

Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

Ćurak, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:611556>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

DIPLOMSKI RAD

Josip Ćurak

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Biljne znanosti

Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

DIPLOMSKI RAD

Josip Ćurak

Mentor:

Prof.dr.sc. Snježana Bolarić

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Josip Ćurak**, JMBAG 0178120272, rođen **19.12.1996.** u Split, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Josip Ćurak**, JMBAG 0178120272, naslova

**Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var.
capitata f. *alba*)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Snježana Bolarić mentor

2. doc. dr. sc. Aleš Vokurka član

3. prof. dr. sc. Ivanka Žutić član

Zahvala

Ovime zahvaljujem na podršci moje obitelji i prijatelja. Zahvalan sam profesorima i kolegama koje sam upoznao baš na Agronomskom fakultetu na diplomskom studiju.

SADRŽAJ

SAŽETAK	1
SUMMARY	2
1. UVOD.....	3
1.1 Cilj rada.....	3
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Sistematika kupusa	4
2.2. Porijeklo i povijest kupusa	4
2.3. Morfološka i biološka svojstva glavatog kupusa.....	5
2.4. Tradicionalni sortiment i bioraznolikost	6
2.5. Genetski markeri.....	10
2.6. Primjena genetskih markera u genotipizaciji glavatog kupusa i srodnih vrsta	13
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Biljni materijal	16
3.1.1. Opis sorata	16
3.1.2. Uzorkovanje i priprema biljnog materijala za izolaciju DNA.....	17
3.1.3. AFLP analiza	19
3.1.4. Statistička analiza podataka.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. Informativnost markera i PIC vrijednosti	25
4.2. Genetska sličnost i UPGMA analiza	26
4.3. Rezultati analize molekularne varijance.....	29
4.4. Udaljenost između sorata (ϕ_{ST}).....	29
5. ZAKLJUČAK.....	31
6. LITERATURA.....	32
ŽIVOTOPIS.....	35

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Josip Ćurak**, naslova

Genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

Tradicionalne sorte glavatog kupusa od velikog su gospodarskog i kulturnog značaja. Analizirane su četiri udomaćene ('Braunschweiger', 'Kopenhaški', 'Ditmar', 'Slava') i pet domaćih sorata ('Čepinski', 'Varaždinski', 'Ogulinski', 'Žminjski', 'Brgujski'). Varijabilnost germplazme je proučavana pomoću AFLP molekularnih markera da bi mogli utvrditi varijabilnost unutar sorata i između 9 sorata. Utvrđivanje varijabilnosti je cilj ovog istraživanja. Kako bi utvrdili varijabilnost koristili smo molekularne rezultate za analizirane sorte, te usporedili i napravili procjenu varijabilnosti na molekularnoj razini. Sjetva sjemena je obavljena početkom listopada 2019., a sjeme je sijano u kontejnere i čuvano u kontroliranim uvjetima. Od 9 proučavanih sorata analizirano je unutar svake sorte po 20 individua, a sveukupno 180 individua (9 sorti x 20 individua). U AFLP analizi su korištene četiri kombinacije početnica. Primarno je bilo potrebno napraviti izolaciju DNA, a kasnije je to pomoglo u analizi genetske strukture za koju su korišteni AFLP markeri. Matrica različitosti korištena je u analizi molekularne varijance (AMOVA), analizi udaljenosti između sorata i u STRUKTURE analizi.

Ključne riječi: *Brassica oleracea* var. *capitata*, genetska varijabilnost, AFLP, AMOVA, STRUCTURE

Summary

Of the master's thesis – student **Josip Ćurak**, entitled

Genetic structure of traditional varieties of head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*)

Traditional varieties of head cabbage are of great economic and cultural importance. Four domesticated varieties ('Braunschweiger', 'Copenhaški', 'Ditmar', 'Slava') and five domestic varieties ('Čepinski', 'Varaždinski', 'Ogulinski', 'Žminjski', 'Brgijski') were analyzed. Germplasm variability was studied using AFLP molecular markers to be able to determine variability within cultivars and between 9 cultivars. Determining variability is the goal of this research. To determine variability, we used molecular results for the analyzed cultivars, and compared and estimated variability at the molecular level. Seeds were sown in early October 2019, and the seeds were sown in containers and stored under controlled conditions. Of the 9 cultivars studied, 20 individuals were analyzed within each cultivar, and a total of 180 individuals (9 cultivars x 20 individuals). AFLP analysis was done using four AFLP primer combinations. Primary DNA isolation was required, and later this helped in the analysis of the genetic structure for which AFLP markers were used. The diversity matrix was used in molecular variance analysis (AMOVA), cultivar distance analysis, and STRUCTURE analysis.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *capitata*, genetic variability, AFLP, AMOVA, STRUCTURE

1. Uvod

Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*) je stranooplodna, diploidna ($2n=18$) i dvogodišnja vrsta. Uzgaja se za kiseljenje ili upotrebu u svježem stanju. Jedna je od najvažniji povrtnih kultura u Republici Hrvatskoj, ali i šire. Po uzgajanim površinama kupus zauzima prvo mjesto od povrtnih kultura u Hrvatskoj (9000 ha). Uzgoj i konzumacija kupusa na našim prostorima imaju dugu tradiciju te su na našim područjima prisutne tradicionalne sorte poput 'Varaždinskog' i 'Ogulinskog'. Tako su i neke strane tradicionalne sorte bile introducirane i dan danas su prisutne u uzgoju kao udomaćene sorte. Važnost tradicionalnih sorata je u njihovoj dobroj prilagođenosti klimatskim i edafskim uvjetima uzgojnog područja, kao i u specifičnim morfološkim i organoleptičkim svojstvima. Upravo zbog toga prisutan je visok stupanj varijabilnosti unutar i između sorata. Prve opise morfoloških i agronomskih svojstava hrvatskih tradicionalnih sorata glavatog kupusa dala je Mikolčević (1959).

Tradicionalne sorte glavatog kupusa nastale su spontano, selekcijom iz ekotipova od strane poljoprivrednika koji su ujedno bili nosioci proizvodnje sjemena i uzgoja istih. Kako bi se proučila genetska struktura tradicionalnih sorata glavatog kupusa od velike pomoći su AFLP molekularni markeri. Molekularni markeri su se pokazali uspješni u genotipizaciji vrsta iz roda *Brassica*, također su se markerima razjasnili odnosi i između vrsta unutar roda. Dobiveni rezultati mogu doprinijeti u razvoju različitih oplemenjivačkih programa na kupusu i očuvanju biljnih genetskih izvora.

U ovom radu istraživano je devet tradicionalnih sorata glavatog kupusa od kojih je pet domaćih, a četiri su udomaćene strane sorte. Molekularni markeri su pomogli proučiti genetsku strukturu tradicionalnih sorata koje se tradicionalno uzgajaju više desetljeća na području Republike Hrvatske.

1.1 Cilj rada

Cilj ovog rada je molekularnim markerima proučiti genetsku strukturu domaćih i udomaćenih stranih tradicionalnih sorata glavatog kupusa.

2. Pregled literature

2.1. Sistematika kupusa

Kupus (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) je dvogodišnja vrsta iz porodice krstašica (*Brassicaceae*). Stranooplodna je vrsta i ima diploidni broj kromosoma ($2n=18$). Unutar porodice *Brassicaceae* definirano je 107 rodova sa ukupno 1208 opisanih vrsta (USDA). Rod *Brassica* sadrži ukupno 31 vrstu od kojih su mnoge važne poljoprivredne kulture, a glavati kupus je jedna od najvažnijih povrtnih kultura u Hrvatskoj, a i u svijetu.

Sistematika kupusa: carstvo (*Plantae*), podcarstvo (*Tracheobionta*), odjeljak (*Spermatophyta*), pododjeljak (*Magnoliophyta*), razred (*Magnoliopsida*), podrazred: (*Capparales*), porodica (*Brassicaceae*)

2.2. Porijeklo i povijest kupusa

Porijeklo kupusa nije u potpunosti poznato. Ako govorimo o porijeklu neke biljne vrste misli se na mjesto na kojem je divlja vrsta evoluirala prije samog udomaćenja ili na mjesto udomaćenja (Ordas i Cartea, 2008). Od zapadne do istočne Europe, te središnjom i istočnom Azijom rasprostranjene su 31 vrsta iz roda *Brassica*. Na određenim izoliranim područjima uz more identificirano je deset divljih vrsta iz roda *Brassica* (Ordas i Cartea, 2008). Dvogodišnji ili višegodišnji divlji tipovi danas se još mogu pronaći na obalama zapadne Francuske, sjeverne Španjolske, te na jugu i jugozapadu Velike Britanije (Ordas i Cartea, 2008). *Brassica sylvestris* Mill. rasprostranjena je u Engleskoj i zapadnoj Francuskoj, *Brassica rupestris* Rafin. na Siciliji, *Brassica cretica* Lam. u Grčkoj i obalama Egejskog mora, a *Brassica robertiana* J. Gay. *Brassica montana* Pour., *Brassica incana* Ten. i *Brassica villosa* Biv. u Španjolskoj i južnoj Francuskoj (Pavlek, 1955). Vrste koje su rasprostranjene na Balkanskom poluotoku su: *Brassica nigra* var. *subglabra*, var. *torulosa*, var. *turgida*, *Brassica oleracea* L., *Brassica incana*, *Brassica napus* var. *oleifera* i var. *napobrassica*, *Brassica campestris*, *Brassica fruticulosa*, *Brassica elongata* i *Brassica armoracioides* (Pavlek, 1955). Uska genetska veza postoji zbog lakšeg križanja svih divljih tipova sa kupusom. Velika rasprostranjenost tih divljih formi u Europi nam daje pretpostavku da se tu nalazi i gencentar. Nije poznato koja divlja vrsta je praroditelj kupusu, ali se može pretpostaviti da je u njegovom nastanku sudjelovalo više vrsta. Od vrste *Brassica oleracea* ljudskom selekcijom je stvoreno nekoliko različitih povrtnih kultura (Ordas i Cartea, 2008). Isti autori navode kako je kod tih kultura selekcija išla u smjeru poboljšanja drugih biljnih organa poput listova uz stabljiku (kelj), listova koji okružuju terminalni pup (kupus), povećanje pazušnog pupa (kelj pupčar), cvata (cvjetača i brokula), odebljale stabljike (korabica). Opće je prihvaćeno da se rana selekcija kupusa dogodila na području Mediterana (Ordas i Cartea, 2008). Međutim, različiti autori tvrde da to nije mjesto njegova nastanka. Kupus je nastao na području Atlantika od divljih *B. oleracea* (Hodgkin, 1995, prema Ordas i Cartea, 2008). Tu teoriju

potvrdili su Mei i sur. (2010) korištenjem AFLP i SSR genetskih markera. Međutim, postoji mišljenje da su sve krstašice porijeklom s Mediterana gdje su diferencirale mutacijama i introgresijom (Swarup i Brahmi, 2005 prema Ordas i Cartea, 2008).

