

MOLEKULARNA BIOLOGIJA U ŠUMARSTVU

MOLECULAR BIOLOGY IN FORESTRY

Josip FRANJIC* & Zlatko LIBER**

SAŽETAK: Danas je molekularna biologija grana biologije s vjerojatno najbržim razvojem i najvećim utjecajem u istraživačkome svijetu, i ne postoji ni jedno područje biološke znanosti koje u svojim istraživanjima ne primjenjuje barem neku od molekularno-bioloških metoda. Današnje svjetsko moderno šumarstvo u čitavoj svojoj kompleksnosti jedan je od najboljih primjera primjene različitih molekularno-bioloških metoda u različitim istraživanjima, ali i u svakodnevnoj praksi. Najnovija dostignuća u molekularnoj biologiji, kao npr. lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), olakšala su primjenjivost ovih metoda u šumarstvu te su one postale nezaobilazno oruđe među ostalim u procjeni genetičke raznolikosti, programima oplemenjivanja i programima zaštite. Za te potrebe razvijene su brojne metode kao što su *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)*, *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*, *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)* i Mikrosateliti. Kako te metode prikazuju određeni DNA polimorfizam osobit za određeno svojstvo (npr. otpornost na neku bolest) ili za jedinku, populaciju, podvrstu ili za neku višu taksonomsku jedinicu, uobičajeno je o ovim metodama govoriti kao o DNA markerima (npr. *RAPD* markeri). Laboratorijsko istraživanje genetičke raznolikosti populacija do nedavno se baziralo isključivo na izoenzimima, međutim njihova primjena bila je ograničena malom varijabilnošću unutar nekih populacija. Danas se za procjenu genetičke varijabilnosti upotrebljavaju različiti DNA markeri, čija je kombinacija omogućila utvrđivanje genetičke varijabilnosti u svim dosad istraživanim populacijama. Ovim radom nastoji se apelirati na šumarske institucije koje bi trebale podržati navedene tipove istraživanja, kako bi se mladi istraživači obučili za takve analize, jer se, s ne tako velikim sredstvima, mogu napraviti veliki rezultati. Bit će velika šteta za naše šumarstvo ako se ovakvim istraživanjima kao dosad, budu isključivo bavili samo istraživači koji nisu šumarske struke i koji nisu dovoljno upoznati s praktičnom šumarskom problematikom.

Gljučne riječi: molekularno-biološke metode, šumarstvo, Hrvatska

UVOD – Introduction

Šumarstvo je nedvojbeno vrlo bitan čimbenik u gospodarstvu mnogih zemalja pa tako i Hrvatske. U

zadnje vrijeme puno se priča i piše o raznim genetskim manipulacijama na raznim vrstama organizama od virusa, bakterija, gljiva, biljaka, životinja sve do čovjeka. Te manipulacije mogu biti korisne ako se mogu dobro kontrolirati, ali mogu biti i vrlo štetne ako odmaknu kontroli. Šumarstvo kao gospodarska grana sasvim sigurno nije izuzeto iz razno raznih genetskih manipulacija. Hrvatsko šumarstvo već znatan niz godina

* Zavod za šumarsku genetiku i dendrologiju, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, E-mail: jozo.franjic@zg.tel.hr

** Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, E-mail: zlatko.liber@botanic.hr

radi na raznim oblicima oplemenjivanja šumskoga drveća (nemolekularnim), gdje su postignuti vrlo dobri rezultati (usp. Krstinić & Kajba 1991, 1993, 1994, 1995, 1997; Kajba 1995; Krstinić et al. 1996, 1996a, 1998; Franjić et al. 2000 i dr.).

Današnji trend u svijetu je detaljno upoznavanje molekularne strukture različitih organizama, tj. utvrđivanja zakonitosti nasljeđivanja određenih osobina. šumsko drveće kao osnovna šumsko-gospodarska komponenta je vrlo interesantan predmet molekularno-bioloških istraživanja, te se njemu u svijetu posvećuje vrlo velika pozornost, tako da se formiraju veliki timovi i laboratoriji koji danonoćno rade na otkrivanju određenih zakonitosti nasljeđivanja gospodarski interesantnih svojstava (prirast, punodrvnost, pravnost, plodonošenje i sl.).

