Molekularno oplemenjivanje bilja

Edited book / Urednička knjiga

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Publication year / Godina izdavanja: **2022**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:648243

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

UREDNICI IVAN PEJIĆ / ZLATKO ŠATOVIĆ

MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA

NAZIV PROJEKTA
Bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (KK.01.1.1.01.0005)

NAZIV KORISNIKA
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv)

Projekt je sufinancirala Europska unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj (www.strukturnifondovi.hr)

Europska unija
Zajedno do fondova EU

STRUKTURNI I INVESTICIJSKI FONDOVI

Operativni program KONKURENTNOST I KOHEZIJA

Republika Hrvatska

Sadržaj publikacije isključiva je odgovornost Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta

MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA

UREDNICI

prof. dr. sc. Ivan Pejić i
prof. dr. sc. Zlatko Šatović

Monografija Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta

Impressum

NAKLADNIK
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

RECENZENTI
prof. dr. sc. Vinko Kozumplik, *professor emeritus*
prof. dr. sc. Vlado Guberac
dr. sc. Goran Zdunić

LEKTURA
mr. sc. Sanja Joka

TEHNIČKI urednik
dr. sc. Filip Varga

GRAFIČKO oblikovanje
Ivana Čukelj

TISAK
Studio moderna d.o.o.

NAKLADA
300 primjeraka

ISBN 978-953-8276-40-8 (tiskano izdanje)
ISBN 978-953-8276-41-5 (elektroničko izdanje)

CIP zapis je dostupan u računalnome katalogu Nacionalne
i sveučilišne knjižnice u Zagrebu pod brojem 001157533.

Odlukom Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, KLASA: 602-09/22-02-05, URBROJ: 251-71-29-01/9-22-4, na 3. redovitoj sjednici održanoj 6. prosinca 2022. godine odobrava se korištenje naziva monografija Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

Zagreb, 2022.

SADRŽAJ

PREDGOVOR / 1

1. KONVENCIONALNO I MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA / 2
   1.1. Povijesni razvoj i postignuća konvencionalnog oplemenjivanja bilja 3
   1.2. Ključni problemi i ograničenja konvencionalnog oplemenjivanja bilja 5
   1.3. Počeci i razvoj molekularnog oplemenjivanja 9
   1.4. Aktualni status primjene metoda molekularnog oplemenjivanja bilja 12
   1.5. Pravci razvoja i mogućnosti komplementiranja klasičnog i molekularnog oplemenjivanja u Hrvatskoj 15

2. PRIKUPLJANJE I OBRADA BILJNOG MATERIJALA I METODE IZOLACIJE DNA / 19
   2.1. Uzimanje uzoraka biljnog tkiva, transport i skladištenje 20
   2.2. Priprema uzorka za DNA analize 22
   2.3. Izolacija genomske DNA 23
   2.4. Provjera kakvoće DNA, normalizacija i čuvanje 27

3. ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI / 30
   3.1. Uvod 31
   3.2. Molekularna filogenija i analiza genetske raznolikosti 31
   3.3. Unutarpopulacijska raznolikost 32
   3.4. Genetska diferencijacija 34
   3.5. Mjerila genetske udaljenosti i izrada stabla 34
   3.6. Analiza molekularne varijance (AMOVA) 37
   3.7. Genetska struktura 38
   3.8. Primjena analize genetske raznolikosti 39
   3.9. Genetska raznolikost i struktura populacija dalmatinskog buhača 46
   3.10. Genetska raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje 56
   3.11. Kukuruz u Jugoistočnoj Europi – povijest, raznolikost i selekcija 66
   3.12. Genetska raznolikost europske germplazme soje 76
   3.13. Genetska raznolikost i srodstveni odnosi hrvatskih autohtonih kultivara vinove loze 85
   3.14. Genetska raznolikost divljih i kulturnih maslina u Hrvatskoj 93
   3.15. Genetska raznolikost tradicijskih kultivara raštike (Brassica oleracea var. acephala) 103

4. ANALIZA LOKUSA ZA KVANTITATIVNA SVOJSTVA / 110

4.1. Uvod 111

4.2. Načela 111

4.3. Statističke metode 112

4.4. Pozicija i učinci QTL-a 116

4.5. Ograničenja QTL analiza 118

4.6. Istraživanja lokusa kvantitativnih svojstava kukuruza u Hrvatskoj 121

4.7. Analiza lokusa za kvantitativno svojstvo povezano s otpornošću pšenice na priježetveno proklijavanje 128

5. PRIDRUŽUJUĆE KARTIRANJE / 140

5.1. Uvod 141

5.2. Neravnoteža vezanosti 142

5.3. Struktura populacije 143

5.4. Srodnost 144

5.5. Računalni programi 145

5.6. Kontrola kvalitete i nadomještanje nedostajućih podataka 146

5.7. Statistička analiza 147

5.8. Cjelogenomska studija pridruživanja za sadržaj minerala u sjemenkama graha 152

6. GENOMSKA SELEKCIJA / 162

6.1. Uvod 163

6.2. Čimbenici koji utječu na točnost predviđanja genomske selekcije 165

6.3. Modeli predviđanja korišteni u GS-u 167

6.4. Uključivanje GS-a u oplemenjivački program biljaka 169

6.5. Genomska selekcija za svojstva kvalitete pšenice 177

POGOVOR / 182

ŽIVOTOPISI AUTORA / 183

PREDGOVOR

IVAN PEJIĆ I ZLATKO ŠATOVIĆ

Oplemenjivanje bilja dugotrajna je sofisticirana djelatnost koju obavlja osoblje sa specijaliziranim znanjima iz više znanstvenih područja i zahtijeva skupu infrastrukturu. Konačni su ishod oplemenjivanja bilja novi kultivari (sorte) poljoprivrednog bilja koji nastaju tijekom višegodišnjih ciklusa odabira. Novi, prinosniji kultivari, poboljšane kakvoće proizvoda, prilagođeni okolišnim i edafskim uvjetima ciljanog područja te otporni na biotske i abiotske stresove, temelj su razvitka poljoprivredne proizvodnje.

Oplemenjivanje bilja kao djelatnost - kao i istraživanja iz područja biljne genetike, u Republici Hrvatskoj imaju dugu tradiciju. Suvremeno komercijalno oplemenjivanje bilja provodi se u privatnim tvrtkama i na javnim ustanovama koje hrvatskoj poljoprivredi osiguravaju veliku dodanu vrijednost. Udio je domaćih kultivara u strukturi sjetve najvažnijih poljoprivrednih kultura pozamašan i gospodarski vrlo značajan[1]. Posljednjih godina hrvatske oplemenjivačke kuće plasiraju svoje sjeme te otvaraju sestrinske tvrtke i u inozemstvu. Ta istraživačka i gospodarska djelatnost prepoznata je i uvrštena i u Strategiju pametne specijalizacije Republike Hrvatske.

Pojam „molekularno oplemenjivanje bilja" odnosi se na primjenu dijagnostičkih molekularnih metoda te pratećih biometričkih metoda i računalnih alata koji omogućuju ubrzanje i povećanje preciznosti konvencionalnog oplemenjivačkog procesa bez izravnih manipulacija u genomu.

Sadržaj ove znanstvene monografije obuhvaća pregled problema klasičnog oplemenjivanja bilja i sadašnje stanje primjene molekularnih metoda koje se danas obilno koriste u bazičnim i primijenjenim istraživanjima. Uz teoretsku osnovu različitih pristupa koji se koriste u molekularnom oplemenjivanju bilja u monografiji su navedene i brojne studije slučaja u kojima se opisuju rezultati konkretnih istraživanja provedenih u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

Ova je monografija prvenstveno namijenjena studentima diplomskih i poslijediplomskih studija iz područja biotehničkih i prirodnih znanosti. Želja nam je potaknuti mlade istraživače i oplemenjivače na uvođenje i razvoj novih strategija i tehnologija u oplemenjivanju bilja koje integriraju upotrebu biljnih genetskih izvora sa suvremenim metodama fenotipizacje i genotipizacije.

Ovo djelo posvećujemo svim našim nekadašnjim, sadašnjim i budućim oplemenjivačima čiji su trud i rezultati rada nedovoljno prepoznati i cijenjeni, a putem novih kultivara i domaćeg sjemena daju velik doprinos poljoprivredi i ukupnom gospodarstvu Hrvatske.

1 Kozumplik, V., Pejić, I., 2012. Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Monografija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.

1 KONVENCIONALNO I MOLEKULARNO OPLEMENJIVANJE BILJA

Ivan Pejić

Oplemenjivanje bilja tijekom proteklih sto godina etabliralo se u relevantnu struku u području poljoprivrede koja daje značajan doprinos povećanju proizvodnje hrane u svijetu. Otkriće spolnosti biljaka, a posebno rođenje genetike kao znanosti, stvorili su pretpostavke za brzi razvoj oplemenjivanja bilja, discipline koja se bavi genetskim poboljšanjem biljnih vrsta za proizvodnju hrane za ljude i stoku te drugih proizvoda biljnog podrijetla (biogoriva, vlakana, biofarmaceutski spojevi, i dr.). Temeljna paradigma oplemenjivanja bilja zasniva se na razvoju novih kultivara unapređenjem njihova genotipa metodama razvoja genetske varijabilnosti i selekcije unutar različitih okolinskih scenarija.

Za uspješno genetsko poboljšanje biljaka neophodno je poznavanje načina nasljeđivanja agronomski važnih svojstava i njihove interakcije s čimbenicima okoline koji određuju razinu ekspresije tih svojstava. Iako je primjena (danas klasičnih) spoznaja o nasljeđivanju svojstava i interakciji genotipa i okoline tijekom zadnjih sto godina polučila suvremene kultivare koji imaju višestruko veće prinose i poboljšanu kvalitetu, proces njihova razvoja ostao je dugotrajan i nisko učinkovit, a time i skup. Brzo rastuća ljudska populacija i ograničene poljoprivredne površine, a posebno promjena klimatskih ciklusa, predstavljaju ogromne izazove budućeg oplemenjivanja poljoprivrednih vrsta. S druge strane, ubrzani razvoj genetike, eksperimentalnih tehnika i informatičke tehnologije omogućuje preobrazbu konvencionalnog (klasičnog) u molekularno oplemenjivanje bilja.

Prema međunarodnom panelu za klimatske promjene (IPCC, 2021.) globalne površinske temperature zraka nastavit će rasti najmanje do sredine ovog stoljeća prema svim razmatranim scenarijima. Globalno zatopljenje od 1.5 °C do 2 °C bit će premašeno tijekom 21. stoljeća ukoliko se ne dogodi veliko smanjenje emisije CO_2 i drugih stakleničkih plinova u narednim desetljećima. Kao posljedica globalnog zatopljenja u pojedinim područjima mogu se očekivati značajne promjene u postojećim klimatskim profilima, a što uključuje češće i izraženije toplinske ekstreme, poplavne oborine te velike suše, a što će uvelike utjecati na niz promjena u poljoprivrednoj proizvodnji. Promjene klimatskih profila neminovno već utječu na promjenu spektra i patogenosti uobičajenih biotskih čimbenika (bolesti i štetnici) koji opterećuju biljnu proizvodnju. Sve te okolinske promjene zajedno će značajno utjecati na potpuno nove tipove interakcije s genotipom budućih kultivara. Stoga je neupitna potreba i budućnost stalnog i ubrzanog genetskog poboljšanja poljoprivrednog bilja.

Kako rastuće temperature i promjene vodnih režima utječu na sve životne procese biljaka kao sesilnih organizama, potrebno je široko razumijevanje i mogućnost praćenja i mjerenja različitih životnih procesa na molekularnom nivou, preciznije, na nivou genomike, transkriptomike, proteomike, metabolomike i epigenetike. Ne manje važno je i pitanje precizne fenotipizacije. Budućnost fenotipizacije vjerojatno je fenomika koja se zasniva na tzv. FAIR principu korištenja novih i postojećih digitalnih podataka (FAIR; engl. *Findability, Accessibility, Interoperability, Reusability*). Nove spoznaje i metode koje se koriste u ovim istraživanjima predstavljaju temeljne alate kojima se koristi „molekularno oplemenjivanje bilja" od kojega se očekuje razvoj kultivara nove generacije visoke rodnosti i željene kvalitete, koji će uz to biti klimatski prilagodljiviji i tolerantniji na postojeće i nove abiotske i biotske stresove.

1.1. POVIJESNI RAZVOJ I POSTIGNUĆA KONVENCIONALNOG OPLEMENJIVANJA BILJA

Za postavljanje realnih ciljeva i razumijevanje dosega molekularnog oplemenjivanja bilja neophodno je temeljno razumijevanje procesa klasičnog oplemenjivanja bilja i tipova kultivara koji se danas koriste u proizvodnji. Oplemenjivanje bilja započelo je još u vremenu neolita kao nesvjesna masovna selekcija koja se ogledala u odabiranju najboljih biljaka i njihovog sjemena za zasnivanje usjeva u narednoj sezoni. Masovna selekcija je jednostavna, ali niskoučinkovita metoda selekcije zbog niske povezanosti fenotipa i genotipa kada su u pitanju agronomski

važna svojstva. Ipak, povijesno gledano ovakva selekcija bila je vrlo važna u domestikaciji i nastanku poljoprivrednih vrsta kakve danas koristimo u poljoprivredi. Primjena masovne selekcije na agronomski važna svojstva visoke heritabilnosti, poput čvršće zatvorenih mahuna kod vrsta koje imaju ovakav plod, krupnijeg sjemena ili grmolikog rasta i terminalne cvatnje, rezultirala je u relativno kratkom vremenu populacijama kultiviranog bilja koje su postale produktivnije od samoniklog.

Rane spoznaje o načinu nasljeđivanja svojstava i njihove interakcije s okolinom u prvoj polovici 20. stoljeća polučile su „moderne metode selekcijskog oplemenjivanja" koje se zasnivaju na selekciji po genotipu, a što pretpostavlja odabiranje superiornih biljaka na temelju mjerenih vrijednosti njihovih potomstava u poljskim pokusima. Ovaj pristup doveo je do značajnog povećanja genetske dobiti od selekcije tijekom jednog oplemenjivačkog ciklusa i u upotrebi je i danas (uz brojne naknadne modifikacije).

Također, značajan iskorak u oplemenjivanju bilja predstavlja i prelazak sa selekcije iz prirodnih i starih kultiviranih populacija na metode divergentnog i konvergentnog oplemenjivanja koje se zasnivaju na planskoj hibridizaciji. Novim spoznajama o genetskoj varijabilnosti početnog materijala i načinu nasljeđivanja agronomski važnih svojstava te potom odabira roditelja za ciljana križanja, stvaraju se puno perspektivnije populacije za nastavak selekcije. Tijekom 20. stoljeća bitno su unaprijeđeni načini testiranja potomstava u poljskim uvjetima, kako u smislu prikupljanja većeg broja podataka i same tehnike mjerenja vrijednosti svojstava, tako i biometričke analize tih podataka. Pri tome su bile ključne spoznaje o matematičkom razdvajanju i kvantifikaciji doprinosa genetskih (nasljednih) i negenetskih (nenasljednih) čimbenika koji u svojoj interakciji rezultiraju fenotipom. Pored razvoja genetike, uspješnosti oplemenjivanja bilja značajano su pridonijeli i razvoj specijalne mehanizacije i informatičkih alata. Sve ovo dovelo je do suvremenih oplemenjivačkih metoda koje su povećale genetsku dobit od selekcije i rezultirale sve većom rodnošću novih kultivara, ali i poboljšanjem brojnih sekundarnih svojstava poput bolje otpornosti na polijeganje, ranijem dozrijevanju, bržem otpuštanju vlage iz zrna u zriobi, otpornosti na bolesti i štetnike, i sl.

O principima i metodama klasičnog (konvencionalnog) oplemenjivanja bilja napisano je puno knjiga, a ovdje se preporučuje samo nekoliko: Poehlman (1959.), Tavčar (1959.), Fehr (1987.), Martinčić i Kozumplik (1996.) te recentnu knjigu Acquaah (2020.) koja izvrsno prezentira i klasične i molekularne metode oplemenjivanja bilja.

Cilj je oplemenjivanja bilja stvoriti superiorne kultivare unutar pojedinih poljoprivrednih vrsta i osigurati njihovu ekonomski isplativu reprodukciju sa stabilnim održavanjem uniformne genetske strukture. Ovo zahtijeva izbor odgovarajuće metode oplemenjivanja za pojedinu poljoprivrednu vrstu, a što primarno ovisi o njenim temeljnim biološkim karakteristikama (ponajprije o prirodnom načinu oplodnje i razmnožavanja), ciljanom tipu kultivara i vrsti uroda zbog kojeg se kultura uzgaja. Kod vrsta kod kojih se kao urod koristi sjeme (npr. žitarice), primarni fokus oplemenjivanja najčešće je prinos sjemena po jedinici površine. Međutim, kod drugih vrsta to može biti korijen (npr. repe) ili list (npr. duhan, kupusnjače). Pojedine poljoprivredne vrste mogu imati više načina iskorištenja (proizvodnja za zrno, zelenu masu ili vlakna). Nadalje, izbor oplemenjivačke metode ovisi i o ekonomski najisplativijem načinu proizvodnje reprodukcijskog materijala. S tim u vezi, kultivari pojedinih poljoprivrednih vrsta mogu imati različitu genetsku strukturu. Suvremena (intenzivna) poljoprivredna proizvodnja zahtijeva kultivare homogene genetske strukture, a što znači da svaka biljka unutar populacije kultivara ima teoretski istovjetan genotip te takvi kultivari daju usjeve vrlo ujednačenog rasta, razvoja i dozrijevanja. Međutim, treba imati na umu da kod istih kultura, ako se uzgajaju po principima ekološke poljoprivrede, koncept željene genetske strukture kultivara može biti potpuno suprotan.

Stoga je kod samooplodnih vrsta koje se razmnožavaju sjemenom najčešći linijski kultivar (npr. pšenica, ječam, soja), a što podrazumijeva populaciju

homozigotnih biljaka približno identičnog genotipa. Kod ekonomski važnih stranooplodnih vrsta (npr. kukuruz, suncokret) su to F1 hibridni kultivari čije populacije čine genotipski istovjetne heteorizgotne biljke. Međutim, kod nekih vrsta (npr. voćke, vinova loza, krumpir) genetska uniformnost kultivara (čije jedinke mogu biti pretežno homozigotne ili heterozigotne) osigurava se kloniranjem jer je to kod njih ekonomski najisplativiji način razmnožavanja. Međutim, za veliki broj stranooplodnih vrsta ekonomski nije isplativ razvoj hibridnih kultivara niti vegetativna reprodukcija, te na tržište dolaze kao „stranooplodne" ili „sintetičke" sorte kod kojih su samo najvažnija svojstva zadovoljavajuće ujednačena, a proces umnažanja njihovog sjemena kojime se nastoji očuvati početna frekvencija gena i genotipova nije savršen. Stoga, oplemenjivačima raznih kultura stoji na raspolaganju više metoda selekcije (Martinčić i Kozumplik, 1996.).

1.2. KLJUČNI PROBLEMI I OGRANIČENJA KONVENCIONALNOG OPLEMENJIVANJA BILJA

Razvoj linijskih kultivara kod samooplodnih vrsta relativno je jednostavan oplemenjivački postupak, a isto tako i kasnije održavanje i proizvodnja sjemena pojedinih kultivara. Svejedno, ovaj je postupak dugotrajan, skup i nedovoljno predvidljiv. Najčešće su korištene oplemenjivačke metode pedigre metoda, metoda potomstva jednog sjemena, metoda smjese te metoda povratnog križanja. Problemi započinju već s izborom roditelja za križanje za koje se često ne zna pedigre, a time i razina očekivane genetske varijabilnosti početne oplemenjivačke populacije. Iskustva govore da je genetska dobit od selekcije značajno veća ukoliko roditelji posjeduju visoke vrijednosti poželjnih agronomskih svojstava, ali su genetski divergentniji. Pri tome, u klasičnom oplemenjivanju, genetsku divergentnost roditelja možemo procijeniti na temelju njihovog poznatog pedigrea, a do neke mjere i međusobnom različitosti nekih sekundarnih svojstava.

Ovisno o metodi oplemenjivanja, oplemenjivači ulažu veliki trud i koriste svoje iskustvo bilo u selekciju po fenotipu od F2 do F5 ili F6 generacije (pedigre metoda), bilo da naglasak stavljaju na procjenu agronomskih svojstava u poljskim mikropokusima linija F5 ili F6 generacije (metoda potomstva jednog sjemena, metoda smjese). Zbog velikog broja linija i ograničene količine sjemena u toj fazi selekcije, uspješnost selekcije obično je niska. Ozbiljna procjena genotipske vrijednosti oplemenjivačkih linija moguća je tek u kasnijim generacijama (od F7), ali i tada značajno ovisi o uloženim sredstvima (broj pokusnih parcela, lokacija i godina ispitivanja). Zbog toga je povijesno gledano, genetska dobit od selekcije samooplodnih vrsta relativno mala, no ipak značajna. Tako je primjerice tijekom 20. stoljeća, posebno u njegovoj drugoj polovici, globalni prinos pšenice po hektaru porastao za 250 % (Calderini i Slafer, 1998.), a značajan doprinos tom povećanju dali su upravo kontinuirano poboljšavani kultivari.

Značajan prijelom u povećanju prinosa, ali i poboljšanju drugih važnih svojstava poljoprivrednih kultura, dogodio se otkrićem koncepta i primjenom hibridnih kultivara, danas najčešće tzv. F1 hibrida. Ovome su prethodila pionirska istraživanja učinaka inbridinga i heterozisa kod kukuruza početkom 20. stoljeća. Superiornost hibridnih kultivara temelji se na iskorištenju fenomena heterozisa, a razvoj najprije na stvaranju inbred linija prisilnom (ručnom) samooplodnjom do postizanja pune homozigotnosti, provedbom testnih križanja većeg broja inbred linija i ispitivanjem test-križanaca u poljskim pokusima, te konačno izborom i održavanjem specifičnih kombinacija inbred linija za proizvodnju hibridnog sjemena. Kod kukuruza je u uvjetima prostorne izolacije moguće provesti kontrolirano križanje dvije inbred linije i proizvesti sjeme F1 generacije na ekonomski isplativ način. Superiornost F1 hibrida kukuruza nad prinosima starih populacija iz masovne selekcije dokazana je u brojnim eksperimentima. Osim visokih i stabilnih prinosa, hibridni kultivari imaju robusnu stabljiku otpornu na polijeganje i lom, koju više nije potrebno nagrtati te osiguravaju i visoku ujednačenost usjeva u dozrijevanju, a što je bilo vrlo značajno za prelazak na potpuno mehanizirani način uzgoja.

Od druge polovice 20. stoljeća, ne više samo u SAD-u, hibridi će postati osnovni tip kultivara kukuruza u svim razvijenim poljoprivredama svijeta.

Superiorne odlike hibridnog tipa kultivara ubrzo su primijenjene i kod drugih važnih poljoprivrednih kultura poput suncokreta, šećerne repe i cijelog niza drugih kultura. Umjetna (ručna) samooplodnja za razvoj inbred linija kod vrsta s hermafroditnim cvjetovima znatno je zahtjevnija, ali još uvijek lako izvediva i prihvatljiva na razini oplemenjivačkih eksperimenata. Međutim, za ekonomski isplativu proizvodnju komercijalnog F1 sjemena bilo je potrebno razviti posebne biološke ili fiziološke sustave uklanjanja muških spolnih stanica kod majčinske komponente hibrida. Tako se počinje istraživati i primjenjivati prirodni fenomen muške sterilnosti pa se u „žensku komponentu" hibrida počinju unositi metodom povratnog križanja: geni za (danas najčešće korištenu) „citoplazmatsku mušku sterilnost (CMS)", a u očinsku komponentu geni za obnavljanje fertilnosti. Tek tako stvorene i održavane inbred linije moguće je upotrijebiti za proizvodnju komercijalnog F1 sjemena. To je naravno dugotrajan, zahtjevan i skup posao, ali viši i stabilniji prinosi tako stvorenih F1 hibrida pokrivaju troškove proizvodnje njegova sjemena. Danas se na takav način proizvodi hibridno sjeme većine poljoprivrednih kultura koje imaju hibride na tržištu.

Dugi niz godina hibridni kultivari bili su „rezervirani" samo za stranooplodne vrste, ali razvojem modernih tehnologija s kraja 20. stoljeća, taj tip kultivara počinje se primjenjivati i kod samooplodnih vrsta (duhan, rajčica, pšenica, ječam i dr.). Iako su učinci heterozisa kod samooplodnih vrsta manji, a troškovi proizvodnje hibridnog sjemena dosta visoki, razvoj F1 hibrida tržišno je isplativ, a oplemenjivačkim kućama osigurava redovnu potražnju sjemena zbog nemogućnosti korištenja F2 sjemena iz uroda za narednu sjetvu.

Brojni su izazovi, a time i potrebe za istraživanjima, za brži, učinkovitiji i jeftiniji razvoj hibridnih kultivara i proizvodnju njihova sjemena. U prvom redu potrebno je skratiti vrijeme dobivanja homozigotnih inbred linija. U klasičnom oplemenjivanju koje koristi ručnu samooplodnju za to je potrebno više godina (generacija). Nadalje, ispitivanje kombinatornih sposobnosti (općih – OKS i specifičnih – SKS) radno je vrlo zahtjevan i skup postupak otkrivanja superiornih hibridnih kombinacija. Sama komercijalna proizvodnja sjemena također je vrlo zahtjevna i skupa. Velike oplemenjivačke kompanije danas već koriste napredne tehnologije kojima uvelike rješavaju navedene probleme, ali male oplemenjivačke kuće poput naših u Hrvatskoj još uvijek ne koriste ove tehnologije. O ovome će kasnije biti još riječi.

Kod poljoprivrednih vrsta koje se u praksi razmnožavaju vegetativno (voćke, vinova loza, krumpir te neke vrste povrća i ukrasnog bilja) također postoje brojni izazovi kako u razvoju novih kultivara, tako i u proizvodnji njihova sadnog materijala. U slučaju voćaka i vinove loze (i drugog višegodišnjeg poljoprivrednog bilja) jedan generativni ciklus može trajati i nekoliko godina. Stoga oplemenjivački programi kod ovih vrsta traju značajno duže i znatno su skuplji. Kod velikog broja tih vrsta kultivari dolaze na tržište kao cjepovi (simbionti kultivara i podloge), a što zahtijeva oplemenjivački rad i na razvoju podloga te dodatno komplicira razvoj i izbor optimalnog kultivara za neko uzgojno područje. Pored nastojanja da se u razvoju novih kultivara osigura veći prinos i posebna kvaliteta, u oplemenjivanju takvih vrsta posebnu važnost imaju svojstva otpornosti na biotske i abiotske čimbenike jer se u praksi uzgajaju kao višegodišnji nasadi. Od dobrog kultivara, primjerice jabuke ili vinove loze, očekuje se da kroz dugi niz godina eksploatacije osigurava stabilnost agronomski važnih svojstava. Izbor roditelja za križanje, postupci procjene genotipske vrijednosti i brzog razmnožavanja imaju puno prostora za unapređenje.

Stoga, unatoč velikom napretku koje je oplemenjivanje bilja dalo poljoprivredi kroz razvoj modernih kultivara povijesno visoke rodnosti i specifične kvalitete, ostali su brojni izazovi.

U nastavku se ukazuje na ključne izazove klasičnog oplemenjivanja bilja za koje se očekuju rješenja

primjenom različitih tehnologija, a za neke i metoda molekularnog oplemenjivanja bilja.

1.2.1. Izbor roditelja i formiranje početnih oplemenjivačkih populacija

Uspješnost stvaranja superiornih kultivara u najvećoj mjeri ovisi o pravilnom izboru roditelja za zasnivanje početne oplemenjivačke populacije. Provedba uspješnog oplemenjivačkog programa neke poljoprivredne vrste nezamisliva je bez priručne kolekcije genotipova koji posjeduju genetsku osnovu za svojstva od interesa. Razinu ekspresije pojedinih svojstava moguće je objektivno procijeniti jedino ukoliko u istim uzgojnim uvjetima možemo promatrati i ocjenjivati veći broj genetski divergentnih genotipova. Priručne oplemenjivačke kolekcije sadrže izvore poželjnih gena i osiguravaju roditelje za razvoj oplemenjivačkih populacija. Da bi se oplemenjivač odlučio koristiti neki genotip iz kolekcije za razvoj nove populacije mora ga prethodno dobro upoznati kroz različite okolinske scenarije; primjerice učinke pojedinih godina ili uzgojnih uvjeta (npr. tolerantnost na sušu ili prekomjernu vlagu, tolerantnost na bolesti i štetnike, i sl.). Međutim, održavanje i evaluacija velike priručne kolekcije radno je zahtjevno i skupo. Alternativa je pristup javno dostupnim profesionalnim kolekcijama, posebno ukoliko su one kvalitetno održavane i evaluirane, i izložene sličnom okolinskom pritisku kao i oplemenjivački program. Kolekcije genotipova pojedinih vrsta (popularno „genbanke") često sadrže primke koje posjeduju visoke vrijednosti ekspresije pojedinih poželjnih svojstava, ali nažalost, obično u kombinaciji s jednim ili više nepoželjnih svojstava.

Stoga komercijalni oplemenjivači bilja kao početni materijal rijetko koriste primke iz genbanki, a najčešće koriste elitni materijal, tj. vodeće kultivare u tuzemstvu ili inozemstvu. Međutim, ovo obično za posljedicu ima nepoznati pedigre i nepoznatu reakciju genotipa na lokalne agroekološke uvjete, a može voditi i u sužavanje genetske osnove sortimenta.

Samo se rijetke ustanove ili kompanije odlučuju za integriranje nedovoljno elitnih primki (lokalne germplazme) u oplemenjivačke programe kroz postupke rekurentne selekcije ili stvaranja sintetičkih populacija. Ovaj važan zadatak identifikacije i akumulacije vrijednih gena projeklom iz starih sorata, populacija, pa čak i divljih srodnika, predstavlja određenu pred-oplemenjivačku fazu (*pre-breeding*) za stvaranje šire genetske osnove budućih oplemenjivačkih populacija. Danas to u pravilu provode znanstvene ustanove (javna sveučilišta i instituti). Imajući u vidu ranije spomenute izazove koje donose klimatske promjene, takvo iskorištenje bioraznolikosti vrlo je važno za budućnost oplemenjivanja bilja i poljoprivrede u cjelini. Primjena molekularnih biljega i metoda molekularnog oplemenjivanja u mnogome može unaprijediti postupke proširenja genetske osnove oplemenjivačkih populacija, a o čemu se može pročitati u narednim poglavljima.

1.2.2. Dugo vrijeme za razvoj homozigotnih linija

Za postupno postizanje zadovoljavajuće razine homozigotnosti oplemenjivačkih linija koristi se prirodna ili umjetna samooplodnja uz viši ili niži stupanj selekcije tijekom najmanje 5 – 6 generacija. Najveći broj oplemenjivača to provodi unutar svog pokusnog polja i taj proces onda kod jednogodišnjeg bilja traje isto toliko godina, a što je radno zahtjevno i skupo. Stoga je veliki izazov budućeg oplemenjivanja bilja skraćivanje vremena za dobivanje što većeg broja homozigotnih linija. Ovdje već postoje određena rješenja pa se velike i napredne oplemenjivačke kompanije već desetljećima koriste „zimskom generacijom" kako bi tijekom zime u drugoj hemisferi (ili u klima-komorama) proveli još jednu ili nekoliko generacija samooplodnje i tako ubrzali postizanje homozigotnosti. Vodeće oplemenjivačke kompanije danas razvijaju inbred linije i tehnikama dihaploida kojima je samo unutar jedne godine moguće razviti veliki broj potpuno homozigotnih linija (Germanà, 2011.; Prasanna i sur., 2012.; Humphreys i Knox, 2015.). Zadnjih se godina intenzivno kod raznih kultura istražuje i razvija tehnologija „ubrzanog

oplemenjivanja" (engl. *speed breeding*), a što pretpostavlja uzgoj više generacija tijekom jedne godine u sofisticiranim klima-komorama (Wanga i sur., 2021.). Jasno, ti su postupci tehnološki i financijski vrlo zahtjevni te zasigurno utječu na povećanu cijenu sjemena, ali značajno doprinose bržem razvoju novih i boljih kultivara. Hrvatski oplemenjivači koriste „zimsku generaciju", a na Poljoprivrednom institutu u Osijeku učinjeni su i pionirski koraci u razvoju dihaploidnih inbred linija kukuruza, međutim, za puno iskorištenje te tehnologije kod različitih poljoprivrednih vrsta potrebna je šira znanstvena i infrastrukturna podrška. Iako je taj izazov izvan fokusa ove knjige, moguće je i trebalo bi ga integrirati s metodama molekularnog oplemenjivanja bilja (Murovec i Bohanec, 2012.; Prasanna i sur., 2012.).

1.2.3. Povećanje rodnosti i kvalitete oplemenjivačkih linija

U Oplemenjivanju bilo koje poljoprivredne vrste, prinos po jedinici površine predstavlja primarno svojstvo. Prosječni prinosi u zadnjih sto godina moderne poljoprivrede, povećani su nekoliko puta kod najvažnijih kultura. To je rezultat unapređenja raznih tehnologija uzgoja (gnojidba, zaštita od bolesti i štetnika, suzbijanje korova, napredna mehanizacija i nove sorte). Iz više kompleksnih studija kod globalno najvažnijih poljoprivrednih kultura u kojima je analiziran doprinos različitih znanosti i tehnologija koje su dovele do ovog povećanja razvidno je da je doprinos oplemenjivanja (genetske dobiti od selekcije) u ovom povećanju vrlo značajan i kreće se između 30 i 50 % (Reeves i Cassaday, 2002.; Duvick, 2005.). Međutim, analiza linije trenda porasta prosječnih prinosa po dekadama pokazuju da u nekoliko zadnjih dekada oplemenjivanje na prinos u nekim zemljama s vrlo naprednom poljoprivredom i oplemenjivanjem bilja, poput Francuske (Schauberger i sur., 2018.) i SAD-a (Assefa i sur., 2017.) ukazuju na znakove usporavanja ili stagnacije. To bi moglo značiti da je rezervoar germplazme koja se koristi u komercijalnom oplemenjivanju iscrpljen i da postupno ulazimo u zonu „plafona prinosa" u pojedinim agroekološkim uvjetima.

Procjena prinosa oplemenjivačkih linija, neovisno o metodi razvoja početnih oplemenjivačkih populacija i načinu postizanja genetske homogenosti, ključni je dio oplemenjivačkog procesa. To znači odabrati najbolje genotipove koji će u interakciji s raznim okolinskim čimbenicima dati visoke i stabilne prinose odgovarajuće kvalitete. Ovo se u praksi provodi kroz višegodišnje preliminarne i komparativne multilokacijske poljske pokuse sa stotinama oplemenjivačkih linija, a što je radno vrlo zahtjevno i skupo. Iako su desetljećima istraživane metode indirektne selekcije te usavršavane različite metode poljskih pokusa i njihovih laboratorijskih alternativa, i danas je glavni izazov pouzdana procjena vrijednosti genotipa koji će rezultirati superiornim fenotipom. Selekcija po genotipu metodama molekularnog oplemenjivanja, primjerice, metodom genomske selekcije ili selekcijom višestrukih QTL-ova (Zhang i sur., 2022.) mogle bi biti korisne komplementarne metode.

Kada su u pitanju druga svojstva, oplemenjivanje skoro svake globalno važne vrste bavi se brojnim specifičnim problemima. Tako primjerice uzgoj brojnih kultura opterećuju specifične bolesti, i štetnici tako da umanjuju prinos, a za koje oplemenjivanje bilja još uvijek nema potpuna rješenja, pa u njihovoj kontroli dominiraju kemijska zaštitna sredstva. Dostupnost i učinkovit unos gena otpornosti za pojedine patogene u elitnu germplazmu još je uvijek veliki izazov klasičnog oplemenjivanja bilja. Iako postoje poznata rješenja, ona su obično dugotrajna i skupa, ili su alternativni načini kontrole ekonomski prihvatljiviji. Teoretski, uvođenje gena otpornosti metodom povratnih križanja u elitne kultivare predstavlja ekološki najbolji način kontrole patogena, a za proizvođače vjerojatno i najjeftiniji. Međutim, vrijeme potrebno za razvoj otpornog elitnog kultivara (ili komponente hibrida) ovom metodom malo je kraće od prosječnog „životnog vijeka" modernih kultivara. Osim toga, potrebni stupanj i stabilnost otpornosti nije lako ostvariti. Kod nekih poljoprivrednih vrsta unutar oplemenjivačke germplazme

nema dovoljno (ili uopće) gena otpornosti. Rješenja su moguća primjenom izvora gena iz starih populacija ili divljih srodnika, ali su ona ostvariva tek kroz dugoročne oplemenjivačke postupke. U nekim slučajevima, rješenje može biti i primjena induciranih mutacija, ali ovaj pristup karakteriziraju niska frekvencija korisnih mutacija i neželjeni učinci na druga svojstva. Dobra rješenja u oplemenjivanju otpornosti na bolesti, ali i drugih kvalitativnih svojstava, nudi primjena nekih metoda molekularnog oplemenjivanja. Vrlo učinkovit pristup unošenju pojedinačnih gena danas osiguravaju metode genetičkog inženjerstva, a posebno metode uređenja gena (engl. *gene editing*). Međutim, ove metode još uvijek izazivaju etičke kontraverze i praćene su brojnim administrativnim ograničenjima pa se u mnogim zemljama (pa tako i u Hrvatskoj) ne koriste u komercijalnom oplemenjivanju bilja.

Zaključno, brojni su izazovi koji stoje pred oplemenjivanjem bilja u bližoj budućnosti. Sve su stroži zahtjevi kvalitete i sigurnosti poljoprivrednih sirovina. Aktualna europska „Strategija od polja do stola" s provedbenim dokumentima postavlja cilj do 2030. godine smanjiti za 50 % upotrebu kemijskih pesticida i drugih rizičnih spojeva u poljoprivredi (European Commission, 2022.). To dodatno motivira oplemenjivače za oplemenjivanje na otpornost prema bolestima i štetnicima. Klimatske promjene stvaraju potrebu za novim kultivarima posebnih mehanizama prilagodibe na sve izraženije okolinske stresove. Vjerojatno će uslijed klimatskih promjena u nekim regijama proizvodnja pojedinih tradicionalnih vrsta postati teško održiva, ali se istovremeno može očekivati i introdukcija i uzgoj potpuno novih kultura. Isto tako, rastuća potražnja i segment tržišta proizvoda iz ekološkog uzgoja stvara potrebu razvoja potpuno novih tipova kultivara, a koji nisu u fokusu današnjeg komercijalnog oplemenjivanja.