Kupus je jedna od najstarijih povrtnih kultura, te nije poznato kada se prvi puta krenulo s njegovim uzgojem. Upotrebljavao se još prije nastanka grčke i rimske civilizacije, a za Grke je bio ljekovita kultura. Teofrast (372.-287. pr.n.e.) spominje tri forme kupusa koje su Grci nazivali Krambe (Hodgkin, 1995, prema Ordas i Cartea, 2008). Kupus je za Rimljane bio važna hrana i cijenili su ga više nego Grci. Katon 200. godine pr.n.e. također spominje tri tipa kupusa, a Plinije 27.-23. godine spominje šest vrsta krstašica za koje se prema opisu može reći da su kupus, korabica i brokula (Ordas i Cartea, 2008). 301. godine Dioklecijan je izdao zakon u kojem je odredio cijenu ranog i kasnog kupusa (De Candolle, 1884, prema Mikolčević, 1959). U Zapadnoj Europi kupus se pojavljuje u 8. i 9. stoljeću o čemu postoje i pisani zapisi, a o glavatom kupusu postoje zapisi iz 12. stoljeća (De candolle, 1884, prema Pavlek, 1955). Francuzi su poznavali dvije sorte bijelog kupusa: 'Chou Quintal' i 'Saint Denis', a Francuski pjesnici u pjesmama „Cris de Paris“ u 13. stoljeću govore o tome kako se kupus prodavao na ulicama Pariza (Gibault, 1912, prema Mikolčević, 1959). U 16. stoljeću se pojavljuje glavati kupus sa velikom produženom rastresitom glavicom (Sinskaja 1927, prema Mikolčević, 1959). Nadalje, Mikolčević (1959) navodi da su botaničari Fuchius (1542) i Gesner (1561) opisali bijeli, a Jesner (1561) i Lubelius (1576) crveni glavati kupus. Kako su prve sorte nastale nije u potpunosti poznato. Zapisano je da je Sluis en Grouet (1869) bio prvi proizvođač sjemena kupusa sorte 'Amager' (Shoemaker, 1947, prema Mikolčević, 1959), a sorta 'Braunschweiger' se uzgaja od 1860. godine (Daskalov, 1941, prema Mikolčević, 1959). Širenju kupusa po cijelom svijetu su najviše doprinijeli pomorci i trgovci, a s prvim doseljenicima kupus se počeo uzgajati i u Americi. U zapisima s cehovskih gozbi postoje mnogi opisi tradicionalnih jela za čije spravljanje je korišten varaždinski kupus, a ista jela se spremaju i do današnjeg dana. Od pamtivijeka varaždinsko područje je poznato po uzgoju, a prvi pisani zapis o uzgoju na području Varaždinske županije je zbirka „Urbarijalni spisi i knjige Varaždinske županije“ iz 1774. godine. Iz navedene knjige očito je da je običaj uzgoja kupusa postojao još od ranije. Varaždinski kupus prvi put se spominje 1878. godine u djelu Povrcarstvo koje je napisao župnik Pajo Kempler, prvoj knjizi o povrcarstvu napisanoj na hrvatskom jeziku (Bogović i sur., 2011). To nije bila sorta varaždinskog kupusa kakvog danas poznajemo nego lokalna populacija crvenog kupusa, koja se prema Mikolčević (1959) uzgajala do 1920. godine u vrtovima za vlastite potrebe.

2.3. Morfološka i biološka svojstva glavatog kupusa

Korijenov sustav glavatog kupusa je razgranat i žiličast, 70 – 80 % korijenovog sustava se nalazi u gornjih 30 cm tla . Kupus ima kratku, debelu mesnatu stabljiku promjera 3 – 5cm. Njezina visina do glavice može biti 5 – 20 cm. Kocen je nastavak stabljike unutar glavice i može biti dug 5 – 15 cm.

Listovi rozete su zelene ili ljubičaste boje, glatki, debeli, gotovo kožasti i s voštanom prevlakom. U početku se nalaze na kratkim peteljka, a kasnije postaju sjedeći. Rozeta lišća kao i korijenov sustav zauzima podjednaku površinu.

Glavica kupusa je hipertrofirani terminalni pup. Glavica nastaje zato što su stariji vanjski listovi manji i žljebičasti, te na taj način prekrivaju mlađe unutarnje listove. Rastom unutarnjih listova glavica postaje sve čvršća. Ukoliko unutarnji listovi nastave rasti glavica puca. Pucanje glavice može uzrokovati i prelazak u generativnu fazu. U tom slučaju se aktiviraju lateralni pupovi i počinje razvoj cvjetnih grana (Lešić i sur., 2002).

Sve vrste roda *Brassica* imaju jednake cvatove, cvjetove, plodove i sjeme. Cvat kupusa je racemoza (grozd). Cvjetna struktura sastoji se od četiri latice, četiri lapa, četiri dugih i dva kratka prašnika i jednim tučkom. Autoinkompatibilnost je prisutna kod kupusa koja je kontrolirana serijom alela na *S*-loku. Kod *Brassica oleracea* autoinkompatibilnost kontrolira 50 – 70 alela.

Plod je komuška dužine do 10 cm. Na rubu placente u dva reda nalaze se sjemenke, a u plodu se može nalaziti 10 – 30 sjemenki. Za početak klijanja sjemena potrebna je minimalna temperatura 1 – 5°C. Optimalna temperatura za nicanje je 20°C i pri njoj kupus nikne za 5 – 6 dana. Optimalna temperatura za vegetativni rast je također 20°C, a pri temperaturama višim od 25°C rast prestaje sve dok ponovo uvjeti ne postanu povoljniji. Optimalne temperature za razvoj glavice su 15 – 18°C. Najniža temperatura na kojoj kupus raste je 1°C i u tom slučaju je rast jako usporen. Kupus relativno dobro podnosi niske temperature. Mlada biljka s nekoliko listova podnosi temperature od -3 do -10°C, što ovisi o tome jesu li niske temperature došle naglo ili postupno (Lešić i sur., 2002.)

2.4. Tradicionalni sortiment i bioraznolikost

Na području Republike Hrvatske nastalo je nekoliko lokalnih populacija kupusa od kojih su najvažnije 'Varaždinski' te 'Ogulinski' kupus, a druge domaće sorte koje se uzgajaju su 'Brgujski', 'Žminski', 'Čepinski' i 'Cerski' kao i udomaćene strane sorte 'Kopenhaški', 'Braunschweiger', 'Slava', 'Futoški' i 'Ditmar'. Mikolčević (1959) je prva osoba koja je opisala biološka svojstva lokalnih populacija kupusa na području Jugoslavije te proučila varijabilnost u važnim agronomskim svojstvima. Također, utvrdila je da postoji nekoliko poveznica između 'Varaždinskog' i 'Ogulinskog', kao prvo navodi da su to vrlo značajne sorte na ovim područjima tijekom Prvog svjetskog rata kada su se uzgajale na velikim površinama zbog velike potražnje. Uspoređujući morfološka svojstva 'Varaždinskog' i 'Ogulinskog' kupusa postoje sličnosti između pojedinih svojstava kao što su izgled rozete, položaj i oblik listova, te veličina glavice (Mikolčević, 1959). Tradicija uzgoja lokalnih populacija diljem Hrvatske razvijena je radi konzerviranja/kiseljenja. Mikroklima proizvodnog područja ima značajnu ulogu u odabiru odgovarajuće sorte, a najbolje to potvrđuju lokalne populacije kao što su 'Varaždinski' i 'Ogulinski' kao i druge stranooplodne populacije kupusa nastale na području Republike Hrvatske. Također lokalne populacije su bolje prilagođene klimatskim uvjetima tog područja, te imaju bolju otpornost.

Bolarić i sur., (2013) korištenjem AFLP molekularnih markera utvrdili su genetsku varijabilnost između i unutar populacija kupusa. Na razini DNA najmanje variranje između individua utvrđeno je kod 'Varaždinskog' kupusa. Međupopulacijska udaljenost bila je najmanja između 'Varaždinskog' i 'Ogulinskog' (21 %), također između istih sorata utvrđena je i najveća sličnost ($S_D=0,78$). To istraživanje pokazalo je jasno grupiranje lokalnih populacija kupusa, a *Bootstrap*-analizom potvrđena je pouzdanost grupiranja istih. Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđena je značajna razlika između lokalnih populacija. Veća fenotipska varijanca utvrđena je između populacija (62,78 %), a manja unutar populacija (Bolarić i sur., 2013). Vrste sa mehanizmom autoinkompatibilnosti su vrlo heterozigotne i heterogene, te je kod takvih vrsta za očekivati veći udio fenotipske varijance unutar populacija. To nije bio slučaj u istraživanju Bolarić i sur. (2013) što se protumačilo činjenicom da je tijekom stoljeća lokalno stanovništvo provodilo selekciju kupusa isključivo na malom broju svojstava (oblik i veličina). Tradicija uzgoja kod lokalnog stanovništva zbog konzumacije kupusa pridonijela je razvoju lokalnih populacija kupusa (Kereković, 2011). To je bio razlog zbog kojeg je s vremenom došlo do suženja genetske varijabilnosti unutar i povećanja između lokalnih populacija kupusa.

'Varaždinski kupus' (Slika 2.1.) je od pamtivijeka „čuvana sorta“, a upisan je na sortnu listu Republike Hrvatske 2007. godine. On je kasna sorta, sadi se početkom ljeta, ali može se saditi i kao rani kupus, samo će u tom slučaju dati manje prinose. Specifičnih je morfoloških i organoleptičkih svojstava. Glavica mu je plosnato-okruglog oblika. Čvrsta nervatura ovu sortu čini pogodnom za kiseljenje jer ne dolazi do raspadanja listova. Mikolčević (1959) je u svojim pokusima otkrila da je 3 % biljaka slatkog okusa. Randman čistog kupusa od merkantilne robe iznosi 77,7 %. Otpadak listova iznosi 12,8 %, a udio kocena u glavici je u prosjeku 9,5 %. Randman kiselog kupusa od merkantilne robe iznosi 54,4 %, a očišćenog ribanca 70 % (Mikolčević, 1959).



Slika 2.1. 'Varaždinski' kupus (Glavica)

Preuzeto sa web stranice gospodarski list <https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/kupus-proizvodnja-i-prerada/> - pristup 6.11.2020.

Prema Mikolčević (1959) proizvođači 'Ogulinskog' kupusa kažu da se prije uzgajao na većim površinama jer se proizvodio za vojne garnizone za prehranu, te mnogo plasirao u Rijeci. U XVIII stoljeću trgovci spominju ovu sortu, a to je i jedna od najstarijih sorti koja se spominje u trgovini 1885. godine (Shoemaker). Prema starijim proizvođačima izgled se nije promijenio, a također pamte samo uzgoj zelenog kupusa u ovoj populaciji. Sličnost bioloških svojstava ove populacije može se usporediti sa sortom 'Amager', te je za pretpostaviti da bi to mogao biti izvorni oblik. Između 'Ogulinskog' i sorte 'Amager' postoje sličnosti u obliku, boji i nervaturi listova, obliku glavice i veličini kocena u glavici. Obzirom da se populacija 'Ogulinskog kupusa' formirala u skromnijim uvjetima na skeletoidnim i siromašnim tlima, produktivna sposobnost je postala manja u odnosu na sortu 'Amager'. Karakteristika ove sorte je da ima male glavice (Mikolčević 1959). Odluka komisije (EU) 2015/1413 o upisu „Ogulinskog kiselog kupusa“/„Ogulinsko kiselo zelje“, je objavljena u Službenom listu EU L220 21. Kolovoza 2015. (Ministarstvo poljoprivrede, 2015). 1973. Prvi put se počeo pakirati kiseli kupus sa područja Ogulinskog polja (Slika 2.2.), te se proizvod na tržište plasira pod nazivom „Ogulinski kupus“. S obzirom da u drukčijim agroekološkim uvjetima sorta 'Ogulinski' nije davala zadovoljavajuće prinose i kvalitetu kao na Ogulinskom polju to je na

tom području očuvalo tradiciju uzgoja. Tradiciju uzgoja se očuvala zahvaljujući 70-tak proizvođača vrlo kvalitetnog sjemena sorte kupusa 'Ogulinski' (Kosanić, 2008).