Molekularno-biološka istraživanja u hrvatskome šumarstvu su na samome početku, iako je bilo nekih pokušaja koji su neznatno našli svoju primjenu u praksi, najčešće radi nedovoljno stručnoga pristupa problemima. Praktično šumarstvo često puta ima velikih teškoća npr. u suzbijanju određenih biljnih bolesti ili napada kukaca, oko uroda i podrijetla sjemena i sl. Danas postoje u svijetu vrlo pouzdane molekularno-biološke

metode koje mogu u znatnoj mjeri riješiti takve probleme. Tako se npr. identifikacija provenijencija temelji na kloroplastnoj i mitohondrijskoj DNA, dok se analiza genetskoga sastava i odnosa unutar sjemenskoga materijala i između sjemenske sastojine i njezina izvora koristiti visokom razinom polimorfizma koju nude nuklearni mikrosateliti (usp. Heinze & Lexer 2000). Nesumnjivo je došlo vrijeme da se i u hrvatskome šumarstvu poduzmu značajniji koraci u molekularno-biološkim istraživanjima i primjeni rezultata tih istraživanja u šumarskoj praksi. Hrvatski šumari zbog nedovoljne molekularno-genetičke naobrazbe smatraju takva istraživanja nečim osobitim i nedokučivim. Danas je krajnje vrijeme da se hrvatski šumari znatnije angažiraju oko molekularno-bioloških istraživanja, jer će sutra već biti kasno. Molekularna biologija ušla je i vrlo brzo ulazi u sve biološke discipline pa tako i u šumarstvo, tako da ćemo mi to htjeti ili ne htjeti morati prihvatiti.

Ovime se radom nastoji apelirati na šumarske institucije koje bi trebale podržati takve tipove istraživanja, kako bi se mladi istraživači obučili za takve i slične analize, jer se, s ne tako velikim sredstvima, mogu napraviti veliki rezultati.

MOGUĆNOSTI PRIMJENE MOLEKULARNO-BIOLOŠKIH METODA U ŠUMARSTVU

Possibilities of applying molecular-biological methods in Forestry

Molekularna biologija je danas grana biologije s vjerojatno najbržim razvojem i najvećim utjecajem u istraživačkome svijetu. Ne postoji niti jedno područje biološke znanosti koje u svojim istraživanjima ne primjenjuje barem neku od molekularno-bioloških metoda. Današnje svjetsko moderno šumarstvo u čitavoj svojoj kompleksnosti jedan je od najboljih primjera primjene različitih molekularno-bioloških metoda u različitim istraživanjima, ali i u svakodnevnoj praksi. Najnovija dostignuća u molekularnoj biologiji, kao što je prije svega lančana reakcija polimerazom (Polymerase Chain Reaction – PCR; usp. Mullis & Faloona 1986), olakšala su primjenjivost ovih metoda u šumarstvu te su one postale nezaobilazno oruđe u prije svega:

1. Procjeni genetičke raznolikosti
2. Programima oplemenjivanja

3. Programima zaštite

Za te potrebe razvijene su brojne kao što su:

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- Mikrosateliti.

Kako ove metode razvijaju određeni polimorfizam karakterističan za određeno svojstvo (npr. otpornost na neku bolest i sl.) i za neku jedinku, populaciju, podvrstu ili za neku drugu taksonomsku jedinicu, uobičajeno je o ovim metodama govoriti kao o DNA markerima (npr. RAPD markeri).

