objekta. Svakog dana nakon završetka programa prihrane s primijenjenim tretmanima, prikupljen je perkolat iz svakog tretmana unutar jednog ponavljanja koji je zatim analiziran u pedološkom laboratoriju. Analiza je uključivala mjerenje pH vrijednosti (pH-metrom Mettler Toledo MP 230) i elektrovodljivosti svakog tretmana (EC-metrom Mettler Toledo MC 226). Tijekom pokusa obavljena su mjerenja morfoloških, fizioloških, biokemijskih i molekularnih svojstava odabranih genotipova.

4.2. Morfometrijska mjerenja

Tijekom pokusa obavljena su sljedeća mjerenja: visina biljke (izmjerena mjernom trakom od supstrata do najvišeg dijela biljke), broj listova biljke (svi listovi veći od > 0.5 cm), dužina izboja (izmjerena porast ostvaren tijekom tretiranja), broj listova izboja (izmjerena na izboju nastalom tijekom primjenjenih tretmana), broj internodija biljke (izbrojen od supstrata do vrha biljke), promjera izboja (izmjerena na središnjem dijelu vrha stabljike; pomičnim mjerilom „Insize 150mm“).

Pored toga destruktivnim metodama izmjerena je površina izboja i listova obavljena skenerom Epson Perfection V700 Photo (Seikō Epuson Kabushiki-gaisha, Nagano, Japan) i software-om WinFOLIA (Regent Instruments Inc., Quebec, Kanada) te je određena svježa i suha masa (vaganjem) svih dijelova biljke (Slika 10). Izboj koji se mjerio je porast biljke ostvaren iz vršnog vegetativnog pupa tekuće godine, koji je započeo ciklus rasta početkom ožujka 2019. godine.

U svrhu lakšeg i ujednačenog mjerenja porasta biljke, svi ostali vegetativni izboji bočnih pupova su uklonjeni u početku vegetativnog rasta.



Slika 10: Odvajanje dijelova biljke za analize (izvor:J.Tadić)

4.3. Fiziološki parametri

Svježi uzorci lista korišteni su za određivanje provodljivosti membrana za soli (EL) i kalij (KL), vodnog potencijala (WP) i relativnog sadržaja vode (RWC).

a) Elektrovodljivost (EL) i curenje kalija iz lista (K-leakage)

Za mjerenje kalija u listu uzorkovan je potpuno razvijeni mladi list. Zatim je sa središnjeg dijela uzorkovan dio lista promjera 5 mm i stavljen u staklene epruvete od 50 ml. Epruvete su zatim napunjene s 30 ml re-destilirane vode i ostavljene u tamnoj prostoriji 24 sata. Zatim je izmjerena elektrovodljivost EC-metrom Mettler Toledo MC 226, uranjanjem sonde unutar epruvete. Nakon svakog mjerenja sonda je isprana s re-destiliranom vodom i osušena papirnim

ručnikom. Vrijednosti dobivene tijekom prvog mjerenja elektrovodljivosti označene su s EC₁. Nakon mjerenja elektrovodljivosti, uzorcima je izmjerena količina kalija (koji je istjecao iz lista) sa Sherwood 410 plamenim spektrometrom (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, UK).

Plameni spektrometar kalibriran je s pet standardnih otopina (K₂O) za preciznije mjerenje. Svakom uzorku je zatim izmjerena emisija kalija na plamenom spektrometru. Nakon dobivenih rezultata te zapisivanja vrijednosti u procesu kalibracije, podaci su uneseni u Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, SAD) gdje su napravljena 2 stupca:

- Vrijednosti kalibracija svih standardnih otopina izraženih u mg/l
- Vrijednost očitane emisije na plamenom spektrometru

Iz tih stupaca napravljen je raspršeni grafikon zbog usporedbe dva skupa vrijednosti odnosno dvije grupe podataka. Uz grafikon dobivene su vrijednosti usporedbe dvije grupe podataka koje su zatim unesene u kvadratnu formulu:

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

Vrijednosti dobivene iz kvadratne formule za curenje kalija označene su oznakom KL₁. Uzorci u istim epruvetama su zatim autoklavirani u „Presoclave II 80“ (J.P. Selecta, Abrera (Barcelona), Španjolska) na 120 °C i 20 minuta, nakon čega su ostavljeni 24 sata u tamnoj prostoriji da se ohlade. Svim uzorcima je ponovo izmjerena elektrovodljivost gdje su dobivene vrijednosti označene s EC₂.

Za dobivanje konačnih rezultata elektrovodljivosti u dS/m korištena je formula:

$$EL = EC_1 / (EC_1 + EC_2) \times 100$$

Izmjerene vrijednosti kalija koji je iscurio iz lista nakon autoklaviranja (u ponovljenom postupku s plamenim spektrometrom) uvrštene su u kvadratnu jednadžbu i označene su oznakom KL₂. Konačni rezultati curenja kalija u mg/L dobiveni su korištenjem formule:

$$KL = KL_1 / (KL_1 + KL_2) \times 100$$

b) Vodni potencijal (bar)

Vodni potencijal određen je uzimanjem potpuno razvijenog mladog lista, stavljanjem uzorka lista u uređaj za mjerenje vodnog potencijala „PMS 1000“ (Model 1000 Pressure Chamber, PMS Instrument Company, Oregon, SAD) spojenog na prijenosni spremnik s inertnim dušikom (Messer group GmbH, Bad Soden, Njemačka). Postupnim povećanjem tlaka unutar komore uređaja, povećalom se prati pojavljivanje kapljice vode na presjeku peteljke lista te se očitava trenutni primijenjeni pritisak (bar) dušika u komori čime se određuje vodni potencijal uzorka.

c) Relativan sadržaj vode (RWC (%))

Za mjerenje relativnog sadržaja vode korišten je potpuno razvijeni mladi list. Uzorkovan je središnji dio lista promjera 5 mm kojem je izmjerena svježa masa (FW) na analitičkoj vazi OHAUS Pioneer PA4101C (Pioneer Corporation, Kawasaki, Japan). Uzorci su prebačeni u staklene petrijeve zdjelice i epruvete napunjene s 20 ml de-ionizirane vode i ostavljeni u laboratoriju sa stalnom temperaturom i prigušenim svjetlom na period od 16 sati do pune hidratacije lista. Nakon toga, uzorci su izvađeni iz petrijevih zdjelica, obrisani papirnatim ručnikom te im je izmjerena turgorska težina (TW). Nakon toga uzorci su osušeni u sušioniku Kambič SP 440 (Kambic laboratory equipment d.o.o., Semic, Slovenija) na 75 °C u periodu od 48 sati (konstantne mase), te im je izmjerena suha masa (DW).

Dobiveni podaci su uvršteni u formulu da bi se dobio relativan sadržaj vode:

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{FW}-\text{DW}) / (\text{TW}-\text{DW})] \times 100$$

RWC- relativan sadržaj vode; FW – svježa masa; DW – suha masa; TW – turgorna masa

d) Ionski sastav korijena i listova izboja

Osušeni korijen samljeven je u mlinu za potrebe analize ionskog sastava koja uključuje mjerenje sljedećih parametara: pH, EC, te ionski sastav aniona i kationa korijena i listova izboja. Na analitičkoj vagi odmjereno je 0,1 g samljevenog uzorka korijena i lista izboja u epruvetu koja je zatim nadopunjena s 25 ml de-ionizirane vode. Epruvete s uzorcima su zatim stavljene u ultrasoničnu kupelj Bandelin Sonorex Digitec (Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin, Njemačka) napunjenu sa re-destiliranom vodom na 30 minuta i na temperaturu od 50 °C. Uzorci su zatim centrifugirani u centrifugi „Hettich Universal 320R“ (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Njemačka) na 5000 okr/min u trajanju od 5 min. Uzorcima je potom izmjeren pH i elektrovodljivost, a za određivanje ionskog sadržaja korišteni su uređaji:

Dionex LC 30 Chromatography Oven, Dionex CD 20 Conductivity Detector i GP 50 Gradient Pump (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, SAD).

e) Fotosintetski parametri

Za mjerenje fotosintetskih parametara korišten je prijenosni uređaj LI-6400XT (LI-COR, Lincon, NE, SAD). Mjerenja su se određivala periodično u razdoblju od 10,30 do 12,30 sati. Izmjeren je intenzitet fotosinteze (A), provodljivost puči (g_{sw}), slobodni međustanični CO_2 (C_i) i transpiracija (E). Parametri fotosinteze izmjereni su na potpuno razvijenom mladom listu. Komora instrumenta površine 6 cm^2 ($2 \times 3\text{ cm}$) prilagođena je listovima masline na površinu od 2 cm^2 ($2 \times 1\text{ cm}$) koja je zatim pričvršćena na gornju trećinu lista. Sva mjerenja su obavljena pod konstantnim uvjetima osvjetljenja ($PAR\ 600\ \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) i koncentracije CO_2 ($400\ \mu\text{mol mol}^{-1}$), dok su temperatura zraka ($37\text{-}42\text{ }^\circ\text{C}$) i relativna vlažnost zraka ($60\text{-}70\%$) pod utjecajem okolišnih uvjeta u komori staklenika.

4.4. Genetska raznolikost

Uzorci mladih listova kultivarnih i divljih maslina prikupljeni su kao biljni materijal za izolaciju ukupne stanične O DNA. U analize je uključeno ukupno 216 uzoraka divljih i 41 uzorak kultiviranih maslina s deset različitih lokacija (Slika 7). Molekularna analiza 12 mikrosatelitnih lokusa napravljena je u Laboratoriju za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.

4.4.1. Izolacija ukupne stanične DNA

Izolacija ukupne stanične DNA provedena je uz pomoć izolacijskog kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) i uređaja za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen®):

- Izvagano je 100 mg svježeg lisnog tkiva koje je anatomskom pincetom smješten u „safe lock“ 2 mL mikroeprovete (Eppendorf®) zajedno s čeličnom steriliziranom kuglicom ($d = 7\text{ mm}$) za usitnjavanje tkiva.
- Uzorak biljnog tkiva smrznut je uranjanjem mikroeprovete u tekući dušik nakon čega je provedeno usitnjavanje lisnog tkiva kroz jednu minutu na frekvenciji od 30 Hz/s pomoću uređaja TissueLyser (Qiagen®).
- Usitnjenom lisnom tkivu dodano je 600 μl pufera AP1, 6 μl RNazeA, 6 mg polivinil pirolidona (PVP) i 6 μl 2-mekarptoetanol. Otopina je promiješana u «vorteks» mješalici (GVLab- Gilson®).

- Homogenat je inkubiran 10 minuta na 65 °C uz miješanje od 600 okretaja po minuti u uređaju ThermoMixer™ C (Eppendorf®).
- Dodano je 195 µL pufera P3, promiješano te inkubirano 7 minuta na -20 °C. Sadržaj epruvete je centrifugiran 7,5 min na 16 100 g (s ciljem taloženja degradiranih proteina i polisaharida). Gornji vodeni sloj (oko 650 µL) je prebačen na kolonu Qiashredder Mini Spin te je centrifugiran 5 min na 16 100 g (radi uklanjanja zaostalih krupnih komada tkiva).
- 600 µL filtrata je prebačeno u čistu „safe lock“ 2 mL mikroepuvete (Eppendorf®)
- Mikroepuvete s filtratom iz prethodnog koraka su smještene u uređaj za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen®).
- Uređaj je opremljen odgovarajućim puferima (AW1, AW2, AE), adapterima za epruvete i kolonama za selektivno vezanje DNA (DNeasy Mini Spin kolone) te je pokrenut postupak izolacije DNA.
- Izolat DNA je do provedbe ostalih molekularno-genetskih analiza pohranjena na -20 °C.

4.4.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija izolirane ukupne stanične DNA utvrđena je pomoću spektrofotometra NanoPhotometer P330 (Implen®). Prije početka mjerenja uređaj je kalibriran pomoću pufera AE koji se upotrijebio u zadnjem koraku izolacije DNA u uređaju za automatsku izolaciju DNA. Osim što je za sve uzorke izmjerena koncentracija, određen je i omjer apsorbancije 260/280 te apsorbancije 260/230 kao mjera čistoće izoliranih DNA. Omjer apsorbancije je u oba slučaja morao biti veći od 1,6, a to je značilo da je izolat DNA očišćen od staničnih proteina i polisaharida i ostalih kemijskih spojeva prisutnih u biljnom tkivu .

4.4.3. Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimeraze

Izolirana DNA razrijeđena je ultračistom vodom do koncentracije od 1 ng/µL. Ovako razrijeđena DNA se upotrijebila kao kalup pri lančanoj reakciji polimerazom (PCR). PCR otopina za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa za jedan uzorak bila je ukupnog volumena od 20 µL:

- 9,1 µL H₂O (ultračista voda Qiagen®)
- 2,0 µL 10 × PCR pufer (TAKARA®)
- 1.6 µL dNTP (TAKARA®)

- 0,2 µL BSA (20 µg/mL)
- 1,0 µl početnica F (na 5' - kraju florescencijska oznaka Fam, Ned, Vic ili Pet)
- 1,0 µl početnica R
- 0,1 µL Taq HS DNA polimeraze (TAKARA®)
- 5,0 µL otopine DNA (1 ng/µL)

Umnožavanje mikrosatelitnih regija (Tablica 4) lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u uređaju GeneAmp 9700 (Applied Biosystems®) prema protokolu:

- početni korak denaturacije: 4 minuta na 95 °C
- 35 ciklusa ponavljanja; tri temperature:
- 20 sekundi na 95 °C (denaturacija)
- 30 sekundi na 50 °C (vezanje PCR-početnice na DNA-kalup)
- 30 sekundi na 72 °C (sinteza novih DNA lanaca)
- završni korak elongacije od 8 minuta na 72 °C

Tablica 4: Potpuni i skraćeni naziv 12 mikrosatelitnih lokusa s ponavljajućim motivom

SSR Potpuni naziv	SSR Skraćeni naziv*	Ponavljajući motiv	Referenca
ssrOeUA-DCA03	DCA03	(GA)19	Sefc et al., 2000
ssrOeUA-DCA04	DCA04	(GA)16	Sefc et al., 2000
ssrOeUA-DCA09	DCA09	(GA)23	Sefc et al., 2000
ssrOeUA-DCA11	DCA11	(GA)26(GGGA)4	Sefc et al., 2000
ssrOeUA-DCA16	DCA16	(GT)13(GA)29	Sefc et al., 2000
ssrOeUA-DCA18	DCA18	(CA)4CT(CA)3(GA)19	Sefc et al., 2000
EMO3	EMO3	(CA)7	De la Rosa et al., 2002
GAPU-59	GAPU59	(CT)9	Carriero et al. 2002
UDO99-011	UDO11	(CT)7(CA)10(CT)2(CA)2	Cipriani et al., 2002
UDO99-019	UDO19	(GT)20(AT)5	Cipriani et al., 2002
UDO99-039	UDO39	(AT)5(GT)11	Cipriani et al., 2002
UDO99-043	UDO43	(GT)12	Cipriani et al., 2002

4.4.4. Detekcija mikrosatelitnih alela elektroforezom u agaroznom gelu

Uspješnost DNA umnožavanja lančanom reakcijom polimerazom provjerena je elektroforezom na 1,0 % gelu agaroze u 0,5 x TBE puferu (45 mM tris-borata i 1 mM EDTA,

pH 8), na 300 V (Sambrook i sur., 1989). 5 μ l otopine DNA pomiješan je s 1 μ l boje za nanošenje (30% saharoze, 0,25% brom-fenolnog modrila i 0,25% ksilen-cijanola; Sambrook i sur., 1989). Dobivena otopina je nanosena u jažice agaroznog gela. Kao DNA veličinski standard upotrebljen je MassRuler DNA Ladder (Thermo Fisher®). Nakon što je brom-fenolno modrilo prešlo 2 cm, elektroforeza je prekinuta, a agarozni gel je smješten u otopinu GelRed (Biotum®) u 0,5 x TBE puferu kroz 25 min. GelRed se specifično veže uz nukleinske kiseline interkaliranjem između dušičnih baza, a molekule DNA postaju vidljive kada se gel osvijetli UV svjetlom transiluminatora (Sigma, T-2202).

4.4.5. Detekcija mikrosatelitnih alela kapilarnom elektroforezom

Umnoženi mikrosateliti finalno su do preciznosti 1 bp detektirani su uz pomoć automatskog sekvencera ABI Prism 3130xl (Thermo Fischer®) i «Dye set» Fam, Vic, Ned, Pet. Ukupno 1,5 μ l umnoženih mikrosatelitnih produkata nakon lančane reakcije polimerazom smješteno je u PCR ploče s 96 epruveta, a zatim je svaki uzorak pomiješan s 10 μ l formaldehida i 0,5 μ l DNA standarda Liz 500 (Applied Biosystems®). Uzorci su 3 minute denaturirani na 95° C te neposredno nakon toga smješteni na led. Nakon kapilarne elektroforeze fragmenata DNA rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka. Pregledavanje .fsa podataka i određivanje mikrosatelitnih alela izvršeno je uz pomoć programa GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystems®).

4.4.6. Statistička obrada molekularno-genetskih podataka

Za svaki mikrosatelitni biljeg izračunat je broj alela (N_a), informacijski sadržaj polimorfizma (*Polymorphic Information Content*; PIC) i vjerojatnost identičnosti (*probability of identity*; PI) koristeći program Cervus v3.0 (Kalinowski i sur., 2007). Genetska raznolikost skupine divljih tipova i kultivara analizirana je na temelju prosječnog broj alela po lokusu (N_{av}), alelnog bogatstva (N_{ar}), broja jedinstvenih alela (N_{pr}), zapažene heterozigotnosti (H_o), te očekivane heterozigotnosti ili genske raznolikosti (H_E). U tu su svrhu korišteni programi FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 1995) i GENEPOP v4.0 (Raymond i Rousset, 1995).

Genetska udaljenost između analiziranih genotipova izračunata je temeljem udjela zajedničkih alela (*Proportion of Shared-Alleles Distance*; D_{PSA} ; Bowcock i sur., 1994) u programu MICROSAT v1.5d (Minch i sur., 1997). Na temelju matrice genetske udaljenosti izrađeno je nezakorijenjeno stablo metodom po Fitchu i Margholiashu (Fitch i Margoliash, 1967), a pouzdanost pojedinih grananja na stablu utvrđena je pomoću metode bootstrap (Felsenstein,

1985). U tu su svrhu korišteni podprogrami SEQBOOT, GENDIST, FITCH i CONSENSE programskog paketa PHYLIP v3.6b (Felsenstein, 2004)

Analizom molekularne varijance (AMOVA; Excoffier i sur., 1992) raščlanjena je ukupna genotipska varijanca u sastavnice varijance između i unutar skupina divljih tipova i kultivara masline. Analiza je provedena pomoću programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010), a signifikantost ϕ_{ST} vrijednosti izračunata je na temelju 10.000 permutacija.

U svrhu određivanja genetske strukture, set podataka o genotipovima analiziranima u okviru ovog doktorata su pridodani setu analiziranom u okviru doktorske disertacije dr. sc. Tatjane Klepo. Budući da su laboratorijske analize provedene na temelju istih mikrosatelitnih početnica u Laboratoriju za genetičku raznolikost, filogeniju i molekularnu sistematiku bilja pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera, bilo je moguće objediniti dobivene podatke i na taj način dobiti reprezentativni uzorak za ovaj tip analize. Ukupni uzorak za utvrđivanje genetske strukture se od 156 jedinki maslina (93 divljih i 63 kultiviranih). Uzorci pet populacija divljih maslina prikupljeni su s otoka Brijuni, Pag, Hvar i Lastovo te s poluotoka Pelješac, koje su zastupljene s 20, 17, 21, 20 odnosno 15 jedinki (ukupno 93 jedinke). Uzorci 63 kultivara prikupljeni su u poljskim kolekcijama Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša, Split (IJK) i Kaštel Starom, te u Stanici za južne kulture (SZJK) Čibača.

Bayesovska analiza genetske strukture populacija provedena je pomoću programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard i sur., 2000). Pretpostavljeno je postojanje jedne do 11 genetskih skupina ($K = 1 - 11$) i svaka je hipoteza analizirana na temelju 30 neovisnih prohoda. Svaki se prohod sastojao od 200.000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (*burn-in*), a podaci o posteriornoj vjerojatnosti podataka [$\ln P(X|K)$] prikupljeni su tijekom 1.000.000 ponavljanja algoritma. Pretpostavljen je model koji dozvoljava mješovito podrijetlo jedinki (*admixture model*) i korelirane alelne učestalosti bez uključivanja prethodnih informacija o pripadnosti pojedinih jedinki u svrhu definiranja skupina. Optimalan broj genetskih skupina (K) utvrđen je na temelju vrijednosti ΔK (Evanno i sur., 2005) koja je izračunata pomoću programa STRUCTURE HARVESTER v0.6.94 (Earl and van Holdt, 2012). U svrhu sažimanja informacija o dobivenim genetskim skupinama korišten je program CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015). Analiza je provedena na Računalnom klasteru Isabella Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu.

4.5. Biokemijske analize

Za biokemijske analize uzorci potpuno razvijenih mladih listova izboja uzorkovani su zadnjeg dana eksperimenta. Listovi su pohranjeni u PE vrećicu koja je uronjena u spremnik s tekućim dušikom na tri sekunde (Slika 12), odnosno do prestanka isparavanja tekućeg dušika. Nakon toga uzorci su pohranjeni u hladnjak Snijders Scientific UF440 -86 (Snijders labs, Laurent Janssensstraat, Nizozemska) na -65 °C do liofiliziranja.

Za potrebe biokemijskih analiza prethodno skladišteni listovi izboja izvađeni su iz hladnjaka te su liofilizirani u Labconco FreeZone 2.5 liofilizatoru (Labconco Corporation, Kansas City, MO, SAD). Liofilizacija se odvijala pri konstantnom tlaku od 0,180 mBar i temperaturi od -48 °C do konstantne težine nakon čega su uzorci pohranjeni natrag u hladnjak na -65 °C. Analize su odrađene u Laboratoriju za fiziologiju bilja, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu. Analizama su određeni koncentracija ukupnih topivih proteina, fotosintetskih pigmenata, aminokiseline prolina i malondialdehida (MDA; indikator lipidne peroksidacije) te aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i gvajakol peroksidaza (GPOD).

4.5.1. Priprema ekstrakata za mjerenje ukupnih topivih proteina, aktivnosti enzima i koncentracije MDA

Prije ekstrakcije, pripremljene su matične otopine za izradu 50 mM kalij-fosfatnog (KP) pufera, pH vrijednosti 7.0, uz dodatak 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA).

a) Priprema matičnih otopina za fosfatni pufer uz dodatak EDTA:

Za 1 M KH_2PO_4 , 50 ml; $M_r(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136,09$. Izvagano je 6,804 g KH_2PO_4 i otopljeno u 50 ml destilirane vode u odmjerne tikvici. Za 1 M K_2HPO_4 , 50 ml, izvagano 8,709 g K_2HPO_4 i otopljeno u 50 ml destilirane vode u odmjerne tikvici. Za 10mM EDTA, 10 ml, $M_r(\text{EDTA}) = 372,24$, izvagano je 0,0372 g EDTA i otopljeno u 10 ml destilirane vode u odmjerne tikvici.

b) Priprema 50 mM fosfatnog pufera pH 7,0 za ekstrakciju proteina od matičnih otopina (prema tablici iz Maniathisovog priručnika)

Za 50 ml pufera 50 mM fosfatnog pufera uz dodatak 0,1mM EDTA odpiperano je 1538 μl 1M K_2HPO_4 i 962 μl 1M KH_2PO_4 , dodano 500 μl 10 mM EDTA i nadopunjeno s destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 50 ml.

c) Homogeniziranje uzoraka

50 mg liofiliziranog biljnog materijala uz dodatak polivinil-polipirolidona (PVPP-a) (30 mg) i 1 ml fosfatnog pufera stavljeno je u epruvetu „safe-lock“ od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg,

Njemačka). U svaku epruvetu s uzorkom stavljena je čelična kuglica nakon čega su epruvete složene u nosače homogenizatora „IST 400 mixer mill“ (InSolido Technologies, Zagreb, Hrvatska), ohlađene u tekućem dušiku, te homogenizirane jednu minutu na 30 Hz (Slika 13). Uzorci koji se nisu homogenizirali u prvom ciklusu dodatno su homogenizirani jednu minutu na 30 Hz/s.

d) Centrifugiranje ekstrakata

Kuglice su izvađene iz epruvetice nakon čega su uzorci centrifugirani na $2500\times g/30\text{min}$, te je supernatant preliven u čiste epruvetice.

4.5.2. Određivanje koncentracije ukupnih topivih proteina

Koncentracija ukupnih topivih proteina određena je prema Bradford (1976). Metoda se temelji na izravnom vezanju boje Comassie Brilliant Blue (CBB) na proteine na bočnim skupinama arginina, triptofana, tirozina, histidina i fenilalanina (Garrett i sur., 2013). Vezanjem proteina na CBB dolazi do promjene boje, a time i apsorpcijskog maksimuma sa 465 nm na 595 nm što se može utvrditi spektrofotometrijski. Pripremljena je radna otopina po Bradford-u (200 mL) koja sadrži 170 mL dH₂O, 6 mL etanola, 12 mL 88 % fosfatne kiseline i 12 mL Bradford stock otopine (96 % etanol, 88 % fosfatna kiselina i Coomasie Brilliant Blue boja). Prvo je izmjerena apsorbanacija slijepe probe (50 μL 50 mM KP pufera i 1 mL Bradford reagensa), a zatim i svih ekstrakata (50 μL ekstrakta i 1 mL Bradford reagensa) pri valnoj duljini od 595 nm na spektrofotometru (Specord, Analytik Jena, Germany). Kako bi se odredila koncentracija proteina, izrađena je baždarna krivulja dobivena mjerenjem apsorbanacija razrjeđenja goveđeg serumskog albumina (bovine serum albumine, BSA) koncentracija od 0,1 do 0,8 mg/mL nakon reakcije s Bradford reagensom. Koncentracija proteina izražena je u mg / g suhe tvari.

4.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost enzima SOD određena je spektrofotometrijski po metodi Beauchamp i Fridovich (1971) na temelju sustava ksantin-ksantin oksidaza (XOD) koji generira superoksidni anion (nastaje djelovanjem ksantin oksidaze na ksantin). Za detekciju superoksidnih aniona se koristi nitro blue tetrazolium klorid (NBT) koji se u njihovom prisustvu reducira u NBT-diformazan što je praćeno promjenom boje iz žute (NBT) u ljubičastu (NBT-diformazan). U prisutnosti SOD, dolazi do smanjenja koncentracije superoksidnih aniona (enzim razgrađuje

superoksidni radikal) i sukladno tome nastaje i manje NBT-diformazana te se apsorbancija također proporcionalno količini NBT-diformazana smanjuje.

Izrada otopina za reakcijsku smjesu:

a) SOD reakcijski pufer (50 mM kalij-fosfatni pufer sa 75 μ M NBT i 0,1 mM EDTA; pH 7,8)

Za pripremu 100 mL odpipetirano je 4,54 mL 1 M K_2HPO_4 , 0,46 mL 1 M KH_2PO_4 , 1 mL 10 mM EDTA, izvagano je 6,15 mg NBT te je otopina nadopunjena s dH_2O do oznake od 100 mL.

b) Ksantin (10, 8 mM)

Za pripremu 10 mL izvagano je 16,4 mg ksantina koji je dodan u dH_2O te otopljen uz dodatak nekoliko kapi 1M KOH na magnetskoj miješalici, uz lagano zagrijavanje otopine.

c) XOD (0,05 U/mL)

Za pripremu 1 mL enzima XOD odpipetirano je 5 μ L enzima XOD i dodano 0,995 μ L. Razrijeđeni enzim stabilan je samo jedan sat, stoga je cijelo vrijeme držan na ledu.

d) Matična otopina SOD (10 U/ μ L) za izradu kalibracijske krivulje

Za pripremu matične otopine SOD izvagano je 4 mg goveđeg enzima SOD–i otopljeno u ekstrakcijskom puferu da se dobije 10 U/ μ L.

Nakon pripreme razrijeđenog enzima XOD i mjerenja slijepe probe (Tablica 5), spektrofotometrijski je izmjerena maksimalna brzina redukcije NBT u NBT-diformazan pri 560 nm (mjerenjem apsorbancije sedam puta s razmakom između mjerenja od 30 sekundi). Sustav se namjesti tako da XOD proizvodi inicijalnu promjenu apsorbancije 0,025/min (s dopuštenom pogreškom 0,020 – 0,030). Nakon toga izmjerena je apsorbancija uzoraka lista masline.

Tablica 5: Volumeni pripremljenih otopina korišteni pri mjerenju apsorbancija za slijepu probu, maksimalnu brzinu redukcije NBT u NBT-diformazan i aktivnost SOD u uzorku.

Komponente	Slijepa proba (μL)	Maksimalna brzina	Uzorak (μL)
		(μL)	
Reakcijski pufer	825	825	825
Ksantin	75	75	75
Ekstrakcijski pufer	50	50	45
Uzorak	-	-	5
dH ₂ O	50	-	-
XOD	-	50	50

Izračun aktivnosti SOD

Aktivnost SOD odredila se preko kalibracijske krivulje koja je izrađena korištenjem matične otopine SOD (standard) te pripremom niza razrjeđenja. U ovom je istraživanju izrađena kalibracijska krivulja u rasponu koncentracija od 0,005 do 0,5 U/ μL . Podatke za srednju vrijednost apsorbancije u minuti trebalo je linearizirati računajući recipročnu vrijednost ($1/\Delta A \text{ min}^{-1}$). Podaci su grafički prikazani u ovisnosti o koncentraciji SOD (U/ μL) te je izračunat kalibracijski pravac. Vrijednosti za srednju vrijednost apsorbancije u minuti dobivene iz proteinskih ekstrakata također treba pretvoriti u recipročne vrijednosti ($1/\Delta A \text{ min}^{-1}$) te iz kalibracijske krivulje izračunati njihovu enzimatsku aktivnost u U/ μL . Konačna aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U / mg proteina).

4.5.4. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaza

Aktivnost enzima gvajakol peroksidaza (GPOD) određena je spektrofotometrijski po metodi Chance i Maehly (1955). Pripremljena je reakcijska otopina za određivanje aktivnosti GPOD koja sadrži 50 mM KH₂PO₄/ K₂HPO₄ pufer vrijednosti pH 7,0 18 mM gvajakol i 5 mM H₂O₂. Za pripremu 50 mL navedene reakcijske smjese odpipetirano je 1538 μl 1M K₂HPO₄ i 962 μl 1M KH₂PO₄ te je dodano 100 μl gvajakola i 25,5 μl 30% H₂O₂.

Za slijepu probu u kivetu je odpipetirano 970 μl reakcijske smjese i 30 μl ekstrakcijskog pufera. Za mjerenje GPOD u plastičnu kivetu odpipetirano 970 μl reakcijske smjese i 30 μl uzorka te je praćeno povećanje apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola svakih 15 sekundi tijekom 2,5 min na 470 nm. Specifična aktivnost GPOD izražena je kao količina nastalih produkata u

μmolima po min (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina (U/mg proteina) koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) za gvajakol.

Izračun:

1. Promjena apsorbancije u minuti po gramu suhe tvari:

$$\Delta A \lambda \equiv \frac{\Delta A_{sv} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzorak} \times \epsilon \times l}, \quad [\mu\text{M}/\text{min mL}]$$

$$\Delta A = \frac{\Delta A [\mu\text{mol}/\text{min mL}]}{m (g)}, \quad [\mu\text{M}/\text{min g}]$$

2. Specifična aktivnost peroksidaze

$$\text{specifična aktivnost peroksidaze} = \frac{\text{aktivnost peroksidaze} \left(\frac{\Delta A \mu\text{M}}{\text{min g}_{\text{su.t.}}} \right)}{\text{sadržaj proteina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{su.t.}}} \right)}$$

- $\Lambda = 470 \text{ nm}$
- ΔA_{sv} = srednja vrijednost apsorbancije u 15 sekundi
- $V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese = 1 mL
- F.R. = faktor razjedenja = 1
- V_{uzorak} = volumen uzorka = 0,05 mL
- ϵ = ekstinkcijski koeficijent = $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- l = dužina optičkog puta = 1 cm

4.5.5. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)

Za određivanje MDA, jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije, pripremljen je reagens koji sadrži 0,25% tiobarbiturine kiseline (TBA) otopljene u 10%-tnoj trikloroetenoj kiselini (TCA) uz dodatak 0,01%-tnog butiliranog hidroksitoluena (smjesa je lagano zagrijavana do otapanja TBA). Za određivanje koncentracije MDA, 200 μL ekstrakta

odpipetirano je u staklene semi mikroeprovete te je dodano 800 μL pripremljenog reagensa. Kao slijepa proba korišteno je 200 μL ekstrakcijskog pufera i 800 μL reagensa.

Uzorci su zatim zagrijavani u sušioniku na 95 °C na (30 minuta). Nakon toga, epruvete su naglo ohlađene na ledu (radi zaustavljanja reakcije), supernatanti preliveni u plastične epruvetice i centrifugirani 10 min na 10000 \times g. Apsorbancije uzoraka očitovane su na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa, pri čemu nastaje MDA. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija.

Sadržaj lipidnih peroksida izražen je kao MDA u jedinicama nmol po gramu suhe tvari uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.5.6. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Koncentracija fotosintetskih pigmenata (klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida) određena je spektrofotometrijski mjerenjem na tri valne dužine: 663 nm, 646 nm i 470 nm prema metodi Lichtenthaler (1987). Za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata, u pojedine epruvetice izvagano je po 15 mg uprašenih listova uzoraka masline, dodano je 1,5 mL 80%-tnog hladnog acetona (v/v) te su uzorci zatim homogenizirani u mlinu IST 400 (30 Hz/s, 1 min). Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirani u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4°C tijekom 10 min na 5000 \times g. Supernatanti su preliveni u staklene epruvete i začepljeni. Napravljena je dodatna ekstrakcija na način da je na talog (nakon centrifugiranja) dodano još 1,5 mL 80%-tnog hladnog acetona, te je proveeno centrifugiranje. Nastali supernatant je spojen sa supernatantom nakon prve ekstrakcije i volumeni svih uzoraka su nadopunjeni do 3 mL. Uzorci su zatim prebačeni u staklene kivete, te se pristupilo mjerenju. Za slijepu probu korišten je 80%-tni aceton. Iz dobivenih apsorbancija izračunate su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida.

Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema slijedećim izrazima (Wellburn, 1994):

Klorofil *a*:

$$c_a = \frac{12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

Klorofil *b*:

$$c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

Ukupni karotenoidi:

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

- c_a = sadržaj klorofila a (mg / g suhe tvari)
- c_b = sadržaj klorofila b (mg / g suhe tvari)
- c_k = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g suhe tvari)
- $A_{646,663,470}$ = apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama
- V = volumen uzoraka (ml)
- l = duljina optičkog puta = 1 cm
- m = masa uzorka = 15 mg (0,015 g)

4.5.7. Određivanje koncentracije aminokiseline prolina

Koncentracija prolina određena je spektrofotometrijski prema metodi Bates i sur. (1973). Za ekstrakciju prolina korištena je sulfosalicilna kiselina, a za određivanje prolina bitna je reakcija s ninhidrinom, pri čemu nastaje daje crvenkasto obojenje (prolin-ninhidrin kompleks tzv. Ruheman's purple) čiji intenzitet ovisi o koncentraciji prolina. Izvagano je po 15 mg liofiliziranog i uprašenog lista, na svaki je uzorak dodano 1,5 ml 3 %-tne sulfosalicilne kiseline te su uzorci zatim homogenizirani u mlinu IST 400 (30 Hz/s, 1 min). Uzorci su zatim centrifugirani na $700 \times g$ 3 min. te su supernatanti prelivevi u staklene epruvete. Na svaki uzorak

je dodano 0,75 mL ledene octene kiseline i 0,75 mL prethodno pripremljenog kiselog ninhidrina. Otopina kiselog ninhidrina pripremljena je na način da je 1,25 g ninhidrina zagrijavano u 30 ml ledene octene kiseline te je dodano 20 mL 6M fosfatne kiseline (otopina je stabilna 24 sata na 4 °C). Uzorci su pomiješani i stavljeni na inkubaciju u sušionik na 100°C (1 sat). Nakon isteka inkubacije, reakcija je zaustavljena stavljanjem uzoraka u ledenu kupelj. Ohlađenim uzorcima dodano je po 1,5 mL toluena i pomiješano kako bi se dobio kromofor u gornjoj, toluenskoj fazi. Spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija crvenkastog kromofora (koja odgovara sadržaju prolina) pri 520 nm.

Sadržaj prolina određen je iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama prolina ($0,231 - 3,23 \times 10^{-6}$ M) pri čemu je dobiveni ekstincijski koeficijent ($\epsilon = 30,038 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) korišten za izračun koncentracije prolina.

4.6. Statistička analiza za morfometrijske, fiziološke i biokemijske parametre

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz proveden je korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO, Inc., USA) i Excel programa Microsoft Office paketa.

Od mjera centralne tendencije izračunata je aritmetička sredina, a od mjera varijabilnosti izračunata standardna je devijacija. Svaki brojčani podatak prikazan grafičkim prikazom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja bioloških replika (minimalno tri). Radi adekvatne usporedbe genotipova maslina, svi podatci su normalizirani pri čemu je kontrolama dodijeljena vrijednost 1. Statistička značajnost između kontrolnog i testnih uzoraka kao i između samih testnih uzoraka izračunata je neparametrijskim testovima - jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajne razlike uz razinu značajnosti od 0,05 ($p < 0,05$) između kontrole i tretiranih biljaka prikazane su različitim slovima. Originalni podatci prikazani su u pomoćnim tablicama u prilogima.

5. REZULTATI

5.1. Genetska raznolikost

Identificirano je ukupno 26 jedinki masline upotrebom 12 mikrosatelitnih biljega (Tablica 3, 4). Genotipovi uključeni u molekularnu analizu s jedinstvenom oznakom svakog genotipa, država ili mjesto podrijetla prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6: Genotipovi divljih i kultiviranih maslina korištenih u eksperimentu s jedinstvenim oznakama

Broj uzorka	Naziv genotipa	Lokalitet	Skupina*	Oznaka jedinstvenog genotipa
1	BR 19	Brijuni	S1	T144
2	LA 13	Lastovo	S1	T145
3	MLJ 25	Mljet	S1	T146
4	MLJ 27	Mljet	S1	T147
5	MLJ 28	Mljet	S1	T148
6	MLJ 29	Mljet	S1	T149
7	LN 11	Pag	S1	T150
8	PLJ 7	Pelješac	S1	T151
9	PLJ 18	Pelješac	S1	T152
10	PLJ 22	Pelješac	S1	T153
11	'Sigoise'	Alžir	S2	T154
12	'Oblica'	Split	S2	T122
13	'Pačica'	Mljet	S2	T124
14	'Perišićeva mastrinka'	Kaštela	S2	T126
15	'Piculja'	Lastovo	S2	T127
16	'Picholine'	Francuska	S2	T155
17	'Koroneiki'	Grčka	S2	T156
18	'Canino'	Italija	S2	T157
19	'Fasolina'	Italija	S2	T158
20	'Leccino'	Italija	S2	T159
21	'Taggiasca'	Italija	S2	T160
22	'Picholine Maroken'	Maroko	S2	T161
23	'Sourani'	Sirija	S2	T162
24	'Bosana'	Španjolska	S2	T163
25	'Farga'	Španjolska	S2	T164
26	'Ayvalik'	Turska	S2	T165

Legenda: * = S1 – divlji genotipovi, S2 – kultivirani genotipovi

Analizirano je 26 uzoraka masline upotrebom dvanaest mikrosatelitnih biljega (DCA3, DCA4, DCA9, DCA11, DCA16, DCA18, EMO3, GAPU59, UDO11, UDO19, UDO39 i UDO43). Svi mikrosateliti su polimorfni te su detektirali ukupno 118 alela, s prosječnom vrijednosti od 9,83 alela po lokusu. Broj alela se kretao od 5 (UDO19, GAPU59) do 16 (DCA09, UDO43). Vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC), oscilirale su od 0,467 (UDO19) do 0,862 (DCA09), s prosječnom vrijednosti od 0,770 (Tablica 7).

Tablica 7: Naziv mikrosatelitnog lokusa, ponavljajući motiv, raspon duljina alela, broj alela i informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) za 12 mikrosatelitnih lokusa analiziranih na 26 uzoraka

Br.	Lokus	Ponavljajući motiv	Raspon duljina umnoženih ulomaka (pb)	Ukupan broj alela	PIC
1	DCA03	(GA)19	232-256	9	0,808
2	DCA04	(GA)16	130-188	8	0,768
3	DCA09	(GA)23	161-209	16	0,862
4	DCA11	(GA)26(GGGA)4	127-161	6	0,728
5	DCA16	(GT)13(GA)29	121-179	15	0,853
6	DCA18	(CA)4CT(CA)3(GA)19	156-182	10	0,807
7	EMO3	(CA)7	205-217	7	0,758
8	GAPU59	(CT)9	208-222	5	0,647
9	UDO11	(CT)7(CA)10(CT)2(CA)2CT(CA)2CT(CA)9	95-131	9	0,840
10	UDO19	(GT)20(AT)5	99-167	5	0,467
11	UDO39	(AT)5(GT)11	105-189	12	0,840
12	UDO43	(GT)12	172-220	16	0,860
Prosjek				9,83	0,770
Ukupno				118	

Legenda: PIC – Informacijski sadržaj polimorfizma

Vrijednost prosječnog broja alela po lokusu (N_{av}) bila je niža kod skupine divljih maslina (7,500), nego kod skupine kultiviranih maslina (7,750). S druge strane u skupini divljih maslina zabilježeno je veće alelno bogatstvo ($N_{ar} = 7,500$), nego kod skupine kultiviranih maslina (N_{ar}

= 6,663). Isto tako primjećen je veći broj jedinstvenih alela ($N_{pa} = 28$), ali i niža vrijednosti zapažene (H_O) i očekivane (H_E) heterozigotnosti kod kultiviranih maslina (Tablica 8).

Tablica 8: Osnovni populacijsko-genetički parametri u skupini divljih i kultiviranih maslina

Br.	Skupina	n	N_{av}	N_{ar}	N_{pa}	H_O	H_E
S1	Divlje	10	7,500	7,500	25	0,833	0,836
S2	Kultivirane	16	7,750	6,663	28	0,703	0,768

Legenda: n - veličina uzorka; N_{av} - prosječan broj alela po lokusu; N_{ar} - alelno bogatstvo; N_{pa} – broj jedinstvenih alela; H_O - zapažena heterozigotnost; H_E - očekivana heterizogitnost

5.1.1. Genetska udaljenost i klaster analiza

Genetska udaljenost između analiziranih genotipova izračunata je temeljem udjela zajedničkih alela (D_{PSA}) u programu MICROSAT v1.5d.

Prosječna genetska udaljenost temeljena na broju zajedničkih alela (D_{psa}) kretala se od 0,721 za skupinu divljih maslina do 0,681 za skupinu kultiviranih maslina (Tablica 9). Najmanja vrijednost D_{psa} zabilježena je kod skupine kultiviranih maslina (0,083), a najveće vrijednosti su identične kod obje skupine maslina (0,917). Skupine divljih i kultiviranih maslina razlikovale su se u minimalno 2 do maksimalno 22 alela.

Tablica 9: Prosječna, minimalna i maksimalna vrijednost genetske udaljenosti na temelju broja zajedničkih alela (D_{psa}), te minimalni i maksimalni broj različitih alela unutar populacija divljih maslina i kultiviranih maslina .

Skupine	D_{psa}			Broj različitih alela	
	Prosjek	Minimum	Maksimum	Minimum	Maksimum
Svi	0,716	0,083	0,917	2	22
Divlje masline	0,721	0,417	0,917		
Kultivare masline	0,681	0,083	0,917		

Na temelju matrice genetske udaljenosti provedena je klaster analiza te je izrađeno nezakorijenjeno stablo metodom po Fitchu i Margholiashu. Na dobivenom stablu uočljivo je grananje na četiri skupine (Slika 12). Vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % označene su na granama.

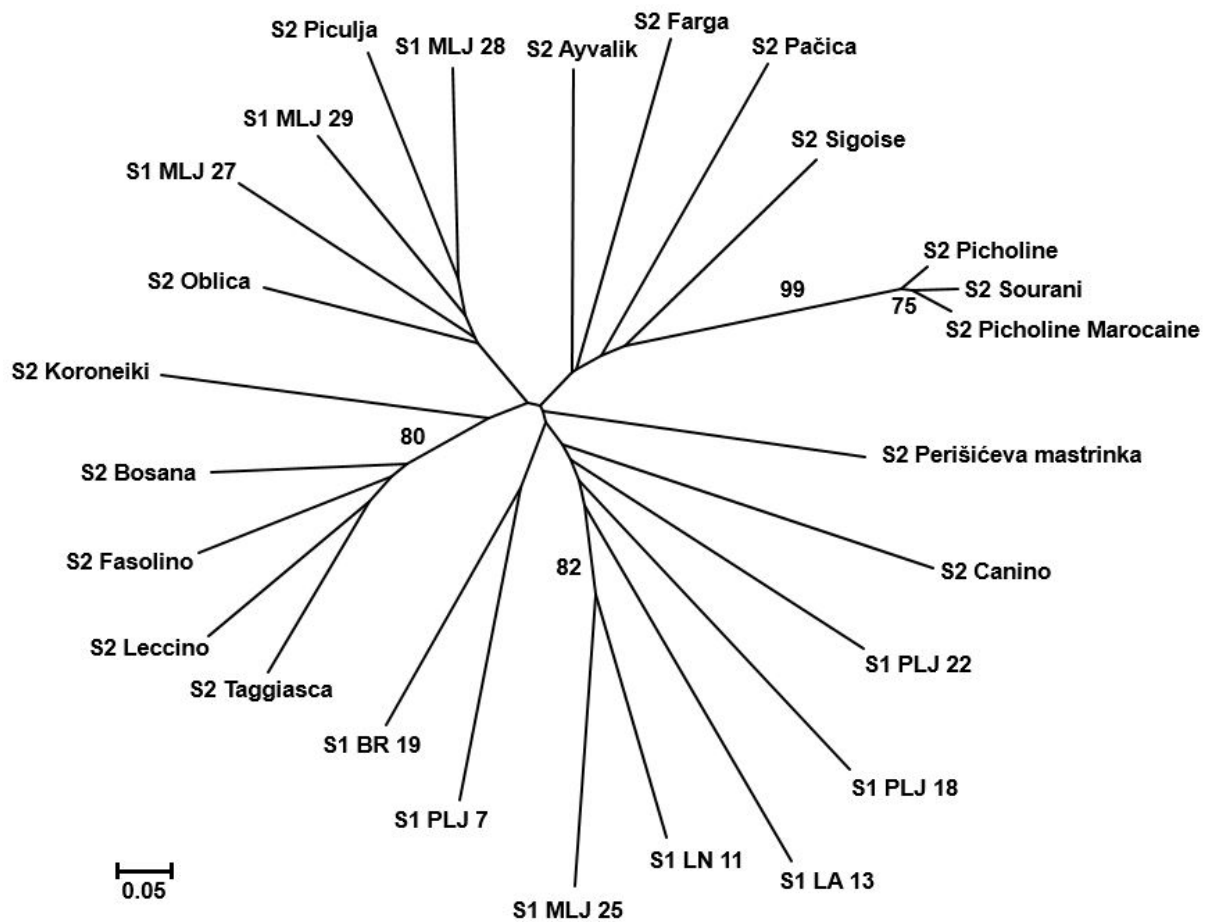
Prva skupina uključuje inozemne genotipove kultiviranih maslina te se unutar te skupine odvojila grupa kultiviranih maslina 'Sourani', 'Picholine' i 'Picholine marocaine' s visokom *bootstrap* vrijednošću (BS = 99 %).

Druga skupina predstavlja divlje genotipove podrijetlom iz Hrvatske te kultivar Canino. Unutar ove skupine jedino su divlji genotipovi „S1“ 'Mljet 1' i 'Pag' odvojene s većom *bootstrap* vrijednošću (BS = 82 %).

Treću skupinu predstavljaju strani kultivari koji su se s većom *bootstrap* vrijednošću odvojili od kultivara „S2“ 'Bosana', 'Fasolino', 'Leccino' i 'Taggiasca' (BS = 80 %).

U četvrtoj skupini s nešto nižom *bootstrap* vrijednošću (BS = 50 %) nalaze se hrvatski kultivari 'Oblica' i 'Piculja' te jedinice divljih maslina s otoka Mljeta. U četvrtoj skupini bez veće *bootstrap*

vrijednosti od 50 % nalaze se hrvatski kultivari 'Oblica' i 'Piculja' te jedinke divljih maslina s otoka Mljeta.



Slika 11. Nezakorijenjeno stablo izrađeno metodom po Fitchu i Margoliashu na temelju udjela zajedničkih alela (*Dpsa*) kao matrice genetske udaljenosti između istraživanih jedinki. Vrijednosti *bootstrap* veće od 50 % dobivene na temelju 1000 pseudoponavljanja označene su brojevima na pojedinim granama.

5.1.2. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Analizom molekularne varijance (AMOVA) raščlanjena je ukupna genotipska varijanca u sastavnice varijance između i unutar skupina divljih i kultiviranih maslina. Analiza je provedena pomoću programa ARLEQUIN v3.5.2.2, a signifikantost ϕ_{ST} vrijednosti izračunata je na temelju 10.000 permutacija (Tablica 10).

Rezultati ove analize su bili signifikantni ($P(f)$ 0,004). Čak 96,06 % od ukupne genetske raznolikosti pripada raznolikosti unutar skupina, a samo 3,94 % raznolikosti predstavlja raznolikost između divljih i kultiviranih maslina.

Tablica 10. Raspodjela raznolikosti na temelju Analize molekularne varijance

Izvor	df	Sastavnice varijance	% Ukupne varijance	<i>f</i> -statistika	<i>P(f)</i>
Između skupina	1	0,195	3,94	0,039	0,004
Unutar skupina	50	4,757	96,06		

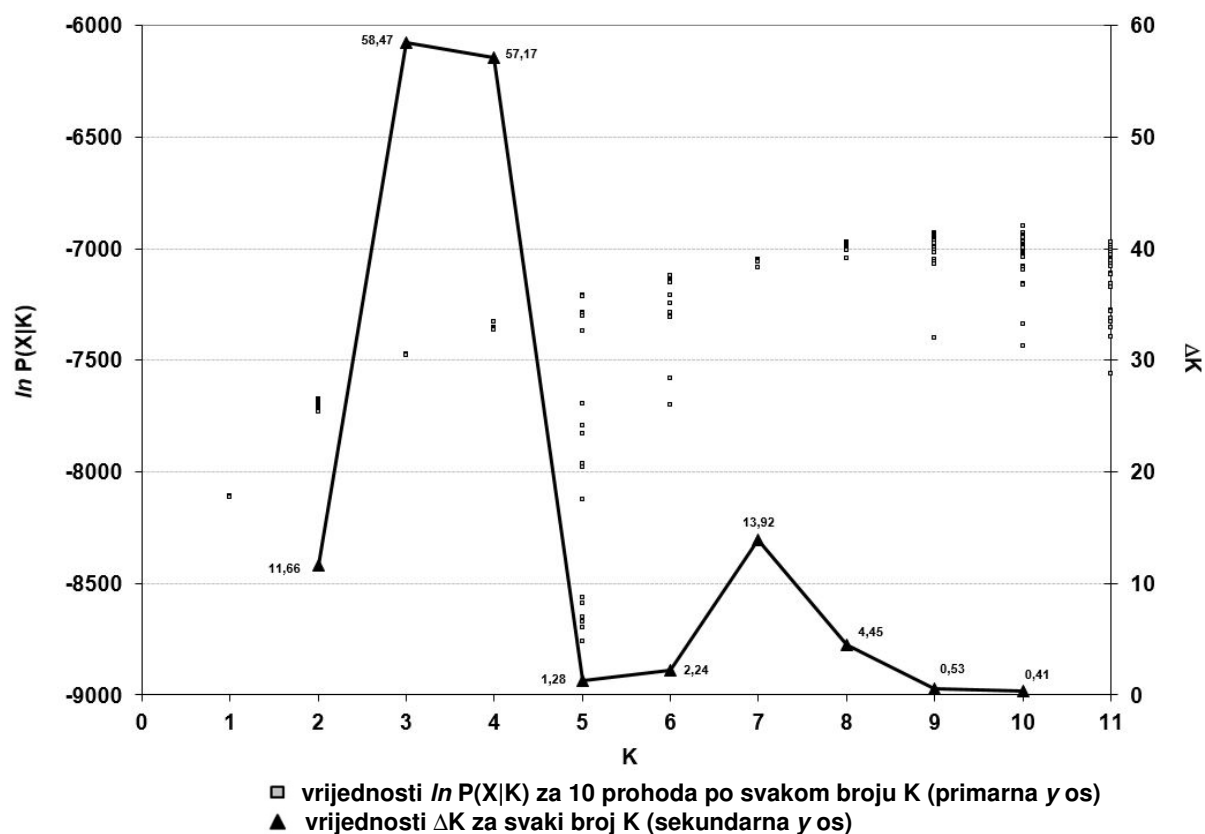
5.1.3. Populacijska struktura

U svrhu dobivanja reprezentativnog uzorka za utvrđivanja populacijske strukture set podataka o genotipovima analiziranima u okviru ovog doktorata je pridodan setu analiziranom u okviru doktorske disertacije dr. sc. Tatjane Klepo. Laboratorijske analize unutar ovog doktorata provedene su na temelju istih mikrosatelitnih početnica i u istom laboratoriju pa je stoga bilo moguće objediniti dobivene podatke u okviru ove doktorske disertacije. Set ranijih podataka sastojao se od 156 jedinki maslina (93 divljih i 63 kultiviranih) te su raspoređeni prema populacijama: P01 Brijuni, P02 Pag, P03 Hvar, P04 Lastovo, P05 Pelješac, P06 Kultivari.

Novi set (NS) podataka iz ove doktorske disertacije sastoji se od 26 jedinki (10 divljih i 16 kultiviranih) gdje su se jedinice raspodjelile u nove skupine i populacije.

Računalnim programom STRUCTURE pretpostavljeno je postojanje od 1 do 11 izvornih genetskih skupina ($K = 1-11$) (hipoteza), gdje je za svaku od hipoteza provedeno 30 neovisnih prohoda, a svaki prohod se sastojao od 200.000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanaca i 1.000.000 ponavljanja algoritma. Na slici 12 prikazana je vjerodostojnost hipoteza [$\ln P(X|K)$] i stopa promjene vjerodostojnosti između uzastopnih vrijednosti K (ΔK) za različit broj izvornih populacija ($K = 1-11$).

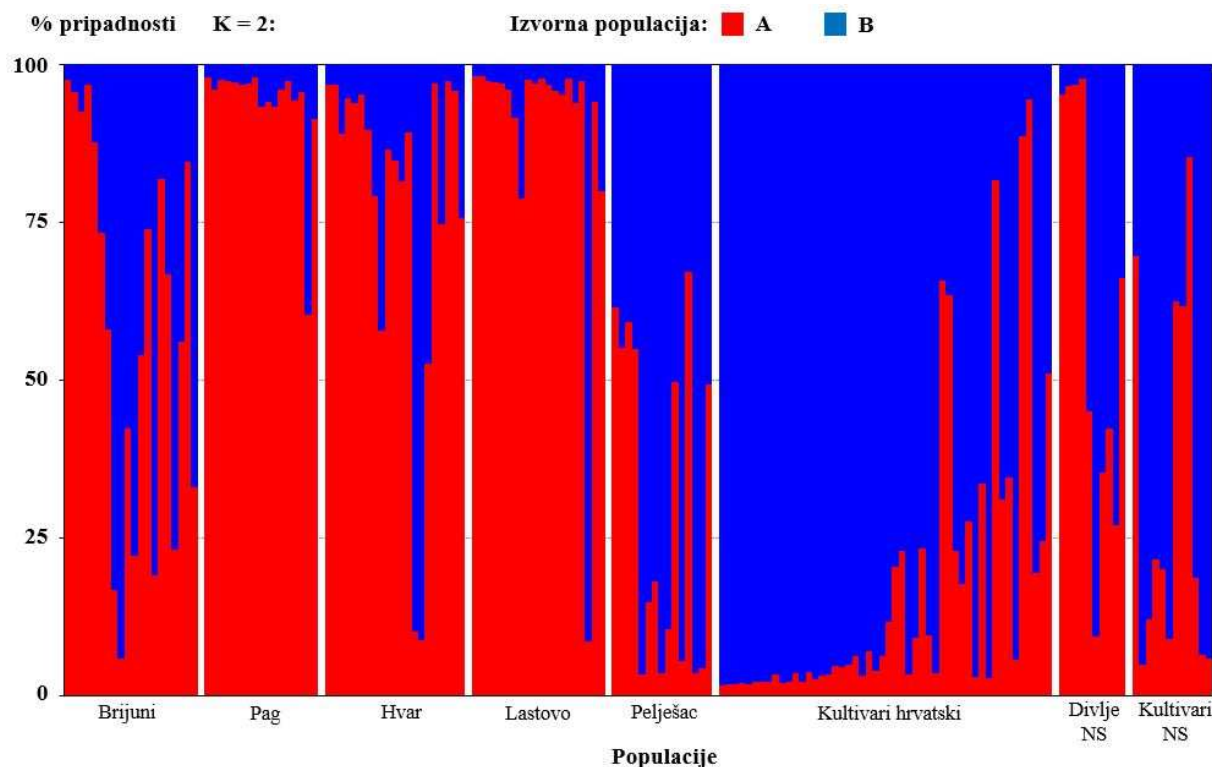
Izračunom vrijednosti ΔK utvrđena je najveća vrijednost za $K=3$ (58,47), što upućuje na zaključak da su analizirane populacije najvjerojatnije potekle iz tri izvorne populacije masline, odnosno genetska skupa (A, B, C). Vrijednosti ΔK za $K > 3$ su se konstantno smanjivale što je ukazivalo na to da je postojanje više od tri izvorne skupine malo vjerojatno.



Slika 12: Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE: Posteriorna vjerojatnosti podataka [$\ln P(X|K)$] i vrijednost ΔK za različite hipoteze o broju izvornih populacija ($K = 1 - 11$).

Prema udjelu genoma (Q) svake jedinke određena je pripadnost određenom genetskom skupu odnosno izvornoj populaciji divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B) te inozemnih kultivara (C). U analizi strukture populacije pri $K=2$ u izvornu populaciju divljih maslina izdvajaju se populacije P02 Pag, P03 Hvar i P04 Lastovo (Slika 13). Populacija divljih maslina s Brijuna (P01), a osobito onih s poluotoka Pelješca (P05) ukazuju na vrlo veliki udio genoma kultivara (izvorni genetski skup kultivara B). Pojedini kultivari kao 'Piculja', 'Mrčakinja' i 'Oleaster' pokazali su veliku srodnost s populacijama divljih maslina (izvorni genetski skup divljih maslina A).

Masline iz ovog istraživanja (NS) koje spadaju u populaciju divljih maslina su genotipovi MLJ 25, LN 11, LA 13, PLJ 18, kultivar 'Piculja' (88 %) i neočekivano španjolski kultivar 'Farga' (85 %). U populaciju kultivara spadaju dominantno populacije kultiviranih maslina te prethodno pretpostavljeni „divlji“ genotipovi MLJ 29 (90 %) i MLJ 28 (73 %).



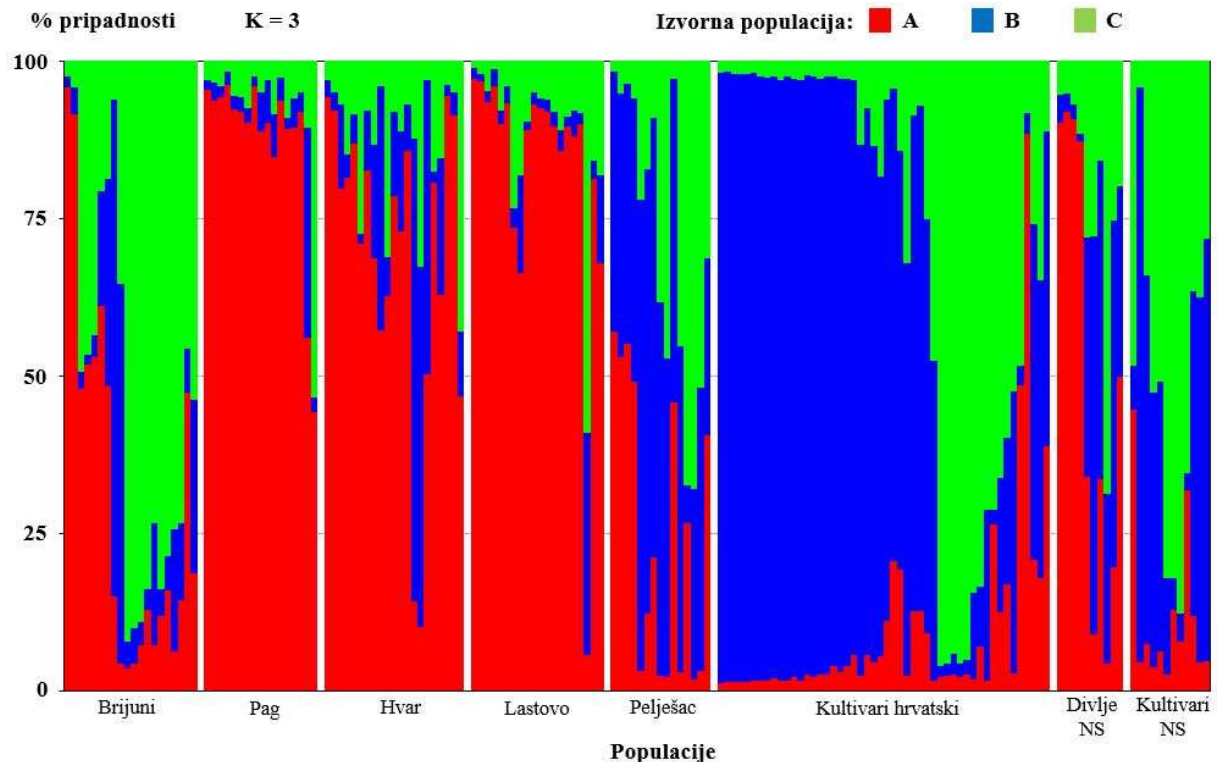
Slika 13: Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE za $K = 2$: svaka je jedinka predstavljena stupcem unutar populacije, a boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koji potječe iz određene izvorne populacije.

Pri najvjerodostojnijoj hipotezi postojanja izvorno tri populacije ($K = 3$) populacije Pag, Lastovo ($Q > 80 \%$), Hvar ($Q > 69 \%$) te velikim dijelom populacija Brijuni ($Q > 50 \%$) pripadaju izvorno divljim maslina. Populacija Pelješac je jedina analizirana populaciji koja u kojoj nema dominacije ni jedne izvorne populacije. Analizirano je ukupno 18 jedinki, gdje je pripadnost populaciji određena prema $Q > 50 \%$. Četiri jedinke pripadaju populaciji divljih maslina, sedam jedinki populaciji kultivara (B), tri jedinke populaciji inozemnih kultivara (C) dok kod četiri jedinke nije utvrđena dominacija ni jedne izvorne populacije ($Q < 50 \%$) što upućuje na izrazito hibridno podrijetlo.

Većina hrvatskih kultivara maslina pripadala je izvornoj populaciji kultivara (B), kultivar 'Mrčakinja' dominantno je pokazao genetsku pripadnost populaciji divljih maslina ($Q > 88 \%$), dok su kultivari 'Kamasa', 'Krivulja', 'Pujizica', 'Rosulja', 'Uljarica', 'Zuzorka', 'Istarska crnica', 'Oleaster' i 'Bjelica' zastupljeni su s više od 70 % udjela genoma iz populacije inozemnih kultivara (C).

Za masline iz NS u populaciju izvorno divljih maslina (A) pripadaju genotipovi LA 13, MLJ 25, LN 11 i PLJ 18 ($Q > 85 \%$). U izvornu populaciju hrvatskih kultivara (B) pripadaju

genotipovi MLJ 27, MLJ 28, MLJ 29 te kultivari 'Sigoise', 'Oblica', 'Pačica', 'Picholine', 'Picholine marocaine', 'Sourani' i 'Bosana' ($Q > 50\%$). U izvornu populaciju inozemnih kultivara (C) pripao je prethodno pretpostavljeni „divlji“ genotip BR 19, kultivar 'Perišićeva mastrinka', 'Koroneiki', 'Fasolino', 'Leccino', 'Taggiasca', 'Farga' i 'Ayvalik' ($Q > 50\%$). Genotipovi i jedinke koji pri ovoj hipotezi nisu pripali niti jednoj izvornoj populaciji ($Q < 50\%$) su PLJ 7, PLJ 22 te kultivari 'Piculja' i 'Canino'.



Slika 14: Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE za $K = 3$: svaka je jedinka predstavljena stupcem unutar populacije, a boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koji potječe iz određene izvorne populacije.

5.2. Morfometrijska mjerenja

Za prikaz rezultata morfometrijskih, ionskih i biokemijskih analiza genotipovi divljih i kultiviranih maslina iz eksperimenta su reducirani i podijeljeni u četiri grupe na temelju rezultata populacijske strukture iz razloga preglednosti rezultata. Unutar svake skupine kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' su predstavljali standarde, 'Koroneiki' kao otporni kultivar, 'Leccino' kao osjetljiviji i 'Oblica' kao najzastupljeniji kultivar u Republici Hrvatskoj koji se prema dosadašnjim istraživanjima pokazao prilagodljiv na različite klimatske uvjete uzgoja.

Grupa A: Standardni kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' s genotipovima koji su pripali u izvornu populaciju divljih maslina: LA 13, MLJ 25, LN 11 i PLJ 18 ($Q > 85 \%$).

Grupa B: Standardni kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' s genotipovima koji su pripali u izvornu populaciju hrvatskih kultivara: MLJ 27, MLJ 28, MLJ 29 i 'Pačica' ($Q > 50 \%$).

Grupa C: Standardni kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' s genotipovima koji su pripali u izvornu populaciju inozemnih kultivara: BR 19, 'Perišićeva mastrinka', i 'Ayvalik' ($Q > 50 \%$)

Grupa D: Standardni kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' s genotipovima koji na temelju rezultata populacijske strukture nisu pripali niti jednoj izvornoj populaciji, odnosno hibridne masline: PLJ 7, PLJ 22, i 'Piculja' ($Q < 50 \%$).

Morfometrijska mjerenja dužine izboja, površine lista i suhe mase izboja prikazani su grafički kao parametri na koje su primjenjeni tretmani imali najveći utjecaj. Ostali rezultati morfometrijskih mjerenja prikazani su tablično.

5.2.1. Relativna dužina izboja izdanka

Općenito, tretman suše (manitol) uzrokovao je značajno smanjenje dužine izboja kod svih genotipova masline dok je tretman povišenog saliniteta ovisno o promatranom genotipu ili uzrokovao značajno smanjenje dužine izboja ili nije značajno utjecao na taj parametar (Slika 15).