Slika 2.2. Polje 'Ogulinskog' kupusa u Ogulinu

Slika je preuzeta sa web stranice <https://www.savjetodavna.hr/2015/09/02/OGULINSKI-KISELI-KUPUS-DOBIO-OZNAKU-IZVORNOSTI-OD-EU/> - pristup 6.11.2020.

Selo Čepin je poznato po uzgoju kupusa još od davnina i s kupusom te sorte opskrbljivalo je osječko područje. Naziv 'Čepinski' (Slika 2.3.) je dobio po mjestu proizvodnje. Pretežno prevladava uzgoj bijelih formi, ali se uzgajao i 'Čepinski' plavi kupus i neke miješane forme. 'Čepinski' plavi kupus se može smatrati kao stara prvotna forma kupusa, dok je 'Čepinski' bijeli kupus mlađa populacija koja se više proširila. 'Čepinski' bijeli kupus je populacija koja se formirala od prvotnih plavih formi, 'Futoškog' kupusa i sorti iz zapadno-europske grupe ('Slava' i 'Kopenhaški'). U usporedbi s populacijama istočnih predjela Slavonije, ovaj kupus ima veliko lišće na kratkim peteljka, tamnije zelene boje i plojku manje lomljivu zbog razvijene nervature. Ovo su karakteristična svojstva sorti zapadno-europske grupe (nelomljivo čvrsto lišće bez peteljke, tamnije zelene boje) (Mikolčević, 1959). Kako tvrdi više izvora, 2014. godine osnovana je udruga „Čepinski kupus“ koja za cilj ima očuvati tradiciju uzgoja 'Čepinskog' kupusa, te stvoriti certificirano sjeme.



Slika 2.3. Čepinski kupus (glavica)

Slika preuzeta sa web stranice <https://narod.hr/gospodarstvo/udruga-cepinski-kupus-zeli-zastiti-nadaleko-poznatu-sortu-13.11.2020>. - pristup 13.11.2020.

2.5. Genetski markeri

Tradicionalne sorte ili lokalne populacije su populacije poljoprivrednog bilja koje se godinama uzgajaju na određenom geografskom području, a nastale su prirodnom selekcijom i selekcijom od strane samih proizvođača. Za razliku od modernih sorti koje su vrlo ujednačene (uniformne) i niske genetske varijabilnosti, tradicionalne sorte su adaptirane na lokalne klimatske i edafske uvjete kao i na lokalnu agrotehniku. Tradicionalne sorte su široke genetske varijabilnosti. Tradicionalnim sortama prijete opasnost izumiranja i gubitka poželjnih alela zbog sve bržeg širenja moderne poljoprivrede. Ugroženost je jedan od razloga sve češćih istraživanja genetske strukture, te očuvanja biljnih genetskih izvora. U tome su nam od velike pomoći genetski markeri. Gubitak genetske raznolikosti nazivamo genetska erozija, u užem smislu to označava gubitak pojedinih alela, a u širem gubitak alelnih kombinacija ili čak čitavih vrsta. Glavni uzrok genetske erozije je zamjena lokalnih populacija modernim visokoprinosnim kultivarima ili egzotičnim vrstama. Genetska ranjivost je opasnost od znatnog smanjenja prinosa uslijed određene epidemije bolesti, te je zbog toga potrebno očuvati poljoprivrednu bioraznolikost koja je važna za sigurnost globalne proizvodnje hrane. Jedan od glavnih razloga zašto je potrebno očuvati lokalne populacije je taj što nose genetsku raznolikost u kojoj možemo pronaći vrlo važne pojedine alele koji nose neka važna svojstva, kao što su otpornost na sušu, bolesti i druga svojstva koja u jednom trenutku mogu postati poželjna (FAO, 2011).

Genetski marker (genetski biljeg, genetic marker) je bilo koji ulomak DNA koji pokazuje neki oblik primjetnog polimorfizma između analiziranih jedinki. Koriste se morfološki i molekularni markeri. Nisu nužno geni u strogom smislu, ali tijekom analize se mogu smatrati jer se nasljeđuju prema istim načelima. Iz toga razloga različiti oblici markera nazivaju se alelima, a mjesto markera na kromosomu lokusom. Kombinacija alela markera analizirane jedinice nazivamo fenotipom odnosno genotipom markera. Idealan sustav markera tijekom rasta i razvoja biljke, prisutnost određenog alela marker ne bi trebao utjecati na normalan rast i razvoj biljke i da je bez interakcije između markera odnosno da je penetracija potpuna, a ekspresija stabilna. U konkretnom sustavu genskih markera u praksi se traži pouzdanost (ponovljivost) i univerzalnost, visoka razina uočenog polimorfizma između analiziranih jedinki kao i postojanje veze između biljega i gena za svojstvo koje nas zanima. Genetski markeri imaju široku primjenu u biljnim istraživanjima i oplemenjivanju, a naročito se koriste DNA markeri (Šatović, 1999).

Morfološki markeri su bili prvi korišteni i bila su to lako uočljiva svojstva monogenskog tipa nasljeđivanja. Obično se tu radi o morfološkim mutacijama koje se u prirodi događaju slučajno ili su inducirane mutagenom. Morfološke markere možemo nazvati i fenotipskim markerima iz razloga što funkcionalni geni mogu uzrokovati jasne fenotipske razlike između jedinki. Prije su morfološki markeri bili korišteni u mnogobrojnim genetskim istraživanjima kao i u oplemenjivanju bilja i sjemenarstvu. Glavne karakteristike morfoloških markera su sljedeće: lako se uočavaju, ali često na razini cijele biljke, a u mnogim slučajevima samo u određenim stadijima, pokazuju tipično mendelsko razdvajanje, utječu na morfologiju i fiziologiju biljke što je u mnogim slučajevima u suprotnosti s ciljevima oplemenjivanja, pojava epistatičkih interakcija koje kompliciraju analizu, nepotpuna penetracija ili nestalna ekspresija i dosta drugih ograničenja koji otežavaju analizu. Uz sva ograničenja morfološki markeri se koriste u opisu svojstava primki banaka gena u svrhu njihovog razlikovanja i klasificiranja, te različite liste deskriptora se uglavnom sastoje od markera u uočavanju lokusa za kvantitativna svojstva. Danas su morfološki markeri u analizi lokusa za kvantitativna svojstva u potpunosti zamijenjeni molekularnim markerima (Šatović, 1999).

Molekularne markere dijelimo na izoenzimske i DNA biljege. Izoenzimi se definiraju kao različiti molekularni oblici istog enzima koji djeluje na isti supstrat, ali se razlikuje po električnom naboju.

Uz pojedine probleme izoenzimi se vrlo često koriste kao genetski markeri. Izoenzimi kao genetski markeri imaju sljedeća svojstva: (1) Polimorfizam se može analizirati na različitim biljnim organima, ali elektroforetički naboj nije uvijek istovijetan; (2) Pokazuju tipično Mendelovo razdvajanje i u većini slučajeva su kodominantni; (3) Ne utječu na morfologiju i fiziologiju biljke, ne ulaze u epistatičke interakcije s drugim markerima, a okoliš ne utječe na njihovu ekspresiju; (4) Metode bojanja su specifične za određeni enzim; (5) Kao i kod morfoloških markera broj izoenzimskih markera koje je moguće otkriti u biljnom materijalu je u većini slučajeva prenizak za izradu genske karte (Weeden i Wendel, 1989).

DNA markeri otkrivaju genetsku varijabilnost izravno na razini DNA. Razvoj i sve veća upotreba DNA markera temelji se na vrlo značajnim otkrićima molekularne genetike kao što su restrikcijski enzimi, lančana reakcija polimerazom i mikrosateliti. Tvorba lakouočljivih, jeftinih i ponovljivih markera je cilj velikog broja različitih tehnika molekularne genetike. Tehnike se dijele u četiri različite skupine:

Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*Restriction fragment length polymorphism – RFLP*) je tehnika koja se temelji na otkriću restrikcijskih enzima endonukleaza. Glavna svojstva RFLP markera su sljedeća: (1) Mogu se uočiti na uzorku DNA bilo kojeg tkiva i u bilo kojem razvojnom stadiju biljke; (2) Potrebna je relativno velika količina DNA (5 - 6 μ g) visoke kakvoće; (3) Pokazuju kodominantno nasljeđivanje; (4) Digestijom genomske DNA eukariota restrikcijskim enzimima se može dobiti 10⁶ ulomaka, a do sad je opisano preko 100 restrikcijskih enzima što nam govori da je potencijalan broj RFLP markera određene biljne vrste praktično beskonačan; (5) Vrlo su pouzdani sa čak 100% ponovljivosti; (6) Ako ne postoje opisane sonde za određenu biljnu vrstu nove se sonde moraju izolirati iz DNA kolekcija što iziskuje stručnost i troškove; (7) RFLP markeri iziskuju mnogo vremena jer je teško automatizirati postupak, a troškovi istraživanja su visoki; (8) Problem je i radioaktivnost ukoliko se koriste radioaktivno ozračene sonde (Šatović, 1999).

Slučajno amplificirana polimorfna DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*) je tehnika koja se razvila nakon otkrića lančane reakcije polimerazom (*Polymerase Chain reaction – PCR*), a temelji se na uporabi početnica (klica; primer). RAPD biljezi su dostupniji oplemenjivačima i sjemenarima jer imaju dosta prednosti u odnosu na RFLP markere, kao što su: (1) Manji uzorak DNA (10 – 40ng) nego kod RFLP (5 – 10 μ g); (2) Sonde koje se koriste kod RFLP su specifične ovisno o vrsti dok su početnice slučajne sekvence i mogu se koristiti u svim vrstama; (3) Proces je jednostavniji i brži; (4) Oprema jeftinija; (5) Sigurniji jer se ne koristi radioaktivnost kao kod nekih RFLP metoda; (6) RAPD su često vrlo polimorfni i broj koji se može uočiti je praktično beskonačan (Helentjaris, 1989 prema Šatović, 1999). Također postoji niz metoda koje se temelje na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) koje su vrlo srodne RAPD sustavu genskih markera, a najkorišteniji su SCAR, ASAP, SPAR i CAPS.

Ponavljajuće jednostavne sekvence (*Simple Sequence repeats – SSR*) je tehnika koja se temelji na činjenici da se ponavljajuće sekvence DNA različitih dužina nalaze u genomu svih organizama. Polimorfizam ovisi o dužini ponavljajućih sekvenci. Potrebno je poznavanje sekvence koja omeđuje ponavljajuću regiju zbog kreiranja početnica koje sudjeluju u lančanoj reakciji polimerazom. SSR tehnika je ponovljiva i pouzdana, a razina polimorfizma koju je moguće otkriti vrlo visoka. Temelji se na polimorfizmu dužine amplificiranog ulomka ili na broju ponavljajućih sekvenci u amplificiranom ulomku, a koristi se kao kodominantni marker. Količina DNA koja je potrebna se kreće između 50 – 100ng. Da bi znali nukleotidnu sekvencu na krajevima ponavljajuće regije potrebna je znatnija oprema i stručnost. Kada su sekvence poznate one se objavljuju u znanstvenim časopisima tako da ih je moguće koristiti u daljnjim istraživanjima, ali su u većini slučajeva korisne samo za određenu biljnu vrstu ili srodne vrste (Šatović, 1999).

Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (Amplified fragment length polymorphism – AFLP) je tehnika tvorbe genetskih markera koja se temelji na kombinaciji RFLP i RAPD tehnike. Postupak selektivne PCR amplifikacije restrikcijskih ulomaka nastalih digestijom genomske DNA uključuje tri faze: (1) Restrikcija DNA endonukleazama i spajanje (ligacija) oligonukleotidnih adaptera; (2) Selektivna amplifikacija restrikcijskih ulomaka; (3) Elektroforeza amplificiranih ulomaka. Digestija se odvija obično s dva enzima, to su rijetki rezač (rare cutter – restrikcijski enzim čija se mjesta rijetko javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje manji broj ulomaka veće molekularne mase – npr. Eco RI) i česti rezač (fragment cutter – restrikcijski enzim čija se mjesta restrikcije često javljaju u genomu tako da restrikcijom nastaje veći broj ulomaka manje molekularne mase – npr. Mse I). Primjenom enzima ligaze na krajeve restrikcijskih ulomaka se spajaju adapteri (ulomci DNA dužine oko 15 bp poznate sekvence), a oni su potrebni jer su mjesta restrikcije na krajevima prekratki za izradu početnica. Sekvenca početnica se sastoji od sekvence mjesta restrikcije i sekvence adaptera, ali dolazi do javljanja previše amplificiranih ulomaka. Zbog neselektivnosti na krajeve početnica se dodaje proizvoljno 1 – 4 nukleotida, te će u ovom slučaju amplificirati samo oni ulomci koji su komplementarni ne samo u adektoru već i u jednom do četiri dodana nukleotida. Amplificirani ulomci se mogu učiniti vidljivim bojenjem srebrom, fluorescentnim bojenjem ili uporabom radioaktivnih sonda (Vos i sur., 1995, Paterson, 1996, prema Šatović, 1999). AFLP tehnika je tehnički kompliciranija od RAPD metode, ali je pouzdanija. Prednost AFLP markera je što zahtjeva manje rada nego kod RFLP markera. Za razliku od SSR markera kod AFLP markera nije potrebno poznavati specifične sekvence za dizajniranje početnica. AFLP markeri su dominantni, ali se to kompenzira većom razinom polimorfizma (Šatović, 1999).

2.6. Primjena genetskih markera u genotipizaciji glavatog kupusa i srodnih vrsta

Primjena genetskih markera može biti različita, a istraživanja uz primjenu markera mogu biti proučavanje genetske raznolikosti, te genetsko-oplemenjivačka istraživanja u najširem smislu te riječi. Genetski markeri pri proučavanju genetske raznolikosti se koriste za očuvanje i uporabu biljnih genetskih izvora, u sistematici i populacijskoj genetici, identifikaciji roditelja za buduća križanja i u identifikaciji čistih linija i kultivara (Šatović, 1999).

Kresovich i sur. (1992) pomoću RAPD markera koji su bili korisni u istraživanju genetskih profila i odnosa 22 sorte različitih varijeteta *Brassica oleracea* L. i dvije sorte *Brassica rapa* L. Oni su dobili preko 140 različitih DNA fragmenata i svaka sorta je imala jedinstveni genetski profil. Analizom sličnosti dobiven je uvid u genetske odnose sorata. Zaključak istraživanja je da RAPD markeri daju detaljne informacije slične operativno težim, dugotrajnim i skupim RFLP markerima. Također RAPD markeri mogu poslužiti u diskriminaciji usko povezanih vrsta.

Lazaro i Aguinalalde (1998) su pomoću RAPD markera istraživali genetsku raznolikost 29 divljih i dvije kultivirane forme *Brassica oleracea* L. Ovim istraživanjem su se usporedili

rezultati dobiveni korištenjem RAPD sustava markera s prethodno dobivenim rezultatima izoenzimskih markera. RAPD sustavom markera detektiran je 151 jedinstveni DNA fragment. Zaključilo se da su DNA markeri zahvaljujući visokom stupnju polimorfizma superiorniji nad izoenzimskim markerima.

Leroy i sur. (2000) su karakterizirali *Brassica oleracea* uz pomoć ISSR (eng *Inter Simple Sequence Repeat*) markera. ISSR metodom pomoću četiri primera dobivena su 136 DNA fragmenta od čega ih je 27 bilo jedinstvenih, a 84 filogenetski informativnih, te je svaka sorta imala jedinstveni genetski profil. Zaključilo se da su ISSR markeri pokazali veliku vrijednost u utvrđivanju sličnosti između sorti kao i u upravljanju bankama biljnih gena. ISSR markeri se mogu primijeniti na sve stranooplodne usjeve kao i na *Brassica oleracea*.

Louran i sur. (2006) su koristili mikrosatelitne markere (SSR) za diferencijaciju 59 kultivara 5 botaničkih varijeteta *Brassica oleracea*. Ovaj pristup značajno smanjuje vrijeme i troškove kod primjene mikrosatelitnih primera. Ukupno se dobilo 47 fragmenata, a kod 51 kultivara je došlo do diferencija. Preostalih 8 je diferenciralo u 4 nerazdvojiva para. Neki parovi kultivara koji nisu diferencirali su bili iste sjemenske kuće što ukazuje na njihovu visoku srodnost. Zaključilo se kako bi vrlo vjerojatno i preostalih 8 kultivara diferenciralo da su korišteni markeri za specifičnu botaničku vrstu.

Hintum i sur. (2007) su istraživali utjecaj regeneracije kolekcije od 10000 uzoraka *Brassica oleracea* L. iz banke biljnih gena na genetsku raznolikost, ali su istraživali i prije regeneracije genetsku raznolikost. Tijekom regeneracije tolikog broja uzoraka logično je da može doći do većih promjena zbog različitih čimbenika koji mogu utjecati kao i do pojave duplikata. Koristili su AFLP genetske markere koji su pomogli u određivanju genetskih promjena nakon regeneracije u odnosu na raznolikost u kolekciji. Regeneracija *Brassica oleracea* L. nije jednostavna jer u najboljem slučaju će nastati samo male promjene, ali ponekad i one postanu značajne. Promjene nakon regeneracije teško su bile značajne na razini populacije, ali na alelnoj razini su se javljale vrlo jasne promjene.

Mei i sur. (2010) koristili su kombinaciju AFLP i SSR markera za istraživanje podrijetla kultiviranih formi *Brassica oleracea* L. 39 primki koje su se sastojale od 10 divljih i 7 kultiviranih formi bilo je uključeno u istraživanje. Zaključilo se da je malo vjerojatno da su kultivirane forme *Brassica oleracea* porijeklom sa Sicilije.

Faltusova i sur. (2011) su istraživali genetsku raznolikost 20 sorata bijelog i crvenog kupusa nakon čega je došlo do jasnog razdvajanja prema podrijetlu i formi. Utvrdila se učinkovitost AFLP markera, te je od ukupno 30 korištenih primera 10 ih se pokazalo najinformativnijim i tako prikladnim za slična istraživanja.

Kang i sur. (2011) su istraživali genetsku raznolikost lokalnih populacija iz Kine pomoću AFLP markera. 83 populacije koje su bile uključene u istraživanje bile su porijeklom iz Sjeverne i Južne Kine i Istočne Europe i Zapadne Europe. Analiza je pokazala relativno niski stupanj genetske raznolikosti. Populacije su se grupirale u dvije skupine. Utvrdilo se da su populacija iz Sjeverne Kine i Istočne Europe bili usko povezani, ali udaljeni od populacija Južne Kine koje su bile genetski bliže sortama iz Afrike, Indije, Japana i Koreje. Ovi podatci se

slažu sa povijesnim podacima o porijeklu kupusa u Kini, te visoku genetsku sličnost možemo pripisati aktivnoj razmjeni sjemena.

Kereković (2011) je istraživala molekularnu raznolikost hrvatskih lokalnih populacija kupusa. U istraživanje su bile uključene tri lokalne populacije kupusa iz Hrvatske, a te populacije su 'Varaždinski', 'Ogulinski' i 'Gerovski' i jedna iz Slovenije ('Kranjska okrugla'). Ustanovljeno je najmanje variranje unutar populacije 'Varaždinskog' kupusa, a najveće kod 'Kranjske okrugle'. Najveća međupopulacijska udaljenost utvrđena je između populacija 'Kranjske okrugle' i 'Gerovskog' kupusa, dok je najmanja međupopulacijska udaljenost utvrđena između 'Ogulinskog' i 'Varaždinskog' kupusa.

Šamec i sur. (2013) su istraživali autentičnost sorte 'Varaždinskog' kupusa pomoću RAPD i fitokemijskih markera. Analizirali su kupus dobiven od sjemena tri sjemenara s varaždinskog područja, od dva sjemena iz Slovenije i jednog iz Italije. Istraživači su koristili samo jednu biljku po populaciji, što nije dovoljno za detekciju svih alela u stranooplodnoj populaciji. Istraživači su zaključili da se genotipovi grupiraju u skladu sa svojim eko-geografskim podrijetlom.

El-Esawi i sur. (2016) u Irskoj su istraživali tamo ugroženu vrstu *Brassica oleracea* L., a ujedno je to bilo i prvo genetsko istraživanje o toj vrsti. Cilj je bio procijeniti genetsku raznolikost 25 irskih populacija korištenjem AFLP metode. Analiza je pokazala usku povezanost između cvjetače i kupusa za razliku od kelja. Genetska varijacija između populacija je iznosila 33,7 %, a unutar populacija 66,3 %. Istraživanje je omogućilo uključivanje 4 populacije Kupusa i kelja u buduće uzgojne programe za poboljšanje sorti, a AFLP markeri su se i u ovom istraživanju pokazali učinkoviti za procjenu genetske raznolikosti.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal

U istraživanju je proučavano devet tradicionalnih sorata bijelog glavatog kupusa od kojih su četiri strane tradicionalne sorte koje su kod nas udomaćene ('Braunschweiger', 'Ditmar', 'Slava' i 'Kopenhaški') i pet su hrvatske tradicionalne sorte ('Varaždinski', 'Ogulinski', 'Čepinski', 'Brgujski' i 'Žminjski')

3.1.1. Opis sorata

Sorta 'Braunschweiger' (Braunšvajski) je njemačka kasna visoko rodna sorta namijenjena za rezanje. Tvori vrlo velike, čvrste i plosnate do okrugle glavice s kratkim kocenom te nježnom strukturom listova. Težina glavice u prosjeku varira od 2 do 3 kg. Namijenjena je za kiseljenje i za svježnu upotrebu. Moguće je kratkotrajno skladištenje u svježem stanju

(https://www.reinsaat.at/shop/EN/brassica/white_cabbage/brunswijker_braunschweiger/).

Sorta 'Ditmar' je rana sorta porijeklom iz Njemačke, čije su glave male i zbijene, a unutarnji listovi su etiolirani i žuto-zelene boje. Duljina vegetacijskog perioda je u prosjeku od 80 do 115 dana (Pavlek, 1955). Glava je okruglo-ovalnog oblika (Červenski i sur. 2003), prosječne težine oko 1,5 kg. Sorta je bijele boje, slatkasto do blago ljutog ukusa. Glave su sklone pucanju (<https://www.seeds-gallery.shop/en/home/ditmar-cabbage-seeds.html>).

Sorta 'Slava' ima okruglu do blago plosnatu glavicu promjera oko 25 cm. Prosječna težina glavice se kreće između 2 i 5 kg. Listovi su blijedozelene boje, slatkog okusa i vrlo sočni, a lisna rozeta je malo uzdignuta sa srednje velikim kocenom. Namijenjena je za svježnu upotrebu i za kiseljenje. (<https://burea-uinsurance.com/en/description-of-cabbage-glory/>).

Sorta 'Kopenhaški' je rana sorta porijeklom iz Danske. Ima okruglu zbijenu glavu s malim kocenom i malim brojem ovojnih listova. Listovi su svjetlo zelene boje sa izraženim maškom (Mikolčević, 1959). Prema Pavlek (1955) listovi imaju nježnu i mnogobrojnu nervaturu, a prosječna težina glave iznosi 1,14 kg (Pavlek, 1955).