1.3. POČECI I RAZVOJ MOLEKULARNOG OPLEMENJIVANJA

Dugotrajnost i visoki troškovi procjene kompleksnih kvantitativnih svojstava poput prinosa, već dugi niz godina zaokupljaju pažnju istraživača. U prošlom su stoljeću provedena brojna istraživanja usmjerena na različita sekundarna svojstva biljaka, tzv. „komponente prinosa", poput broja zrna po biljci, mase zrna, dužine klasa ili klipa, dlakavost lista, visina biljke i drugih morfoloških svojstava kod kojih je proučavana varijabilnost i stupanj nasljednosti. Bio je ovo pokušaj utvrđivanja povezanosti lako mjerljivih i genetski stabilnih morfoloških svojstava s onim agronomski važnim i tako putem indirektne selekcije pojednostavniti i ubrzati selekciju. Utvrđene su korelacije različite jačine između ovakvih svojstava i prinosa, kvalitete i otpornosti na bolesti, ali ta povezanost nije bila dovoljno čvrsta i nikada nije dovela do jednostavne selekcije superiornih genotipova.

Sama ideja povezanosti svojstava zasniva se na vezanosti njihovih gena, tj. vezanosti genskih lokusa agronomski važnog svojstva i indirektnog lakše mjerljivog svojstva. Ukoliko su dva monogena svojstva kontrolirana s genskih lokusa koji su na istom kromosomu, i uz to još i fizički relativno blizu, onda postoji visoka vjerojatnost da će alelni geni tih lokusa u procesu tvorbe gameta tvoriti haplotip i završiti skupa u istoj spolnoj stanici. Selekcijom na jedno svojstvo, istovremeno se odabire i drugo svojstvo. Međutim, kako je broj jednostavno uočljivih ili mjerljivih svojstava na biljci ograničen, a uz to često i kontroliran s više lokusa u genomu, koncept indirektne selekcije nikada nije zamijenio izravnu fenotipizaciju u poljskim pokusima.

Sredinom pedesetih godina prošlog stoljeća ubrzano se razvijaju biokemijske metode za detekciju i kvantifikaciju različitih molekula biljnog porijekla. U tom je vremenu otkrivena i polimorfnost molekula enzima primjenom elektroforeze. Početkom sedamdesetih godina započinju istraživanja u području oplemenjivanja bilja u kojima se istražuje polimorfizam enzima kod populacija i sorata poljoprivrednog bilja. Stuber i Moll (1972.) i Stuber i sur. (1982.)

analiziraju genetski diverzitet populacija kukuruza iz različitih ciklusa rekurentne selekcije i otkrivaju promjene u frekvenciji alela izoenzima i njihove korelacije s prinosom, slijedeći istu paradigmu ranije spomenute vezanosti gena iz klasične genetike. Analogno determinaciji morfološkog diverziteta jedinki u populaciji biljaka putem razine ekspresije kvalitativnih svojstava, polimorfizam pojedinih enzima pokazuje se upotrebljivim u identifikaciji pojedinih oplemenjivačkih linija ili sorata i njihovom međusobnom razlikovanju.

U početku se varijante jednog enzima (izoenzimi) tumače kao molekule specifične za dati supstrat, a potom se sve više povezuju s ekspresijom gena, označavaju se kao gen-biljezi i definiraju kao genetički determinirane varijante jednog enzima u istom organizmu sa sličnom supstratnom specifičnošću. Otkriveno je da pojedini izoenzimi mogu biti kodirani s jednog ili više lokusa. Analize polimorfizma u razdvajajućim generacijama potvrđuju izoenzime kao korisne kodominantne genetske biljege. S obzirom na njihovu fiziološku ulogu u procesima rasta i razvoja i stabilnost njihova fenotipa naspram okoline, izoenzimi se pokazuju perspektivnim molekularnim biljezima za selekciju po genotipu. Međutim, broj različitih enzima i razina njihovog polimorfizma nisu omogućavali naprednije genetske analize i preciznije oplemenjivanje. Zapravo, u potpunosti i nisu istraženi svi potencijali izoenzima kao molekularnih biljega jer se početkom osamdesetih godina 20. stoljeća pojavljuju novi tipovi biljega na bazi DNA koji će ih potisnuti.

Era DNA biljega započinje otkrićem biljega RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymophism*) koji se zasnivaju na polimorfizmu DNA molekula (Botstein i sur., 1980.). Polazni materijal za istraživanja s ovom metodom, a i cijelim nizom drugih koje će uslijediti, je genomska DNA. Time je postalo važno ovladati laboratorijskim tehnikama izolacije DNA iz različitih biljnih tkiva jer za većinu metoda molekularnog oplemenjivanja koje se i danas koriste, prvi korak u postupku genotipizacije predstavlja izolacija DNA. U narednom poglavlju ove knjige detaljno se opisuju postupci uzimanja uzoraka, izolacije, analize kvalitete i čuvanja DNA. RFLP predstavljaju fragmenti DNA izrezani specifičnim restrikcijskim enzimima i obilježeni posebnim sondama ili probama, elektroforetski razdvojeni prema duljini. Njihov elektroforetski fenotip za pojedini genotip diploidnih vrsta predstavljaju jedna ili dvije crtice (*bands*) koje su analogne genskim alelima. RFLP biljezi nasljeđuju se kodominantno, a broj i polimorfizam alela po lokusu daleko nadmašuje onaj kod izoenzima (Helentjaris i sur., 1985.). S ovom su tehnologijom oplemenjivači dobili „alat" kojim su mogli kartirati cijelim genom i utvrditi pozicije pojedinačnih gena i skupina lokusa odgovornih za kvantitativna svojstva (engl. *quantitative trait loci*; QTL). Ova tehnologija genetske karakterizacije pojedinih biljaka čiji su molekularni profili slobodni od okolinskih čimbenika, obećava pomoć u preciznoj selekciji na specifična kvalitativna svojstva, a dijelom i kvantitativna, i uvodi danas poznatu sintagmu „selekcije potpomognute biljezima" (engl. *Marker Assisted Selection*; MAS). Za mnoge kultivirane vrste, kukuruz među prvima, napravljene su vrlo guste genetske karte s velikim brojem biljega (Helentjaris, 1987.; Heun i sur., 1991.; Tanksley i sur., 1992.). Međutim, kao i svaka druga metoda i RFLP ima svoje nedostatke. Radno je zahtjevna, vrlo teška za automatizaciju, a probe (sonde) ključne u detekciji polimorfizma nisu bile široko dostupne u tim godinama. Međutim, na razini današnje tehnologije sve to bi bilo lako rješivo, ali se 1985. dogodilo revolucionarno oktriće PCR tehnologije koja je polučila nove tipove molekularnih biljega (RAPD, SSR, AFLP...) koji su znatno pojeftinili i ubrzali genotipizaciju. U odnosu na RFLP, metode na bazi PCR-a zahtijevaju znatno manje količine i manje kvalitetnu DNA, postupak generiranja i analize fragmenata znatno je brži. Tehnološki postupak laboratorijskih tehnika ubrzano se automatizira pa muktorpno ručno pipetiranje zamjenjuju roboti, PCR rekacija potpuno je automatizirana, a osjetljivi postupak elektroforetskog razdvajanja fragemnata putem horizontalne elektroforeze ubrzo zamjenjuju sofisticirani strojevi na bazi gel i kapilarne elektroforeze uz lasersku detekciju

veličine fragmenata i automatsko očitavanje dužine fragmenata. Razvijaju se potpuno nove tehnologije detekcije polimorfizma DNA i novi tipovi biljega. Jedan od njih, jednonukleotidni polimorfizam (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP), posebno nakon razvoja tehnologije čipova, postat će univerzalno vrijedan genetski biljeg s potencijalom vrlo široke primjene. Genotipizacija biljega SNP u početku je bila skupa i rezervirana samo za velike laboratorije, ali zbog mogućnosti potpune automatizacije, u samo nekoliko godina postala je široko dostupna znanstvenoj zajednici putem brojnih privatnih servisa za genotipizaciju. Oplemenjivači više ne moraju imati vlasiti laboratorij da bi se bavili molekularnim oplemenjivanjem bilja. Usporedno se razvijaju i tehnike sekvenciranja genoma pa ubrzano rastu spoznaje o strukturi genoma i funkciji pojedinačnih gena gospodarski najvažnijih vrsta. Prvi projekti sekvenciranja cijelog genoma, od početnog ljudskog genoma koji je trajao nekoliko godina i izvođen simultano u više laboratorija, vrijedili su milijune dolara, a izvodile su ih samo vrhunski opremljene znanstvene ustanove. Danas je postalo moguće sekvencirati genom neke vrste u nekoliko dana po vrlo prihvatljivim iznosima. Naime, razvoj oplemenjivanja i genetike dobrim dijelom su zasnovani na ubrzanom napretku elektronske industrije i novih sistema sekvenciranja genoma koji postaju sve dostupniji i cjenovno pristupačniji. Kao ilustracija brzog i uzajamnog napretka genomike i mikroelektronike može poslužiti razvoj i dostupnost nove generacije sekvenciranja na primjeru humanog genoma koji dovodi do ubrzanog pada troškova genotipizacije, bržim od onoga koji predviđa Mooreov zakon (November, 2018.). Detaljne informacije o tipovima i svojstvima raznih molekularnih biljega, kao i postupcima genotipizacije, dostupne su iz brojne literature. Osim toga, o ovim tehnologijama i metodama danas se studente poučava teoretski i praktično kroz studijske programe raznih studija prirodnih i poljoprivrednih znanosti.

Zahvaljujući razvoju molekularne biologije, početkom 1990-ih genetsko poboljšanje poljoprivrednih kultura otišlo je u jednom sasvim posebnom pravcu. Modifikacijom i primjenom patogenih mehanizama otkrivenih kod bakterija i virusa uspješno su unešeni dijelovi DNA u genom poljoprivrednih kultura čime je započela era genetičkog inženjerstva ili „transfera gena" kojom su stvoreni genetički modificirani (GM) kultivari. Poslije su otkriveni i drugi mehanizmi prijenosa stranih gena. Ovom tehnologijom postalo je moguće savladati barijere seksualne inkopatibilnosti i prenijeti pojedinačne gene za svojstva poželjne ekspresije iz vrlo udaljenih taksonomskih skupina u genom domaćina. To je omogućilo relativno brzo poboljšanje (modifikaciju) genotipa postojećih kultivara inaktivacijom ili unosom (jednog ili nekoliko pojedinačnih) gena koji su se eksprimirali na fenotipu domaćina. Postignuća takve tehnologije zaista su impresivna. Primjerice, unos *bt* gena iz bakterije *Bacillus thuringiensis* u kukuruz, a koji je omogućio sintezu insekticidnog proteina, učinio je brojne hibride kukuruza otpornim na štete od kukuruznog moljca i kukuruzne zlatice, ekonomski vrlo štetnih kukaca koji svake godine pričinjavaju ogromne štete u proizvodnji kukuruza. Globalni problem u proizvodnji soje, kontrola korova, riješen je unosom gena za tolerantnost na aktivnu tvar specifičnih totalnih herbicida čija je primjena znatno jednostavnija i okolišno prihvatljivija. Uzgoj GM kultivara soje postao je puno sigurniji i ekonomski isplativiji. Eksperimentalno su razvijeni, i u pokusima potvrđeni, uspješni prijenosi različitih gena za različita svojstva kod svih najvažnijih poljoprivrednih kultura. Potencijal genetičkog inženjerstva činio se neograničen i nudio mogućnost „popravaka" dobro etabliranih kultivara, posebno kod drvenastog i višegodišnjeg bilja, jer unosom novih gena nije mijenjan osnovni genotip kultivara. Međutim, pojavile su se sumnje i protesti vezani uz primjenu ove tehnologije jer su teoretski (a u nekim slučajevima i dokazano) mogući nekontrolirani procesi i neželjene posljedice globalnog karaktera (Mackelprang i Lemaux, 2020.). Unatoč superiornosti i ekstremno brzom širenju u praksi GM kultivara na prostoru Sjeverne i Južne Amerike, pitanje tehnologije genetičkog inženjerstva i genetski modificiranih organizama (GMO) postali

su najprije ekološko i etičko, a potom i političko pitanje. Ekspanzija ove tehnologije i njome stvorenih sorata nastavila se u Sjevernoj i Južnoj Americi, ali je u samom početku zaustavljena u Europi i brojnim pojedinačnim državama u svijetu. Kao posljedica ovoga, stvorena je posebna zakonska regulativa u brojnim državama koja upotrebu GM sorata čini vrlo restriktivnom ili potpuno zabranjenom. Među njima je i Hrvatska.

Iako su istraživači i zagovornici genetičkog istraživanja godinama dokazivali bezopasnot takve tehnologije i izvršili brojna poboljšanja i rješenja naspram predočenih rizika, u Europi do danas nema ekonomski značajne proizvodnje s GM kultivarima, a oplemenjivačke kuće u pravilu ne koriste ovu tehnologiju. Zadnjih je nekoliko godina na sceni tehnologija pod imenom „uređenje genoma" (engl. *genome editing*) koja se zasniva na ciljanoj mutagenezi koja omogućuje vrlo precizne promjene genoma postojećih kultivara. Tom je tehnologijom moguće inaktivirati postojeće ili umetati nove gene u genom domaćina, ekvivalentno drugim tehnikama transfera gena, ali i inducirati mono- ili oligo-nukleotidne mutacije koje se ne razlikuju od spontanih (Jung i sur., 2018.). U tijeku su nastojanja znanstvene zajednice da u okviru pravnog i regulatornog sustava Europske unije dokažu sigurnost te tehnologije i odvoje je od postojećeg regulatornog sustava za GMO.

1.4. AKTUALNI STATUS PRIMJENE METODA MOLEKULARNOG OPLEMENJIVANJA BILJA

Tehnike molekularnih biljega (markera) i molekularnog oplemenjivanja koje se opisuje u ovoj knjizi pripadaju skupini biotehnoloških dijagnostičkih metoda koje same po sebi ne mijenjaju genom domaćina već samo selekciju čine bržom i preciznijom (Lübberstedt i Varshney, 2013.). U nastavku se iznose najčešće primjene koje su unaprijedile procese istraživanja genetske varijabilnosti, oplemenjivanja bilja i proizvodnje reproduktivnog materijala.

Prva korisna primjena dogodila se još s razvojem tehnike izoenzima, a odnosi se na „genetičku identifikaciju genotipa" (engl. *genetic fingerprinting*). Zahvaljujući stabilnom elektroforetskom profilu molekularnih biljega koji ostaje nepromijenjen uslijed djelovanja okolinskih čimbenika, postalo je moguće pouzdano razlikovati oplemenjivačke linije i sorte u vrlo ranim fazama razvoja biljke, a i kada to po fenotipu nije moguće. To je brzo našlo primjenu u sjemenarstvu i rasadničarstvu za provjeru i potvrdu genotipa i genetske čistoće tijekom ciklusa razmnožavanja. Isto tako, molekularni su biljezi danas nezamjenjiv alat u održavanju kolekcija poljoprivrednog bilja pa su doveli do otkrića brojnih sinonima i homonima i pomogli u racionalnijem održavanju biljnih genetskih izvora.

U dodatku na jednostavnu identifikaciju i razlikovanje primki/kultivara, molekularni biljezi, posebno oni kodominantnog tipa, omogućuju analizu i procjenu različitih genetskih parametara koji omogućuju analizu genetske strukture populacija, filogenetskih veza, stupanj srodstva i same srodstvene veze (pedigre). Oplemenjivačima je ovo korisno u izboru roditelja, ali i zaštiti oplemenjivačkih prava. Molekularni se biljezi danas koriste rutinski u identifikaciji sorata kao isključiva ili komplementarna metoda morfološkoj karakterizaciji u službi dokazivanja jedinstvenosti i posebnosti novih kultivara (DUS). Postoje brojne internacionalne i nacionalne baze genetskih profila sorata svih gospodarski važnih poljoprivrednih vrsta, a koje se koriste pretežno u istraživačke i oplemenjivačke svrhe. Ipak, kada je u pitanju pouzdano (službeno) razlikovanje sorata, još uvijek ne postoje standardizirani protokoli kojima se jasno razdvajaju originalne sorte (nastale selekcijom iz biparentalnih ili složenijih populacija) od blisko srodnih linija nastalih primjenom povratnih križanja, ili pak klonova u slučaju vegetativno održavanih sorata. Pokušaji ustanovljenja službene granične vrijednosti genetskog srodstva procijenjene molekularnim biljezima, a koja bi sortu činila jedinstvenom ili izvedenom od već postojeće sorte (engl. *essentially derived variety*; EDV) još nisu postigli znanstveni i stručni konsenzus.

Kao što je ranije spomenuto, izbor pravih roditelja i razvoj početne oplemenjivačke populacije u

najvećoj mjeri određuje uspješnost razvoja novog superiornog kultivara. Stoga za dugoročne pomake u komercijalnom oplemenjivanju bilja od posebne važnosti moraju biti globalne, regionalne i nacionalne kolekcije germplazme. Njihova korisnost u velikoj mjeri ovisi o metodama evaluacije održavanih primki, ali prije svega o svrhovitoj genotipizaciji i analizi genetske varijabilnosti za potrebe oplemenjivanja bilja. Za potrebe identifikacije i razlikovanja primki u kolekcijama primjenjuju se određeni morfološki deskriptori, ali pouzdan status pojedinih primki nije moguć bez primjene molekularnih biljega. U tu se svrhu još uvijek najčešće koriste mikrosateliti (SSR) jer su relativno jeftina tehnologija prikladna za male priručne laboratorije; dovoljno su ponovljivi i jednostavni u interpretaciji, posebno ukoliko se koriste za identifikaciju linijskih i klonskih kultivara. Kada su u pitanju heterogene populacije stranooplodnih vrsta, DNA profilacija pomoću molekularnih biljega postaje složenija. Više recentnih istraživanja pokazuje da genotipizacija primjenom SNP ili drugih tipova biljega (koji omogućuju puno više genetskih podataka) ne osigurava značajno veću učinkovitost ili preciznost u analizi međusobnih odnosa. Istraživanja genetske strukture većeg broja primki, kao i analiza stupnja genetskog srodstva pojedinih jedinki ili skupina, mogu pomoći oplemenjivačima u rekonstrukciji pedigrea i izboru genetski divergentnijih roditeljskih parova. Primjena molekularnih biljega osobito bi bila korisna u pred-oplemenjivačkim postupcima, tj. razvoju sintetičkih populacija i pretapanju egzotične germplazme u elitnu. U ovome bi bila nužna suradnja oplemenjivača, kuratora kolekcija i populacijskih genetičara.

Ipak, ponajveća očekivanja i doprinos ogleda se u selekciji potpomognutoj biljezima (MAS). Primjeni ove tehnologije u praktičnom oplemenjivanj bilja prethodila su temeljna istraživanja za izradu genetskih karata i identifikacije lokusa gena za agronomski važna svojstva (popularno QTL-ova). Genetska karta s poznatim lokusima u oplemenjivanju važnih svojstava i njima tijesno vezanim genetskim biljezima neophodan je preduvjet za izradu konkretnih laboratorijskih protokola za izravnu primjenu selekcije pomoću biljega.

Postoje (i povijesno su korišteni) različiti pristupi u otkrivanju QTL-ova i njihove povezanosti (kosegregacije) s molekularnim biljezima. Početna istraživanja koristila su u pravilu genetski varijabilne biparentalne populacije čije su jedinke ili potomstva u poljskim uvjetima detaljno analizirani na više agronomskih svojstava i istovremeno genotipizirane većim brojem molekularnih biljega što gušće i ravnomjernije raspoređenih u genomu. Potom je analizirana značajnost povezanosti svojstva i pojedinačnih biljega. Ovaj jednostavan pristup u slučaju malih populacija, a posebno skromnog broja biljega, ima brojnih nedostataka. Ubrzo su se pojavile nove metode i računalni programski alati za intervalno i višestruko kartiranje koje su unaprijedile detekciju QTL-ova i njihovih korisnih biljega. Ove se metode detaljno opisuju u 4. poglavlju ove knjige.

Iz brojnih studija kartiranja proistekli su molekularni biljezi čvrsto povezani s QTL-ovima za brojna važna, pretežno jednostavno nasljedna svojstva. Danas se kod brojnih poljoprivrednih vrsta u oplemenjivanju koriste molekularni biljezi za odabir biljaka s poželjnim genotipom za pojedinačna agronomski važna svojstva. Dobar primjer su nove sorte vinove loze otporne na pepelnicu i plamenjaču (PIWI) gdje vodeće oplemenjivačke ustanove u Europi i SAD-u već godinama koriste molekularne biljege u razvoju sorata otpornih na navedene bolesti. Selekcija po fenotipu moguća je i klasičnim oplemenjivanjem, ali u razvoju sorata s kompleksnom otpornošću koja se zasniva na introdukciji više različitih gena otpornosti (piramidizacija gena) molekularni biljezi su neophodan alat (Topfer i sur., 2011.). Dobar primjer je i selekcija pomoću biljega za svojstvo besjemenosti (bobice bez sjemenki) kod stolnih sorata vinove loze. Primjenom MAS-a selekciju je moguće provesti još u fazi sjemenjaka, nekoliko godina prije nego što bi to bilo moguće u klasičnoj selekciji po fenotipu (Adam-Blondon i sur., 2001.). MAS se uspješno koristi i kod soje u selekciji jedinki s niskim sadržajem tripsin inhibitora u sjemenu. Analizom samo jednog

biljeg lokusa u F2 populaciji, moguće je odabrati poželjne homozigote za svojstvo niskog sadržaja koji će ostati fiksiran do kraja selekcijskog postupka na druga svojstva (Bulatova i sur., 2019.).

Međutim, početna očekivanja (i zanos) vezana uz primjenu molekularnih biljega u selekciji na kvantitativna svojstva nisu ostvarena. Unatoč eksperimentalno utvrđenim brojnim QTL-ovima povezanim s prinosom i drugim multigenskim svojstvima, procijenjeni pojedinačni učinci (udio objašnjene genotipske varijance, R^2) pojedinih QTL-ova u ukupnoj genotipskoj varijanci u studijama kartiranja nisu bili dovoljni za učinkovitu selekciju u realnim oplemenjivačkim programima, čak i u slučaju istovremene selekcije na nekoliko QTL-ova. Također, ubrzo je ustanovljeno da su QTL-ovi detektirani u jednoj genetskoj pozadini rijetko funkcionirali u drugoj. Izostala su otkrića QTL-ova velikog učinka na prinos koji imaju stabilno mjesto u genomu jedne vrste i koji bi omogućili univerzalnu primjenu u različitim populacijama te vodili postupnoj akumulaciji poželjnih QTL-ova. Očekivanje da će u selekciji potpomognutoj biljezima biti potrebno samo primijeniti protokol genotipizacije za točno određene biljege i potom samo napraviti selekciju u laboratoriju, nije se ispunilo. Razlozi za ovo iscrpno se obrazlažu u 4. i 5. poglavlju ove knjige.

Svejedno, selekcija potpomognuta biljezima danas se široko primjenjuje za cijeli niz kvalitativnih svojstava i predstavlja rutinski postupak u mnogim oplemenjivačkim programima. Ovaj pristup značajno je pridonio racionalizaciji poljskih i laboratorijskih ispitivanja te povećao preciznost selekcije. Brojne nedavne studije kartiranja kod različitih vrsta i različitih populacija unutar pojedinih vrsta, a koje se zasnivaju na novim metodama genotipizacije i kartiranja QTL-ova, i dalje imaju za cilj upravo otkrivanje i izradu pouzdanih specifičnih biljega za različita agronomski važna svojstva. Dobar uvid u stanje raspoloživih biljega, pretežno otkrivenih u studijama kartiranja s biparentalnim populacijama, a koji se koriste u komercijalnom oplemenjivanju različitih vrsta daju Hasan i sur. (2021.).

Tijekom vremena došlo se do spoznaje da ograničenja u selekciji kvantitativnih svojstava pomoću biljega proizlaze iz samog načina detekcije QTL-ova u biparentalnim populacijama. Zadnjih godina u fokus istraživanja došao je novi pristup u prepoznavanju QTL-ova metodom pridružujućeg kartiranja (engl. *association mapping*), a koja se u literaturi još naziva i cjelogenomska studija pridruživanja (engl. *genome-wide association study*; GWAS). Umjesto za razvoj zahtjevnih razdvajajućih populacija s limitiranim polimorfizmom svojstava, za utvrđivanje povezanosti biljega i agronomskih svojstava moguće je upotrijebiti i velike populacije međusobno nesrodnih i različitih sorata i/ili linija. Uz precizne fenotipske podatke i veliku količinu genotipskih podataka (gusto raspoređenih po cijelom genomu) primjenom odgovarajućih algoritama, provodi se otkrivanje i kartiranje novih QTL-ova s određenim poboljšanjima u odnosu na prethodno navedene metode. Ovaj model kartiranja QTL-ova detaljno se opisuje u 5. poglavlju ove knjige.

Perspektivan iskorak u selekciji na kvantitativna svojstva potpomognutoj biljezima mogla bi predstavljati genomska selekcija (engl. *genomic selection*; GS). Metoda genomske selekcije ne zahtijeva prethodno kartiranje i identifikaciju QTL-a, a svoju učinkovitost pokazuje upravo u selekciji poligenih kvantitativnih svojstava. Genomska se selekcija oslanja na genotipizaciju s desetinama tisuća biljega (obično SNP) dobro raspoređenih po cijelom genomu. Genotipizacija se najprije provede za sve jedinke tzv. trenažne populacije koju čini veći broj elitnih kultivara s visokom oplemenjivačkom vrijednošću utvrđenom kroz kvalitetnu fenotipizaciju. Potom se provodi kalibracija fenotipa prema biljezima posebnim modelima predviđanja (tzv. treniranje modela) te izradi kalibracijska krivulja. U drugom se koraku provodi genotipizacija oplemenjivačke populacije (skupine linija) te se prema odabranoj kalibracijskoj krivulji vrši predviđanje svojstava bez fenotipizacije. Početna iskustva s genomskom selekcijom kod nekoliko vrsta, posebno kada su trenažna i oplemenjivačka populacija relativno srodne, pokazuju uspješnost selekcije

na prinos, tj. linije odabrane u postupku genomske selekcije pokazuju superiornost i u poljskim ispitivanjima. Uspješnost naravno nije 100-postotna, ali je zadovoljavajuće dobra i u najmanju ruku obećava učinkovito odbacivanje neperspektivnih linija. Ovdje treba naglasiti da je upravo preliminarno ispitivanje velikog broja F5 ili F6 linija najskuplji i najnepreciziniji dio klasičnog oplemenjivanja bilja. U ovom trenutku, troškovi genomske selekcije približno su jednaki troškovima poljskih pokusa, ali se u bliskoj budućnosti očekuje značajno jeftinija genotipizacija. Istovremeno, troškovi su klasične fenotipizacije (s dosta ljudskog rada i energije) u porastu. Potencijal, ali i neka ograničenja genomske selekcije, detaljno se opisuje u poglavlju 6.

Nove tehnologije genotipizacije proizvode enormne količine genetskih podataka koje zahtijevaju posebna znanja i alate za njihovo procesiranje te potpuno nove načine interpretacije rezultata. Stoga, iako je danas ukupno znanje o strukturi genoma i načinu nasljeđivanja agronomski važnih svojstava puno veće, a velike količine genetskih podataka dostupne po prihvatljivoj cijeni, njihovo procesiranje i interpretacija vrlo su složeni i zahtijevaju visoko specijalizirana znanja, posebno iz područja statistike i informatike.

1.5. PRAVCI RAZVOJA I MOGUĆNOSTI KOMPLEMENTIRANJA KLASIČNOG I MOLEKULARNOG OPLEMENJIVANJA U HRVATSKOJ

Znanastveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv) osnovan je s ciljem da unaprijedi temeljna znanja i omogući primjenu tehnologija molekularnog oplemenjivanja. Kao objekt istraživanja Centra odabrano je više različitih poljoprivrednih vrsta različitog gospodarskog značaja, od samoniklih i lokalnih populacija, preko autohtonih sorti do gospodarski najvažnijih vrsta zastupljenih s modernim kultivarima. Isto tako, odabrane modelne vrste različitih su bioloških karakteristika (samooplodne i stranooplodne vrste te trajnice koje se razmnožavaju vegetativno). U istraživanju tih vrsta korištene su suvremene metode i najnovije tehnologije genotipizacije i fenotipizacije. Iz ukupnog djelovanja Centra očekuju su usko specijalizirani kadrovi, istraživačka oprema te nove strategije i budući projekti usmjereni na veću primjenu biotehnoloških metoda u nacionalnim programima oplemenjivanja poljoprivrednog bilja.

Iako je oplemenjivanje bilja u Hrvatskoj dalo ogroman doprinos općem razvoju i još se uvijek na tržištu sjemena uspješno nosi s konkurencijom multinacionalnih kompanija, za očuvanje ili unapređenje te pozicije neophodno je osuvremeniti skoro sve postupke i faze oplemenjivačkih programa. Pored stalnog fokusa na viši urod i kvalitetu brojni su drugi izazovi koje mogu i trebaju riješiti budući kultivari.

U tablici 1.1. navedeni su ključni izazovi koje bi trebalo rješavati u narednom razdoblju, a za koje znanstvena zajednica s metodama molekularnog oplemenjivanja ima više rješenja.

TABLICA 1.1. **IZAZOVI KOMERCIJALNOG OPLEMENJIVANJA I MOGUĆA RJEŠENJA – IDEJE ZA BUDUĆE PROJEKTE**

IZAZOV ILI OGRANIČENJE	POTENCIJALNO RJEŠENJE	DIONICI
Pouzdane i kvalitetno održavane kolekcije genotipova (gen-banke) za Hrvatsku najvažnijih ili perspektivnih poljoprivrednih vrsta.	Sakupljačke misije, introdukcija, redovna evaluacija i genetička karakterizacija. Umrežavanje s međunarodnim kolekcijama, razmjena materijala i edukacija. Umrežavanje s oplemenjivačkim kućama.	Javni instituti, sveučilišta, veleučilišta i srednje poljoprivredne škole. Oplemenjivači bilja kao eksperti za fenotipizaciju.
Razvoj predoplemenjivačkih populacija na bazi elitne germplazme i lokalnih BGI.	Dobro osmišljeni programi razvoja sintetičkih populacija i dugoročni programi rekurentne selekcije za svojstva adaptabilnosti i prilagodbe klimatskim promjenama s posebnim fokusom na sušu (izgradnja infrastrukture za induciranu sušu).	Javni instituti, sveučilišta, i oplemenjivačke kuće (tuzemne i inozemne).
Kolekcioniranje i evaluacija autohtonih sorti i lokalnih populacija.	Pouzdana identifikacija, evaluacija i održavanje rijetkih autohtonih sorti i lokalnih populacija. Masovna i klonska selekcija u funkciji potpore proizvođačima ovakvog sortimenta.	Javni instituti, sveučilišta, veleučilišta, udruge i OPG-i.
Oplemenjivanje na agronomski važna kvalitativna svojstva (monogene otpornosti na bolesti, svojstva kvalitete ploda i sl.).	Razvoj protokola i uslužne genotipizacije za selekciju potpomognutu biljezima za gospodarski važna monogena svojstva (pojedinačni geni, piramidizacija gena, povratna križanja potpomognuta biljezima).	Javni instituti, sveučilišta i oplemenjivačke kuće (tuzemne i inozemne).
Unapređenje metoda razvoja hibridnih kultivara.	- Međuinstitutski razvoj uskobaznih sintetičkih populacija kukuruza temeljem molekularno-genetičke analize. - Nacionalni program uspostave centra ili konzorcija za razvoj inbred linija tehnikama dihaploida. - Međuinstitutska (nacionalna) mreža za zajedničko ispitivanje eksperimentalnih hibrida na većem broju lokacija. - Eksperimentalni razvoj hibrida pšenice i ječma.	Oplemenjivačke kuće, HAPIH-CSR, javni instituti i sveučilišta, inozemni partneri.
Ubrzanje procesa razvoja oplemenjivačkih linija (*speed breeding*).	Stvaranje infrastrukture i metodike za uzgoj više generacija vrijednog oplemenjivačkog materijala tijekom jedne godine.	Oplemenjivačke kuće, javni instituti i sveučilišta, inozemni partneri.
Uvođenje suvremenih metoda za unapređenje oplemenjivačkog procesa i bržeg razvoja novih kultivara.	Kompetitivni međunarodni istraživački projekti na temu: - genomske selekcije kod najvažnijih kultura - iskorištenje potencijala „*reverse breeding*-a" - napredne fenotipizacije.	Umreženi timovi s više domaćih i inozemnih istraživačkih ustanova.
Razvoj kultivara i populacija za ekološku proizvodnju.	Kompetitivni međunarodni istraživački projekti za stjecanje primjenjivih znanja za razvoj kultivara i populacija posebno prilagođenih zahtjevima ekološkog uzgoja.	Javni instituti, sveučilišta i oplemenjivačke kuće (tuzemne i inozemne).
Nedostatak kritične mase kadrova, infrastrukture i elementarnih praktičnih znanja iz tehnologije „uređenja genoma" u području oplemenjivanja poljoprivrednog bilja.	Kompetitivni međunarodni istraživački projekti za stjecanje primjenjivih znanja u području „uređenja genoma" – modelne vrste: kukuruz, pšenica i soja.	Javni instituti, sveučilišta i oplemenjivačke kuće (tuzemni i inozemni partneri).
Nedovoljna komunikacija i suradnja klasičnih oplemenjivača i znanstvenika različitih profila.	Primjenjeni multidisciplinarni istraživački projekti s prikladnim modelom financiranja. Posebni studijski programi ili pojedinci s dvojnim obrazovanjem.	Javni instituti, sveučilišta i oplemenjivačke kuće.

Iako zadnjih desetljeća globalno raste proizvodnja i potražnja svih poljoprivrednih proizvoda, u cijelom svijetu brzo opada broj oplemenjivačkih programa i profesionalnh oplemenjivača te se gase cijeli instituti i kompanije (ili se spajaju s velikim). Procesom razvoja novih kultivara i proizvodnje sjemena dominiraju velike multinacionalne kompanije. Slično se događa i u Hrvatskoj gdje su u zadnjih 30 godina prestali nekad uzorni programi oplemenjivanja šećerne repe, suncokreta, uljane repice, krumpira i skoro svih povrtnih vrsta (Kozumplik i Pejić, 2012.). Posljedica je ovo visokih troškova oplemenjivačkog postupka i liberalizacije tržišta sjemena, u čemu se najbolje snalaze i profitiraju velike multinacionalne kompanije. U krizi je i obrazovanje iz područja oplemenjivanja bilja (Stalker i Knauft, 2008.). Međutim, proizvođači i nisu previše osjetili te promjene jer do njih i dalje dolaze sve rodniji i bolji kultivari. Ipak, iskustva iz nekoliko zadnjih godina koja obilježavaju pandemija korona virusom i ratni sukobi koji imaju globalne posljedice ukazali su na dobre strane i stratešku važnost domaćeg oplemenjivanja bilja i sjemenarstva. Na sceni je i primjetan trend povećanog interesa lokalnog tržišta za domaćim proizvodima svih vrsta. Nestašica energenata i povećanje njihove cijene te značajan ugljični otisak, postupno podižu cijenu međunarodnog transporta, pa je uvoz hrane s udaljenih tržišta sve manje konkurentan. Pojedine države već imaju usvojene strategije i akcijske planove s kojima sigurnost hrane vežu pretežno ili isključivo uz nacionalnu poljoprivredu, pa čak i unutar države, s proizvodnjom neposredno u blizini same potrošnje.

Stoga, zbog postojeće tradicije, aktualne tržišne pozicije, infrastrukture i specijaliziranih kadrova, budućnost domaćeg oplemenjivanja bilja i sjemenarstva ne bi trebala biti upitna. Osobito ukoliko bi se u ovu djelatnost koordinirano i pojačano ulagalo - sredstva, znanje i trud.

LITERATURA

Acquaah, G., 2020. Principles of Plant Genetics and Breeding: Third Edition. Wiley-Blackwell - John Wiley & Sons, Ltd.

Adam-Blondon, A.F., Lahogue-Esnault, F., Bouquet, A., Boursiquot, J.M., This, P., 2001. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. Vitis 40, 147–155.

Assefa, Y., Prasad, P.V.V., Carter, P., Hinds, M., Bhalla, G., Schon, R., Jeschke, M., Paszkiewicz, S., Ciampitti, I.A., 2017. A new insight into corn yield: Trends from 1987 through 2015. Crop Sci. 57, 2799–2811.

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

Bulatova, K., Mazkirat, S., Didorenko, S., Babissekova, D., Kudaibergenov, M., Alchinbayeva, P., Khalbayeva, S., Shavrukov, Y., 2019. Trypsin Inhibitor Assessment with Biochemical and Molecular Markers in a Soybean Germplasm Collection and Hybrid Populations for Seed Quality Improvement. Agronomy 9, 76.

Calderini, D.F., Slafer, G.A., 1998. Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. F. Crop. Res. 57, 335–347.

Duvick, D.N., 2005. The Contribution of Breeding to Yield Advances in maize (*Zea mays* L.). Adv. Agron. 86, 83–145.

European Commission, 2022. Reducing the risk and use of pesticides.

Fehr, W., 1987. Principles of Cultivar Development. Macmillan Publishing Co., New York, London.

Germanà, M.A., 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant Cell Rep. 30, 839–857.

Hasan, N., Choudhary, S., Naaz, N., Sharma, N., Laskar, R.A., 2021. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. J. Genet. Eng. Biotechnol. 19, 1–26.

Helentjaris, T., 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. Trends Genet. 3, 217–221.

Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C., Wegman, S., 1985. Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol. 5, 109–118.

Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). Genome 34, 437–447.

Humphreys, D.G., Knox, R.E., 2015. Doubled Haploid Breeding in Cereals, u: Al-Khayri J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (Ur.), Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools. Springer, str. 241–290.

IPCC, 2021. Summary for Policymakers, u: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press., United Kingdom and New York, NY, USA, 2391, str. 1–1927.

Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., Melzer, S., 2018. Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. Plant Breed. 137, 1–9.

Kozumplik, V., Pejić, I., 2012. Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Monografija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.

Lübberstedt, T., Varshney, R.K., 2013. Diagnostics in plant breeding, Diagnostics in Plant Breeding. Springer Netherlands.

Mackelprang, R., Lemaux, P.G., 2020. Genetic Engineering and Editing of Plants: An Analysis of New and Persisting Questions. Annu. Rev. Plant Biol. 71, 659–687.

Martinčić, J., Kozumplik, V., 1996. Oplemenjivanje bilja, Oplemenjivanje bilja. Poljoprivredni institut Osijek, Agronomski fakultet Zagreb, Zagreb.

Murovec, J., Bohanec, B., 2012. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding, u: Plant Breeding. IntechOpen.

November, J., 2018. More than Moore's Mores: Computers, Genomics, and the Embrace of Innovation. J. Hist. Biol. 2018 514 51, 807–840.

Poehlman, J.M., 1959. Breeding field crops.

Prasanna, B.M., Vijay, C., George, M., 2012. Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. CIMMYT 1–56.

