

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
ŠUMARSKI FAKULTET

Nina Herceg i Sanja Telalović

**FIZIOLOŠKE ZNAČAJKE POLENA
HRASTA LUŽNJAKA (*Quercus robur* L.)
PORIJEKLOM IZ KLONSKIH
SJEMENSKIH PLANTAŽA**

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen je na Šumarskom fakultetu, Zavodu za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku pod vodstvom doc.dr.sc. Željka Škvorca i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010/2011.

SADRŽAJ RADA

Uvod	1
Hipoteza i ciljevi rada	2
Materijali i metode	3
Rezultati	6
Rasprava	11
Zaključci	13
Zahvale	14
Popis literature	15
Sažetak	19
Summary	20

UVOD

U posljednjih nekoliko desetljeća u domaćoj literaturi sve je više podataka vezanih uz poteškoće prilikom prirodne obnove gospodarskih sastojina hrasta lužnjaka. Jedan od glavnih razloga zbog kojega dolazi do otežane prirodne obnove je izostanak uroda žira (Matić i dr. 1996). Prema Cecich i Haenchen (1995) izostanak uroda u prirodnim sastojinama kod nekih vrsta iz roda *Quercus* povezan je s neuspjehom oplodnje. Kod nekih drvenastih vrsta oplodnja je često puta negativno utjecana polenom loših fizioloških značajki kao što su loša klijavost polena i spori rast polenovih mješnica (Hedhly i dr. 2004).

Uspješnu oplodnju prije svega uvjetuje produkcija polena dobre kvalitete pod kojom podrazumijevamo polen koji se odlikuje visokim postotkom klijavosti i brzim rastom polenovih mješnica što u konačnici značajno utječe na uspjeh reproduktivnog razvoja šumskoga drveća (Cecich i Haenchen, 1995; Boavida i dr. 1999). Kvalitetan polen u konačnici uvelike utječe na kakvoću i količinu produciranoga sjemena, regeneraciju šumskih sastojina i opstanak pojedinih populacija šumskoga drveća (Dow i Ashley, 1998; Knapp i dr. 2001; Schueler 2005; Varela i dr. 2008).

Hrast lužnjak pripada u porodicu *Fagaceae*, široko je rasprostranjen diljem cijele Europe, anemofilna je i monoecična vrsta s prostorno odvojenim muškim i ženskim cvjetovima koji se pojavljuju u proljeće tijekom travnja i svibnja. Zametanje muških resa odvija se u lipnju prethodne godine. Njihova diferencijacija traje sve do kolovoza, a mejoza nastupa sljedećeg proljeća stvarajući binuklearna polenova zrnca neposredno prije pojavljivanja resa (Ducouso i dr. 1993; Tucović i Jovanović, 1970). Muški cvjetovi razvijaju se na 2 - 5 cm dugim resama koje se nalaze pri dnu proljetnih izbojaka, dok se ženski cvjetovi nalaze u skupinama od 2 – 5 cvjetova na jednoj visećoj resi koja se nalazi na vrhu proljetnoga izbojaka (Ducouso i dr. 1993).

S obzirom na relativno široko područje rasprostiranja, važan ekološki značaj te visoku gospodarsku i ekonomsku vrijednost, hrast lužnjak je prilično dobro istražena vrsta šumskoga drveća. Mnogo je literaturnih podataka vezanih uz njegove fiziološke i morfološke značajke te genetsku raznolikost (Jovanović i Tucović, 1975; Stojković, 1991; Beerling i Chalover, 1993; Sha Valli Khan i dr. 1998; Rust i Roloff, 2002; Ponton i dr. 2004; Schueler, 2005; Prewin i dr. 2006; Kühne i Bartschl, 2007). Unatoč tome, bilo kakve podatke vezane uz klijavost polena i rast polenovih mješnica u literaturi je vrlo teško pronaći. Primjerice, vezano uz klijanje polena hrasta lužnjaka u literaturi postoji samo podatak da njegov polen za početak klijanja zahtjeva temperaturu zraka od 20 °C (Cecich 1997, prema Jicinska i Koncalava 1978).

HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Iako su šume hrasta lužnjaka u Hrvatskoj vrlo kvalitetne, gospodarenje s njima nastoji se poboljšati. Međutim, u posljednjih nekoliko desetljeća problemi prilikom obnove prirodnih sastojina sve su učestaliji iz razloga jer urod žira nije više regularan. Drugim riječima, urod više nije periodičan kao što je bio nekada kada se obično svake pete ili šeste godine pojavio jedan obilan urod, a između toga jedan ili dva manja uroda. Na obilan urod sada se čeka 10 i više godina. S ciljem da se taj problem izbjegne ili umanja prije 20-ak godina pristupilo se proizvodnji žira u klonskim sjemenskim plantažama hrasta lužnjaka. Trenutno u Hrvatskoj postoje tri klonske sjemenske plantaže (KSP) hrasta lužnjaka, na području Uprava šuma Podružnica (UŠP) Vinkovci, Našice i Bjelovar. U KSP za razliku od prirodnih sastojina moguće je kontrolirati proizvodnju žira s obzirom na genetsku kvalitetu i količinu uroda. Kontrolirana proizvodnja genetski kvalitetnoga sjemena u KSP između ostaloga podrazumijeva međusobno oprašivanje dovoljnoga broja roditeljskih stabala (20 do 60) koje se može odvijati prirodnim putem ili kontroliranim oprašivanjem. Kako bi se što bolje i što sigurnije mogla planirati masovna proizvodnja genetski kvalitetnoga žira neophodno je što bolje poznavati fiziološke značajke polena onih klonova od kojih su osnovane KSP.

S obzirom kako kvalitetan polen pozitivno utječe na oprašivanje bilo da je ono kontrolirano ili da se odvija prirodnim putem, a samim time i na oplodnju te količinu i genetsku kvalitetu proizvedenoga žira ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Utvrditi postotak klijavosti polena i dužine polenovih mješnica hrasta lužnjaka porijeklom iz postojećih KSP u *in vitro* uvjetima.
2. Izdvojiti klonove s najboljim fiziološkim značajkama polena kao potencijalno najbolje oprašivače.

MATERIJALI I METODE

Područje istraživanja i klimatske prilike

Istraživanje je provedeno na pokusnoj plohi površine 0,48 ha, koja je osnovana s vegetativno razmnoženim jedinkama hrasta lužnjaka u proljeće 2008. godine u blizini grada Zagreba, (45° 50' 20,25" N, 16° 06' 14,10" E, 128 m.n.v.). Prema Köpenovoj klimatskoj klasifikaciji područje na kojem se nalazi pokusna ploha pripada u klasu Cfbwx“ klime. To je umjereno topla kišna klima bez sušnoga razdoblja s ravnomjerno raspoređenim oborinama tijekom cijele godine. Srednja temperatura najhladnijega mjeseca (siječanj) ne spušta se ispod -0,4 °C, dok srednja temperatura najtoplijega mjeseca (srpanj) obično ne prelazi 21,4°C. Ukupna godišnja količina oborina iznosi 900 mm (489 mm otpada na vegetacijsko razdoblje), a srednja godišnja relativna vlažnost zraka iznosi između 77 i 92 % (Seletković 1996).