Sorta 'Varaždinski' je kasna sorta, a sadi se početkom ljeta. Glavica mu je plosnato-okruglog oblika u gornjem dijelu zbijena, a u donjem ovisno o uvjetima uzgoja ponekad rahla. Prosječna težina glavice je između 1 i 3 kg. Listovi su svijetlozelene boje sa izraženom nervaturom, a unutarnji listovi su žutozelene do bijele boje. Razvoj glavice traje od 105 – 120 dana. Dobro podnosi transport i skladištenje. Zbog čvrstog i žilavog lišća, te kiselog okusa manje je prikladan za primjenu u svježem stanju, a čvrsta nervatura ovu sortu čini pogodnom za kiseljenje (Mikolčević, 1959).

Sortu 'Ogulinski' karakterizira mala veličina glavice sa prosječnom težinom oko 1,1 kg. Glavica je okruglog oblika. Boja listova vanjskog dijela glavice je svijetlo zelena, a prema središtu glavice žuto-zelena do blijeda. Sazrijevanje glavice obično traje od 80 do 130 dana ovisno o uvjetima uzgoja. Slabo je otporan na sušu i srednje otporan protiv bolesti. Dobro podnosi transport kao i skladištenje. Namijenjen je za kiseljenje (Mikolčević, 1959).

Glavica sorte 'Čepinski' je srednje krupna i okrugla sa prosječnom težinom oko 1,5 kg. Listovi su veliki, svijetlo-zelene boje sa srednje izraženom nervaturom. Glavica se razvije u prosjeku za 106 do 112 dana nakon sadnje. Srednje je otporna sorta na bolesti i otporna na sušu. Srednje je izdržljiv tijekom transporta i skladištenja (Mikolčević, 1959).

Sorta 'Brgijski' je tradicionalna sorta poznata na području Liburnije i Kastavštine. Pretpostavlja se da potječe iz mjesta Veli i Mali Brgud u općini Matulji. Glava je obrnuto eliptičnog oblika srednje čvrstoće s ljubičastim obojenjem srednjeg intenziteta. Prosječna težina glave iznosi 1,9 kg. Namijenjena je za kiseljenje i za korištenje u svježem stanju. (Bažon i sur.,2019)

Opis istarske tradicionalne sorte 'Žminjski' još nije javno dostupan. Poznato je samo da je namijenjen za svježju upotrebu.

3.1.2. Uzorkovanje i priprema biljnog materijala za izolaciju DNA

U tablici 3.1. navedene su tradicionalne sorte kupusa i informacije o porijeklu sjemena iz kojih su uzgojene biljčice za DNA analizu.

Tablica 3.1. Tradicionalne sorte bijelog glavatog kupusa i porijeklo sjemena

Naziv sorte	Skraćeni naziv sorte	Broj primke/Sjemenarska kuća
'Braunschweiger'	Bra	Sementi Doto, 2019
'Ditmar'	Dit	Semenarna, 2011
'Slava'	Sla	Royal Seeds, 2019
'Kopenhaški'	Kop	Sementi Doto, 2019
'Varaždinski'	Var	NBBG*, VEG00001
'Ogulinski'	Og	NBBG, VEG00011
'Čepinski'	Čep	NBBG, VEG00092
'Brgijski'	Brg	NBBG, VEG00031
'Žminjski'	Žm	Institut za poljoprivredu i turizam Poreč

*NBBG – Nacionalna banka biljnih gena

Sjeme kupusa posijano je u supstrat TraySubstrate (Klasmann-Deilmann GmbH) u plitice i stavljeno u komoru rasta. Svaka sorta zastupljena je sa 20 individua. Uzorci listova za DNA analizu uzeti su zasebno sa 20 individua po sorti od svake individue zasebno u fazi tri do četiri razvijena prava lista, stavljeni su na sušenje u silica gel u PVC vrećice sa zip zatvaračem i pohranjeni su u hladnjak na +4°C. Osušeni listovi izmrvljeni su u fini prah, zasebno za svaku individuu, pomoću oscilatornog mlina *Mixer Mill MM 400* (Retsch).

Izolacija DNA izvedena je pomoću komercijalnog kompleta (kita) za izolaciju DNA (GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit; Sigma-Aldrich) prema sljedećim uputama proizvođača priloženim uz kit:

U tubice volumena 2 ml odvagano je po 30 mg osušenog i fino samljevenog biljnog materijala, dodano je 350 µl otopine "*Lysis solution (Part A)*" i 50 µl otopine "*Lysis Solution (Part B)*" te je sve dobro promiješano pomoću laboratorijske tresilice (*vortex*) i potom inkubirano na 65°C 10 minuta. U smjesu je dodano 130 µl otopine "*Precipitation Solution*", te je sve zajedno dobro pomiješano okretanjem ruke i stavljeno na led 5 minuta. Nakon toga je smjesa centrifugirana 5 minuta na brzini od 12000 rpm. Prilikom centrifugiranja dolazi do razdvajanja krute i tekuće faze. Tekuća faza je pažljivo uzeta pomoću mikropipete i pipetirana je u plavu filter-kolonu ("*GenElute Filtration Column*") koja je smještena u sakupljačku tubicu volumena 2 ml i centrifugirana 1 minutu na 12000 rpm. Nakon centrifugiranja, kada je tekući dio prošao kroz filter u sakupljačku tubicu, plavi dio kolone je bačen, a u sakupljačku tubicu u tekući dio je dodano 700 µl otopine "*Binding Solution*" te je sve zajedno vrlo lagano promiješano inverznim okretanjem ruke. Potom je dobro promiješana smjesa oprezno pipetirana u crvenu filter-kolonu ("*GenElute MiniPrep Binding*") koja je prethodno smještena u sakupljačku tubicu volumena 2 ml i sve je centrifugirano 1 minutu na 12000 rpm. Zatim je filtrirana otopina uklonjena iz sakupljačke tubice i pažljivo je pipetirana preostala količina smjese u crvenu filter-kolonu i ponovno centrifugirana 1 minutu na 12000 rpm. Nakon centrifugiranja crvena kolona je premještena u novu sakupljačku tubicu volumena 2 ml i u nju je pipetirano 500 µl otopine "*Wash Solution*" i centrifugirana je 1 minutu na 12000 rpm. Filtrirana otopina je uklonjena i u crvenu kolonu je pipetirano novih 500 µl smjese "*Wash Solution*" i centrifugirana 3 minute na 12000 rpm da se kolona osuši. Potom je crvena kolona, u čijem filteru je zadržana i oprana DNA molekula, premještena u novu tubicu volumena 2 ml. U tu kolonu je potom pipetirano 80 µl "*Elution Solution*", prethodno zagrijanog na 65°C, i centrifugirano je 2 minute na 12000 rpm. Tubica u kojoj je sada izolirana DNA je dobro zatvorena, označena i spremljena na -20°C, te je bila spremna za korištenje u daljnjim analizama.

Kvaliteta izolirane DNA provjerena je u horizontalnoj elektroforezi u 0,8 % agaroznom gelu u 0,5xTBE puferu u koji je dodana boja (Olerup SSP GelRed; Olerup Inc., SAD) za označavanje molekula DNA, radi njihove vizualizacije pod UV svjetlom. DNA u gelu je bila vizualizirana i dokumentirana pomoću sustava za dokumentaciju gela (GelDoc XR, Biorad). Uzorci za elektroforezu pripremljeni su na način da je po svakom uzorku napravljena smjesa volumena 10 µl, koja se sastoji od 2 µl plave boje (5x SGB), 7 µl ultra čiste vode i 1 µl izolirane genomske DNA kupusa. Komponente su dobro izmiješane i pipetirane u jažice

agaroznog gela. Nakon elektroforeze izvedena je vizualizacija DNA u gelu pod UV svjetlom, fotografiranje i analiza pomoću sustava za analizu gela GelDoc XR (Biorad, SAD).

Nakon provjere kvalitete izolirane DNA izmjerena je količina izolirane DNA spektrofotometrom DS-11 FX (DeNovix, SAD). Na temelju dobivenih rezultata o koncentraciji izolirane DNA, za svaku individuu zasebno napravljena je radna koncentracija DNA za daljnju AFLP analizu. Radna koncentracija DNA po uzorku bila je $30 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ u volumenu od $20 \mu\text{l}$.

3.1.3. AFLP analiza

AFLP analiza devet tradicionalnih sorata (20 individua po sorti) glavatog kupusa provedena je prema protokolu Vos i sur. (1995) uz modifikaciju. U AFLP analizi bilo je uključeno 8 ponavljajućih uzoraka i dvije slijepe probe (uzorci bez DNA molekula).

Genomska DNA isječena je pomoću endonukleaza *EcoRI*-HF i *MseI*. Koncentracije reagensa za postupak restrikcije (restrikcijska smjesa) prikazane su u Tablici 3.2.. $17 \mu\text{l}$ genomske DNA koncentracije $30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ pomiješana je sa $3 \mu\text{l}$ restrikcijske smjese. Tako pripremljeni uzorci za restrikciju stavljeni su u vodenu kupelj na sat vremena na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a nakon toga 15 min. na $70 \text{ }^\circ\text{C}$ radi deaktivacije endonukleaza.

Tablica 3.2. Reagensi i konačna koncentracija smjese za restrikciju

Reagens	Konačna koncentracija
Smart Cut pufer (1X; NEB*)	1X
<i>EcoRI</i> -HF endonukleaza ($100 \text{ U}/\mu\text{l}$; NEB)	5U
<i>MseI</i> endonukleaza ($50 \text{ U}/\mu\text{l}$; NEB)	5U

*NEB - New England BioLabs®, SAD

Nakon restrikcije slijedila je ligacija adaptera (*EcoA* i *MseA*; Tablica 3.3.) i na isječene krajeve genomske DNA. Za postupak ligacije pripremljena je smjesa za ligaciju. Koncentracije reagensa za postupak ligacije prikazane su u Tablici 3.4.. U uzorke, nakon restrikcije, dodano je po $15 \mu\text{l}$ smjese za ligaciju, dobro je pomiješano i stavljeno u vodenu kupelj na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od tri sata. Nakon završenog postupka ligacije u svaki uzorak je dodano po $500 \mu\text{l}$ $T_{10}E_{0,1}$ pufera.

Tablica 3.3. Naziv i sekvenca adaptera

Naziv adaptera		Sekvenca adaptera
EcoA:	EcoA1	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
	EcoA2	5' AAT TGG TAC GCA GTC 3'
MseA:	MseA1	5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
	MseA2	5' TAC TCA GGA CTC AT 3'

Tablica 3.4. Reagensi i konačna koncentracija smjese za ligaciju

Reagens	Konačna koncentracija
EcoA adapter (5 μ M; ABI*)	0,33 μ M
MseA adapter (50 μ M; ABI)	3,33 μ M
ATP (100 mM; NEB**)	0,67 mM
T4-pufer (10X; NEB)	1X
T4-ligaza (5 U/ μ l; NEB)	0,033 U

* ABI - Applied Biosystems; SAD; ** NEB - New England BioLabs®, SAD

Nakon ligacije slijedio je postupak predselektivne amplikacije u kojem su bile korištene početnice E01 i M02 sa po jednim selektivnim nukleotidom (Tablica 3.5.).

Tablica 3.5. Naziv i sekvenca početnica za predamplifikaciju

Naziv početnice adaptera	Sekvenca adaptera
E01	5' GAC TGC GTA CCA ATT <u>CA</u> 3'
M02	5' GAT GAG TCC TGA GTA <u>AC</u> 3'

Predselektivna amplifikacija provedena je u volumenu od 20 μ l. Korišteni reagensi i njihova konačna koncentracija u smjesi za predamplifikaciju prikazana je u Tablici 3.6..