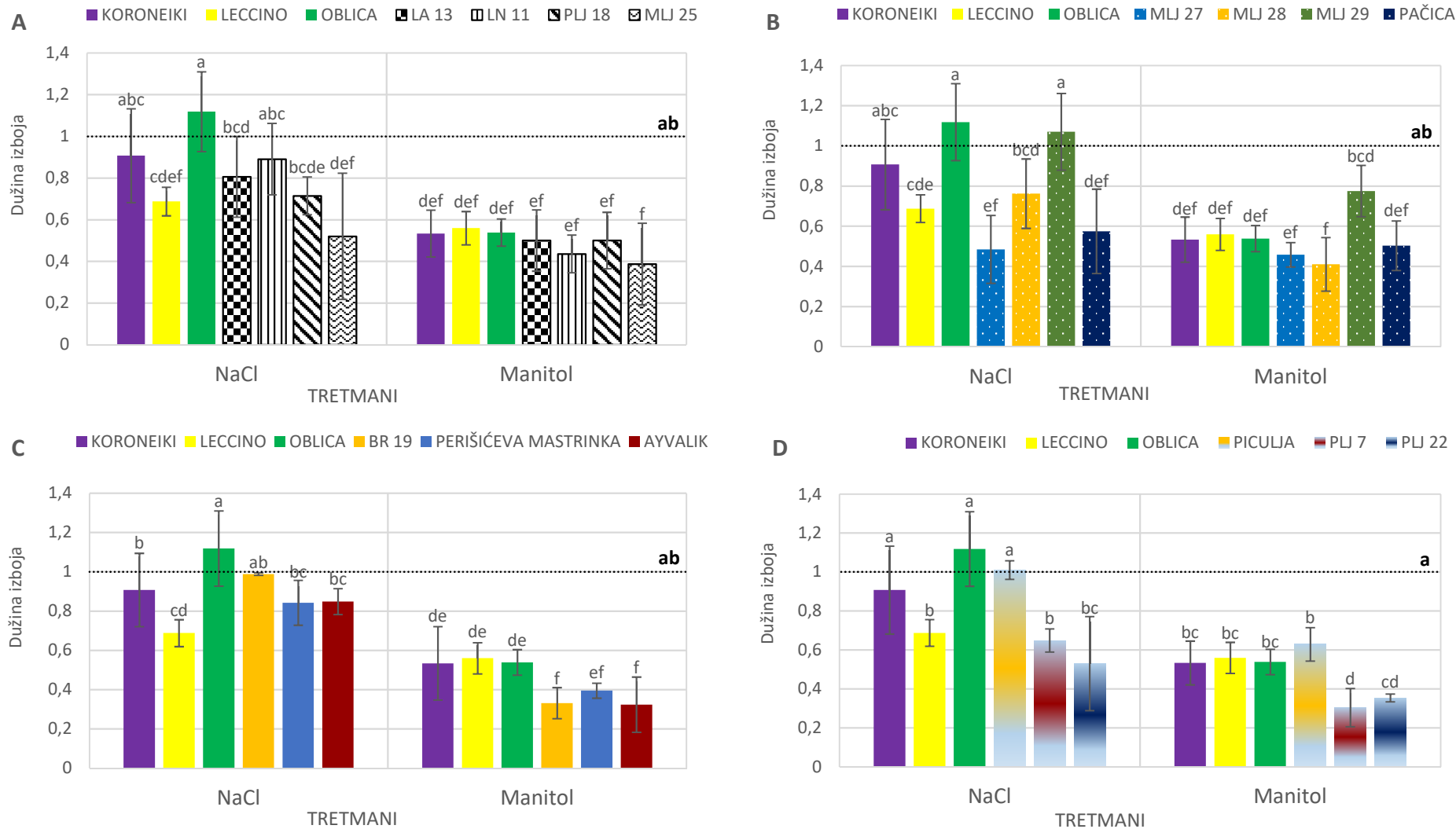
Standardni kultivari 'Koroneiki' i 'Oblica' nisu pokazali signifikantnu redukciju dužine izboja neovisno o primjenjenom tretmanu, dok je kultivar 'Leccino' imao signifikantnu redukciju dužine izboja u oba tretmana.

Kod grupe izvorno divljih maslina u tretmanu povišenog saliniteta signifikantna redukcija zabilježena je jedino kod genotipa MLJ 25. Tretman suše signifikatno je utjecao na dužinu izboja kod svih genotipova (Slika 15A).

Tretman povišenog saliniteta kod grupe hrvatskih kultivara signifikantno je utjecao na genotipove MLJ 27 i kultivar 'Pačicu', dok samo kod genotipa MLJ 29 nije zabilježena signifikantna redukcija dužine izboja u tretmanu suše između svih promatranih grupa (Slika 15B).

Kod grupe inozemnih kultivara signifikantna redukcija dužine izboja nije zabilježena u tretmanu povišenog saliniteta, izuzev kultivara 'Leccino', dok su svi genotipovi pokazali signifikantnu redukciju dužine izboja u tretmanu suše (Slika 15C).

Kod kultivara 'Piculja' u grupi hibridnih maslina nije zabilježena signifikantna redukcija dužine izboja u tretmanu povišenog saliniteta, dok je tretman suše utjecao signifikatno (značajno smanjenje dužine izboja) na sve genotipove (Slika 15D).



Slika 15: Relativna dužina izboja (originalni podatci u cm – Tablica S1) izdanka masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.2.2. Relativna površina lista izboja

Gledajući općeniti trend, može se zaključiti da su oba tretmana značajno utjecala na površinu lista izboja u smislu smanjenja tog parametra (Slika 16).

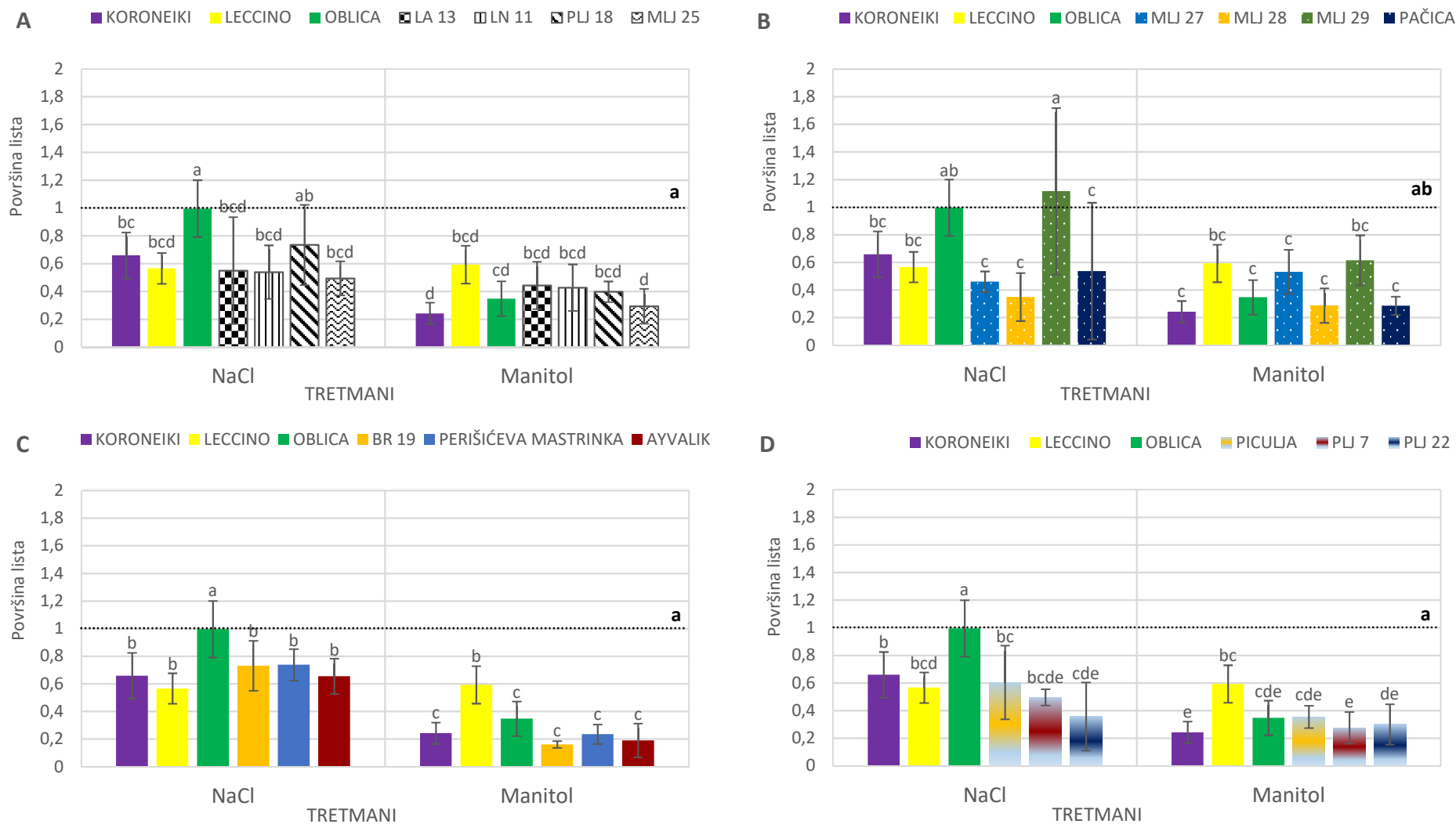
Standardni kultivari 'Koroneiki' i 'Leccino' su imali signifikantnu redukciju u gotovo svim promatranim grupama na oba tretmana. Za razliku od tretmana suše, tretman povišenog saliniteta nije značajno utjecao na površinu lista izboja u kultivaru 'Oblica' kod svih grupa (Slika 16).

Tretman povišenog saliniteta kod grupe izvorno divljih maslina signifikantno je utjecao na površinu lista svih genotipova osim genotipa PLJ 18. Tretman suše signifikatno je utjecao na površinu lista kod svih genotipova (Slika 16A).

Kod grupe hrvatskih kultivara genotip MLJ 29 nije zabilježio signifikatnu redukciju površine lista u tretmanu povišenog saliniteta i tretmanu suše, dok kultivar 'Leccino' nije imao redukciju površine lista u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 16B).

Tretmani povišenog saliniteta i suše signifikantno su utjecali na redukciju površine lista kod svih genotipova grupe inozemnih kultivara (Slika 16C).

Kao i kod prethodne grupe, tretmani povišenog saliniteta i suše su kod grupe hibridnih maslina signifikatno smanjili površinu lista u svim genotipovima (Slika 16D).



Slika 16: Relativna površina lista (originalni podatci u cm² - Tablica S1) izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.2.3. Relativna suha masa izboja izdanka

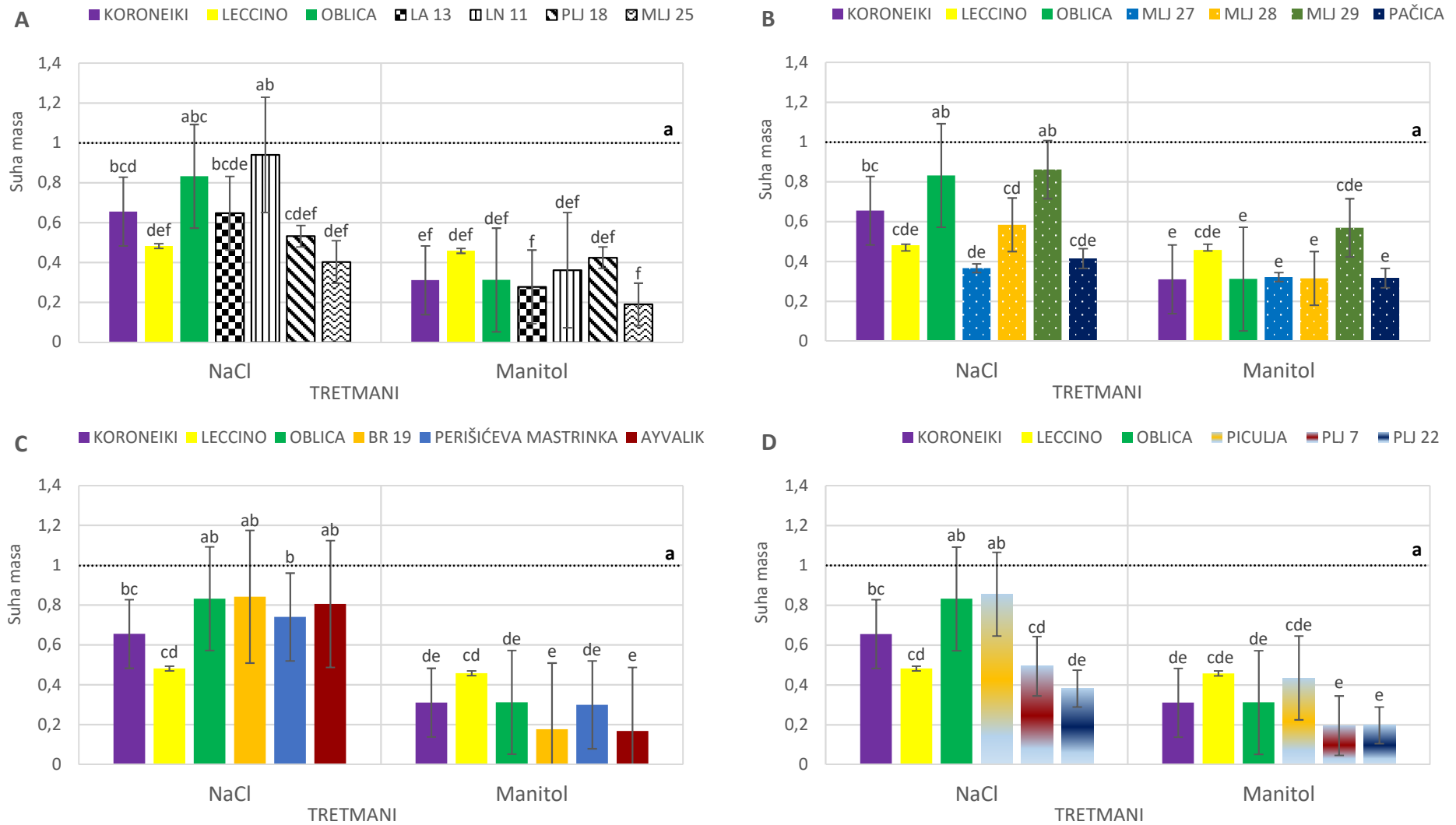
Rezultati za suhu masu izboja su sukladni rezultatima dužine izboja i površine lista izboja. Suha masa izboja bila je pod signifikantno većim utjecajem tretmana suše u odnosu na tretman povišenog saliniteta neovisno o promatranom genotipu. Od standardnih kultivara, kultivar 'Oblica' jedini nije imao signifikatno razliku u suhoj masi izboja u tretmanu povišenog saliniteta neovisno o promatranoj grupi (Slika 17).

U grupi izvorno divljih maslina signifikantan utjecaj imala su oba tretmana na sve genotipove osim na genotip LN 11 u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 17A).

U grupi hrvatskih kultivara kod genotipa MLJ 29 nije zabilježena signifikatna redukcija suhe mase izboja u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 17B).

Tretman povišenog saliniteta nije signifikantno utjecao na genotip BR 19 i kultivar 'Ayvalik' u grupi inozemnih kultivara (Slika 17C).

Kod grupe hibridnih maslina jedino je kultivar 'Piculja' imao vrijednosti slične kontroli u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 17D).



Slika 17: Relativna suha masa (originalni podatci u g – Tablica S1) izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.2.4. Relativna površina izboja, promjer izboja i suha masa korijena

Rezultati površine i promjera izboja te suhe mase korijena tablično su posložene prema svakoj grupi zasebno i sukladno tome su interpretirani. Općenito, tretman suše pokazao je jači utjecaj na promatrane parametre rasta kod većine kultiviranih i divljih maslina (Tablica 11).

U grupi izvorno divljih maslina na parametar površine izboja signifikantno je utjecao tretman suše kod svih genotipova, a kod genotipa MLJ 25 i tretman povišenog saliniteta. Kod promjera izboja signifikantno veći utjecaj imao je tretman suše, dok je za kultivar 'Koroneiki' i genotip MLJ 25 signifikantan utjecaj imao i tretman povišenog saliniteta. Suha masa korijena nije se signifikantno razlikovala od kontrolnog tretmana neovisno o promatranom genotipu ili primjenjenom tretmanu (Tablica 11).

U grupi hrvatskih kultivara tretman suše je imao signifikantno veći utjecaj od tretmana povišenog saliniteta kao i kod standardnih kultivara 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' za parametar površine izboja. Taj je parametar bio značajno snižen i u tretmanu povišenog saliniteta kod kultivara 'Pačica' i genotipa MLJ 28. Tretman povišenog saliniteta i suše uzrokovao je signifikantnu redukciju promjera izboja kod kultivara 'Koroneiki', 'Pačica' i genotipa MLJ 28. Kultivar 'Pačica' jedini je imao signifikantno niže vrijednosti suhe mase korijena u tretmanu suše (Tablica 12).

U grupi inozemnih kultivara na površinu izboja signifikantan utjecaj je imao tretman suše osim kod kultivara 'Leccino' na kojeg je signifikantno utjecao i tretman povišenog saliniteta. Promjer izboja signifikantno je bio reduciran kod oba tretmana samo kod kultivara 'Koroneiki', dok je za genotipove BR 19, kultivar 'Perišićeva mastrinka' i 'Ayvalik' bio signifikantno reduciran u tretmanu suše. Parametar suhe mase korijena signifikantno se razlikovao samo u tretmanu povišenog saliniteta kod kultivara 'Ayvalik' gdje su vrijednosti bile signifikantno veće od kontrolnog tretmana (Tablica 13).

Kod grupe hibridnih maslina na površinu izboja signifikantno su utjecala oba tretmana osim kod kultivara 'Oblica' i 'Piculja' na koje je signifikantno utjecao samo tretman suše. Promjer izboja bio je pod utjecajem oba tretmana samo kod kultivara 'Koroneiki', dok je tretman suše signifikantno utjecao na kultivar 'Piculja' i genotipove PLJ 7 i PLJ 22. Suha masa korijena imala je signifikantno niže vrijednosti samo kod genotipa PLJ 22 (Tablica 14).

Tablica 11: Relativna površina i promjer izboja te relativna suha masa korijena 21 nakon dan izlaganja abiotским stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima divljih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Površina izboja	Promjer izboja	Suha masa
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^{ab}
	NaCl	0.72 (0.194) ^{abc}	0.72 (0.066) ^{cdefg}	0.64 (0.069) ^{ab}
	Manitol	0.29 (0.093) ^e	0.54 (0.068) ^g	0.68 (0.174) ^{ab}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^{ab}
	NaCl	0.65 (0.0187) ^{bcd}	0.99 (0.095) ^{ab}	0.62 (0.019) ^{ab}
	Manitol	0.37 (0.070) ^{de}	0.93 (0.097) ^{abc}	0.72 (0.203) ^{ab}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.038) ^a	1.00 (0.063) ^{ab}	1.00 (0.189) ^{ab}
	NaCl	0.90 (0.234) ^{ab}	1.11 (0.090) ^a	1.03 (0.368) ^{ab}
	Manitol	0.46 (0.108) ^{cde}	0.84 (0.199) ^{bcde}	0.72 (0.055) ^{ab}
LA 13	Kontrola	1.00 (0.021) ^a	1.00 (0.057) ^{ab}	1.00 (0.007) ^{ab}
	NaCl	0.72 (0.250) ^{abc}	0.87 (0.171) ^{bcd}	0.89 (0.326) ^{ab}
	Manitol	0.26 (0.036) ^e	0.61 (0.055) ^{fg}	0.56 (0.170) ^b
LN 11	Kontrola	1.00 (0.034) ^a	1.00 (0.138) ^{ab}	1.00 (0.010) ^{ab}
	NaCl	0.89 (0.229) ^{ab}	1.07 (0.072) ^a	0.77 (0.239) ^{ab}
	Manitol	0.34 (0.117) ^e	0.72 (0.121) ^{cdefg}	0.92 (0.198) ^{ab}
PLJ 18	Kontrola	1.00 (0.034) ^a	1.00 (0.138) ^{ab}	1.00 (0.010) ^{ab}
	NaCl	0.77 (0.116) ^{ab}	0.83 (0.048) ^{bcde}	0.81 (0.174) ^{ab}
	Manitol	0.41 (0.205) ^{de}	0.71 (0.184) ^{defg}	1.15 (0.76) ^a
MLJ 25	Kontrola	1.00 (0.034) ^a	1.00 (0.138) ^{ab}	1.00 (0.010) ^{ab}
	NaCl	0.42 (0.18) ^{de}	0.78 (0.080) ^{cdef}	0.74 (0.026) ^{ab}
	Manitol	0.22 (0.09) ^e	0.64 (0.130) ^{efg}	0.75 (0.073) ^{ab}

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman je normaliziran na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani u Tablici S1.

Tablica 12: Relativna površina i promjer izboja te relativna suha masa korijena nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hrvatskih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Površina izboja	Promjer izboja	Suha masa
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^a
	NaCl	0.72 (0.194) ^{abcd}	0.72 (0.066) ^{cde}	0.64 (0.069) ^{ab}
	Manitol	0.29 (0.093) ^{de}	0.54 (0.068) ^e	0.68 (0.174) ^{ab}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^a
	NaCl	0.65 (0.0187) ^{abcd}	0.99 (0.095) ^{ab}	0.62 (0.019) ^{ab}
	Manitol	0.37 (0.070) ^{cde}	0.93 (0.097) ^{abc}	0.72 (0.203) ^{ab}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.038) ^a	1.00 (0.063) ^{ab}	1.00 (0.189) ^a
	NaCl	0.90 (0.234) ^{ab}	1.11 (0.090) ^a	1.03 (0.368) ^a
	Manitol	0.46 (0.108) ^{bcde}	0.83 (0.199) ^{bcd}	0.72 (0.055) ^{ab}
Mljet 27	Kontrola	1.00 (0.033) ^a	1.00 (0.048) ^{ab}	1.00 (0.033) ^a
	NaCl	0.78 (0.462) ^{abc}	0.86 (0.067) ^{bcd}	0.97 (0.559) ^a
	Manitol	0.54 (0.134) ^{bcde}	0.70 (0.227) ^{de}	0.86 (0.304) ^a
Mljet 28	Kontrola	1.00 (0.062) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.034) ^a
	NaCl	0.33 (0.050) ^{cde}	0.67 (0.053) ^{de}	0.77 (0.262) ^{ab}
	Manitol	0.12 (0.061) ^e	0.53 (0.052) ^e	0.76 (0.161) ^{ab}
Mljet 29	Kontrola	1.00 (0.046) ^a	1.00 (0.036) ^{ab}	1.00 (0.036) ^a
	NaCl	0.93 (0.636) ^{ab}	0.96 (0.142) ^{ab}	0.86 (0.090) ^a
	Manitol	0.54 (0.209) ^{bcde}	0.84 (0.095) ^{bcd}	0.69 (0.068) ^{ab}
Pačica 17	Kontrola	1.00 (0.049) ^a	1.00 (0.072) ^{ab}	1.00 (0.024) ^a
	NaCl	0.46 (0.177) ^{bcde}	0.68 (0.167) ^{de}	0.78 (0.100) ^a
	Manitol	0.31 (0.102) ^{de}	0.50 (0.071) ^e	0.41 (0.130) ^b

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman je normaliziran na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani u Tablici S1.

Tablica 13: Relativna površina i promjer izboja te relativna suha masa korijena nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima inozemnih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Površina izboja	Promjer izboja	Suha masa
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^{bcde}
	NaCl	0.72 (0.194) ^{abc}	0.72 (0.066) ^{cd}	0.64 (0.069) ^{de}
	Manitol	0.29 (0.093) ^d	0.54 (0.068) ^{ef}	0.68 (0.174) ^{de}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^{bcde}
	NaCl	0.65 (0.0187) ^{bc}	0.99 (0.095) ^{ab}	0.62 (0.019) ^e
	Manitol	0.37 (0.070) ^d	0.93 (0.097) ^b	0.72 (0.203) ^{cde}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.038) ^a	1.00 (0.063) ^{ab}	1.00 (0.189) ^{bcde}
	NaCl	0.90 (0.234) ^{ab}	1.11 (0.090) ^a	1.03 (0.368) ^{abcd}
	Manitol	0.46 (0.108) ^{cd}	0.83 (0.199) ^{bc}	0.72 (0.055) ^{cde}
Brijuni 19	Kontrola	1.00 (0.118) ^a	1.00 (0.318) ^{ab}	1.00 (0.086) ^{bcde}
	NaCl	0.93 (0.292) ^a	0.99 (0.060) ^{ab}	1.10 (0.271) ^{abc}
	Manitol	0.19 (0.053) ^d	0.49 (0.027) ^{ef}	0.75 (0.147) ^{cde}
Perišićeva mastrinka	Kontrola	1.00 (0.054) ^a	1.00 (0.061) ^{ab}	1.00 (0.180) ^{bcde}
	NaCl	0.84 (0.149) ^{ab}	0.88 (0.057) ^b	1.18 (0.118) ^{ab}
	Manitol	0.30 (0.096) ^d	0.60 (0.146) ^{de}	0.89 (0.119) ^{bcde}
Ayvalik	Kontrola	1.00 (0.291) ^a	1.00 (0.062) ^{ab}	1.00 (0.094) ^{bcde}
	NaCl	0.88 (0.037) ^{ab}	0.89 (0.023) ^b	1.39 (0.282) ^a
	Manitol	0.23 (0.103) ^d	0.42 (0.081) ^f	0.95 (0.374) ^{bcde}

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani u Tablici S1.

Tablica 14: Relativna površina i promjer izboja te relativna suha masa korijena nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hibridnih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Površina izboja	Promjer izboja	Suha masa
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^{abc}
	NaCl	0.72 (0.194) ^{bc}	0.72 (0.066) ^{cde}	0.64 (0.069) ^{abc}
	Manitol	0.29 (0.093) ^{ef}	0.54 (0.068) ^e	0.68 (0.174) ^{abc}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^{abc}
	NaCl	0.65 (0.0187) ^c	0.99 (0.095) ^{ab}	0.62 (0.019) ^{bc}
	Manitol	0.37 (0.070) ^{def}	0.93 (0.097) ^{abc}	0.72 (0.203) ^{abc}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.038) ^a	1.00 (0.063) ^{ab}	1.00 (0.189) ^{abc}
	NaCl	0.90 (0.234) ^{ab}	1.11 (0.090) ^a	1.03 (0.368) ^{abc}
	Manitol	0.46 (0.108) ^{cdef}	0.83 (0.199) ^{bcd}	0.72 (0.055) ^{abc}
Piculja 17	Kontrola	1.00 (0.047) ^a	1.00 (0.057) ^{ab}	1.00 (0.049) ^{abc}
	NaCl	0.93 (0.016) ^{ab}	0.88 (0.082) ^{bc}	0.70 (0.301) ^{abc}
	Manitol	0.57 (0.254) ^{cd}	0.61 (0.134) ^e	0.69 (0.135) ^{abc}
Pelješac 7	Kontrola	1.00 (0.045) ^a	1.00 (0.021) ^{ab}	1.00 (0.043) ^{abc}
	NaCl	0.55 (0.107) ^{cde}	0.87 (0.109) ^{bcd}	1.05 (0.437) ^{ab}
	Manitol	0.24 (0.072) ^f	0.67 (0.108) ^{de}	0.77 (0.363) ^{abc}
Pelješac 22	Kontrola	1.00 (0.079) ^a	1.00 (0.110) ^{ab}	1.00 (0.074) ^{abc}
	NaCl	0.56 (0.202) ^{cd}	0.97 (0.198) ^{ab}	1.14 (0.168) ^a
	Manitol	0.26 (0.010) ^f	0.60 (0.082) ^e	0.53 (0.087) ^c

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S1.

5.3. Sadržaj iona u listu i korijenu masline

Kao i kod morfometrijskih mjerenja, unutar svake skupine kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' su predstavljali standarde. Ionski sadržaj natrija i klora u listovima izboja i korijenu prikazani su grafički kao parametri na koje su primjenjeni tretmani imali najveći utjecaj. Ostali ioni (K, Ca i Mg) mjereni u listovima izboja i korijenu prikazani su tablično.

5.3.1. Relativan sadržaj natrija u listu izboja

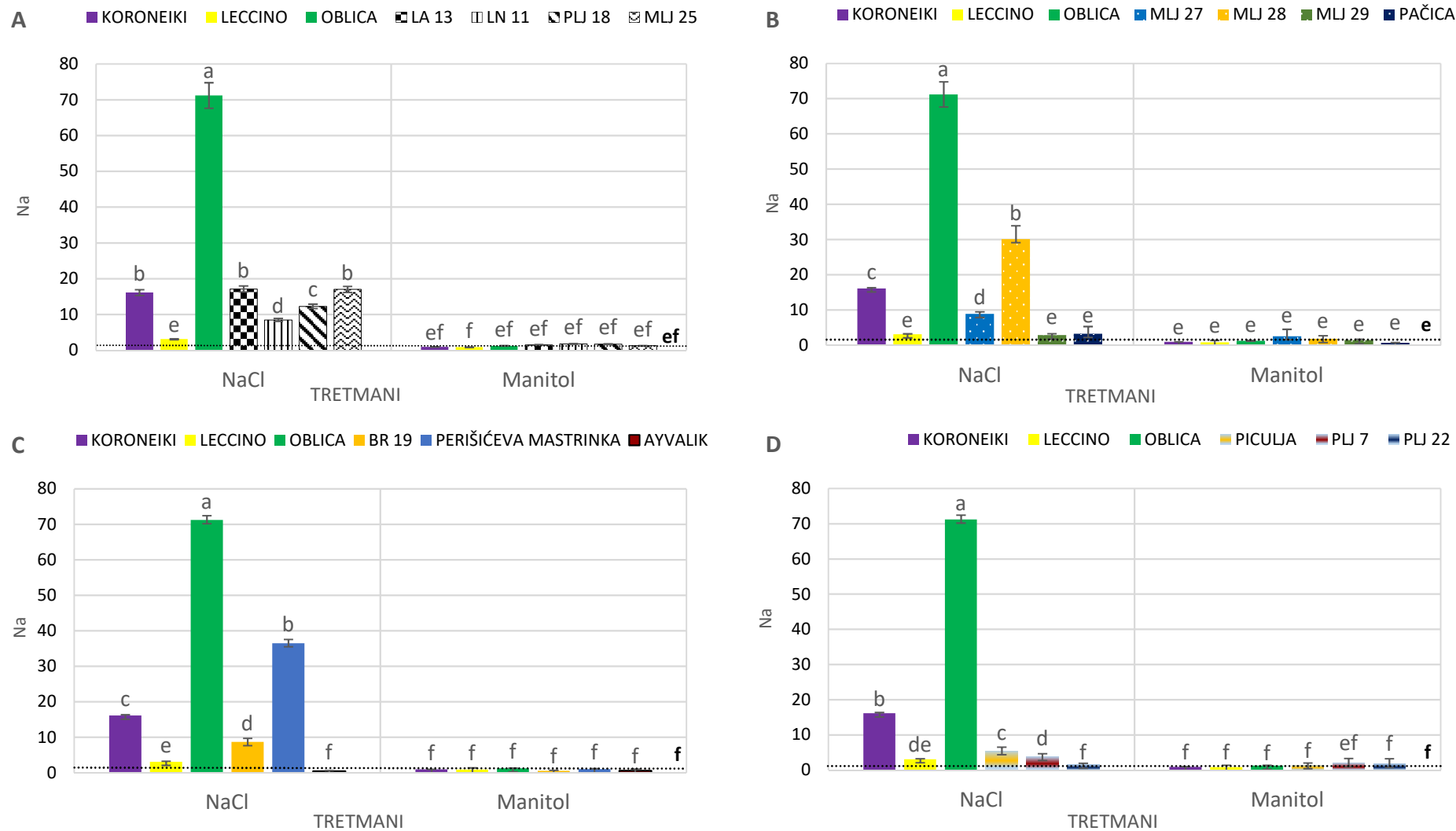
Signifikantno povišene vrijednosti natrija u listovima izboja zabilježene su kod tretmana povišenog saliniteta dok u tretmanu suše ni jedan genotip nije imao povišene vrijednosti tog iona neovisno o grupi. Kod standardnih kultivara 'Koroneki' i 'Oblica' vrijednosti su značajne kod svih promatranih grupa, dok je standardni kultivar 'Leccino' imao značajno povišene vrijednosti u grupi inozemnih kultivara i grupi hibridnih maslina (Slika 18).

Svi genotipovi grupe izvorno divljih maslina u tretmanu povišenog saliniteta imali su značajno povišene vrijednosti natrija u listovima izboja (Slika 18A).

U grupi hrvatskih kultivara samo su genotipovi MLJ 27 i MLJ 28 imali značajno povišene vrijednosti natrija u listovima izboja (Slika 18B).

U grupi inozemnih kultivara značajno povišene vrijednosti natrija u listovima izboja imali su kultivar 'Perišićeva mastrinka' i genotip BR 19 (Slika 18C).

Kultivar 'Piculja' i genotip PLJ 7 imali su značajno povišene vrijednosti natrija u listovima izboja za grupu hibridnih maslina (Slika 18D).



Slika 18: Relativan sadržaj Na (originalni podatci u mg/g – Tablica S2) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.3.2. Relativan sadržaj natrija u korijenu

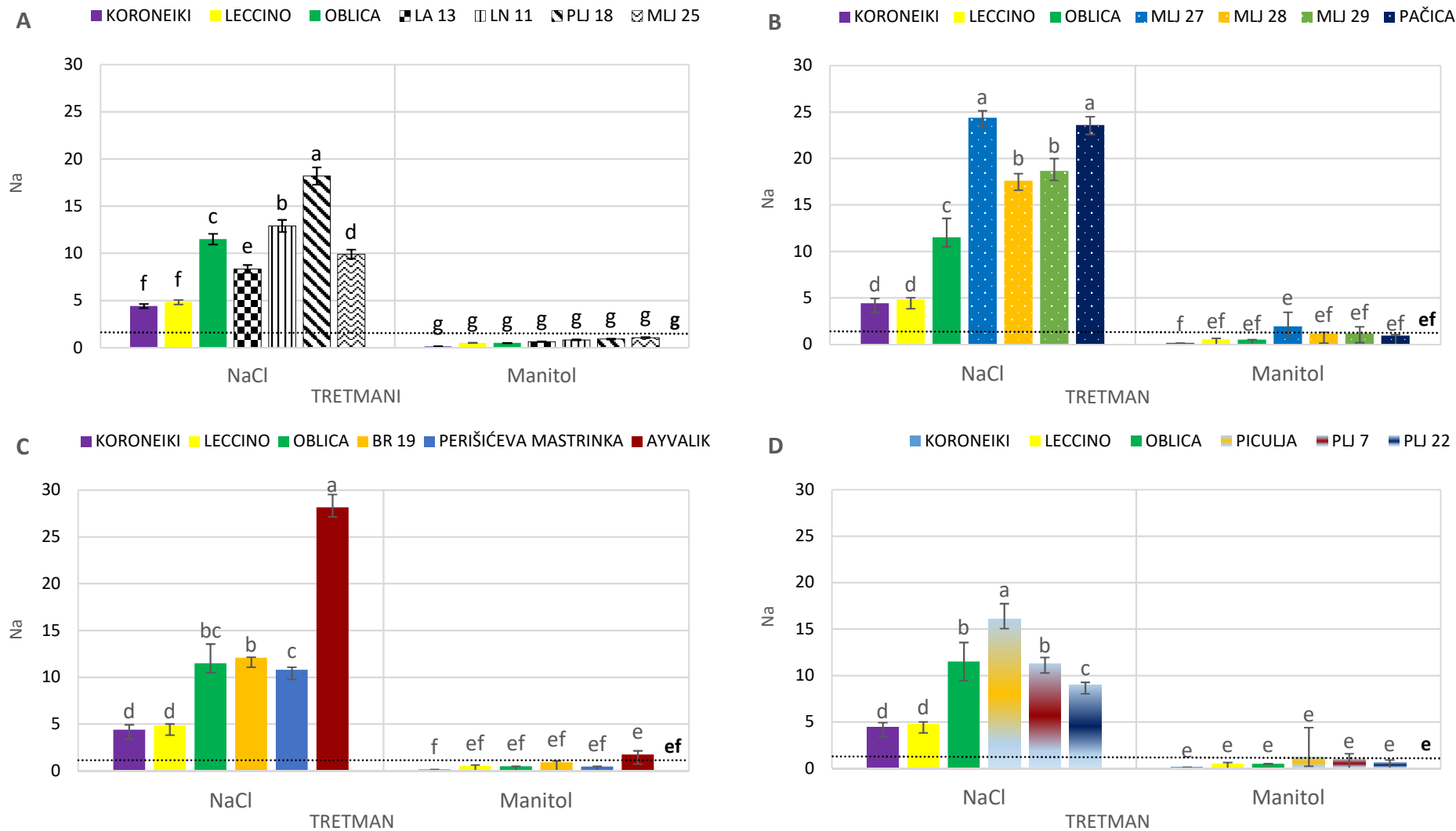
Za razliku od tretmana suše, tretman povišenog saliniteta doveo je do signifikantnog nakupljanja natrija u korijenu divljih i kultiviranih maslina neovisno o grupi. No, sadržaj natrija u korijenu standardnih kultivara 'Koroneiki' i 'Leccino' bio je značajno niži od sadržaja tog iona u korijenu kultivara 'Oblica' kao i svim drugim genotipovima maslina neovisno o grupi. je (Slika 19).