Procjena genetičke raznolikosti – Estimating of genetic variability

Vjerodostojne informacije o distribuciji genetičke raznolikosti nužni su početak za sva istraživanja bilo da se radi o selekciji, uzgoju, oplemenjivanju, programima zaštite ili pak o taksonomiji, evoluciji ili ekologiji. Laboratorijsko istraživanje genetičke raznolikosti populacija do nedavno se baziralo isključivo na izoenzimima, međutim njihova primjena je bila ograničena malom varijabilnošću unutar nekih populacija. Danas

se za procjenu genetičke varijabilnosti upotrebljavaju različiti DNA markeri (usp. Fineschi et al. 1991; Wagner 1992; Ayad et al. 1995; Karp et al. 1998), čija je kombinacija je omogućila utvrđivanje genetičke varijabilnosti u svim dosad istraživanim populacijama. Za ovu prigodu navode se samo neke osobine najčešće upotrebljavanih DNA metoda:

1. **RFLP analiza** je dosad najčešće upotrebljavana metoda. Ona se zasniva na razgradnji DNA restrikcijskim enzimima, elektroforezi i na hibridizaciji s različito označenim DNA sondama (usp. Botstein et al. 1980). U novije vrijeme lančana reakcija polimerazom uvedena je i u ovaj tip analize.
2. **RAPD metoda** se zasniva, za razliku od klasične lančane reakcije polimerazom, na upotrebi samo jedne (iste) desetmerne početnice, a ne para različitih početnica (usp. Williams et al. 1990). RAPD početnica se izabiru po čitljivosti i informativnosti dobivenoga RAPD profila nakon elektroforeze na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Ovisno o početnici na gelu agaroze se pojavljuje obično od 1 do 20 DNA fragmenata.
3. **AFLP tehnika** je bazirana na načelu selektivnoga umnožavanja prethodno restrikcijskim enzimima

razgrađene DNA (Vos et al. 1995). Dobiveni DNA polimorfizam se očituje u različitom broju i veličini DNA fragmenata na poliakrilamidnom gelu.

4. **Mikrosateliti** su još poznati pod nazivom *kratki ponavljajući nizovi* (Short Tandem Repeats – STRs; usp. Jeffreys et al. 1985). Oni su široko raspršeni unutar eukariotskoga genoma i vrlo jako polimorfni u broju ponavljajućih jedinica među pojedinim jedinkama i populacijama. Za utvrđivanje varijabilnosti na razini mikrosatelita koristi se standardni PCR protokol, a razlike unutar ove metode su u načinu detekcije koja varira od poliakrilamidne i agarozne gel elektroforeze te bojanja etidij bromidom ili srebrom do radioaktivnoga i fluorescencijskoga označavanja i upotrebe gelova za sekvencioniranje ili automatiziranih sustava.

Programi oplemenjivanja – Breeding programmes

Genetički markeri važno su oruđe u programima oplemenjivanja šumskoga drveća (usp. Cheliak & Rogers 1990; Neal et al. 1992; Staub & Serquen 1996; Wilcox et al. 1996). Genetička analiza drveća ograničena je dugim generacijskim vremenom, pa za razliku od npr. poljoprivrednih biljaka gdje su za razvoj pojedinih kultivara protekle stotine i tisuće godina, najnapredniji programi oplemenjivanja u šumarstvu imaju svega nekoliko generacija selekcije. Zbog takve situacije vrlo se malo zna o načinu nasljeđivanja šumarstvu interesantnih svojstava (npr. otpornost na bolesti, pravnost i punodrvnost debla, veličina krošnje, adaptabilnost, plodonošenju i sl.). Također se relativno malo zna i o načinu nasljeđivanja lovnome gospodarstvu interesantnih svojstava (npr. otpornost na razne bolesti, kvalitet trofeja i sl.). Metode koje bi omogućile ranu selekciju osobito su zanimljive u šumarstvu (Marker-Assisted Selection – MAS). Upotreba genetičkih markera za ranu selekciju već je godinama predmet velikoga interesa mnogih istraživača. Princip je taj da se DNA markeri vežu na različita mjesta na kromosomima, a zatim se na dovoljno velikom uzorku utvrdi veza pojedinih DNA markera s genima osobine važne za šumarstvo (Quantitative Trait Loci – QTL). Tako se npr. u rasadnicima ili pri prirodnoj obnovi šume u mladim biljkama može iz svega nekoliko miligrama tkiva utvrditi da li dotična jedinka nosi gen za određeno svojstvo ili ne. Prema tomu lako je donijeti, već vrlo rano, odluku da li nastaviti s uzgojem dotične jedinke ili ne. Na taj su način istraživači npr. povezali RFLP i RAPD

markere sa specifičnom težinom drveta, te otpornošću na neke bolesti (usp. Wilcox et al. 1996). Takve analize mogu se naravno primijeniti i u okviru lovnoga gospodarstva, što danas predstavlja značajan segment šumarstva kao grane privrede.