Tablica 3.6. Reagensi i konačna koncentracija reagensa u smjesi za predamplifikaciju po uzorku

Reagens	Konačna koncentracija
PCR pufer* (10X)	1X
dNTP (2 mM; SA**)	0,2 mM
početnica E01 (10 μM; ABI***)	0,25 μM
početnica M02 (10 μM; ABI)	0,25 μM
Taq polimeraza (5 U/μl; SA)	0,5 U

* sastav PCR pufera: 20 mM TRIS HCl + 50 mM KCl + 3 mM MgCl₂; ** Sigma-Aldrich, SAD;

*** Applied Biosystems, SAD

Smjesa za predselektivnu amplifikaciju raspodijeljena je po 15 μl u tubice za PCR reakciju i dodano je po 5 μl uzorka DNA nakon postupka restrikcije i ligacije. Potom su uzorci centrifugirani 30 sekundi na 4000 rpm. Predselektivna amplifikacija provedena je pomoću aparata *Thermalcycler Verity (Applied Biosystems, SAD)* prema sljedećem temperaturnom režimu (tablica 3.7.):

Tablica 3.7. Temperaturni režim za predselektivnu amplifikaciju

°C	min	broj ciklusa
72	2:00	1

94	0:20	
56	0:30	20
72	2:00	

60	30:00	1

Nakon provedene predselektivne amplifikacije, 20 μl otopine umnoženih fragmenata DNA se razrijedila sa 500 μl T₁₀E_{0.1} pufera (tj. u omjeru 1:25). Zatim je slijedio postupak selektivne amplifikacija.

Za selektivnu amplifikaciju korištene su četiri kombinacije početnica čiji su komercijalni nazivi i sekvence prikazane u tablici 3.8..

Tablica 3.8. Kombinacije i sekvence početnica korištenih u selektivnoj amplifikaciji

Sekvenca početnica 5' → 3'	Fluorescentna boja
E*+AAG/M**+CAG	6FAM
E+AAG/M+CAT	6FAM
E+ACC/M+CAC	VIC
E+AGA/M+CAT	VIC

* E- sekvenca adaptera: 5' GAC TGC GTA CCA ATT C 3'

** M- sekvenca adaptera: 5' GAT GAG TCC TGA GTA A 3'

Selektivna amplifikacija provedena je u volumenu od 20 µl po uzorku. U Tablici 3.9. prikazan je sastav PCR-a za selektivnu amplifikaciju.

Tablica 3.9. Reagensi i konačna koncentracija reagensa u smjesi za selektivnu amplifikaciju po uzorku

Reagens	Konačna koncentracija
PCR pufer* (10X)	1X
dNTP (2 mM; SA**)	0,2 mM
početnica Exx (10 µM; ABI***)	0,25 µM
početnica Mxx (10 µM; ABI)	0,25 µM
Taq polimeraza (5 U/µl; SA)	0,5 U

* sastav PCR pufera: 20 mM TRIS HCl + 50 mM KCl + 3 mM MgCl₂; ** Sigma-Aldrich, SAD;

*** Applied Biosystems, SAD

Smjesa za Selektivnu amplifikaciju raspodijeljena je u tubice za PCR reakciju u volumenu od po 15 µl i dodano je po 5 µl uzorka DNA nakon postupka predselektivne amplifikacije. Selektivna amplifikacija provedena je pomoću aparata *Thermalcycler Verity* prema sljedećem temperaturnom režimu:

Tablica 3.10. Temperaturni režim za selektivnu amplifikaciju

°C	Min	Broj ciklusa
94	2:00	1
94	0:20	9
66 – 56	0:30	
72	2:00	
94	0:20	20
56	0:30	
72	2:00	
60	30:00	1

Nakon selektivne amplifikacije provedeno je razdvajanje i očitavanje fragmenata DNA pomoću kapilarne elektroforeze (Genetic analyzer 3130 (Applied Biosystems, SAD). Razdvajanje fragmenata provedeno je pomoću polimera Pop-7 (Applied Biosystems) i standarda s definiranim veličinama DNA fragmenata GeneScan LIZ500 (Applied Biosystems). Očitavanje fragmenata provedena je po principu fluorescencije, a analiza fragmenata (veličina i visina pikova fragmenata) provedena je pomoću programa GeneMapper Ver 4.0.

Pomoću softvera scanAFLP-r (Herman i sur., 2010) provedena je provjera pouzdanosti pik-ova očitanih programom Gene Mapper. U tu svrhu korištena je GeneMapper matrica očitanih fragmenata DNA bazirana na podacima o veličini i visini pikova fragmenata te pikova osam ponavljajućih uzoraka [četiri ponavljanja unutar i dva ponavljanja između plate-ova (PCR-pločica)] i pikova dvije slijepe probe po plate-u. Pomoću programa scanAFLP iz daljnje analize bili isključeni AFLP fragmenti (pik-ovi) (1) koji se nisu pojavljivali u ponavljajućim uzorcima i nisu bili prisutni u slijepim probama, (2) čija je visina bila niža od visine najnižeg definiranog pik-a (50 rfu), (3) čiji je koeficijent variranja (CV) visine pika bio veći od zadanog (CV = 1). U konačnici je dobivena binarna matrica gdje je postojanje amplificiranog AFLP fragmenta kod svake individue označeno s brojem 1, a odsutnost s brojem 0. Binarna matrica je skup podataka koji se koristi za daljnju statističku analizu.

3.1.4. Statistička analiza podataka

Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC - Polymorphism information content) za svaku kombinaciju početnica izračunat je prema Roldan-Ruiz i sur. (2000):

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

gdje je PIC_i informacijski sadržaj polimorfizma AFLP fragmenta, f_i frekvencija prisutnih fragmenata, a $1-f_i$ frekvencija odsutnih fragmenata.

Binarna matrica je korištena za izračun genetske različitosti (EucSQ, kvadrirana euklidska distanca (Excoffier et al. 1992)). Matrica različitosti korištena je kao ulazni podatak za UPGMA (*Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages*) klaster analizu, Analizu glavnih koordinata (*PCoA, Principal coordinate analysis*), Bayesovsku analizu genetske strukture sorata (STRUCTURE) i molekularnu analizu varijance (AMOVA).

Za grafički prikaz genetskih odnosa izrađen je dendrogram tradicionalnih sorata glavatog kupusa na bazi individua. Dendrogram je dobiven klaster analizom, korištenjem algoritma UPGMA (Sneath i Sokal, 1973). Procjena pouzdanosti podskupina stabala provedena je *bootstrap* testiranjem iz 1000 poduzoraka. Za izradu dendrograma i *bootstrap* testiranje korišten je program NTSYSpc 2.21L (Rohlf, 2008).

STRUCTURE analizom se individue razvrstavaju u genetski diferencirane skupine. Ovom analizom, temeljenom na genetičkom modelu nastoji se grupirati individue u nepoznat broj genetskih skupina (K) (Evano i sur., 2005). STRUCTURE analiza provedena je programom STRUCTURE ver. 2.3.4 software (Falush i sur. 2007)

Provedena je analiza molekularne varijance AMOVA (Excoffier i sur., 1992) radi procjene i razdiobe ukupne varijance na varijancu između i unutar sorata. Komponente varijance procijenjene su prema modelu prema (Excoffier i sur. 1992), dok je razina značajnosti procijenjenih komponenti varijance provedena procedurom neparametrijske permutacije, 1000 permutacija. Molekularna analiza varijance provedena je pomoću programa AMOVA unutar softverskog paketa Arlequin .ver. 3.5.2.2. (Excoffier and Lischer, 2010). U analizi udaljenosti između sorata izračunate su ϕ_{ST} vrijednosti koje predstavljaju udio varijance između sorata u ukupnoj varijanci i poslužile su kao mjerilo udaljenosti između sorata. ϕ_{ST} vrijednosti izračunate su pomoću softverskog paketa Arlequin, dok je trodimenzionalna analiza i grafički prikaz glavnih koordinata (3D PCoA) provedena programom NTSYSpc 2.21L.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Informativnost markera i PIC vrijednosti

U Tablici 4.1. prikazani su rezultati analize AFLP fragmenata nakon njihovog elektroforetskog razdvajanja i očitavanjem pomoću programa *GeneMapper Ver. 4.0*. Očitani fragmenti dodatno su pročišćeni pomoću programa *scanAFLP*. Dobivena binarna matrica korištena je za daljnje statističke analize. Sa četiri kombinacije početnica ukupno su detektirana 237 AFLP fragmenata od kojih su 202 polimorfna (85,75 % u odnosu na ukupni broj fragmenata). Udio polimorfnih fragmenata, u odnosu na ukupni broj, kretao se od 82 % do 92 % po kombinaciji početnica. Najveći broj ukupno detektiranih fragmenata zabilježen je kod kombinacije početnica E33/M50 (76). Najveći udio polimorfnih fragmenata utvrđen je kod kombinacije početnica E41/M50 (92 %). Kombinacija početnica E41/M50 je ujedno imala i najveću vrijednost PIC. Maretić (2016) je u svom radu koristio četiri iste AFLP kombinacije početnica, koje su korištene i u ovom radu, te je utvrdio skoro identičan udio polimorfnih markera (86.00 %). Ali je Maretić (2016) sa sve četiri kombinacije početnica utvrdio nešto manji broj ukupnih i polimorfnih fragmenata (203, odn. 174), što je i očekivano s obzirom da je proučavao genetsku varijabilnost samo između populacija unutar sorte 'Varaždinski kupus'. Faltusova i sur. (2011) su u genotipizaciji 20 sorata glavatog kupusa koristili 30 AFLP kombinacija početnica koje su generirale ukupno 806 fragmenata od kojih je 45 % bilo polimorfno. Kang i sur. (2011) su u proučavanju 83 lokalnih populacija glavatog kupusa koristili 12 kombinacija početnica koje su generirale ukupno 575 fragmenata od kojih je 41.9 % bilo polimorfno.

Tablica 4.1. Komercijalni naziv parova početnica

Kombinacija početnica	Ukupan broj fragmenata	Broj polimorfnih fragmenata	Udio polimorfnih fragmenata (%)	Vrijednosti PIC
E33/M49	59	50	85	0,25
E33/M50	76	62	82	0,26
E36/M48	49	41	84	0,23
E41/M50	53	49	92	0,29
Ukupno	237	202	-	-
Prosjek	59,25	50,50	85,75	0,26

Prosječna vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC) bila je 0,26 (Tablica 4.1.), što je znatno veća vrijednost u odnosu na rezultate Maretića (2016), gdje je ta vrijednost u prosjeku bila 0.22. S druge strane prosječna vrijednost PIC je u istraživanjima Kang i sur., (2011) bila znatno veća (0.35)., tj. kombinacije početnica su bile informativnije.

4.2. Genetska sličnost i UPGMA analiza

U tablici 4.2. prikazane su vrijednosti standardne devijacije, prosječne vrijednosti koeficijenta različitosti dobivene između parova individua unutar sorte, te najveća i najmanja vrijednost koeficijenta različitosti između parova individua.

Prosječna vrijednost koeficijenta različitosti unutar proučavanih sorata glavatog kupusa kretala se od 18,61 ('Braunschweiger') do 27,99 ('Čepinski'). Najmanje variranje utvrđeno je između individua unutar sorte 'Ditmar' gdje je utvrđena najmanja vrijednost standardne devijacije (SD = 3,49), dok se koeficijent različitosti između parova individua kretao od 5 do 25. Najveće variranje između parova individua utvrđeno je unutar sorte 'Brgujski' (SD = 7,39) čiji se koeficijent različitosti kretao od 2 do 37 (Tablica 4.2.). Bažon i sur. (2019) su u svojim istraživanjima utvrdili da je sorta 'Brgujski' vrlo varijabilna u morfološkim i agronomskim svojstvima.