Svi genotipovi grupe izvorno divljih maslina u tretmanu povišenog saliniteta imali su signifikantno povišene vrijednosti natrija u korijenu s najvišom ostvarenom vrijednosti kod genotipa PLJ 18 (Slika 19A).

Genotipovi MLJ 27 i kultivar 'Pačica' imali su signifikantno najviše vrijednosti natrija u korijenu u usporedbi s vrijednostima tog iona u korijenu drugih maslina iz grupe hrvatskih kultivara (Slika 19B).

Kultivar 'Ayvaalik' imao je signifikantno najviše vrijednosti natrija u korijenu u usporedbi s vrijednostima tog iona u korijenu drugih maslina u grupi inozemnih kultivara (Slika 19C).

Kultivar 'Piculja' imao je signifikantno najviše vrijednosti natrija u korijenu u usporedbi s vrijednostima tog iona u korijenu drugih maslina iz grupe hibridnih maslina (Slika 19D).



Slika 19: Relativan sadržaj Na (originalni podatci u mg/g – Tablica S2) u korijenu masline nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.3.3. Relativan sadržaj klora u listu

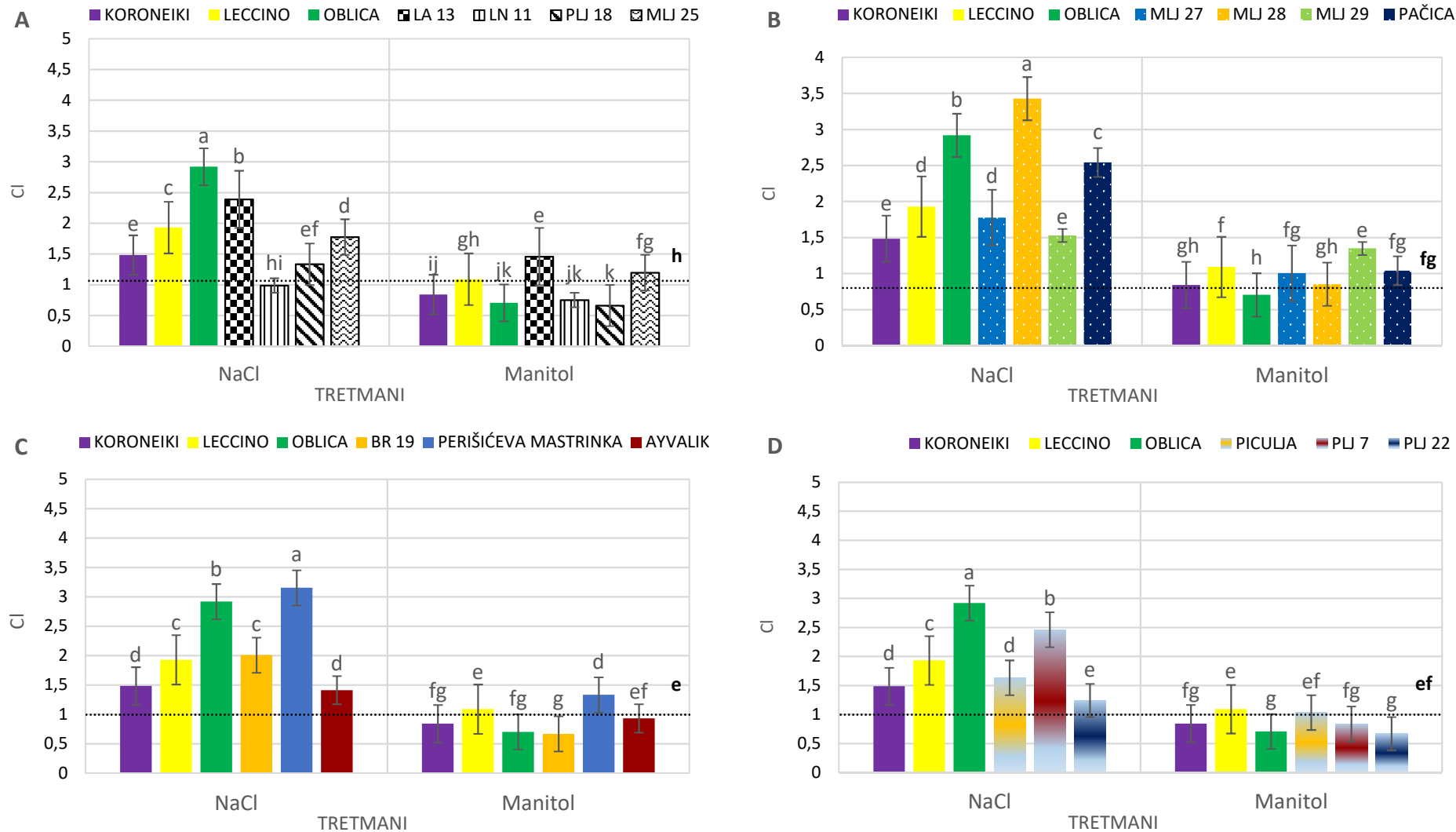
Općenito, sadržaj klora u listovima izboja maslina izloženih tretmanu povišenog saliniteta bio je uglavnom signifikantno povišen, a u onima izloženim tretmanu suše sadržaj tog iona bio je najčešće značajno snižen ili sličan kontrolnom tretmanu. Standardni kultivari 'Koroneiki', 'Oblica' i 'Leccino' izloženi tretmanu povišenog saliniteta imali su signifikantno povišene vrijednosti klora kod svih promatranih grupa (Slika 20).

Svi genotipovi grupe izvorno divljih maslina osim genotipa LN 11 u tretmanu povišenog saliniteta imali su signifikantno povišene vrijednosti klora u listovima izboja (Slika 20A). U tretmanu suše utvrđene su signifikantno niže vrijednosti klora u listovima izboja standardnih kultivara 'Koroneiki' i 'Oblica' te listovima genotipova LN 11 i PLJ 18; genotip MLJ 25 imao je signifikantno povišene vrijednosti tog iona (Slika 20A).

U grupi hrvatskih kultivara zabilježene su signifikantno povišene vrijednosti klora u listovima svih genotipova izloženih tretmanu povišenog saliniteta. Kod tretmana suše, sadržaj tog iona u listovima izboja kultivara 'Oblica' bio je signifikantno niži, a u listovima genotipa MLJ 29 signifikantno viši u usporedbi s drugim genotipovima iz te grupe (Slika 20B).

U grupi inozemnih kultivara svi genotipovi su imali signifikantno povišene vrijednosti klora u tretmanu povišenog saliniteta. U tretmanu suše kultivari 'Koroneiki' i 'Oblica' te genotip BR 19 imali su signifikantno niže vrijednosti klora dok je kultivar 'Perišićeva mastrinka' imao signifikantno povišene vrijednosti tog iona u listovima izboja (Slika 20C).

Sadržaj klora u listovima izboja genotipa PLJ 22 izloženog tretmanu povišenog saliniteta bio je sličan onome u kontrolnom tretmanu, a u listovima izboja kod ostalih genotipova grupe hibridnih maslina bio je signifikantno povišen. Što se tiče tretmana suše, signifikantno niže vrijednosti klora zabilježene su u listovima kultivara 'Oblica' i genotipa PLJ 22 (Slika 20D).



Slika 20: Relativan sadržaj Cl (originalni podatci u mg/g – Tablica S2) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.3.4. Relativan sadržaj klora u korijenu

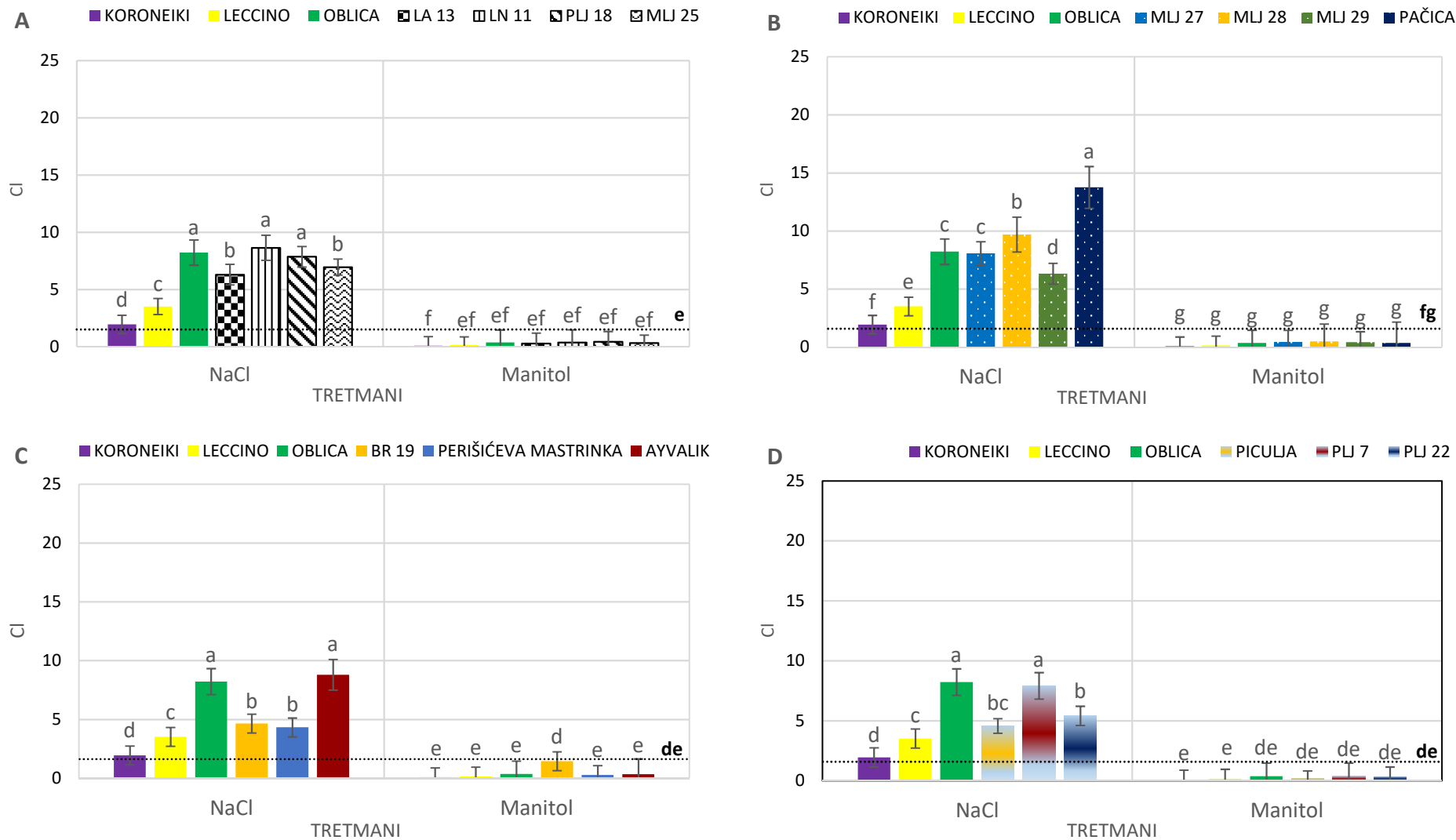
Signifikantno povišene vrijednosti klora u korijenu zabilježene su samo kod tretmana povišenog saliniteta za sve grupe. Standardni kultivari 'Oblica' i 'Leccino' imali su signifikantno povišene vrijednosti klora kod svih promatranih grupa u tretmanu povišenog saliniteta, za razliku od kultivara 'Koroneiki' u čijem je korijenu sadržaj klora bio sličan kontrolnim vrijednostima (Slika 21).

Svi genotipovi grupe izvorno divljih maslina u tretmanu povišenog saliniteta imali su signifikantno povišene vrijednosti klora u korijenu. U tretmanu suše samo je kultivar 'Koroneiki' imao signifikantno niže vrijednosti klora u korijenu (Slika 21A).

U grupi hrvatskih kultivara svi genotipovi, osim kultivara 'Koroneiki', su imali signifikantno povišene vrijednosti klora u korijenu u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 21B).

Kao i kod prethodne grupe, u grupi inozemnih kultivara svi genotipovi (osim kultivara 'Koroneiki') su imali signifikantno povišene vrijednosti klora u korijenu u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 21C).

U grupi hibridnih maslina svi genotipovi, izuzev kultivara 'Koroneiki', su imali signifikantno povišene vrijednosti klora u korijenu u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 21D).



Slika 21: Relativan sadržaj Cl (originalni podatci u mg/g – Tablica S2) u korijenu masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.3.5. Relativan sadržaj iona magnezija, kalcija i kalija te curenje kalija u listu

Rezultati relativnog sadržaja iona magnezija, kalcija i kalija te curenje kalija u listovima izboja i korijena masline tablično su posložene prema svakoj grupi zasebno i sukladno tome su interpretirani. U pravilu (s nekoliko iznimaka) oba tretmana su negativno utjecala na sadržaj magnezija, a manje promjene su uzrokovali u sadržaju kalcija i kalija u listovima izboja maslina.

U grupi izvorno divljih maslina (Tablica 15) za sve genotipove zabilježene su signifikantno niže vrijednosti magnezija u oba tretmana, s iznimkom genotipa LA 13 gdje su zabilježene signifikantno povišene vrijednosti tog iona. U tretmanu suše signifikantno niže vrijednosti vrijednosti iona kalcija zabilježene su kod svih standardnih kultivara, a signifikantno povišene kod genotipova LN 11 i MLJ 25. U tretmanu povišenog saliniteta kultivari 'Koroneiki' i 'Oblica' te genotip LA 13 imali su signifikatno niže vrijednosti kalcija. Signifikatno niže vrijednosti kalija kod oba tretmana zabilježeno su samo kod kultivara 'Koroneiki', a kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta. Genotipovi LN 11, PLJ 18 i MLJ 25 imali su signifikantno niže vrijednosti kalija samo kod tretmana suše. Kod parametra curenja kalija iz lista izboja jedina signifikantna povišena vrijednost zabilježena je kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta i genotipa LN 11 u tretmanu suše (Tablica 15).

Kod grupe hrvatskih kultivara signifikantno niže vrijednosti vrijednosti magnezija zabilježene su kod kultivara 'Leccino' i 'Oblica' u oba tretmana, kod kultivara 'Koroneiki' u tretmanu suše te kod genotipova MLJ 28 i MLJ 29 u tretmanu povišenog saliniteta. Št se tiče sadržaja iona kalcija, niže vrijednosti su zabilježene samo kod kultivara 'Oblica'. . Signifikantno niže vrijednosti kalija u oba tretmana zabilježene su u listovima kultivara 'Koroneiki', dok je sadržaj tog iona bio značajno niži od kontrole u listovima kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta i u listovima kultivara 'Pačica' u tretmanu suše. Kod parametra curenja kalija iz lista izboja signifikantno povišene vrijednosti u odnosu na kontrolni tretman zabilježene su kod kultivara 'Oblica' i 'Pačica' u tretmanu povišenog saliniteta (Tablica 16).

U grupi inozemnih kultivara vrijednosti iona magnezija bile su signifikantno niže u oba tretmana za sve genotipove, izuzev kod kultivara 'Ayvalik' u tretmanu povišenog saliniteta gdje su vrijednosti tog iona bile slične kontrolnim vrijednostima. Ioni kalcija bili su signifikantno niži u oba tretmana za kultivare 'Koroneiki', 'Oblica' i 'Perišićeva mastrinka', dok je kultivar 'Leccino' zabilježio signifikantno niže vrijednosti kod tretmana suše. Vrijednosti kalija bile su signifikantno niže u oba tretmana kod kultivara 'Koroneiki', te kod kultivara Perišićeva

mastrinka', 'Ayvalik' i genotipa BR 19 u tretmanu suše. Kod kultivara 'Oblica' zabilježene su signifikantno niže vrijednosti kalija u tretmanu povišenog saliniteta. Signifikantno povišene vrijednosti curenja kalija zabilježene su kod kultivara 'Perišićeva mastrinka' u oba tretmana i kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta (Tablica 17).

U grupi hibridnih maslina signifikantno snižene vrijednosti magnezija zabilježene su kod svih standardnih kultivara u oba tretmana ,kod kultivara 'Piculja' u tretmanu povišenog saliniteta i genotipa PLJ 22 u tretmanu suše. Signifikantno niže vrijednosti iona kalcija zabilježene su u listovima kultivara 'Koroneiki', 'Oblica', 'Piculja' u oba tretmana zai u listovima kultivara 'Leccino' u tretmanu suše, dok su u listovima genotipa PLJ 7 utvrđene signifikantno povišene vrijednosti kalcija. Vrijednosti iona kalija signifikantno su bile snižene u listovima kultivara 'Koroneiki' u oba tretmana , u listovima genotipa PLJ 7, genotipa PLJ 22 i kultivara 'Piculja' u tretmanu suše, te listovima kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta. Kod parametra curenja kalija iz lista izboja signifikantna povišena vrijednost zabilježena je samo kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta (Tablica 18).

Tablica 15: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija), te curenje kalija izmjerenih u listu izboja maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima divljih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Curenje kalija (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{b*}	1.00 (0.038) ^{cd}	1.00 (0.029) ^{ab}	1.00 (0.343) ^c
	NaCl	0.80 (0.010) ^c	0.77 (0.033) ^{ef}	0.71 (0.012) ^f	1.32 (0.422) ^{bc}
	Manitol	0.62 (0.038) ^{def}	0.69 (0.009) ^{fg}	0.59 (0.010) ^g	1.06 (0.439) ^c
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^b	1.00 (0.049) ^{cd}	1.00 (0.090) ^{ab}	1.00 (0.167) ^c
	NaCl	0.75 (0.088) ^{cd}	0.88 (0.084) ^{cdef}	0.95 (0.039) ^{abc}	1.61 (0.205) ^{bc}
	Manitol	0.62 (0.022) ^{ef}	0.72 (0.090) ^{fg}	0.93 (0.096) ^{abcd}	1.34 (0.382) ^{bc}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.038) ^b	1.00 (0.063) ^{cd}	1.00 (0.189) ^{ab}	1.00 (0.171) ^c
	NaCl	0.73 (0.081) ^{cde}	0.36 (0.016) ^{hi}	0.87 (0.038) ^{cde}	2.90 (0.674) ^a
	Manitol	0.55 (0.009) ^f	0.27 (0.011) ⁱ	1.01 (0.059) ^a	1.72 (0.020) ^{bc}
LA 13	Kontrola	1.00 (0.021) ^b	1.00 (0.057) ^{cd}	1.00 (0.007) ^{ab}	1.00 (0.503) ^c
	NaCl	0.55 (0.117) ^f	0.54 (0.038) ^{gh}	0.95 (0.007) ^{abc}	1.30 (0.211) ^{bc}
	Manitol	1.64 (0.144) ^a	0.94 (0.049) ^{cde}	0.99 (0.077) ^{ab}	1.75 (0.529) ^{bc}
LN 11	Kontrola	1.00 (0.034) ^b	1.00 (0.138) ^{cd}	1.00 (0.010) ^{ab}	1.00 (0.396) ^c
	NaCl	0.76 (0.017) ^c	1.08 (0.107) ^{bc}	0.94 (0.033) ^{abc}	1.30 (0.185) ^{bc}
	Manitol	0.73 (0.039) ^{cde}	1.33 (0.173) ^a	0.86 (0.034) ^{de}	2.08 (1.024) ^b
PLJ 18	Kontrola	1.00 (0.034) ^b	1.00 (0.138) ^{cd}	1.00 (0.010) ^{ab}	1.00 (0.155) ^c
	NaCl	0.63 (0.044) ^{def}	0.80 (0.141) ^{def}	0.99 (0.021) ^{ab}	1.71 (0.529) ^{bc}
	Manitol	0.80 (0.056) ^c	1.08 (0.248) ^{bc}	0.82 (0.014) ^e	1.53 (0.411) ^{bc}
MLJ 25	Kontrola	1.00 (0.034) ^b	1.00 (0.138) ^{cd}	1.00 (0.010) ^{ab}	1.00 (0.581) ^c
	NaCl	0.57 (0.031) ^f	0.99 (0.100) ^{cd}	0.92 (0.026) ^{bcd}	1.16 (0.134) ^c
	Manitol	0.53 (0.086) ^f	1.22 (0.159) ^{ab}	0.85 (0.073) ^{de}	1.15 (0.325) ^c

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S3.

Tablica 16: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija), te curenje kalija izmjerenih u listu izboja maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hrvatskih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Curenje kalija (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^{abc}	1.00 (0.343) ^{cd}
	NaCl	0.80 (0.010) ^{abcd}	0.77 (0.033) ^{abcd}	0.71 (0.012) ^f	1.32 (0.422) ^{bcd}
	Manitol	0.62 (0.038) ^{de}	0.69 (0.009) ^{bcd}	0.59 (0.010) ^g	1.06 (0.439) ^{cd}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^{abc}	1.00 (0.167) ^{cd}
	NaCl	0.75 (0.088) ^{bcde}	0.88 (0.084) ^{abc}	0.95 (0.039) ^{abcd}	1.61 (0.205) ^{bc}
	Manitol	0.62 (0.022) ^{de}	0.72 (0.090) ^{abcd}	0.93 (0.096) ^{abcd}	1.34 (0.382) ^{bcd}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.033) ^a	1.00 (0.016) ^{ab}	1.00 (0.048) ^{ab}	1.00 (0.171) ^{cd}
	NaCl	0.73 (0.081) ^{cde}	0.36 (0.016) ^{cd}	0.87 (0.038) ^{de}	2.90 (0.674) ^a
	Manitol	0.55 (0.009) ^e	0.27 (0.011) ^d	1.01 (0.059) ^a	1.72 (0.020) ^{bc}
Mljet 27	Kontrola	1.00 (0.144) ^a	1.00 (0.059) ^{ab}	1.00 (0.045) ^{abc}	1.00 (0.172) ^{cd}
	NaCl	0.80 (0.016) ^{abcd}	1.11 (0.397) ^{ab}	0.98 (0.026) ^{abcd}	1.07 (0.394) ^{cd}
	Manitol	0.94 (0.025) ^{abc}	1.20 (0.168) ^{ab}	0.88 (0.023) ^{cde}	0.97 (0.225) ^{cd}
Mljet 28	Kontrola	1.00 (0.143) ^a	1.00 (0.119) ^{ab}	1.00 (0.023) ^{abc}	1.00 (0.218) ^{cd}
	NaCl	0.70 (0.035) ^{de}	0.82 (0.199) ^{abcd}	0.95 (0.019) ^{abcd}	1.60 (0.814) ^{bc}
	Manitol	0.97 (0.415) ^{ab}	1.14 (0.199) ^{ab}	1.01 (0.213) ^{ab}	0.61 (0.302) ^d
Mljet 29	Kontrola	1.00 (0.058) ^a	1.00 (0.101) ^{ab}	1.00 (0.047) ^{abc}	1.00 (0.289) ^{cd}
	NaCl	0.73 (0.027) ^{cde}	0.83 (0.164) ^{abcd}	0.90 (0.012) ^{abcde}	1.83 (0.748) ^{bc}
	Manitol	0.79 (0.030) ^{abcd}	1.08 (0.092) ^{ab}	0.88 (0.017) ^{bcde}	1.39 (0.232) ^{bcd}
Pačica 17	Kontrola	1.00 (0.192) ^a	1.00 (0.150) ^{ab}	1.00 (0.173) ^{abc}	1.00 (0.443) ^{cd}
	NaCl	0.93 (0.041) ^{abc}	0.85 (0.071) ^{abc}	0.93 (0.022) ^{abcd}	2.08 (0.953) ^b
	Manitol	0.94 (0.020) ^{abc}	1.31 (0.539) ^a	0.79 (0.006) ^{ef}	1.60 (0.432) ^{bc}

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S3.

Tablica 17: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija), te curenje kalija izmjerenih u listu izboja maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima inozemnih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Curenje kalija (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^{ab}	1.00 (0.029) ^{ab}	1.00 (0.343) ^{def}
	NaCl	0.80 (0.010) ^{bcd}	0.77 (0.033) ^{cde}	0.71 (0.012) ^e	1.32 (0.422) ^{def}
	Manitol	0.62 (0.038) ^{fg}	0.69 (0.009) ^{cde}	0.59 (0.010) ^f	1.06 (0.439) ^{def}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^{ab}	1.00 (0.090) ^{ab}	1.00 (0.167) ^{def}
	NaCl	0.75 (0.088) ^{cd}	0.88 (0.084) ^{bc}	0.95 (0.039) ^{abc}	1.61 (0.205) ^{cde}
	Manitol	0.62 (0.022) ^{fg}	0.72 (0.090) ^{cde}	0.93 (0.096) ^{abc}	1.34 (0.382) ^{def}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.033) ^a	1.00 (0.016) ^{ab}	1.00 (0.048) ^{ab}	1.00 (0.171) ^{def}
	NaCl	0.73 (0.081) ^{cde}	0.36 (0.016) ^{fg}	0.87 (0.038) ^{cd}	2.90 (0.674) ^{ab}
	Manitol	0.55 (0.009) ^g	0.27 (0.011) ^g	1.01 (0.059) ^{ab}	1.72 (0.020) ^{cd}
Brijuni 19	Kontrola	1.00 (0.096) ^a	1.00 (0.181) ^{ab}	1.00 (0.031) ^{ab}	1.00 (0.162) ^{def}
	NaCl	0.82 (0.040) ^{bc}	0.80 (0.032) ^{bcd}	0.90 (0.009) ^{bcd}	0.90 (0.123) ^{ef}
	Manitol	0.58 (0.033) ^{fg}	1.06 (0.010) ^a	0.74 (0.004) ^e	0.90 (0.314) ^{ef}
Perišićeva mastrinka	Kontrola	1.00 (0.038) ^a	1.00 (0.0630) ^{ab}	1.00 (0.099) ^{ab}	1.00 (0.305) ^{def}
	NaCl	0.66 (0.024) ^{ef}	0.56 (0.016) ^{ef}	1.03 (0.204) ^a	3.29 (0.370) ^a
	Manitol	0.64 (0.031) ^{ef}	0.61 (0.027) ^{de}	0.79 (0.056) ^{de}	2.28 (1.009) ^{bc}
Ayvalik	Kontrola	1.00 (0.068) ^a	1.00 (0.101) ^{ab}	1.00 (0.027) ^{ab}	1.00 (0.297) ^{def}
	NaCl	1.03 (0.051) ^a	1.03 (0.050) ^a	0.92 (0.007) ^{abc}	1.07 (0.241) ^{def}
	Manitol	0.85 (0.050) ^b	1.07 (0.381) ^a	0.83 (0.019) ^{cde}	0.69 (0.126) ^f

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S3.

Tablica 18: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija), te curenje kalija izmjenjenih u listu izboja maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hibridnih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)	Curenje kalija (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.029) ^{a*}	1.00 (0.038) ^b	1.00 (0.029) ^a	1.00 (0.343) ^b
	NaCl	0.80 (0.010) ^{bcd}	0.77 (0.033) ^{cde}	0.71 (0.012) ^e	1.32 (0.422) ^b
	Manitol	0.62 (0.038) ^{fg}	0.69 (0.009) ^{ef}	0.59 (0.010) ^f	1.06 (0.439) ^b
Leccino	Kontrola	1.00 (0.006) ^a	1.00 (0.049) ^b	1.00 (0.090) ^a	1.00 (0.167) ^b
	NaCl	0.75 (0.088) ^{cdef}	0.88 (0.084) ^{bcd}	0.95 (0.039) ^{abc}	1.61 (0.205) ^b
	Manitol	0.62 (0.022) ^{fg}	0.72 (0.090) ^{def}	0.93 (0.096) ^{abc}	1.34 (0.382) ^b
Oblica	Kontrola	1.00 (0.033) ^a	1.00 (0.016) ^b	1.00 (0.048) ^a	1.00 (0.171) ^b
	NaCl	0.73 (0.081) ^{def}	0.36 (0.016) ^g	0.87 (0.038) ^{bcd}	2.90 (0.674) ^a
	Manitol	0.55 (0.009) ^g	0.27 (0.011) ^g	1.01 (0.059) ^a	1.72 (0.020) ^b
Piculja 17	Kontrola	1.00 (0.021) ^a	1.00 (0.167) ^b	1.00 (0.046) ^a	1.00 (0.204) ^b
	NaCl	0.77 (0.051) ^{cde}	0.58 (0.061) ^f	0.96 (0.021) ^{ab}	1.18 (0.718) ^b
	Manitol	0.87 (0.023) ^{abc}	0.58 (0.010) ^f	0.86 (0.023) ^{cd}	0.95 (0.790) ^b
Pelješac 7	Kontrola	1.00 (0.034) ^a	1.00 (0.030) ^b	1.00 (0.029) ^a	1.00 (0.153) ^b
	NaCl	0.93 (0.083) ^{ab}	0.91 (0.125) ^{bc}	0.91 (0.089) ^{abc}	1.51 (1.024) ^b
	Manitol	0.93 (0.069) ^a	1.24 (0.173) ^a	0.77 (0.029) ^e	1.02 (0.148) ^b
Pelješac 22	Kontrola	1.00 (0.034) ^a	1.00 (0.077) ^b	1.00 (0.012) ^a	1.00 (0.308) ^b
	NaCl	0.92 (0.124) ^{ab}	0.99 (0.133) ^b	1.00 (0.069) ^a	1.15 (0.868) ^b
	Manitol	0.67 (0.123) ^{efg}	0.99 (0.135) ^b	0.79 (0.019) ^{de}	1.12 (0.751) ^b

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S3.

5.3.6. Relativan sadržaj iona magnezija, kalcija i kalija u korijenu

Općenito, oba tretmana su negativnije utjecala na sadržaj kalija nego na sadržaj kalcija i magnezija u korijenu maslina.

Vrijednosti iona magnezija u korijenu masline u grupi izvorno divljih maslina neovisno o tretmanu i genotipu nisu se statistički signifikantno razlikovale od kontrole. Signifikantno povišene vrijednosti iona kalcija zabilježene su kod kultivara 'Koroneiki' i 'Leccino' i genotipova LA 13 i MLJ 25 u tretmanu suše, dok su signifikantne niže vrijednosti tog iona zabilježene kod genotipova LN 11 i PLJ 18 u tretmanu povišenog saliniteta. Signifikantno niže vrijednosti kalija zabilježene su u oba tretmana kod kultivara 'Koroneiki', 'Leccino' i genotipova LA 13, LN 11, MLJ 25, u tretmanu povišenog saliniteta kod genotipa PLJ 18 i u tretmanu suše kod kultivara 'Oblica' (Tablica 19). Signifikantno povišene vrijednosti kalija utvrđene su kod genotipa PLJ 18 u tretmanu suše.

U grupi hrvatskih kultivara zabilježene su signifikantno povišene vrijednosti iona magnezija u korijenu kultivara 'Koroneiki' i 'Pačica' u tretmanu suše, a u korijenu genotipa MLJ 27 u oba tretmana. Vrijednosti kalcija bile su signifikantno povišene kod svih standardnih kultivara, kultivara 'Pačica' i genotipa MLJ 28 u tretmanu suše, a signifikantno niže vrijednosti tog iona zabilježene su kod genotipa MLJ 27 i kultivara 'Pačica' u tretmanu povišenog saliniteta. Signifikantno niže vrijednosti kalija zabilježene su kod svih genotipova neovisno o tretmanu (Tablica 20).

U grupi inozemnih kultivara vrijednosti iona magnezija bile su signifikantno povišene u tretmanu suše kod kultivara 'Koroneiki', 'Ayvalik' i kod genotipa BR 19. U korijenu kultivara 'Perišićeva mastrinka' zabilježene su signifikantno niže vrijednosti tog iona u oba tretmana, a u korijenu kultivara 'Ayvalik' u tretmanu povišenog saliniteta. Vrijednosti iona kalcija bile su signifikantno povišene kod genotipa BR 19 u oba tretmana, kultivara 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Perišićeva mastrinka' u tretmanu suše. Vrijednosti tog iona bile su signifikantno snižene kod kultivara 'Ayvalik' u tretmanu povišenog saliniteta. Signifikantno niže vrijednosti kalija zabilježene su kod svih genotipova neovisno o tretmanu, osim kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta gdje su vrijednosti bile slične kontrolnim (Tablica 21).

Kod grupe hibridnih maslina signifikantno povišene vrijednosti magnezija zabilježene su jedino kod kultivara 'Koroneiki' u tretmanu suše, dok su kod genotipa PLJ 7 zabilježene signifikantno niže vrijednosti tog iona u oba tretmana. Vrijednosti iona kalcija bile su signifikantno povišene kod svih standardnih kultivara u tretmanu suše, a signifikantno snižene kod genotipa PLJ 7 u

tretmanu povišenog saliniteta. Signifikantno niže vrijednosti kalija zabilježene su kod svih genotipova neovisno o tretmanu, osim kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta gdje su vrijednosti bile slične kontrolnim (Tablica 22).