Reeves, T.G., Cassaday, K., 2002. History and past achievements of plant breeding, u: Australian Journal of Agricultural Research. CSIRO PUBLISHING, str. 851–863.

Schauberger, B., Ben-Ari, T., Makowski, D., Kato, T., Kato, H., Ciais, P., 2018. Yield trends, variability and stagnation analysis of major crops in France over more than a century. Sci. Reports 2018 81 8, 1–12.

Stalker, H.T., Knauft, D.A., 2008. Plant breeding education. White paper on education. Natl. Plant Breeding Coordinating Committee.

Stuber, C.W., Goodman, M.M., Moll, R.H., 1982. Improvement of Yield and Ear Number Resulting from Selection at Allozyme Loci in a Maize Population 1. Crop Sci. 22, 737–740.

Stuber, C.W., Moll, R.H., 1972. Frequency Changes of Isozyme Alleles in a Selection Experiment for Grain Yield in Maize (*Zea mays* L.) 1. Crop Sci. 12, 337–340.

Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., Young, N.D., 1992. High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato Genomes. Genetics 132, 1141.

Tavčar, A., 1959. Oplemenjivanje bilja. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.

Topfer, R., Hausmann, L., Eibach, R., 2011. Molecular Breeding, u: Adam-Blondon, A.-F., Martinez-Zapater, J.M., Kole, C. (Ur.), Genetics, Genomics and Breeding of Grapes. CRC Press.

Wanga, M.A., Shimelis, H., Mashilo, J., Laing, M.D., 2021. Opportunities and challenges of speed breeding: A review. Plant Breed. 140, 185–194.

Zhang, M., Liu, Y.H., Wang, Y., Sze, S.H., Scheuring, C.F., Qi, X., Ekinci, O., Pekar, J., Murray, S.C., Zhang, H. Bin, 2022. Genome-wide identification of genes enabling accurate prediction of hybrid performance from parents across environments and populations for gene-based breeding in maize. Plant Sci. 324, 111424.

2 PRIKUPLJANJE I OBRADA BILJNOG MATERIJALA I METODE IZOLACIJE DNA

Renata Hanzer

Analiza biljne DNA od velike je važnosti za različita područja istraživanja u poljoprivredi. Oplemenjivanje bilja danas je nezamislivo bez uporabe genomskih alata koji omogućavaju oplemenjivačima bolje razumijevanje molekularnih osnova nasljeđivanja složenih svojstava i olakšavaju praćenje i proučavanje specifičnih genotipova. Različite genomske metode omogućavaju identifikaciju gena i njihovih regulatornih sekvenci, a masovnim sekvenciranjima dijela ili cijelih genoma znanstvenicima je omogućen pristup bazama podataka, kako za proučavanje genetičkih značajki, tako i za selekciju potpomognutu uporabom molekularnih biljega kao preduvjet za dizajn novih kultivara. Dobivene informacije znanstvenicima omogućavaju da se suoče s izazovima poput povećanja prinosa, otpornosti na štetnike, bolesti, sušu, ali i omogućavaju učinkovitiji i usmjereniji pristup u oplemenjivanju bilja.

Za svaku analizu koja se zasniva na DNA neophodan je uspješan postupak izdvajanja molekule DNA iz uzorka. Literatura opisuje velik broj različitih protokola za uspješno izdvajanje DNA iz uzoraka biljnog porijekla. Svi opisani protokoli imaju za cilj izdvojiti dovoljnu količinu DNA odgovarajuće čistoće i kakvoće za daljnju namjenu. Izolacija DNA predstavlja prvi analitički korak i o uspješno provedenom postupku izolacije DNA ovisit će i svi nizvodni protokoli.

2.1. UZIMANJE UZORAKA BILJNOG TKIVA, TRANSPORT I SKLADIŠTENJE

Analize DNA započinju odabirom i uzimanjem uzoraka biljnog tkiva. Od ključne je važnosti odabrati reprezentativan uzorak prikladan za daljnje istraživanje. Odabir i veličina uzorka ovisit će o planiranom istraživanju (npr. genetskoj strukturi populacije), odabiru metode izolacije DNA te o metodama za koje će se koristiti izolirana DNA. Prilikom planiranja pokusa važno je utvrditi što za samo istraživanje predstavlja reprezentativni uzorak. Uzorak može biti tkivo jedne biljke ili zbirni uzorak uzet s više pojedinačnih biljaka. Kada se uzima zbirni uzorak, potrebno je utvrditi s koliko pojedinačnih biljaka treba uzeti tkivo da bi se uzorak smatrao reprezentativnim. Ukoliko se u sklopu istraživanja promatraju varijacije od biljke do biljke unutar samog pokusa nužno je prikupiti pojedinačne uzorke sa svake biljke. Također, ukoliko su predmet istraživanja genetički homogene populacije uzorak tkiva jedne biljke može se smatrati reprezentativnim, u većini ostalih slučajeva uzet će se zbirni uzorak s više biljaka. Literatura u pravilu ne daje općenite smjernice koliko biljaka predstavlja zbirni uzorak. Crossa i Vencovsky (2011.) daju vrlo iscrpan prikaz složenih statističkih modela za utvrđivanje veličine populacije prilikom planiranja uzorkovanja. U mnogim biljnim vrstama svaka je biljka u određenoj mjeri genetski jedinstvena. Većina biljnih vrsta sadrži brojne genetske varijacije. Kod isključivih stranooplodnih vrsta poput *Lolium* spp. dovoljno je uzorkovati tek nekoliko biljaka da bi se uzorak smatrao reprezentativnim zbog izrazitog protoka gena na unutar-populacijskoj razini. Isto tako kod inbred linija genomske su varijacije minimalne te je jedna ili nekoliko biljaka dovoljno uzorkovati da bi se dobio reprezentativni uzorak. Populacije samooplodnih biljaka i biljaka dobivenim klonalnim razmnožavanjem karakterizira slabi protok gena, te je samim time potreban znatno veći zbirni uzorak kako bi se postigla reprezentativnost unutar jednog pokusa (Brown i Marshall, 1995.; Burgos, 2015.).

Visoko kvalitetna DNA može se izolirati iz lista, cvijeta, sjemena, korijena ili bilo kojeg drugog dijela biljke uključujući i cijelu biljku. Za većinu primjena svaki od navedenih uzoraka može dati dovoljno DNA, no optimalnu kombinaciju odabira tkiva i metode treba prilagoditi samom pokusu (Boiteux i sur., 1999.).

Prvi izbor za DNA analize svakako je uzorak svježe ubranog mladog lista. Najčešće se uzorci uzimaju na mjestima udaljenim od mjesta na kojemu će se provesti analiza i potrebno ih je na prikladan način dostaviti u laboratorij. Otkidanjem lista s biljke vrlo brzo započinju biokemijski procesi koji dovode do degradacije tkiva što može dijelom kompromitirati sam pokus, stoga je važno u što kraćem vremenu

započeti analizu. Degradacija molekule DNA može imati u određenoj mjeri neželjeni učinak na metode, poput analiza molekularnih biljega ili digestije restrikcijskim endonukleazama. Molekula DNA prisutna je i u osušenim i odstajalim uzorcima, no takvi uzorci mogu dati izolat DNA male molekulske mase koja ne jamči uvijek uspješnu analizu, pogotovo za metode koje zahtijevaju velike fragmente DNA (Doyle i Dickson, 1987.; Guo i sur., 2018.).

Ukoliko nakon prikupljanja nije moguće brzo dostaviti uzorak u laboratorij i započeti analizu postoji nekoliko postupaka privremenog skladištenja i konzerviranja uzorka s kojima se degradacija nastoji svesti na najmanju moguću mjeru. Postupci pohrane uzoraka podrazumijevaju metode poput zamrzavanja, primjene desikanata i konzervansa, te sušenja. Svaki od navedenih postupaka ima određene prednosti i nedostatke. Većina primijenjenih postupaka dat će izolat DNA dobre kakvoće i prinosa za većinu metoda zasnovanih na DNA, no dovest će u određenoj mjeri do degradacije DNA, te gotovo potpune degradacije RNA u uzorcima, dok će ukupni proteini većinom ostati intaktni (Semagn, 2014.).

Zamrzavanje svježe ubranih listova dobro je rješenje pohrane za uspješnu izolaciju DNA. Postupak podrazumijeva najčešće uporabu tekućeg dušika ili suhog leda. Tekući dušik, iako predstavlja izvrsno rješenje za brzo zamrzavanje uzorka nije pogodan za uporabu izvan laboratorija. Tekući dušik zahtjeva uporabu posebnog posuđa i pribora, izuzetno brzo hlapi i predstavlja opasnost za transport i rukovanje. S druge strane suhi led nešto je više temperature u odnosu na tekući dušik i neće dovesti do jednako brzog zamrzavanja, no siguran je za rukovanje, lako se transportira u prikladnoj krioambalaži i tako pohranjen može održavati uzorke smrznutim dulje vrijeme.

Jedna od često zastupljenih metoda za prezervaciju uzoraka je i uporaba desikanata poput silika-gela. Silika-gel je povoljno i pouzdano rješenje za brzo skladištenje uzoraka sušenjem neposredno nakon prikupljanja *in situ*. Postupak podrazumijeva jednostavno pohranjivanje prikupljenih uzoraka u vrećicu s odgovarajućom količinom silika-gela najčešće u omjeru 10:1. Važno je dobro optimizirati postupak pohrane uzorka u hermetički zatvorene vrećice i uporabu dostatne količine silica-gela kako bi se osiguralo uspješno sušenje i minimalna degradacija DNA. Postupak omogućava uspješno sušenje uzorka lista i prikladan je za većinu daljnjih primjena uz minimalnu razgradnju DNA (Chase i Hills, 1991.). Uzorci se lista također mogu osušiti i uporabom upijajućeg papira tzv. blott papira. Blott papir ima veliku sposobnost apsorpcije tekućine i pogodan je za sušenje manjih uzoraka. Uzorci se suše pritiskom o papir, a papir se mora nekoliko puta promijeniti dok se uzorak ne osuši.

Literatura opisuje i nekoliko postupaka konzerviranja uzoraka lista kemijskim agensima. Jedan je od često opisanih protokola pohrana uzorka u otopinu NaCl/CTAB (3g CTAB i 35g NaCl otopljeno u 100 mL destilirane vode). Uzorci lista pohranjuju se neposredno nakon uzorkovanja u epruvete s unaprijed pripremljenom otopinom NaCl/CTAB. Tako pripremljeni uzorci mogu se transportirati u laboratorij na sobnoj temperaturi ili pohraniti zamrzavanjem na -20°C dulje vrijeme (Štorchová i sur., 2000.).

Liofilizacija je široko rasprostranjen postupak sušenja uzorka smrzavanjem u uvjetima sniženog tlaka. Djelovanjem sniženog tlaka nastali kristali leda sublimiraju i iza sebe ostavljaju dehidrirani uzorak rastresite strukture. Tako pripremljen uzorak u velikoj mjeri zadržava svoja svojstva i može se uskladištiti na sobnoj temperaturi dulje vrijeme do početka same izolacije. S jedne strane postupak olakšava manipulaciju s uzorkom i ne zahtijeva skladištenje u hladnjacima i komorama, ali još uvijek laboratorijski liofilizatori predstavljaju trošak i nisu uvijek dostupni. Osim toga sam postupak nije pogodan za sušenje uzoraka izvan laboratorija. Liofilizatori omogućavaju smrzavanje u kratkom vremenu čime se sprečava nastanak krupnijih kristala leda koji bi mogli mehanički dodatno oštetiti tkivo, a sušenjem uzorka liofilizacijom sačuvana je visokokvalitetna DNA (Patel i Pikal, 2011.; Weißbecker i sur., 2017.).

Kod odabira metode uzimanja uzorka i njegovog skladištenja do izolacije DNA važno je uzeti u obzir

sve relevantne parametre. Prije svega dostupnost samog uzorka i brzinu dopreme u laboratorij. Za većinu metoda koje se rutinski provode u molekularnim laboratorijima iz uzoraka pohranjenih na bilo koji od ranije opisanih postupaka dobit će se dovoljna količina izolirane DNA, no do koje mjere će molekula DNA biti degradirana ovisi o svim postupcima manipulacije s uzorcima od trenutka otkidanja sa same biljke do trenutka izolacije DNA. Neke nizvodne metode nisu osjetljive na djelomičnu degradaciju DNA, no neke poput RFLP metode (polimorfizam duljine fragmenta restrikcije) ili sekvenciranja zahtijevaju veće fragmente molekule DNA. Ukoliko postoji potreba za dobivanjem DNA izolata velike molekularne mase, a postoji potreba za pohranom uzorka kroz određeni vremenski period prije početka same analize većina studija ukazuje da osušeno tkivo lista najbolje čuva integritet DNA.

2.2. PRIPREMA UZORKA ZA DNA ANALIZE

DNA se može izolirati iz jedne biljke ili iz zbirnog uzorka, te iz bilo kojeg dijela biljke uključujući i izravno iz sjemena, no većina protokola preporuča svježe mlado lišće kao idealan izvor DNA za molekularna istraživanja. Objavljeno je mnogo studija koje ukazuju da i DNA dobivena iz sjemena daje zadovoljavajuće rezultate za veliki broj molekularnih analiza od metoda lančane reakcije polimerazom, genotipizacije molekularnim biljezima čak i sekvenciranja cijelog genoma (Bolton i sur., 2005.; Abdel-Latif i Osman, 2017.). Odabir tkiva za izvor DNA i postupka pripreme ovisit će također i o biljnoj vrsti i njenim svojstvima. Jedan od često korištenih biljnih modela za istraživanje je vrsta *Arabidopsis thaliana,* rastom mala samooplodna biljka, iznimno sitnog sjemena, promjera 0.5 mm, a odrasla biljka dostiže visinu 15-20 cm. Takva biljka idealna je za uzgoj u klima komorama u laboratoriju, dok je iznimno sitno sjeme izazov za izravno izdvajanje DNA iz sjemena. S druge strane, ukoliko se istraživanje provodi na biljkama velikog rasta poput kukuruza, jasno je da zatvoreni sustav neće biti prvi izbor za uzgoj. Za potrebe uzgoja mogu se koristiti klima komore, plastenici ili uzgoj na otvorenom. Uzgoj u zatvorenim sustavima omogućava bolji nadzor nad okolišnim uvjetima poput svjetlosnog režima, temperature i sadržaja vlage, uporabu supstrata poznatog sastava, predtretmane sjemena ukoliko to istraživanje zahtijeva, te omogućava bolju usporedivost dobivenih rezultata. Listovi se biljaka obično prikupljaju u fazi pojave prvih 2-3 lista. Nakon što se uzorkuju listovi za potrebe izolacije DNA iste biljke mogu se koristiti za daljnja istraživanja. Ukoliko se DNA izdvaja iz sjemena, takvo je sjeme trajno uništeno.

Bez obzira prikupljaju li se uzorci lista na mjestima udaljenim od laboratorija i pohranjuju prema nekom od ranije opisanih postupaka ili se uzgajaju u zatvorenom sustavu u blizini laboratorija, potrebno ih je na prikladan način usitniti. Isto vrijedi i za uzorke sjemena ili drugih dijelova biljaka. Usitnjavanje je prvi korak izolacije DNA i njime se postiže mehanička dezintegracija stanične stjenke i stanične membrane. Ovisno o vrsti tkiva, veličini, ali i dostupnoj opremi, ovisit će i način mehaničkog razaranja. Najčešće za usitnjavanje uzoraka koristimo različite laboratorijske mlinove i homogenizatore, a kod svježeg materijala pomažemo si tekućim dušikom ili liofilizatorom.

Ukoliko je uzorak sjeme ili tvrdi dio biljke poput kore drveta, melje se u laboratorijskim mlinovima neposredno prije postupka izolacije DNA. Sjeme se može mljeti s ili bez dodatka tekućeg dušika. Tekući će dušik omogućiti brže usitnjavanje materijala, ali će istovremeno i spriječiti pretjerano zagrijavanje materijala koje nastaje prilikom mljevenja kao posljedica trenja. Postoje i laboratorijski mlinovi s vodenim hlađenjem koji su posebno pogodni za usitnjavanje uzoraka s visokim sadržajem ulja. Ukoliko niti jedan od navedenih postupaka odvođenja topline nije moguć, potrebno je prilagoditi vrijeme usitnjavanja kako bi se pregrijavanje uzorka svelo na najmanju moguću mjeru.

Usitnjavanje uzoraka lista, ukoliko se radi o svježem listu, najčešće se provodi usitnjavanjem u tarioniku s pistilom uz dodatak tekućeg dušika. Postupak

je brz, jednostavan za izvođenje, ne zahtijeva skupu opremu i omogućava usitnjavanje uzorka lista u fini prah s minimalnim narušavanjem strukture DNA uzorka. Takav je postupak najzastupljeniji kod pripreme uzorka biljaka uzgojenih u neposrednoj blizini laboratorija kada nije potreban predtretman uzorka. Usitnjavanje tkiva u tekućem dušiku, iako daje vrhunske rezultate nije uvijek dostupno, a i predstavlja određeni sigurnosni rizik za analitičara, stoga mnogi autori nude razna alternativna rješenja (Tan i sur., 2016.). U nedostatku odgovarajuće opreme moguće je koristiti i razne mlinove namijenjene za kućnu uporabu, ali je potrebno optimizirati i validirati postupak kako bi bili sigurni da će rezultat biti zadovoljavajući. S druge strane veliki je raspon sofisticiranih laboratorijskih mlinova i homogenizatora koji dijelom mogu automatizirati cijeli postupak i omogućavaju istovremeno usitnjavanje većeg broja uzoraka. Jedan su od takvih primjera i homogenizatori koji usitnjavaju tkivo pomoću kuglica za usitnjavanje različitih promjera i materijala za različita tkiva. Usitnjavanje se odvija izravno u laboratorijskoj epruveti uz dodatak lizirajućeg sredstva čime se objedinjuje mehanička i kemijska dezintegracija biljne stanice. Uređaji omogućavaju istovremeno homogeniziranje većeg broja uzoraka u zatvorenim epruvetama što dodatno onemogućava kontaminaciju među uzorcima, a sam postupak značajno se ubrzava.

2.3. IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Homogenizirani i usitnjeni materijal pripremljen je za postupak izolacije DNA. Preporuča se DNA izolirati neposredno nakon usitnjavanja kako se ne bi dodatno narušio integritet nukleinskih kiselina u uzorcima. Uobičajeni protokoli za izolaciju DNA uključuju nekoliko osnovnih koraka poput homogenizacije, lize stanice, fizikalno-kemijskih postupaka uklanjanja nečistoća i eluiranja ili otapanja izdvojene DNA (Slika 2.1). Koji god protokol izaberemo za izolaciju DNA svaki u konačnici mora omogućiti uspješno izdvajanje DNA iz biljne stanice i uklanjanje ostalog staničnog materijala koji može ometati daljnje postupke u radu. Stanični zid nužno je razoriti kako bi se oslobodio stanični sadržaj. To postižemo ranije opisanim postupcima homogenizacije. Homogeniziran i usitnjen uzorak pogodan je za tretman odgovarajućim lizirajućim sredstvom koji će narušiti integritet stanične membrane i u potpunosti osloboditi DNA u obliku stanične juhe. Literatura opisuje različite metode i različita lizirajuća sredstva za oslobađanje DNA iz biljne stanice, najčešće su to sufrakatni i detergenti. Većina protokola opisuje uporabu kemijskih spojeva za razaranje stanica s i bez dodatka enzima za dodatnu razgradnju staničnih struktura. Neke metode podrazumijevaju istovremenu uporabu fizikalnog i kemijskog razaranja uporabom kuglica (metalnih, porculanskih ili staklenih) uz snažnu agitaciju u prisustvu sredstva za liziranje, te razaranje pomoću ultrazvuka. Komercijalno dostupni setovi kombiniraju sve navedeno ovisno o namjeni.

Kod izdvajanja DNA iz biljnog tkiva od posebne je važnosti zaštititi DNA od endogenih nukleaza. Za uklanjanje nukleaza čija prisutnost izravno utječe na prinos metode, koristi se EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), kelirajuće sredstvo koje na sebe veže ione magnezija, kofaktore većine nukleaza. Također se dodaju kloroform i fenol kako bi denaturirali proteine i razdvojili ih od DNA. Dodatkom proteaza prilikom liziranja stanica dodatno se pospješuje razgradnja proteina u uzorku uključujući i nukleaze. Izdvajanjem DNA iz uzorka dijelom se oslobađa i RNA koja može ometati daljnje postupke i dovodi do pogreške u procjeni prinosa izolacije. Molekule RNA uspješno se uklanjaju dodavanjem enzima RNaze. Dodatak RNaze neće utjecati na molekulu DNA, a vrlo uspješno će razgraditi molekulu RNA.

Uspješan protokol za izolaciju DNA osim što mora uspješno izdvojit DNA od ostalih staničnih dijelova jednako uspješno mora pročistiti i izolat od zaostalih reagenasa koji se koriste u postupku izolacije DNA. Nerijetko zaostali reagensi mogu narušiti uspjeh daljnjih postupaka s izdvojenom DNA. Kako bi izbjegli onečišćenje zaostalim reagensima prije svega važna je urednost u radu, a dodatno kao

završni korak izolacije DNA može se izdvojiti taloženjem (precipitacijom) alkoholima, pri čemu se uspješno izdvajaju zaostale nečistoće. Ukoliko navedeni postupci nisu dovoljni DNA se može dodatno pročistiti komercijalno dostupnim kolonama za pročišćavanje DNA.

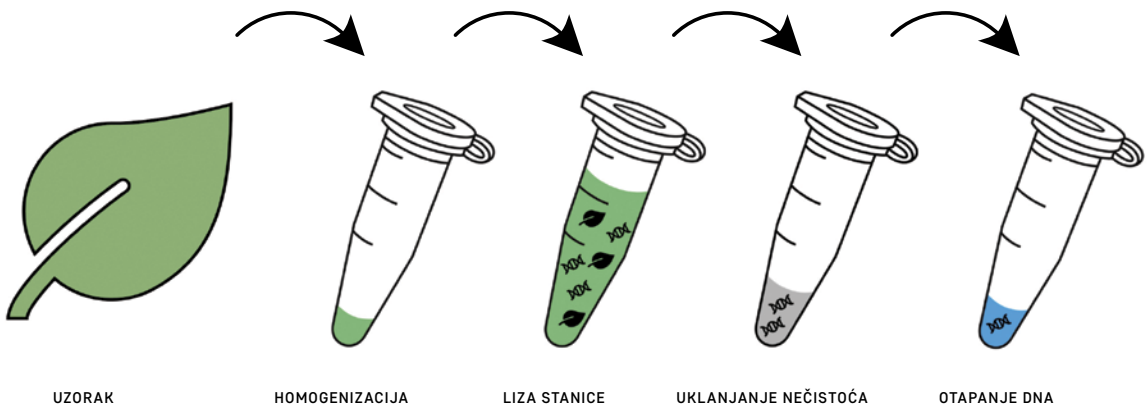
Osim uspješnog uklanjanja nečistoća iz izolata DNA, važno je sačuvati molekulu DNA od razaranja prilikom manipulacije s uzorkom. Svaki korak potrebno je provesti pažljivo bez nepotrebnih radnji, jer sva manipulacija s uzorkom, treskanje, pipetiranje, centrifugiranje može dovesti do kidanja lanca DNA. Uobičajenim postupcima izolacije izdvaja se DNA prosječne duljine 50 – 100 kb (Rogers i Bendich, 1989.).

Sam se postupak izdvajanja DNA iz uzorka može provesti takozvanim klasičnim metodama pripremajući radne otopine u laboratoriju prema dostupnim protokolima, ali isto tako postoji veliki broj komercijalno dostupnih kompleta koji sadrže sve potrebno za uspješno izoliranje DNA. Komercijalno dostupni kompleti predstavljaju brzo i jednostavno rješenje, prilagođeni su korisniku jer omogućavaju brzo uvođenje metode i bez ranijeg iskustva u ovakvim analizama. Iako se takvi kompleti čine kao dobro rješenje, većina autora preporuča klasične metode. Gotovi kompleti značajno su skuplji i u radu predstavljaju određeni limitirajući faktor jer ne dopuštaju puno prilagođavanja uzorku. Također, ukupni su prinosi značajno niži nego kod klasičnih metoda (Kang i sur., 1998.; Von Post i sur., 2003.). Literatura opisuje različite postupke izolacije DNA klasičnim putem od kojih su najpoznatije: izolacija DNA CTAB metodom, PVP metoda, te fenol-kloroform izolacija.

Svaki od protokola prati nekoliko osnovnih koraka, no postoji također veliki broj varijacija kod kojih autori modificiraju osnovni protokol kako bi ga prilagoditi svojim zahtjevima. Koji god postupak izabrali on mora biti optimiziran za vrstu uzorka, jamčiti točnost i ponovljivost nizvodnih koraka u radu s DNA, osigurati prihvatljivo iskorištenje, te izdvojiti sva potencijalna onečišćenja poput polisaharida (npr. celuloza, pektin, škrob), RNA, proteina, lipida te soli.

Izolacija DNA fenol-kloroform metodom pogodna je za izolaciju DNA iz velikog broja različitih matrica, ali nije prvi izbor za uzorke biljnog porijekla. Kod ove metode dodatno se naglašava rad u sigurnosnom kabinetu, pogotovo kod uporabe organskih otapala. Fenol uspješno razara nukleaze i proteine, ali kod primjene na uzorcima zelenog lišća može doći do kotaloženja spojeva koji imaju inhibirajuće djelovanje na enzimatske reakcije u metodama, poput lančane reakcije polimerazom ili cijepanja restrikcijskim endonukleazama. Kao sredstvo za liziranje koristi se

SLIKA 2.1. OSNOVNI KORACI U IZOLACIJI DNA



SDS (natrijev dodecil sulfat) uz dodatak EDTA, a uzorak se nakon liziranja pročišćava pomoću fenola i kloroforma. Izdvojena DNA precipitira se pomoću etanola kako bi se izdvojila onečišćenja kemikalijama korištenih za izolaciju (Sambrook i sur., 1989.).

Polivinilpirolidon ili skraćeno PVP je polimer koji uspješno uklanja fenolne spojeve iz biljnih uzoraka vežući ih na sebe vodikovom vezom. Tako nastali kompleksi lako se uklanjaju centrifugiranjem. PVP metoda započinje lizom pomoću SDS uz dodatak EDTA kao i kod fenol-klorofom metode. Nakon lize izdvajaju se nečistoće poput polifenola, polisaharida, biljnih metabolita, proteina, pomoću PVP i amonijevog acetata. Izdvojena i pročišćena DNA precipitira se pomoću ledeno hladnog izopropanola. Kao i u prethodno opisanom postupku, izdvojena DNA u obliku peleta precipitira se dodatkom etanola kako bi se uklonile nečistoće zaostale od postupka izolacije poput soli koje bi mogle negativno utjecati na daljnje postupke s DNA (Kim i sur., 1997.).

Metoda pomoću cetrimonijevog bromida, tzv. CTAB metoda bez sumnje je najzastupljenija metoda izolacije DNA iz biljnog tkiva. Metodu je detaljno opisao velik broj autora uz mnoge izmjene osnovnog protokola. Posebno je uspješna za izdvajanje DNA iz biljne stanice jer uspješno uklanja polosaharide i polifenole koji imaju inhibirajući učinak na enzimatske reakcije. Metoda započinje lizom stanice uz dodatak CTAB, te nastavlja nizom koraka uklanjanja nečistoća i staničnih komponenti. Različiti opisani CTAB protokoli međusobno se razlikuju dodatnim enzimatskim reakcijama koje su prilagođene samom uzorku i namjeni. Kod uzoraka bogatim škrobom može se dodati α-amilaza, a za uklanjanje proteina često se dodaje proteinaza K; neki protokoli također preporučuju dodatak RNaza za razgradnju RNA, ukoliko postoji bojazan da bi RNA mogla narušiti daljnje istraživanje i sl. Za pročišćavanje se koristi kloroform, a u završnim koracima DNA se precipitira pomoću izopropanola i pročišćava ispiranjem etanolom (Rogers i Bendich, 1989.).

Komercijalno dostupni setovi za izolaciju DNA kombiniraju sve navedene postupke i prilagođeni su određenoj namjeni. Uključuju sve neophodno za uspješno izdvajanje DNA iz uzoraka, osim laboratorijske opreme. Uz setove dolaze i detaljno opisani postupci za uporabu, no svi reagensi označeni su šifrom proizvođača iz koje nije vidljiv točan sastav svake od uključenih radnih otopina. Iako u većini slučajeva predstavljaju dobro rješenje i omogućavaju brzu implementaciju metode u laboratorij, mnogi istraživači ipak biraju klasične metode. Osim što su klasične metode povoljnije, one pružaju određenu veću slobodu u radu jer omogućavaju prilagodbu pojedinih koraka protokola, daju potpunu informaciju o sastavu radnih otopina, te samim time i bolji uvid u biokemijske procese koji se odvijaju prilikom izdvajanja DNA. Izdvajanje DNA tek je prvi korak u istraživanju, a poznavanje svih značajnih parametara nužno je uspješno u provođenju svih nizvodnih analiza.

Izolacija DNA CTAB metodom

Metoda izolacije kao lizirajuće sredstvo koristi cetrimonijev bromid, CTAB, sufrakant koji lizira biljnu stanicu i uspješno se primjenjuje na širok raspon matrica (Tablica 2.1). Metoda je dugi niz godina uspješno primijenjena u velikom broju laboratorija. Metodu opisuju brojni autori s većim ili manjim izmjenama, no osnovni postupak je isti. Prvi je korak liza stanice u prisustvu 2 % CTAB otopine i pri povišenoj temperaturi. Ovisno o samoj matrici u ovom koraku mogu se dodavati enzimi: poput proteinaze K, RNaze A ili α-amilaze, kako bi dodatno omogućili uklanjanje kontaminanata.

Osnovni postupak

Za provedbu izolacije DNA ovom metodom potrebno je osigurati osnovni pribor i reagense (Tablica 2.2). U epruvetu s približno 200 mg uzorka homogeniziranog i pripremljenog prema nekom od ranije opisanih postupaka potrebno je dodati 1000 - 1500 µl CTAB pufera 2 %, prethodno zagrijanog na 65°C i kratko promiješati. Uzorak mora biti pokretan u puferu ukoliko je potrebno dodati više pufera dok se uzorak ne resuspendira. Treba paziti na volumen epruvete.

TABLICA 2.1. SASTAV CTAB PUFERA I OTOPINE ZA TALOŽENJE

	CTAB PUFER 2 %		CTAB OTOPINA ZA TALOŽENJE	
REAGENS	ZA 200 ml	KONCENTRACIJA	ZA 200 ml	KONCENTRACIJA
CTAB	4,0 g	2 % (20 g/l)	1 g	5 g/l
NaCl 5M	56,0 ml	1,4 M	1,6 ml	0,04 M
EDTA 0,5M pH 8	8,0 ml	0,02 M	/	/
Tris_HCl 1M pH 8	20,0 ml	0,1 M	/	/
sterilna voda	do 200 ml	/	do 200 ml	/

Ukoliko je potrebno treba dodati 10 µl α-amilaze (10 mg/ml), 10 µl RNaze A (10 mg/ml) i lagano promiješati.

Inkubirati 60 minuta na 65 °C uz treskanje ili inkubirati 30 minuta na 65 °C, dodati 10 µl proteinaze—K (20 mg/ml) i inkubirati još 30 minuta na 65 °C uz treskanje.

Uzorke centrifugirati na 12000 g 10 minuta.

Pripremiti nove epruvete i odmjeriti u svaku po 500 µl kloroforma (raditi u digestoru!). U to prenijeti supernatant. U ovom se koraku kloroform dodaje u količini 0,7-1 volumena supernatanta. Ukoliko je u uzorak dodana veća količina pufera u ranijem je koraku potrebno sukladno povećati volumen kloroforma. Snažno promućkati izvrtanjem 30 sekundi do pojave mliječno bijele boje.

Centrifugirati 15 min na 12000 g dok se faze ne razdvoje. Prenijeti gornji sloj u novu epruvetu.

U epruvetu s uzorkom dodati dva volumena CTAB otopine za taloženje. Inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi bez treskanja. Centrifugirati 15 min na 12000 g.

DNA je vidljiva na stijenci epruvete u obliku peleta. Pažljivo baciti supernatant, a pelet DNA otopiti

TABLICA 2.2. PRIBOR I REAGENSI ZA IZOLACIJU DNA

LABORATORIJSKA OPREMA	OTOPINE I REAGENSI
Mikrocentrifuga s rotorom	CTAB pufer 2 %
Termomikser / termoblok / vodena kupelj	CTAB otopina za taloženje
Treskalica	Kloroform ($CHCl_3$ p.a.)
Epruvete za centrifugu od 1,5/2,0 ml	Izopropanol ($CH_3CH(OH)CH_3$ p.a.)
Klipne pipete raznih volumena s jednokratnim nastavcima (0,1 – 1000 µl)	Etanol (C_2H_5OH 70 % p.a.) NaCl 1,2 M
Digestor	Sterilna deionizirana voda
	1xTBE otopina (opcionalno)

u 350µl NaCl (1,2 M). Dodati 350 µl kloroforma i promućkati izvrtanjem 30 sekundi. Centrifugirati 10 minuta na 12000 g dok se ne razdvoje faze.

Gornji sloj prenijeti u novu epruvetu i dodati 0,6 volumena izopropanola te lagano promiješati izvrtanjem. Ostaviti da odstoji na sobnoj temperaturi 20 minuta. Centrifugirati 15 minuta na 12000 g.

Pažljivo izliti gornji sloj i na talog dodati 500 µl 70 % etanola te pažljivo protresti da se talog odvoji od stjenke. Ovo je vrlo važan korak za uklanjanje zaostalog CTAB pufera. Centrifugirati 10 minuta na 12000 g.

Odbaciti gornji sloj, a talog ostaviti da se osuši na sobnoj temperaturi. Izdvojenu DNA otopiti u 100 µl sterilne deionizirane vode koja ne sadrži DNaze ili u TE puferu (Tris-EDTA). Dobivena otopina predstavlja sirovu ili master otopinu DNA. Takva se otopina rijetko izravno koristi za daljnja istraživanja, već se nakon utvrđivanja koncentracije DNA iz nje priređuje radna otopina normalizirana na potrebnu koncentraciju.

2.4. PROVJERA KAKVOĆE DNA, NORMALIZACIJA I ČUVANJE

Jednom izolirana DNA uspješno se čuva dulje vrijeme, u hladnjaku najviše dva tjedna ili u zamrzivaču na -20°C. Najčešće se čuva sirova otopina DNA i prema potrebi se iz nje priređuje normalizirana radna otopina. Radna otopina normalizira se na potrebnu koncentraciju prema zahtjevima daljnjih postupaka u radu i na osnovu izmjerene vrijednosti koncentracije sirove otopine. Bez obzira koji je postupak izolacije DNA odabran, svaki mora rezultirati odgovarajućim prinosom i kakvoćom izdvojene DNA prikladne za nizvodne metode sa što manje lomova u lancu i onečišćenja koji mogu nepovoljno utjecati na daljnje postupke. Postoji nekoliko metoda kvantifikacije i provjere kakvoće DNA. Najčešće su to UV spektrofotometrija, fluorometrija i elektroforeza u gelu agaroze. Svaka od metoda ima svoje prednosti i nedostatke, stoga je važno odabrati onu koja će biti prikladna namjeni. Izbor metode procjene kakvoće i prinosa ovisit će i o dostupnoj opremi, no važno je napomenuti da je bilo kakva procjena kakvoće i mjerenje iskorištenja bolje od upotrebe sirove otopine DNA u daljnjim analizama.

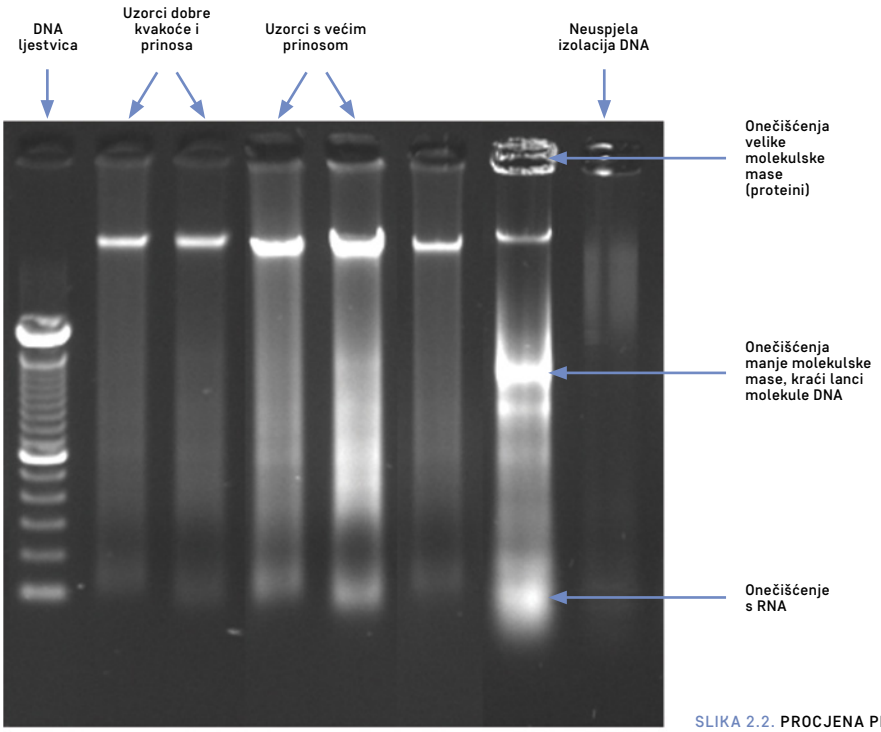
Izoliranu DNA vrlo jednostavno možemo izmjeriti pomoću spektrofotometra izravno u obliku otopine nastale metodom izolacije. To je ujedno i najzastupljenija metoda kvantifikacije DNA. Uređaj mjeri vrijednosti apsorbancije - odnosno optičku gustoću OD u ultraviolentnom svjetlu. Uređaj radi na jednostavnom principu kod kojeg se svjetlost poznate valne duljine propušta kroz otopinu, a fotoćelija s druge strane mjeri količinu prenesene svjetlosne energije. Molekule u otopini apsorbiraju energiju zračenja na određenoj valnoj duljini koja je karakteristična za pojedinu molekulu, te je moguće na osnovi dobivene vrijednosti ekstrapolirati koncentraciju otopljene tvari (Lambert-Beerov zakon). Koncentracija DNA mjeri se pri 260 nm nasuprot vrijednosti upotrijebljenog otapala (blank). Proteini apsorbiraju pri 280 nm, stoga računajući omjer A260/A280 možemo dobiti uvid u čistoću otopine DNA. Visoko kvalitetnom DNA smatramo onu s omjerom apsorbanci A260/280 između 1,8 i 2,0. Važno je napomenuti kako i otopine DNA i RNA djelomično apsorbiraju svjetlost pri 280nm, dok proteini djelomično apsorbiraju svjetlost pri 260 nm, stoga omjer A260/280 daje procjenu čistoće nukleinskih kiselina. Značajno onečišćenje uzorka proteinima dat će vrijednosti omjera značajno iznad 2,0, dok se onečišćenje s RNA neće moći procijeniti na ovaj način. Mjerenjem apsorbancije pri 230 nm dobit ćemo uvid u kontaminaciju spojevima poput ugljikohidrata, polifenola, aromatičnih spojeva i sl. Čistom DNA smatra se ona kod koje omjer A260/A230 iznosi približno 2,2 (Querci i sur., 2020.).