Porijeklo biljnoga materijala

U prirodnim sastojinama hrasta lužnjaka starosti preko 80 godina na području Uprava šuma podružnica Vinkovci, Našice i Bjelovar obavljena je fenotipska selekcija plus stabala, koja su kasnije vegetativno razmnožena. Vegetativno razmnožavanje plus stabala obavljeno je cijepljenjem. Na taj način je spriječena rejuvenizacija novonastalih vegetativnih kopija (klonova) te je zadržana njihova sposobnost cvjetanja. Ukupno je selekcionirano i vegetativno razmnoženo 150 plus stabala od čijih su rameta (vegetativnih kopija) osnovane tri proizvodne klonske sjemenske plantaže na području navedenih UŠP ukupne površine od 66 ha (Kajba i dr. 2007). Plemke sakupljene s klonova iz postojećih KSP precijepljene su na prethodno pripremljene podloge 2006. godine s kojima je u proljeće 2008. godine osnovana pokusna ploha na kojoj je tijekom proljeća 2010. godine provedeno ovo istraživanje.

U godini istraživanja pojava muških cvjetova zabilježena je na 71 klonu (Franjić i dr. 2011). Međutim, istraživanje je provedeno na 55 klonova iz razloga jer su neki klonovi imali mali broj muških cvjetova te nisu bili uključeni u istraživanje. Prosječna visina istraživanih klonova iznosila je $1,96 \pm 0,44$ metara. Po jednom istraživanom klonu u prosjeku su utvrđene 53 muške rese.

Sakupljanje polena i priprema medija za naklijavanje

Sa svakog od 55 klonova sakupljeno je po 15 muških resa pred sami početak otvaranja prašnika i trušnja polena. Sakupljanje muških resa obavljano je od 20. 4. do 11. 5.

zbog neujednačenog početka trušenja polena, što je uvjetovano razdobljem cvjetanja na razini svakog klona (rani, kasni ili intermedijarni klon). Muške rese sakupljane su između 12:00 i 13:00 sati te su odmah smještene u plastične vrećice i transportirane u laboratorij. Prema Fonseca i Westgate (2005) visoki postotak vijabilnoga polena utvrđen je prilikom trušenja polena iz prašnika pri relativno niskim temperaturama zraka i visokoj relativnoj vlažnosti zraka. Iz tog razloga, rese nakon što su dopremljene u laboratorij položene su na bijeli papir te su izložene temperaturi zraka od 15 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 70 % tijekom sljedećih 48 sati. Polen koji se nakon 48 sati istrusio ravnomjerno je raspoređen u petrijeve zdjelice sa prethodno pripremljenim medijem za naklijavanje polena. Tucović i dr. (2002) navode kako je svježiji polen hrasta lužnjaka najbolje naklijavati u *in vitro* uvjetima na mediju u kojemu koncentracija saharoze iznosi 15 %. Iz tog se razloga, medij za naklijavanje polena korišten u ovom istraživanju sastojao od 15 % saharoze i 0,8 % agara. Prije nanošenja polena medij je bio temperaturno ujednačen. U prijašnjim istraživanjima razlike između klijavosti polena direktno na njušci tučka (*in vivo*) i na hranjivoj podlozi (*in vitro*) nisu utvrđene (Schoper i dr. 1986 i 1987; Paraddey i dr. 1989; Báez i dr. 2002) iz tog razloga ispitivanje klijavosti polena i rasta polenovih mješnica u ovom istraživanju prvedeno je *in vitro*.

Temperatura i relativna vlažnost zraka prilikom naklijavanja polena u klima komori

Vezano za klijanje polena hrasta lužnjaka u literaturi postoji samo podatak da njegov polen za početak klijanja zahtjeva temperaturu zraka od 20 °C (Jicinska i Koncalava, 1978), što ne znači da je to i optimalna temperatura zraka za njegovo klijanje *in vitro*. Iz tog razloga naklijavanje polena *in vitro* tijekom ovoga istraživanja obavljeno je pri temperaturi zraka od 25 °C. Prema istraživanjima koja su proveli Mulugeta i dr. (1994), Loupassaki i Vasilakakis (1995) te Fonseca i Westgate (2005) vrlo dobra klijavost polena *in vitro* kako drvenastih tako i zeljastih vrsta zabilježena je pri visokoj relativnoj vlažnosti zraka. S ciljem da se polenu osiguraju najoptimalniji uvjeti klijanja, polen svakoga od 55 istraživanih klonova raspoređen je u četiri petrijeve zdjelice koje su izlagane temperaturi zraka od 25 °C i relativnoj vlažnosti zraka od 80 %. Naklijavanje polena odvijalo se u tami tijekom vremenskoga razdoblja od 2, 4, 6 i 24 sata. Nakon što je predviđeno vrijeme naklijavanja (vremenski tretman) proteklo, daljnje klijanje zaustavljeno je premazivanjem unutrašnje strane poklopca petrijeve zdjelice s formalinom. Rast polenovih mješnica kod binuklearnih polenovih zrnaca sastoji se od autotrofne i heterotrofne faze koje se nakon nekoliko sati od početka klijanja izmjenjuju i pri tome znatno utječu na brzinu rasta polenovih mješnica (Tagliasacchi i dr. 1985). S obzirom kako se trenutak izmjene autotrofne i heterotrofne faze razlikuje od vrste do vrste, a za hrast

lužnjak taj podatak nije poznat mi smo naklijavanje polena proveli pri nekoliko vremenskih razdoblja (2, 4, 6 i 24 h).