Tablica 19: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija) izmjerene u korijenu maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s grupom divljih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.037) abcde*	1.00 (0.085) de	1.00 (0.042) b
	NaCl	0.99 (0.110) abcde	0.84 (0.051) ef	0.84 (0.012) cd
	Manitol	1.22 (0.061) a	1.85 (0.117) ab	0.58 (0.010) fgh
Leccino	Kontrola	1.00 (0.089) abcde	1.00 (0.020) de	1.00 (0.037) b
	NaCl	0.97 (0.218) abcde	0.97 (0.208) de	0.48 (0.009) ghi
	Manitol	0.92 (0.037) bcde	1.53 (0.102) bc	0.50 (0.158) ghi
Oblica	Kontrola	1.00 (0.113) abcde	1.00 (0.168) de	1.00 (0.011) b
	NaCl	0.95 (0.162) abcde	0.89 (0.223) def	0.90 (0.041) bc
	Manitol	0.93 (0.009) abcde	1.28 (0.089) cd	0.66 (0.039) ef
LA 13	Kontrola	1.00 (0.237) abcde	1.00 (0.033) de	1.00 (0.130) b
	NaCl	1.06 (0.088) abc	1.04 (0.152) de	0.71 (0.066) def
	Manitol	1.03 (0.119) abcd	1.52 (0.504) bc	0.50 (0.031) ghi
LN 11	Kontrola	1.00 (0.221) abcde	1.00 (0.527) de	1.00 (0.089) b
	NaCl	0.85 (0.348) cde	0.55 (0.280) fg	0.79 (0.089) cde
	Manitol	0.76 (0.204) de	1.13 (0.184) de	0.35 (0.056) i
PLJ 18	Kontrola	1.00 (0.013) abcde	1.00 (0.059) de	1.00 (0.018) b
	NaCl	0.71 (0.095) e	0.44 (0.091) g	0.56 (0.032) fgh
	Manitol	1.17 (0.221) ab	1.12 (0.176) de	1.19 (0.219) a
MLJ 25	Kontrola	1.00 (0.042) abcde	1.00 (0.048) de	1.00 (0.019) b
	NaCl	0.95 (0.039) abcde	0.77 (0.068) efg	0.63 (0.021) fg
	Manitol	1.01 (0.021) abcd	2.16 (0.311) a	0.44 (0.026) hi

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S4.

Tablica 20: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija) izmjerene u korijenu maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hrvatskih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.037) ^{cd*}	1.00 (0.085) ^e	1.00 (0.042) ^a
	NaCl	0.99 (0.110) ^{cd}	0.84 (0.051) ^e	0.84 (0.119) ^{bc}
	Manitol	1.22 (0.061) ^{ab}	1.85 (0.117) ^b	0.58 (0.010) ^{gh}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.089) ^{cd}	1.00 (0.020) ^e	1.00 (0.037) ^a
	NaCl	0.97 (0.218) ^{cd}	0.97 (0.208) ^e	0.48 (0.009) ^h
	Manitol	0.92 (0.037) ^{cd}	1.53 (0.102) ^c	0.50 (0.158) ^{gh}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.113) ^{cd}	1.00 (0.168) ^e	1.00 (0.011) ^a
	NaCl	0.95 (0.162) ^{cd}	0.89 (0.223) ^e	0.90 (0.041) ^b
	Manitol	0.93 (0.009) ^{cd}	1.28 (0.089) ^d	0.66 (0.039) ^{def}
Mljet 27	Kontrola	1.00 (0.033) ^{cd}	1.00 (0.048) ^e	1.00 (0.033) ^a
	NaCl	1.29 (0.055) ^{ab}	0.56 (0.042) ^f	0.71 (0.011) ^d
	Manitol	1.40 (0.119) ^a	1.01 (0.082) ^e	0.76 (0.062) ^{cd}
Mljet 28	Kontrola	1.00 (0.062) ^{cd}	1.00 (0.049) ^e	1.00 (0.034) ^a
	NaCl	0.95 (0.121) ^{cd}	1.11 (0.055) ^{de}	0.69 (0.011) ^{de}
	Manitol	1.09 (0.066) ^{bc}	2.25 (0.182) ^a	0.59 (0.016) ^{efg}
Mljet 29	Kontrola	1.00 (0.046) ^{cd}	1.00 (0.036) ^e	1.00 (0.036) ^a
	NaCl	0.89 (0.045) ^{cd}	0.83 (0.025) ^e	0.76 (0.032) ^{cd}
	Manitol	0.78 (0.069) ^d	1.05 (0.077) ^{de}	0.51 (0.015) ^{gh}
Pačica 17	Kontrola	1.00 (0.049) ^{cd}	1.00 (0.072) ^e	1.00 (0.024) ^a
	NaCl	0.93 (0.129) ^{cd}	0.38 (0.031) ^f	0.73 (0.017) ^d
	Manitol	1.43 (0.021) ^a	1.65 (0.361) ^{bc}	0.55 (0.016) ^{gh}

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S4.

Tablica 21: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija) izmjerene u korijenu maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima inozemnih kultivara.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.037) ^{c*}	1.00 (0.085) ^{cd}	1.00 (0.042) ^a
	NaCl	0.99 (0.110) ^c	0.84 (0.051) ^d	0.84 (0.119) ^b
	Manitol	1.22 (0.061) ^b	1.85 (0.117) ^a	0.58 (0.010) ^{cde}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.089) ^c	1.00 (0.020) ^{cd}	1.00 (0.037) ^a
	NaCl	0.97 (0.218) ^{cd}	0.97 (0.208) ^{cd}	0.48 (0.009) ^e
	Manitol	0.92 (0.037) ^{cd}	1.53 (0.102) ^b	0.50 (0.158) ^{de}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.113) ^c	1.00 (0.168) ^{cd}	1.00 (0.011) ^a
	NaCl	0.95 (0.162) ^{cd}	0.89 (0.223) ^d	0.90 (0.041) ^{ab}
	Manitol	0.93 (0.009) ^{cd}	1.28 (0.089) ^{bc}	0.66 (0.039) ^c
Brijuni 19	Kontrola	1.00 (0.118) ^c	1.00 (0.318) ^{cd}	1.00 (0.086) ^a
	NaCl	0.92 (0.128) ^{cd}	1.30 (0.405) ^b	0.52 (0.036) ^{de}
	Manitol	1.21 (0.191) ^b	2.09 (0.286) ^a	0.62 (0.112) ^{cd}
Perišićeva mastrinka	Kontrola	1.00 (0.054) ^c	1.00 (0.061) ^{cd}	1.00 (0.180) ^a
	NaCl	0.63 (0.050) ^e	0.80 (0.032) ^d	0.32 (0.039) ^f
	Manitol	0.77 (0.029) ^{de}	1.50 (0.125) ^b	0.36 (0.009) ^f
Ayvalik	Kontrola	1.00 (0.291) ^c	1.00 (0.062) ^{cd}	1.00 (0.094) ^a
	NaCl	0.68 (0.091) ^e	0.32 (0.060) ^e	0.81 (0.022) ^b
	Manitol	1.42 (0.058) ^a	0.97 (0.025) ^{cd}	0.54 (0.016) ^{de}

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S4.

Tablica 22: Relativne vrijednosti iona (magnezija, kalcija i kalija) izmjerene u korijenu maslina nakon 21 dan izlaganja abiotskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima hibridnih maslina.

GENOTIP	TRETMAN	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	K (mg/L)
Koroneiki	Kontrola	1.00 (0.037) ^{bc*}	1.00 (0.085) ^{de}	1.00 (0.042) ^a
	NaCl	0.99 (0.110) ^{bc}	0.84 (0.051) ^{ef}	0.84 (0.119) ^b
	Manitol	1.22 (0.061) ^a	1.85 (0.117) ^a	0.58 (0.010) ^{cde}
Leccino	Kontrola	1.00 (0.089) ^{bc}	1.00 (0.020) ^{de}	1.00 (0.037) ^a
	NaCl	0.97 (0.218) ^{bc}	0.97 (0.208) ^e	0.48 (0.009) ^{ef}
	Manitol	0.92 (0.037) ^c	1.53 (0.102) ^b	0.50 (0.158) ^{def}
Oblica	Kontrola	1.00 (0.113) ^{bc}	1.00 (0.168) ^{de}	1.00 (0.011) ^a
	NaCl	0.95 (0.162) ^{bc}	0.89 (0.223) ^{ef}	0.90 (0.041) ^{ab}
	Manitol	0.93 (0.009) ^c	1.28 (0.089) ^c	0.66 (0.039) ^c
Piculja 17	Kontrola	1.00 (0.047) ^{bc}	1.00 (0.057) ^{de}	1.00 (0.049) ^a
	NaCl	0.97 (0.066) ^{bc}	0.85 (0.027) ^{ef}	0.67 (0.008) ^c
	Manitol	1.12 (0.053) ^{ab}	1.18 (0.041) ^{cd}	0.47 (0.027) ^{ef}
Pelješac 7	Kontrola	1.00 (0.045) ^{bc}	1.00 (0.021) ^{de}	1.00 (0.043) ^a
	NaCl	0.59 (0.055) ^d	0.70 (0.067) ^f	0.48 (0.037) ^{ef}
	Manitol	0.67 (0.122) ^d	0.87 (0.047) ^{ef}	0.61 (0.046) ^{cd}
Pelješac 22	Kontrola	1.00 (0.079) ^{bc}	1.00 (0.110) ^{de}	1.00 (0.074) ^a
	NaCl	0.85 (0.067) ^c	0.85 (0.071) ^{ef}	0.57 (0.069) ^{cde}
	Manitol	0.89 (0.055) ^c	1.15 (0.047) ^{cd}	0.44 (0.019) ^f

*Različita slova unutar kolona označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Podaci su prikazani kao prosjek (\pm SD u zagradama), $n=3$. Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1. Sirovi podatci su prikazani Tablici S4.

5.4. Biokemijske analize

5.4.1. Relativna aktivnost superoksid dismutaze

Promjene u aktivnosti enzima superoksid dismutaze u listu zabilježena su kod gotovo svih grupa analiziranih genotipova u oba tretmana i što upućuje na disbalans u redoks reakcijama u biljnim stanicama, naročito nakon tretmana suše (Slika 22).

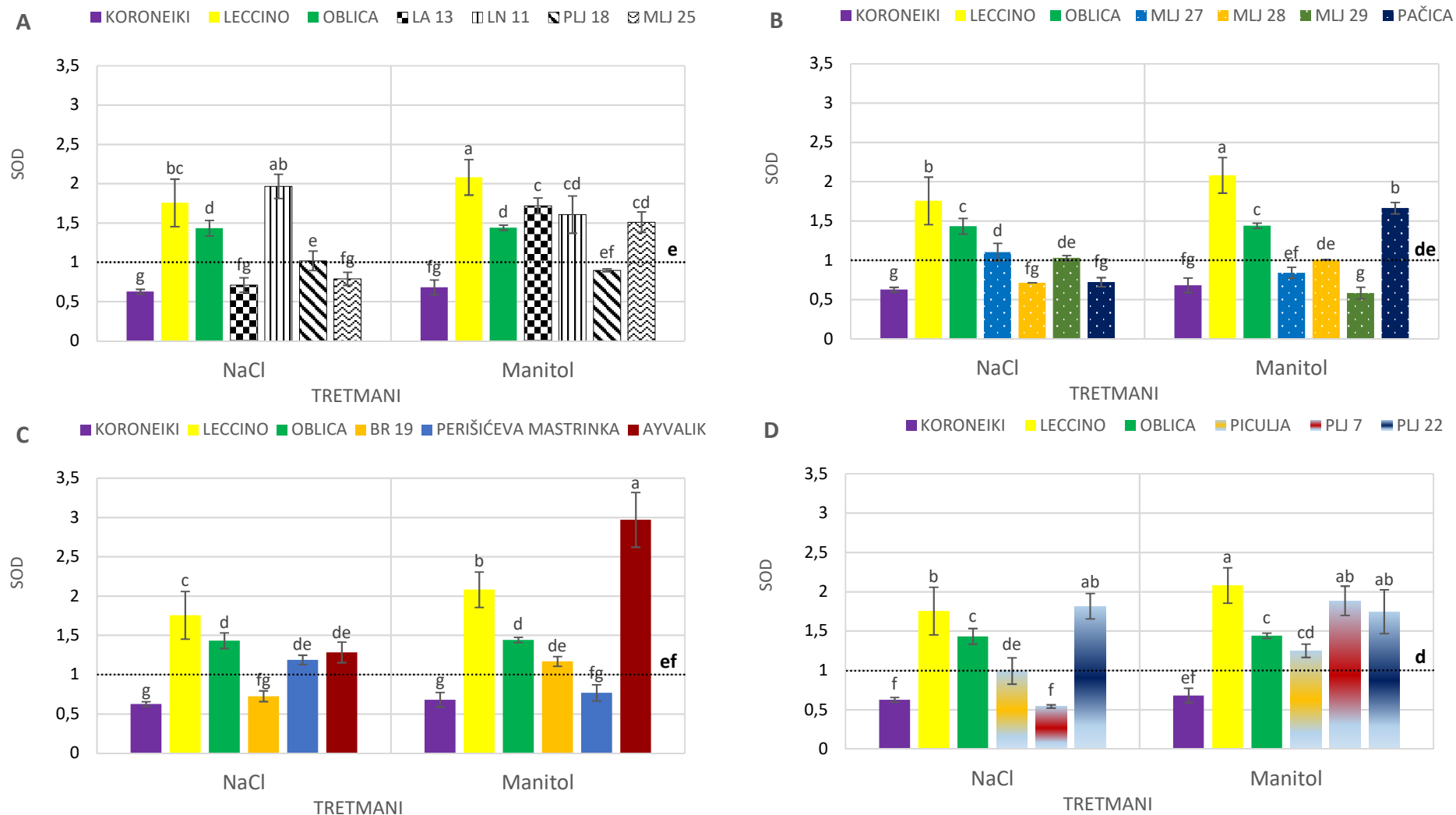
Neovisno o promatranoj grupi i primjenjenom tretmanu, standardni kultivari 'Leccino' i 'Oblica' imali su signifikantno povećanu aktivnost enzima superoksid dismutaze, a kultivar 'Koroneiki' signifikantno smanjenu aktivnost tog enzima u odnosu na kontrolu.

Kod grupe izvorno divljih maslina tretmani povišenog saliniteta i suše su signifikantno povećali aktivnost SOD u listu divljeg genotipa LN 11. Aktivnost SOD u listu genotipova LA 13 i MLJ 25 bila je bitno snižena u tretmanu povišenog saliniteta te bitno povećana u tretmanu suše (Slika 22A).

U grupi hrvatskih kultivara signifikantno povećanje aktivnosti enzima SOD zabilježeno je samo kod kultivara 'Pačica' u tretmanu suše (Slika 22B), a signifikantno smanjenje tog enzima kod kultivara 'Pačica' i genotipa MLJ28 u tretmanu povišenog saliniteta te kod genotipa MLJ 29 u tretmanu suše.

U grupi inozemnih kultivara jedino je kod kultivara 'Ayvalik' zabilježeno signifikantno povećanje aktivnosti SOD u tretmanu suše (Slika 22C).

Genotip iz grupe hibridnih maslina PLJ 22 imao je signifikantno povećanu aktivnost SOD u oba primjenjena tretmana u odnosu na kontrolu. Za genotip PLJ 7 utvrđena je signifikantno povećana aktivnost SOD u tretmanu suše te signifikantno smanjena aktivnost tog enzima u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 22D).



Slika 22: Relativna aktivnost enzima SOD (originalni podaci u U/mg proteina – Tablica S5) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.4.2. Relativna aktivnost gvajakol peroksidaze

Slično kao i kod enzima superoksid dismutaze, promjene (uglavnom inhibicija) u aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze zabilježene su kod oba tretmana i kod svih grupa (Slika 23).

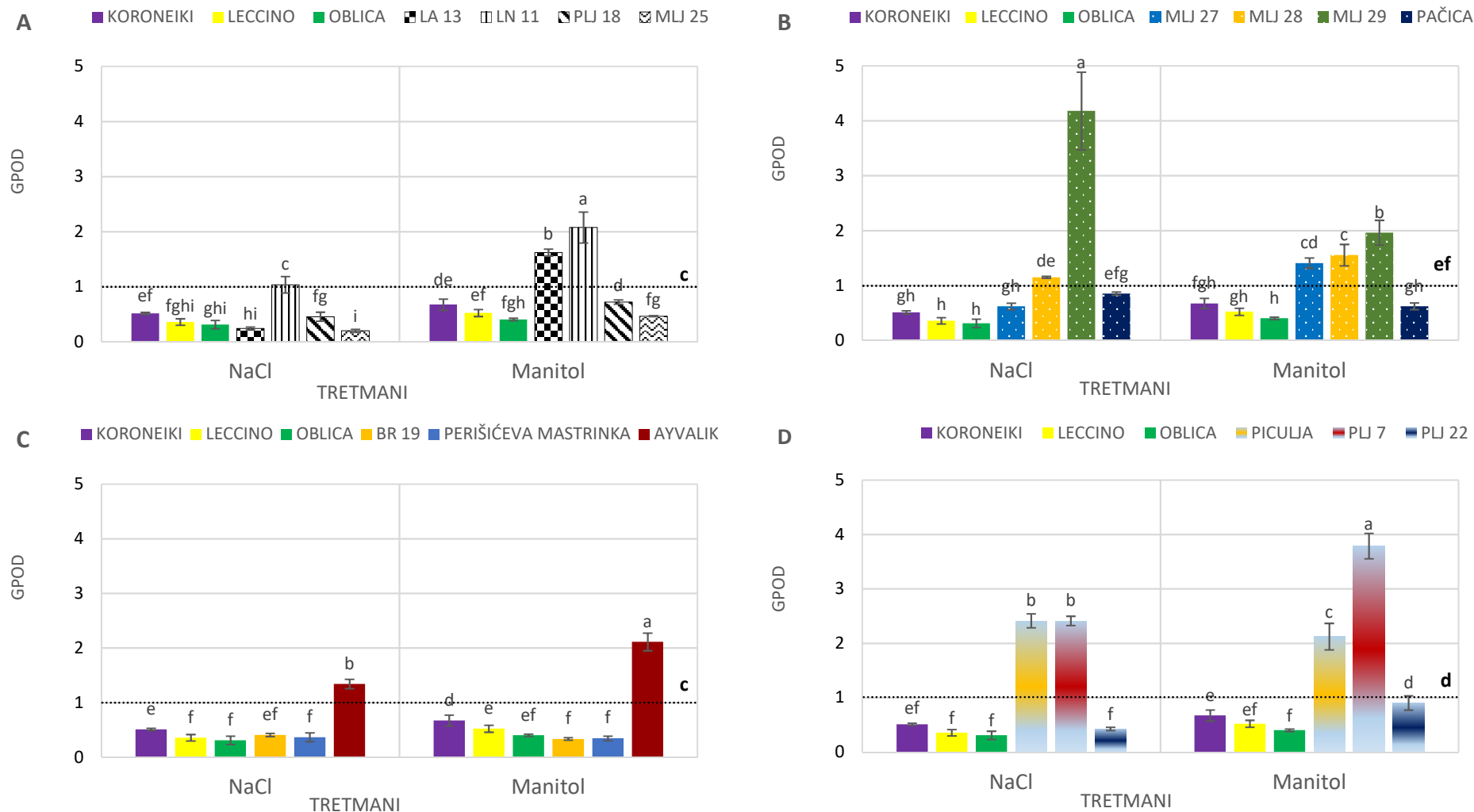
Neovisno o promatranoj grupi i primjenjenom tretmanu, standardni kultivari imali su signifikantno smanjenu aktivnost enzima GPOD u listu.

U grupi izvorno divljih maslina aktivnost GPOD bila je značajno smanjena u listu genotipova PLJ 18 i MLJ 25 u oba tretmana te u listu genotipa LA 13 (Slika 23A). Genotipovi LA 13 i LN 11 su jedini u grupi imali signifikatno veću aktivnost enzima u tretmanu suše.

Aktivnost enzima GPOD kod grupe hrvatskih kultivara bila je izraženija u tretmanu suše gdje je signifikantno povećana aktivnost zabilježena kod genotipova MLJ 27, MLJ 28 i MLJ 29, dok je genotip MLJ 29 imao signifikatno povećanu aktivnost tog enzima i u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 23B). Značajno smanjenje GPOD utvrđeno je u listu genotipa MLJ 27 u tretmanu povišenog saliniteta i genotipa 'Pačica' u tretmanu suše.

Kod grupe inozemnih kultivara jedino je kultivar 'Ayvalik' imao signifikantno povećanu aktivnost GPOD u oba primjenjena tretmana dok su kod ostalih genotipova utvrđene signifikantno niže aktivnosti tog enzima od kontrole (Slika 23C).

U grupi hibridnih maslina signifikantno povećanje aktivnosti GPOD zabilježeno je kod kultivara 'Piculja' i genotipa PLJ 7u oba tretmana , a signifikantno smanjenje kod genotipa PLJ 22 u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 23D).



Slika 23: Relativna aktivnost enzima GPOD (originalni podatci u U/mg proteina – Tablica S5) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.4.3. Relativan sadržaj malondialdehida

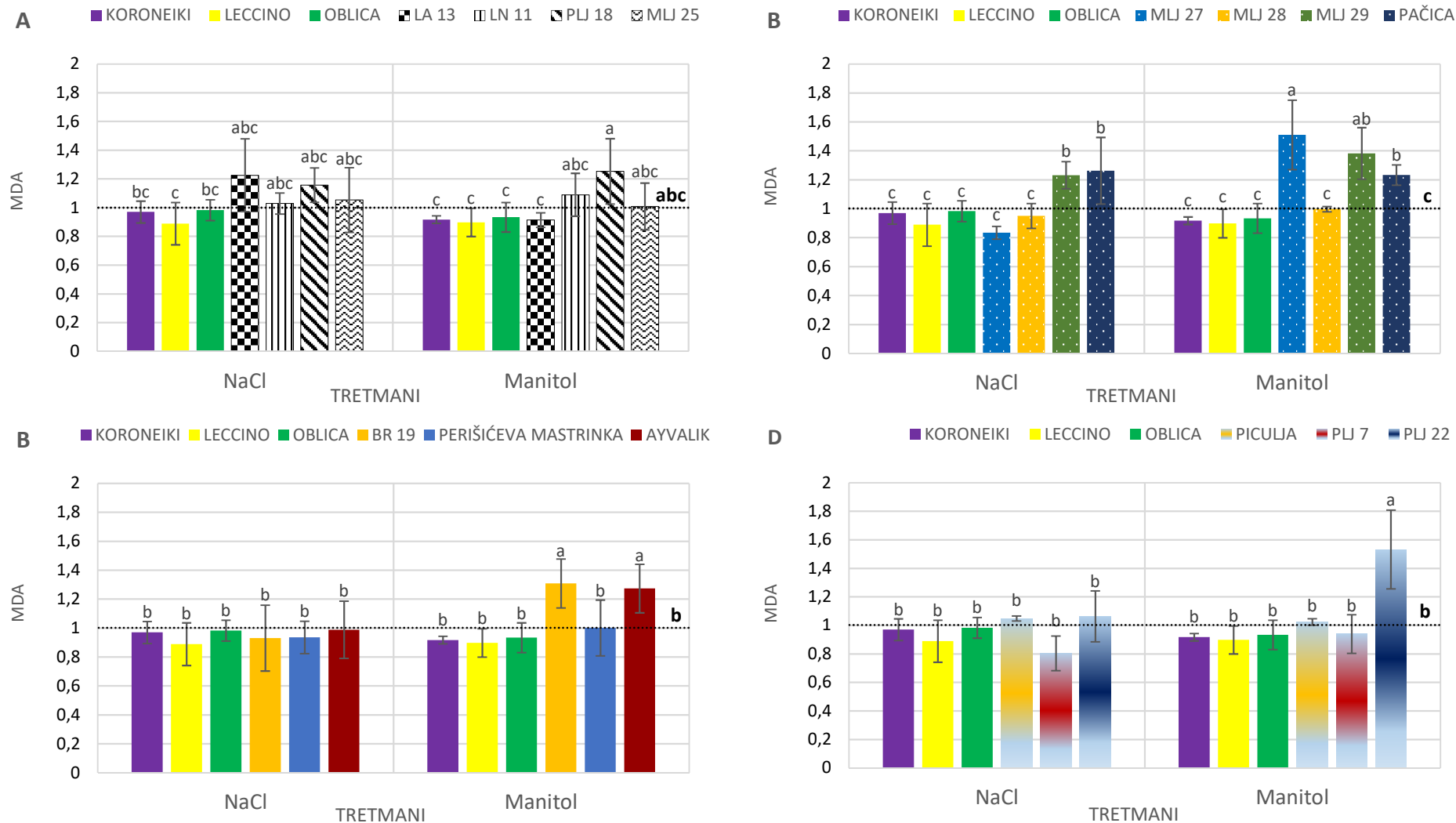
Općenito, sadržaj malondialdehida (indikator lipidne peroksidacije) u ovom kratkoročnom eksperimentu uglavnom (uz par ispod navedenih iznimki) je, neovisno o tretmanu, bio sličan kontroli (Slika 24).

U grupi izvorno divljih maslina u oba je tretmana razina malondialdehida kod svih genotipova bila u razini kontrole (Slika 24A).

U grupi hrvatskih kultivara signifikantno povećanje sadržaja malondialdehida u oba tretmana izmjereno je u listu genotipa MLJ 29 i kultivara 'Pačica'. U listu genotipa MLJ 27 utvrđeno je signifikantno povećanje sadržaja MDA samo u tretmanu suše (Slika 24B).

U grupi inozemnih kultivara u listu genotipa BR 19 i kultivara 'Ayvalik' zabilježeno je signifikantno povećanje samo kod tretmana suše (Slika 24C).

U grupi hibridnih maslina samo je kod genotipa PLJ 22 utvrđeno signifikantno povećanje sadržaja MDA u tretmanu suše (Slika 24D).



Slika 24: Relativni sadržaj MDA (originalni podatci u nmol/g su.tv. – Tablica S5) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

5.4.4. Relativan sadržaj prolina

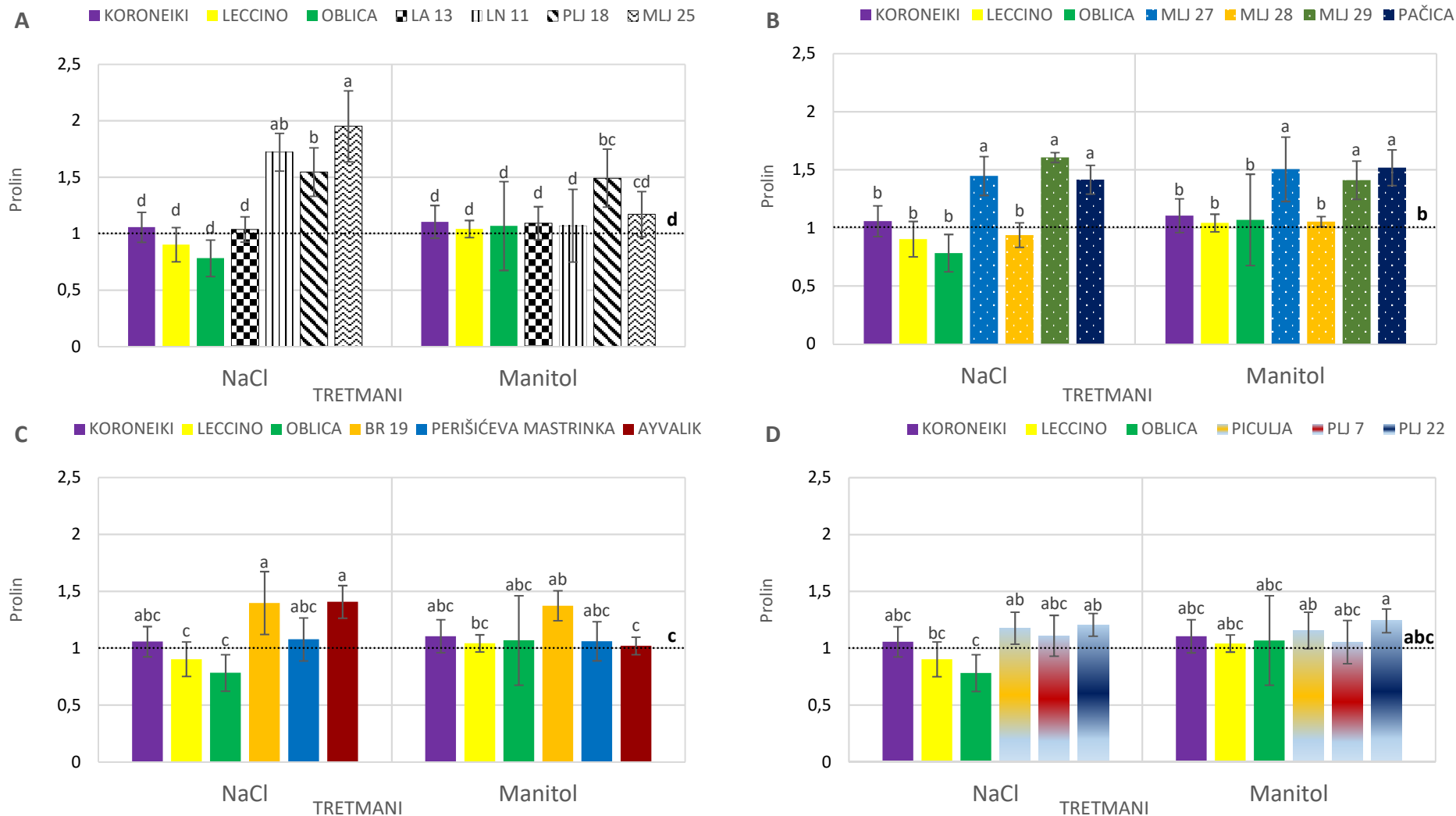
Općenito, povišeni salinitet i suša slabije su utjecali na sadržaj aminokiseline prolina u grupi inozemnih kultivara i grupi hibridnih maslina, a veće promjene u sadržaju te aminokiseline uzrokovali su u grupi izvorno divljih maslina i grupi hrvatskih kultivara (Slika 25). Neovisno o promatranoj grupi i primjenjenom tretmanu, vrijednosti prolina u listu standardnih kultivara se nisu značajno razlikovale od kontrole.

U grupi izvorno divljih maslina tretman povišenog saliniteta izazvao je značajno povećanje sadržaja prolina u listu genotipa LA 13, PLJ 18 i MLJ 25, dok je znatno nakupljanje te aminokiseline u tretmanu suše zabilježeno samo u listu genotipa PLJ 18 (Slika 25A).

U grupi hrvatskih kultivara značajno nakupljanje prolina zabilježeno je u oba tretmana kod genotipova MLJ 27, MLJ 29 i kultivara 'Pačica' (Slika 25B).

U grupi inozemnih kultivara značajno povećanje prolina zabilježeno je jedino u listu genotipa BR 19 u oba tretmana, a u listu kultivara 'Ayvalik' u tretmanu povišenog saliniteta (Slika 25C).

Kod genotipova iz grupe hibridnih maslina nisu zabilježene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu neovisno o primjenjenom tretmanu (Slika 25D).



Slika 25: Relativan sadržaj prolina (originalni podatci u nmol/g su.tv. – Tablica S5) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

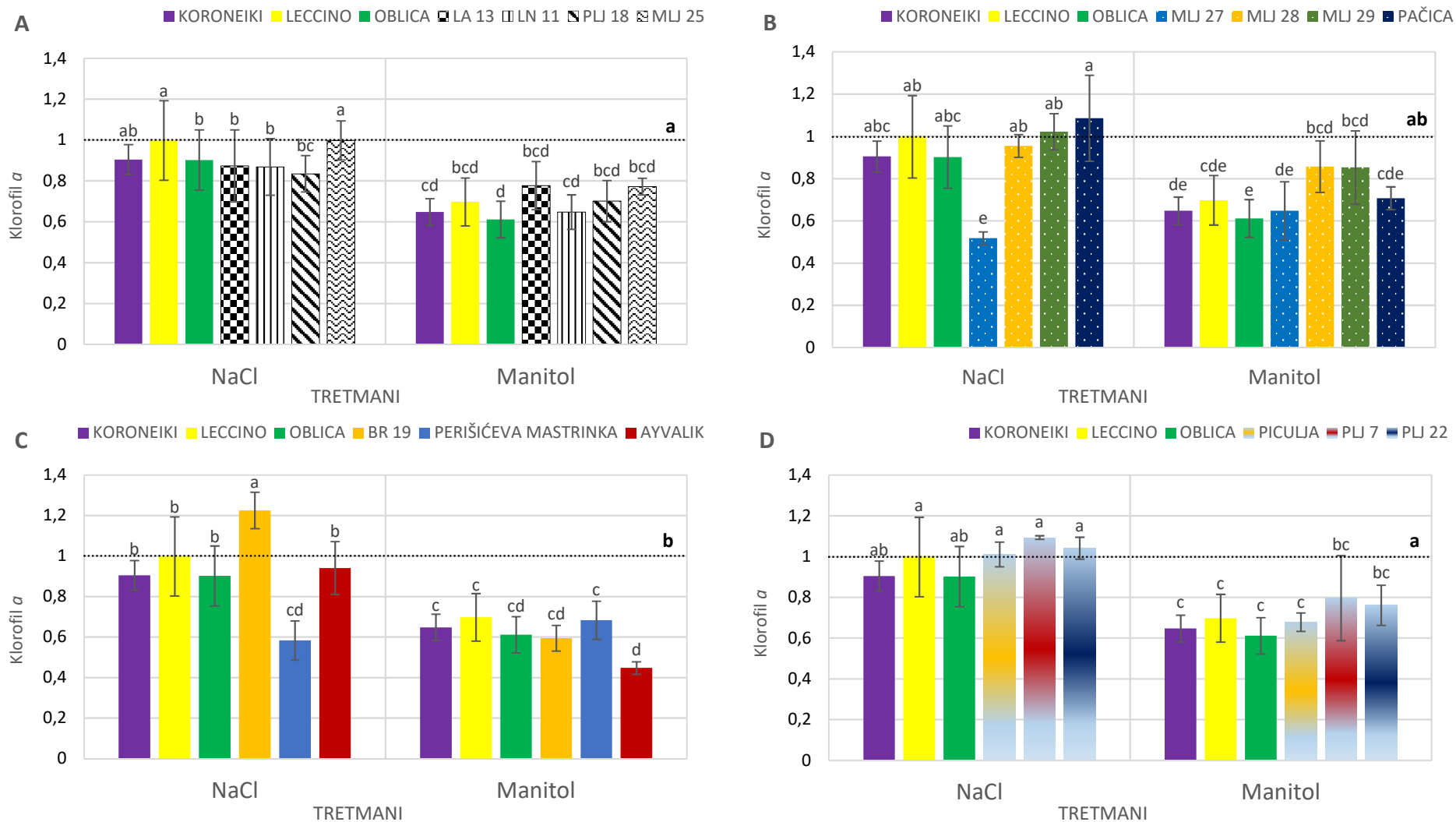
5.4.5. Relativan sadržaj fotosintetskih pigmenata

Oba tretmana su utjecala na sadržaj fotosintetskih pigmenata, s tim da je tretman suše uglavnom uzrokovao smanjenje sadržaja svih analiziranih pigmenata. Signifikantno smanjenje sadržaja klorofila *a* je bilo izraženije u tretmanu suše kod svih grupa, dok su vrijednosti pigmenata klorofila *b* i karotenoida ovisile o analiziranom genotipu (Slika 26, 27, 28).