Fluorometrija je metoda slična spektrofotometriji uz dodatak fluorescirajuće boje koja na sebe veže dvolančanu DNA. Zbog ovdje navedenog smatra se točnijom metodom od spektrofotometrije jer je specifična za DNA, dok spektrofotometri mjere ukupne nukleinske kiseline. Iako pouzdanija, metoda, rjeđe se koristi za procjenu koncentracije i kakvoće otopi-

ne DNA. Metoda je značajno složenija za rutinsku primjenu, zahtijeva uporabu standarda i izradu kalibracijske krivulje, te je ukupni trošak metode značajno veći. Ukoliko se sam postupak izolacije DNA provede u skladu s preporukama u uzorcima biljnog porijekla, zaostala RNA obično ne predstavlja značajan problem, te rijetko utječe na daljnje analize. Onečišćenje s RNA relativno jednostavno spriječi se uporabnom RNaza, a eventualno zaostala količina RNA u otopini može jedino dovesti do krive procjene ukupnog sadržaja DNA u uzorku. Ukoliko je za daljnji tijek istraživanja procjena sadržaja RNA u uzorku od posebnog značaja, mjerenje koncentracije DNA fluorometrom metoda je koju treba razmotriti, no u većini slučajeva spektrofotometrijsko mjerenje bit će dostatno (Zimmermann i sur., 1998.; Shokere i sur., 2009.).

Za procjenu prinosa i kakvoće izolirane DNA metoda elektroforeze u gelu agaroze neće biti prvi izbor za ovakav tip analiza, ali predstavlja dobar dodatak uz spektrofotometrijsko mjerenje. Metoda omogućava razdvajanje makromolekula na osnovu njihove veličine, naboja i fizikalnih svojstava. Molekule se uz pomoć istosmjerne struje propuštaju kroz mrežastu strukturu agaroznog gela. Brzina prolaska pojedinih molekula kroz gel ovisit će o ionskim svojstvima i molekulskoj masi. Postupak je standardan za razdvajanje fragmenata DNA, ali i za identificiranje nečistoća u uzorku. Elektroforeza omogućava razdvajanje nukleinskih kiselina i proteina vizualizacijom na gelu (Slika 2.2). Dodatkom DNA ljestvice uz uzorke moguće je procijeniti veličinu fragmenta DNA u uzorcima (Sambrook i sur., 1989.).

Visoko kvalitetnom DNA smatramo izolat s fragmentima velike molekularne mase i omjerom apsorbanci A260/280 između 1,8 i 2,0 i bez onečišćenja koje negativno mogu utjecati na daljnje istraživanje. U izoliranoj DNA ne bi trebalo biti kontaminanata poput polisaharida i polifenola, te potencijalnih inhibitora DNA polimeraze i drugih enzima kao što su tanini, alkaloidi i polifenoli koji mogu narušiti uspješnost daljnjeg istraživanja. Prisutnost ovih spo-



SLIKA 2.2. PROCJENA PRINOSA I KAKVOĆE NA GELU AGAROZE

jeva u biljnom materijalu izravno utječe na kakvoću DNA, te nizvodne metode poput genetskog mapiranja, selekcije potpomognute uporabom molekularnih biljega i raznih drugih genomskih analiza. Ukoliko su rezultati procjene kakvoće i prinosa DNA nezadovoljavajući, potrebno je dodatno optimizirati postupak izolacije DNA, kao i sve ranije korake u radu s uzorcima koji su mogli odvesti do neadekvatnog rezultata. Jednom optimiziran postupak jamstvo je uspjeha u daljnjem radu.

LITERATURA

Abdel-Latif, A., Osman, G., 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods 13, 1–9.

Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N., Simon, P.W., 1999. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124, 32–38.

Bolton, M.D., Nelson, B.D., Sparks, R.B., Sparks, R.D., Santoso, A., 2005. Methods for Extraction and Amplification of DNA from Soybean Seed. Seed Technol. 27, 89–94.

Brown, A., Marshall, D.R., 1995. A basic sampling strategy: Theory and practice, u: Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines.

Burgos, N.R., 2015. Whole-Plant and Seed Bioassays for Resistance Confirmation. Weed Sci. 63, 152–165.

Chase, M.W., Hills, H.H., 1991. Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. Taxon 40, 215–220.

Crossa, J., Vencovsky, R., 2011. Basic sampling strategies: Theory and practice, u: Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines. 2011 Update.

Doyle, J.J., Dickson, E.E., 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. Taxon 36, 715–722.

Guo, Y., Yang, G.Q., Chen, Y., Li, D., Guo, Z., 2018. A comparison of different methods for preserving plant molecular materials and the effect of degraded DNA on ddRAD sequencing. Plant Divers. 40, 106–116.

Kang, H.W., Cho, Y.G., Yoon, U.H., Eun, M.Y., 1998. A Rapid DNA Extraction Method for RFLP and PCR Analysis from a Single Dry Seed. Plant Mol. Biol. Report. 1998 161 16, 90–90.

Kim, C.S., Lee, C.H., Shin, J.S., Chung, Y.S., Hyung, N.I., 1997. A Simple and Rapid Method for Isolation of High Quality Genomic DNA from Fruit Trees and Conifers Using PVP. Nucleic Acids Res. 25, 1085–1086.

Patel, S.M., Pikal, M.J., 2011. Emerging freeze-drying process development and scale-up issues. AAPS PharmSciTech 12, 372–378.

Querci, M., Kagkli, D.M., Gatto, F., Foti, N., Maretti, M., Mazzara, M., 2020. The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms - User Manual. Publications Office of the European Union, Luxembourg

Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1989. Extraction of DNA from plant tissues, u: Plant Molecular Biology Manual. Springer, Dordrecht, str. 73–83.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Vols. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Semagn, K., 2014. Leaf Tissue Sampling and DNA Extraction Protocols, u: Besse, P. (Ur.), Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, str. 53–67.

Shokere, L.A., Holden, M.J., Ronald Jenkins, G., 2009. Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. Food Control 20, 391–401.

Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtek, J., Tetera, M., Fitze, D., Fehrer, J., 2000. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. Taxon 49, 79–84.

Tan, H., Tie, M., Zhang, L., Zhu, Y., Li, H., 2016. The effects of three different grinding methods in DNA extraction of cowpea (Vigna unguiculata L. Walp). African J. Biotechnol. 12.

Von Post, R., Von Post, L., Dayteg, C., Nilsson, M., Forster, B.P., Tuvesson, S., 2003. A high-throughput DNA extraction method for barley seed. Euphytica 2003 1302 130, 255–260.

Weißbecker, C., Buscot, F., Wubet, T., 2017. Preservation of nucleic acids by freeze-drying for next generation sequencing analyses of soil microbial communities. J. Plant Ecol. 10, 81–90.

Zimmermann, A., Lüthy, J., Pauli, U., 1998. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. Zeitschrift für Leb. und -forsch. A 1998 2072 207, 81–90.

ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI 3

Zlatko Liber, Zlatko Šatović i Ivan Pejić

3.1. UVOD

Na Zemlji je do sada utvrđeno gotovo devet milijuna živućih vrsta, a to je po nekim procjenama jedva 1 % svih vrsta koje su živjele na ovom planetu (Mora i sur., 2011.). Po jednoj od najutjecajnih teorija u povijesti znanosti, teoriji evolucije (Darwin, 2011.), ova nevjerojatno velika brojnost vrsta na Zemlji se generira iz raznolikosti jedinki unutar populacija. Po Darwinovoj teoriji jedinke koje su bolje prilagođene svom okolišu imaju veću vjerojatnost preživljavanja i na taj način veću vjerojatnost prijenosa svojstava u sljedeću generaciju. Sve dok između jedinki unutar populacije postoje varijacije događat će se neizbježan prirodni odabir i nastanak novih vrsta (specijacija). Uz pomoć Darwinove teorije evolucije, Mendelovih zakona i čimbenika nasljeđivanja (Turley i Bateson, 1910.), otkrića deoksiribonukleinske kiseline (Dahm, 2005.), kromosoma (Sutton, 1902.), strukture molekule DNA (Watson i Crick, 1953.) te načina prijenosa genetske informacije (Crick, 1970.) uspješno je utvrđen nasljedni materijal kao i način njegovog prijenosa iz generacije u generaciju. Danas znamo da sva živa bića na Zemlji imaju jedinstveni zapis unutar molekula DNA koji se ekskluzivno prenosi iz generacije u generaciju gotovo četiri milijarde godina postojanja života na Zemlji (Maruyama i sur., 2019.; Damer i Deamer, 2020.; Marshall, 2020.). Osnovne su jedinice ovog zapisa nukleotidi, a oni su organizirani u gene koji putem svojih varijacija ili alela određuju sva svojstva i funkciju svake jedinke bilo koje vrste na Zemlji.

Različite se vrste svojim vanjskim izgledom uglavnom dovoljno razlikuju jedne od drugih, no isto tako lako se uočava da su neke vrste međusobno slične. U pravilu, što su vrste ili jedinke iste vrste međusobno genetski srodnije, to je i njihova sličnost veća. Različitost u zapisu DNA, koji se često naziva nasljedni kod ili šifra, nazivamo genetskom raznolikošću. Nasumične mutacije, greške u replikaciji, rekombinacije i nasumično raspoređivanje kromosoma tijekom mejoze, te aktivnost transpozona i retrovirusa najčešći su uzroci genetske raznolikosti. Kad govorimo o genetskoj raznolikosti zapravo se referiramo na broj, učestalost i redoslijed pojedinih, od ukupno četiri vrste nukleotida (A = adenin, C = citozin, G = gvanin, T = timin). Što je veća genetska raznolikost među jedinkama i populacijama neke vrste, veća je i šansa njezina opstanka. Isto tako, što je veća raznolikost vrsta ili genetska raznolikost na višim taksonomskim razinama na nekom području (biotop), pa čak i ako su te vrste suprotstavljene u hranidbenom lancu, to je veća šansa da cijeli sustav (biocenoza) bude stabilniji jer je veća šansa preživljavanja bilo koje vrste koja čini tu biocenozu.

Ponekad morfološka različitost ne mora nužno biti odraz srodstvene različitosti. To je obično slučaj s udomaćenim biljnim i životinjskim vrstama. Svima je dobro poznata morfološka raznolikost jabuka, paprika, rajčica, pasa, mačaka ili konja, no pritom se radi o uskoj genetskoj raznolikosti između različitih kultivara i pasmina iste vrste. Isto tako, među divljim vrstama postoje i skrivene ili kriptičke vrste (Bickford i sur., 2007.) koje su toliko slične nekim drugim vrstama da je njihovo razlikovanje na morfološkoj razini nemoguće, ali je moguće ako se usporede njihove molekule nasljeđa. Za razliku od morfološke, anatomske, kemijske i fiziološke raznolikosti (fenotip), genetska raznolikost (genotip) usko je povezana sa stvarnom srodnošću istraživanih jedinki ili svojti.

Jedinstveni genetski materijal zajedničkog pretka svih živih bića na Zemlji putujući kroz vrijeme, iz generacije u generaciju, razvio se u nevjerojatnu raznolikost genetskog materijala. Danas se istraživanja genetske raznolikosti iznad razine vrste nazivaju molekularnom filogenijom, dok se naziv analiza genetske raznolikosti uglavnom upotrebljava za istraživanja unutarvrsne raznolikosti.

3.2. MOLEKULARNA FILOGENIJA I ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Filogenija je znanstvena disciplina koja proučava srodstvene odnose između živućih vrsta ili klasifikacijskih kategorija iznad razine vrste kako bi rekonstruirala evoluciju života na Zemlji. Napredak

molekularnih metoda kao što su izum lančane reakcija polimerazom (*Polimerase chain Reaction*, PCR; Mullis i sur., 1986.) i automatskog Sangerovog sekvenciranja (Smith i sur., 1986.) omogućili su uključivanje genetičke informacije u filogenetske analize i ujedno razvitak nove discipline poznate kao molekularna filogenija. Od tih vremena pa do danas gotovo svako ozbiljnije filogenetsko istraživanje je, u barem jednom svom dijelu, molekularno. Dosadašnja molekularno-filogenetska istraživanja su istraživanja raznolikosti sekvenci nekolicine lokusa (gena ili intergenskih regija), no razvojem sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*; NGS) generira se izuzetno veliki broja molekularnih podataka pa čak i sekvenci cjelokupnih genoma (Heather i Chain, 2016.). Ova tehnološka unapređenja postpupno transformiraju molekularnu filogeniju u novu znanstvenu disciplinu – molekularnu filogenomiku. Nakon generiranja molekularnih podataka, bez obzira na korištenu metodu sekvenciranja, potrebno je provesti filogenetsku analizu te konstruirati filogenetsko stablo s utvrđenom pouzdanošću pojedinih filogenetskih grana.

Analiza genetske raznolikosti uglavom se odnosi na istraživanja raznolikosti između jedinki unutar populacija kao i između populacija iste vrste, a provodi se na temelju različitih sustava genetskih biljega. Genetski biljeg (genetski marker; engl. *genetic marker*) je bilo koji ulomak DNA koji pokazuje neki oblik uočljivog polimorfizma između analiziranih jedinki. Postoji mnoštvo različitih sustava biljega, a danas se najčešće koriste mikrosatelitni biljezi i biljezi SNP. Mikrosatelitni biljezi (engl. *microsatellite markers*) ili ponavljajuće jednostavne sekvence (engl. *simple sequence repeats*; SSR) temelje se na umnažanju kratkih ulomaka DNA u kojima se nalazi svojstveni motiv sastavljen obično od jednog do šest ponavljanja nukleotidnih baza. Biljezi SNP (engl. *single nucleotide polymrophism*; polimorfizam pojedinačnog nukleotida ili jednonukleotidni polimorfizam) uočavaju supstitucije jednog nukleotida na specifičnoj poziciji u genomu, a moguće ih je detektirati pomoću različitih metoda sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*; NGS). Genetski podaci dobiveni analizom mikrosatelitnih biljega i biljega SNP mogu se obraditi pomoću različitih statističkih metoda koje se primjenjuju u analizi genetske raznolikosti. Bitna razlika između mikrosatelitnih biljega i biljega SNP leži u tome što mikrosatelitni biljezi u većini slučajeva pokazuju velik broj različitih alela u analiziranoj populaciji, dok su biljezi SNP u pravilu bialelni. Analiza genetske raznolikosti uključuje istraživanja prirodnih populacija biljnih vrsta kao i kolekcija biljnih genetskih izvora koje mogu uključivati i divlje srodnike kulturnih biljnih vrsta, te tradicijske i moderne kultivare. Istraživanja prirodnih populacija temelje se na različitim modelima populacijske genetike od kojih je najvažnija ravnoteža po Hardyju i Weinbergu (engl. *Hardy-Weinberg equilibrium, HWE*; Hardy, 1908.; Weinberg, 1908.; Edwards, 2008.). Istraživanja kulturnih biljnih vrsta često imaju za cilj utvrđivanje genetskih razlika između kultivara, te njihovo svrstavanje u skupine na temelju srodnosti.

3.3. UNUTARPOPULACIJSKA RAZNOLIKOST

Deskriptivna statistika obuhvaća izračun niza jednostavnih statističkih mjerila u svrhu analize informativnosti mikrosatelitnih biljega kao i raznolikosti unutar populacija.

Informativnost pojedinih biljega procjenjuje se na temelju ukupnog broja zapaženih alela u analiziranim jedinkama/populacijama kao i pomoću Informacijskog sadržaja polimorfizma. Informacijski je sadržaj polimorfizma (engl. *Polymorphism Information Content*; PIC; Botstein i sur., 1980.) mjerilo alelne raznolikosti koje predstavlja udio informativnog potomstva, odnosno vjerojatnost da se genotip potomstva može upotrijebiti u svrhu saznanja od kojeg roditelja potječu pojedini aleli. Informacijski sadržaj polimorfizma procjenjuje se prema formuli:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{I} p_i^2 - 2 \sum_{i=i+1}^{I} \sum_{i=1}^{I-1} p_i^2 p_j^2$$

gdje je,

p_i – učestalost alela *i* u populaciji,
I – ukupni broj alela.

Unutarpopulacijska raznolikost mikrosatelitnih biljega analizira se na temelju izračuna prosječnog broja alela po biljegu (N_a), alelnog bogatstva (N_{ar}), broja jedinstvenih alela (N_{pr}), zapažene heterozigotnosti (H_O), te očekivane heterozigotnosti ili genske raznolikosti (H_E)

Alelno bogatstvo (engl. *allelic richness*; El Mousadik i Petit, 1996.; Petit i sur., 2008.) predstavlja procjenu prosječnog broja alela neovisnu o veličini uzorka svođenjem svih uzoraka na veličinu najmanjeg uzorka. Alelno se bogatstvo procjenjuje upotrebom rarefakcijskog indeksa (Hurlbert, 1971.) prema formuli:

$$N_{ar} = \sum_{i=1}^{n_i} \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

gdje je

N – broj uzorkovanih jedinki,
$2N$ – broj uzorkovanih alela,
N_i – broj alela *i* u populaciji,
n – broj poduzorkovanih jedinki (veličina najmanjeg uzorka u analizi),
$2n$ – broj poduzorkovanih alela.

Jedinstveni su aleli (engl. *private alleles*) definirani kao aleli koji se pojavljuju u jedinkama samo jedne od analiziranih populacija.

Zapažena heterozigotnost (engl. *observed heterozigosity;* H_O) definirana kao udio heteozigotnih jedinki u analiziranim populacijama.

Očekivana heterozigotnost (engl. *expected heterozygosity)* ili genska raznolikost (engl. *gene diversity*; H_E) predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne nakon jedne generacije nasumične oplodnje, odnosno vjerojatnost da su dva nasumično odabrana alela iz populacije međusobno različita. Očekivana heterozigotnost ili genska raznolikost izračunava se na temelju formule po Neiju (Nei, 1973.):

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{I} p_i^2$$

gdje je

p_i – učestalost alela *i* u populaciji.

Postoji i nepristana (engl. *unbiased*) formula po Neiju (Nei, 1978.) koja uključuje korekciju na malu veličinu uzorka:

$$H_{Eun} = \frac{n}{n-1}\left(1 - \sum_{i=1}^{I} p_i^2 - \frac{H_O}{2n}\right)$$

gdje je:

n – veličina uzorka,
p_i – učestalost alela *i* u populaciji,
I – ukupan broj alela,
H_O – zapažena heterozigotnost.

U svrhu utvrđivanja nalazi li se analizirana populacija u ravnoteži, po Hardyju i Weinbergu (*HWE*) potrebno je izračunati fiksacijski indeks (F_{IS}) i testirati njegovu signifikantnost. Fiksacijski indeks (Wright, 1931.) mjerilo je smanjenja heterozigotnosti u populaciji u odnosu na populaciju koja je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, a izračunava se prema klasičnoj formuli po Wrightu kao:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_E}$$

gdje je

H_O – opažena heterozigotnost,
H_E – očekivana heterozigotnost.

Ukoliko je F_{IS} = 0 populacija je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ukoliko je F_{IS} > 0 u populaciji postoji nedostatak heterozigota što može biti uzrokovano samooplodnjom ili oplodnjom između jedinki koje su u bliskom srodstvu, te se tako F_{IS} naziva i indeksom unutarpopulacijske endogamije, odnosno koeficijentom samooplodnje (engl. *inbreeding coefficient*). Međutim, nedostatak heterozigota

može biti uzrokovan i podstrukturom populacije koja dovodi do Wahlundovog učinka (engl. *Wahlund's effect*; Wahlund, 1928.). Ukoliko je $F_{IS} < 0$, postoji višak heterozigota u populaciji što može značiti da prirodni odabir favorizira heterozigote.

Izračun nepristranog procjenitelja fiksacijskog indeksa po metodi Weira i Cockerhama (Weir i Cockerham, 1984.) temelji se na analizi varijance. Ukupna varijanca alelnih učestalosti unutar populacije (σ_T^2) jednaka je sumi varijance alelnih učestalosti između (σ_I^2) i unutar jedinki (σ_G^2). Pritom se *f*, Weirov i Cockerhamov procjenitelj fiksacijskog indeksa (F_{IS}), izračunava prema formuli:

$$F_{IS} = f = \frac{\sigma_I^2}{\sigma_T^2}$$

gdje je

σ_I^2 – varijanca alelnih učestalosti između jedinki unutar populacije,

σ_T^2 – ukupna varijanca alelnih učestalosti ($\sigma_T^2 = \sigma_I^2 + \sigma_G^2$).

Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže može se utvrditi χ^2-testom ili Fisherovim egzaktnim testom, te neparametrijski pomoću permutacija ili algoritma Markovljevih lanaca (*Markov Chain*; MC).

3.4. GENETSKA DIFERENCIJACIJA

Mogućnost protoka gena (engl. *gene flow*) iz jedne populacije u drugu populaciju od iznimne je važnosti u evoluciji populacija i vrsta. Stoga, analiza genetske diferencijacije između različitih populacija iste vrste može dati vrijedne podatke o stanju određene vrste.

Indeks genetske diferencijacije (F_{ST}; Wright, 1931.) mjerilo je smanjenja heterozigotnosti u metapopulaciji uzrokovanog razlikama u alelnim učestalostima pojedinih populacija od kojih se sastoji, a nastaje uslijed smanjenja učestalosti prijenosa gena između populacija i genetskog otklona (engl. *genetic drift*).

Indeks genetske diferencijacije izračunava se prema klasičnoj formuli po Wrightu kao:

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

gdje je

H_S – prosječna očekivana heterozigotnost (H_E) populacija,

H_T – očekivana heterozigotnost (H_E) metapopulacije.

Indeks genetske diferencijacije kreće se od $F_{ST} = 0$ (nema genetske diferencijacije između populacija) do 1 (potpuna genetska diferencijacija). U teoriji F_{ST} ne može biti negativan, jer je prosječna očekivana heterozigotnost populacija (H_S) uvijek manja od očekivane heterozigotnosti metapopulacije (H_T).

Po metodi Weira i Cockerhama (Weir i Cockerham, 1984.) koja se temelji na analizi varijance, indeks genetske diferencijacije (F_{ST}) može se procijeniti na temelju parametra θ. Ukupna varijanca alelnih učestalosti unutar metapopulacije (σ_T^2) može se rastaviti na tri sastavnice:

σ_P^2– varijancu alelnih učestalosti između populacija,

σ_I^2– varijancu alelnih učestalosti između jedinki unutar populacija, te

σ_G^2– varijancu alelnih učestalosti između gameta unutar jedinki.

Pritom se Weirov i Cockerhamov procjenitelj indeksa genetske diferencijacije θ izračunava prema formuli:

$$F_{ST} = \theta = \frac{\sigma_P^2}{\sigma_T^2}$$

gdje je

σ_P^2 – varijanca alelnih učestalosti između populacija,

σ_T^2– ukupna varijanca alelnih učestalosti ($\sigma_T^2 = \sigma_P^2 + \sigma_I^2 + \sigma_G^2$).

3.5. MJERILA GENETSKE UDALJENOSTI I IZRADA STABLA

Genetska se udaljenost može analizirati na razini jedinki na temelju višelokusnih genotipova ili na populacijskoj razini na temelju alelnih učestalosti gena, odnosno biljega u populacijama.

Genetsku udaljenost između jedinki možemo izračunati na temelju udjela zajedničkih alela (engl. *Proportion of shared-alleles distance*; D_{PSA}; Bowcock i sur., 1994.). Udio zajedničkih alela (P_{SA}), kao mjerilo sličnosti, izračunava se prema formuli:

$$P_{SA} = \frac{\sum_{l=1}^{L} s}{2L}$$

gdje je

s – broj zajedničkih alela,
L – ukupan broj lokusa.

Iz udjela zajedničkih alela (P_{SA}) genetska se udaljenost (D_{PSA}) izračunava kao:

$$D_{PSA} = 1 - P_{SA}$$

gdje je

P_{SA} – udio zajedničkih alela.

Za izračunavanje genetske udaljenosti između populacija na temelju alelnih učestalosti postoji veći broj mjerila koja se obično dijele na evolucijska i geometrijska. Uobičajena evolucijska mjerila udaljenosti su (1) Standardna genetska udaljenost po Neiju (Nei, 1972.), (2) Neijeva nepristrana udaljenost (Nei, 1978.), (3) Hillisova udaljenost (Hillis, 1984.), te (4) Hillisova nepristrana udaljenost (Swofford i Olsen, 1990.). Od geometrijskih mjerila udaljenosti najčešće se koriste (1) Tetivna udaljenost (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967.), (2) Lučna udaljenost (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967.) i (3) Rogersova udaljenost (Rogers, 1972.).

Standardna genetska udaljenost po Neiju (engl. *Nei's standard genetic distance*) (Nei, 1972.) izračunava se prema formuli:

$$D_{NEI72} = -\ln\left(\frac{\sum_{l=1}^{L}\sum_{a=1}^{A} p_{al1}p_{al2}}{\sqrt{\sum_{l=1}^{L}\sum_{a=1}^{A} p_{al1}^2 \sum_{l=1}^{L}\sum_{a=1}^{A} p_{al2}^2}}\right)$$

gdje je

p_{al1} – učestalost alela a lokusa l u populaciji 1,
a – alel,
A – ukupni broj alela,
l – lokus,
L – ukupan broj lokusa.

Standardna je genetska udaljenost po Neiju najčešće korišteno mjerilo genetske udaljenosti koje pretpostavlja da udaljenost ovisi o broju genskih supstitucija po lokusu koje su se dogodile nakon odvajanja dvije populacije.

Za razliku od evolucijskih mjerila udaljenosti koja pretpostavljaju konstantnu veličinu populacija i konstantnu mutacijsku stopu, kako između lokusa tako i između jedinki, geometrijska mjerila ne polaze od pretpostavki uobičajenih za populacijsku genetiku, stoga daju pouzdanije rezultate u slučaju da navedene pretpostavke nisu ispunjene. Geometrijskim se mjerilima udaljenost između dviju populacija svodi na izračun udaljenosti između dvije točke u višedimenzionalnom prostoru određenom alelnim učestalostima.

Najčešće je korišteno geometrijsko mjerilo udaljenosti preinačena tetivna udaljenost (engl. *chord distance*) (Cavalli-Sforza i Edwards, 1967.; Felsenstein, 1995.) koja se izračunava po formuli:

$$D_{CHORD}^2 = \frac{4\left(\sum_{l=1}^{L}\sum_{a=1}^{A}\sqrt{p_{al1}p_{al2}}\right)}{\sum_{l=1}^{L} A_l - 1}$$

gdje je

p_{al1} – učestalost alela a lokusa l u populaciji 1,
a – alel,
A – ukupni broj alela,
l – lokus,
L – ukupan broj lokusa.

U svrhu grafičkog prikaza genetskih odnosa na temelju matrica udaljenosti između jedinki ili populacija, često se koriste različite multivarijatne metode. Budući da su ulazni podaci za navedene analize sadržani u matrici udaljenosti koja može biti izračunata na temelju jedinki i populacija, u oba se slučaja koriste iste metode, pa će se u daljnjem tekstu koristiti izraz jedinka koja se stoga može odnositi i na populacije. Genetski odnosi između jedinki mogu se

prikazati u obliku stabla ili u koordinatnom sustavu, koristeći multivarijatne metode temeljene na međuovisnosti (engl. *interdependence methods*). Prikaz u obliku stabla rezultat je razvrstavnih multivarijatnih metoda (engl. *classification methods*) u koje spadaju različiti algoritmi za izradu stabala kao što su metoda sparivanja susjeda (engl. *Unweighted pair-group method using arithmetic average*; UPGMA; Sneath i Sokal, 1973.), (engl. *Neighbor joining method*; NJ; Saitou i Nei, 1987.) i metoda po Fitchu i Margoliashu (*Fitch-Margoliash method*; FM; Fitch i Margoliash, 1967.). Prikaz genetskih odnosa između jedinki ili populacija u koordinatnom sustavu rezultat je rasporednih multivarijatnih metoda (engl. *ordination methods*) kao što su analiza glavnih koordinata (engl. *Principal co-ordinate analysis*; PCoA; Gower, 1966.) i faktorijalna analiza korespondencije (engl. *Factorial correspondence analysis*; FCA).

Neponderiranom metodom za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti (UPGMA) stablo se tvori na postupan način (engl. *sequential clustering*) sparivanjem pojedinih jedinki, odnosno skupina jedinki. U svakoj se fazi postupka, dvije jedinke (odnosno skupine) sparuju u jednu skupinu tako da se broj skupina postupno smanjuje za jednu. Proces se završava kada se posljednje dvije skupine (jedinke) spare u jednu skupinu koja sadrži sve jedinke u analizi. Algoritam UGPMA sastoji se od dva koraka koji se izmjenjuju. U prvom je koraku u matrici udaljenosti potrebno naći par jedinki, *i* i *j*, čija je udaljenost minimalna i ujediniti ih u novonastalu skupinu (ij), dok se u drugom koraku mora izračunati udaljenost između novonastale skupine (ij) i svih ostalih jedinki u analizi prema formuli:

$$d_{(ij)k} = \frac{(d_{ik} + d_{jk})}{2}$$

gdje je

$d_{(ij)k}$ – udaljenost između novonastale skupine (*ij*) i jedinke *k*,

dik – udaljenost između jedinke i i jedinke k.

Metodom sparivanja susjeda (*Neighbor Joining*; NJ) genetski odnosi između jedinki sadržani u izvornoj matrici udaljenosti prikazuju se u obliku aditivnog stabla tako da se minimalizira razlika između izvornih i patrističkih udaljenosti između parova jedinki. Patristička je udaljenost suma duljina svih grana koje povezuju dvije jedinke na stablu. Izrada stabla metodom sparivanja susjeda započinje zvjezdastim stablom kod kojeg su sve jedinke jednako udaljene od korijena kao i međusobno.

Prvi je korak izračunavanje neto odvajanja jedinki u analizi. Neto odvajanje (engl. *net divergence*) prosječna je udaljenost jedinke od svih ostalih jedinki u analizi, a izračunava se prema formuli:

$$r_i = \sum_{j=1}^{N} d_{ij}$$

gdje je

r_i – neto odvajanje (engl. *net divergence*) jedinke i,

d_{ij} – udaljenost između jedinke *i* i *j*,

N – ukupan broj jedinki u pokusu.

U drugom je koraku potrebno izračunati korigiranu matricu udaljenosti (engl. *rate-corrected matrix*) imajući u vidu različitu mutacijsku stopu, odnosno različito neto odvajanje jedinki u analizi, te naći par jedinki *i* i *j* čija je korigirana udaljenost (M_{ij}) minimalna i povezati ih preko članka u u skupinu (*ij*):

$$M_{ij} = d_{ij} - \frac{(r_i + r_j)}{N - 2}$$

gdje je

d_{ij} – udaljenost između jedinke *i* i *j*,

r_i – neto odvajanje jedinke *i*,

N – ukupan broj jedinki u pokusu.

Treći je korak izračunavanje duljina grana od novonastalog članka do para jedinki koje su preko njega povezane:

$$d_{iu} = \frac{d_{ij}}{2} + \frac{(r_i - r_j)}{2(N-2)}$$

$$d_{ju} = d_{ij} - d_{iu}$$

gdje je

d_{iu} – udaljenost između jedinke *i* i članka *u*,

d_{ij} – udaljenost između jedinke *i* i *j*,
r_i – neto odvajanje jedinke *i*,
N – ukupan broj jedinki u pokusu.

U četvrtom, završnom koraku, potrebno je izračunati udaljenosti između članka *u* i svih ostalih jedinki u analizi:

$$d_{ku} = \frac{(d_{ki} + d_{kj} - d_{ij})}{2}$$

gdje je

d_{ku} – udaljenost između jedinke *k* i članka *u*,
d_{ki} – udaljenost između jedinke *k* i *i* (koja je s jedinkom *j* povezana preko članka *u*),
d_{ij} – udaljenosti između jedinke *i* i *j*.

Time se tvori nova početna matrica te se cjelokupan postupak ponavlja. Metoda sparivanja susjeda ne pretpostavlja jedinstvenu mutacijsku stopu po svim granama stabla, tako da je prikladna za istraživanja koja uključuju jedinke (ili populacije) različitog oplemenjivačkog statusa (divlji srodnik, tradicijski kultivar, moderni kultivar).

Metoda po Fitchu i Margoliashu (engl. *Fitch-Margoliash method*; FM) temelji se na procjeni patističkih udaljenosti između jedinki na temelju svih mogućih stabala te izboru onog s najkraćom ukupnom duljinom grana. Za svaku je topologiju moguće izračunati udaljenosti između jedinki na stablu. Prilikom zbrajanja duljina grana koje povezuju dvije jedinke na stablu često postoji određena nepodudarnost između patističkih udaljenosti na stablu i udaljenosti u izvornoj matrici zbog odstupanja od aditivnosti. Algoritam po Fitchu i Margoliashu pronalazi „najbolje" stablo pomoću testa stupnja podudaranja (engl. *goodness-of-fit*) izvornih udaljenosti patističkim udaljenostima. Kriterij za ocjenu prilagodbe temelji se na metodi najmanjih kvadrata (engl. *least-squares method*), a izračunava se prema formuli:

$$F = \sum_{p=1}^{P} \frac{(D_{ij} - d_{ij})}{D_{ij}^2}$$

gdje je

F – stupanj podudaranja (engl. *goodness-of-fit*),
d_{ij} – izvorna udaljenost između jedinke *i* i *j*,
D_{ij} – patristička udaljenost između jedinke *i* i *j*,
P – ukupan broj parova svojti u analizi.

Pouzdanost pojedinih grananja na stablu može se utvrditi metodom *bootstrap* (Felsenstein, 1985.). Metoda *bootstrap* jedna je od neparametrijskih tehnika poduzorkovanja u svrhu utvrđivanja pogreške uzorkovanja prilikom izrade stabla. Postupak uključuje sljedeće faze: (1) izrada niza poduzoraka iste veličine kao i izvorni set podataka tako da se se neki podaci ispuštaju, a neki pojavljuju više puta (kombinacije s ponavljanjem), (2) izračun matrica udaljenosti i izrada stabala na temelju većeg broja pseudoponavljanja *bootstrap* (obično više od 1.000), te (3) usporedba stabala bootstrap s izvornim stablom: bilježenje broja stabala *bootstrap* koja sadrže pojedinu skupinu izvornog stabla. Podržana vrijednost *bootstrap* (engl. *bootstrap support value*) određene skupine na stablu predstavlja udio pseudoponavljanja koja su rezultirala stablima koja sadrže istovjetnu skupinu i mjera su njene pouzdanosti. Ukoliko je vrijednost *bootstrap* manja od 50 % skupina nije pouzdana, stoga nije moguće sa sigurnošću utvrditi odražava li nastala skupina stvarnu genetsku sličnost između jedinki ili je rezultat slučajnosti. Vrijednosti od 50 do 74 % smatraju se slabo pouzdanima, od 75 do 89 % pouzdanima, a veće od 90 % vrlo pouzdanima.

3.6. ANALIZA MOLEKULARNE VARIJANCE (AMOVA)

Analizom molekularne varijance (engl. *Analysis of Molecular Variance*; AMOVA) (Excoffier i sur., 1992.) moguće je raščlaniti varijancu udaljenosti između jedinki na njezine sastavnice: sastavnicu varijance uzrokovanu razlikama između populacija i sastavnicu varijance uzrokovanu razlikama između jedinki unutar populacija (odnosno bilo kojih drugih pretpostavljenih razina strukture). Za razliku od klasične analize varijance (ANOVA) kod koje izračunavamo sume kvadrata pojedinih izvora varijabilnosti, pri analizi molekularne varijance koriste

se sume kvadratnih odstupanja (engl. *sums of squared deviations*; SSD). Sume kvadratnih odstupanja definirane su kao odstupanja od centroida u multidimenzionalnom prostoru jer u analizi kao ishodišne podatke koristimo udaljenosti između parova jedinki, a ne vrijednosti određenih svojstava jedinki. Na temelju suma kvadratnih odstupanja svake razine strukture (npr. između i unutar populacija) moguće je izračunati prosječnu sumu kvadratnih odstupanja, procijeniti sastavnice varijance te utvrditi postotak ukupne varijance koji je objašnjen određenom razinom strukture. Opravdanost pretpostavljenih razina strukture možemo utvrditi testom procjenitelja φ koji se u slučaju jednosmjerne analize (*one-way* AMOVA) izračunava prema formuli:

$$\varphi = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

gdje je

σ_a^2 – sastavnica varijance uzrokovana razlikama između populacija,

σ_T^2 – ukupna varijanca.

Za razliku od procjenitelja F u klasičnoj analizi varijance (ANOVA) koji se uspoređuje s teoretskom F-raspodjelom, nulta raspodjela parametara φ nije poznata, stoga se raspodjela izrađuje neparametrijski, na temelju većeg broja permutacija originalne matrice udaljenosti. Analizu molekularne varijance možemo provesti zasebno za sve parove istraživanih populacija te izračunati φ_{ST} vrijednosti između svakog pojedinog para populacija. Imajući na umu da φ_{ST} predstavlja udio varijance između populacija u ukupnoj varijanci, φ_{ST} vrijednosti mogu poslužiti kao mjerilo udaljenosti između populacija (Huff, 1997.).

3.7. GENETSKA STRUKTURA

Cilj je Bayesovske analize populacijske strukture utvrditi optimalan broj skupina radi razvrstavanja jedinki u genetski različite skupine pretpostavljajući Hardy-Weinbergovu razvnotežu, kao i ravnotežu vezanosti gena (engl. *linkage equilibrium*) unutar svake skupine (Pritchard i sur., 2000.; Corander i sur., 2003.). Nakon utvrđivanja optimalnog broja skupina (K) moguće je procijeniti pripadnost jedinki pojedinim skupinama tako da se izračunava udio genoma svake jedinke koji potječe iz određene genetske skupine, odnosno izvorne populacije (engl. *ancestral population*). Osnovni algoritam opisan je 2000. godine (Pritchard i sur., 2000.) i implementiran u računalnom programu STRUCTURE. Sličan je pristup razvijen u programu BAPS (Corander i sur., 2003., 2004.) i TESS (Chen i sur., 2007.) koji uključuju i mogućnost prostornog modeliranja genetske strukture (Corander i sur., 2007.).