Utvrđivanje postotka klijavosti polena i dužina polenovih mješnica

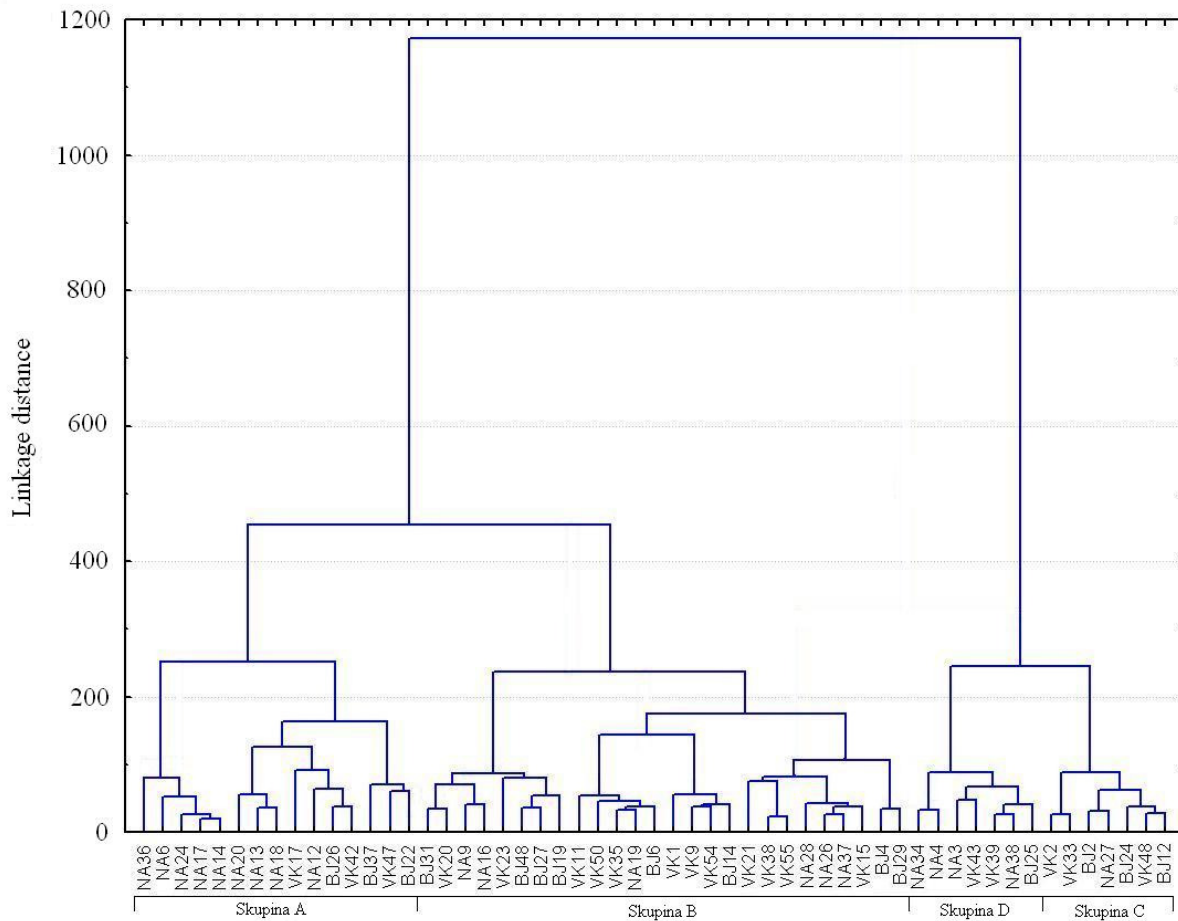
Fotografiranje polena u petrijevim zdjelicama obavljeno je pomoću lupe (Olympus SZX12) opremljene s digitalnom kamerom (ColorViewII) pri povećanju od 82x. Unutar svake petrijeve zdjelice na slučajno odabranim mjestima snimljene su 4 fotografije na kojima je kasnije pomoću softwaerskoga paketa analySIS obavljeno prebrojavanje prokljalih i neprokljalih polenovih zrnaca te izmjera dužina polenovih mješnica. Na svakoj fotografiji snimljeno je od 50 do 100 polenovih zrnaca. Polenovo zrnce smatrano je prokljalim kada je dužina polenove mješnice premašila 15 μm . Postotak klijavosti određen je dijeljenjem broja prokljalih polenovih zrnaca s ukupnim brojem zrnaca što je naposljetku izraženo u postotcima. Dužina polenove mješnice izračunata je kao prosječna dužina polenovih mješnica svih zrnaca koja su smatrana prokljalima. Energija klijanja polena istraživanih klonova definirana je kao sukcesivno povećanje dužina polenovih mješnica u funkciji vremena (2, 4, 6 i 24 h) pri konstantnim uvjetima temperature i vlažnosti zraka.

Statistička obrada podataka

Kako bi se utvrdio stupanj sličnosti istraživanih klonova s obzirom na postotak klijavosti i dužine polenovih mješnica provedena je klasteraska analiza. U tu svrhu primijenjena je hijerarhijska metoda udruživanja objekata Wardsovim algoritmom izrade dendrograma, a kao mjera udaljenosti upotrebljavana je Euklidova udaljenost. Na taj su način istraživani klonovi razvrstani u četiri skupine (A, B, C, D). Nakon toga, analizom varijance s ponovljenim mjerenjima ispitivane su razlike između skupina. U tom slučaju zavisne varijable bile su postotak klijavosti i dužine polenovih mješnica dok su faktor bile skupine (A, B, C, D) i vrijeme (2, 4, 6 i 24 sata). Tukey-ev post-hoc test proveden je s ciljem utvrđivanja signifikantnih razlika između skupina. Statističke analize provedene su pomoću programskoga paketa Statistica 7.1. (StatSoft, Inc. 2006).

REZULTATI

S obzirom na utvrđen postotak klijavosti i dužine polenovih mješnica klonovi su klusterskom analizom razvrstani u četiri skupine (A, B, C i D). U skupinu A pripada 15 klonova, u skupinu B 26 klonova, dok skupinama C i D pripada svakoj po sedam klonova (Slika 1).



Slika 1. Dendrogram dobiven klusterskom analizom na temelju postotka klijavosti polena i dužina polenovih mješnica koji istraživane klonove dijeli u skupine A, B, C i D. (NA-Našice, VK-Vinkovci, BJ-Bjelovar)

Analizom varijance s ponovljenim mjerenjima utvrđene su statistički značajne razlike između skupina s obzirom na postotak klijavosti (Tablica 1) i dužine polenovih mješnica (Tablica 2).