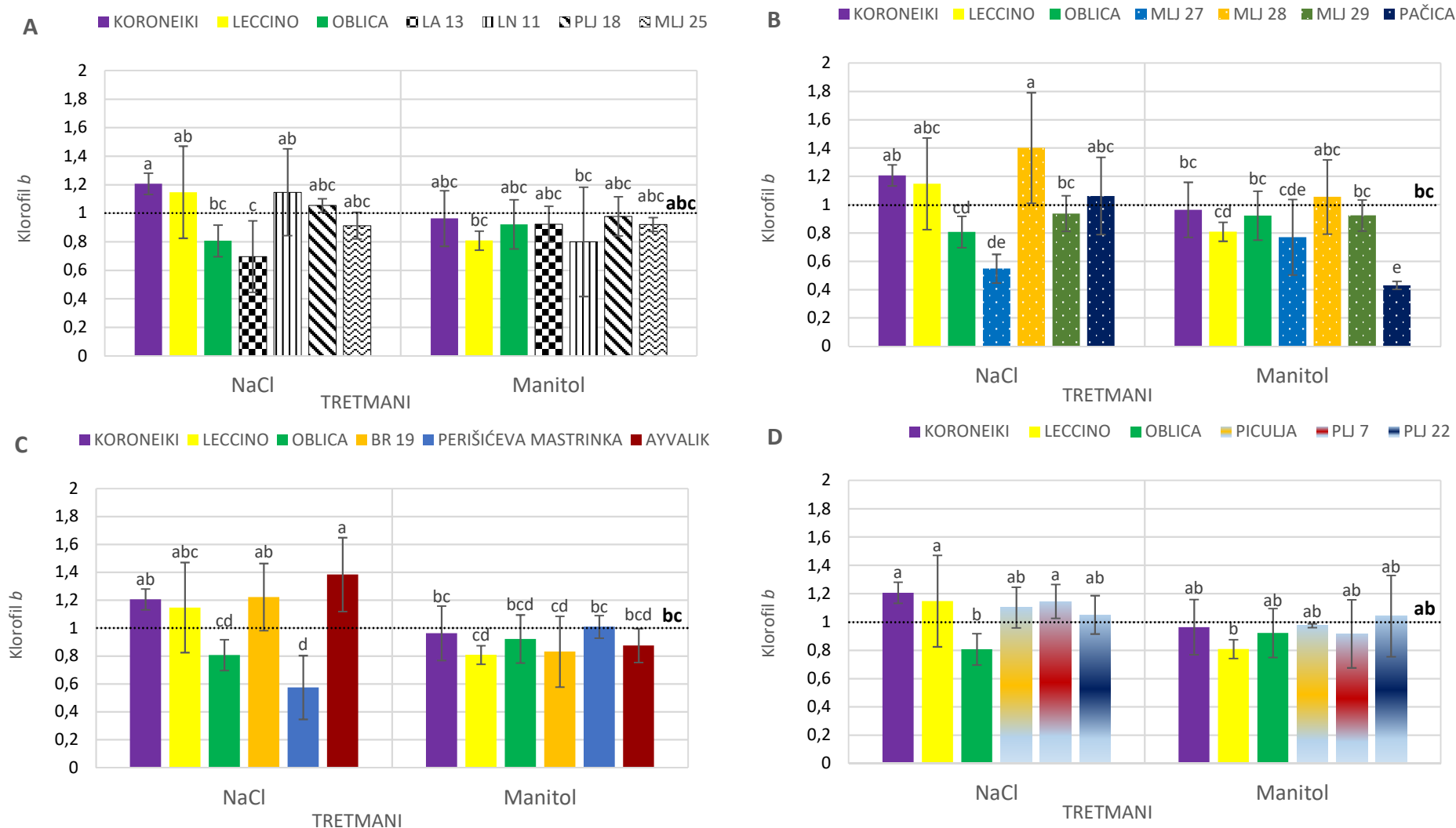
Neovisno o grupi, sadržaj klorofila *a* u listu standardnih kultivara nije se bitno razlikovao od kontrole u tretmanu povišenog saliniteta, a bio je bitno smanjen u tretmanu suše (Slika 26). Sadržaj klorofila *a* signifikantno se smanjio kod svih grupa u tretmanu suše, osim kod genotipova MLJ 28 i MLJ 29 iz grupe hrvatskih kultivara. U grupi izvorno divljih maslina signifikantno smanjenje sadržaja klorofila *a* utvrđeno je kod genotipova LA 13, LN 11 i PLJ 18 u tretmanu povišenog saliniteta. U grupi hrvatskih kultivara znatno smanjenje sadržaja klorofila *a* pod utjecajem soli utvrđeno je kod genotipa MLJ 27. U grupi inozemnih kultivara jedino je kod genotipa BR 19 zabilježeno signifikantno povećanje klorofila *a*, a kod kultivara 'Perišićeva mastrinka' signifikantno smanjenje sadržaja tog pigmenta u tretmanu povišenog saliniteta. Tretman povišenog saliniteta nije signifikantno utjecao na sadržaj klorofila *a* u grupi hibridnih maslina.

Signifikantno smanjenje sadržaja klorofila *b* zabilježeno je u tretmanu povišenog saliniteta kod genotipa MLJ 27 iz grupe hrvatskih kultivara i kod kultivara 'Perišićeva mastrinka' iz grupe inozemnih kultivara. Signifikantno povećanje sadržaja klorofila *b* zabilježeno je pod utjecajem soli kod genotipa MLJ 28 i kultivara 'Ayvalik'. Signifikantno smanjenje sadržaja klorofila *b* u tretmanu suše zabilježeno je samo kod kultivara 'Pačica' iz grupe hrvatskih kultivara (Slika 27).

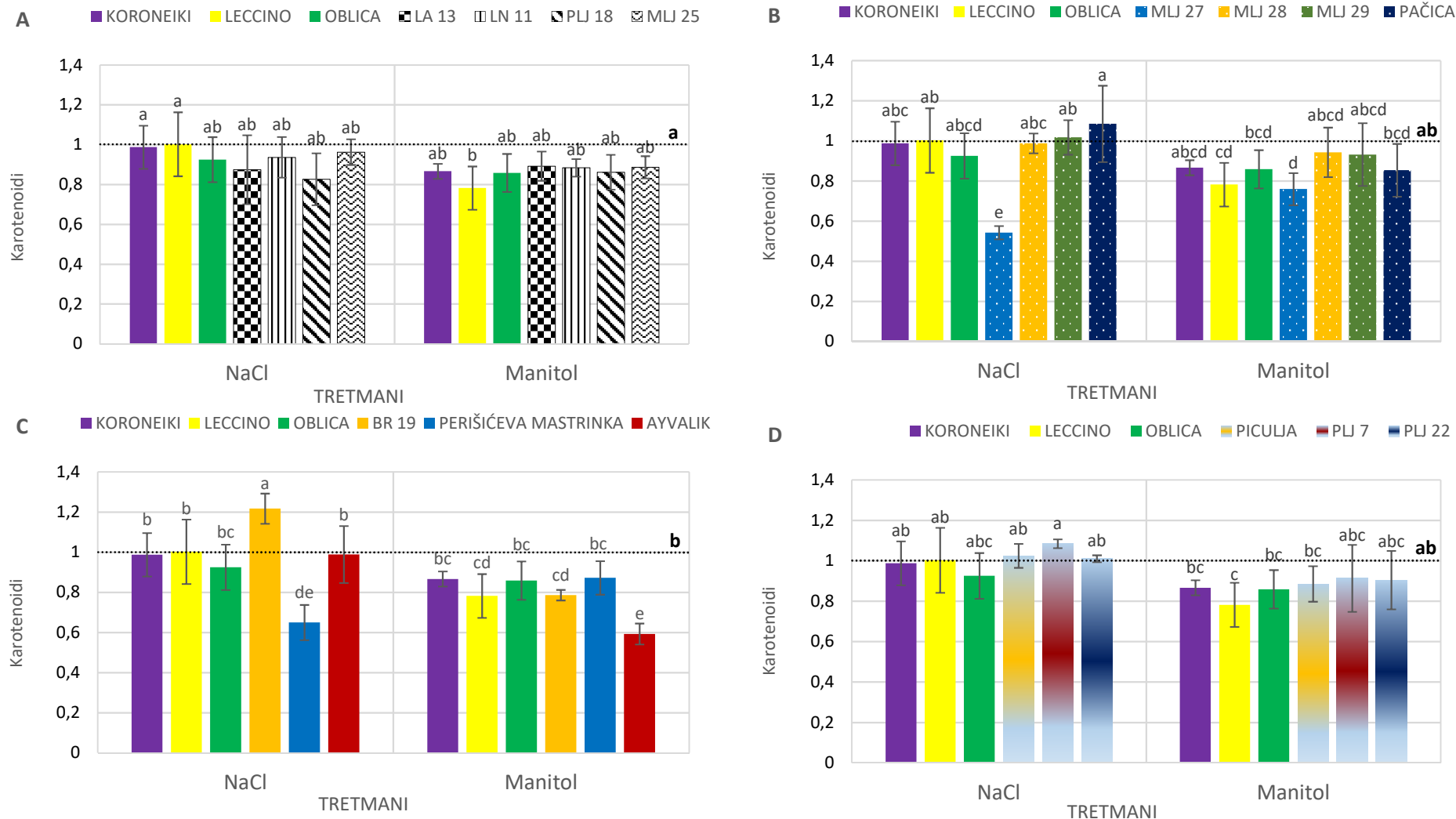
Vrijednosti sadržaja karotenoida bile su više pod utjecajem tretmana suše od tretmana povišenog saliniteta. Neovisno o grupi, signifikantno smanjenje sadržaja karotenoida utvrđeno je kod standardnog kultivara 'Leccino' u tretmanu suše. Signifikantno smanjenje sadržaja karotenoida zabilježeno je kod genotipa MLJ 27 iz grupe hrvatskih kultivara neovisno o tretmanu. U grupi inozemnih kultivara signifikantno povećanje sadržaja karotenoida zabilježeno je kod genotipa BR 19 u tretmanu povišenog saliniteta, a značajno smanjenje tih pigmenata kod kultivara 'Perišićeva mastrinka' u tretmanu povišenog saliniteta te kod genotipa BR 19 i kultivara 'Ayvalik' u tretmanu suše (Slika 28).



Slika 26: Relativan sadržaj klorofila *a* (originalni podaci u mg/g su.tv. – Tablica S6) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.



Slika 27: Relativan sadržaj klorofila *b* (originalni podatci u mg/g su.tv. – Tablica S6) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotiskim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrtkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.



Slika 28: Relativan sadržaj ukupnih karotenoida (originalni podatci u mg/g su.tv. – Tablica S6) u listovima izboja masline nakon 21 dan izlaganja abiotičkim stresovima povišenog saliniteta (150 mM NaCl) i suše (300 mM manitola). Standardni kultivari ('Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica') u svakoj grupi su uspoređeni s genotipovima izvorno divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B), inozemnih kultivara (C) i grupom hibridnih maslina (D). Kontrolni tretman normaliziran je na vrijednosti 1 i prikazan kao iscrkana linija. Različita slova na stupcima ili liniji (kontrola) označavaju statistički signifikantnu razliku ($p < 0.05$). Okomiti intervali pouzdanosti označavaju \pm SD, $n=3$. SD, standardna devijacija.

6. RASPRAVA

6.1. Genetska raznolikost

Istraživanje je uspješno razlikovalo 26 genotipova divljih i kultiviranih maslina. Prosječan broj alela bio je 9,83 s najvećom vrijednošću kod UDO43 i DCA09 od 16 alela po biljegu, s tim da je kod DCA09 zabilježena najveća vrijednost informacijskog sadržaja polimorfizma (*PIC*). Prema rezultatima *PIC* vrijednosti (0,770) za utvrđivanjem genetičke raznolikosti autohtonih divljih i kultiviranih maslina, ovo istraživanje je u skladu s prijašnjim rezultatima (Klepo, 2014) gdje je istraženo više jedinki s istih lokacija (populacija) te možemo donijeti zaključak da su analizirani mikrosateliti bili visoko diskriminirajući i u ovom slučaju. Uspoređujući rezultate genetske raznolikosti ove doktorske disertacije i do sada jedinog istraživanja genetske raznolikosti (Klepo, 2014) koje je obuhvatilo populacije hrvatskih autohtonih divljih maslina, vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (0,770 i 0,779) su više o odnosu na istraživanja usporedbe genetske raznolikosti svjetskih *ex situ* banaka u Cordobi (IFAPA), Porquerollesu (FOGB) i Marrakechu (WOGBM) (0,707; 0,737 i 0,688) (El Bakkali i sur., 2019; Khadari i sur., 2019).

Mikrosatelitna raznolikost skupina divljih i kultiviranih maslina (Tablica 8) zabilježila je veće vrijednosti kultiviranih maslina za prosječan broja alela po lokusu ($N_{av} = 7,750$) kao i veći broj jedinstvenih alela ($N_{pa} = 28$). Veće alelno bogatstvo ($N_{ar} = 7,500$) te vrijednosti zapažene ($H_o=0,833$) i očekivane ($H_E=0,836$) heterozigotnosti zabilježene su kod skupine divljih maslina, što se ne podudara u potpunosti sa rezultatima Belaj i sur. (2010), Erre i sur., (2010), Besnard i sur. (2013), Klepo (2014), gdje su divlje masline zabilježile veće vrijednosti za sva istražena svojstva.

Razlika i nepopudaranost rezultata može se objasniti malim uzorkom u ovom istraživanju (10 divljih i 16 kultiviranih maslina), a koje su uz to vrlo raznolikog podrijetla (Alžir, Francuska, Hrvatska, Italija, Maroko, Sirija, Španjolska, Turska,). Potaknuti ovim rezultatima, potrebom većeg uzorka kod nekih statističkih analiza molekularnih podataka te činjenicom da je doktorska disertacija Klepo (2014) napravljena u istom laboratoriju, molekularne podatke iz ovog istraživanja bilo je moguće obraditi zajedno s podacima navedene disertacije prilikom određivanja populacijske strukture.

S obzirom na vrijednosti genetske raznolikosti dobivene u ovom istraživanju s 26 genotipova (10 divljih i 16 kultiviranih) i istraživanju Klepo (93 divljih i 63 kultiviranih) i njihovom

usporedbom s rezultatima *ex situ* bankama germplazme masline IFAPA, WOGBM i FOGB možemo istaknuti bogatstvo germplazme hrvatskih autohtonih divljih i kultiviranih maslina.

Analiza molekularne varijance (AMOVA) zabilježila je najveću genetsku raznolikost unutar skupina (96,06 %) divljih i kultiviranih maslina i manju između skupina (3,94 %). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Belaj i sur., (2010) gdje je raznolikost unutar populacija divljih i kultiviranih maslina (84,07 %) i između populacija (8,08 %) te istraživanja Klepo (2014) unutar (95,06%) i između (4,94 %) populacija autohtonih hrvatskih divljih i kultiviranih maslina. Da to nije samo karakteristika između populacija divljih i kultiviranih maslina istraženo je između jedinki divljih maslina istočnog i zapadnog Mediterana (Breton i sur., 2006) gdje su zabilježene vrijednosti između jedinki (76,33 %) u odnosu na razlike između populacija jedinki (7,58 %).

Na temelju udjela zajedničkih alela (D_{PSA}) na relativnom malom uzorku divljih (10) i kultiviranih (16) maslina, najniža vrijednosti genetske udaljenosti ($D_{PSA}=0,083$) bila je za kultivare, dok su maksimalne vrijednosti ($D_{PSA}=0,917$) identične kod obje skupine maslina. Izdvajanja dvije skupine isključivo kultiviranih maslina zabilježena je na nezakorijenjeno stablo po Fitchu i Margholiashu temeljenom na matrici genetske udaljenosti (*bootstrap* vrijednosti 75 % do 99 %). Ostale dvije skupine sastojale su se od kultiviranih, divljih i „hibridnih“ genotipova koji su vidljivo odvojeni i prikazani u strukturi populacija (Slika 14).

Prema multicentričnoj teoriji podržanoj analizom mikrosatelitnih biljega i rezultatima prijašnjih istraživanja izvorno divlje masline prisutne su u cijelom Mediteranu kao i kultivari nastali udomaćivanjem i selekcijom lokalnih divljih maslina (Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007; Klepo, 2014; Besnard i sur., 2016; 2018).

Bayesovska analiza populacijske strukture upućuje da su analizirani genetski skupovi prema udjelu genoma svake jedinice potekle iz tri izvorna genetska skupa masline, odnosno izvornih genetskih skupova divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B) i inozemnih kultivara (C). Jedinke (genotipovi) iz ove disertacije, a koje nisu analizirane u doktorskoj disertaciji Klepo (2014), pokazale su pripadnosti izvornim genetskim skupovima većinom u skladu s prijašnjim istraživanjem.

Istraživanja temeljena na plastidnoj DNA i SSR biljezima potvrđuju hipotezu o postojanju tri genetska centra kultiviranih maslina zapadnog, središnjeg i istočnog Mediterana kao i dva genetska centra divljih maslina zapadnog i istočnog Mediteranskog bazena (Besnard i sur., 2001, 2013, 2018; Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007, 2011; Díez i sur., 2015). Prema

navedenom hrvatski kultivari pripadaju središnjem genetskom centru, a specifičnost u broju izvornih populacija i kompliciranost hipoteze o podrijetlu istih potvrđena je istraživanjem Belaj i sur. (2002) i doktorskom disertacijom Klepo (2014). Slični zaključci i rezultati o velikom broju izvornih genetskih skupova i podrijetlu autohtonih francuskih kultivara dobiveni su u istraživanju svjetske *ex situ* banke germplazme u Francuskoj. Razlozi su slični kao u slučaju hrvatskih maslina, a pripisani su povoljnom zemljopisnom položaju za uzgoj gdje je došlo do razmjene kultivara, klonske selekcije pa čak i selekcije sjemenjaka iz križanja kultiviranih maslina između Pirenejskog i Apeninskog poluotoka (Khadari i sur., 2019).

Jedina analizirana populacija koja ni u ovom istraživanju nema dominacije ni jednog izvornog genetskog skupa kad se analizira svaka jedinka zasebno je P05 Pelješac. Četiri jedinke pripadaju izvornom skupu divljih maslina (A), sedam jedinki izvornom skupu kultivara (B), tri jedinke izvornom skupu inozemnih kultivara (C) dok kod četiri jedinke nema dominacije ni jednog izvornog skupa ($Q < 50\%$) što upućuje na 'hibridnost' jedinki. Genotipovi divljih maslina bez dominacije izvornih genetskih skupova dovode do zaključka da su ti kultivari nastali spontanom hibridizacijom kultivara i divljih maslina (Klepo, 2014).

Kultivari u ovom istraživanju koji nemaju dominaciju ni jedne izvorne populacije su 'Piculja' i 'Canino'. Klepo (2014) je potvrdila kultivar 'Piculju' kao specifičan kultivar koji se vjerojatno izdvojio iz populacije divljih maslina zbog poželjnih agronomskih svojstava, te prema ovom i prema prijašnjem istraživanju pripada u divlje masline. Kultivar 'Mrčakinja' kod analize hipoteza ($K=2$; $K=3$) pripada izvornom genetskom skupu divljih maslina ($Q > 94\%$ i 88%), a status kultivara, kao i kultivaru 'Piculja', dodijeljen je vjerojatno na temelju agronomskih svojstava obilne i redovite cvatnje te je uz kultivar 'Piculja' jedan od oprašivača 'Oblice', najzastupljenijeg kultivara u nasadima masline u Republici Hrvatskoj (Vlašić, 1980; Bakarić, 2002; Strikić i sur., 2007, Vuletin Selak i sur., 2011). Važnost oprašivača u nasadima je vrlo bitna iz razloga što je maslina (*Olea europaea* L.) biljna vrsta koja se oprašuje vjetrom i samo djelomično je samooplodna (Androulakis i Loupassaki, 1990; Cuevas i Polito, 1997; Lavee i sur., 2002).

Većina hrvatskih kultivara pripada izvornom genetskom skupu kultivara (B). Prema Klepo (2014) izvorni genetski skup kultivara (B) može biti genetski skup koji je nastao davnom introdukcijom kultivara koji su međusobnim križanjem stvorili veliki broj autohtonih kultivara.

Hrvatski kultivari 'Kamasa', 'Krivulja', 'Pujizica', 'Rosulja', 'Uljarica', 'Zuzorka', 'Istarska crnica', 'Oleaster', 'Bjelica' zastupljeni su s više od 70 % udjela genoma iz izvornog genetskog skupa inozemnih kultivara (C). Kultivari 'Istarska crnica', 'Oleaster', 'Uljarica' pripadaju tipično mediteranskom skupu kultivara (Besnard i sur., 2013) dok se kultivar 'Uljarica' još svrstao sa skupinom turskih kultivara prema istraživanju Ercisli i sur., (2012). U izvorni genetski skup inozemnih kultivara (C) pripao je prethodno pretpostavljeni „divlji“ genotip BR 19, kultivar 'Perišićeva mastrinka', 'Koroneiki', 'Fasolino', 'Leccino', 'Taggiasca', 'Farga' i 'Ayvalik' ($Q > 50$ %). 'Perišićeva mastrinka' smatra se jedinstvenim kultivarom za koju nije utvrđena srodnost ni s jednim do sada istraživanom genotipom te je vjerojatno nastao križanjem izvornih divljih maslina i kultivara (Klepo, 2014).

6.2. Morfometrijska mjerenja

Učinkovitost *Olea europaea* da zaštiti osjetljive izboje od štetnih učinaka visoke koncentracije toksičnih iona može biti posljedica umjerene dinamike rasta i smanjenog transporta vode iz zone korijena s povišenom koncentracijom NaCl tj. "niske strategije natrija", (Chartzoulakis, 2005; Melgar i sur., 2006). Biljke izložene velikom nedostatku vode uzrokovanog viškom soli (i osmotskom disbalansu) drastično smanjuju ukupno usvajanje ugljika, što zauzvrat značajno smanjuje proizvodnju biomase (Tattini i Traversi, 2009). Ipak, u promjenjivom slanom okruženju na mediteranskim geografskim širinama, kasne ljetne i rane jesenje padaline dopuštaju biljci asimilaciju CO₂ i proizvodnju novog porasta (ukoliko su temperatura zraka i sunčeva radijacija u optimalnim granicama) u značajnoj količini (Tattini i Traversi, 2009). Nasuprot tome, osmotske komponente visokog saliniteta mogu biti manje važne za većinu zimzelenih sklerofilnih biljaka, kao što je maslina koje su se razvile u uvjetima sušnog stresa i nedostatka hranjivih tvari u tlu (zimzelene sklerofilne biljke imaju nasljedno niske stope ukupne CO₂ asimilacije i proizvodnje biomase) (Bongi i sur., 1987; Gucci i Tattini 1997; Testi i sur., 2006).

U ovom istraživanju, stres suše induciran manitolom inhibirao je rast izboja i površine lista masline u signifikantno većem razmjeru od stresa povišenog saliniteta izazvanog s NaCl. Dosadašnja istraživanja pokazala su da biljke izložene abiotskom stresu povišenog saliniteta prvo doživljavaju vodni stres (tj. osmotsku fazu), uzrokujući trenutno zaustavljanje i smanjenje rasta biljke, a posljedica je povećana koncentracija soli izvan korijena za što postoje iznenađujuće malo genotipske razlike (Munns, 1993). Abiotski stres suše uzrokovao je

signifikantno smanjenje rasta izboja kod svih genotipova osim kod genotipa MLJ 29 (Slika 15). Kultivari 'Koroneiki i 'Oblica' očekivano su imali smanjene vrijednosti morfometrijskih mjerenja, ali u većini parametara vrijednosti nisu bile značajne. Slične rezultate navode Bashir i sur., (2021) koji su kod otpornog kultivara 'Canino' i osjetljivog 'Sirole' utvrdili redukciju rasta izboja već kod manje koncentracije NaCl (50 mM). Takav je rezultat, vrlo vjerojatno, postignut zbog osmotske faze stresa za koji, kako je navedeno prije, nema genotipske razlike. Slične rezultate zabilježili su autori Perica i sur., (2008) gdje je učinak povišenog saliniteta bio linearan te je zabilježeno kvadratno smanjenje rasta morfometrijskih parametara. Autori navode da su Tattini i sur. (1992) predložili obrnuto proporcionalnu vezu između tolerantnosti kultivara na salinitet i bujnosti biljke masline. Tvrdnja implicira da bujni kultivari maslina imaju tendenciju bržeg rasta u početnim uvjetima povišenog saliniteta što rezultira povišenim transportom Na⁺ u izboje. Međutim u tom istraživanju zabilježeno je da redukcija rasta nije određena samo prirodnom bujnošću kultivara. Pri koncentraciji od 166 mM NaCl kultivar 'Drobnica' koji se odlikuje slabom bujnošću, imao je redukciju u težini stabljike slično kultivaru 'Leccino' koji je prirodno najbujniji od kultivara korištenih u istraživanju. Druga faza smanjenog rasta, za koju je potrebno vrijeme da se razvije povezana je s naprednim starenjem lišća koje najduže transpirira. To je rezultat oštećenja biljnih stanica uzrokovanih od strane Na⁺ i Cl⁻ koji su se akumulirali u svim transpirirajućim listovima do prekomjerne razine uzrokujući preuranjeno odumiranje i smanjujući fotosintetski kapacitet biljke na razinu koja ne može podnijeti daljnji rast (Munns, 1993). U našem istraživanju kod standardnog kultivara 'Leccino' oba tretmana su utjecala na niže vrijednosti kod većine morfometrijskih parametara. Zabilježeni rezultati u skladu su s prethodnim studijama gdje je kultivar 'Leccino' pokazao najveću redukciju rasta u usporedbi s drugim kultivarima (Perica i sur., 2008; Rossi i sur., 2014). Oba tretmana negativno su utjecala na većinu promatranih morfoloških svojstava kod grupe divljih maslina, a najosjetljiviji genotip unutar grupe bio je MLJ 25 (Slike 15-17). U grupi hrvatskih kultivara, genotip MLJ 27 i kultivar 'Pačica' bili su pod značajnim utjecajem oba tretmana za sve morfometrijske parametre, s tim da je tretman suše imao značajno veći utjecaj. U grupi inozemnih kultivara 'Ayvalik' se u ovom istraživanju pokazao kao kultivar niskih vrijednosti morfometrijskih parametara u odnosu na druge genotipove i neovisno o primjenjenom tretmanu, dok je za parametar suhe mase korijena (Tablica 13) imao vrijednosti značajno povišene u odnosu na kontrolni tretman. Razlog tomu su vjerojatno značajno najveće zabilježene vrijednosti relativnog sadržaja iona Na⁺ u korijenu među svim genotipovima (Slika 21). Slične rezultate za kultivar 'Ayvalik' zabilježio je i Ayaz i sur. (2021) u istraživanju utjecaja povišenog saliniteta (100, 200, 300 mM NaCl) na morfometrijske i

biokemijske parametre triju turskih kultivara maslina. U tom je istraživanju utvrđeno da je kultivar 'Ayvalik' akumulirao signifikatno povišene vrijednosti manitola. S pretpostavkom da je taj kultivar osjetljiv na abiotske stresove povišenog saliniteta, autori su zaključili da manitol imao ulogu antioksidansa u tretmanu povišenog saliniteta. U našem istraživanju gdje smo sušu inducirali manitolom nismo zabilježili pozitivne morfometrijske i biokemijske promjene koje bi sugerirale da je manitol, za koji je poznato da djelomice može ući u apoplast i simplast korijena (Hohl i Schopfer, 1991), djelovao kao signalna molekula ili kao predkursor za odgovor biljke na abiotski stres. No u našem istraživanju, unatoč mogućnosti ulaska u stanice korijena, manitol je dodavanjem u podlogu djelovao prije svega kao osmotik nakupljajući se s vanjske strane stanica korijena.

6.3. Sadržaj iona u listu i korijenu masline

Nakon završetka faze osmotskog stresa, sol se akumulira prvo u korijenu, zatim u stabljici i u konačnici u listovima biljke, a toksično djelovanje Na^+ i Cl^- uzrokuje smanjenje rasta svih organa biljke (Munns, 2002). Ako su Na^+ i Cl^- izdvojeni u vakuole stanice, ioni K^+ i organska otapala trebaju se akumulirati u citoplazmi i organelima radi uspostave ravnoteže osmotskog tlaka u vakuoli (Hasegawa i sur., 2000). Razlika između učinka NaCl i manitola na rast maslina vjerojatno je povezana s različitim osmotskim prilagodbama. Upotreba Na^+ i Cl^- za osmotsku prilagodbu manje je energetski zahtjevna te isplativija od biosinteze organskih otopljenih tvari, sve dok su ioni soli izdvojeni u vakuole stanice (Munns i sur., 2020). U ovom istraživanju akumulacija štetnih iona Na^+ i Cl^- u signifikatno povišenim razinama zabilježena je u listovima i korijenu kod tretmana povišenog saliniteta (Slike 18 i 19), dok oscilacije istih u tretmanu suše mogu biti povezane s korištenjem vodovodne vode u nadopunjavanju tankova s tretmanskim otopinama. Nakon izloženosti povišenom salinitetu, u listovima izboja signifikantno najveća akumulacija Na^+ zabilježena je kod kultivara 'Oblica'. Suprotno svim prethodnim studijama, (Tattini i sur., 1992., Perica i sur., 2008., Tattini i Traversi, 2009., Rossi i sur., 2014) kultivar 'Leccino' zabilježio je niske, odnosno vrijednosti slične kontrolnom tretmanu, ovisno o promatranoj grupi signifikatno povišene ali mnogo manje vrijednosti u odnosu na ostale genotipove (Slika 18). U prethodnim istraživanjima najveća količina Na^+ obično je zabilježena u listovima kultivara 'Leccino' u usporedbi s drugim sortama, međutim ključna razlika ovog istraživanja od prethodnih je dulji vremenski period kojem su kultivari bili izloženi.

Osobina genotipa kao razvijenost korijenovog sustava također ima značajnu ulogu kod otpornosti na abiotske stresove povišenog saliniteta i suše (Rossi i sur., 2014). Ranija istraživanja morfologije korijena i njegovo prirodno grananje sugeriraju usku kontrolu usvajanja potencijalno toksičnih iona (Tattini i sur., 1997). Isti autori pretpostavljaju da veća dužina korijena omogućava biljci da dosegne veće dubine tla koje sadrži manju lokaliziranu koncentraciju NaCl u odnosu na plitke slojeve tla gdje se primjerice ukorijenjuje kultivar 'Leccino'. Da bismo izbjegli takvu genotipsku osobinu koja bi sigurno utjecala na rezultate u relativno malom volumenu posude za uzgoj, biljke su posađene u smjesu visoko propusnog anorganskog supstrata male mase prema volumenu (Poglavlje 4.3.), te su aklimatizirane tijekom relativno dugog vremenskog perioda za ravnomjerno i dobro razvijeno korijenje. Prema analizi iona u korijenu masline, isključivanje Na⁺ iz korijena u najosjetljivije organe, listove izboja, najučinkovitije je bilo kod kultivara 'Leccino' (Slika 19). Iako kultivar 'Oblica' koristi isti mehanizam otpornosti (Melgar i sur., 2009; Fernández-Escobar, 2019) na povišeni salinitet, translokacija Na⁺ iz korijena u listove izboje bila je višestruko veća nego kod ostalih genotipova (Slika 18 i 19). Ukoliko se poveže morfometrijski parametar dužine izboje (Slika 15) u kojem je kultivar 'Oblica' zabilježio signifikantno najveći rast od svih genotipova, možemo pretpostaviti da je raspoređivanje iona Na⁺ u vakuole stanica listova izboja i korijena bilo relativno učinkovito te je poslužilo održavanju osmotskog tlaka u stanicama. Kultivari 'Koroneiki' i 'Leccino' zabilježili su najniže vrijednosti Na⁺ u korijenu iako su bile signifikantno povišene u odnosu na kontrolni tretman. Kultivar 'Ayvalik' je nije zabilježio signifikantno povećanje Na⁺ u listovima izboja u odnosu na kontrolni tretman, dok su vrijednosti Na⁺ u korijenu bile najviše među svim genotipovima. Rezultate u skladu s ovim istraživanjem zabilježio je Ayaz i sur., (2021) gdje je kultivar 'Ayvalik' zabilježio signifikantan porast relativnog sadržaja iona Na⁺ u listu i korijenu. U našem istraživanju vrijednosti sadržaja Cl⁻ u listovima izboja kod tog kultivara (iako signifikantno povećane u odnosu na kontrolni tretman) bile su najniže u promatranoj grupi, dok su vrijednosti Cl⁻ u korijenu bile najviše u grupi. Istraživanja pokazuju da su masline, u usporedbi s Na⁺, manje osjetljive na Cl⁻, koji općenito nije fitotoksičan za stabla masline (Tattini i sur., 1992; Melgar i sur., 2009). Ioni Cl⁻ vjerojatno su pridonijeli osmotskoj prilagodbi, iako u manjoj mjeri od Na⁺. Kultivar 'Oblica' istaknuo se kao genotip sa signifikantno visokim vrijednostima iona Cl⁻ u listovima izboja, dok su više vrijednosti zabilježene samo kod kultivara 'Perišićeva mastrinka' i genotipa MLJ 28. Usporedbom rezultata ovog istraživanja s kratkotrajnim izlaganjem s rezultatima istraživanja s dugotrajnim izlaganjem biljaka povišenom salinitetu, pretpostavljamo da je vremenski period

izlaganja ključ različite dinamike usvajanja iona soli, u ovim primjerima Na^+ i Cl^- . Storey i Walker (1999) zaključili su da je određenim genotipovima citrusa osjetljivim na povišeni salinitet potrebno duže vrijeme za akumulaciju iona Na^+ i Cl^- do stabilne razine nego genotipovima otpornim na povišeni salinitet. To bi objasnilo ranu percepciju stresa kod osjetljivijih kultivara kao što je 'Leccino' koji je reagirao brzo smanjujući intezitet rasta izboja (Slika 15) i spriječio translokaciju štetnih iona Na^+ u osjetljive listove izboja (Slika 18). Slični rezultati zabilježeni su i kod grupe hrvatskih kultivara za genotipove MLJ 27, MLJ 29 i kultivar 'Pačica' (Slika 18) te kod kultivara 'Ayvalik' u grupi inozmenih kultivara (Slika 18).