Analiza se temelji na Bayesovom teoremu:

$$Pr(H|D) = \frac{Pr(D|H)\,Pr(H)}{Pr(D)}$$

gdje je

$Pr(H|D)$ – posteriorna vjerojatnost hipoteze H uz dane podatke D,

$Pr(D|H)$ – uvjetna vjerojatnost podatka D uz danu hipotezu H,

$Pr(H)$ – priorna vjerojatnost hipoteze H,

$Pr(D)$ – marginalna vjerojatnost podatka D.

U analizi populacijske strukture različite hipoteze (H) pretpostavljaju različit broj skupina, a podaci (D) su višelokusni genotipovi jedinki. Odnos između podataka i hipoteza na temelju kojeg se izračunava uvjetna vjerojatnost podataka D uz danu hipotezu H pretpostavlja niz kriterija optimalnosti (engl. *optimality criterion*) koji uključuju maksimaliziranje Hardy-Weinbergove ravnoteže, kao i ravnoteže vezanosti gena (engl. *linkage equilibrium*) unutar svake pretpostavljene skupine.

Budući da je marginalna vjerojatnost (engl. *marginal probability*) podataka D [$Pr(D)$] konstantna za sve hipoteze, a sve su hipoteze a priori jednako vjerojatne [$Pr(H)$; engl. *prior probability*], posteriorana vjerojatnost [$Pr(H|D)$; engl. *posterior probability*] je proporcionalna uvjetnoj vjerojatnosti (engl. *conditional probability*) podataka D uz danu hipotezu H [$Pr(D|H)$].

Svaki pretpostavljeni broj skupina (K) predstavlja različitu hipotezu, a cilj je analize utvrditi koja je vjerodostojnost (engl. *likelihood*) svake pojedine hipoteze i odabrati najvjerodostojniju. Kao što je maksimalna vjerodostojnost (engl. *maximum likelihood*) hipoteze koja pretpostavlja određeni broj K [engl. *maximum likelihood*; max $L(H=h_K)$] jednaka maksimalnoj posteriornoj vjerojatnosti [engl. maximum posterior probability; max $Pr(H|D)$], tako je i maksimalna marginalna vjerodostojnost [engl. maximum marginal likelihood; max $mL(H=h_K)$] u ovom slučaju jednaka maksimalnoj uvjetnoj vjerojatnosti podataka D uz hipotezu koja pretpostavlja navedeni broj K [engl. *maximum conditional probability*; max $Pr(D|H)$]:

$$max\, L\,(H = h_K) = max\, Pr(H|D)$$

$$max\, m\, L(H = h_K) = max\, Pr(D|H)$$

Vrijednosti marginalne vjerodostojnosti određenog broja skupina (K) često se logaritmiraju tako da se vrijednost izražava kao log(mL), odnosno logaritam marginalne vjerodostojnosti.

Budući da različite hipoteze pretpostavljaju maksimaliziranje velikog broja parametara (Hardy-Weinbergova ravnoteža, ravnoteža vezanosti gena), umjesto izravne procjene maksimalne vjerodostojnosti hipoteza (engl. *maximum likelihood estimation*) koja bi uključivala istodobnu procjenu svih potrebnih parametara modela, Bayesovske se analize često temelje na algoritimima za poduzorkovanje. Algoritimi iz klase Markovljevih lanaca Monte Carlo (engl. *Markov Chain Monte Carlo*; MCMC), kao što je primjerice algoritam Metropolis-Hastings (Chib i Greenberg, 1995.) uobičajene su metode poduzorkovanja iz raspodjele određene parametrima modela koji uključuje zadane kriterije optimalnosti. Stoga se vrijednosti marginalne vjerodostojnosti pojedinih hipoteza ne izračunavaju izravno pomoću procjene maksimalne marginalne vjerodostojnosti, već su dobivene kao srednje vrijednosti marginalnih vjerodostojnosti velikog broja poduzoraka iz raspodjele uspostavljene na temelju modela.

Izbor najvjerodostojnije hipoteze provodi se na temelju vrijednosti parametra ΔK koji predstavlja stopu promjene posteriornih vjerojatnosti između uzastopnih vrijednosti K (Evanno i sur., 2005.). Nakon utvrđivanja najvjerodostojnijeg broja K, jedinke se pridružuju pojedinim skupinama uz izračun udjela genoma (Q) koji potječe iz određene skupine. Na taj način neke jedinke mogu potpuno pripadati jednoj skupini ili pak imati mješovito (hibridno) podrijetlo iz dvije ili više skupina. Utvrđene skupine tako predstavljaju izvorne populacije (engl. *ancestral populations*) na temelju kojih je moguće objasniti genetsku strukturu uzorkovanih populacija.

3.8. PRIMJENA ANALIZE GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Navedeni pristupi u obradi molekularnih podataka prilikom analize genetske raznolikosti temelj su znanstvenih disciplina kao što je populacijska genetika (Hartl i Clark, 2006.), molekularna ekologija (Freeland, 2005.), krajobrazna (Balkenhol i sur., 2016.) i konzervacijska genetika (Allendorf i Luikart, 2007.). Skorašnja istraživanja biljne genetske raznolikosti uzimaju u obzir i mnoštvo drugih podataka o jedinkama i populacijama istraživane vrste uključujući morfološke i biokemijske podatke te podatke o zemljopisnim i bioklimatskim svojstvima mjesta prikupljanja. Cilj je modeliranja ekoloških niša (engl. *Ecological Niche Modelling*; ENM) procijeniti odnos između rasprostranjenosti određene vrste po određenim nalazištima i okolišnih uvjeta tih nalazišta, procijeniti pogodnost staništa za vrstu te izraditi model rasprostranjenosti vrste. Usporedbom rezultata analize molekularne raznolikosti s modelom rasprostranjenosti vrste često se mogu dobiti vrlo zanimljivi uvidi u populacijsku dinamiku vrste te predvidjeti promjene u genetskoj strukturi vrste u budućnosti, imajući u vidu nastupajuće klimatske promjene. Jednako je zanimljivo putovati u evolucijsku prošlost biljnih vrsta jer je na temelju molekularnih podataka moguće testirati različite scenarije koji opisuju demografsku povijest određene vrste koristeći

aproksimativnu Bayesovsku analizu (engl. *Approximate Bayesian Computation*; ABC). Na taj je način moguće procijeniti efektivnu veličinu populacija u prošlosti, utvrditi postojanje genetskog uskog grla (engl. *genetic bottleneck*) tijekom povijesti vrste, kao i vrijeme razdvajanja (engl. *divergence time*) genetskih skupina od kojih se danas sastoji određena biljna vrsta. Nadalje, integracijom genetskih i bioklimatskih podataka moguće je identificirati lokuse pod selekcijom uslijed adaptacije populacija na svojstvene bioklimatske prilike staništa, te tako utvrditi koji su okolišni čimbenici bili presudni u diferencijaciji populacija. Konzervacijska je genetika usmjerena na praktičnu stranu analize genetske raznolikosti i uključuje analizu stanja populacija radi očuvanja bioraznolikosti i uvrđivanja glavnih čimbenika genetske erozije. Pritom se pod genetskom erozijom (engl. *genetic erosion*) smatra sveprisutno smanjenje genetske raznolikosti mnogih biljnih vrsta na našem Planetu uzrokovano prekomjernim iskorištavanjem, uništenjem staništa kao i promjenama okolišnih uvjeta. Krajnji cilj konzervacijske genetike pritom bi trebao biti procjena ugroženosti i osmišljavanje akcijskih planova zaštite populacija biljnih vrsta.

U kontekstu oplemenjivanja bilja, analiza genetske raznolikosti ima više korisnih primjena. Ovdje genetsku raznolikost najčešće promatramo i analiziramo unutar jedne kulturne biljne vrste koju predstavljaju različite populacije i jedinke uzimajući u obzirom povijest uzgoja i stupanj oplemenjivanja. Kao materijal za analizu mogu se koristiti i divlji preci, tradicijski i moderni kultivari te oplemenjivačke linije. Štoviše, ponekad postoji potreba i za analizom unutarsortne varijabilnosti, a ona je pretpostavka i osnova klonske selekcije, metode razvoja „klonova" kao kategorije sadnog materijala kod vegetativno razmnožavanih vrsta (Maletić i sur., 2008.; Anhalt i sur., 2011.).

Analiza genetske raznolikosti prije ere molekularne karakterizacije, zasnivala se pretežno na morfološkim, fenološkim i nekim biološkim karakteristikama genetski stabilnih, kvalitativnih svojstava i manjeg broja agronomskih svojstava, prikladnih za razlikovanje i evaluaciju oplemenjivačke germplazme. Međutim, dostupnost novih metoda genotipizacije koje osiguravaju velike količine molekularnih podataka, omogućavaju različite analize čiji su rezultati izravno upotrebljivi u oplemenjivanju, sjemenarstvu i rasadničarstvu. Broj genetskih biljega i razina njihova polimorfizma daleko nadmašuje broj svojstava koje je moguće prikupiti metodama fenotipizacije (opažanja, mjerenja, kemijske analize i sl.), a uz to su i jeftiniji.

Pouzdana identifikacija i razlikovanje kultivara na temelju polimorfizma DNA sekvenci (engl. *DNA fingerprinting*) predstavlja važan alat za upravljanje kolekcijama biljnih genetskih izvora (bankama gena) i u proizvodnji reproduktivnog materijala poljoprivrednih vrsta (Korir i sur., 2012.). Genetskom karakterizacijom uz pomoć relativno malog broja SSR ili SNP biljega moguće je pouzdano razvrstavanje i razlikovanje primki koje imaju genetski homogenu strukturu (linijski, hibridni ili klonski tip kultivara). Genetička identifikacija kultivara danas nalazi redovnu primjenu u sjemenarstvu i rasadničarstvu radi potvrđivanja genotipskog statusa visokih kategorija sjemena i matičnih nasada komercijalnih klonskih kultivara te kontroli genetske čistoće njihovog reproduktivnog materijala. Međutim, kod stranooplodnih vrsta koje se komercijalno razmnožavaju sjemenom u tipu stranoplodnih sorti, identifikacija pomoću molekularnih biljega još uvijek nije pouzdana i standardizirana. Isto tako, kada su u pitanju tradicijski (autohtoni) kultivari malih populacija (poput vinove loze ili masline) i čija povijest nastanka i širenja nije poznata, potrebna su temeljita istraživanja kako bi se pouzdano utvrdio i definirao njihov genotip. Istraživanjem autohtonog sortimenta vinove loze utvrđeni su brojni slučajevi uzoraka istog genotipa, a različitog imena (sinonimi), kao i uzorci koji u praksi nose jedno ime, a imaju različit genotip (homonimi) (Maletić i sur., 2008.; Lacombe i sur., 2011.). Pregled sličnih istraživanja na sortimentu masline donose Yadav i sur. (2021).

Ukoliko se genotipizacija kultivara i oplemenjivačkih linija provodi s kodominantnim ili bialelnim

biljezima (npr. SSR i SNP), osim uvida u razinu genetskog variranja, strukturiranost populacije i međusobnog srodstva, moguće je rekonstruirati pedigre i bliske srodstvene veze među sortama. Iz ovakvih istraživanja na vinovoj lozi, pretežno samooplodnoj vrsti, utvrđeno je da su tradicijske sorte nastajale isključivo kao rezultat daleko manje vjerojatne spontane stranooplodnje te da je njihova prosječna opažena heterozigotnost izuzetno velika (75 – 85 %). Sveobuhvatnim genotipizacijama tradicijskih sorata vinove loze moguće je provesti i analizu roditeljstva te rekonstruirati pedigre i područje nastanka sorata klonskog tipa, a koje su u proizvodnji više stotina godina (Bowers i Meredith, 1997.; Maletić i sur., 2004.; Sefc i sur., 2009.). Isto tako, analizom stotina sorata iz velikih regija ili pojedinih država, uočeno je postojanje manjeg broja „ključnih sorata" (engl. *key genitors or founders*) koje su sudjelovale u nastanku više drugih sorata (Žulj Mihaljević i sur., 2020.).

Zadnjih 10 do 20 godina provedena je temeljita genotipizacija sortimenta svih važnih poljoprivrednih vrsta, kako na nacionalnom, tako i na globalnom planu iz čega je proisteklo više nacionalnih ili međunarodnih istraživačkih baza podataka u kojima su javno dostupni podaci genetičke, biokemijske i morfološke karakterizacije. Dobar primjer su *European Vitis Database* za vinovu lozu (http://www.eu-vitis.de) i *OLEA databases* za maslinu (https://www.ibe.cnr.it).

Rezultati analize genetske raznolikosti jedinki i populacija poljoprivrednog bilja mogu se upotrijebiti i za učinkovitije dizajniranje predoplemenjivačkih programa (engl. *pre-breeding*), čija je svrha postupno uvođenje divlje ili egzotične germplazme u oplemenjivačke populacije, a sa svrhom proširenja njihove genetske osnove (Haupt i Schmid, 2020.; Sukumaran i sur., 2022.). Rezultati analiza morfološke i molekularne raznolikosti koriste se i za formiranje jezgrenih kolekcija (engl. *core collections*), subpopulacija unutar genbanki, koje unutar manjeg broja primki sadrže ukupnu alelnu varijabilnost cijele kolekcije (Brown, 1989.). Općenito, molekularni podaci, u kombinaciji s podacima o agronomskim svojstvima, mogu biti upotrijebljeni za povećanje genetske varijabilnosti i vrijednosti oplemenjivačkih populacija, ili za identifikaciju donora vrijednih gena (QTL-ova) (Swarup i sur., 2021.) Istraživanja su pokazala da je i stupanj genetske udaljenosti (GD) između elitnih inbred linija u korelaciji s razinom heterotičnog učinka njihovih F1 hibrida (Melchinger, 1999.).

Analizu genetske raznolikosti biljnog materijala važnog u oplemenjivanju neophodno je pažljivo provesti i prije razvitka populacija za kartiranje (engl. *mapping populations*) kao i prilikom izbora panela (populacije genotipova) za *pridružujuće kartiranje* na cjelokupnom genomu (engl. *genome-wide association studies*; GWAS). U prvom slučaju, kada se obično razvijaju biparentalne populacije, važno je odabrati roditelje maksimalne fenotipske divergentnosti kako bi se mogla ostvariti što veća fenotipska i genotipska varijabilnost u generaciji razdvajanja. O ovome će uvelike ovisiti i polimorfizam biljega. Međutim, izbor roditelja moguće je provesti i temeljem genetske udaljenosti procijenjene molekularnim biljezima. Veličina i tip populacije koji određuju maksimalni stupanj rekombinacije te dobra pokrivenost genoma s polimorfnim biljezima ključni su za uspješno kartiranje (Collard i sur., 2005.).

Kod izbora panela genotipova za GWAS, veličina panela (broj genotipova), a posebno njegov sastav, ključni su za uspješnost kartiranja (Tibbs Cortes i sur., 2021.). U istraživanjima kakva se opisuju u ovoj knjizi, veličina panela varira od svega 150 do nekoliko tisuća genotipova. Veličina panela ovisi o puno čimbenika, u praksi ponajprije o dostupnosti materijala i troškovima fenotipizacije i genotipizacije, a za procjenu kritične veličine razvijene su i posebne aplikacije. Osim toga, pri izboru genotipova panela vrlo je važan preduvjet zadovoljavajući broj rekombinacijskih događaja, a što pretpostavlja odsutnost srodnosti i strukturiranosti unutar panela. Stranooplodne vrste, kod iste veličine panela, u pravilu imaju veći stupanj rekombinacije od samooplodnih. Kako unutar panela srodnost između jedinki uglavnom nije poznata, stoga se ona prije samog postupka kartiranja mora procijeniti pomoću genotipskih podataka

te utvrđeni obrasci moraju biti uključeni u model kartiranja. Ukoliko je panel dovoljno velik, divergentan i genetski varijabilan, kartiranje je u pravilu učinkovitije nego u slučaju biparentalnih populacija. Kako se postupci kartiranja biljega najčešće istovremeno provode radi utvrđivanja pozicija QTL-ova za agronomski važna svojstva, za formiranje panela može biti presudno i posjedovanje prethodno prikupljenih fenotipskih podataka. Tako kao materijal za pridružujuće kartiranje mogu poslužiti prethodno fenotipizirane primke iz genbanki, fenotipski karakterizirane oplemenjivačke linije ili priznate sorte iz službenih pokusa za priznavanje sorata.

U nastavku ovog poglavlja nekoliko je studija slučaja u kojima se preciznije opisuju svrha, metode, korišteni biljni materijal i načini primjene analize raznolikosti kod različitih biljnih vrsta. To su vrste koje su uključene u istraživanja vezana uz projekt Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv). Dvije od njih (dalmatinski buhač i ljekovita kadulja) predstavljene su prirodnim populacijama koje imaju potencijal kultivacije, a s ciljanom primjenom u proizvodnji bioinsekticida i farmakoloških proizvoda. Nadalje, tu su studije slučaja u kojima se analizira bioraznolikost kultivara i oplemenjivačkih linija gospodarski važnih vrsta (kukuruz, pšenica i soja) te tri vrste (vinova loza, maslina i raštika) koje su predstavljene s tradicijskim kultivarima.

U studijama slučaja koje slijede ukratko se navode dosadašnje spoznaje i aktualni izazovi u oplemenjivanju, opisuju se korištene metode i materijali istraživanja te iznose preliminarni rezultati istraživanja.

LITERATURA

Allendorf, F.W., Luikart, G., 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. Malden, MA, USA.

Anhalt, U.C.M., Martínez, S.C., Rühl, E., Forneck, A., 2011. Dynamic grapevine clones-an AFLP-marker study of the Vitis vinifera cultivar Riesling comprising 86 clones. Tree Genet. Genomes 7, 739–746.

Balkenhol, N., Cushman, S.A., Storfer, A.T., Waits, L.P., 2016. Landscape genetics: concepts, methods, applications. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol. Evol. 22, 148–155.

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

Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L., 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature 368, 455–457.

Bowers, J.E., Meredith, C.P., 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. Nat. Genet. 16, 84–87.

Brown, A.H.D., 1989. Core collections: A practical approach to genetic resources management, u: Genome. NRC Research Press Ottawa, Canada, str. 818–824.

Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am. J. Hum. Genet. 19, 233.

Chen, C., Durand, E., Forbes, F., François, O., 2007. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. Mol. Ecol. Notes 7, 747–756.

Chib, S., Greenberg, E., 1995. Understanding the metropolis-hastings algorithm. Am. Stat. 49.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142, 169–196.

Corander, J., Sirén, J., Arjas, E., 2007. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. Comput. Stat. 2007 231 23, 111–129.

Corander, J., Waldmann, P., Marttinen, P., Sillanpää, M.J., 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. Bioinformatics 20, 2363–2369.

Corander, J., Waldmann, P., Sillanpää, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. Genetics 163, 367–374.

Crick, F., 1970. Central Dogma of Molecular Biology. Nature 227, 561–563.

Dahm, R., 2005. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Dev. Biol. 278, 274–288.

Damer, B., Deamer, D., 2020. The hot spring hypothesis for an origin of life. Astrobiology 20, 429–452.

Darwin, C., 2011. On the origin of species by means of natural selection; or, The preservation of favoured races in the struggle for life / by Charles Darwin.

Edwards, A.W.F., 2008. G. H. Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium. Genetics 179, 1143–1150.

El Mousadik, A., Petit, R.J., 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. Mol. Ecol. 5.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491.

Felsenstein, J., 1995. PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). Cladistics 5, 164–166.

Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution (N. Y). 39, 783.

Fitch, W.M., Margoliash, E., 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 155, 279–284.

Freeland, J.., 2005. Molecular Ecology, Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd, Oxford, UK.

Gower, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika 53, 325–338.

Hardy, G.H., 1908. Mendelian proportions in a mixed population 28, 49–50.

Hartl, D.L., Clark, A.G., 2006. Principles of Population Genetics, Principles of Population Genetics. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.

Haupt, M., Schmid, K., 2020. Combining focused identification of germplasm and core collection strategies to identify genebank accessions for central European soybean breeding. Plant Cell Environ. 43, 1421–1436.

Heather, J.M., Chain, B., 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Genomics 107, 1–8.

Hillis, D.M., 1984. Misuse and Modification of Nei's Genetic Distance. Syst. Zool. 33.

Huff, D.R., 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Sci. 37.

Hurlbert, S.H., 1971. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. Ecology 52, 577–586.

Korir, N.K., Han, J., Shangguan, L., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y., Fang, J., 2012. Plant variety and cultivar identification: Advances and prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 33, 111–125.

Lacombe, T., Audeguin, L., Boselli, M., Bucchetti, B., Cabello, F., Chatelet, P., Crespan, M., D'Onofrio, C., Dias, J.E. i sur., 2011. Grapevine European catalogue: Towards a comprehensive list. Vitis - J. Grapevine Res. 50, 65–68.

Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., 2008. Vinova loza : ampelografija, ekologija, oplemenjivanje, First. ed. Školka knjiga, d.d., Zagreb.

Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Piljac, J., Dangl, G.S., Vokurka, A., Lacombe, T., Mirošević, N., Meredith, C.P., 2004. Zinfandel, Dobričić, and Plavac mali: The genetic relationship among three cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. Am. J. Enol. Vitic. 55, 174–180.

Marshall, M., 2020. Origin Life. Nature 588, 210–213.

Maruyama, S., Kurokawa, K., Ebisuzaki, T., Sawaki, Y., Suda, K., Santosh, M., 2019. Nine requirements for the origin of Earth's life: Not at the hydrothermal vent, but in a nuclear geyser system. Geosci. Front. 10, 1337–1357.

Melchinger, A.E., 1999. Genetic diversity and heterosis, u: The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. John Wiley & Sons, Ltd, str. 99–118.

Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B., 2011. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? PLoS Biol 9, 1001127.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986., u: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. str. 263–273.

Nei, M., 1978. Estimation of Average Heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89, 583–590.

Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 3321–3323.

Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. Am. Nat. 106, 283-+.

Petit, R.J., El Mousadik, A., Pons, O., 2008. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. Conserv. Biol. 12.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Rogers, J.S., 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in genetics, VII. Univ. Texas Publ. 7213.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Sefc, K.M., Pejić, I., Maletić, E., Thomas, M.R., Lefort, F., 2009. Microsatellite markers for grapevine: Tools for cultivar identification & pedigree reconstruction, u: Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology: Second Edition. Springer Netherlands, str. 565–596.

Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E., 1986. Fluoresence detection in auomated DNA sequence analysis. Nature 321, 674–679.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Numer. Taxon. Princ. Pract. Numer. Classif.

Sukumaran, S., Rebetzke, G., Mackay, I., Bentley, A.R., Reynolds, M.P., 2022. Pre-breeding Strategies, u: Wheat Improvement. Springer International Publishing, Cham, str. 451–469.

Sutton, W.S., 1902. On the morphology of the chromosome group in Brachysola magna. Biol. Bull. 4, 24–39.

Swarup, S., Cargill, E.J., Crosby, K., Flagel, L., Kniskern, J., Glenn, K.C., 2021. Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. Crop Sci.

Swofford, D.L., Olsen, G.J., 1990. Phylogeny reconstruction, u: Hills, D., Moritz, C. (Ur.), Molecular Systematic. Sinaucr Associates, str. 411–501.

Tibbs Cortes, L., Zhang, Z., Yu, J., 2021. Status and prospects of genome-wide association studies in plants. Plant Genome.

Turley, L., Bateson, W., 1910. Mendel's Principles of Heredity. Am. J. Psychol. 21, 329.

Wahlund, S., 1928. Zusammensetzung von populationen und korrelationserscheinungen vom standpunkt der vererbungslehra aus betrachtet. Hereditas 11, 65–106.

Watson, J.D., Crick, F.H.C., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 171, 737–738.

Weinberg, W., 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkd. Württemb. 44, 369–382.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution (N. Y). 38, 1358.

Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics 16, 97–159.

Yadav, S., Carvalho, J., Trujillo, I., Prado, M., 2021. Microsatellite markers in olives (Olea europaea l.): Utility in the cataloging of germplasm, food authenticity and traceability studies. Foods.

Žulj Mihaljević, M., Maletić, E., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Zyprian, E., Pejić, I., 2020. Genetic diversity, population structure, and parentage analysis of croatian grapevine germplasm. Genes (Basel). 11, 1–35.

ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI STUDIJE SLUČAJA

(A)

PRIRODNE POPULACIJE

Dalmatinski buhač
Ljekovita kadulja

(B)

OPLEMENJIVAČKE LINIJE I KULTIVARI

Kukuruz
Soja
Vinova loza
Maslina
Raštika

3.9. Genetska raznolikost i struktura populacija dalmatinskog buhača

MARTINA GRDIŠA I FILIP VARGA

3.9.1. UVOD

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip.) višegodišnja je, termofilna, endemska vrsta istočne obale Jadranskog mora, a prema sistematskoj klasifikaciji pripada porodici Asteraceae. Diploidna je biljna vrsta (2n=18) (MacDonald, 1995.) te stranooplodna i samoinkopatibilna (Parlevliet, 1975.), stoga posjeduje visoke razine heterozigotnosti i varijabilnosti u morfološkim, biokemijskim i genetskim svojstvima (Grdiša i sur., 2009., 2013., 2014.). Rasprostranjenost dalmatinskog buhača proteže se duž obalnih područja Hrvatske i otoka, južnih dijelova Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije (Euro+Med, 2006.; Nikolić, 2020.). Samoniklo raste na kamenjarskim pašnjacima, kamenitim, skeletnim i degradiranim staništima; kao i u svijetlim šumama alepskog bora te u vegetaciji bušika, maslinicima i vinogradima (Kovačić i sur., 2008.).

Biološki aktivna tvar dalmatinskog buhača naziva se piretrin, a pripravci na bazi piretrina najčešće su komercijalno korištena sredstva za zaštitu bilja u ekološkoj poljoprivredi. Koncentracija piretrina najviša je u cvatovima dalmatinskog buhača. Piretrin čini šest aktivnih spojeva (piretrin I i II, cinerin I i II te jasmolin I i II), a piretrin I i II čine preko 50 % ukupnih piretrina (Casida, 1973.). U prirodnim populacijama ukupni sadržaj piretrina kreće se od 0,36 do 1,3 % (prosjek 0,86 % po masi suhog cvata) (Grdiša i sur., 2013.; Varga i sur., 2021.), dok je kod komercijalnih kultivara zabilježen sadržaj piretrina i do 3,0 % (Bhat, 1995.). Uz genotip, na sintezu i akumulaciju piretrina utječu i morfološka svojstva biljaka (Bhat i Menary, 1986.; Bhat, 1995.), klimatski uvjeti (Wandahwa i sur., 1996.; Ambrožič Dolinšek i sur., 2007.), metode ekstrakcije (Ban i sur., 2010.; Nagar i sur., 2015.; Gallo i sur., 2017.), uvjeti skladištenja (Morris i sur., 2006.), tehnologija uzgoja (Suraweera i sur., 2017.; Grdiša i sur., 2022.) i dr.

Piretrin se brzo razgrađuje na svjetlu i visokim temperaturama. Čvrsto se veže za čestice tla, slabo je pokretan u tlu (Crosby, 1995.; Gunasekara, 2004.) te ne dospijeva do podzemnih voda i ne nakuplja se u hranidbenim lancima, stoga primjena sredstava za zaštitu bilja na bazi piretrina ima minimalno negativan utjecaj na okoliš (Casida i Quistad, 1995.). Kod primjene piretrina nije zabilježena pojava rezistentnosti kod štetnika, kao što je slučaj kod brojnih sintetičkih insekticida, budući da složenost prirodnih ekstrakata otežava njen razvoj. Uz insekticidno djelovanje piretrin djeluje repelentno na čitav niz štetnika, jer ih svojim karakterističnim mirisom odbija, što je od iznimne važnosti kod zaštite hrane u skladištima (Crombie, 1995.).

Uzgoj i korištenje dalmatinskog buhača na području RH započinje 1850. godine i to na području Dalmacije. Vodeću poziciju u proizvodnji suhih cvatova dalmatinskog buhača navedeno područje zadržalo je sve do početka I. svjetskog rata. Od 1914. do 1930. godine u Dalmaciji su proizvedene značajne količine cvjetova buhača koje su se izvozile u europske zemlje i SAD. Uz Japan i Keniju, proizvodnja se proširila i u druge zemlje, dok se proizvodnja u Hrvatskoj (u to vrijeme dijelu Jugoslavije) postepeno smanjivala, a otkrićem i širokom uporabom sintetskog insekcitida DDT-a (diklor-difenil-trikloretan) proizvodnja i prestaje (Ožanić, 1955.). Danas su najveći proizvođači dalmatinskog buhača Tanzanija, Ruanda, Kenija i Australija (Tasmanija) (FAO, 2018.), dok su kasniji pokušaji ponovnog uvođenja dalmatinskog buhača u proizvodnju u Hrvatskoj bili bezuspješni.

U današnje vrijeme dalmatinski buhač nanovo privlači veliku pozornost, ponajviše ekoloških proizvođača, s obzirom da je riječ o biljnoj vrsti čije je korištenje dozvoljeno u navedenom sustavu proizvodnje. S ciljem informiranja znanstvenika i šire javnosti o svim mogućim aspektima dalmatinskog buhača objavljen je i znanstveni rad koji sažima 100 godina znanstvenih istraživanja na dalmatinskom buhaču (Jeran i sur., 2020.). Moderna genetska istraživanja dalmatinskog buhača usmjerena su prema utvrđivanju gena kandidata povezanih s biosintezom piretrinskih spojeva (Tang i sur., 2012.; Sultana i sur., 2015.), čemu je doprinio i nedavno konstruiran nacrt genoma vrste (Yamashiro i sur., 2019.). U znanstvenoj literaturi dostupan je neznatan broj znanstvenih radova koji istražuju prirodne populacije dalmatinskog buhača, a koje su danas suočene s nizom čimbenika koji utječu na smanjenje njihove brojnosti, pa tako i genetske raznolikosti. Od čimbenika valja spomenuti uništavanje i gubitak staništa, posebice zbog razvitka poljoprivrede i turizma, prekomjerno iskorištavanje, razvoj industrije, te ubrzani razvoj infrastrukture i naselja. Dosadašnja populacijsko-genetička istraživanja na prirodnim populacijama dalmatinskog buhača provedena su primjenom dvaju sustava biljega, polimorfizma duljine PCR-umnoženih fragmenata DNA (engl. *Amplified Fragment Lenght Polymorphism*; AFLP) i jednostavnih ponavljajućih sekvenci, odnosno mikrosatelita (engl. *Simple Sequence Repeats*; SSR). Za razliku od SSR biljega, AFLP su biljezi univerzalni te ih nije potrebno razvijati za svaku pojedinu vrstu, dok su biljezi SSR informativniji, zahvaljujući kodominantnoj prirodi (moguće je razlikovati homozigote i heterozigote), specifični za lokus i imaju visoku razinu ponovljivosti (Vieira i sur., 2016.). Oba sustava biljega od svog otkrića intenzivno su korištena u analizi genetske raznolikosti i populacijske strukture velikog broja biljnih vrsta. Konačni cilj istraživanja primjenom AFLP ili SSR biljega bilo je prikupljanje podataka za korištenje prirodnih populacija u budućim oplemenjivačkim i sjemenarskim programima, a isto tako i prikupljanje podataka potrebnih za uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju te očuvanje ovih vrijednih biljnih genetskih izvora.

3.9.2. GENETSKA RAZNOLIKOST I STRUKTURA DALMATINSKOG BUHAČA UTVRĐENA PRIMJENOM AFLP BILJEGA

U istraživanju genetske raznolikosti i strukture dalmatinskog buhača pomoću biljega AFLP bilo je uključeno 20 prirodnih populacija uzorkovanih duž hrvatskog dijela jadranske obale i otoka, pri čemu je korišteno šest kombinacija selektivnih početnica. Utvrđen je veliki broj polimorfnih biljega (593), što je potvrdilo postojanje genetske raznolikosti na razini vrste. Postotak polimorfnih biljega varirao je između populacija s najvećim udjelom u populaciji s otoka Krka (52,11 %), a najmanjim u populaciji s Biokova – Kotiški Stanovi (26,14 %).

Kod višegodišnjih stranooplodnih biljnih vrsta ukupna genetska raznolikost većim je dijelom rezultat veće unutarpopulacijske raznolikosti (Hamrick i Godt, 1996.), što je kod analiziranih populacija dalmatinskog buhača i potvrđeno izračunom Shannonovog informacijskog indeksa fenotipske raznolikosti i analizom molekularne varijance (engl. *analysis of molecular variance*; AMOVA) koji su omogućili raspodjelu ukupne raznolikosti na onu uzrokovanu razlikama između populacija i unutar populacija.

Ukupna fenotipska raznolikost populacija izračunata Shannonovim informacijskim indeksom iznosila je H_t = 0,297 te se veći dio odnosio na razlike unutar populacija (75 %), dok je ostatak bio uzrokovan razlikama između populacija. Ovi su rezultati u skladu s rezultatima AMOVA-e koja je također pokazala da većina ukupne genetske raznolikosti pripada unutarpopulacijskoj raznolikosti (85,78 %), dok manji dio (14,22 %) pripada raznolikosti između populacija; što upućuje na umjerenu genetsku diferencijaciju između populacija (Wright, 1951.), odnosno na protok gena između nekih populacija.

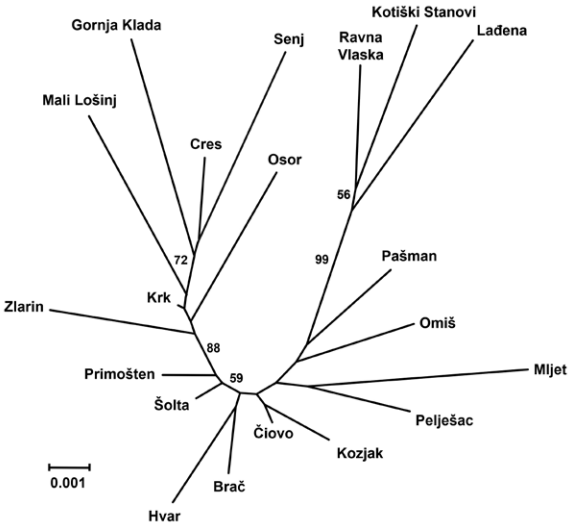
Od ukupno 593 utvrđenih alela, privatnih je alela utvrđeno ukupno 36. Populacije s najviše privatnih alela (4) bile su populacije Mali Lošinj i Primošten, dok takvi aleli nisu pronađeni u populacijama sa Zlarina, Šolte i Hvara. Najvišu razinu očekivane heterozigotnosti (H_E) imala je populacija Mali Lošinj (H_E = 0,131), a najnižu populacija s Biokova (0,92) – Kotiški Stanovi. Vrijednosti DW (engl. *Frequency-Down-Weighted marker value*; (Schönswetter i Tribsch, 2005.) kretale su se od 18,92 u populaciji Kotiški stanovi do 95,20 u populaciji Mali Lošinj (Tablica 3.1.).

TABLICA 3.1. **MOLEKULARNA RAZNOLIKOST 20 POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU BILJEGA AFLP.**

BROJ PRIMKE	POPULACIJA	*P%*	N_{pr}	*I*	H_E	*DW*
MAP02143	Osor	44,18	2	0,242	0,112	56,76
MAP02158	Cres	45,70	2	0,246	0,113	58,18
MAP02139	Mali Lošinj	50,93	4	0,284	0,131	95,20
MAP02156	Krk	52,11	3	0,268	0,118	62,74
MAP02148	Gornja Klada	40,64	1	0,214	0,105	48,82
MAP02138	Senj	37,61	2	0,214	0,105	42,91
MAP02180	Pašman	36,26	3	0,205	0,102	41,45
MAP02171	Zlarin	42,33	0	0,234	0,109	45,04
MAP02166	Primošten	45,53	4	0,239	0,110	46,09
MAP02144	Čiovo	47,22	2	0,251	0,118	48,67
MAP02153	Šolta	40,13	0	0,226	0,105	31,59
MAP02145	Kozjak	41,15	1	0,220	0,106	31,25
MAP02155	Brač	40,81	3	0,216	0,102	47,50
MAP02173	Hvar	37,44	0	0,209	0,102	29,40
MAP02170	Omiš	38,79	2	0,205	0,102	39,09
MAP02142	Kotiški Stanovi	26,14	1	0,160	0,092	18,92
MAP02140	Lađena	34,40	1	0,196	0,099	47,38
MAP02141	Ravna Vlaška	34,23	3	0,196	0,096	48,53
MAP02184	Pelješac	42,50	1	0,247	0,125	33,18
MAP02152	Mljet	33,39	1	0,186	0,094	40,03

MAP - *Broj primke u Kolekciji ljekovitog i aromatičnog bilja, Zagreb, Hrvatska*, (*dostupno na:* cpgrd.hcphs.hr); *%P - udio polimorfnih biljega;* N_{pr} *- broj jedinstvenih alela; I - Shannonov informacijski indeks fenotipske raznolikosti;* H_E *- očekivana heterozigotnost; DW - Frequency-down-weighted marker vrijednost*

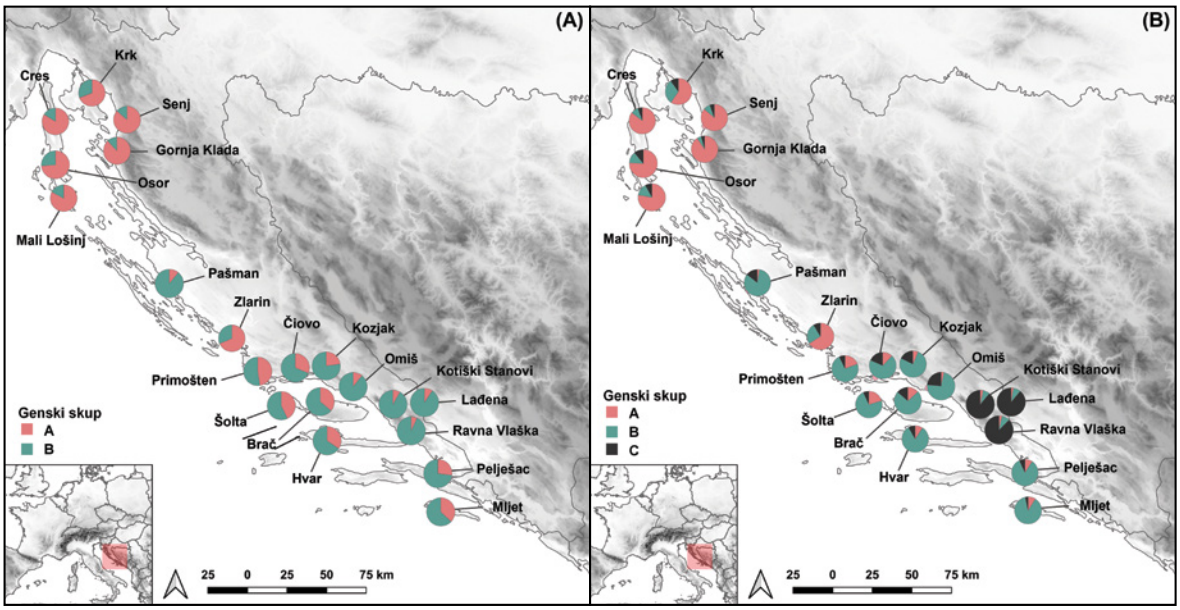
SLIKA 3.1. STABLO PO FITCH-MARGOLIASHU IZRAĐENO PREMA UDALJENOSTIMA PO NEI-U IZMEĐU 20 POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU AFLP BILJEGA.