Tablica 1. Rezultati analize varijance s ponovljenim mjerenjima koji ukazuju na razlike između istraživanih skupina s obzirom na postotak klijanja

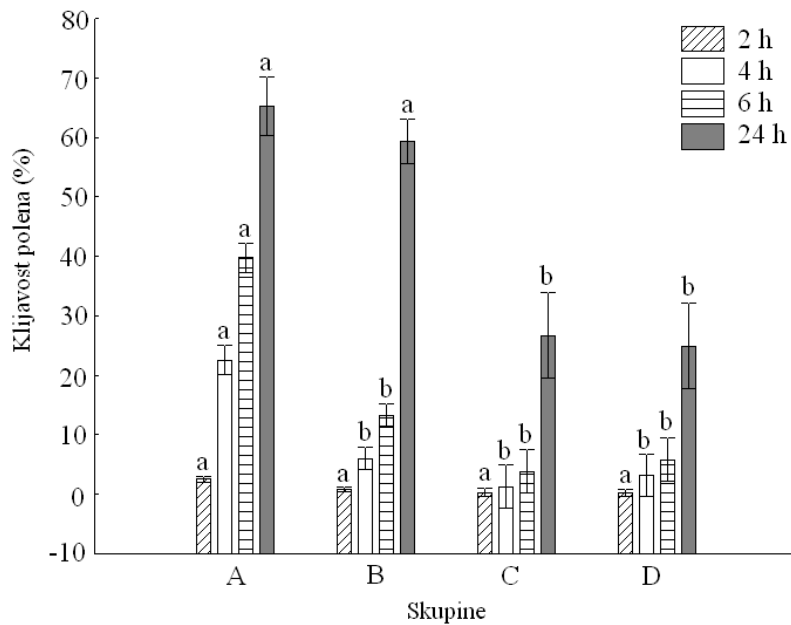
	SS	df	MS	F	p
SKUPINE	27428,5	3	9142,83	28,2158	0,00000
ERROR	16525,63	51	324,03		
VRIJEME	47484,62	4	11871,15	101,2156	0,00000
VRIJEME * SKUPINE	11958,21	12	996,52	8,4965	0,00000
ERROR	23926,32	204	117,29		

Tablica 2. Rezultati analize varijance s ponovljenim mjerenjima koji ukazuju na razlike između istraživanih skupina s obzirom na dužine polenovih mješnica

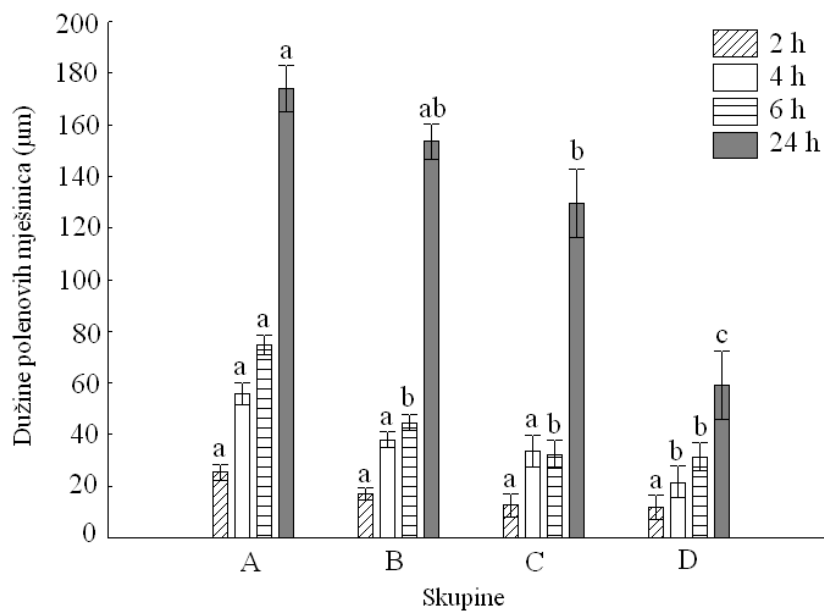
	SS	df	MS	F	p
SKUPINE	73379,1	3	24459,7	47,946	0,00000
ERROR	26017,7	51	510,2		
VRIJEME	300688,4	4	75172,1	179,044	0,00000
VRIJEME * SKUPINE	38102,2	12	3175,2	7,563	0,00000
ERROR	85650,1	204	419,9		

S obzirom na klijavost polena pri vremenskom tretmanu od 2 sata skupine se međusobno ne razlikuju ($p > 0,991$). Pri vremenskim tretmanima od 4, 6 i 24 sata, skupina A po klijavosti polena jasno se razlikuje ($p < 0,001$) od skupina C i D. Skupina B s obzirom na vremenski tretman od 24 sata ne razlikuje se značajno od skupine A ($p = 0,978$), dok se s obzirom na tretmane od 2, 4 i 6 sati statistički značajno ne razlikuje od skupina C i D ($p > 0,05$). Skupine C i D s obzirom na klijavost polena ne razlikuju se značajno niti pri jednom vremenskom tretmanu ($p > 0,05$), (Slika 2).

Uz prilično dobru klijavost polena klonovi koji pripadaju skupini A imaju i najduže polenove mješnice pri vremenskom tretmanu od 6 sati ($p < 0,001$). Dužine polenovih mješnica pri tretmanu od 24 sata statistički se značajno ne razlikuju između skupina A i B ($P = 0,200$), kao niti između skupina B i C ($p = 0,403$), dok su najkraće kod klonova iz skupine D ($p < 0,001$). Dužine polenovih mješnica pri vremenskom tretmanu od 2 sata statistički se značajno ne razlikuju između skupina ($p > 0,991$), (Slika 3).



Slika 2. Postotak klijavosti polena kod klonova razvrstanih u skupine s obzirom na vremenski tretman prilikom naklijavanja (Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju pri $p < 0,001$)



Slika 3. Dužine polenovih mješnica klonova razvrstanih u skupine s obzirom na vremenski tretman prilikom naklijavanja (Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju pri $p < 0,001$)

Pri svakom od vremenskih tretmana klonovi koji pripadaju skupini A odlikuju se najboljim postotkom klijavosti polena i najdužim polenovim mješanicama, dok se klonovi iz skupina C i D odlikuju najlošijim postotcima klijavosti i najkraćim polenovim mješanicama (Tablica 3). Klonovi koji pripadaju skupini B pri vremenskom tretmanu od 24 sata vrlo su slični klonovima iz skupine A, dok se isti klonovi pri vremenskim tretmanima od 2, 4 i 6 sati vrlo slični klonovima iz C i D skupine (Slika 2 i 3).

Tablica 3. *Prosječne vrijednosti klijavosti polena i dužina polenovih mješnica kod klonova razvrstanih u skupine (A, B, C i D) s obzirom na vremenski tretman prilikom naklijavanja (\pm S.D.)*

VRIJEME KLIJANJA	KLIJAVOST POLENA (%)				DUŽINA POLENOVIH MJEŠNICA (μ m)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
2 sata	2,5 \pm 2,6	0,9 \pm 1,4	0,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,3	29,3 \pm 6,0	23,3 \pm 5,6	17,7 \pm 3,3	27,7 \pm 15,1
4 sata	22,6 \pm 17,2	6,0 \pm 4,2	1,3 \pm 1,2	3,2 \pm 2,3	55,9 \pm 15,6	38,1 \pm 13,0	47,1 \pm 22,3	25,2 \pm 5,2
6 sata	39,8 \pm 14,9	13,3 \pm 7,8	3,8 \pm 2,2	5,8 \pm 2,5	74,8 \pm 13,0	44,7 \pm 14,6	37,8 \pm 15,2	31,4 \pm 13,3
24 sata	65,2 \pm 19,9	59,3 \pm 18,4	26,7 \pm 24,1	25,0 \pm 13,7	174,1 \pm 28,3	153,6 \pm 43,3	129,7 \pm 22,8	59,2 \pm 17,3

Skupine A i B koje čine klonovi s najboljim fiziološkim značajkama polena što znači da se odlikuju najboljim postotkom klijavosti polena i najboljim rastom polenovih mješnica pri vremenskom tretmanu od 24 sata čine po 15 klonova porijeklom iz KSP Vinkovci i Našice te 11 klonova porijeklom iz KSP Bjelovar (Tablica 4).