Također je moguće DNA markere iskoristiti za utvrđivanje osobina koje su povezane s ekološkim uvjetima pojedinoga staništa i na taj način obavljati pošumljavanje staništu najbolje prilagođenim jedinkama. Sutton et al. (1991) proveli su upravo takvo istraživanje primjenjivo u šumarskoj praksi. Tako se proizvodi oko 100 milijuna sadnica smreke godišnje za potrebe pošumljavanja područija zvanog British Columbia. Glavnina sjemena za taj ogroman posao potječe od vrsta *Picea sitchensis*, *P. glauca* i *P. engelmannii*, međutim zbog nedostatka dovoljne reproduktivne barijere dolazi do međuvrsnoga križanja u nekoliko velikih zona. Ti su istraživači razvili jeftinu tehniku, koristeći kloroplasne RFLP markere, koja će omogućiti selekcioniranje gotovo šest milijuna sadnica s najboljim genetičkim svojstvima, koliko je potrebno za pošumljavanje toga ekološki iznimno zahtjevnoga staništa.

Zanimljivo je napomenuti kako je mogućnost utvrđivanja gena odgovornih za određena svojstva otvorila vrata manipulaciji s genima. Veliko je pitanje da li će u budućnosti genetički manipulirani organizmi (GMOs) zamijeniti danas aktualne programe oplemenjivanja, ali će svakako oni biti tema mnogih polemika, zabrana kao i mnogih strategija tehnološki razvijenih zemalja.

Programi zaštite – Conservation programmes

Ideja zaštite genetičkih resursa (tj. zaštita biološke raznolikosti) potječe od biljnih i životinjskih oplemenjivača, koji su se zabrinuli za mogućnost gubitka važ-

nih osobina za buduća križanja. Konzervacijski koncept još je više aktualiziran promjenama u okolišu, uvjetovanih negativnim djelovanjem čovjeka (usp.

Schierwater et al. 1994; Baradat et al. 1995; Haig 1998; Butcher et al. 1999). Zaštita genetičke raznolikosti unutar vrsta prepoznata je kao jedan od glavnih ciljeva konzervacijske biologije (usp. IUCN/UNEP/WWF 1991). Danas molekularno-genetičke tehnike vidljivo preuzimaju sve veću ulogu pri konzervaciji šumskih genetičkih izvora, jer je pravi konzervacijski program nemoguće i zamisliti bez znanja o gene-

tičkoj strukturi koju treba zaštititi. Ideal je sačuvati sve gene i sve adaptacije koje se pojavljuju među i unutar populacija (usp. Millar 1987), tako Hamrick (1983) zaključuje kako su za konzervacijske potrebe najzahalniji jako polimorfni DNA markeri. U pripremi je i standardizacija upotrebe DNA markera za konzervacijske potrebe (usp. Ericsson 1995).

RASPRAVA I ZAKLJUČAK – Discussion and Conclusion

Današnji je trend u svijetu detaljno upoznavanje molekularne strukture različitih organizama, tj. utvrđivanja zakonitosti nasljeđivanja određenih osobina i mogućnosti njihove primjene. Hrvatsko šumarstvo već znatan niz godina radi na raznim oblicima oplemenjivanja šumskoga drveća, gdje su postignuti vrlo dobri rezultati (usp. Krstinić & Kajba 1991, 1993, 1994, 1995, 1997; Kajba 1995; Krstinić et al. 1996, 1996a, 1998; Franjić et al. 2000. i dr.). Šumsko drveće kao osnovna šumsko-gospodarska komponenta vrlo je interesantan predmet molekularno-bioloških istraživanja, te se njemu u svijetu posvećuje velika pozornost, tako da se formiraju veliki timovi i laboratoriji koji danonoćno rade na otkrivanju određenih zakonitosti nasljeđivanja gospodarski interesantnih svojstava, koja bi svoju primjenu našla u oplemenjivanju. Molekularno-biološka istraživanja u hrvatskom šumarstvu su na samome početku, iako je bilo poje-