Osmotska prilagodba u listovima izboja maslina u uvjetima abiotskih stresa povišenog saliniteta i suše mogla se postići i akumulacijom K^+ i Ca^{2+} . Zabilježeno je da povišeni salinitet negativno utječe na sadržaj hranjivih tvari u glikofitnim usjevima, uključujući masline (Loupassaki i sur., 2002; Fernández-Escobar, 2019). To je potvrđeno rezultatima za sadržaj iona listova izboja masline, prvenstveno predstavnika osjetljivih maslina, kultivara 'Leccino' (Tablice 15-18), neovisno o promatranoj grupi. Kod kultivara 'Leccino' vrijednosti K^+ i Ca^{2+} u tretmanu povišenog saliniteta bile su u razini kontrolnog tretmana, a sadržaj K^+ je i u tretmanu suše bio u razini kontrolnog tretmana. Standardni kultivari 'Koroneiki' i 'Oblica' su imali signifikantno niže vrijednosti K^+ i Ca^{2+} u oba tretmana, s iznimkom sadržaja K^+ u listu kultivara 'Oblica' koji je bio sličan kontroli. Dobiveni rezultati su pokazali da je kultivar 'Leccino' mogao održavati dovoljnu koncentraciju K^+ u citoplazmi stanica listova izboja u uvjetima oba stresa (Ragel i sur., 2019). Slične rezultate zabilježio je i Ayaz i sur., (2021) gdje je relativan sadržaj K^+ i Ca^{2+} u listovima bio u razini kontrolnog tretmana. Genotipovi iz grupe divljih maslina LN 11 i MLJ 25 te genotip PLJ 7 iz grupe hibridnih maslina jedini su imali signifikantno povišene vrijednosti Ca^{2+} u tretmanu suše što sugerira da imaju učinkovitije mehanizme usvajanja Ca^{2+} u uvjetima suše (Tablice 15-18). Tattini i Traversi (2009) izvijestili su da masline u tretmanu povišenog saliniteta dodatno opskrbljene Ca^{2+} pokazuju učinkovitiju sposobnost translokacije Na^+ u izboje biljke. To je u suglasnosti s dobivenim rezultatima za prethodno navedene masline divljeg i hibridnog genotipa jer su u tretmanu povišenog saliniteta ti genotipovi ostvarili vrijednosti Ca^{2+} slične kontrolnom tretmanu (Tablice 15-18).

Curenje kalija (KL) iz biljnih stanica često se koristi kao pokazatelj oštećenja tkiva uzrokovanih stresom što se odnosi na curenje K^+ i određenih protuiona (Demidchik i sur., 2014). Nedavna istraživanja sugeriraju sudjelovanje ROS, posebice hidroksilnog radikala i vodikovog peroksida

u aktivaciji proteinskih kanala za iznos K^+ iz stanice (Demidchik i sur., 2014). Signifikantno povećana razina pojedinih biokemijskih pokazatelja i paralelno povećana vrijednost KL zabilježena je kod kultivara 'Oblica' (povećana aktivnost enzima SOD) u oba tretmana, genotipa LN 11 (povećana aktivnost enzima SOD i GPOD) u tretmanu suše i kultivara 'Pačica' (povećani sadržaj MDA i prolina) u tretmanu povišenog saliniteta. Kod ostalih genotipova koji su imali povišene vrijednosti KL može se pretpostaviti da su one rezultat povećanih količina hidroksilnih radikala i vodikovog peroksida nastalih djelovanjem NADPH oksidaze ili nekog drugog izvora (Baxter i sur., 2014).

Međutim, relativan sadržaj K^+ u korijenu signifikantno se smanjio u gotovo svakom promatranom genotipu neovisno o primjenjenom tretmanu osim kod kultivara 'Oblica' u tretmanu povišenog saliniteta (Tablice 19-22). U ovom istraživanju genotip PLJ 18 iz grupe divljih maslina jedini je imao signifikatno povećanu razinu K^+ u korijenu u tretmanu suše. Smanjeni sadržaj K^+ u korijenu neovisno o primjenjenoj koncentraciji zabilježili su i Ayaz i sur., (2021) u istraživanju sa tri turska kultivara. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju mogu implicirati da je ograničenje unosa K^+ iz tla, uzrokovano osmotskom komponentom stresa (Wang i sur., 2013) zaustavljeno, i da je krenula faza ionskog stresa uzrokovana ionima Na^+ i Cl^- . Prema Tattini i sur. (2008), pretpostavljeno je da protionske pumpe u stanicama korijena osjetljivijih kultivara funkcioniraju u znatno manjoj razini u odnosu na one u stanicama otpornijih kultivara koje im omogućavaju da u uvjetima povišenog saliniteta usvajaju značajno veće količine iona K^+ (Negrini i sur., 1994); Maathius i Amtmann, 1999); Blumwald i sur., 2000); Tester i Davenport, 2003). Utvrđeno je da preferencijalna akumulacija toksičnih iona u starijim listovima predstavlja jedan od mehanizama za sprječavanje prekomjernog akumuliranja soli u mladim listovima izboja (Bongi i Loreto, 1989); Loupassaki i sur., (2002). Najveće smanjenje sadržaja K^+ u prethodno spomenutim istraživanjima zabilježeno je upravo u korijenu i starom lišću, što upućuje na to da maslina može održati visoke razine K^+ u mladim listovima te da može djelovati kao glavni monovalentni kationski osmotik u uvjetima povećanog saliniteta. Smanjenje koncentracije iona K^+ u korijenu masline, što je rezultiralo niskim $K^+ : Na^+$ omjerom, može upućivati na mehanizam kojim biljka masline postiže ionsku ravnotežu nakon primanja visokih koncentracija Na^+ u korijen. Ovaj mehanizam može uključivati povećane translokacije K^+ iz starog u mlado lišće (Marschner, 1995). Ranija istraživanja na maslini zabilježila su kako je osim korijena i stabljika važno mjesto za skladištenje potencijalno toksičnih iona, prvenstveno za translokaciju Na^+ iz starih listova u izboj (Tattini i sur., 1992; Tattini, 1994). Haimler i sur. (1995) i Rossi i sur. (2014) navode kako

lipidna struktura korijenovih stanica ima ključnu ulogu između unosa Na^+ u korijen i njegov transport u izboj.

Vrijednosti iona Ca^{2+} bile su povećane čak i signifikantno u tretmanu suše kod velikog broja genotipova neovisno o promatranoj grupi. Tretman povećanog saliniteta djelovao je negativnije na usvajanje iona Ca^{2+} stoga su vrijednosti kod većine genotipova snižene, a rijetko signifikantno povećane. Razlog tome je vjerojatno visoka koncentracija iona Na^+ koja istiskuje Ca^{2+} iz veznih mjesta u plazmatskoj membrani s posljedičnim gubitkom $\text{K}^+ : \text{Na}^+$ selektivnosti (Tablice 19-22). Ranija istraživanja potvrdila su ključnu ulogu Ca^{2+} u ograničavanju toksičnog učinka iona Na^+ na integritet plazmatske membrane u stanicama korijena. Povećanje omjera $\text{Ca}^{2+} : \text{Na}^+$ u vanjskoj otopini ublažava učinke saliniteta na depolarizaciju i selektivnost plazmatske membrane (Cramer, 2002). Oba tretmana imala su sličan utjecaj na usvajanje iona Mg^{2+} iako je kultivar 'Koroneiki' imao signifikantno povećane vrijednosti u svim promatranim grupama osim kod grupe divljih maslina u tretmanu suše. Kultivari 'Pačica', 'Ayvalik' te genotipovi MLJ 27 i BR 19 su također imali signifikantno povećane vrijednosti tog iona u istom tretmanu. Slično kao i kod iona Ca^{2+} možemo pretpostaviti da je došlo do antagonizma između iona Mg^{2+} sa ionima K^+ , Ca^{2+} i Na^+ (Lešić i sur., 2004).

6.4. Biokemijske analize

U biljnim stanicama ROS nastaju kao potencijalno štetni nusprodukt fotosintetskih i respiratornih lanaca transporta elektrona. ROS se također mogu enzimski proizvesti različitim oksidazama kako bi poslužile kao signalne ili posredničke molekule u metabolizmu, razvoju i odgovorima na stres (Mittler i sur., 2011). Male koncentracije ROS mogu uzrokovati ekspresiju određenih gena čime se može spriječiti peroksidacija lipida (Alscher i sur., 2002). Zasad nema dokaza prilagodbe enzima na prisustvo soli tako da mehanizmi za uklanjanje/skladištenje soli na staničnoj razini uključuju zadržavanje soli izvan citoplazme i akumulaciju u vakuoli stanice. Da se to događa u većini vrsta pokazuju visoke koncentracije soli zabilježene u listovima biljaka izloženim koncentracijama od 200 mM NaCl koji još uvijek funkcioniraju normalno, dok će iste vrijednosti NaCl u potpunosti potisnuti enzimsku aktivnost *in vitro* (Munns i sur., 1983). Općenito, Na^+ počinje inhibirati enzime pri koncentraciji iznad 100 mM. Koncentracija kod koje ioni Cl^- postaju toksični još je manje definirana, ali je vjerojatno u istom rasponu kao kod iona Na^+ (100 mM) (Hasegawa i sur., 2000).

Općenito, povećana aktivnost SOD je prva linija obrane od ROS, jer taj antioksidativni enzim katalizira dismutaciju superoksidnih radikala uglavnom nastalih kao rezultat curenja elektrona iz fotosintetskih i respiratornih transportnih lanaca elektrona do kisika (Sofo i sur., 2008). Aktivnost enzima SOD bila je povećana kod kultivara 'Leccino' i 'Oblice' te genotipa LN 11 kao odgovor na tretman povišenog saliniteta, iako je viša aktivnost uočena u tretmanu suše. Međutim, jedini kultivar kod kojeg nije zabilježena povećana aktivnost je 'Koroneiki', dok je kultivar 'Ayvalik' zabilježio signifikantno najveću aktivnost enzima SOD od svih ispitanih genotipova (Slika 22). U istraživanju Goreta i sur. (2007), rani odgovor kultivara 'Leccino' na postupno povećanje saliniteta uključivao je povećanu aktivnosti enzima SOD, koja se smanjivala s produljenim izlaganjem povišenom salinitetu. U toj studiji uočen je inverzni obrazac promjene aktivnosti SOD u odnosu na trajanje abiotskog stresa saliniteta otpornijeg kultivara 'Oblica', implicirajući njezin učinkovitiji mehanizam prilagodbe na povišeni salinitet u odnosu na kultivar 'Leccino'. Međutim, potrebno je napomenuti da bi se u srednjoročnim i dugoročnim pokusima povišenog saliniteta mogli pojaviti i drugi znakovi stresa, smanjujući aktivnost enzima SOD jer se vodikov peroksid dodatno razgrađuje katalazom i peroksidazama (Das i Roychoudhury, 2014).

Slično kao i kod enzima SOD, povećana aktivnost enzima GPOD zabilježena je kod oba tretmana, ali ne i kod svih grupa, te u znatno smanjenim vrijednostima ovisno o promatranom genotipu (Slika 23). Genotipovi LA 13 i LN 11 su imali signifikantno veću aktivnost enzima GPOD u tretmanu suše, što je u skladu s rezultatima enzima SOD. Kultivari 'Koroneiki', 'Leccino' i 'Oblica' su imali signifikantno smanjenu aktivnost enzima GPOD neovisno o promatranj grupi i primjenjenom tretmanu. Smanjena aktivnost tog enzima zabilježena je i kod kultivara 'Arbequina' izložena istoj koncentraciji soli primijenjenoj u ovom istraživanju, ali na dulji vremenski period (Del Buono i sur., 2021). Genotipovi MLJ 29, PLJ 7, kultivari 'Ayvalik' i 'Piculja' pokazali su signifikantno povećanu aktivnost enzima GPOD u oba tretmana s tim da je kultivar 'Ayvalik' zabilježio povećanu aktivnost enzima SOD samo u tretmanu suše. Bez obzira na povećanu aktivnost enzima SOD kod većine genotipova u oba tretmana, aktivnosti GPOD su bile smanjene kao i relativan sadržaj MDA koji je kod većine grupa sličan kontrolnom tretmanu. Iznimke u relativnom sadržaju MDA su kultivari 'Ayvalik', 'Perišićeva mastrinka', 'Pačica' te genotipovi MLJ 27, MLJ 29 i PLJ 22 većinom u tretmanu suše (Slika 24). Ayaz i sur., (2021) također su zabilježili signifikantno više vrijednosti MDA za kultivar 'Ayvalik' ali samo u tretmanu s najvišom koncentracijom od 300 mM NaCl i to nakon 15 dana

trajanja eksperimenta. Već 30-tog dana eksperimenta vrijednosti su se značajno snizile u odnosu na kontrolni tretman, pa možemo pretpostaviti da su drugi enzimi, poput katalaze i askorbat peroksidaze, mogli biti uključeni u detoksikaciju vodikovog peroksida. Do sličnih zaključaka su došli Bashir i sur., (2021) koji su u svom istraživanju primjenili različite koncentracije soli (50, 100, 200 mM NaCl) s primarnom svrhom provjere ekspresije različitih gena i alternativnih metabolizama masline in-vitro na sol osjetljivog kultivara 'Sirole' i na sol otpornog 'Canino' te transgenetskih linija 'Canino AT17-1' i 'Canino AT17-2' u in vitro uvjetima. Različite koncentracije NaCl nisu značajno utjecale na sve genotipove, dok je transgenetska linija 'Canino AT17-1' već u kontrolnom tretmanu imala 30 % povišene vrijednosti MDA u odnosu na otporni kultivar 'Canino'. Za razliku od ovdje prikazanih rezultata, tretmani povišenog saliniteta i suše povećali su peroksidaciju lipida kod kultivara 'Chétoui' nakon 21 dana kod tretmana povišenog saliniteta i suše (Abdallah i sur., 2018). U tom istraživanju biljke su bile izložene višoj koncentraciji NaCl (200 mM), a stres suše postignut je reduciranim navodnjavanjem. Međutim redukcijom navodnjavanja kroz vrijeme trajanja eksperimenta osmotski potencijal ne može se kontrolirati ni održati na istoj razini što je vjerojatno moglo pridonijeti višoj razini oksidativnog stresa.

Univerzalan odgovor stanice na vanjski osmotski potencijal je akumulacija metabolita koji djeluju kao kompatibilni osmoliti, odnosno tvari koje neće inhibirati normalne metaboličke reakcije. Organske tvari koje se najčešće akumuliraju kod abiotičkog stresa povišenog saliniteta su prolin i glicin betain, iako se i druge molekule mogu akumulirati pri nižim koncentracijama soli (Hasegawa i sur., 2000). Osim što djeluje kao izvrstan osmoprotektant, smatra se da prolin tijekom stresa ima tri glavne uloge – može djelovati kao metalni kelator, kao antioksidans i kao signalna molekula (Hayat i sur., 2012). U ovom istraživanju razine prolina ostale su u razini kontrolnog tretmana ili čak smanjene kao odgovor na abiotičke stresove u grupi hibridnih maslina i svih standardnih kultivara. Slične rezultate izvijestili su Regni i sur. (2019), dok su Ben Ahmed i sur. (2009.) utvrdili povećanje prolina u maslini izloženoj povišenom salinitetu. Zanimljivo je da je većina genotipova iz grupe divljih maslina, izuzev genotipa LA 13, imala povišenu koncentraciju prolina, te da su genotipovi MLJ 27, MLJ 29 i kultivar 'Pačica' imali podjednako povišene vrijednosti neovisno o primijenjenom tretmanu (Slika 25). Budući da nije mjeren sadržaj prolina u korijenu maslina, ne može se sa sigurnošću tvrditi da prolin ne djeluje kao osmolit u stanicama korijena maslina. Međutim, zabilježene razine te aminokiseline u listovima izboja ne podržavaju njezinu ulogu kao glavnog osmolita u osmotskoj prilagodbi i prilagodbi na solni stres. Bashir i sur. (2021) su zabilježili povišene razine prolina kod otpornog

kultivara 'Canino' u odnosu na osjetljivi kultivar 'Sirole' kod kontrolnog tretmana. Pri niskim koncentracijama od 50 mM NaCl, upravo je kultivar 'Sirole' imao višu koncentraciju prolina, a nakon primjene 200 mM NaCl sadržaj prolina je bio veći kod kultivara 'Canino' iako su koncentracije bile signifikantno manje od kontrolnog tretmana. Do sličnog zaključka došli su autori Sotiras i sur. (2016) koji su istraživali utjecaj povišenog saliniteta (80 mM) na određene parametre uključujući sadržaj prolina i vodikovog peroksida u listovima trogodišnje sadnica nešpula (*Eriobotrya japonica* Lindl.) u periodu od 81 dan. Rezultati su pokazali da se paralelno s povećanjem koncentracije vodikovog peroksida povećava i sadržaj prolina međutim ne u dovoljnoj količini s obzirom da su dijelovi listova počeli nekrotizirati. Na temelju spomenutog i ovog istraživanja moglo bi se zaključiti da sadržaj prolina neovisno o dužini trajanja eksperimenta ne može poslužiti kao pouzdani indikator razine stresa. Slični rezultati utvrđeni su i u istraživanju Ayaz i sur. (2021) u kojem su se vrijednosti prolina u listovima povećavale u skladu s povećanjem koncentracije NaCl neovisno o promatranom genotipu. U tom je istraživanju zabilježeno da je za uočavanje povećanja sadržaja prolina iznimno bitno praćenje njegovog sadržaja tijekom prva dva tjedna izloženosti stresu, budući da sadržaj te aminokiseline može signifikantno opadati duljim izlaganjem biljke stresu, a što je uočeno i u istraživanju Goreta i sur. (2007). Prema rezultatima Bashir i sur. (2021) razine prolina mogu jako varirati ovisno o tretmanu i genotipu te ukoliko se ne prati trend rasta/pada sadržaja te aminokiseline može se donijeti krivi zaključak o prolina i razini stresa kojeg je biljka preživjela kao i razinu stresa kojeg biljka trenutno prolazi. Ovisno o vremenu izloženosti abiotičkom stresu, uloga prolina se više može promatrati kroz prizmu signalne molekule koja u kratkom vremenu može upućivati smanjuje li se ili raste koncentracija ROS u biljci (Bashir i sur. 2021), te na temelju dodatnih indikatora stresa procijeniti realno stanje stresa.

Abiotički stres suše induciran manitolom je imao jači učinak na fotosintetske pigmente, posebice na sadržaj klorofila *a*, svih genotipova maslina neovisno o grupi, nego stres povišenog saliniteta, (Slika 26). Osjetljivi kultivar 'Leccino' je u tretmanu povišenog saliniteta održao vrijednosti klorofila i karotenoida u razini kontrolnog tretmana, što je u suprotnosti s rezultatima ostalih biokemijskih pokazatelja stresa. S druge strane, utvrđeno je za genotip MLJ 27 iz grupe hrvatskih maslina koji je imao signifikantno smanjen sadržaj svih fotosintetskih pigmenta u tretmanu povišenog saliniteta, da su ostali biokemijski pokazatelji bili na razini kontrolnog tretmana (izuzev sadržaja prolina koji je bio signifikantno povišen). Međutim ukoliko se promatraju i morfometrijski rezultati, zabilježeno je da su oba genotipa zabilježila signifikantnu redukciju dužine izboja (Slika 15), površine lista (Slika 16) i masu suhog izboja (Slika 17).

Takvi rezultati nam sugeriraju da na redukciju biomase biljke ne utječe samo oštećenje fotosintetskog sustava već vjerojatno dolazi do ekspresije gena za pokretanje niza biokemijskih reakcija kao odgovor na određenu vrstu stresa. Ukoliko se sagledaju svi biokemijski parametri ne samo u tretmanima abiotskog stresa već i kod kontrole, možemo zabilježiti različite vrijednosti enzima, aminokiselina i anorganskih iona za homeostazu biljnih stanica određenog genotipa. U istraživanju Bashir i sur. (2021) također je zabilježen smanjen sadržaj ukupnih fotosintetskih pigmenta i karotenoida pod utjecajem soli. U navedenom istraživanju primjenjene su različite koncentracije soli (50, 100, 200 mM NaCl) s primarnom svrhom provjere ekspresije različitih gena i alternativnih metabolizama masline na sol osjetljivog kultivara 'Sirole' i na sol otpornog kultivara 'Canino' te transgenetskih linija 'Canino AT17-1' i 'Canino AT17-2'. Rezultati fotosintetskih pigmentata pokazali su pad ukupnog sadržaja klorofila (*a* i *b*) i karotenoida neovisno o kultivaru i transgenetskoj liniji te je pad sadržaja tih pigmentata bio u korelaciji s povećanjem koncentracije NaCl. U tom je istraživanju ukupni sadržaj klorofila i karotenoida bio najveći kod transgenetske linije 'Canino AT17-1' u kontrolnom tretmanu, koji je nakon izlaganja koncentraciji od samo 50 mM NaCl zabilježio drastičan pad, dok su na sol otporni kultivar 'Canino' i na sol osjetljivi kultivar 'Sirole' pratili trend smanjivanja s povećanjem koncentracije soli. Premda, iako kod osjetljivog kultivara 'Sirole' u kontrolnom tretmanu su zabilježene signifikantno najniže vrijednosti ukupnih klorofila i karotenoida. Kako bi se pravilno tumačili rezultati fotosintetskih pigmentata, nužno je poznavati rezultate prijašnjih istraživanja vezano uz osjetljivost kultivara na povišeni salinitet jer već niske koncentracije soli (50 mM NaCl) imaju signifikantan učinak na promjenu ukupnog sadržaja pigmentata. Rezultate suprotno ovom istraživanju zabilježili su Abdallah i sur., (2018) gdje je ukupni sadržaj klorofila kod 7-mjesečnog kultivara 'Chétoui' izložen povišenom salinitetu (200 mM NaCl) i suši tijekom 21 dana bio sličan kontroli, dok su se ukupni karotenoidi povećali. Međutim, u studiji Mousavi i sur. (2019.), dulje izlaganje (43 dana) kultivara 'Koroneiki' abiotskom stresu povišenog saliniteta iste koncentracije (200 mM NaCl) uzrokovalo je smanjenje sadržaja klorofila, iako niže koncentracije NaCl nisu utjecale na njegove vrijednosti. Rezultati sadržaja fotosintetskih pigmentata kao i sadržaja aminokiseline prolina dobiveni u ovom istraživanju sugeriraju da fotosintetski pigmenti i prolin nisu pouzdani pokazatelji stresa te da su potrebni dodatni podaci u svrhu što preciznijeg određivanja razine stresa. Rezultati ovog i navedenih istraživanja sugeriraju da odgovor masline na povišeni salinitet i sušu snažno ovisi o primjenjenoj tehnici izlaganja biljke povišenom salinitetu (biljke uzgajane u in vitro uvjetima brže reagiraju na povišeni salinitet), genotipu, starosti biljke i

vremenskom periodu uzorkovanja biljnog tkiva i trajanju izloženosti stresu (Fernández-Escobar, 2019; Bashir i sur., 2021; Henn i Damschen, 2021).

7. ZAKLJUČCI

U zaključcima su komentirani rezultati istraživanja primjene abiotičkih stresova izazvanih povišenom koncentracijom soli i sušom kod 26 genotipova maslina podijeljenih u četiri grupe: divlje masline (A), hrvatski kultivari (B), inozemni kultivari (C) i hibridne masline (D). Standardni kultivari su potvrdili genotipske karakteristike i omogućili objektivnije tumačenje rezultata uspoređujući grupe i pojedine genotipove unutar grupe. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Analizom uzoraka 26 različitih genotipova (10 divljih i 16 kultiviranih) maslina kroz identifikaciju alela 12 SSR-lokusa te njihovom usporedbom s rezultatima *ex situ* bankama germplazme masline IFAPA, WOGBM i FOGB utvrđeno je bogatstvo germplazme hrvatskih autohtonih divljih i kultiviranih maslina.
2. Bayes-ovom analizom populacijske strukture potvrđeno je da su analizirani genetski skupovi prema udjelu genoma (Q) svake jedinice potekle iz tri izvorna genetska skupa masline: divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B) i inozemnih kultivara (C).
3. Dužina i suha masa izboja te površina lista signifikantni su pokazatelji razine stresa suše kod analiziranih genotipova.
4. Obzirom na visok sadržaj iona soli, Na^+ i Cl^- su u listovima izboja kultivara 'Oblica' vjerojatno uključeni u održavanje osmotskog tlaka u stanicama jer usprkos visokim vrijednostima tih iona (koji su najvjerojatnije skladišteni u staničnim vakuolama) ostali rezultati nisu upućivali na ozbiljnije znakove stresa. U ovom istraživanju zbog kratke izloženosti relativno visokoj koncentraciji soli i manitola, osjetljivi i abiotskom stresu podložniji genotipovi imali su niže razine usvojenih iona Na^+ i Cl^- u listovima izboja. Hipoteza da je određenim genotipovima osjetljivim na povišeni salinitet potrebno duže vrijeme za akumulaciju Na^+ i Cl^- do stabilne razine nego genotipovima otpornim na povišeni salinitet daje prihvatljivo objašnjenje rezultata koje su dobiveni usporedbom ovog i istraživanja s dugotrajnim izlaganjem stresu povišenog saliniteta.
5. Činjenica da je 'Leccino' kao najosjetljiviji kultivar usvojio najviše K^+ i Ca^{2+} u listovima izboja u tretmanu povišenog saliniteta, te da su genotipovi iz grupe divljih maslina LN

11 i MLJ 25 te genotip PLJ 7 iz grupe hibridnih maslina jedini imali signifikantno povišene vrijednosti Ca^{2+} u tretmanu suše, navodi na zaključak da je usvajanje Ca^{2+} energetski najučinkovitiji odgovor masline na abiotske stresove u kratkom vremenskom razdoblju kako je navela i citirana literatura. Relativan sadržaj K^+ u korijenu signifikantno se smanjio u gotovo svakom promatranom genotipu neovisno o primjenjenom tretmanu, što označava da su svi genotipovi bili u određenoj razini stresa.

6. Što se tiče biokemijskih pokazatelja, trend promjena u aktivnosti enzima SOD kao i u sadržaju klorofila *a*, sugerira da ti parametri mogu poslužiti kao indikatori abiotskog stresa povišenog saliniteta a posebice stresa suše. Aminokiselina prolin može se promatrati u kontekstu signalne molekule koja u kratkom vremenu može upućivati smanjuje li se ili raste koncentracija ROS u biljci.
7. Genotipovi iz grupe divljih maslina LA 13 i PLJ 18 te genotip iz grupe hibridnih maslina PLJ 7 svojim kontinuirano zadovoljavajućim rezultatima morfometrijih mjerenja i biokemijskih analiza, zaslužuju daljnja istraživanja na bazi genotipske karakterizacije kao što je veličina, kvaliteta ploda te procjena radmana ulja jer već sada predstavljaju vrijedni materijal za buduće oplemenjivačke programe. Autohtoni kultivar 'Oblica' uspio se prilagoditi na sve uvjete abiotskih stresova povišenog saliniteta i suše, ne narušavajući dinamiku rasta usprkos povećanoj aktivnosti enzima antioksidacijskih sustava. Inozemni kultivar 'Koroneiki' nije imao signifikantno povećanu aktivnost antioksidativnih enzima kao ni akumulaciju osmolita što odgovara navodima literature da se radi o kultivaru koji je iznimno otporna na uvjete abiotskog stresa, na što može sugerirati i njegovo prirodno stanište.
8. Odgovor masline na povišeni salinitet i sušu snažno ovisi o tehnički ispravnoj i kontroliranoj metodi izlaganja biljke povišenom salinitetu i suši, starosti biljke i vremenskom periodu izloženosti. Možemo pretpostaviti da različiti genotipovi aktiviraju različitu vrstu mehanizma obrane od akumulacije anorganskih iona do antioksidativnih enzima i sinteze osmolita, počevši od energetski najmanje zahtjevnih. Prema pregledu literature i rezultatima ove disertacije, ranije uzorkovanje biljnog tkiva daje konkretnije rezultate biokemijskih paramatera koju mogu preciznije odrediti razinu stresa od morfometrijskih mjerenja.

9. Tumačeći rezultate koji su signifikantno pridonijeli boljem razumijevanju otpornih i osjetljivih genotipova može se predložiti budući protokol za selekciju velikog broja genotipova u relativno kratkim eksperimentima s točno određenim parametrima koji se trebaju analizirati.

8. LITERATURA

1. Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. 1331-41. Review. PubMed PMID: 11997379
2. Amtmann, A., Sanders, D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29, 76–112
3. Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 98: 411-421
4. Ayaz, M., Varol, N., Yolcu, S., Pelvan, A., Kaya, U., Aydogdu, E., Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I. (2021). Three (Turkish) olive cultivars display contrasting salt stress-coping mechanisms under high salinity. *Trees* (2021) 35:1283-1298. doi.org/10.1007/s00468-021-02115-w
5. Ayers, N.M., McClung, A.M., Larkin, P.D., Bligh, H.F.J., Jones, C.A., Park W.D. (1997). Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 94: 773–781.
6. El Bakkali, A., Essalouh, L., Tollon, C., Rivallan, R., Mournet, P., Moukhli, A., Zaher, H., Mekkaoui, A., Hadidou, A., Sikaoiu, L., Khadari, B. (2019). Characterization of Worldwide Olive Germplasm Banks of Marrakech (Morocco) and Cordoba (Spain): Towards management and use of olive germplasm in breeding programs. *PLoS ONE* 14(10): e0223716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223716>
7. Bakarić, P. (2002). Sorte maslina Dubrovačkog primorja. Alfa 2, Dubrovnik.
8. Baldoni, L., Belaj, A. (2009). Oil crops: Olive. En: J. Vollmann and I. Rajcan (eds.), *Handbook of Plant Breeding*. Doi: 10.1007/978-0-387-77594-4_13
9. Barcaccia, G., Pallottini, L., Parrini, P., Lucchin, M. (2006). A genetic linkage map of a flint maize (*Zea mays* var. *Indurata* L.) Italian landraces using one way pseudo-test cross strategy and multilocus PCR based markers. *Maydica* 51: 469-480

10. Barranco, D. (2008). Variedades y Patrones. U: El cultivo del olivo (D Barranco, R Fernández-Escobar, L Rallo, eds), Mundi-Prensa y Junta de Andalucía. Madrid. 37-62
11. Bashir, M.A., Silvestri, C., Coppa, E., Brunori, E., Cristofori, V., Rugini, E., Ahmad, T., Hafiz, I.A., Abbasi, N.A., Nawaz Shah, M.K., Astolfi, S. (2021). Response of olive shoots to salinity stress suggests the involvement of sulfur metabolism. *Plants* 2021, 10, 350. doi.org/10.3390/plants10020350
12. Belaj, A., Muñoz-Díez, C., Baldoni, L., Porceddu, A., Barranco, D., Šatović, Z. (2007). Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Ann Bot* 100: 449-458
13. Belaj, A., Leon, L., Šatović, Z., De la Rosa, R. (2011). Variability of wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 129, 561-569 to cross-breeding programs. *Adv. Hort. Sci.*, 2008 22(2): 73-86
14. Bellini, E., Giordani, E., Rosati, A. (2008). Genetic improvement of olive from clonal selection to cross-breeding programs. *Adv. Hort. Sci.*, 2008 22(2): 73-86
15. Benčić, Đ. (1991). Morfološki sterilitet sorti maslina u Istri. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet, Zagreb
16. Besnard, G., Terral, J.F., Cornille, A. (2018). On the origin and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany* 00: 1-19, 00. Doi: 10.1093/aob/mcx145
17. Besnard, G., Cuneo, P. (2016). An ecological and evolutionary perspective on the parallel invasion of two cross-compatible trees. *AoB Plants* 8: plw056
18. Besnard, G., Khadari, B., Navascues, M., Fernandez-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., Savolainen, V. (2013). The complex history of the olive tree: from late Quaternary diversification of

Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. Proc R Soc B: Biol Sci 280 (1756):20122833. Doi: 10.1098/rspb.2012.2833

19. Besnard, G., Rubio De Casas, R., Christin, P.A., Vargas, P. (2009). Phylogenetics of *Olea* (*Oleaceae*) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Ann bot* 104: 143-160
20. 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
21. Besnard, G., Rubio de Casas, R., Vargas, P. (2007). Nuclear and plastid DNA polymorphism reveals large-scale reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea* L.). *J Biogeogr* 34: 736–752
22. Besnard, G., Baradat, P., Berville, A. (2001). Genetic relationship in the olive *Olea europaea* L. reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102: 251-258
23. Blumwald, E., Aharon, G.S., Aps, M.P. (2000). Sodium transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 140-151
24. Bonghi, F., Loreto, F. (1989). Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 90, 1408–1416
25. Bowcock, A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L. L. (1994). High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457
26. Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (1998). Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci.* 3, 411–412
27. Breton C., Tersac, M., Bervillé, A. (2006). Genetic diversity and gene flow between the wild olive oleaster, *Olea europaea* L. and the olive: several Plio-Plesitocene refuge zones

- in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *J Biogeogr* 33: 1916-1928
28. Brito, C., Dinis, L.T., Pereira, J.M., Correia, C.M. (2019). Drought stress effects and olive tree acclimation under a changing climate. *Plants*, (8), 232
 29. Brown, A.H.D. (1979). Enzyme polymorphism in plant population. *Theor Pop Biol* 15: 1-42
 30. Camarero, J.J., Manzanedo, R.D., Sanchez-Salguero, R., Navarro-Cerrillo, R.M. (2013). Growth response to climate and drought change along an aridity gradient in the southernmost *Pinus nigra* relict forests. *Annals of Forest Science* 70 (8) 769
 31. Chartzoulakis, K.S. (2005). Salinity and olive: growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. *Agric. Water Man.* 78, 108–121
 32. Chartzoulakis, K.S, Loupassaki, M., Androulakis, I. (2002). Comparative study on NaCl salinity of six olive cultivars. *Acta Horticult.* 586 (1), 497–502
 33. Chartzoulakis K.S., Greenway, H., Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in glycophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31, 149–190
 34. Cramer, G.R. (2002). Sodium-calcium interactions under salinity stress. In: L'äuchli, A., Lutge, U. (Eds.), *Salinity. Environment-Plants-Molecules*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 205–227
 35. Cramer, G.R., Bowman D.C. (1991). Kinetics of maize leaf elongation increased yield threshold limits short-term, steady-state elongation rates after exposure to salinity. *Journal of Experimental Botany* 42, 1417–1426
 36. Davenport, R., Reid, R.J., Smith, F.A. (1997). Sodium–calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiol. Plant.* 99, 323–327

37. Díez, C.M., Trujillo, I., Martínez-Uriroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., Gaut, B.S. (2014). Olive domestication and diversification in the Mediterranean basin. *New Phytologist* 206: 436–447
38. De la Rosa, R., Klepo, T., Arias-Calderon, R. (2014). Current status of conservation, evaluation and usefulness of wild olive germplasm. Proc. VIIth IS on Olive Growing, Eds.: F. Vita Serman et al. Acta Hort. 1057, ISHS
39. Delfine, S., Alvino, A., Villani, M.C., Loreto, F., (1999). Restrictions to CO₂ conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiol.* 119, 1101–1106
40. Earl, D.A., Vonholdt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4 (2):359-361
41. Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14 (8):2611-2620
42. Evans, J.R., Von Caemmerer, S., Setchell, B.A., Hudson. G.S. (1994). The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australian Journal of Plant Physiology* 21, 475–495
43. Everard, J.D., Gucci, R., Kann, S.C., Flore, J.A., Loescher, W.H. (1994). Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various leaves of root zone salinity. *Plant Physiol.* 106: 281–292
44. Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131:479-491
45. Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* 10: 564-567

46. FAOSTAT: Statistical databases and data-sets of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://faostat.fao.org/default.aspx>)
47. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 185-212
48. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenesis: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 – 791
49. Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
50. Fitch, W. M., Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees: A method based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science* 155: 279-284
51. Foyer, C.H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal.*:861-905.Review. PubMed PMID: 19239350
52. Free, J. B. (1993). *Insect pollination of crops*. London, 2nd ed. Academic Press
53. Gao, X.J., Giorgi, F. (2008). Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution regional climate projections. *Global and Planetary Change*, 62,195-209, 2008.
54. Garrett, R.H., Grisham, C.M. (2013). *Biochemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont
55. Geric, I., Zlokolica, M., Geric, C., Stuber, C. (1989). Races and populations of maize in Yugoslavia. Isozyme variation and genetic diversity. IBPGR, Rome

56. Giorgi, F. (2006). Climate change hot spots. *Geophys. Res. Lett.*, 33, L08707, doi: 10.1029/2006GL025734
57. Goreta, S., Bucevic-Popovic, V., Pavela-Vrancic, M., Perica, S., (2007). Salinity-induced changes in growth, superoxide dismutase activity, and ion content of two olive cultivars. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 398–403
58. Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* 86: 485–486
59. Gould, I., De Waegemaeker, J., Tzemi, D., Wright, I., Pearson, S., Ruto, E., Karrasch, L., Christensen, L.S., Aronsson, H., Eich-Greatorex, S., Bosworth, G., Vellinga, P. (2021). Salinization threats to agriculture across the north sea region. *Future of Sustainable Agriculture in Saline Environments*, 1st Edition. CRC Press. Doi: 10.1201/9781003112327-5
60. Gouveia, C., Trigo, R.M., Begueria, S., Vicente-Serrano, S.M. (2016). Drought impacts on vegetation activity in the Mediterranean region: An assessment using remote sensing data and multi-scale drought indicators. *Global and Planetary Change*. Doi: 10.1016/j.gloplacha.2016.06.011
61. Green, P.S. (2002). A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin* 57: 91-140
62. Gucci, R., Caruso, G. (2011). Environmental stresses and sustainable olive growing. *Acta Hort.* 924:19-30
63. Gucci, R., Lombardini, L., Tattini, M. (1997a). Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol.* 17, 13
64. Gucci, R., Tattini, M. (1997). Salinity tolerance in olive. *Hortic. Rev.* 17, 177–204
65. Hannachi, H., Martin Gomez, J.J., Saadaoui, E., Cervantes, E. (2017). Stone diversity in wild and cultivated olive trees (*Olea europaea* L.) *Dendrobiology* (2017), vol. 77, 19-32. Doi: 10.12657/denbio.077.002

66. Harper, R.J., Dell, B., Ruprecht, J.K., Sochacki, S.J., Smettem, K.R.J. (2021). Salinity and the reclamation of salinized lands. *Soils and Landscape Restoration*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813193-0.00007-2>. Elsevier Inc.
67. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463–499
68. Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signaling and Behavior* 7:11, 1456-1466
69. Hoerling, M., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X., Zhang, T., Pegion, P. (2012). On the Increased Frequency of Mediterranean Drought. *J. Clim.*, 25, 2146-2161
70. Hohl, M., Schopfer, P. (1991). Water relations of growing maize coleoptiles comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.* 95: 716–722
71. Holzmeister, C., Gaupels, F., Geerlof, A., Sarioglu, H., Sattler, M., Durner, J., Lindermayr, C. (2015). Differential inhibition of *Arabidopsis* superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. PubMed PMID: 25428993
72. Hunter, M.C., Smith, R.G., Schipanski, M.E., Atwood, L.W., Mortensen, D.A. (2017). Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience* 67, 386-391
73. IPCC (2021). „*Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*“ (Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)). Cambridge University Press. In Press.