Tablica 4. Postotak klijavosti i dužine polenovih mješnica klonova iz skupina A i B kao potencijalno najboljih oprašivača prikazanih po KSP

KLON	SKUPINE	KLIJAVOST (%)				DUŽINE (µm)			
		2 sata	4 sata	6 sati	24 sata	2 sata	4 sata	6 sati	24 sata
BJ04	B	0,4	3,7	15,4	77,4	32,4	38,1	40,3	113,7
BJ06	B	0,7	1,4	29,8	59,6	24,5	48,2	42,4	159,7
BJ14	B	0,7	0,9	3,2	55	31,6	21,7	41,7	170,8
BJ19	B	0	2,6	12,1	78,2	0	46,5	69,1	233
BJ22	A	7,8	40,2	58,8	81,5	27,1	45,3	71,6	200,7
BJ26	A	2,7	13,9	26,8	89,1	28	57,1	70,2	190,4
BJ27	B	0,1	4,9	8,3	55,3	24,1	43,4	51,4	205,7
BJ29	B	0	3,8	25	48,7	0	36,6	66,7	107,9
BJ31	B	0,2	13,4	17,2	45,8	16,3	45,3	46,8	112,2
BJ37	A	0	32,4	37,6	76,7	0	80	93,2	204,5
BJ48	B	0	4,4	14,4	60,4	0	32	63,2	199,4
Prosjek		1,1	11	22,6	66,2	16,7	44,9	59,7	172,6
St. Dev		2,3	13,3	15,6	14,8	13,9	14,9	16,6	43,7
NA06	A	0,5	4,5	18,2	38,2	19,6	58,9	60,9	156,1
NA09	B	0,4	14,7	35	67	19,1	51,4	78,3	197
NA12	A	1,8	14,1	35	67,3	37,2	56,5	90,1	181,9
NA13	A	2,7	15,6	40	63,5	39,8	67	58,2	123,1
NA14	A	2,6	51,4	55,2	75	21,7	69,4	76,4	137,6
NA16	B	0	12,2	18,4	69	0	60,6	62,5	220
NA17	A	1,1	4,8	23,5	40,1	28,1	46,1	78,1	168,2
NA18	A	8,9	55,6	57,5	56,8	36,3	88,3	101,9	161,4
NA19	B	0,1	4,6	11,2	67,6	30,7	30,2	39,2	154,1
NA20	A	0,2	24,2	53,9	68,8	28	54,6	58,1	147,6
NA24	A	1,9	7,3	22,2	38,8	27,4	50,7	71,7	160,1
NA26	B	0,1	6,5	8	70,3	16,5	60	42,4	131,1
NA28	B	0	12,1	16,6	69,7	0	42,4	40	121,9
NA36	A	0	9,9	22,8	32,1	0	30,2	81,8	170
NA37	B	0,4	12,6	21,6	75,5	18,7	45,4	49,5	98,9
Prosjek		1,4	16,7	29,3	60	21,5	54,1	66	155,3
St. Dev		2,3	15,9	16,1	14,9	13,2	14,9	18,8	30,9
VK01	B	6	9,8	16,1	25,2	25,2	29,2	28,4	165
VK09	B	1	1,2	6,1	57,2	17,7	24,9	21,5	148,8
VK11	B	0,8	1,7	8,2	79,2	22,6	23,4	34,8	163,8
VK15	B	0	4	11,1	38,9	0	26,5	58,4	108,5
VK17	A	2,8	31,5	48,9	89,5	25,2	51,5	63,6	176,8
VK20	B	1,5	1,5	5,1	23,8	20,7	17	20,9	114,9
VK21	B	1,4	4,9	6,4	18,1	19,8	67,3	26	117,8
VK23	B	0	1,8	12,9	49,9	0	26	34,7	241,1
VK35	B	2,8	4,4	9,6	81,3	24,1	31,8	36,4	171,5
VK38	B	3,8	5,5	5,5	56	23,6	25,7	36,7	83,2
VK42	A	1,3	2,3	59,3	90,7	34,4	33,8	67,5	228,3
VK47	A	3,9	31,4	37,2	69,3	27,5	49,4	78	204,6
VK50	B	0,8	6,4	8,8	90,5	33,8	48,7	41,7	177,4
VK54	B	0,9	9,6	6,1	71,6	16,1	35,4	49,3	147,5
VK55	B	0,4	7,3	13,8	51,7	25,4	32,7	39,3	127,1
Prosjek		1,8	8,2	17	59,5	21,1	34,9	42,5	158,4
St. Dev		1,7	9,8	17,1	24,9	9,9	13,5	17,4	44,5

BJ-Bjelovar; NA-Našice; VK-Vinkovci

RASPRAVA

Na fiziološke značajke polena kao što su klijavost i rast polenovih mješnica utječu mnogobrojni vanjski (Hedhly i dr. 2003; Fonseca i Westgate 2005; Schueler i dr. 2005; Kakani i dr. 2005; Kremer i Jemrić, 2006) i unutarnji (Schrauwen i dr. 1996; Suzuki i dr. 2001; Zhang i Fernando, 2005; Vinod, 2005) čimbenici. Od vanjskih čimbenika na fiziološke značajke polena prvenstveno mogu utjecati meteorološke prilike kao što su visoke i niske temperature zraka (Lardon i dr. 1994; Garcia-Mozo i dr. 2001), niska relativna vlažnost zraka (Fonseca i Westgate, 2005), vodni stres (Suzuki i dr. 2001) i dr. Razdoblje tijekom kojega je muški cvijet najosjetljiviji na negativan utjecaj meteoroloških prilika je trenutak u kojem se odvija mejoza koja je sastavni dio procesa mikrosporogeneze (Stairs, 1964). To u konačnici može rezultirati produkcijom polena loše kvalitete (Issarakraisila i Considine, 1994). Kod hrasta lužnjaka mejoza se odvija za vrijeme otvaranja cvjetnih pupova i početka izduživanja muških resa (Ducouso i dr. 1993; Tucović i Jovanović, 1970). Osim okolišnih čimbenika produkcija polena loše kvalitete i sterilnost muških cvjetova može biti utjecana i genetičkim čimbenicima (Kaul 1988; Hidalgo-Fernandez i dr. 1999). Ako govorimo o sterilnosti tada je ona najčešće povezana s mutacijama jezgrinih i/ili citoplazmatskih gena (Vinod, 2005). Međutim, utjecaj genetičkih i okolišnih čimbenika koji izazivaju sterilnost muških cvjetova na dobivene rezultate u ovom istraživanju može biti isključen. Iz razloga jer prilikom naklijavanja polena niti kod jednog klona nije utvrđena klijavost polena od 0 % pri svim vremenskim tretmanima (2, 4, 6 i 24 sata).