dinačnih pokušaja koji se slabo primjenjuju u praksi (usp. Zoldoš et al. 1995, 1995a, 1997, 1998, 1999, 2000; Besendorfer et al. 1996; Liber 1999; Liber 2000; Slade 1999; Slade et al. 2000).

Danas postoje u svijetu vrlo pouzdane molekularno-biološke metode koje mogu u znatnoj mjeri riješiti brojne praktične probleme, te je nesumnjivo došlo vrijeme da se i u Hrvatskoj poduzmu značajniji koraci u tom smislu.

Molekularna biologija ušla je i vrlo brzo ulazi u sve biološke discipline pa tako i u šumarstvo, tako da ćemo mi htjeti to ili ne htjeti morati prihvatiti. Bila bi velika šteta da to posljednji shvatimo. Ovime se radom nastoji apelirati na šumarske institucije koje bi trebale podržati takve tipove istraživanja da se mladi istraživači obučavaju za takve analize, jer se s ne tako velikim sredstvima mogu napraviti veliki rezultati.

LITERATURA – References

- Ayad, W. G., T. Hodgkin, A. Jaradat, V. R. Rao, 1995: Molecular genetic techniques for plant genetic resources. IPGRI, Rome, Italy.
- Bardat, Ph., W. T. Adams, G. Müller-Starck, 1995: Population genetics and conservation of forest trees. SPB Academic Publishing, Amsterdam, Netherlands.
- Besendorfer, V., V. Zoldoš, T. Peškan, M. Krsnik-Rasol, T. Littvay, D. Papeš, 1996: Identification of potential cytogenetical and biochemical markers in bioindication of common oak forests. *Phyton* 36(3): 139-146.
- Botstein, D., R. L. White, M. Scolnick, R. W. Davis, 1980: Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 641-656.
- Butcher, P. A., J. C. Glaubitz, G. F. Moran, 1999: Applications for microsatellite markers in the domestication and conservation of forest trees. *Forest Genetic Resources* 27: 34-42.
- Cheliak, W. M., D. L. Rogers, 1990: Integrating biotechnology into tree improvement programs. *Can. J. For. Res.* 20: 452-463.
- Eriksson, G., 1995: Which traits should be used to guide sampling for gene resources? In Bardat, Ph., W. T. Adams, G. Müller-Starck (ed.): *Population genetics and conservation of forest trees*, 349-359. SPB Academic Publishing, Amsterdam, Netherlands.
- Franjić, J., J. Gračan, D. Kajba, Ž. Škvorc, B. Dalbelo-Bašić, 2000: Multivariate analysis of leaf shape of the common oak (*Quercus robur* L.) in the "Gajno" provenance test (Croatia). *Glas. šum. Pokuse* 37: 469-479.
- Fineschi, S., M. E. Malvolti, F. Cannata, H. H. Hattemer, 1991: Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands.
- Haig, S. M., 1998: Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79(2): 413-425.
- Hamrick, J. L., 1983: The distribution within and among natural plant population. In Schone-wald-Cox, C. M., Chambers, S. M., MacBryde, B., Thomas, W. L. (ed.): *Genetics and Conservation*. London: Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc.