Utvrđena je umjerena razina genetske diferencijacije populacija (F_{ST} = 0,078), što upućuje na kontinuirani protok gena između pojedinih populacija. Prema indeksu genetske diferencijacije kao i analizi genetske udaljenosti (Nei, 1972.) najviše su se genetski razlikovale populacije Senj i Ravna Vlaška (Biokovo), dok su genetski najsličnije populacije bile Čiovo i Šolta.

Na stablu po Fitch-Margoliashu (Slika 3.1.), koje je izrađeno na temelju udaljenosti po Nei-u jasno je vidljivo razdvajanje populacija u dvije grupe (sjeverni Jadran vs. srednji i južni Jadran), te jasno grupiranje i odvajanje populacija s Biokova od preostalih južnih populacija (vrijednost *bootstrap* 99 %). Isto je potvrdila i Bayesovska analiza populacijske strukture. Dakle, rezultati istraživanja upućuju na genetsku diferencijaciju dalmatinskog buhača na dvije (K = 2; Slika 3.2.a), odnosno tri (K = 3; Slika 3.2.b) jasne genske skupine.

Utvrđena genetska struktura, tj. zemljopisno i genetski jasno definirani genski skupovi upućuju na činjenicu da su populacije dalmatinskog buhača preživjele nepovoljne klimatske uvjete unutar refugija, što je do sada potvrđeno za veliki broj balkanskih biljnih vrsta (Surina i sur., 2011.; Kutnjak i sur., 2014.; Glasnovic i sur., 2018.) te da je upravo ograničeni protok gena između refugijalnih populacija rezultirao formiranjem jasno definiranih genskih skupova. Visoke vrijednosti očekivane heterozigotnosti, najveći broj privatnih alela i *DW* vrijednosti utvrđene su kod sjeverno jadranskih populacija što govori da su navedene populacije davno izolirane od ostatka populacija iste vrste, ali dovoljno brojne da nije došlo do smanjenja raznolikosti uslijed oplodnje u srodstvu. Postojanje refugija na sjevernom dijelu Jadrana neočekivano je za termofilnu biljnu vrstu, ali ih je moguće objasniti kroz klimatske uvjete interglacijalnih i glacijalnih razdoblja koja su karakteristična za kvartarni period, a koja su poznata po velikim migracijama biljnih vrsta. Moguće je objašnjenje da su u razdoblju zadnjeg interglacijala, kada je bilo daleko toplije nego što je to danas, populacije koje su izvorno bile rasprostranjene južnije, migrirale u sjeverne krajeve i tamo preživjele ledeno doba; izolirane od izvorne populacije, što je dovelo do genetske diferencijacije i formiranje sjevernog genskog skupa. U odnosu na sjeverne populacije, južne populacije generalno su karakterizirane manjim brojem privatnih alela, manjom vrijednošću *DW* i genetskom raznolikošću, što se ne podudara s općim predviđanjima da su najviše razine raznolikosti prisutne u južnim regijama rasprostranjenosti vrsta (Taberlet i sur., 1998.; Hampe i Petit, 2005.). Niske vrijednosti genetske raznolikosti nekih južnih populacija moguće je pripisati ljudskoj aktivnosti, tj. prekomjernom iskorištavanju tijekom prošlog stoljeća. Do 1850-ih, biljni materijal za izdvajanje piretrina intenzivno je prikupljan iz prirode (Ožanić, 1955.), stoga je vrlo vjerojatno da je prekomjerna eksploatacija odgovorna za tako nisku genetsku raznolikost i vrijednost *DW*. Iznimka je populacija s otoka Pelješca kod koje je utvrđena visoka razina genske raznolikosti popraćena malim brojem privatnih alela i niskom *DW* vrijednošću, što govori da je riječ o skorašnjoj populaciji, te da postoji slobodan protok gena iz susjednih populacija. Ova je populacija vjerojatno zona sekundarnog kontakta između divergentnih linija i antropogenog je porijekla. Za hibridne



SLIKA 3.2. REZULTATI ANALIZE GENETSKE STRUKTURE PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU AFLP BILJEGA UZ POSTOJANJE: A) DVA GENSKA SKUPA (*K* = 2); B) TRI GENSKA SKUPA (*K* = 3).

populacije sa Zlarina, Primoštena i Šolte također se pretpostavlja da su antropogenog podrijetla te da su utemeljene razmjenom sjemenskog materijala između poljoprivrednika iz različitih geografskih regija u svrhu osiguravanja biljnog materijala za uzgoj buhača, koji je započeo 1850-ih u blizini Dubrovnika i brzo se proširio dalmatinskim primorjem i otocima (Ožanić, 1955.).

Kao što je i spomenuto, populacije s Biokova grupirale su se u zasebni genski skup, kao rezultat geografske izolacije od ostalih populacija, koja za posljedicu ima smanjen protok gena (Vucetich i Waite, 2003.). Kod biokovskih populacija utvrđene su najniže vrijednosti genetske raznolikosti i *DW*, što upućuje na činjenicu da su navedene populacije nastale skorašnjim širenjem te da su prošle kroz genetsko usko grlo, što je rezultiralo smanjenjem genetske raznolikosti. Biokovske populacije uzorkovane su na znatno višim nadmorskim visinama (od 1295 do 1335 m. n.v.), od ostalih populacija, sa zemljopisno i ekološki rubnih područja rasprostranjenosti vrste, stoga je bilo i za očekivati takve rezultate (Eckert i sur., 2008.). Na višim nadmorskim visinama s atipičnim klimatskim uvjetima za termofilnu biljnu vrstu, vrlo je malo vjerojatno da bi se u današnje vrijeme mogao očekivati spontani razvoj populacija. Međutim, pretpostavlja se da je tijekom nekih prošlih razdoblja koja su bila toplija od sadašnjih (holocenski klimatski optimum) (Rossignol-Strick, 1999.) došlo do visinskih pomaka u rasprostranjenosti vrste, što je zabilježeno i kod drugih vrsta sa zapadnog Balkana (Surina i sur., 2011.).

Genetska diferencijacija između populacija mogla se bolje objasniti na temelju bioklimatskih razlika između lokacija uzorkovanja populacija (12,3 %), što je pokazala analiza izolacije uslijed ekološke udaljenosti (engl. *isolation-by-environmen*; IBE; Mendez i sur., 2010.), nego li izolacijom uslijed udaljenosti(engl. *isolation-by-distance*; IBD; Rousset, 1997.), čijom je analizom utvrđeno da se 5,6 % genetske diferencijacije između populacija može objasniti prostornom udaljenošću. Rezultati analize izolacije uslijed ekološke udaljenosti u najvećoj mjeri objašnjava odvajanje populacija s Biokova. Kao što je i spomenuto, navedene populacije nastanjuju staništa koja se po ekološkim uvjetima znatno razlikuju od staništa

preostalih populacija u istraživanju, te predstavljaju tipične slučajeve ekološke izolacije. Mikroklimatski uvjeti značajno utječu na fenologiju biljaka (Dahlgren i sur., 2007.), odnosno temperatura, fotoperiod i vlaga glavni su čimbenici koji utječu na obrasce cvatnje i formiranje plodova kod biljaka (Warren i sur., 2011.). Zbog nižih temperatura i viših količina oborina, populacije s planine Biokovo cvatu kasnije (oko 20 dana) od populacija na nižim nadmorskim visinama, stoga se njihove fenološke faze ne podudaraju, što u konačnici rezultira genetskom izolacijom i diferencijacijom od ostalih populacija.

3.9.3. GENETSKA RAZNOLIKOST I STRUKTURA DALMATINSKOG BUHAČA UTVRĐENA PRIMJENOM SSR BILJEGA

Istraživanje genetske raznolikosti i strukture dalmatinskog buhača pomoću biljega SSR bilo je provedeno na 194 jedinke iz 10 hrvatskih prirodnih populacija uzorkovanih na području prirodne rasprostranjenosti vrste. Za istraživanje je korišteno 12 mikrosatelitnih lokusa koji su za vrstu razvijeni pomoću sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*; NGS)(Varga i sur., 2022.).

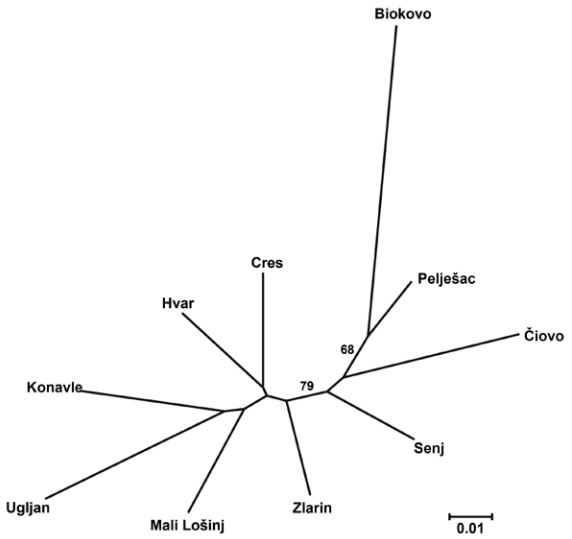
Detektirano je ukupno 121 alel s prosjekom od 10,08 alela po lokusu, što upućuje na postojanje velike genetske raznolikosti (Tablica 3.2.). Najniže vrijednosti alelnog bogatstva (engl. *allelic richness*; N_{ar}) zabilježene su u populaciji Biokovo (2,86) dok su najviše zabilježene u populaciji Zlarin (5,02). Kod 10 populacija ukupno je zabilježeno 36 privatnih alela, a najviše u populaciji Konavle, njih 7. Vrijednosti zapažene heterozigotnosti (H_O) kretale su se od 0,46 (Čiovo) do 0,61 (Konavle), što je tipično za stranooplodne vrste (Ninčević i sur., 2021.). Fiksacijski indeks (F_{IS}) pokazao je da ne postoji značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u slučaju sedam populacija (značajni nedostatak heterozigota zabilježen je u populacijama Cres, Zlarin i Čiovo). Kod populacije Biokovo utvrđeno je i genetsko usko grlo (engl. *bottleneck*) kao posljedica smanjenja veličine populacije. Analiza molekularne varijance (AMOVA) pokazala je da je većina genetske raznolikosti uvjetovana razlikama između jedinki unutar populacija (87,03 %), dok je manji dio raznolikosti moguće objasniti razlikama između populacija (12,97 %). Razina genetske diferencijacije između populacija bila je umjerena (F_{ST}= 0,129). Najmanja vrijednost genetske diferencijacije kao i najmanja vrijednost tetivne udaljenosti utvrđena je između populacija Senj i Pelješac. Najveća tetivna udaljenost utvrđena je između populacija Biokovo i Mali Lošinj. Na stablu izrađenom metodom sparivanja susjeda (engl. *neighbour-joining;* NJ) prikazano je odvajanje populacija u dvije skupine (vrijednost *bootstrap* 79 %). Prva skupina uključuje otočne populacije i populaciju Konavle, dok drugu skupinu sačinjavaju kopnene populacije uz otočnu populaciju Čiovo (Slika 3.3.). Jasno je prikazano i odvajanje biokovske populacije od ostatka kopnene skupine (vrijednost *bootstrap* 68 %). U prethodno opisanom istraživanju dalmatinskog buhača na temelju AFLP sustava biljega utvrđeno je odvajanje istraživanih populacija na sjevernu i južnu skupinu populacija, kao i odvajanje populacija s Biokova od ostatka južnojadranskih populacija (Grdiša i sur., 2014.). Slično grupiranje populacija karakteristično je i za druge mediteranske biljne vrste sličnog areala rasprostranjenosti, kao što su ljekovita kadulja (Jug-Dujaković i sur., 2020.) i sredozemno smilje (Ninčević i sur., 2021.).

Bayesovskom analizom genetske strukture utvrđeno je postojanje dva (K = 2; Slika 3.4.a), odnosno tri (K = 3; Slika 3.4.b) genska skupa unutar analiziranih populacija. Ovi su rezultati u skladu s onima dobivenim analizom genetske udaljenosti pa je tako genski skup A dominantan u otočnim populacijama i populaciji Konavle, dok je genski skup B dominantno prisutan u kopnenim populacijama i populaciji Čiovo. Genski skup C bio je dominantan samo u populaciji Biokovo, što je u skladu s ostalim analizama na ovom uzorku. Ovaj genski skup utvrđen je i u prethodnom istraživanju provedenom pomoću AFLP sustava biljega, što dodatno ukazuje na to da su biokovske populacije dalmatinskog buhača prostorno izolirane od populacija iste vrste. U populacijama Senj i Zlarin utvrđeno je najviše jedinki

TABLICA 3.2. MOLEKULARNA RAZNOLIKOST 10 PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU 12 MIKROSATELITNIH LOKUSA.

BROJ PRIMKE	POPULACIJA	N_a	N_{ar}	N_{pr}	H_O	H_E	F_{IS}
MAP02797	Cres	5,000	4,647	5	0,508	0,557	0,087**
MAP02799	Senj	4,750	4,477	4	0,576	0,581	0,009^{ns}
MAP02814	Mali Lošinj	4,417	4,277	2	0,568	0,617	0,080^{ns}
MAP02800	Ugljan	3,833	3,770	3	0,524	0,516	-0,016^{ns}
MAP02813	Zlarin	5,333	5,015	3	0,565	0,632	0,106**
MAP02807	Čiovo	3,500	3,367	5	0,463	0,486	0,048*
MAP02809	Biokovo	2,917	2,864	1	0,466	0,475	0,018^{ns}
MAP02806	Hvar	4,500	4,238	3	0,558	0,560	0,003^{ns}
MAP02803	Pelješac	4,583	4,337	3	0,592	0,581	-0,018^{ns}
MAP02769	Konavle	4,917	4,537	7	0,608	0,571	-0,066^{ns}

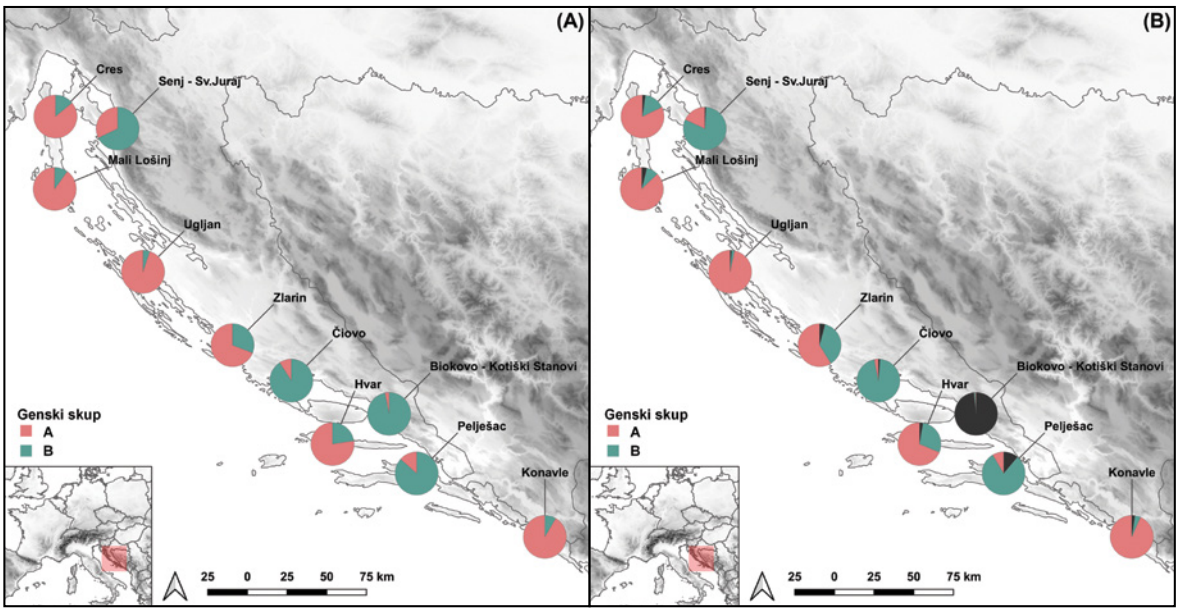
*MAP - Broj primke u Kolekciji ljekovitog i aromatičnog bilja, Zagreb, Hrvatska, (dostupno na: cpgrd.hcphs.hr); N_a – prosječni broj alela; N_{ar} – alelno bogatstvo; N_{pr} – broj privatnih alela; H_O – zapažena heterozigotnost; H_E – očekivana heterozigotnost; F_{IS} – fiksacijski indeks (^{ns}nesignifikantno; *signifikantno kod P < 0,05; ** signifikantno kod P < 0,01; *** signifikantno kod P < 0,001)*



SLIKA 3.3. NEIGHBOR-JOINING STABLO IZRAĐENO PREMA TETIVNIM UDALJENOSTIMA IZMEĐU 10 POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU SSR BILJEGA.

hibridnog porijekla u kojima su genski skupovi A i B bili podjednako zastupljeni, što ukazuje na njihovo antropogeno podrijetlo.

Genetska diferencijacija između populacija mogla se objasniti na temelju razlika u okolišnim čimbenicima (temperatura, količina padalina, parametri tla, nadmorska visina) tj. izolacijom uslijed ekološke udaljenosti (engl. *isolation-by-environment*; IBE; 40,61 %), dok se izolacijom uslijed udaljenosti (engl. *isolation-by-distance*; IBD) moglo objasniti svega 0,7 % genetske diferencijacije.



SLIKA 3.4. REZULTATI ANALIZE GENETSKE STRUKTURE PRIRODNIH POPULACIJA DALMATINSKOG BUHAČA NA TEMELJU SSR BILJEGA UZ POSTOJANJE: A) DVA GENSKA SKUPA; B) TRI GENSKA SKUPA.

3.9.4. BUDUĆA ISTRAŽIVANJA

Rezultati istraživanja upućuju na postojanje genetske raznolikosti i strukturiranosti prirodnih populacija dalmatinskog buhača. Utvrđeni obrasci rezultat su većeg broja čimbenika kao što su temeljna životna svojstva vrste, demografska povijest, okolišni uvjeti te antropogeno djelovanje (Varga, 2021.). Dokumentirana povijest uzgoja, odnosno prijenos gena posredstvom čovjeka svakako je utjecao na genetsku strukturu, dok je prekomjerno iskorištavanje biljnih genetskih izvora ove vrste kod nekih populacija dovelo do smanjenja genetske raznolikosti. Uzrok smanjenja genetske raznolikosti svakako je i fragmentacija i gubitak staništa ovog balkanskog endema uslijed urbanizacije obalnog područja Hrvatske, koja veliki dio svog gospodarstva temelji na turizmu. Ipak, utvrđena genetska raznolikost dalmatinskog buhača predstavlja veliki potencijal za istraživanje otpornosti na klimatske promjene, kao i za kvalitetno i učinkovito upravljanje i zaštitu ove endemske vrste. Prirodne populacije također predstavljaju potencijalni izvor gena otpornosti na različite biotske i abiotske čimbenike što otvara mogućnost proširenja područja uzgoja i u uvjetima kontinentalne klime.

Buduća istraživanja na dalmatinskom buhaču bit će usmjerena k usporedbi prirodnih populacija s kultiviranim biljnim materijalom iz zemalja u kojima postoje dugogodišnji oplemenjivački programi (Australija, Japan, Ruanda, Kenija). Nadalje, pomoću tehnologije sekvenciranja seljedeće generacije DArTseq (engl. *Sequencing-Based Diversity Array Technology*) razvit će se brojni biljezi temeljeni na polimorfizmu jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphisms*; SNP) koji će biti primijenjeni u daljnjim analizama genetske raznolikosti. Nadalje, na temelju rezultata genetskih i biokemijskih analiza provest će se pridružujuće kartiranje, u svrhu identifikacije biljega koji su povezani sa sintezom piretrina kod dalmatinskog buhača.

LITERATURA

Ambrožič Dolinšek, J., Kovač, M., J, Ž., Camloh, M., 2007. Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) from the Northern Adriatic as a potential source of natural insecticide. Ann. Ser. Hist. Nat. 17, 39–46.

Ban, D., Sladonja, B., Lukić, M., Lukić, I., Lušetić, V., Ganić, K.K., Žnidarčič, D., 2010. Comparison of pyrethrins extraction methods efficiencies. African J. Biotechnol. 9, 2702–2708.

Bhat, B.K., 1995. Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum, u: Casida, J.E., Quistad, G.B. (Ur.), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. Oxford University Press, New York, str. 67–94.

Bhat, B.K., Menary, R.C., 1986. Genotypic and phenotypic correlation in Pyrethrum, (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis), and their implication in selection. Pyrethrum post 16, 61–65.

Casida, J.E., 1973. Biochemistry of the Pyrethrins, u: Casida, John E (Ur.), Pyretrum: The Natural Insecticide. Academic Press, New York, str. 101–120.

Casida, J.E., Quistad, G.B. (Ur.), 1995. Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. Oxford University Press, New York.

Crombie, L., 1995. Chemistry of Pyrethrins, u: Casida, J.E., Quistad, G.B. (Ur.), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford University Press, New York, str. 123–193.

Crosby, D.G., 1995. Environmental Fate of Pyrethrins, u: Casida, J.E., Quistad, G.B. (Ur.), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford University Press, New York, str. 194–213.

Dahlgren, J.P., Von Zeipel, H., Ehrlén, J., 2007. Variation in vegetative and flowering phenology in a forest herb caused by environmental heterogeneity. Am. J. Bot. 94, 1570–1576.

Eckert, C.G., Samis, K.E., Lougheed, S.C., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. Mol. Ecol. 17, 1170–1188.

Euro+Med, 2006. Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. https://www.emplantbase.org/home.html (pristupljeno 5.12.2021).

FAO, 2018. FAOSTAT. Production: Crops. URL https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (pristupljeno 5.12.2021).

Gallo, M., Formato, A., Ianniello, D., Andolfi, A., Conte, E., Ciaravolo, M., Varchetta, V., Naviglio, D., 2017. Supercritical fluid extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariifolium*) compared to traditional maceration and cyclic pressurization extraction. J. Supercrit. Fluids 119, 104–112.

Glasnović, P., Temunović, M., Lakušić, D., Rakić, T., Grubar, V.B., Surina, B., 2018. Understanding biogeographical patterns in the western Balkan Peninsula using environmental niche modelling and geostatistics in polymorphic *Edraianthus tenuifolius*. AoB Plants 10.

Grdiša, M., Babić, S., Periša, M., Carović-Stanko, K., Kolak, I., Liber, Z., Jug-Dujaković, M., Šatović, Z., 2013. Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch.Bip.) in Croatia. Chem. Biodivers. 10, 460–472.

Grdiša, M., Carović-Stanko, K., Kolak, I., Šatović, Z., 2009. Morphological and biochemical diversity of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.). Agric. Conspec. Sci. 74, 73–80.

Grdiša, M., Jeran, N., Varga, F., Klepo, T., Ninčević, T., Šatović, Z., 2022. Accumulation Patterns of Six Pyrethrin Compounds across the Flower Developmental Stages—Comparative Analysis in Six Natural Dalmatian Pyrethrum Populations. Agron. 2022, Vol. 12, Page 252 12, 252.

Grdiša, M., Liber, Z., Radosavljević, I., Carović-Stanko, K., Kolak, I., Šatović, Z., 2014. Genetic diversity and structure of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan refugium. PLoS One 9, e105265.

Gunasekara, A.S., 2004. Environmental Fate of Pyrethrins. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, str. 1–19.

Hampe, A., Petit, R.J., 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. Ecol. Lett. 8, 461–467.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1996. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. Philos. Trans. Biol. Sci. 351, 1291–1298.

Jeran, N., Grdiša, M., Varga, F., Šatović, Z., Liber, Z., Dabić, D., Biošić, M., 2020. Pyrethrin from Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.): biosynthesis, biological activity, methods of extraction and determination. Phytochem. Rev.

Jug-Dujaković, M., Ninčević, T., Liber, Z., Grdiša, M., Šatović, Z., 2020. *Salvia officinalis* survived in situ Pleistocene glaciation in 'refugia within refugia' as inferred from AFLP markers. Plant Syst. Evol. 306, 3.

Kovačić, S., Nikolić, T., Ruščić, M., Milović, M., Stamenković, V., Mihelj, D., Jasprica, N., Bogdanović, S., Topić, J., 2008. Flora jadranske obale i otoka. 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga, Zagreb, Croatia.

Kutnjak, D., Kuttner, M., Niketic, M., Dullinger, S., Schonswetter, P., Frajman, B., 2014. Escaping to the summits: Phylogeography and predicted range dynamics of *Cerastium dinaricum*, an endangered high mountain plant endemic to the western Balkan Peninsula. Mol. Phylogenet. Evol. 78, 365–374.

MacDonald, W.L., 1995. Pyrethrum Flowers - Production in Australia, u: Casida, J.E., Quistad, G.B. (Ur.), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford University Press, New York, str. 55–66.

Mendez, M., Rosenbaum, H.C., Subramaniam, A., Yackulic, C., Bordino, P., 2010. Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. Mol. Ecol. 19, 2212–2228.

Morris, S.E., Davies, N.W., Brown, P.H., Groom, T., 2006. Effect of drying conditions on pyrethrins content. Ind. Crops Prod. 23, 9–14.

Nagar, A., Chatterjee, A., Ur Rehman, L., Ahmad, A., Tandon, S., 2015. Comparative extraction and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Ind. Crops Prod. 76, 955–960.

Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. Am. Nat. 106, 283.

Nikolić, T., 2020. Flora Croatica, Volume 2. Alfa d.d., Zagreb, Croatia.

Ninčević, T., Jug-Dujaković, M., Grdiša, M., Liber, Z., Varga, F., Pljevljakušić, D., Šatović, Z., 2021. Population structure and adaptive variation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don along eastern Adriatic temperature and precipitation gradient. Sci. Reports 2021 111 11, 1–16.

Ožanić, S., 1955. Poljoprivreda Dalmacije u prošlosti. Agronomic society NRH, Društvo agronoma NRH, Podružnica Split, Split, Croatia.

Parlevliet, J., 1975. Breeding pyrethrum in Kenya. Pyrethrum Post 13, 47–54.

Rossignol-Strick, M., 1999. The Holocene climatic optimum and pollen records of sapropel 1 in the eastern Mediterranean, 9000-6000 BP. Quat. Sci. Rev. 18, 515–530.

Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145, 1219–1228.

Schönswetter, P., Tribsch, A., 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). Taxon 54, 725–732.

Sultana, S., Hu, H., Gao, L., Mao, J., Luo, J., Jongsma, M.A., Wang, C., 2015. Molecular cloning and characterization of the trichome specific chrysanthemyl diphosphate/chrysanthemol synthase promoter from *Tanacetum cinerariifolium*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 185, 193–199.

Suraweera, D.D., Groom, T., Taylor, P.W.J., Jayasinghe, C.S., Nicolas, M.E., 2017. Dynamics of flower, achene and trichome development governs the accumulation of pyrethrins in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) under irrigated and dryland conditions. Ind. Crops Prod. 109, 123–133.

Surina, B., Schönswetter, P., Schneeweiss, G.M., 2011. Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. J. Biogeogr. 38, 1381–1393.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Mol. Ecol. 7, 453–464.

Tang, L., Li, J., Khalil, R., Yang, Y., Fan, J., Liu, M., Li, Z., 2012. Cloning and functional analysis of CDS_CCI2: A *Tanacetum cinerariaefolium* chrysanthemyl diphosphate synthase gene. Plant Growth Regul. 67, 161–169.

Varga, F., 2021. Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.) population diversity based on pyrethrin content and microsatellite marker analysis. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet.

Varga, F., Jeran, N., Šatović, Z., Biošić, M., Grdiša, M., 2021. High diversity of natural Dalmatian pyrethrum based on pyrethrin composition at intra- and interpopulation level. Phytochemistry 192.

Varga, F., Liber, Z., Jakše, J., Turudić, A., Šatović, Z., Radosavljević, I., Jeran, N., Grdiša, M., 2022. Development of Microsatellite Markers for *Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip., a Plant with a Large and Highly Repetitive Genome. Plants (Basel, Switzerland) 11.

Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L., Munhoz, C. de F., 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genet. Mol. Biol. 39, 312–328.

Vucetich, J.A., Waite, T.A., 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: Null hypotheses for landscape conservation genetics. Conserv. Genet. 4, 639–645.

Wandahwa, P., Van Ranst, E., Van Damme, P., 1996. Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) cultivation in West Kenya: origin, ecological conditions and management. Ind. Crops Prod. 5, 307–322.

Warren, R.J., Bahn, V., Bradford, M.A., 2011. Temperature cues phenological synchrony in ant-mediated seed dispersal. Glob. Chang. Biol. 17, 2444–2454.

Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15, 323–354.

Yamashiro, T., Shiraishi, A., Satake, H., Nakayama, K., 2019. Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil. Sci. Rep. 9.

3.10. Genetska raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje

ZLATKO LIBER I ZLATKO ŠATOVIĆ

3.10.1. UVOD

Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.) višegodišnja je, grmolika, do metar visoka biljka porodice usnača (Lamiaceae L.). Po ovoj je vrsti Carl Linné (Linnaeus, 1753.) opisao cijeli rod *Salvia* L. s oko 1.000 vrsta prirodno rasprostranjenih u središnjoj i Južnoj Americi, Sredozemlju, te središnjoj i istočnoj Aziji (Walker i sur., 2004.). U Hrvatskoj je ova biljka poznata pod nazivima prava kadulja, krastatica, kuš, pelin, salvia, slavulja, šalvija i žalfija (Nikolić, 2022.). Cijela je biljka gusto prekrivena žljezdastim dlakama koje na vrhu nose kuglaste spremnike s eteričnim uljima. Ima uspravnu stabljiku, a korijen ima sposobnost snažnog prodiranja u kamenjar. Ljekovita kadulja raste u sredozemnim kamenjarsko-pašnjačkim biljnim zajednicama. Eliptični listovi dugi su do 10 cm i široki do 5 cm; na dugoj su peteljci te od svih biljnih dijelova najgušće pokriveni žljezdastim dlakama zbog čega cijela biljka ima kserofitske osobine i karakterističnu srebrenkasto-zelenu boju. Cvjetovi su dvospolni, entomofilni, plavo-ljubičasti, dvousnati, do 3 cm dugi s raznim prilagodbama na stranooprašivanje kao što su proteroandrija, tvorba nektara pri bazi plodnice te posebni mehanizam za oprašivanje poznat kao „klackalica" (Walker i Sytsma, 2007.). Ovim prilično agresivnim mehanizmom jedina dva prašnika prisutna u cvijetu peludom „zaprašuju" leđa svakog kukca koji uđe u cvijet. Od svih oprašivača ljekovita se kadulja najčešće oprašuje pčelama te je upravo zbog tog razloga ova vrsta jedna od najvažnijih medonosnih biljaka primorskog dijela Hrvatske. Desetak cvjetova, gotovo bez cvjetne stapke, na vrhu fertilnih ogranaka oblikuje sastavljene klasaste cvatove. Ovisno o uvjetima staništa cvatu oko mjesec dana, od travnja do srpnja. Nakon oprašivanja i oplodnje plodnica od dva plodna lista dodatno se pregradi, pri čemu nastaju četiri jednosjemena kuglasta ploda oraha koji su u zrelom stadiju tamnosmeđe boje, promjera 2 mm i bez dodatnih mehanizma za rasprostiranje.

Blagodati ljekovite kadulje bile su poznate još u drevnom Egiptu, a Europom su je proširili prvo Rimljani, a potom kršćanski redovnici u srednjem vijeku. Određivanje prirodnog areala otežano je tisućljetnim uzgajanjem. Naime, postoji sumnja da je ljekovita kadulja tijekom dugog razdoblja uzgoja na mnogim mjestima pobjegla iz kulture i formirala naturalizirane populacije (Rešetnik i sur., 2016.). Do danas je razvijeno na desetine kultivara ove vrste pa se kao kultiviranu biljku može pronaći na svim kontinentima. Treba istaknuti da je osim svojih biokemijskih osobina ljekovita kadulja cijenjena u hortikulturi kao iznimno dekorativna biljka kamenjara (Židovec, 2004.).

Gospodarski se najvažnija svojstva ljekovite kadulje temelje na kompleksnom sastavu eteričnog ulja. Eterična ulja ove biljke sastavljena su od više desetina uglavnom lakohlapljivih terpenskih spojeva od kojih su najzastupljeniji cis-tujon, kamfor, trans-tujon, 1,8-cineol, β-pinen, kamfen, borneol i bornil acetat. Znanstveno je utvrđeno da preparati ljekovite kadulje djeluju gastroprotektivno, antidijabetično, protiv pretilosti, protuupalno te da imaju antispazmatska, virucidna, fungicidna i baktericidna svojstva, olakšavaju posljedice Alzheimerove bolesti, poboljšavaju raspoloženje i kognitivne performanse te smanjuju anksioznost. Primjena listova kadulje u tekućinama za grgljanje preporučljiva je zbog jakog antibakterijskog djelovanja cis- i trans-tujona, koji ponekad u eteričnom ulju ljekovite kadulje prelaze udio od 60 %, no s ispijanjem preparata treba biti oprezan jer u većim količinama tujoni mogu imati neurotoksično i hepatotoksično djelovanje (Jug-Dujaković i sur., 2012.; Grdiša i sur., 2015.).

Jadranska obala i otoci, kao i cijelo Sredozemlje, izuzetno su bogati biljnim vrstama, a ujedno su i jedni od najpoznatijih centara endemizma i mjesta brojnih utočišta biljnih vrsta tijekom posljednje glacijacije u Pleistocenu poznatih kao mikrorefugiji (Medail i Diadema, 2009.). Zbog klimatskih uvjeta ovo područje bogato je aromatičnim i ljekovitim biljnim vrstama koje se tisućama godina tradicionalno prikupljanju u prirodi. Zbog povećane potražnje prirodnih biljnih preparata posljednjih nekoliko desetljeća, osobito od strane kozmetičke i farmaceutske industrije, prikupljanje se u prirodi pojačalo. Ono je uz ostale negativne utjecaje čovjeka kao što su degradacija i fragmentacija staništa, klimatske promjene, zagađenje i unošenje stranih vrsta, dovelo do urušavanja prirodne biološke raznolikosti te genetske erozije prirodnih populacija ove vrste. Nažalost, ova povećana potražnja nije dovela do značajnije poljoprivredne proizvodnje čime bi se zadovoljilo tržište, ostvarila ekonomska dobit, ali i očuvali biljni genetski izvori. Budući da prirodne populacije imaju veliku genetsku raznolikost koja im omogućuje prilagodbu stalnim promjenama u okolišu, proučavanje ove raznolikosti važno je za procjenu stanja prirodnih populacija, njihovu zaštitu te uvođenje u programe oplemenjivanja i poljoprivrednu proizvodnju.

3.10.2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

Broj znanstvenih istraživanja koja se bave ljekovitom kaduljom uistinu je velik, ali već površno pretraživanje svjetskih baza citiranosti znanstvenih radova pokazuje da barem dvije trećine radova istražuje kemijska i ljekovita svojstva, a ostali se bave stresom (suša, sol, temperatura), identifikacijom uzročnika bolesti, etnobotanikom i istraživanjima u prehrambenoj industriji. U 2021. godini samo su tri rada bila genetske tematike (*Web of Science Core Collection*). Jedan se rad bavio induciranom poliploidizacijom, drugi filogenetskim odnosima, a treći DNA-barkodiranjem za potrebe kontrole kvalitete hrane. Zaključak je kako su, bez obzira na godinu objavljivanja, istraživanja genetske raznolikosti te istraživanja vezana uz oplemenjivanje i uzgoj ljekovite kadulje rijetkost. Od malobrojnih genetskih istraživanja ljekovite kadulje svakako bi trebalo izdvojiti razvitak mikrosatelitnih biljega (An i sur., 2010.; Radosavljević i sur., 2011., 2012.), jedno filogeografsko istraživanje (Stojanović i sur., 2015.) te nekoliko istraživanja genetske raznolikosti istočnojadranskih te balkanskih prirodnih i kultiviranih populacija upotrebom genetskih biljega RAPD (Liber i sur., 2014.), biljega AFLP (Jug-Dujaković i sur., 2020.) te biljega SSR (Greguraš, 2013.; Rešetnik i sur., 2016.). Nasumično umnoženi polimorfni DNA biljezi (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) primijenjeni su u istraživanju genetske raznolikosti devet prirodnih populacija uzduž hrvatske obale Jadrana te jedne populacije iz Bosne i Hercegovine. Utvrđena je veća raznolikost među jedinkama u populaciji nego što je raznolikost između populacija, što je uobičajano za stranooplodne biljne vrste. Rezultati su upućivali na postojanje više mikrorefugija u kojima su populacije ljekovite kadulje preživjele posljednji glacijalni maksimum (engl. *Last Glacial Maximum*; LGM). Najveća genetska raznolikost i najmanji broj jedinstvenih alela pronađena je među populacijama iz središnje

i južne Dalmacije, dok su populacije u sjevernom Jadranu i u zaleđu pokazivale najmanju genetsku raznolikost i najveći broj privatnih alela. Bayesovska analiza populacijske strukture podržala je raspodjelu populacija u tri izvorne genetske skupine pri čemu su genetski najraznovrsnije populacije iz južnog i sjevernog Jadrana pokazivale hibridno podrijetlo iz sva tri genska skupa. Ove populacije upućuju na mjesta kontakta između mikrorefugija, dok su sjeverne genetski siromašne i izolirane populacije vjerojatno mikrorefugijalnog podrijetla. Prilikom istraživanja polimorfizma duljina DNA fragmenata umnoženih lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Amplified Fragment Lenght Polimorphisms*, AFLP) analizirano je 25 populacija na sličnom dijelu prirodnog areala kao kod RAPD istraživanja te su dobiveni vrlo slični rezultati, osim što je genetska diferencijacija između populacija bila nešto manja. Ova bi se razlika među istraživanjima mogla pripisati većem uzorku koji je gušće pokrivao istraživano područje. Za razliku od RAPD i AFLP biljega koji su dominantni biljezi, dva istraživanja kodominantnim mikrosatelitnim biljezima (engl. *Simple Sequence Repeats*; SSR) omogućila su dodatne statističke analize. U prvom istraživanju SSR biljezima (Greguraš, 2013.) analiziran je gotovo isti uzorak prirodnih populacija ljekovite kadulje kao kod AFLP istraživanja. I ovo je istraživanje potvrdilo postojanje tri izvorne genetske skupine, izolaciju zbog udaljenosti te veću genetsku raznolikost južnih populacija. Međutim, dobiveni rezultati bili su puno kompleksniji pa su se mogle detektirati barijere protoka gena u smjeru sjeveroistok-jugozapad (Zrmanja, Cetina) i planinskih masiva u smjeru sjeverozapad-jugoistok (Velebit, Biokovo). Većina se populacija nalazila u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Signifikantno odstupanje zabilježeno je u šest populacija, a objašnjena su vjerojatnim učinkom osnivača (engl. *founder effect*; populacija Vratnik), geografskom izolacijom (Mljet) te Wahlundovim učinkom (Karlobag, Mostar, Pelješac i Konavle). Isto tako, nisu uočeni znakovi da je neka populacija nedavno prošla kroz genetsko usko grlo (engl. *genetic bottleneck*).