Schrauwen i dr. (1996) navode pet fizioloških funkcija tapetuma povezanih s klijavošću polena i rastom polenovih mješnica. Primjerice, jedna od njih je sinteza lipidnih supstanci koje štite polenova zrnca od isušivanja nakon što ona napuste polenovnice. Druga je sinteza proteinskih spojeva neophodnih za uspješnu rehidraciju polena tijekom klijanja i rasta polenovih mješnica na njušci tučka ženskoga cvijeta. Iz tog razloga moguće je pretpostaviti kako je u našem slučaju uslijed nepovoljnoga utjecaja meteoroloških prilika došlo do poremetnje navedenih fizioloških procesa. Polen koji se razvio iz tada stvorenih mikrospora nije bio otporan na isušivanje nakon što je napustio polenovnice i/ili nije imao sposobnost rehidracije nakon nanošenja na medij. Na taj način moguće je objasniti bolji postotak klijavosti polena kod klonova iz skupina A i B u odnosu na klonove iz skupina C i D. To je posebno naglašeno pri vremenu inkubacije od 24 h (Slika 2).

Rast polenovih mješnica binuklearnih polenovih zrnaca sastoji se od dvije faze. Prva je autotrofna u kojoj dolazi do mobilizacije endogenih supstanci (aminokiseline i šećeri)

potrebnih za početni rast polenove mješinice, dok je druga heterotrofna i ovisi o sintezi nove mRNA (Tagliasacchi i dr. 1985). Nakon dva do sedam sati od početka klijanja binuklearnih polenovih zrnaca dolazi do izmjene autotrofne i heterotrofne faze (Tagliasacchi i dr. 1985). Rast polenovih mješinica tijekom autotrofne faze ovisi o količini aminokiselina i šećera pohranjenih u polenovom zrncu tijekom mikrosporogeneze (Mascarenhas, 1993; Schrauwen i dr. 1996). Na taj način moguće je objasniti sličnosti i razlike u dužinama polenovih mješinica između istraživanih skupina pri svim istraživanim vremenima inkubacije od 2, 4, 6 i 24 sata (Slika 3).

Klonovi uključeni u ovo istraživanje nisu fenološki ujednačeni što znači da ne ulaze istovremeno u određene fenofaze razvoja cvjeta (Franjić i dr. 2011), a samim time niti mejoza kod njih ne nastupa istovremeno. Iz tog je razloga lošiji postotak klijavosti polena i sporiji rast polenovih mješinica zaista mogao biti posljedica nepovoljnoga utjecaja meteoroloških prilika koje su utjecale samo na klonove koji pripadaju skupinama C i D.

S druge strane, postoji mogućnost da su razlike u klijavosti polena i rastu polenovih mješinica kod istraživanih klonova posljedica različite reakcijske norme pojedinih klonova unutar istraživanih skupina na utjecaj identičnih meteoroloških prilika za vrijeme odvijanja mejoze. To u kombinaciji s možebitnim utjecajem meteoroloških prilika u određenoj mjeri dodatno otežava objašnjenje razlika u postotku klijavosti polena i rastu polenovih mješinica zbog utjecaja genetske pozadine na fiziološke značajke polena koju u ovom istraživanju nije bilo nemoguće u potpunosti isključiti.

Hrast lužnjak spada u skupinu šumskoga drveća koje se odlikuje odgođenom oplodnjom (Sogo i Tobe, 2006). To znači da se oplodnja odvija 3 do 4 tjedna nakon oprašivanja. Polen hrasta lužnjaka na njušci tučka ženskoga cvijeta proklije unutar 24 sata. Nakon toga po prilici sljedeća 2 tjedna polenove mješinice rastu kroz staničje njuške tučka sve do mjesta gdje se vrat tučka spaja s plodnicom koja u to vrijeme još uvijek nije funkcionalna (Jovanović i Tucović, 1975). Nakon toga polenove mješinice miruju sve dok jajna stanica u plodnici ne postane spremna za oplodnju. Tada polenove mješinice nastavljaju s rastom i proraštaju u plodnicu nakon čega slijedi oplodnja. Kod hrasta plutnjaka utvrđeno je kako jedinke koje se odlikuju visokim postotkom klijavosti polena i brzim rastom polenovih mješinica imaju bolji potencijal oplodnje u odnosu na jedinke sa manjim postotkom klijavosti i sporijim rastom polenovih mješinica (Boavida i dr. 1999). S obzirom na to klonovi koji pripadaju skupinama A i B izdvojeni su kao dobri polinatori jer se odlikuju vrlo dobrim postotkom klijavosti i brzim rastom polenovih mješinica što je posebno naglašeno pri vremenskom tretmanu od 24 sata (Slika 2 i 3, Tablica 4).

ZAKLJUČCI

S obzirom na uspjeh klijanja polena i brzinu rasta polenovih mješnica utvrđeno je jasno razdvajanje klonova u četiri skupine što je posebno izraženo pri vremenskom tretmanu od 24 sata.

Prilikom kontroliranoga oprašivanja u KSP preporučamo koristiti mješavinu polena onih klonova čiji polen ima najbolji postotak klijavosti i najbrži rast polenovih mješnica.

Prilikom provođenja pomotehničkih zahvata u KSP potrebno je obratiti posebnu pozornost klonovima koji imaju najbolje fiziološke značajke polena s ciljem produkcije što većih količina takvoga polena.

Buduća istraživanja fizioloških značajki polena kao što su utvrđivanje postotka klijavosti i rasta polenovih mješnica trebalo bi uzeti u obzir i možebitan utjecaj okolišnih čimbenika na produkciju polena tijekom razvoja muških cvjetova.

ZAHVALE

Posebno bismo željele iskazati zahvalnost doc.dr.sc. Željku Škvorcu i Krunoslavu Severu dipl.ing. što su nam pružili pomoć pri izradi ovog rada.