- Heinze, B., C. Lexer, 2000: Oak seedlots and forest seed trade regulations: an investigation using molecular markers. *Glas. Šum. Pokuse* 37: 347-360.
- IUCN/UNEP/WWF, 1991: *Caring for the earth: a strategy for sustainable living*. Gland, Switzerland.
- Jeffreys, A. J., V. Wilson, S. L. Thein, 1985: Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Kajba, D., 1995: Klonsko šumarstvo i njegove perspektive. *Šum. list* 119(9-10): 329-334.
- Karp, A., P. G. Isaac, D. S. Ingram, 1998: *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman & Hall, London.
- Krstinić, A., D. Kajba, 1991: Mogućnosti genetskog poboljšanja bujnosti rasta crne johe (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) putem klonskih sjemenjskih plantaža. *Šum. list* 115(6-9): 261-271.
- Krstinić, A., D. Kajba, 1993: Oplemenjivanje brzorastućih listača. *Glas. Šum. Pokuse, Pos. Izd.* 4: 59-72.
- Krstinić, A., D. Kajba, 1994: Kolekcija klonova čistih vrsta i hibrida topola iz sekcije *Aigeiros* u Republici Hrvatskoj – značaj za oplemenjivanje i uzgoj. *Šum. list* 118 (1-2): 33-38.
- Krstinić, A., D. Kajba, 1995: Prvi rezultati oplemenjivanja stablastih vrba samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom. *Šum. list* 119 (5-6): 163-167.
- Krstinić, A., D. Kajba, 1997: Improvement of Chinese Willow (*Salix matsudana* Koidz.) and White Willow (*Salix alba* L.) by hybridization and selection. *Znanje za gozd. Zbornik ob 50. obljetnici obstoja in delovanja GIS 1*: 341-350. Ljubljana.
- Krstinić, A., J. Gračan, D. Kajba, 1996: Dostignuća na oplemenjivanju topola i stablastih vrba u Hrvatskoj. U Matić, S., J. Gračan (ur.): *Unapređenje proizvodnje biomase šumskih ekosustava. Skrb za hrvatske šume od 1846. do 1996. Unapređenje proizvodnje biomase šumskih ekosustava, 1*: 229-238. Hrvatsko šumarsko društvo, Zagreb.
- Krstinić, A., Gračan, J., Kajba, D., Z. Perić, 1998: Improvement of Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Mill.) and Brutian Pine (*Pinus brutia* Ten.) in function of reforestation on burnt up area in the coastal area and on the islands of Croatia. *Period. Biol.* 100, Suppl. 1: 45-46.
- Krstinić, A., Trinajstić, I., Gračan, J., Franjić, J., Kajba, D., Britvec, M., 1996a: Genetska izdiferenciranost lokalnih populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) u Hrvatskoj. U Matić, S., J. Gračan (ur.): *Skrb za hrvatske šume od 1846. do 1996. Zaštita šuma i pridobivanje drva 2*: 159-168. Hrvatsko šumarsko društvo, Zagreb.
- Liber, Z., Zi. Pavletić, T. Nikolić, H. Fulgosi, 1999: DNA polymorphisms in Austrian and Dalmatian black pine. *Wiss. Mitt. Niderost. Landmuseum* 12: 53-62.
- Liber, Z., 2000: *Filogenetski i taksonomski odnosi populacija crnoga bora (Pinus nigra Arnold) u Hrvatskoj*. Doktorska disertacija-Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Millar, C. I., 1987: The California forest germplasm conservation project. A case for genetic conservation of emperate tree species. *Cons. Biol.* 191-193.
- Mullis K. B., F. A. Faloona, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzimol.* 155: 335-350.
- Neale, D. B., M. E. Devey, K. D. Jarmstad, M. R. Ahuja, M. C. Alosi, K. A. Marshal, 1992: Use of DNA markes in forest tree improvement research. *New Forests* 6: 391-407.
- Schierwater, B., B. Streit, G. P. Wagner, R. De Salle, 1994: *Molecular ecology and evolution: Approches and applications*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Slade, D., 1999: Fitogenetičko porijeklo i distribucija haplotipova hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.), kitnjaka (*Q. petraea* L.), medunca (*Q. pubescens* L.) i sladuna (*Q. frainetto* L.) u Hrvatskoj. *Radovi Šum. Inst. Jastrebov.* 34 (2): 121-131.
- Slade, D., R. Petit, J. Gračan, T. Littvay, 2000: Genetsko kartiranje populacija hrastova u Hrvatskoj temeljem biljega kloroplastne DNA. *Zbornik sažetaka priopćenja sedmog hrvatskog biološkog kongresa, 76*. Zagreb.
- Staub, J. E., F. C. Serguen, 1996: Genetic markers, map construction, and their application in Plant Breeding. *HortScience* 31(5): 729-741.
- Sutton, B. C. S., D. J. Flanagan, Y. A. El-Kasaby, 1991: A simple and rapid method for estimating representation of species in spruce seedlots using chloroplast DNA restriction fragment length polymorphism. *Silva Genetica* 40(3-4): 119-123.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Rijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.