Pojedine mikrosatelitne biljege razvijene za ljekovitu kadulju bilo je moguće umnožiti lančanom reakcijom polimerazom i u srodnim vrstama, a pokazali su se i polimorfnima (Radosavljević i sur., 2011., 2012.). Što je vrsta bila srodnija ljekovitoj kadulji to je s njom dijelila više mikrosatelitnih lokusa, a najsrodnije su se pokazale kratkozupčasta (*Salvia brachyodon* Vandas) i grčka kadulja (*Salvia fruticosa* Mill.). Prednost analize istih mikrosatelitnih lokusa kod različitih vrsta primijenjena je u tri znanstvena istraživanja (Radosavljević i sur., 2015.; Radosavljević i sur., 2019., 2020.). U prvom istraživanju provedena je analiza mikrosatelitnih lokusa populacija sve tri navedene vrste. Pokazalo se da populacija središnjeg dijela areala širokorasprostranjene vrste (ljekovita kadulja) posjeduje veliku i stabilnu genetsku raznolikost, da su populacije endemične vrste s malim i međusobno izoliranim populacijama (kratkozupčasta kadulja) sklone odstupanju od Hardy-Weinbergove ravnoteže i klonalnom razmnožavanju, te pokazuju jasne naznake prolaska kroz genetsko usko grlo (engl. *genetic bottleneck*), dok diskontinuirana populacija izvan areala širokorasprostranjene vrste (grčka kadulja s otoka Visa) pokazuje nedostatak heterozigota i stvara međuvrsne hibride s dominantnom vrstom kadulje na tom području (ljekovita kadulja). Drugo istraživanje pokušalo je detaljnije analizirati prvim istraživanjem dokazanu hibridizaciju ljekovite i grčke kadulje na otoku Visu. U istraživanju su upotrebljeni morfološki, genetski (AFLP i SSR) te epigenetski biljezi (polimorfnost umnažanja ulomaka osjetljivih na metilaciju; engl. *Methylation-sensitive amplification polymorphism*; MSAP) (Reyna-López i sur., 1997.; Bossdorf i sur., 2008.). Genetski biljezi potvrdili su diploidnost hibridnih jedinki, a samim tim i homoploidni tip hibridizacije. Hibridne jedinke većinom su bile potomci F_1 generacije, uz mali broj jedinki F_2 generacije i jedinki nastalih povratnim križanjem. Većina morfoloških osobina smještala je hibridne jedinke između roditeljskih vrsta; mjereni genetski parametri imali su najveće vrijednosti upravo kod hibridnih jedinki, dok je ra-

zina epigenetske raznolikosti roditeljskih vrsta bila u potpunoj suprotnosti s razinom njihove genetske raznolikosti. Utvrđena epigenetska raznolikost ukazala je na važnost epigenetskog odgovora na promjene u okolišu te potvrdila transgeneracijsku prirodu epigenetskih promjena. Modeliranje ekoloških niša pokazalo je da su klimatski uvjeti na istraživanom području optimalni za ljekovitu, ali ne i za grčku kadulju. Taj je rezultat u skladu s razmišljanjima o antropogenom rasprostranjenju grčke kadulje na otoku Visu koje seže još u antička vremena. U trećem istraživanju upotrebljena je prostorno-genetska analiza visoke rezolucije kako bi se rasvijetlila klonalna struktura populacije kratkozupčaste kadulje (*Salvia brachyodon* Vandas) s poluotoka Pelješca. Istraživana populacija sastavljena je od velikog broja više ili manje izoliranih skupina jedinki različitih veličina. Potvrđena je prisutnost i spolne i klonske reprodukcije te je uočena signifikantna negativna korelacija između genetske raznolikosti i veličine ovih skupina jedinki. Naime, mlade jedinke nisu otkrivene unutar velikih skupina, što je objašnjeno većim selekcijskim pritiskom u većim i vjerojatno starijim nakupinama.

3.10.3. GENETSKA DEMOGRAFIJA LJEKOVITE KADULJE

U istraživanje je bilo uključeno 30 populacija ljekovite kadulje zastupljenih s 20 do 25 biljaka. Dvadeset i tri samonikle (divlje) populacije bile su uzorkovane u Sloveniji (2), Hrvatskoj (8), Bosni i Hercegovini (4), Crnoj Gori (2), Albaniji (2), Sjevernoj Makedoniji (2), Grčkoj (2) i Srbiji (1). Kultivirane, odnosno naturalizirane populacije prikupljene su u Srbiji (1), Kosovu (2), Rumunjskoj (2) i Moldaviji (2). U svrhu molekularne analize korišteno je osam mikrosatelitnih biljega (SoUZ001, SoUZ002, SoUZ003, SoUZ007, SoUZ011, SoUZ013, SoUZ014, SoUZ019) prethodno razvijenih za ljekovitu kadulju (An i sur., 2010.; Radosavljević i sur., 2020.) Upotrebom osam mikrosatelitnih biljega identificirano je ukupno 165 alela. Prosječno alelno bogatstvo (N_{ar}) izračunato u programu FSTAT (Goudet, 1995.) iznosilo je 6,929 (Tablica 3.3.). Najmanje alelno bogatstvo (2,707) zabilježeno je kod kultivirane populacije iz Srbije (P25), a najveće (10,300) kod samonikle populacije iz Konavala, Hrvatska (P10). Prosječno alelno bogatstvo samoniklih populacija (7,920) bilo je signifikantno veće ($P < 0{,}001$) od onog kultiviranih/naturaliziranih populacija (3,672). Imajući na umu zemljopisnu poziciju mjesta prikupljanja samoniklih populacija, najviše vrijednosti alelnog bogatstva ($N_{ar} > 9$) zabilježene su kod samoniklih populacija sa samog juga Hrvatske (P09 i P10) kao i kod triju samoniklih populacija iz Bosne i Hercegovine (P12, P13, P14) koje se nalaze u središtu područja rasprostranjenja ljekovite kadulje na Balkanskom poluotoku, dok su vrijednosti alelnog bogatstva opadale prema sjeveru kao i prema jugu. Jedinstveni aleli opaženi su isključivo kod samoniklih populacija, a najviše jedinstvenih alela ($N_{pr} = 4$) otkriveno je u populaciji P17 iz Albanije. Uspoređujući skupine samoniklih i kultiviranih/naturaliziranih populacija opaženo je 115 alela u samoniklim populacijama koji nisu bili prisutni kod kultiviranih/naturaliziranih, dok kulivirane/naturalizire populacijama nisu imale niti jedan jedinstveni alel.

Prosječna zapažena heterozigotnost (H_O) izračunata u programu GENEPOP (Raymond i Rousset, 1995.) iznosila je 0,699, a kretala se u rasponu od 0,313 do 0,854. Prosječna očekivana heterozigotnost (H_E) kretala se u rasponu od 0,377 (P25) do 0,846 (P10). Kao i u slučaju alelnog bogatstva samonikle populacije imale su signifikantno veću ($P < 0{,}001$) očekivanu heterozigotnost (0,751) od kultiviranih/naturaliziranih (0,545). Signifikantno odstupanje ($P < 0{,}001$) od ravnoteže po Hardyju i Weinbergeru utvrđeno je kod dvije kultivirane populacije iz Rumunjske (P27 i P28) u kojima je uočen suvišak heterozigota, te je koeficijent samooplodnje bio negativan (-0,283 kod P27 i -0,296 kod P28). Koeficijenti genetske diferencijacije (F_{ST}) bili su signifikantni ($P < 0{,}05$) između svih parova populacija, osim između dvije susjedne samonikle populacije iz Slovenije (P01/P02), dvije susjedne samonikle populacije iz Hrvatske (P10) i Bosne i Hercegovine (P14),

TABLICA 3.3. **GENETSKA RAZNOLIKOST POPULACIJA LJEKOVITE KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) NA TEMELJU OSAM MIKROSATELITNIH BILJEGA**

POPULACIJA	NALAZIŠTE	DRŽAVA	STATUS	N_{AR}	N_{PR}	H_0	H_E	F_{IS}	P	GENETSKA SKUPINA
P01	Petrinjski Kras	SVN	S	7,930	0	0,745	0,795	0,063	ns	A1
P02	Petrinje	SVN	S	8,258	0	0,854	0,795	-0,075	ns	A1
P03	Krk	HRV	S	7,708	0	0,717	0,734	0,024	ns	A1
P04	Pag	HRV	S	7,948	1	0,754	0,759	0,008	ns	A1
P05	Pirovac	HRV	S	7,107	0	0,707	0,708	0,002	ns	A1
P06	Šparadići	HRV	S	9,071	1	0,698	0,743	0,060	ns	A1
P07	Unešić	HRV	S	8,990	1	0,736	0,771	0,045	ns	A1
P08	Vis	HRV	S	6,655	0	0,717	0,712	-0,007	ns	A2
P09	Pelješac	HRV	S	9,949	2	0,754	0,768	0,018	ns	A2
P10	Konavle	HRV	S	10,300	0	0,825	0,846	0,025	ns	A2
P11	Hutovo blato	BIH	S	7,372	2	0,817	0,758	-0,078	ns	A2
P12	Mostar	BIH	S	9,709	1	0,762	0,796	0,043	ns	A2
P13	Međugorje	BIH	S	9,471	1	0,818	0,815	-0,004	ns	A2
P14	Trebinje	BIH	S	9,847	2	0,777	0,833	0,067	ns	A2
P15	Pješivci, Nikšić	MNE	S	6,721	0	0,693	0,745	0,070	ns	A1
P16	Sutorman, Bar	MNE	S	7,651	1	0,699	0,718	0,026	ns	A2
P17	Llogora	ALB	S	8,633	4	0,744	0,764	0,027	ns	A2
P18	Rrenci	ALB	S	8,694	0	0,743	0,802	0,073	ns	A2
P19	Jablanica, Globočica	MKD	S	6,458	2	0,683	0,699	0,024	ns	A3
P20	Karaormar, Burinec	MKD	S	6,210	1	0,720	0,725	0,007	ns	A3
P21	Lygeri, Kozani	GRC	S	5,752	0	0,679	0,673	-0,009	ns	A3
P22	Skiti, Kozani	GRC	S	6,600	1	0,672	0,702	0,042	ns	A3
P23	Vermicë	KOS	N	4,089	0	0,598	0,561	-0,067	ns	B
P24	Mirusha	KOS	N	4,076	0	0,505	0,561	0,100	ns	B
P25	Pančevo	SRB	K	2,707	0	0,313	0,377	0,171	ns	B
P26	Gradište	SRB	S	5,134	0	0,537	0,608	0,118	ns	A2
P27	Bacau, Motoc	ROM	K	4,189	0	0,783	0,610	-0,283	***	B
P28	Bihor, Avram Iancu	ROM	K	3,639	0	0,793	0,612	-0,296	***	B
P29	Chishinau	MDA	N	3,886	0	0,592	0,595	0,004	ns	B
P30	Lopatica, Calme	MDA	N	3,121	0	0,545	0,497	-0,096	ns	B

Država: ALB – Albanija; BIH – Bosna i Hercegovina; GRC – Grčka; HRV – Hrvatska; KOS – Kosovo; MKD – Sjeverna Makedonija; MLD – Moldavija; MNE – Crna Gora; ROM – Rumunjska; SRB – Srbija; SVN – Slovenija; Status: S – samonikla populacija, N – naturalizirana populacija, K – kultivirana poplacija; N_{ar} – alelno bogatstvo; N_{pr} – broj jedinstvenih alela; H_0 – zapažena heterozigostnost; H_E – očekivana heterozigostnost; F_{IS} – koeficijent samooplodnje; P – oznaka signifikantnosti testa Hardy–Weinbergove ravnoteže: ns – nesignifikantna vrijednost, *** – signifikantna vrijednost na razini $P < 0,001$); Genetska skupina – genetska skupina na temelju Bayesovske analize populacijske strukture pomoću programa STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000.).

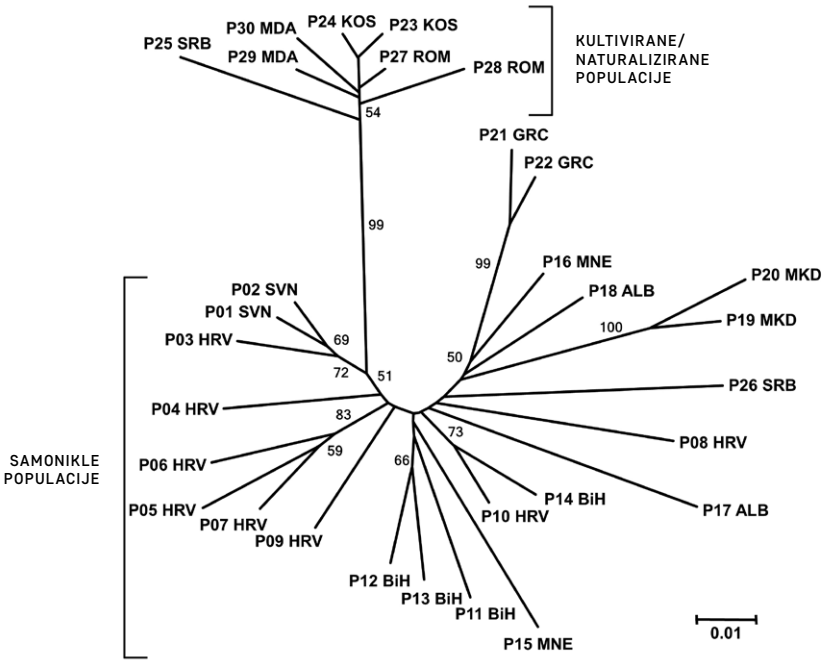
te između dvije susjedne naturalizirane populacije s Kosova (P23/P24).

Genetska udaljenost između populacija izračunata je na temelju tetivne udaljenosti po Cavalli-Sforza i Edwardsu (engl. *chord distance*; Cavalli-Sforza i Edwards, 1967.), dok je nezakorijenjeno stablo izrađeno metodom po Fitchu i Margoliashu (engl. *Fitch-Margoliash method*; FM; Fitch i Margoliash, 1967.). Pouzdanost pojedinih grananja na stablu utvrđena je metodom *bootstrap* (Felsenstein, 1985.) koristeći 1.000 pseudoponavljanja. Analiza je provedena u programu PHYLIP (Felsenstein, 1995.). Samonikle populacije su se svrstale u skladu sa zemljopisnom pozicijom mjesta prikupljanja; od Slovenije na sjeverozapadu, do Grčke na jugoistoku analiziranog područja (Slika 3.5.). Sedam kultiviranih/naturaliziranih populacije činilo je zasebnu skupinu visoke pouzdanosti (vrijednost *bootstrap* 99 %) ukazujući na zajedničko podrijetlo kultiviranog biljnog materijala. Budući da su sve kultivirane/naturalizirane populacije uzorkovane u središnjem i istočnom dijelu Balkanskog poluotoka pretpostavlja se da je kultivirani biljni materijal potekao iz Instituta za proučavanje ljekovitog bilja „Dr Josif Paničić", Beograd, Srbija, jedne od vodećih ustanova za oplemenjivanje ljekovitog i aromatičnog bilja na Balkanu u drugoj polovici dvadesetog stoljeća.

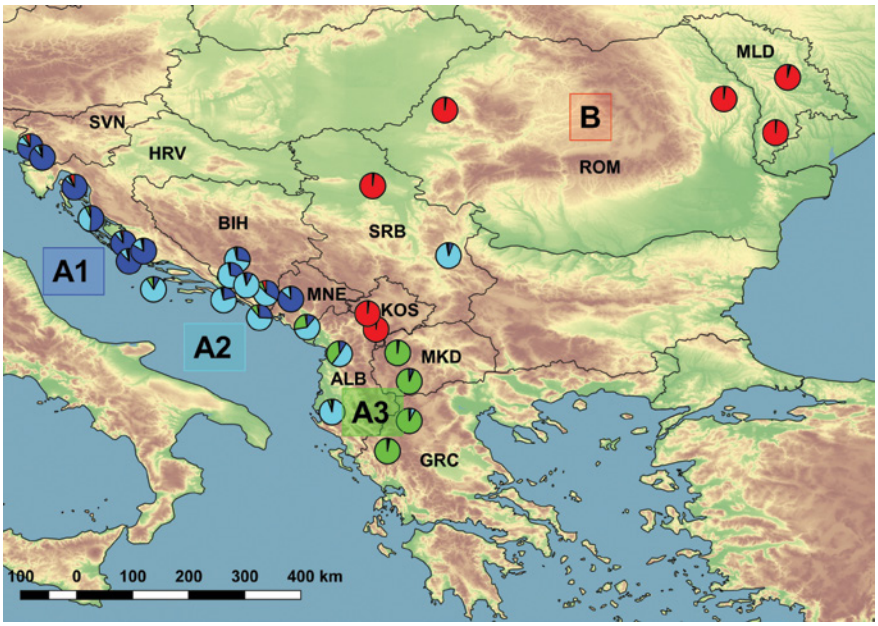
Analiza molekularne varijance (engl. *Analysis of molecular variance*; AMOVA) (Excoffier i sur., 1992.) provedena u programu ARLEQUIN (Excoffier i sur., 2005.) pokazala je da većinu genetske raznolikosti (83,73 %) uvjetuju razlike između jedinki unutar populacija, no signifikantna vrijednost (P < 0,0001) parametra ϕ_{ST} između populacija ukazala je na postojanje populacijske diferencijacije. Dvosmjerna analiza molekularne varijance pokazala je da postoje signifikantne (ϕ_{CT} = 0,110; P < 0,0001) razlike između skupina samoniklih i kultiviranih/naturaliziranih populacija.

Nakon provedbe Bayesovske analize populacijske strukture pomoću programa STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000.) najviša je vrijednost parametra ΔK utvrđena pri K = 2 (3183,82), a sljedeća najveća pri K = 4 (4,10). Prilikom analize na temelju hipoteze o postojanju dvije genetske skupine (K = 2), sve jedinke samoniklih populacija bile su pridružene skupini A, dok one kultiviranih/naturaliziranih skupini B. Pri K = 4, utvrđene su tri podskupine kod samoniklih populacija (Slika 3.6.). Podskupinu A1 činile su sjevernojadranske populacije uključujući dvije populacije iz Slovenije (P01 i P02), pet od osam hrvatskih populacija (P03-P07) te jedna crnogorska (P15). Podskupina A2 obuhvaćala je južnojadranske populacije uključujući tri populacije s juga Hrvatske (P07-P09), sve populacije iz Bosne i Hercegovine (P11-P14) te jednu crnogorsku (P16) i dvije albanske populacije (P17 i P18). Disjunktna populacija iz Srbije (P26) uzorkovana u Sićevačkoj klisuri također je pripala podskupini A2. Poskupina A3 uključivala je populacije iz Sjeverne Makedonije (P19 i P20) i Grčke (P21 i P22). Imajući na umu teoriju o postojanju više glacijalnih mikrorefugija na području Balkanskog poluotoka (model refugija unutar refugija; engl. *refugia within refugia model*; Gómez i Lunt, 2007.) kojoj u prilog idu brojna filogeografska istraživanja samonikle flore Balkana (Surina i sur., 2011.; Lakušić i sur., 2013.; Grdiša i sur., 2014.; Kutnjak i sur., 2014.; Glasnović i sur., 2018.; Ninčević i sur., 2021.) moguće je pretpostaviti da podskupine A1, A2 i A3 predstavljaju populacije koje su podrijetlom iz triju različitih glacijalnih mikrorefugija. Tijekom postglacijalne kolonizacije ljekovita kadulja ponovo je uspostavila relativno kontinuirano područje rasprostranjenja uz stabilan prijenos gena između susjednih populacija i nastajanje brojnih miješanih (hibridnih) populacija.

Analiza izolacije uslijed udaljenosti (engl. *isolation by distance*; IBD; Rousset, 1997.) provedena je izračunom korelacije između matrice genetskih [F_{ST}/(1-F_{ST})] i zemljopisnih [ln(km)] udaljenosti između isključivo samoniklih populacija. Nakon provedbe Mantelovog testa (Mantel, 1967.) utvrđena je signifikantna korelacija (r = 0,474; R^2 = 0,225; P_{Mantel} < 0,0001), što ukazuje na to da se 22,50 % genetske diferencijacije između samoniklih populacija može objasniti njihovom prostornom udaljenošću.



SLIKA 3.5. NEZAKORIJENJENO STABLO IZRAĐENO PO METODI FITCHA I MARGOLIASHA NA TEMELJU TETIVNIH UDALJENOSTI IZMEĐU 30 POPULACIJA LJEKOVITE KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) IZRAČUNATIH IZ ALELNIH UČESTALOSTI OSAM MIKROSATELITNIH BILJEGA. NA GRANAMA SU PRIKAZANE VRIJEDNOSTI *BOOTSTRAP* VEĆE OD 50%. OZNAKE POPULACIJA NAVEDENE SU U TABLICI 1.



SLIKA 3.6. GENETSKA STRUKTURA 30 POPULACIJA LJEKOVITE KADULJE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) PROCIJENJENA NA TEMELJU OSAM MIKROSATELITNIH BILJEGA U PROGRAMU STRUCTURE PRI *K* = 4. UDIO GENOMA SVAKE POPULACIJE PRIDRUŽEN ODREĐENOJ GENETSKOJ SKUPINI PRIKAZAN JE RAZLIČITIM BOJAMA: A1 SJEVERNOJADRANSKA SKUPINA (TAMNOPLAVO), A2 JUŽNOJADRANSKA SKUPINA (SVJETLOPLAVO), A3 SJEVERNOMAKEDONSKO-GRČKA SKUPINA (ZELENO), B KULTIVIRANA/NATURALIZIRANA SKUPINA (CRVENO). ALB – ALBANIJA; BIH – BOSNA I HERCEGOVINA; GRC – GRČKA; HRV – HRVATSKA; KOS – KOSOVO; MKD – SJEVERNA MAKEDONIJA; MLD – MOLDAVIJA; MNE – CRNA GORA; ROM – RUMUNJSKA; SRB – SRBIJA; SVN – SLOVENIJA.

Evolucijska povijest ljekovite kadulje na Balkanskom poluotoku analizirana je pomoću Aproksimativne Bayesovske analize (engl. *Approximate Bayesian computation*; ABC; Beaumont i sur., 2002.) u programu DIYABC (Cornuet i sur., 2014). Simulacije koalescencije provedene su u svrhu testiranja alternativnih povijesnih scenarija temeljenih na rezultatima analize genetske strukture (STUCTURE) samoniklih populacija uključujući samo one jedinke koje su pridružene određenoj genetskoj skupini (A1, A2, A3) uz vjerojatnost veću od 90 % ($Q > 0{,}90$). Povijesni scenariji uključeni u analizu bili su sljedeći: (S1) Populacija A1 nastala je iz populacije A2, koja je nastala iz populacije A3; (S2) Populacija A3 nastala je iz populacije A2, koja je nastala iz populacije A1; (S3) Populacije A1 i A3 nastale su iz populacije A2; (S4) Populacija A2 nastala je miješanjem populacija A1 i A3, te (S5) Sve su se tri populacije razdvojile u isto vrijeme. Koalescentna ABC analiza pokazala je da je procijenjeni medijan posteriorne vjerojatnosti (engl. *posterior probability*; PP) za scenarij S5 (PP 0,440 uz 95 %-tni interval pouzdanosti od 0,365 do 0,514) bio viši od medijana scenarija S1 (0,166), S2 (0,193), S3 (0,075) i S4 (0,126), a da se 95 %-tni interval pouzdanosti nije preklapao niti s jednim od ostalih scenarija. Scenarij S5 pretpostavljao je jednostavan model u kojem su se sve tri populacije (A1, A2 i A3) razdvojile od ancestralne prije *t* generacija. Medijan efektivnih veličina populacija A1, A2, A3 i ancestralne populacije iznosio je $N_1 = 4{,}330$, $N_2 = 7{,}190$, $N_3 = 2{,}440$ i $N_A = 8{,}550$. Procijenjeni medijan vremena divergencije (*t*) iznosio je 525 generacija, uz 95 %-tni interval pouzdanosti od 157 do 1540. Pouzdanih podataka o generacijskom vremenu (engl. *generation time*) ljekovite kadulje nema, a za usko srodnu grčku kadulju (*S. fruticosa* Mill.) navodi se da pojedine jedinke mogu živjeti i do 300 godina (Rivera i sur., 1994.). Ukoliko pretpostavimo da ljekovita kadulja ima sličan životni vijek, vrijeme divergencije koje je iznosilo 525 generacija moglo bi se smjestiti u pleistocen. Stoga se u skladu s teorijom o postojanju više glacijalnih mikrorefugija i rezultatima analize genetske strukture može pretpostaviti da je tijekom posljednjeg glacijalnog maksimuma (engl. *Last Glacial Maximum*; LGM) ljekovita kadulja preživjela u tri mikrorefugije, tako da je do razdvajanja populacija A1, A2 i A3 došlo u razdoblju od prije 25 do 18 tisuća godina.

3.10.4. DALJNJA ISTRAŽIVANJA

Kako bi se potaknuli programi oplemenjivanja i uvođenja ove vrijedne ljekovite i aromatične biljne vrste u poljoprivrednu proizvodnju, u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv) na području cijelog prirodnog areala provodi se prikupljanje primki i popunjavanje kolekcije ljekovite kadulje i srodnih vrsta. Na prikupljenom materijalu provode se biokemijske analize sastava eteričnih ulja te mnogobrojne genetske analize. U svrhu sklapanja i anotiranje genoma ljekovite kadulje koriste se metode sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS). Analiza biljezima SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*; polimorfizam pojedinačnog nukleotida) metodom DArTseq (Melville i sur., 2017.) poslužit će za cjelogenomsku studiju pridruživanja (engl. *Genome-Wide Association Study*; GWAS; Visscher i sur., 2012.) u svrhu identifikacije gena koji nadziru biosintetski put kojim nastaju pojedine sastavnice eteričnog ulja. U daljnja istraživanja genetske raznolikosti ljekovite kadulje bit će uključene diskontinuirane populacije s Apeninskog poluotoka, kao i populacija podvrste *Salvia officinalis* subsp. *lavandulifolia* (Vahl) Gams (Reales i sur., 2004.) rasprostranjene na Iberijskom poluotoku. Analiza mikrosatelitnim biljezima dopunit će se analizom sekvenci kloroplastne DNA. Posebna pažnja posvetit će se daljnjim genetskim i biokemijskim istraživanjima križanaca između ljekovite i grčke kadulje (*Salvia fruticosa* Mill.) na otoku Visu; u svijetu jedinstvenom nalazištu na kojem dolazi do spontane hibridizacije između te dvije biljne vrste.

LITERATURA

An, J., Bechet, A., Berggren, A., Brown, S.K., Bruford, M.W., Cai, Q., Cassel-Lundhagen, A., Cezilly, F., Chen, S.-L., i sur., 2010. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2009-30 November 2009. Mol. Ecol. Resour. 10, 404–408.

Beaumont, M.A., Zhang, W., Balding, D.J., 2002. Approximate Bayesian computation in population genetics. Genetics 162, 2025–2035.

Bossdorf, O., Richards, C.L., Pigliucci, M., 2008. Epigenetics for ecologists. Ecol. Lett. 11, 106–115.

Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. Am. J. Hum. Genet. 19, 233.

Cornuet, J.M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., Marin, J.M., Estoup, A., 2014. DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. Bioinformatics 30, 1187–1189.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1, 47.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491.

Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution (N. Y). 39, 783.

Felsenstein, J., 1995. PHYLIP - Phylogeny inference package (Version 3.2). Cladistics 5, 164–166.

Fitch, W.M., Margoliash, E., 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 155, 279–284.

Glasnović, P., Temunović, M., Lakušić, D., Rakic, T., Grubar, V.B., Surina, B., 2018. Understanding biogeographical patterns in the western Balkan Peninsula using environmental niche modelling and geostatistics in polymorphic *Edraianthus tenuifolius*. AoB Plants 10.

Gómez, A., Lunt, D.H., 2007. Refugia within Refugia: Patterns of Phylogeographic Concordance in the Iberian Peninsula. Phylogeography South. Eur. Refug. Evol. Perspect. Orig. Conserv. Eur. Biodivers. 155–188.

Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-statistics. J. Hered. 86, 485–486.

Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., Šatović, Z., 2015. Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): A review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. Agric. Conspec. Sci. 80.

Grdiša, M., Liber, Z., Radosavljević, I., Carović-Stanko, K., Kolak, I., Šatović, Z., 2014. Genetic diversity and structure of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan refugium. PLoS One 9, e105265.

Greguraš, D., 2013. Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L). Doktorska disertacija. Biološki odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu.

Jug-Dujaković, M., 2010. Genetska i biokemijska raznolikost ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Jug-Dujaković, M., Ninčević, T., Liber, Z., Grdiša, M., Šatović, Z., 2020. *Salvia officinalis* survived in situ Pleistocene glaciation in 'refugia within refugia' as inferred from AFLP markers. Plant Syst. Evol. 306.

Jug-Dujaković, M., Ristić, M., Pljevljakušić, D., Dajić-Stevanović, Z., Liber, Z., Hančević, K., Radić, T., Šatović, Z., 2012. High diversity of indigenous populations of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) in essential-oil composition. Chem. Biodivers. 9, 2309–2323.

Kutnjak, D., Kuttner, M., Niketic, M., Dullinger, S., Schonswetter, P., Frajman, B., 2014. Escaping to the summits: Phylogeography and predicted range dynamics of *Cerastium dinaricum*, an endangered high mountain plant endemic to the western Balkan Peninsula. Mol. Phylogenet. Evol. 78, 365–374.

Lakušić, D., Liber, Z., Nikolić, T., Surina, B., Kovačić, S., Bogdanović, S., Stefanović, S., 2013. Molecular phylogeny of the *Campanula pyramidalis* species complex (Campanulaceae) inferred from chloroplast and nuclear non-coding sequences and its taxonomic implications. Taxon 62, 505–524.

Liber, Z., Židovec, V., Bogdanović, S., Radosavljević, I., Pruša, M., Filipović, M., Han Dovedan, I., Jug-Dujaković, M., Šatović, Z., 2014. Genetic diversity of dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.) as assessed by RAPD markers. Agric. Conspec. Sci. 79, 77–84.

Linnaeus, C., 1753. Species Plantarum vol 1. Holmiae Impensis Laurentii Salvii, Stockholm.

Mantel, N., 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. Cancer Res. 27.

Medail, F., Diadema, K., 2009. Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. J. Biogeogr. 36, 1333–1345.

Melville, J., Haines, M.L., Boysen, K., Hodkinson, L., Kilian, A., Smith Date, K.L., Potvin, D.A., Parris, K., 2017. Identifying hybridization and admixture using SNPs: Application of the DArTseq platforminphylogeographic research on vertebrates. R. Soc. Open Sci. 4, 1–14.

Nikolić, T., 2022. Salvia officinalis L. Flora Croat. database.

Ninčević, T., Jug-Dujaković, M., Grdiša, M., Liber, Z., Varga, F., Pljevljakušić, D., Šatović, Z., 2021. Population structure and adaptive variation of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don along eastern Adriatic temperature and precipitation gradient. Sci. Reports 2021 111 11, 1–16.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Radosavljević, I., Antonić, O., Hruševar, D., Križan, J., Satovic, Z., Turković, D., Liber, Z., 2020. The influence of a seedling recruitment strategy and a clonal architecture on a spatial genetic structure of a *Salvia brachyodon* (Lamiaceae) population. Plants 9, 1–19.

Radosavljević, I., Bogdanović, S., Celep, F., Filipović, M., Satovic, Z., Surina, B., Liber, Z., 2019. Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and Salvia fruticosa Mill. Sci. Rep. 9.

Radosavljević, I., Jakse, J., Javornik, B., Satovic, Z., Liber, Z., 2011. New microsatellite markers for *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and cross-amplification in closely related species. Am. J. Bot. 98, e316–e318.

Radosavljević, I., Satovic, Z., Jakse, J., Javornik, B., Greguraš, D., Jug-Dujaković, M., Liber, Z., 2012. Development of new microsatellite markers for *Salvia officinalis* L. and its potential use in conservation-genetic studies of narrow endemic Salvia brachyodon vandas. Int. J. Mol. Sci. 13, 12082–12093.

Radosavljević, I., Satovic, Z., Liber, Z., 2015. Causes and consequences of contrasting genetic structure in sympatrically growing and closely related species. AoB Plants 7.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86, 248–249.

Reales, A., Fls, D.R., Palazón, J.A., Fls, C.O., 2004. Numerical taxonomy study of *Salvia* sect . *Salvia* (mLabiatae). Bot. J. Linn. Soc. 145, 353–371.

Rešetnik, I., Baričevič, D., Rusu, D.B., Carović-Stanko, K., Chatzopoulou, P., Dajić-Stevanovic, Z., Goncearіuc, M., Grdiša, M., Greguraš, D., Ibraliu, A., Jug-Dujaković, M., Krasniqi, E., Liber, Z., Murtić, S., Pećanac, D., Radosavljević, I., Stefkov, G., Steševic, D., Šoštarić, I., Šatović, Z., 2016. Genetic diversity and demographic history of wild and cultivated/naturalised plant populations: Evidence from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L, Lamiaceae). PLoS One 11.

Reyna-López, G.E., Simpson, J., Ruiz-Herrera, J., 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Mol. Gen. Genet. 253, 703–710.

Rivera, D., Obon, C., Cano, F., 1994. The Botany, History And Traditional Uses Of Three-Lobed Sage (*Salvia fruticosa* Miller) (Labiatae). Econ. Bot. 1994 482 48, 190–195.

Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145, 1219–1228.

WOS (2022). *Salvia officinalis* – Web of Science Core Collection. Clarivate analytics.

Stojanović, D., Aleksić, J.M., Jančić, I., Jančić, R., 2015. A mediterranean medicinal plant in the continental balkans: A plastid DNA-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and its conservation implications. Willdenowia 45, 103–118.

Surina, B., Schonswetter, P., Schneeweiss, G.M., 2011. Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. J. Biogeogr. 38, 1381–1393.

Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., Yang, J., 2012. Five years of GWAS discovery. Am. J. Hum. Genet. 90, 7–24.

Walker, J.B., Sytsma, K.J., 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. Ann. Bot. 100, 375–391.

Walker, J.B., Sytsma, K.J., Ttreutlein, J., Wink, M., 2004. *Salvia* (Lamiaceae) Is Not Monophyletic : Implications for the Systematics , Radiation , and Ecological Specializations of S Alvia and Tribe M Entheae. Am. J. Bot. 7, 1115–1125.

Židovec, V., 2004. Varijabilnost prirodnih populacija mirisave kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

3.11. Kukuruz u Jugoistočnoj Europi – povijest, raznolikost i selekcija

VLATKO GALIĆ, DOMAGOJ ŠIMIĆ, ZVONIMIR ZDUNIĆ I ANTUN JAMBROVIĆ

3.11.1. O PORIJEKLU OPLEMENJIVAČKE GERMPLAZME KUKURUZA U JUGOISTOČNOJ EUROPI

Sličnost između agroekoloških uvjeta u europskim regijama od Biskajskog zaljeva do Crnog mora i američkog kukuruznog pojasa uočena je još na početku modernog uzgoja kukuruza (Jonasson, 1926.), a uvođenje kukuruza u Stari svijet trebalo je uspjeti, jer su se domaće rase (tradicijski kultivari) donesene iz SAD-a lako uzgajale u mnogim europskim područjima. Međutim, neka od prvih uvođenja kukuruza u dijelove Europe nakon otkrića Amerike vjerojatno su propala u širim razmjerima zbog loše procjene sposobnosti adaptacije donesenih sorti, kao i kulturološkog jaza. Dobro je poznato da je tijekom ranog 16. stoljeća nekoliko populacija kukuruza karipskog podrijetla bilo raširenu u južnoj Španjolskoj i Italiji, ali vjerojatno je tek nakon odvojenog uvođenja Sjevernih tvrdunaca kasnije u istom stoljeću, kukuruz uvelike dospio i do središnjih dijelova Europe (Rebourg i sur., 2003.; Tenaillon i Charcosset, 2011.; Mir i sur., 2013.). Uzastopno spontano miješanje tvrdunaca s germplazmom kukuruznog pojasa olakšalo je njegovu prilagodbu europskim klimatskim uvjetima, s umjerenim znakovima uskih grla selekcije i selekcijom za lokuse koji sadrže gene uključene u odgovor na stres (Brandenburg i sur., 2017.).

Jugoistočna Europa (JIE), koja se prvenstveno sastoji od Balkanskog poluotoka, može se smatrati europskim pandanom američkom kukuruznom pojasu s dobro prilagođenom germplazmom zubana umjerenog pojasa, te više od 20 % sjetvenih površina pod kukuruzom (Leff i sur., 2004.). Štoviše, više od 35 % europskog kukuruza za zrno proizvedeno je u Srbiji, Rumunjskoj i Mađarskoj te kontinentalnoj Hrvatskoj u razdoblju od 2010. – 2014. (USDA, 2020.). U novijim izvješćima prikazano je kako su Hrvatska, Srbija, Rumunjska i Mađarska u 2018. i 2019. g. zajedno pridonijele 52 % odnosno 51 % ukupnoj proizvodnji kukuruza u Europskoj uniji + Srbija (Eurostat, 2019.; Republic of Serbia, 2020.).