POPIS LITERATURE

1. Báez, P., Riveros, M. & Lehnebach, C. 2002: Viability and longevity of pollen *Nothofagus* species in southern Chile. *New Zealand Journal of Botany*. **40**: 671-678.
2. Beerling, D.J. & Chalover, W.G. 1993: The impact of atmospheric CO₂ and temperature change on stomatal density. Observations from *Quercus robur* lammas leaves. *Annals of Botany*. 71:231-235.
3. Boavida, L.C., Varela, M.C. & Feijo, J.A. 1999: Sexual reproduction in the cork oak (*Quercus suber* L.). I. The progamic phase. *Sex Plant Reprod*. **11**: 347-353.
4. Cecich, R.A. & Haenchen, W.W. 1995: Pollination biology of northern red and black oak. pp. 238-246. In: Gottschalk, K.W. & Fosbroke, S.C.L. (ed.), *Proceedings, 10th Central Hardwood Forest Conference*. Morgantown.
5. Cecich R.A. 1997: Influence of Weather on pollination and acorn production in to two species of Missouri oaks. In (S.G.Pallardy, R.A.Cecich, H.E.Garrett and P.S.Johnson, eds.) *Proceeding, 11th Central Hardwood Forest Conference; March 23-26, 1997; Columbia, MO.Gen.Tech.Rep.NC-188.St.Paul,MN: U.S.Dept. Agric.; Forest Service, North Central For. Expt. Sta. p. 252-261*
6. Ducouso, A., michaud, H. & Lumaret, R. 1993: Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Ann Sci For*. 50: 91-106.
7. Dow B.D. and Ashley M.V. 1998: High Levels of Gene Flow in BurO ak Revealed by Paternity Analysis Using Microsatellites. *Journal of Heredity*. **89**: 62-70.
8. Fonseca, A.E. & Westgate, M.E. 2005: Relationship between desiccation and viability of maize pollen. *Field Crops Research*. **94**: 114-125.
9. Franjić, J., Sever, K., Bogdan, S., Škvorc, Ž., Krstonošić, D., Alešković, I. 2011: Fenološka neujednačenost kao ograničavajući čimbenik uspješnoga oprašivanja u klonskim sjemenskim plantažama hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). *Croat. J. For. Eng*. **32**: 141- 156
10. Garcia-Mozo, H., Hidalgo, P.J., Galán, C., Gómez-Casero, M.T. & Dominguez, E. 2001: Catkin frost damage in mediterranean cork-oak (*Quercus suber* L.). *Isr. J.Plant Sci*. **49**: 41-47.
11. Hedhly, A., Hormaza, J.I. & Herrero, M. 2003: The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Environ*. **26**: 1673-1680.

12. Hedhly, A., Hormaza, J.I. & Herrero, M. 2004: Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany*. **91**: 558-564.
13. Hidalgo-Fernández, P.J., Perez-Vicente, R., Maldonado, R. & Ubera-Joiménez, J.L. 1999: Mitochondrial DNA polymorphism and gynodioecy in natural populations of *Rosmarinus officinalis* L. *Isr. J.Plant Sci.* **47**: 77-83.
14. Issarakraisila, M. & Considine, J. A. 1994: Effects of temperature on pollen viability in mango cv. 'Kensington'. *Annals of Botany* **73**:231-240.
15. Jicinska, D. & Koncalava, M.N. 1978: Flowering and fertilization process in European *Sambucus* and *Quercus* species. In (F. Bonner, ed.) *Proceedings of a symposium on flowering and seed development in trees*. Starkville, MS. pp. 103-111.
16. Jovanović, M. & Tucović, A. 1975: Genetics of common and sessile oak (*Quercus robur* L. and *Q. Petraea* Liebl.). *Ann. For.* **7**: 23-53.
17. Kajba D., Pavičić N., Bogdan S., Katičić I., 2007: Pomotehnički zahvati u klonskim sjemenskim plantažama listača, *Šum.list* 11-12: 523-528
18. Kakani, V.G., Reddy, K.R., koti, S., Wallace, T.P., Prasad, V.V., Reddy, V.R. & Zhao, D. 2005: Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Annals of Botany* **96**: 59-67.
19. Kaul, M. 1988: *Male sterility in higher plants*. Springer Verlag, Berlin.
20. Knapp, E.E., Goedde, M.A. & Rice, K.J. 2001: Pollen-limited reproduction in blue oak: Implications for wind pollination in fragmented populations. *Oecologia*. **128**: 48-55.
21. Kremer, D. & Jemrić, T. 2006: Pollen germination and pollen tube growth in *Fraxinus pennsylvanica*. *Biologia, Bratislava*. **61**: 79-83.
22. Kühne, C. & Bartschl, N. 2007: Germination of acorns and development of oak seedlings (*Quercus robur* L.) following flooding. *J. For. Sci.* **9**: 391-399.
23. Lardon, A. & Triboi-Blondel, A.M. 1994: Freezing injury to ovules, pollen and seeds in winter rape. *J. Exp. Bot.* **45**: 1177-1181.
24. Loupassaki, M. & Vasilakakis, M. 1995: The effect of temperature and relative humidity on the *in vitro* germination of the pollen of avocado. – 3rd World Avocado Congr. Tel Aviv 1995. Proc. pp. 42-45.-
http://www.avocadosource.com/WAC3/WAC3_TOC.htm.
25. Mascarenas J.P., 1993: Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *The plant Cell*. Vol.5 1303-1314.