- Wagner, D. B., 1992: Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New Forests* 6: 373-390.
- Wilcox, P. L., H. V. Amerson, E. G. Kuhlman, B. H. Liu, D. M. Omalley, R. R. Sederoff, 1996: Detection of a major gene for resistance to fusiform rust disease in loblolly pine by genomic mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (9): 3859-3864.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey, 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zoldoš, V., V. Besendorfer, T. Littvay, D. Papeš, 1995: The common oak (*Quercus robur* L.) as a potential test plant for cytotoxicity monitoring. *Period. Biol.* 96(4): 490-492.
- Zoldoš, V., S. Šiljak-Yakovlev, V. Besendorfer, D. Papeš, 1997: Raznolikost veličine područja nukleolarnih organizatora (NOR) između jedinki istih vrsta hrasta (*Q. robur* i *Q. petraea*). Zbornik sažetaka priopćenja, šesti kongres biologa Hrvatske, 91. Zagreb.
- Zoldoš, V., T. Littvay, V. Besendorfer, Z. Lorković, D. Papeš, 1995a: Primjena citogenetskih i biokemijskih analiza u utvrđivanju stupnja oštećenja šuma hrasta lužnjaka. *Radovi Šum. Inst. Jastrebov.* 29(1): 151-160.
- Zoldoš, V., D. Papeš, S. Brown, O. Panaud, S. Šiljak-Yakovlev, 1998: Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. *Genome* 41: 162-168.
- Zoldoš, V., S. Šiljak-Yakovlev, D. Papeš, A. Sarr, O. Panaud, 2000: Molekularno kloniranje DNA razlika između dviju vrsta hrasta (*Q. robur* i *Q. suber*) u istraživanju evolucije genoma u roda *Quercus*. Zbornik sažetaka priopćenja sedmog hrvatskog biološkog kongresa, 80-81. Zagreb.
- Zoldoš, V., D. Papeš, M. Cerbah, O. Panaud, V. Besendorfer, S. Šiljak-Yakovlev, 1999: Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoret. Appl. Genet.* 99: 969-977.

SUMMARY: Today, the molecular biology very likely is the biology branch with the fastest development and the highest impact in the research world, and there is not a single field of biological science where at least one of the molecular-biological methods is not used in the research. In its complexity, the present modern world forestry is one of the best examples of the use of various molecular-biological methods in different research works, but in the everyday practice either. The latest achievements in the molecular biology, such as Polymerase Chain Reaction – PCR, made the applicability of these methods to the forestry easier, so now these methods have become an indispensable tool, among other things, in the estimating of genetic variability, breeding programmes and conservation programmes. For these purposes, many methods have been developed such as RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and Microsatellites. As these methods show a certain DNA polymorphism specific for a given property (resistance to some disease, for instance) or for an individual, a population, a subspecies or any superior taxonomic unit, they are usually referred to as DNA markers (RAPD markers, for instance). Until recently, the laboratory research of population genetic variability has been limited by a small variability inside some populations. Today, to estimate the genetic variability, the various DNA markers are used, and their combination enabled to determine the genetic variability in all populations researched so far. This work is an effort to appeal to the forestry institutions which have to support these types of research, so that young research would become trained in such analyses by means of which, with a rather modest resources, considerable results can be obtained. It will do great harm to our forestry if such researches continue to be carried out, as until now, solely by the research workers who not being of the forestry profession are not aware enough of the practical forestry problems.

Key words: molecular-biological methods, forestry, Croatia