74. Jarne, P., Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424–429
75. 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.* (5):1099-106
76. Khadari, B., El Bakkali, A., Essalouh, L., Tollon, C., Pinatel, C., Besnard, G. (2019). Cultivated olive diversification at local and regional scales: Evidence from the genetic characterization of French genetic resources. *Front. Plant. Sci.* 10:1593. Doi: 10.3389/fpls.201901593
77. Klepo, T., De la Rosa, R., Šatović, Z., León, L., Belaj, A. (2013). Utility of wild germplasm in olive breeding. *Scientia Horticulturae* 152: 92-101. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.12.010
78. Klepo, T. (2014). Genetska raznolikost kultiviranih i divljih maslina (*Olea europaea* L.) u Hrvatskoj. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
79. Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour.* 15, 1179–1191
80. Lavee, S., Avidan, B., Ben-Ari, G. (2014). Trends in breeding new olive varieties in Israel for quality and economic management. *Agricultural Sciences*, 2014, 5, 701-709
81. Lavee, S. (2013). Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae* 161 (2013) 333-339
82. Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Ćustić, M.H., Poljak, M., Romić, D. (2004). Povrčarstvo. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu. Agronomski fakultet – Zrinski d.d., Čakovec.

83. Leon, L., Diaz-Rueda, P., Belaj, A., De la Rosa, R., Carrascosa, C., Colmenero-Flores, J.M. (2020). Evaluation of early vigor traits in wild olive germplasm. *Scientia Horticulturae* 264; 109157
84. Leon, L., De la Rosa, R., Velasco, L., Belaj, A. (2018). Using wild olives in breeding programs: implications on oil quality composition. *Frontiers in Plant Science*. Volume 9 | Article 232
85. Litt, M., Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401
86. Loescher, W.H. (1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plant.* 70, 553–557
87. Loreto, F., Bonghi, G. (1987). Control of photosynthesis under salt stress in the olive. In: Prodi, F., Rossi, F., Cristoferi, G. (Eds.), *International Conference on Agrometeorology*, Fondazione Cesena Agricoltura, Cesena
88. Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F., Di Gusto, F. (2004). Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean basin. *Heredity* 92:343-351
89. Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, second ed. Academic Press, London
90. Melgar, J.C., Mohamed, Y., Serrano, N., Garcia-Galavis, P.A., Navarro, C., Parra, M.A., Benlloch, M., Fernandez-Escobar, R. (2009). Long term responses of olive trees to salinity. *Agricultural Water Management* 96; 1105-1113
91. Melgar, J.C., Benlloch, M., Fernandez-Escobar, R., (2006). Calcium increases sodium exclusion in olive plants. *Sci. Hortic.* 109, 303–305

92. Metternicht, G. (2017). Soils: salinization. The International Encyclopedia of Geography. Published by John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9781118786352.wbieg1044
93. Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L.L. (1997). MICROSAT: A Computer Program for Calculating Various Statistics on Microsatellite Allele Data, Version 1.5b; Department of Genetics, Stanford University: Stanford, CA, USA
94. Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollerym, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? Trends Plant Sci , 10, 300-9
95. Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetics diversity in crop plants: salient statical tools and considerations. Crop Sci 43: 1235-1248.
96. Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nature Genet. 3: 194-200
97. Mousavi, S., Regni, L., Bocchini, M., Mariotti, R., Cultrera, N. G. M., Mancuso, S., Googiani, J., Chakerolhosseini, R.M., Guerrero, C., Albertini, E., Baldoni, L., Proietti, P. (2019). Physiological, epigenetic and genetic regulation in some olive cultivars under salt stress. Scientific Reports, 9:1093. doi: 10.1038/s41598-018-37496-5
98. Mulas, M., Francesconi, A. H. D. (1999). Wild olive (*Olea europaea* L.) as a forestry species. S.I.S.E.F. Atti 2: 55-60
99. Munns, R., Passioura, J.B., Colmer, T.D., Byrt, C.S. (2019). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. New Phytologist, doi: 10.1111/nph.15862
100. Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol. 59:651-81
101. Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment 25, 239–250

102. Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment* 16, 15–24
103. Murillo, J. M., Madejon, E., Madejon, P., Cabrera, F. (2005). The response of wild olive to the addition of a fulvic acid-rich amendment to soils polluted by trace elements (SW Spain). *J Arid Environ* 63: 284–303
104. Neumann, P.M. (1993). Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant Cell and Environment* 16, 1107–1114
105. Ninčević, T., Jug-Dujaković, M., Grdiša, M., Liber, Z., Varga, F., Pljevljakušić, D., Šatović, Z. (2021). Population structure and adaptive variation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don along eastern Adriatic temperature and precipitation gradient. *Scientific Reports* (2021) 11:24333 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03548-6>
106. Oosterbaan, R.J. (2020). Soil salinity. Conference: Lectures, www.waterlog.info/lectures. Project: Soil salinity control and model applications.
107. Pellizzaro, G., Cesaraccio, C., Duce, P., Ventura, A., Zara, P. (2007). Relationships between seasonal patterns of live fuel moisture and meteorological drought indices for Mediterranean shrubland species, *International Journal of Wildland Fire* 16 (2), pp. 232-241
108. Perica, S., Brkljača, M., Goreta, S., Romić, D., Romić, M. (2004). Vegetative growth and salt accumulation of six olive cultivars under salt stress. *Acta Horticulturae*, 664, 555– 560
109. Perica, S., Goreta S., Vuletin Selak, G. (2008). Growth, biomass allocation and leaf ion concentration of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars under increased salinity. *Scientia Horticulturae*, 123-129
110. Poljak, I., Idžojić, M., Šatović, Z., Ježić, M., Čurković-Perica, M., Simovski, B., Acevski, J., Liber, Z (2017). Genetic diversity of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Central

- Europe and the western part of the Balkan Peninsula and evidence of marron genotype introgression into wild populations. *Tree Genetics & Genomes* (2017) 13:18 doi:10.1007/s11295-017-1107-2
111. Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* Vol. 1, No. 7, pp. 215-222, ISSN 1360-1385
112. Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959
113. Rallo, L., Barranco, D., De la Rosa, R., Leon, L. (2018). New olive cultivars and selections in Spain: results after 25 years of breeding. *Acta Horticulturae*, 1199. ISHS 2018. Doi: 10.17660/ActaHortic.2018.1199.4
114. Rapoport, H.F., Fabbri, A., Sebastiani, L. (2016). Olive biology. Springer International Publishing AG 2016. The olive tree genome, *Compendium of plant genomes*. Doi: 10.1007/978-3-319-48887-5_2
115. Raymond, M., Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248–249
116. Rebourg, C., Gouesnard, B., Charcosset, A. (2001). Large scale molecular analysis of traditional European maize populations – relationships with morphological variation. *Heredity* 86:574–587
117. Rešetnik I, Baričević D, Bašić Rusu D, Carović-Stanko K, Chatzopoulou P, Dajić-Stevanović Z, Goncariuc, M., Grdiša, M., Greguraš, D., Ibraliu, A., Jug-Dujaković, M., Krasniqi, E., Liber, Z., Murtić, S., Pećanac, D., Radosavljević, I., Stefkov, G., Stešević, D., Šoštarić, I., Šatović, Z. (2016). Genetic Diversity and Demographic History of Wild and Cultivated/Naturalised Plant Populations: Evidence from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L., Lamiaceae). *PLoS ONE* 11(7): e0159545. doi:10.1371/journal.pone.0159545

118. Rhoades, J.D., Kandiah, A., Mashali, A.M., (1992). The use of saline waters for crop production. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 48. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
119. Rossi, L., Minnocci, A., Francini, A., Sebastiani, L. (2014). The different adaptations to salt-stress of two Italian live cultivars, salt-sensitive (Leccino) and salt-tolerant (Frantoio). Conference paper
120. Schillinger, W.F., Schofstoll, S.E., Alldredge, J.R. (2008). Available water and wheat grain yield relations in a Mediterranean climate, *Field Crops Research* 109 (1-3), pp. 45-49
121. Schneider, S.H. (2011). *Encyclopedia of climate and weather*. Second edition, volume 1. Oxford University Press, Inc. ISBN 978-0-19-976532-4
122. Sheveleva, E., Chmara, W., Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1997). Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol* 115:1211–1219
123. Singh, M., Singh, V.P., Kumar, J., Prasad, M.S. (2015). Roles of osmoprotectans in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. Article in *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, DOI 10.1007/s11157-015-9372-8
124. Smith, D.N., Devey, M.E. (1994). Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37: 977–983
125. Smith, J.S.C. (1987). Gene Markers and Their Uses in the Conservation, Evaluation and Utilization of Genetic Resources of Maize (*Zea mays* L.). International Training Session on Scientific Management of Gene Banks, Raleigh, N.C.
126. Stocker, T.F., Qin, D.; Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (2013). *Climate Change: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change 2013*; Cambridge University Press: New York, Y, USA

127. Strikić, F., Čmelik, Z., Šatović Z., Perica, S. (2007). Morfološka raznolikost masline (*Olea europaea* L.) sorte Oblica. *Pomologia Croatica* 13(2): 77-86
128. Tanksley, S.D. (1983): Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1:3–8
129. Tattini M., Traversi M.L. (2009). On the mechanism of salt tolerance in olive (*Olea europaea* L.) under low or high Ca²⁺ supply. Article, *Environmental and Experimental Botany*
130. Tattini, M., Traversi, M.L., Biricolti, S., Guidi L. (2009). Contrasting response mechanisms to root-zone salinity in three co-occurring Mediterranean woody evergreens: A physiological and biochemical study. Article in *Functional Plant Biology*; 36, 551-563
131. Tattini, M., Lombardini, L., Gucci, R. (1997). The effect of NaCl stress and relief on gas exchange properties of two olive cultivars differing in tolerance to salinity. *Plant Soil*, 197, 87–93
132. Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A., Everard, J.D. (1996). Changes in nonstructural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiol. Plant.* 98, 117–124
133. Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M.A., Ponzio, C., Everard, J.D. (1995). Growth, gas exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity and subsequent relief. *Physiol. Plantarum* 95, 203–210
134. Tester, M., Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503–527
135. Testi, L., Orgaz, F., Villalobos, F.J. (2006). Variations in bulk canopy conductance of an irrigated olive (*Olea europaea* L.) orchard. *Environ. Exp. Bot.* 55, 15–28

136. Tuna, A.L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 59, 173–178
137. Vosman, B., P. Arens, W. Rus-Kortekaas, M.J.M. Smulders (1992): Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 85: 239-244
138. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer (1995): *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi* (ed. Arbor, A.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1–3
139. Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., Flowers, T.J. (1991). Short and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 42, 881– 889
140. Zohary, D., Hopf, M. (1994). *Domestication of plants in the Old World*. 2nd ed. Oxford. UK. Clarendon Press
141. Zec J. (1951). Sortiment masline u Dalmaciji. *Biljna proizvodnja*, 1:3-20
142. Zeng, Y., Zhang, H., Li, Z., Shen, S., Sun, J., Wang, J., Liao, D., Liu, X., Wang, X., Xiao, F., Wen, G. (2007). Evaluation of Genetic Diversity of Rice Landraces (*Oryza sativa* L.) in Yunnan, China. *Breeding Science* 57: 91–99
143. Zhu Z., Wei G., Li J., Qian Q., Yu J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stresses cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science*, pages 527-533
144. Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66–71

Internet navodi:

- <http://www.agromillora.com>
- <http://www.fao.org>

9. SAŽETAK

Genetska raznolikost divljih maslina nadmašuje onu pronađenu kod kultiviranih, a bogatstvo germplazme kultiviranih maslina smatra se jedinstvenim slučajem u hortikulturnoj praksi. Pretpostavlja se da je razlog tome selekcija masline koje je neovisno započeta u svakom naseljenom području što je rezultiralo velikim brojem kultivara, a moderni oplemenjivački programi osim kultivirane masline za istraživanje i oplemenjivanje koriste i divlje masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Dugotrajne suše i smanjene količine padalina postaje sve veći problem za prirodne ekosustave i usjeve zbog degradacije zemljišta i procesa dezertifikacije Mediterana kojem je dodijeljena titula „žarišta klimatskih promjena“. Maslina se smatra srednje otpornom biljnom vrstom na sušu i na povišeni salinitet u tlu koje koje prinos najviše ovisi o jesenskim/proljetnim padalinama čija je značajna uloga u ispiranju akumulirane soli u dublje slojeve tla, što biljci omogućuje novi sezonski porast. Abiotski stresovi povišenog saliniteta i dugotrajne suše sve više postaju problemi u modernim nasadima, gustog sklopa, gdje je evapotranspiracijska potražnja visoka i gdje se manje kvalitetna voda (bočata ili slana) upotrebljava za navodnjavanje kao i korištenje vodotopivih hraniva.

Genotipovi kultiviranih maslina (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) prikupljeni su u poljskoj kolekciji Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša na lokacijama Split i Kaštel Stari. Temeljem morfološkog vrednovanja veličine lista i ploda, udaljenosti pronađenih jedinki maslina od starih ili zapuštenih maslinika kultiviranih maslina, izdvojeni su pretpostavljeno divlji genotipovi za testiranje njihove otpornosti na sol i sušu. Za provedbu pokusa odabrano je 11 divljih genotipova i 15 kultivara maslina s područja Mediterana. Eksperiment je postavljen u eksperimentalnom stakleniku IJK u Splitu po principu slučajnog bloknoeg rasporeda u tri ponavljanja s dva nivoa abiotskog stresa i kontrolnim tretmanom. Za izazivanje abiotskog stresa povišenog saliniteta primijenjena je krupna morska sol bez dodanog joda kako bi se postigao tretman 150 mM/L NaCl-a, a tretman suše koncentracije od 300 mM/L iniciran je upotrebom šećernog alkohola manitola u prahu. Tretmani su primijenjeni 18. lipnja 2019. tijekom 21-og dana. Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj abiotskih stresova povišenog saliniteta i suše na divlje i kultivirane masline te povezati morfološke, fiziološke i biokemijske promjene uvjetovane stresom s potvrđenom genetskom specifičnošću kultiviranih i divljih maslina.

Istraživanje je uspješno analiziralo uzorke 26 različitih genotipova divljih i kultiviranih maslina i identificiralo alele 12 SSR-lokusa. Prosječan broj alela bio je 9,83 s tim da je kod DCA09 zabilježena najveća vrijednost informacijskog sadržaja polimorfizma te su analizirani mikrosateliti bili visoko diskriminirajući. Mikrosatelitna raznolikost skupina divljih i

kultiviranih maslina zabilježila je veće vrijednosti kultiviranih maslina za prosječan broj alela po lokusu kao i veći broj jedinstvenih alela. Veće alelno bogatstvo te vrijednosti zapažene i očekivane heterozigotnosti zabilježene su kod skupine divljih maslina. Analiza molekularne varijance zabilježila je najveću genetsku raznolikost unutar skupina divljih i kultiviranih maslina i manju između skupina. Izdvajanja dvije skupine isključivo kultiviranih maslina zabilježena je na nezakorijenjeno stablo po Fitchu i Margholiashu temeljenom na matrici genetske udaljenosti, a ostale dvije skupine sastojale su se od kultiviranih, divljih i „hibridnih“ genotipova. Bayesovska analiza populacijske strukture upućuje da su analizirani genetski skupovi prema udjelu genoma svake jedinice potekle iz tri izvorna genetska skupa masline; divljih maslina (A), hrvatskih kultivara (B) i inozemnih kultivara (C).

Morfometrijski parametri dužina i suha masa izboja te površina lista signifikantni su pokazatelji razine stresa suše kod analiziranih genotipova. S obzirom na visok sadržaj iona soli, Na^+ i Cl^- su u listovima izboja kultivara 'Oblica' vjerojatno uključeni u održavanje osmotskog tlaka u stanicama jer usprkos visokim vrijednostima tih iona ostali rezultati nisu upućivali na ozbiljnije znakove stresa. Osjetljivi i abiotskom stresu podložniji genotipovi imali su niže razine usvojenih iona Na^+ i Cl^- u listovima izboja. Relativan sadržaj K^+ u korijenu signifikantno se smanjio u gotovo svakom promatranom genotipu neovisno o primjenjenom tretmanu, što označava da su svi genotipovi bili u određenoj razini stresa. Povišene vrijednosti Ca^{2+} u tretmanu suše navode na zaključak da je usvajanje Ca^{2+} energetski najučinkovitiji odgovor masline na abiotske stresove u kratkom vremenskom razdoblju kako je navela i citirana literatura. Trend promjena u aktivnosti enzima SOD kao i u sadržaju klorofila *a*, sugerira da ti parametri mogu poslužiti kao indikatori abiotskog stresa povišenog saliniteta, a posebice stresa suše. Aminokiselina prolin može se promatrati u kontekstu signalne molekule koja u kratkom vremenu može upućivati smanjuje li se ili raste koncentracija ROS u biljci. Genotipovi iz grupe divljih maslina LA 13 i PLJ 18 te genotip iz grupe hibridnih maslina PLJ 7 svojim kontinuirano zadovoljavajućim rezultatima morfometrijskih mjerenja i biokemijskih analiza, zaslužuju daljnja istraživanja na bazi genotipske karakterizacije kao što je veličina, kvaliteta ploda te procjena radmana ulja jer već sada predstavljaju vrijedni materijal za buduće oplemenjivačke programe. Autohtoni kultivar 'Oblica' uspio se prilagoditi na sve uvjete abiotskih stresova povišenog saliniteta i suše, ne narušavajući dinamiku rasta usprkos povećanoj aktivnosti enzima antioksidacijskih sustava. Inozemni kultivar 'Koroneiki' nije imao signifikantno povećanu aktivnost antioksidativnih enzima kao ni akumulaciju osmolita što odgovara navodima literature da se radi o kultivaru koji je iznimno otporna na uvjete abiotskog stresa, na što može sugerirati i njegovo prirodno stanište. Možemo pretpostaviti da različiti genotipovi aktiviraju

različitu vrstu mehanizma obrane od akumulacije anorganskih iona do antioksidativnih enzima i sinteze osmolita, počevši od energetski najmanje zahtjevnih. Ranije uzorkovanje biljnog tkiva daje konkretnije rezultate biokemijskih parametara koju mogu preciznije odrediti razinu stresa od morfometrijskih mjerenja.

10. SUMMARY

The genetic diversity of wild olives exceeds that found in cultivated ones, and the richness of the germplasm of cultivated olives is considered a unique case in horticultural practice. It is assumed that the reason for this is the selection of olives that was started independently in each populated area, resulting in a large number of cultivars and modern breeding programs. In addition to cultivated olives, also use wild olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) for research. Prolonged droughts and reduced rainfall are becoming a growing problem for natural ecosystems and crops due to land degradation and the desertification process of the Mediterranean, which has been awarded the title of "hotspot of climate change". The olive is considered a medium-resistant plant species to drought and increased salinity in the soil and yield depends mostly on the autumn/spring rainfall, which plays a significant role in washing the accumulated salt into the deeper layers of the soil, which helps the plant to grow a new season. Abiotic stresses of increased salinity and long-term droughts are becoming troublesome problems in modern orchards with dense structures, where the evapotranspiration demand is high and low quality water (brackish or salty) is used for irrigation in combination with water-soluble fertilizers.

Genotypes of cultivated olives (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) were collected in the field collection of the Institute for Adriatic Cultures and Karst Reclamation in Split and Kaštel Stari. Supposedly wild genotypes were selected based on the morphological evaluation of the size of the leaf and fruit, the distance of the found olive individuals from the old or neglected olive groves of cultivated olives for testing their resistance to salt and drought. In total 11 wild genotypes and 15 olive cultivars from the Mediterranean region were selected for the experiment. The experiment was set up in the experimental greenhouse of the IJK in Split according to the principle of random block arrangement in three repetitions with two levels of abiotic stress and a control treatment. To induce abiotic stress of increased salinity, coarse sea salt without added iodine was applied to achieve a treatment of 150 mM/L NaCl, and a drought treatment with a concentration of 300 mM/L was initiated using powdered sugar alcohol mannitol. The treatments were applied on June 18, 2019, during the 21 day. The goal of the research is to determine the impact of abiotic stresses of increased salinity and drought on wild and cultivated olives and to link the morphological, physiological, biochemical changes caused by the stress with the confirmed genetic specificity of cultivated and wild olives.

The research successfully analyzed samples of 26 different genotypes of wild and cultivated olives and identified alleles of 12 SSR-loci. The average number of alleles was 9.83, with

DCA09 having the highest value of polymorphism information content, and the microsatellites analyzed were highly discriminating. Microsatellite diversity of wild and cultivated olive groups recorded higher values of cultivated olives for the average number of alleles per locus as well as a higher number of unique alleles. Higher allelic richness and values of observed and expected heterozygosity were recorded in the group of wild olives. Analysis of molecular variance recorded the highest genetic diversity within wild and cultivated olive groups and less between groups. The separation of two groups of exclusively cultivated olives was recorded on an unrooted tree according to Fitch and Margoliash based on the genetic distance matrix, and the other two groups consisted of cultivated, wild and "hybrid" genotypes. Bayesian analysis of the population structure indicates that the analyzed genetic sets according to the share of the genome of each individual originated from three original olive genetic sets; wild olives (A), Croatian cultivars (B) and foreign cultivars (C).

The morphometric parameters of shoot length and dry mass and leaf area are significant indicators of the level of drought stress in the analyzed genotypes. Considering the high content of salt ions, Na^+ and Cl^- in the shoot leaves of cultivar 'Oblica' are probably involved in maintaining the osmotic pressure in the cells because, despite the high values of these ions, the other results did not indicate more serious signs of stress. Genotypes that are sensitive and more susceptible to abiotic stress had lower levels of absorbed Na^+ and Cl^- ions in shoot leaves. The relative content of K^+ in the roots decreased significantly in almost every genotype observed, regardless of the applied treatment, which indicates that all genotypes were in a certain level of stress. The increased values of Ca^{2+} in the drought treatment lead to the conclusion that Ca^{2+} absorption is the most energetically efficient olive response to abiotic stress in a short period of time as indicated by the cited literature. The trend of changes in SOD enzyme activity as well as in the content of chlorophyll a suggests that these parameters can serve as indicators of abiotic stress of elevated salinity, especially drought stress. The amino acid proline can be viewed in the context of a signal molecule that can indicate in a short time whether the concentration of ROS in the plant decreases or increases. Genotypes from the group of wild olives LA 13 and PLJ 18 and the genotype from the group of hybrid olives PLJ 7, with their continuously satisfactory results of morphometric measurements and biochemical analyses, deserve further research based on genotypic characterization such as size, fruit quality and assessment of radman oil because they already represent valuable material for future breeding programs. The autochthonous cultivar 'Oblica' managed to adapt to all conditions of abiotic stresses of increased salinity and drought, without disrupting growth dynamics despite the increased activity of antioxidant systems enzymes. The foreign cultivar 'Koroneiki' did not have

a significantly increased activity of antioxidant enzymes or osmolyte accumulation, which corresponds to the literature's claims that it is a cultivar that is extremely resistant to abiotic stress conditions, as its natural habitat may suggest. We can assume that different genotypes activate a different type of defense mechanism from the accumulation of inorganic ions to antioxidant enzymes and osmolyte synthesis, starting with the least energetically demanding. Earlier sampling of plant tissue gives more specific results of biochemical parameters that can determine the level of stress more precisely than morphometric measurements.

11. ŽIVOTOPIS

Josip Tadić rođen je 11. travnja 1988. godine u Splitu. Nakon završene Opće gimnazije „Vladimir Nazor“ u Splitu, upisuje sveučilišni prediplomski studij Mediteranska poljoprivreda u Splitu u sklopu Sveučilišta u Zagrebu i Sveučilišta u Splitu. Godine 2013. je isti studij završio s temom završnog rada „Utjecaj cijepljenja plodovitog povrća na generativna i vegetativna svojstva“ stekavši akademski naziv sveučilišnog prvostupnika (baccalaurea) mediteranske poljoprivrede te iste godine na Agronomskom fakultetu u Zagrebu upisuje diplomski studij „Ekološke poljoprivrede i agroturizma“. Diplomirao je na temu „Utjecaj gnojidbe na dinamiku rasta i prinos populacija luka“ 2015. godine te stekao naziv magistra ekološke poljoprivrede i turizma s velikom pohvalom (magna cum laude). Tijekom studiranja odradio je praksu u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, a na temelju akademskih uspjeha osvojio je Rektorovu nagradu 2013. godine, te je bio stipendista Sveučilišta u Zagrebu 2014. i 2015. godine u kategoriji izvrsnosti. Nakon završenog fakultetskog obrazovanja dobio sam priliku završiti stručno osposobljavanje u tvrtki specijaliziranoj za proizvodnju sjemena povrća „Bejo Zaden“. U rujnu 2016. zapošljava se na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu na zavodu za Biljne znanosti kao doktorand. Iste godine upisujem poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti, modul znanost o materijalima i nove tehnologije.

12. PUBLIKACIJE I SIMPOZIJI

Tadić J, Dumičić G, Veršić Bratinčević M, Vitko S and Radić Brkanac S. (2021). Physiological and Biochemical Response of Wild Olive (*Olea europaea* Subsp. *europaea* var. *sylvestris*) to Salinity. *Frontiers in Plant Science* (2021), 12:712005. DOI: [10.3389/fpls.2021.712005](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.712005)

J. Tadić, I. Žutić, B. Urlić, M. Jukić Špika, G. Dumičić. Effect of fertilization on onion growth, yield and storage. *Acta Horticulturae* (2021) 1320. DOI: [10.17660/ActaHortic.2021.1320.32](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1320.32)

F. Strikić, M. Šuste, J. Gugić, T. Svalina, **J. Tadić**, Z. Storić. Olive growing in the hinterland of Vodice. *Pomologia Croatica*, (2019). Vol. 23-2019., br 1-2. DOI: [10.33128/pc.23.1-2.5](https://doi.org/10.33128/pc.23.1-2.5)

Tadić, J., Žutić, I., Urlić, B., Jukić Špika, M., Dumičić, G. (2021). Effect of fertilization on onion growth, yield and storage. 24.-26. September 2021. VIII South-Eastern Europe Symposium on Vegetables and Potatoes, Ohrid, North Macedonia.

Tadić, J., Dumičić, G., Klepo, T., Radić Brkanac, S. (2020). Morphological and physiological characteristics of old Kaštela olive plants under abiotic stress conditions. Zbornik sažetaka 55. hrvatskog i 15. međunarodnog simpozija agronoma, Osijek, Poljoprivredni fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 287-288.

Tadić, J., Dumičić, G., Klepo, T., Radić Brkanac, S. (2020). Morfološka i fiziološka svojstva sadnica Kaštelanske stare masline u uvjetima abiotičkog stresa. Noćnjak 2020. Zadar, 25.-27. lipnja 2020, usmeno izlaganje.

Dumičić, G., **Tadić, J.**, Carić, M., Žnidarčić, D., Slatnar, A., Urlić, B., Žanić, K. (2019). Utjecaj koncentracije i sastava hranjive otopine na vegetativna svojstva presadnica cijepljene rajčice. Zbornik sažetaka 54. hrvatskog i 14. međunarodnog simpozija agronoma, Osijek, Poljoprivredni fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 105-106.

Tadić, J., Strikić, F. (2018). Digitalni pristup kvantitativnim analizama lista voćnih vrsta. Zbornik sažetaka 53. hrvatskog i 13. međunarodnog simpozija agronoma, Osijek, Poljoprivredni fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 280-281.

Glavinović, V., **Tadić, J.**, Radunić, M., Klepo, T. (2018). Preliminary Morphological Description of Cultivated and Wild Olives in Croatia. Conference: 4th Congress of Croatian geneticists with international participation, str. 46.

Glavinović, V., **Tadić, J.** (2018). Folijarna gnojdba masline – dosadašnja saznanja i iskustva. Noćnjak 2018. Vodice; 15. -17. ožujka, sudjelovanje s prezentacijom.

Strikić, F., Šuste, M., Gugić, J., Svalina, T., **Tadić, J.**, Storić, Z. (2017). Uzgoj maslina u zaleđu Vodica. 10. međunarodni kongres oplemenjivanja bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo i 5. regionalni dan sjemenara. Str. 86.-87.

Tadić, J., Klepo, T. (2017). Sorte maslina za superintezivan uzgoj. Noćnjak 2017. Jelsa, Hvar; 23.-26. ožujka, usmeno izlaganje.

RADIONICE I LJETNE ŠKOLE

Radionica - Histološke tehnike u biljnoj biologiji, Laboratorija za molekularnu dijagnostiku Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša, Split. 22. veljače 2017. <http://tomgraf.krs.hr/diseminacija-i-publikacije-dissemination-and-publications/> (Prilog)

Ljetna škola „Split Summer School 2. - 8. September 2018. - „Application of Imaging Techniques in Life Sciences“

Radionica „Genotipizacija visoke propusnosti“, „Workshop on „High-throughput genotyping“ organized by Centre of excellence for biodiversity and molecular plant breeding in Krk, Croatia, 24.-26.09.2018.“

Radionica „Fenotipizacija visoke propusnosti“, „Workshop High-throughput Plant Phenotyping“ organized by Centre of excellence for biodiversity and molecular plant breeding in Zagreb, Croatia, 28.-29.10.2021.

Radionica „Workshop on Olive growing and climate change“ organized by the International Centre for Advanced mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), through the

Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza (CIHEAM Zaragoza), and the International Olive Council (IOC), 27. September to 1. October 2021.

Radionica „Workshop on Conservation and Sustainable Use of Plant Genetic Resources“ organized by Centre of excellence for biodiversity and molecular plant breeding in Zagreb, Croatia and the Croatian Agency for Agriculture and Food (HAPIH). 6-7 December 2021 at the University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Zagreb, Croatia.

Ljetna škola „Molecular Diversity and Plant Breeding“ organized by Centre of excellence for biodiversity and molecular plant breeding in Zagreb, Croatia from May 11. – 13.

13. PRILOZI