Tablica 4.2. Standardna devijacija, prosječne vrijednosti i rangiranje koeficijenta različitosti između individua unutar sorata.

Sorta	Minimum	Maksimum	Prosjek	SD
'Braunschweiger'	4	36	18,61	5,49
'Brgujski'	2	37	19,77	7,39
'Čepinski'	13	40	27,99	5,56
'Ditmar'	5	25	13,49	3,49
'Kopenhaški'	3	35	22,57	4,39
'Ogulinski'	12	36	24,12	4,10
'Slava'	17	39	26,84	4,72
'Varaždinski'	10	36	23,20	5,33
'Žminjski'	9	39	24,23	6,05

U Tablici 4.3. prikazane su prosječne vrijednosti koeficijenta različitosti dobivene između parova individua između sorata. Najslabije sorte su 'Ditmar' i 'Kopenhaški' (EucSQ = 27,84), dok su najudaljenije sorte 'Ditmar' i istarska tradicionalna sorta 'Brgujski' (EucSQ = 49,05).

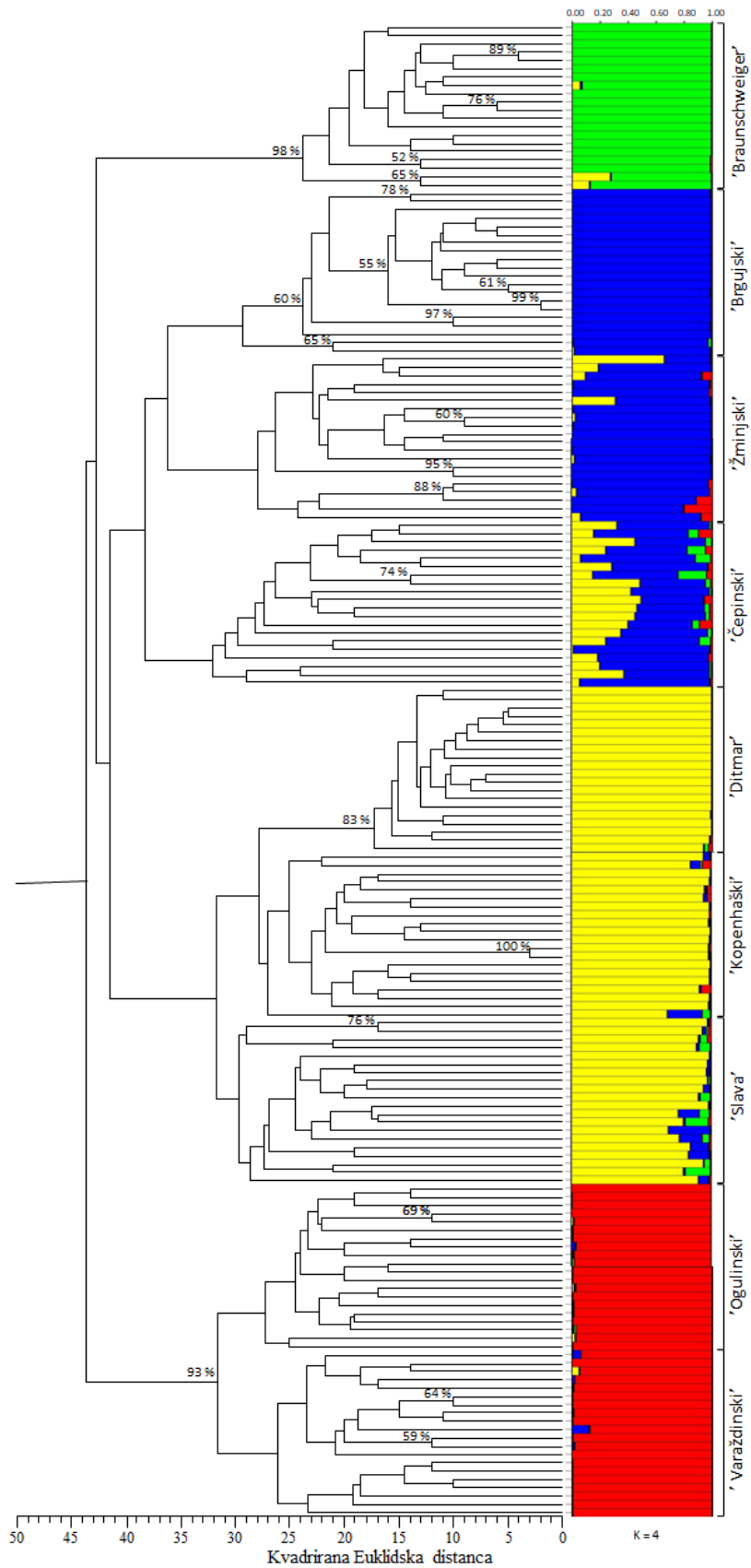
Tablica 4.3. Prosječna vrijednost koeficijenta različitosti između parova individua između sorata

	Bra	Brg	Čep	Dit	Kop	Og	Sla	Var
Brg	43,32							
Čep	40,06	38,29						
Dit	41,98	49,05	40,55					
Kop	44,04	42,99	39,39	27,84				
Og	45,39	44,88	40,66	44,86	43,66			
Sla	40,30	43,28	36,19	31,34	32,23	41,43		
Var	46,55	42,27	43,07	43,41	44,51	31,58	44,22	
Žm	46,91	36,10	38,24	41,74	40,26	44,08	39,66	42,68

Bra='Braunšvajski'; Brg='Brgujski'; Čep='Čepinski'; Dit='Ditmar'; Kop='Kopenhaški'; Og='Ogulinski'; Sla='Slava'; Var='Varaždinski'; Žm='Žminjski'

Analiza UPGMA pokazala je jasno grupiranje individua unutar proučavanih sorata. Analizom STRUCTURE sorte su se grupirale u četiri različite genetske skupine. Sorta 'Braunschweiger' pripada jednoj genetskoj skupini (K1, zeleno obojano), hrvatske tradicionalne ranije sorte 'Brgujski', 'Žminjski' i 'Čepinski' grupiraju se u drugu genetsku skupinu (K2, plavo obojano), strane udomaćene tradicionalne sorte 'Ditmar', 'Kopenhaški' i 'Slava' grupiraju se zajedno u treću genetsku skupinu (K3, žuto obojano), dok se kasnije hrvatske tradicionalne sorte 'Ogulinski' i 'Varaždinski' grupiraju u četvrtu skupinu (K4, crveno obojano) kao što se vidi na Grafu 4.1.

U istraživanju Faltusova i sur. (2011) na 20 populacija vrste *Brassica oleracea* var. *capitata* došlo je do podjele u dvije genetske skupine, pri čemu je ova podjela korelirala dvije forme kupusa *rubra* i *alba* (crveni i bijeli). Samo je jedna populacija bijelog kupusa bila u grupi gdje je crveni oblik bio zastupljen. Unutar tih dviju skupina uočene su i podskupine s obzirom na područje uzgoja.



Graf 4.1. Dendrogram 9 sorata glavatog kupusa dobiven klaster metodom, algoritma UPGMA, na bazi kvadrirane euklidske distance i STRUCTURE analiza

4.3. Rezultati analize molekularne varijance

Nakon provedene analize molekularne varijance, ukupni udio varijabilnosti između sorata je bio 45,61 %, a unutar sorata 54,39 %. Kupus je stranooplodna vrsta i to je razlog velikog udjela ukupne varijabilnosti unutar sorata (54,39 %). U tablici 4.4. prikazan je ukupni udio varijabilnosti između proučavanih tradicionalnih sorata glavatog kupusa (45,61 %). Udio varijabilnosti procijenjen između sorata govori o tome da se dugi niz godina uspjela očuvati genetska varijabilnost domaćih i udomaćenih sorata, te se samim tim očuvala tradicija uzgoja glavatog kupusa na našim područjima.

Tablica 4.4. Molekularna analiza varijance na bazi AFLP markera za 9 proučavanih sorata (svaka sorta po 20 individua)

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Varijanca	% ukupne varijabilnosti	ϕ
Između sorata	8	9,36	45,61**	0,46
Unutar sorata	171	11,16	54,39	
Ukupno	179	20,51		

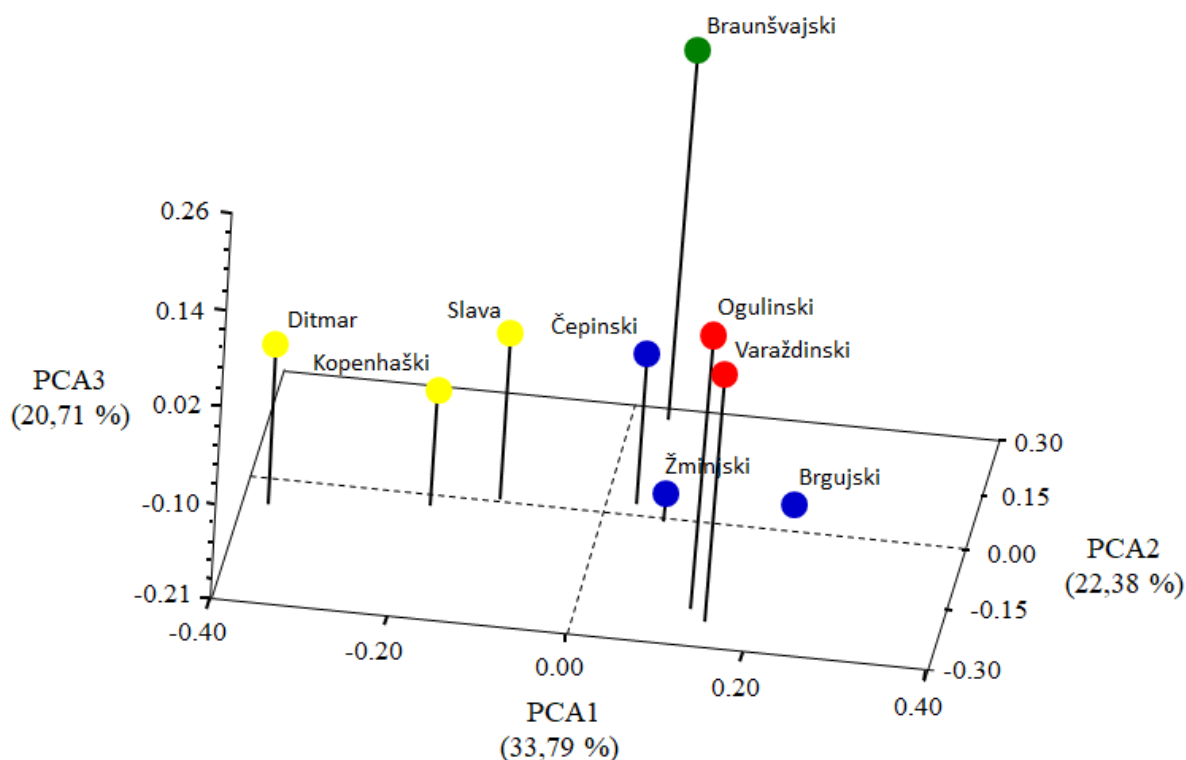
4.4. Udaljenost između sorata (ϕ_{ST})

U tablici 4.5. prikazane su značajne udaljenosti utvrđene između svih proučavanih sorata glavatog kupusa. Najveća udaljenost između sorata utvrđena je između sorata 'Ditmar' i 'Brgujski' ($\phi_{ST} = 0,235$), a najmanja između sorata 'Slava' i 'Kopenhaški' ($\phi_{ST} = 0,233$). Najveća prosječna udaljenost između sorata utvrđena je između sorte 'Braunšvajski' i ostalih sorata ($\phi_{ST} = 0,523$), a ista prosječna vrijednost utvrđena je također između sorte 'Ditmar' i ostalih sorata. Najveće udaljenosti su utvrđene između stranih i domaćih sorata što je bilo i za očekivati s obzirom na njihovo porijeklo, a manje udaljenosti odnosno veće sličnosti su utvrđene između domaćih sorata.