26. Matić, S., Oršanić, M., Anić, I. 1996: Urod žira u prirodnim sastojinama hrasta lužnjak u Hrvatskoj. pp. 105-111. In: Mayer B. (ed.), Unaprjeđenje biomase šumskih ekosustava. Hrvatsko Šumarsko Društvo, Zagreb
27. Mulugeta, D., Maxwell, B.D., Fay, P.K. & Dayer, W.E. 1994: *Kochia (Kochia scoparia)* pollen dispersion, viability and germination. *Weed Sci.* **42**: 548-552.
28. Paraddey, D.R., Greyson, R.I. & Walden, D.B. 1989: Production of normal, germinable and viable pollen from in vitro-cultured maize tassels. *Theory Applied Genetics.* **77**: 521-526.
29. Ponton, S., Dupouey, J.L. & Dreyer, E. 2004: Leaf morphology as species indicator in seedlings of *Quercus robur* L. and *Q. Petraea* (Matt.) Leibl: modulation by irradiance and growth flush. *Ann. For. Sci.* **61**: 73-80
30. Prewein, C., Endemann, M., Reinöhl, V., Salaj J., Sunderlikova, V. & Wilhelm, E. 2006: Physiological and morphological characteristics during development of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) zygotic embryos. *Trees.* **20**: 53-60.
31. Rust, S. & Roloff, A. 2002: Reduced photosynthesis in old oak (*Quercus robur* L.): the impact of crown and hydraulic architecture. *Tree Physiol.* **22**: 597-601
32. Schoper, J.B., Lambert, R.J. & Vasilas, B.L. 1986: Maize pollen viability and ear receptivity under water and high temperature stress. *Crop Sci.* **26**: 1029-1033.
33. Schoper, J.B., Lambert, R.J. & Vasilas, B.L. 1987: Pollen viability, pollen shedding, and combining ability for tassel heat tolerance in maize. *Crop Sci.* **27**: 27-31.
34. Schrauwen, J.A.M., Mettrnmeier, T., Croes, A.F. & Wullems, G.J. 1996: Tapetum-specific genes: What role do they play in male gametophyte development? *Acta Bot Neerl.* **45**: 1-15.
35. Schueler, S., Schlüzen, K.H. & Scholz, F. 2005: Viability and sunlight sensitivity of oak pollen and its implications for pollen-mediated gene flow. *Trees.* **19**: 154-161.
36. Seletković, Z. 1996: Climate of pedunculate oak forests, pp. 71-82. In: Klepac D. (ed.), pedunculate oak in Croatia, HAZU and "Croatian forest", Vinkovci, Zagreb.
37. Sha Valli Khan, P.S., Evers, D. & Hausman, J.F. 1998: Stomatal characteristics and water relations of *in vitro* grown *Quercus robur* NL 100 in relation to acclimatization. *Silvae Genetica.* **48**: 83-87.
38. Sogo A. i Tobe H., 2006: The evolution of fertilization independent of the microphyle in Fagales and 'pseudoporogamy'. Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto, Japan. *Pl. Syst. Evol.* **259**: 73-80

39. Stairs, G.R. 1964: Microsporogenesis and embryogenesis in *Quercus*. Bot. Gaz. **125**: 115-121.
40. StatSoft, Inc., 2006: STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
41. Stojković, M. 1991: Varijabilnost i nasljednost listanja hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.). Glas. Šum. Pokuse. **27**: 227-259.
42. Suzuki, K., Takeda, H., Tsukaguchi, T. & Egawa, Y. 2001: Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heat stress. Sex Plant Reprod. **13**: 293-299.
43. Tagliasacchi, A.M., Forino, L. M. C., Bellani, L.M. & Avanzi, S. 1985: Dynamics of pollen grain germination in two cultivars of *Malus domestica*: the influence of actinomycin D on fresh and stored pollen grains. Annals of Botany. **56**: 29-33.
44. Tucović, A. & Jovanović, M. 1970: Some characteristic of meiosis in common oak (*Quercus robur* L.). pp. 41-42. In: (Valtion , P. ed.), Sexual reproduction of forest trees. Varparanta, Finland.
45. Tucović, A., Bobinac, M. & Isajev, V. 2002: Individual variability of pedunculate oak inflorescence on the same tree and its significance. Proceeding of the 7th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Dimitrovgrad. Proc. pp. 171-176.
46. Varela, M.C., Bras, R., Barros, I.R., Oliveira, P. & Meierrose, C. 2008: Opportunity for hybridization between two oak species in mixed stands as monitored by the timing and intensity of pollen production. For Ecol Manage. **256**: 1546-1551.
47. Vinod, K.K. 2005: Cytoplasmic genetic male sterility in plants – A molecular perspective. pp. 147-162. In: Proceedings of the training programme on “Advances and Accomplishments in Heterosis breeding“, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India.
48. Zhang, S. & Fernando, D.D. 2005: Structural, histochemical, and protein analysis of male reproductive development in willow. Sex plant reprod. **18**: 37-46.

SAŽETAK

FIZIOLOŠKE ZNAČAJKE POLENA HRASTA LUŽNJAKA (*Quercus robur* L.) PORIJEKLOM IZ KLONSKIH SJEMENSKIH PLANTAŽA

Nina Herceg i Sanja Telalović

U radu su istraživane fiziološke značajke polena koje se ogledaju u postotku njegove klijavosti i rastu polenovih mješinica. Istraživanje je provedeno na klonovima hrasta lužnjaka porijeklom iz klonskih sjemenskih plantaža u Hrvatskoj. Klijavost polena i rast polenovih mješinica ispitivan je pri konstantnoj temperaturi zraka od 25°C i relativnoj vlažnosti zraka od 80 % pri vremenskim tretmanima od 2, 4, 6 i 24 sata.

Klijavost polena pri vremenskim tretmanima od 2, 4, 6 i 24 sata u prosjeku je iznosila od 0,2 do 2,5 %; 1,3 do 22,4 %; 3,8 do 39,8 % i 25,0 do 65,2 % kako slijedi. Dužine polenovih mješinica pri istim vremenskim tretmanima iznosile su od 17,7 do 29,3 µm; 25,2 do 55,9 µm; 31,4 do 74,8 µm i 59,2 do 174,1 µm kako slijedi.

S obzirom na uspjeh klijanja polena i brzinu rasta polenovih mješinica utvrđeno je jasno razdvajanje klonova u četiri skupine što je posebno izraženo pri vremenskom tretmanu od 24 sata. Na temelju dobivenih rezultata preporučamo da se prilikom provođenja pomotehničkih zahvata u klonskim sjemenskim plantažama posebna pažnja posveti klonovima koji se odlikuju najboljom klijavošću polena i najbržim rastom polenovih mješinica.

Ključne riječi: klijavost polena, rast polenove mješinice, hrast lužnjak, klonska sjemenska plantaža

SUMMARY

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PEDUNCULATE OAK (*Quercus robur* L.) POLLEN FROM CLONAL SEED ORCHARDS

Nina Herceg i Sanja Telalović

This paper examines the physiological characteristics of pollen which is reflected in its percentage of germination and growth of pollen tubes. The study was conducted on the oak clones from clonal seed orchards in Croatia. Pollen germination and growth of pollen tubes was examined at a constant air temperature of 25°C and a relative humidity of 80% at the time of treatment 2, 4, 6 and 24 hours.

Pollen germination at the time of treatments 2, 4, 6 and 24 hours was on average from 0.2 % to 2.5 %; 1.3 % to 22.4 %; 3.8% to 39.8 % and 25.0 % to 65.2 % respectively. Lengths of pollen tubes at those time treatments were from 17.7 µm to 29.3 µm; 25.2 µm to 55.9 µm; 31.4 µm to 74.8 µm and 59.2 µm to 174.1 µm respectively.

From the success of pollen germination and growth rate of pollen tubes, clear separation of clones into four groups was established, which is especially evident at the time of treatment 24 hours. Based on these results we recommend that, during the pomotechnical operations in clonal seed orchards, special attention is paid to the clones that are characterized by the best pollen germination and the fastest pollen tube growth.

Key words: pollen germination, pollen tube growth, pedunculate oak, clonal seed orchard