Tablica 4.5. Udaljenost između sorata (ϕ_{ST})

	Bra	Brg	Čep	Dit	Kop	Og	Sla	Var	Žm
Bra	0,000	**	**	**	**	**	**	**	**
Brg	0,557	0,000	**	**	**	**	**	**	**
Čep	0,418	0,376	0,000	**	**	**	**	**	**
Dit	0,618	0,661	0,488	0,000	**	**	**	**	**
Kop	0,532	0,508	0,358	0,352	0,000	**	**	**	**
Og	0,529	0,511	0,359	0,581	0,465	0,000	**	**	**
Sla	0,436	0,462	0,242	0,357	0,233	0,385	0,000	**	**
Var	0,551	0,492	0,406	0,577	0,486	0,251	0,434	0,000	**
Žm	0,543	0,391	0,317	0,548	0,419	0,452	0,356	0,444	0,000

U grafičkom prikazu 3D PCoA analize (Graf 4.2) došlo je do razdvajanja sorata u 4 grupe koje zapravo predstavljaju 4 različita genska izvora. Sorta 'Braunsweiger' se izdvaja kao jedna grupa. 'Ditmar', 'Kopenhaški' i 'Slava' pripadaju istoj grupi, a upravo ove tri sorte su strane udomaćene sorte. Sorte 'Čepinski', 'Brgujski' i 'Žminjski' grupirane su u zasebnu skupinu. Sorte 'Varaždinski' i 'Ogulinski' su također grupirane u zasebnu skupinu i čime su potvrđena istraživanja koje je provela Kereković (2011), u kojima se utvrdila određena sličnost između sorata 'Varaždinski' i 'Ogulinski'.



Graf 4.2. 3D PCoA analiza glavnih koordinata domaćih i stranih udomaćenih tradicionalnih sorata bijelog glavatog kupusa

5. Zaključak

1. Detektiran je ukupni udio od 85 % polimorfnih markera, do čega se došlo analizom AFLP molekularnih markera. Iz ovih rezultata se zaključilo da su se AFLP molekularni markeri pokazali učinkoviti.
2. Najveća genetska varijabilnost unutar sorti se utvrdila kod sorte 'Brgijski', a najmanja kod sorte 'Ditmar'
3. Analizom STRUCTURE utvrđeno je jasno grupiranje sorata u četiri različite genetske skupine. U dvije genetske skupine su se smjestile samo strane sorte, dok u druge dvije genetske skupine domaće sorte. U jednoj od genetskih skupina se nalaze sorte 'Varaždinski' i 'Ogulinski', a i u istraživanjima Kereković (2011) je utvrđena sličnost između ove dvije sorte.
4. Ukupni udio varijabilnosti bio je veći unutar sorti nego između sorti (između sorata je bio 45,61 %, a unutar sorata 54 %).
5. Značajna varijabilnost između proučavanih sorata potvrđuje da se uspješno očuvati sjeme odnosno sortna čistoća tradicionalnih sorata, a i stranih udomaćenih sorata glavatog kupusa.
6. Najveća udaljenost između sorata utvrđena je između sorata 'Ditmar' i 'Brgijski' ($\Phi_{ST}=0,235$), a najmanja između sorata 'Slava' i 'Kopenhaški' ($\Phi_{ST}=0,233$).

6. Literatura

1. Bažon I., Goreta Ban S., Cvitan D., Prekalj B., Franić M., Ban D. (2019). Morfološka i gospodarska svojstva prirodne populacije 'Brgujski kupus' Proceedings of the 55th Croatian and 15th International Symposium on Agriculture (2459-5543) 54 (2019); 231-234
2. Bogović M., Vincek D., Ozimec R. (2011). Povijesni pregled uzgoja 'Varaždinskog' zelja do aktualne zaštite izvornosti. Agronomski glasnik 3/2011
3. Bolarić S., Kereković M., Žutić I., Bukan M., Dujmović D., Vokurka A. (2013). Molekularna raznolikost lokalnih populacija kupusa. Genetics, Plant Breeding and Seed Production 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture, Dubrovnik Croatia (2013)
4. Červenski J., Gvozdenović Đ., Vasić M., Bugarski D., Gvozdanović-Varga J. 2003. Mode of inheritance of head height and head width in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) Genetika, 35(1), 21-30.
5. Čop T., (2018). Kupus – Proizvodnja i prerada. Dostupno na: <<https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/kupus-proizvodnja-i-prerada/>> pristup 6.studenog 2020.
6. El Esawi M. A., Germaine K., Bourke P., Malone R. (2016). AFLP analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of *Brassica oleracea* in Ireland. Comptes Rendus Biologies, Science Direct
7. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol.; 14:2611-2620
8. Excoffier L., Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour. 10, 564-567. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
9. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M., (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131:479-491. PMID: 1644282
10. Faltusova Z., Kučera L., Ovesna J. (2011). Genetic diversity of *Brassica oleracea* var. *capitata* gene bank accessions by AFLP. Electronic Journal of Biotechnology ISSN 0717-3458
11. Falush D., Stephens M, Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Mol Ecol Notes. 2007; 7:574-578.
12. Herman, L.M. (2010). What laboratory research has told us about dolphin cognition. International Journal of Comparative Psychology, 23:310-330
13. Hintum Th.J.L. Wiel C.C.M., Visser D.L., Treuren R., Vosman B. (2007). The distribution of genetic diversity in a *Brassica oleracea* gene bank collection

- related to the effects on diversity of regeneration as measured with AFLPs. *Theor Appl Genet* 114:777-786
14. Kang J., Fang Z., Wang X., Xu D., Liu Y., Yang L. Zhuang M., Zhang Y. (2011). Genetic diversity and relationships among cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) landraces in China revealed by AFLP markers. *African Journal of Biotechnology* 10(32):5940-5949
 15. Kereković M. (2011). Molekularna raznolikost hrvatskih lokalnih populacija kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Diplomski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
 16. Kresovich S., Williams J.G.K., McFerson J.R., Routman E.J., Schaal B.A. (1992). Characterization of genetic identities and relationship of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85:190-196
 17. Lazaro A., Aguinalalde I. (1998). Genetic diversity in *Brassica oleracea* L. (*Cruciferae*) and wild relatives (2n=18) using RAPD Markers. *Annals of Botany* 82:829-833
 18. Leroy X.J., Leon K., Branchard M. (2000). Characterisation of *Brassica oleracea* L. by microsatellite primers. *Plant Syst. Evol.* 225: 235-240
 19. Lešić R., Borošić J., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2002). Kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) syn. (*Brassica oleracea* convar. *capitata* Alef.). U: Povrćarstvo. Zrinski, Čakovec
 20. Louran S., Torp A. M., Holme I. B., Andersen S. B., Jensen B. D. (2006). Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet Resour Crop Evol* 54:1717-1725
 21. Maretić R. (2016). Genotipizacija Varaždinskog kupusa pomoću AFLP markera. Diplomski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
 22. Mei J., Li Q., Yang X., Qian L., Liu L., Yin J., Frauen M., Li J., Qian W. (2010). Genomic relationship between wild and cultivated *Brassica oleracea* L. with emphasis on the origination of cultivated crops. *Genet Resour Crop Evol* 57: 687-692
 23. Mikolčević V. (1959). Prilog poznavanju gospodarskih važnijih morfoloških i bioloških svojstava domaćih sorata kupusa. Doktorska disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
 24. Ordas A., Cartea E. (2008). Cabbage and Kale. In: *Vegetables II* (J. Prohens-Tomas, F. Nuez, eds), Springer Verlag. New York, 119-143
 25. Pavlek P. (1955). Neka biološka i gospodarska svojstva *Brassica oleracea* var. *capitata* L. (obzirom na uzgoj ranih sorata kod nas). Doktorska disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb
 26. Roldan-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rate in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6:125-134

27. Sneath P.H.A, Sokal R.R. (1973). Numerical taxonomy. Freeman and Co., San Francisco
28. Šamec D., Bogović M., Vincek D., Martinčić J., Salopek-Sondi B. (2013). Assessing the authenticity of the white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) cv. 'Varaždinski' by molecular and phytochemical markers. FRIN-04717: No of pag.7
29. Šatović Z. (1999). Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo 16(1-2):73-95
30. Wendel J.F., Weeden N.F. (1989). Genetic variability of the Saudi Arabian *Uromastix aegyptia microlepis* using protein and isoenzymes electrophoreses. Advances in Bioscience and Biotechnology 2:27-32. Doi:10.4236/abb.201121005.
31. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407-4414
32. Ogulinski kiseli kupus dobio oznaku izvornosti od EU – Savjetodavna.hr <<https://www.savjetodavna.hr/2015/09/02/OGULINSKI-KISELI-KUPUS-DOBIO-OZNAKU-IZVORNOSTI-OD-EU/>> pristup 6.studenog 2020.
33. Zaštita sorte Čepinski kupus – Narod.hr <<https://narod.hr/gospodarstvo/udrugacepinski-kupus-zeli-zastiti-nadaleko-poznatu-sortu>> pristup 13.studenog 2020.
34. Opis strane sorte Braunsweiger <https://www.reinsaat.at/shop/EN/brassica/white_cabbage/brunswijker_braunschweiger/> pristup 11. Srpnja 2021.
35. Opis strane sorte Ditmar <<https://www.seeds-gallery.shop/en/home/ditmar-cabbage-seeds.html>> pristup 11.srpnja 2021.
36. Opis strane sorte Slava <<https://burea-uinsurance.com/en/description-of-cabbage-glory/>> pristup 12.srpnja 2021.
37. Opis strane sorte Kopenhaški <<https://www.westcoastseeds.com/products/copenhagen-market>> pristup 12.srpnja 2021.

Životopis

Josip Ćurak rođen u Splitu 19. prosinca 1996., a živi u Središnjoj Bosni i Hercegovini u mjestu Nova Bila. Srednju školu pohađao u Katoličkom školskom centru Petar Barbarić u Travniku, opću gimnaziju. Preddiplomski studij u Mostaru upisao 2015. godine na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Mostar opći smjer agronomije. Stručnu praksu odradio u rasadniku „Adria Hithil“, Gabela, Čapljina. 2018. godine upisao diplomski studij u Zagrebu na Agronomskom fakultetu smjer Biljne znanosti. Stručnu praksu odradio na „Bc institutu“, Zagreb pod mentorstvom dr. sc. Marka Maričevića glavnim selekcionarom strnih žitarica. Osnovno razumijevanje engleskog jezika kao i programa Word i Exel. Završen tečaj za digitalnog marketing menadžera u svibnju 2021. godine. Uspješno završena obuka „Ja poduzetnik“ koju je financirala fondacija Agora i na koju je prošao sa biznis idejom o pokretanju destilerije voćnih rakija također u svibnju 2021. Kao hobi navodi proizvodnju voćnih rakija kao i brigu o manjem obiteljskom voćnjaku, a moguće je da ovaj hobi preraste u ozbiljniju proizvodnju. Mora se spomenuti i kako još od malih nogu dosta pomaže i u obiteljskoj poljoprivredno-prehrambenoj trgovini.