U bivšoj Jugoslaviji veliki broj domaćih primki (>2000) razvrstanih u 18 rasa, pokazao je veliku varijabilnost unutar i između rasa, kao i visoku očekivanu heterozigotnost (Geric i sur., 1989.; Ignjatović-Micić i sur., 2013.), što vjerojatno odražava višestruko podrijetlo i uvođenje kukuruza u ovu regiju uočljivo i kroz riječi na različitim jezicima koje označavaju kukuruz kao „tursko žito", ili „kolombač", riječi koja potiče od riječi Kolumbo u Crnoj Gori (Leng i sur., 1962.). Na temelju morfološke procjene, povijesne domaće rase bivše Jugoslavije nalikuju mnogim različitim povijesnim populacijama, kao što su Amarillo de Ocho (Crnogorski sitnozrni tvrdunac), Američki Sjeverni tvrdunci (osmoredni tvrdunci), stari Južni

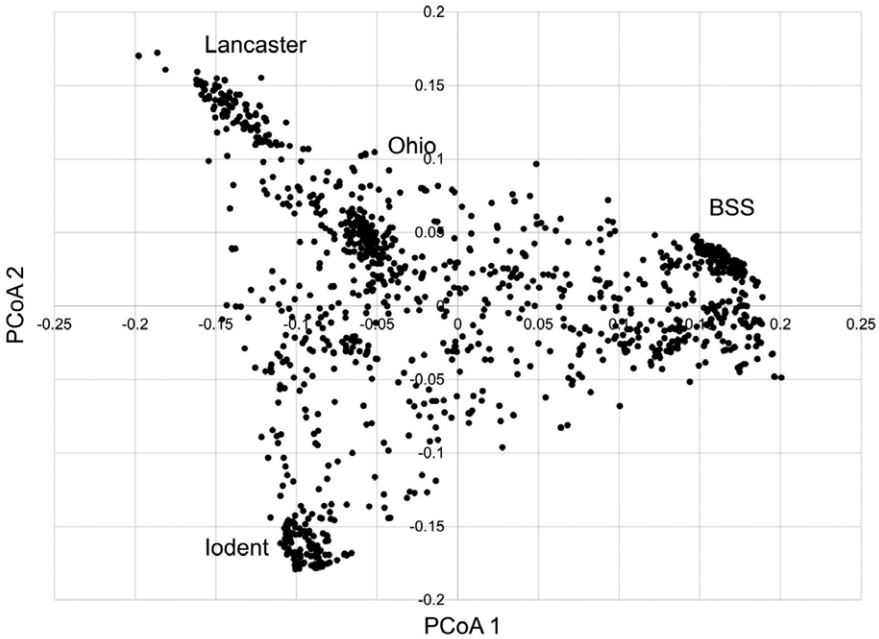
zubani (mnogoredni meki zubani), itd., zajedno s nekoliko recentnijih stranooplodnih sorata (engl. *open-pollinated varieties*; OPV) s kraja 19. stoljeća kao što su Hichory King i Golden Mine/Golden Flood (zubani velikog zrna), Queen of Prairie (Rumski/Vukovarski/Beljski/Šidski žuti zuban) i mnogim drugim s početka 20. stoljeća (Kozumplik i Martinić-Jerčić, 2000.; Hadi, 2006.; Babic i sur., 2012.).

U prvoj polovici 20. stoljeća uzgoj izvornih OPV-a postupno je zamijenjen uzgojem inter-OPV hibrida sa znatnim (20 – 30 %) povećanjem prinosa u odnosu na izvorne sorte (Tavčar, 1955.). Nakon Drugog svjetskog rata, neke od europskih tradicionalnih sorti korištene su za razvoj hibrida prilagođenih europskim uvjetima (Rojc i sur., 1983.; Tenaillon i Charcosset, 2011.), a križane su s materijalima iz američkih uvezenih dvostrukih (engl. *double-cross*) hibrida, kao što je Wf9 x Hy, Hy x Oh07, W32 x W187 itd. tijekom 1950-ih (Brkić i sur., 2003.; Hadi i sur., 2013.). Razvoj lokalno uzgojenih hibrida kukuruza bio je toliko popularan u jugoistočnoj Europi tijekom 1960-ih, da se čak nagađalo da će nadmašiti proizvodnju američkih hibrida u narednim desetljećima (Leng i sur., 1962.), uglavnom zbog viših troškova proizvodnje sjemena američkih hibrida u usporedbi s ustaljenom praksom. Međutim, poboljšanje performansi natjeralo je proizvođače sjemena da prihvate nove postupke, pa su prvi dvostruki križanci originalnog pedigrea stvoreni početkom 1960-ih (Rojc i sur., 1983.), a potom trostruki (engl. *three-way cross*) i jednostruki (engl. *single-cross*) hibridi. Izvor tadašnje moderne američke germplazme bila je organizirana neograničena proizvodnja američkih dvostrukih hibrida otvorenog pedigrea u jugoslavenskim javnim istraživačkim institutima u sklopu plana američke pomoći preko američke Uprave za strane organizacije, iz izvornih inbred linija (Tavčar, 1955.). Uvezene inbred linije sredinom 1950-ih bile su: Wf9, 38-11, Hy, L317, N6, K148, K150, M14, W32, W187, A374, A375 i Oh07.

Podaci o molekularnoj raznolikosti genetskog materijala kukuruza u JIE oskudni su (Şuteu i sur., 2013.). Ipak, dugo se nagađalo o korištenju JIE kukuruza kao izvora poželjnih alela i genetske raznolikosti (Leng i sur., 1962.), a većina materijala još je uvijek pohranjena u bankama gena. Razmatranje važnosti biljnih genetskih izvora općenito ima najmanje dva kompatibilna aspekta. Prvo je očuvanje biološke raznolikosti koja je sužena načinom na koji je povijesna raznolikost iskorištena (Planchenault i Mounolou 2011.). Drugi je aspekt korištenje svih dostupnih modernih alata za uzgoj, kao što su gusta genotipizacija, fenotipizacija visoke propusnosti, itd. kako bi se detektirala i iskoristila povoljna varijabilnost prevladavanjem problema, kao što je vezanost gena (Ortiz i sur., 2010.; Sood i sur., 2014.; Unterseer i sur., 2016.; Hölker i sur., 2019.).

U oplemenjivačkoj zajednici postoji zabrinutost da bi trenutna shema oplemenjivanja kukuruza gdje samo jedinke pojedinih pedigrea dospijevaju u više cikluse oplemenjivanja, mogla dovesti do toga da dostupna germplazma postane elitnija, ali i genetski manje raznolika (Lu i Bernardo, 2001.; Reif i sur., 2005.). Zbog izrazitog heterozisa u okviru heterotičnih obrazaca kod uzgoja kukuruza (Lee i Tracy, 2009.), zadržava se raznolikost na razini populacije (Slika 3.7.), ali kako bi se održao dugoročni napredak oplemenjivanja, iskorištavanje svih dostupnih resursa germplazme neizbježno je, posebno za svojstva povezana s adaptacijom (Bouchet i sur., 2013.; Romero Navarro i sur., 2017.; Wegary i sur., 2019.). Moderni hibridi kukuruza koji se danas uzgajaju diljem svijeta, uglavnom su jednostruki križanci razvijeni kroz zamršene sheme križanja i testiranja u ciljanim populacijama okolina, od strane multinacionalnih kompanija. S druge strane, tek marginalni tržišni udjeli ostvareni su od strane malih tvrtki i javnih institucija (FAO/IHS Markit Agribusiness Consulting, 2019.), što utječe na otpornost proizvodnog lanca sjemena na promjene klime, vlasništva kompanija ili tržišnih uvjeta.

Ova studija slučaja predstavlja skraćene i preliminarne rezultate istraživanja koji će biti naknadno objavljeni, a u kojem će detaljno biti opisana genetska raznolikost povijesne germplazme JIE, lokalne redukcije raznolikosti uzrokovane selekcijom, te genetska



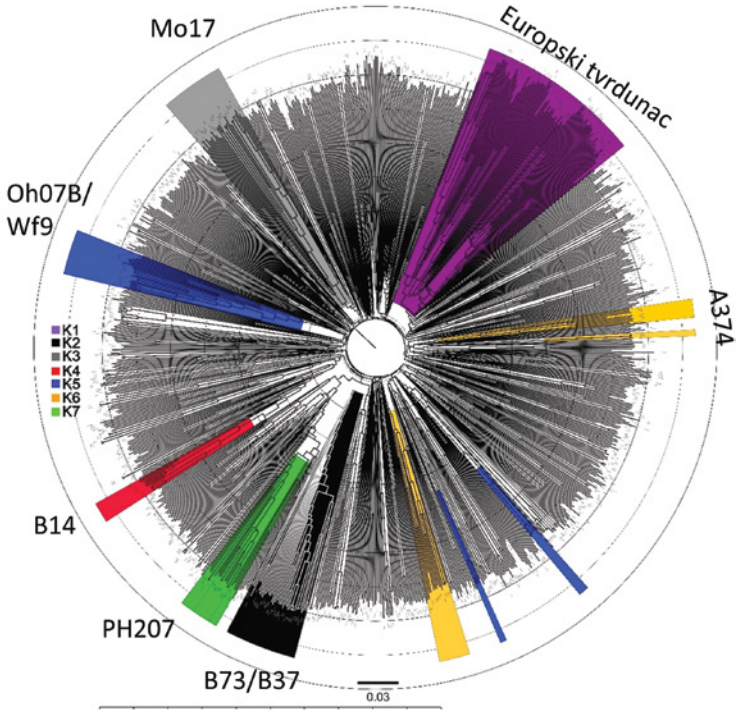
SLIKA 3.7. ANALIZA GLAVNIH SASTAVNICA 1300 MODERNIH OPLEMENJIVAČKIH INBRED LINIJA KUKURUZA RAZVIJENIH NA POLJOPRIVREDNOM INSTITUTU U OSIJEKU KORIŠTENJEM METODE ADMIXTURE I ~48000 MOLEKULARNIH BILJEGA, S PRIKAZANIM GLAVNIM HETEROTIČNIM SKUPINAMA (NEOBJAVLJENO).

ontologija gena pronađenih u lokusima pod selekcijom. Materijal koji je analiziran u radu su 572 inbred linije pohranjene u Banci gena Instituta za kukuruz „Zemun polje" (ZP panel) u Srbiji, od kojih je njih 455 razvijeno na području JIE od kraja 1950-ih do 1980-ih godina.

3.11.2. GENETSKA RAZNOLIKOST I SELEKCIJA U POVIJESNOJ GERMPLAZMI KUKURUZA JUGOISTOČNE EUROPE

U ovoj studiji slučaja je genetska raznolikost promatrana iz više različitih perspektiva. Na razini cijelih kromosoma, ili cijelog genoma utvrđena je povezanost pojedinih izvornih skupina kroz analizu izglednosti da pojedini aleli dolaze iz iste ishodišne populacije. U radu je za analizu genetske raznolikosti korišten osnovni set od 572 inbred linije iz ZP panela, te 402 linije s javno dostupnim podatcima, genotipiziranih istom tehnologijom pri Technische Universität München, Njemačka (TUM panel – 155 linija) i INRAE, Francuska, u sklopu projekta DROPS (DROPS panel – 247 linija). Javno dostupni paneli koji predstavljaju najvažnije Europske genetske izvore posljednjih 50-ak godina, u vidu oplemenjivačkih linija Europskih tvrdunaca (Njemačka) i zubana umjerenog pojasa (Francuska), korišteni su kako bi se povećala informativnost analize genetske strukture, te s ciljem identifikacije izvorišnih populacija u pan-europskom okviru. Provedena je analiza Admixture korištenjem 460263 zajedničkih filtriranih i imputiranih SNP biljega. Utvrđeno je postojanje 7 izvornih populacija u kombiniranom setu od 974 inbred linije (Slika 3.8.) korištenjem metode za neujednačeno uzorkovane populacije (Puechmaille, 2016.) u programskom sučelju Structure Selector (Li i Liu, 2018.). S obzirom da se radi o izvornim oplemenjivačkim populacijama s visokom zastupljenošću originalnih izvornih linija, prag za pripadnost pojedinoj ishodišnoj populaciji (Q) postavljen je na strogih Q = 0,9.

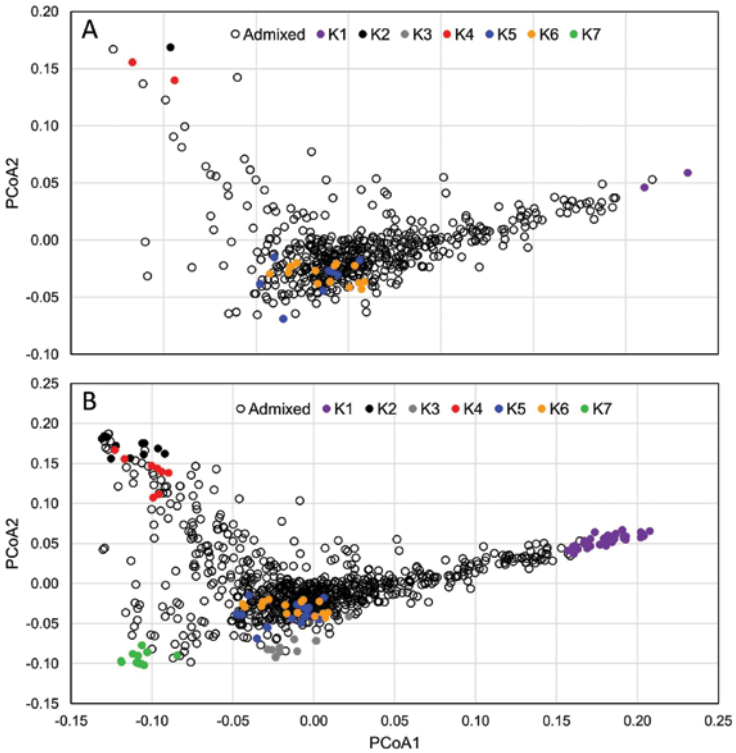
Najzanimljivije otkriće ove analize bilo je izostanak moderne heterotične skupine Iowa Reid Yellow Dent (Iodent) u ZP panelu. Skupina Iodent nastala je nakon razvoja linije PH207 1970-ih od strane oplemenjivačke kompanije Pioneer i njezine komercijalizacije 1983. godine (McConnell i Richard, 1983.).



SLIKA 3.8. KLADOGRAM IZRAĐEN METODOM PRIDRUŽIVANJA SUSJEDA (ENGL. *NEIGHBOR JOINING*) S OBOJENIM LINIJAMA S Q > 0,9 U ANALIZI METODOM ADMIXTURE I SEDAM ISHODIŠNIH POPULACIJA (K = 7).

Ovo otkriće pokazuje povijesni kontekst genotipiziranog panela, s tek dvije linije s pripadnosti skupini Iodent od Q = 0,706 i Q = 0,705, te jednom linijom s Q = 0,644. Velika je vjerojatnost da su visoke vrijednosti pripadnosti istoj ishodišnoj populaciji uzrokovane korištenjem materijala oplemenjivačkog programa Reid yellow dent u JIE (Ignjatović-Micić i sur., 2013.) za dobivanje linija (Rojc i sur., 1983.; Hadi i sur., 2013.) iz kojega je podrijetlom i skupina Iodent. Toj teoriji ide u prilog i najviša genetska raznolikost unutar Reid yellow dent-a ovjekovječena poslovicom „You can get anything out of Reid" (Lu i Bernardo, 2001.). U ZP panelu općenito je utvrđen mali broj čistih linija iz većine ishodišnih populacija, osim K5 i K6 definiranim povijesnim linijama Oh07B/Wf9 i A374. Izražena prisutnost materijala ovog podrijetla (Slika 3.9.) povezana je s prispijećem ovih i srodnih linija nakon Drugog svjetskog rata u sklopu Američkog plana za europsku obnovu u tadašnjoj Jugoslaviji preko FOA (engl. *foreign organisation administration*). Prema Tavčaru (Tavčar, 1955.), ove su linije slobodno korištene u jugoslavenskim oplemenjivačkim programima, a za razliku od domaćih sorti pokazivale su znatno dulje trajanje vegetacije i bolja agronomska svojstva. Korištenje ovih linija u JIE bilo je toliko raširenо da su se zbog velikog broja događaja miješanja s ostalom germplazmom formirale kao zasebne ishodišne populacije što je potvrdila analiza Admixture, a nije slučaj u germplazmi američkog kukuruznog pojasa (White i sur., 2020.).

Na razini pojedinih kromosoma ili genomskih regija, oplemenjivanje često prati cikličke obrasce, a germplazma razvijena u jednom ciklusu prolazi križanjima kroz iteracije, s ciljem prilagodbe i poboljšanja pojedinih svojstava od interesa. Ovakav način prilagodbe germplazme kroz oplemenjivačke cikluse ima za cilj razbiti vezanost gena te prenijeti samo poželjne alele u daljnje potomstvo, premda je uz razmjerno mali broj rekombinacija i to najčešće na bliskim pozicijama (Rodgers-Melnick i sur., 2015.)



SLIKA 3.9. ANALIZA GLAVNIH SASTAVNICA KORIŠTENJEM MULTIDIMENZIJSKOG SKALIRANJA NA TEMELJU MATRICE UDALJENOSTI IZRAČUNATE PO METODOLOGIJI *IDENTITY-BY-DESCENT* KORIŠTENJEM 460263 FILTRIRANA I IMPUTIRANA SNP BILJEGA. SLIKA (A) PRIKAZUJE ANALIZU PROVEDENU U ZP PANELU (N = 572), DOK JE NA (B) PRIKAZAN ZP PANEL UZ JOŠ DVA EUROPSKA GENOTIPIZACIJSKA PANELA (N = 974). SLIKA JE PRIKAZANA S OBOJENIM LINIJAMA S Q > 0,9 U ANALIZI METODOM ADMIXTURE I SEDAM ISHODIŠNIH POPULACIJA (K = 7).

određena količina vezanosti gena neizbježna. Samooplodnja, koja je sastavni dio procesa proizvodnje inbred linija kukuruza, također bitno smanjuje broj efektivnih rekombinacija, ostavljajući tragove smanjene genetske raznolikosti raširenima kroz dulje fragmente genoma (Hartfield i Bataillon, 2018.).

Rekombinacije su u samooplodnji općenito izglednije između homozigotnih pozicija, pa se stoga njihova efektivna stopa (r_{eff}) smanjuje prateći faktor $1 - 2F + \Phi$, uzimajući u obzir omjer samooplođenih potomstava σ, koeficijent samooplodnje $F = \sigma / (2 - \sigma)$, te Φ kao vjerojatnost da su dva lokusa identičnog porijekla (Hartfield i Glémin, 2016.) definiranu kao:

$$\Phi = \frac{\sigma(2-\sigma) - 2(1-r)r(2-3\sigma))}{(2-\sigma)(2-(1-2(1-r)r)\sigma)}$$

S obzirom da su geni pod selekcijom važni za svojstva od interesa obično unutar duljih lokusa okruženi neutralnim regijama, njihova se akumulacija promatra dinamički, pretpostavljajući da je postojala faza zatečene raznolikosti u germplazmi prije definiranja ideotipa pojedinog lokusa p_0, praćena selekcijom za poželjni alel čija frekvencija raste od p_0 do fiksacije (Berg i Coop, 2015.). Poželjnost pojedinog alela također se može promatrati fleksibilno, ovisno o tržišnim zahtjevima (bijela ili crvena boja svile, indentacija zrna) ili poželjnoj fenotipskoj ekspresiji u novonastalim uvjetima (suša, niska opskrbljenost hranjivima). Opisani model selekcije dovodi do procesa koji se naziva selektivna zamjena (engl. *selective sweep*) i podrazumijeva selektivno „istiskivanje" postojeće varijabilnosti u korist pojedine poželjne varijante. Zbog vezanosti gena, a posredno i samooplodnje kako je opisano ranije, dulji fragmenti genoma mogu ukazivati na selekciju za samo pojedini gen unutar regije niske genetske raznolikosti. Smanjenje raznolikosti unutar regija mijenja spektar frekvencije lokusa (engl. *site frequency spectrum*; SFS), uzrokujući odstupanje SFS od distribucije pod pretpostavkom

neutralnog modela (bez selekcije) (Nielsen i sur., 2005.). Akumulacija neutralnih, genetski vezanih varijanti i promjene njihovih frekvencija nazivaju se genetsko stopiranje (engl. *genetic hitchiking*) (Fay i Wu, 2000.) i predstavljaju jednu od najvažnijih metoda analize selekcije na razini genoma. Nielsen i sur. (2005) razvili su Bayesovski pristup analizi pozitivne selekcije za guste molekularne biljege nazvan složeni omjer izglednosti (engl. *composite likelihood ratio*; CLR,) u formi:

$$CLR = \frac{L(regija|SFS)}{L(genom|SFS)}$$

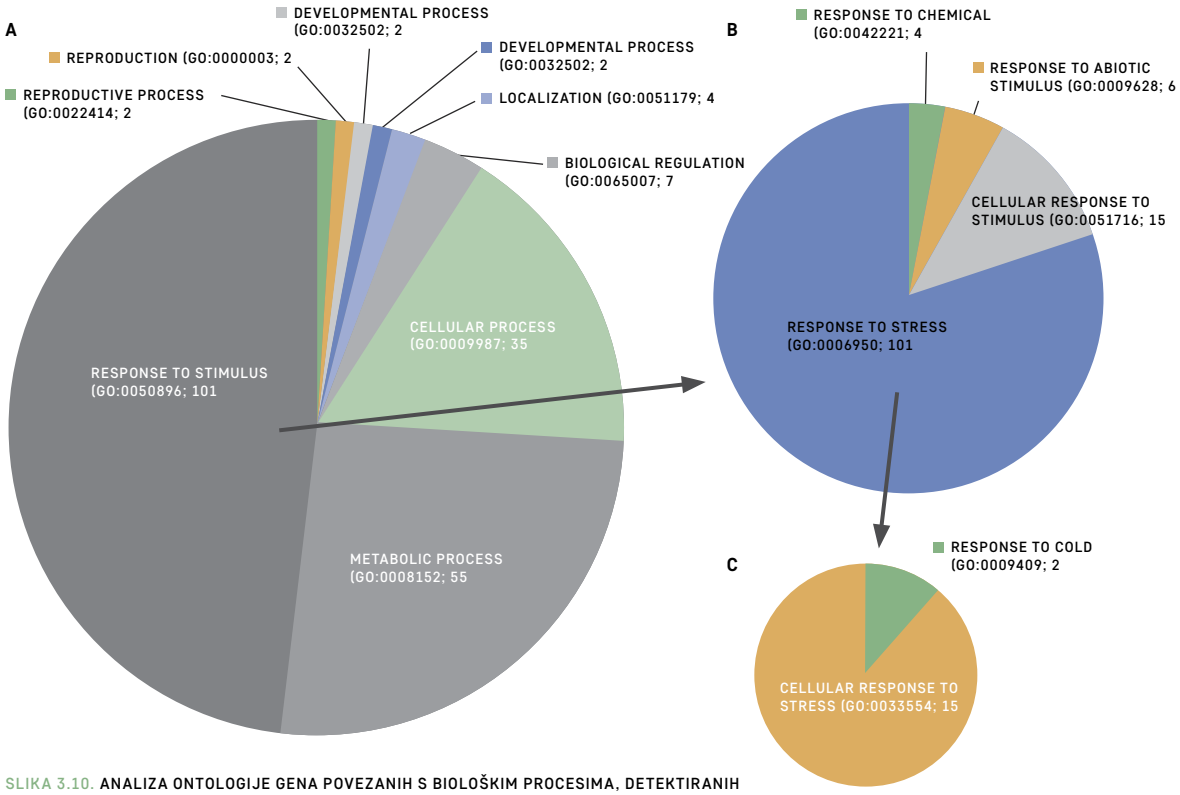
koji kao brojnik koristi izglednost da je pojedina regija pod selekcijom na temelju odstupanja SFS od neutralnog modela, a kao nazivnik empirijsku izglednost neutralnog modela izračunatu na temelju cijelog genoma.

Praćeno je nekoliko pokazatelja selekcije koji analiziraju guste molekularne biljege u odnosu na neki od pretpostavljenih modela lokalnog smanjenja raznolikosti. Najznačajniji rezultati CLR prikazani su u Tablici 1. S obzirom da je genotipizacija panela provedena genotipizacijskim čipom (engl. *genotyping array*) koji se oslanja na raznolikost obuhvaćenu u populaciji korištenjem koje je čip razvijen, utvrđeno je da rezultati genotipizacije ovom tehnologijom često pokazuju potvrdnu pristranost prema nekom od alela obuhvaćene populacije, tj. rijetki aleli često nisu genotipizirani. Pojava takve pristranosti može uzrokovati umjetno „peglanje" genomskih regija, te prouzročiti umjetna odstupanja SFS od neutralnog modela. Kako bi se spriječila pojava artefakata SFS, postoje različite procedure ublažavanja potvrdne pristranosti u rezultatima dobivenim korištenjem genotipizacijskih čipova, najefikasnija od kojih je uklanjanje redundantnih biljega korištenjem faktora inflacije varijance (engl. *variance inflation factor*; VIF) po formuli $VIF = 1/(1-r^2)$ unutar regija od 50 biljega (Malomane i sur., 2018.). Za analizu selek-

TABLICA 3.4. NAJVIŠI SLOŽENI OMJERI IZGLEDNOSTI (ENGL. *COMPOSITE LIKELIHOOD RATIO*; CLR) ZA REGIJE POD SELEKCIJOM, TE GLAVNI ATRIBUTI REGIJE POD SELEKCIJOM.

KROMOSOM	POČETAK (MBP)	KRAJ (MBP[a])	NAJVIŠI CLR	NAJVEĆA DULJINA (MBP)	BR. BILJEGA	BR. GENA
1	115,14	154,8	10,3	39,65	457	249
1	117,14	159,21	9,94	36,42	407	223
1	117,14	153,56	9,94	36,42	407	223
1	143,63	159,21	7	15,58	286	133
3	181,65	181,91	7,43	0,26	32	7
6	49,3	54,46	6,72	5,16	30	41
7	45,57	52,91	7,49	7,35	113	64
7	98,86	106,23	12,2	7,37	140	76
8	70,46	76,86	11,21	6,4	152	102
9	2,88	3,26	6,75	0,37	18	5
10	36,23	50,58	8,1	14,35	137	85

[a] Mbp – mega bazni par, milijun baznih parova udaljenosti na fizikalnoj mapi



SLIKA 3.10. ANALIZA ONTOLOGIJE GENA POVEZANIH S BIOLOŠKIM PROCESIMA, DETEKTIRANIH UNUTAR REGIJA KOJE POKAZUJU TRAGOVE SELEKCIJE (TABLICA 1) KORIŠTENJEM SUSTAVA PANTHER. NAJVEĆI BROJ GENA (101) PREDSTAVLJA TERMIN ODGOVOR NA STIMULUS (A). SVI OVI GENI UKLJUČENI SU U ODGOVOR NA STRES (B), A NEKI OD NJIH TAKOĐER I U DRUGE BIOLOŠKE PROCESE, DOK JE 15 GENA POVEZANO SA STANIČNIM ODGOVOROM NA STRES (C), A 2 S ODGOVOROM NA HLADNOĆU.

cije u predmetnom radu provedeno je uklanjanje redundantnih biljega korištenjem metode klizećeg prozora (engl. *sliding window*) korištenjem VIF = 2, u regijama od 50 biljega s pomakom od 5 biljega u programu Plink (Purcell i sur., 2007.). Nakon uklanjanja preostalo je 58264 biljega za analizu selekcije. CLR je u ovom radu izračunat korištenjem programa SweeD (Pavlidis i sur., 2013.) koji slijedi metodologiju opisanu u (Nielsen i sur., 2005.), ali optimizira izračun za veći broj biljega. Regije obuhvaćene s najviših 1 % CLR-ova prikazane su u Tablici 3.4. zajedno s duljinama regija koje pokazuju poremećaje u SFS, brojem biljega u regiji, te brojem gena u referentnom sastavku genoma prema analizi programom BioMart (Kinsella i sur., 2011.).

Iz Tablice 3.4. vidljivo je da je većina regija koje pokazuju tragove selekcije vrlo dugačka, često čak i više od 10 % ukupne duljine kromosoma (pozicije 115,14 do 117,14 na kromosomu 1). Samo dvije regije s tragovima selekcije u ZP panelu bile su kraće od 1 Mbp i sadržavale 7, odnosno 5 gena. Ukupni broj gena u regijama s tragovima selekcije bio je 1208. Velika duljina genomskih regija pod selekcijom ukazuje na protok malog broja generacija od znatne populacijske ekspanzije (Hartfield i Bataillon, 2018.), što je u skladu s otkrićem velikog broja inbred linija grupiranih oko američkog materijala pridošlog nakon Drugog svjetskog rata. Posebna relevantnost ovoga ogleda se u činjenici da je većina materijala sadržanog u ZP panelu pohranjena u Banku gena Instituta za kukuruz „Zemun polje" tijekom 1960-ih i 1970-ih godina 20. stoljeća, što je u skladu s dugim oplemenjivačkim ciklusima inbred linija kukuruza sa stopom razmnožavanja od jedne generacije godišnje

(Hallauer i sur., 2010). Brza ekspanzija materijala i njegova prisutnost u većini materijala; čak 91,1 % materijala iz ZP panela pokazuje pripadnost grupi A374 Q > 0,1, sugerira da se svaki oplemenjivački program kukuruza u bivšoj Jugoslaviji naglo okrenuo radu s američkim linijama, suprotno predviđanjima da će oplemenjivanje korištenjem lokalnih tradicijskih kultivara biti najznačajniji način oplemenjivanja kukuruza na ovim prostorima (Leng i sur., 1962.).

Svih 1208 gena pronađenih unutar regija s tragovima selekcije podvrgnuto je analizi ontologije u sučelju programa PANTHER (Mi i sur., 2013.). Analiza ontologije detektiranih gena pokazala je značajno obogaćenje ($p < 10^{-16}$) bioloških procesa, s najznačajnijim terminom *response to stimulus/ response to stress* (Slika 3.10.).

Analizom ontologije pokazano je da je oplemenjivački rad za zajednički cilj imao adaptaciju materijala na uvjete JIE, tj. poboljšanje tolerantnosti na stres postojeće germplazme korištenjem američkog materijala kao izvora poželjne raznolikosti. Iz rezultata istraživanja proizlazi potreba za detaljnom fenotipskom karakterizacijom ovog panela, kao potencijalno vrijedne germplazme u oplemenjivanju za tolerantnost na stres. Zaključno, ovaj panel zasigurno predstavlja jedan od vrjednijih javnih izvora germplazme kukuruza u Europi s obzirom na gustu genotipizaciju, povijesni kontekst i dokazanu akumulaciju alela povezanih s odgovorom na stres, pogotovo u vrijeme sve izraženijeg utjecaja klimatskih promjena na poljoprivrednu proizvodnju.

LITERATURA

Babic, V., Ivanovic, M., Babic, M., 2012. The origin and evolution of maize and its introduction into South-Eastern Europe. Ratar. i Povrt. 49, 92–104.

Berg, J.J., Coop, G., 2015. A coalescent model for a sweep of a unique standing variant. Genetics 201, 707–725.

Bouchet, S., Servin, B., Bertin, P., Madur, D., Combes, V., Dumas, F., Brunel, D., Laborde, J., Charcosset, A., Nicolas, S., 2013. Adaptation of Maize to Temperate Climates: Mid-Density Genome-Wide Association Genetics and Diversity Patterns Reveal Key Genomic Regions, with a Major Contribution of the Vgt2 (ZCN8) Locus. PLoS One 8.

Brandenburg, J., Mary-huard, T., Rigaill, G., Hearne, S.J., Joets, J., Charcosset, A., Nicolas, D., 2017. Independent introductions and admixtures have contributed to adaptation of European maize and its American counterparts 1–30.

Brkić, I., Parlov, D., Kozumplik, V., 2003. Maize Seed Production in Croatia, u: Ruckenbauer, P. (Ur.), Bericht über die 54. Tagung 2003 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. str. 1–5.

Eurostat, 2019. Agricultural Production - Crops, Agriculture, forestry and fishery statistics - 2019 edition.

FAO/IHS Markit Agribusiness Consulting, 2019. Analysis on Sales and Profitability Within the Seed Sector.

Fay, J.C., Wu, C.I., 2000. Hitchhiking under positive Darwinian selection. Genetics 155, 1405–1413.

Geric, I., Zlokolica, M., Geric, C., Stuber, C.W., 1989. Races and populations of maize in Yugoslavia. Isozyme variation and genetic diversity, Systematic. ed. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, Italy.

Hadi, G., 2006. Genetic basis of maize production in Eastern Central Europe between 1610 and 2005: Review. Cereal Res. Commun. 34, 1307–1314.

Hadi, G., Pinter, J., Marton, C., 2013. The first 30 years of hybrid maize in Hungary, u: 60 Years of Hungarian Hybrid Maize. Budapest, Hungary, str. 112–116.

Hallauer, A.R., Carena, M.J., Filho, J.B.M., 2010. Quantitative Genetics in Maize Breeding.

Hartfield, M., Bataillon, T., 2018. Selective sweeps under dominance and inbreeding. bioRxiv 10, 1063–1075.

Hartfield, M., Glémin, S., 2016. Limits to adaptation in partially selfing species. Genetics 203, 959–974.

Hölker, A.C., Mayer, M., Presterl, T., Bolduan, T., Bauer, E., Ordas, B., Brauner, P.C., Ouzunova, M., Melchinger, A.E., Schön, C.C., 2019. European maize landraces made accessible for plant breeding and genome-based studies. Theor. Appl. Genet. 132, 3333–3345.

Ignjatović-Micić, D., Ristić, D., Babić, V., Andjelković, V., Marković, K., Vančetović, J., 2013. Genetic assessment of maize landraces from former Yugoslavia. Genetika 45, 405–417.

Jonasson, O., 1926. Agricultural Regions of Europe, u: Economic Geography. Clark University, str. 19–48.

Kinsella, R.J., Kähäri, A., Haider, S., Zamora, J., Proctor, G., Spudich, G., Almeida-King, J., Staines, D., Derwent, P., Kerhornou, A., Kersey, P., Flicek, P., 2011. Ensembl BioMarts: A hub for data retrieval across taxonomic space. Database 2011, 1–9.

Kozumplik, V., Martinić-Jerčić, Z., 2000. Breeding field crops and vegetables in Croatia. Agric. Conspec. Sci. 65, 129–141.

Lee, E.A., Tracy, W.F., 2009. Modern maize breeding, u: Bennetzen, J., Hake, S. (Ur.), Handbook of Maize: Genetics and Genomics. Springer Science+Business Media, LLC, str. 151–160.

Leff, B., Ramankutty, N., Foley, J.A., 2004. Geographic distribution of major crops across the world. Global Biogeochem. Cycles 18.

Leng, E.R., Tavčar, A., Trifunovič, V., 1962. Maize of southeastern Europe and its potential value in breeding programs elsewhere. Euphytica 11, 263–272.

Li, Y.L., Liu, J.X., 2018. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. Mol. Ecol. Resour.

Lu, H., Bernardo, R., 2001. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. Theor. Appl. Genet. 103, 613–617.

Malomane, D.K., Reimer, C., Weigend, S., Weigend, A., Sharifi, A.R., Simianer, H., 2018. Efficiency of different strategies to mitigate ascertainment bias when using SNP panels in diversity studies. BMC Genomics 19, 22.

McConnell, Richard, L., 1983. An application requesting a certificate of protection for an alleged novel variety (PH 207).

Mi, H., Muruganujan, A., Thomas, P.D., 2013. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. Nucleic Acids Res. 41, 377–386.

Mir, C., Zerjal, T., Combes, V., Dumas, F., Madur, D., Bedoya, C., Dreisigacker, S., Franco, J., Grudloyma, P., Hao, P.X., Hearne, S., Jampatong, C., Laloë, D., Muthamia, Z., Nguyen, T., Prasanna, B.M., Taba, S., Xie, C.X., Yunus, M., Zhang, S., Warburton, M.L., Charcosset, A., 2013. Out of America: Tracing the genetic footprints of the global diffusion of maize. Theor. Appl. Genet. 126, 2671–2682.

Nielsen, R., Williamson, S., Kim, Y., Hubisz, M.J., Clark, A.G., Bustamante, C., 2005. Genomic scans for selective sweeps using SNP data. Genome Res. 15, 1566–1575.

Ortiz, R., Taba, S., Chávez Tovar, V.H., Mezzalama, M., Xu, Y., Yan, J., Crouch, J.H., 2010. Conserving and enhancing maize genetic resources as global public goods-A perspective from CIMMYT. Crop Sci. 50, 13–28.

Pavlidis, P., Živković, D., Stamatakis, A., Alachiotis, N., 2013. SweeD: Likelihood-based detection of selective sweeps in thousands of genomes. Mol. Biol. Evol. 30, 2224–2234.

Puechmaille, S.J., 2016. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. Mol. Ecol. Resour. 16, 608–627.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am. J. Hum. Genet. 81, 559–75.

Rebourg, C., Chastanet, M., Gouesnard, B., Welcker, C., Dubreuil, P., Charcosset, A., 2003. Maize introduction into Europe: The history reviewed in the light of molecular data. Theor. Appl. Genet. 106, 895–903.

Reif, J.C., Hamrit, S., Heckenberger, M., Schipprack, W., Maurer, H.P., Bohn, M., Melchinger, A.E., 2005. Trends in genetic diversity among European maize cultivars and their parental components during the past 50 years. Theor. Appl. Genet. 111, 838–845.

Republic of Serbia, 2020. Statistical Office of the Republic of Serbia, Official Gazette.

Rodgers-Melnick, E., Bradbury, P.J., Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Acharya, C.B., Mitchell, S.E., Li, C., Li, Y., Buckler, E.S., 2015. Recombination in diverse maize is stable, predictable, and associated with genetic load. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 3823–3828.

Rojc, M., Parlov, D., Stastny, K., Kozić, Z., Vragolović, A., 1983. Dostignuća u selekciji linija i hibrida kukuruza u SR Hrvatskoj - in Croatian. Agron. Glas. 45, 541–556.

Romero Navarro, J.A., Willcox, M., Burgueño, J., Romay, C., Swarts, K., Trachsel, S., Preciado, E., Terron, A., Delgado, H.V., Vidal, V., Ortega, A., Banda, A.E., Montiel, N.O.G., Ortiz-Monasterio, I., Vicente, F.S., Espinoza, A.G., Atlin, G., Wenzl, P., Hearne, S., Buckler, E.S., 2017. A study of allelic diversity underlying flowering-time adaptation in maize landraces. Nat. Genet. 49, 476–480.

Sood, S., Flint-Garcia, S., Willcox, M.C., Holland, J.B., 2014. Mining natural variation for maize improvement: Selection on phenotypes and genes, u: Tuberosa, R., Graner, A., Frison, E. (Ur.), Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, Sequencing and Mining Genetic Resources. Springer Netherlands, str. 615–649.

Şuteu, D., Băcilă, I., Haş, V., Haş, I., Miclăuş, M., 2013. Romanian maize (Zea mays) inbred lines as a source of genetic diversity in SE Europe, and their potential in future breeding efforts. PLoS One 8, 1–13.

Tavčar, A., 1955. Methods of hybrid maize production in Yugoslavia (in Croatian). Agron. Glas. 5, 225–237.

Tenaillon, M.I., Charcosset, A., 2011. A European perspective on maize history. Comptes Rendus - Biol. 334, 221–228.

Unterseer, S., Pophaly, S.D., Peis, R., Westermeier, P., Mayer, M., Seidel, M.A., Haberer, G., Mayer, K.F.X., Ordas, B., Pausch, H., Tellier, A., Bauer, E., Schön, C.C., 2016. A comprehensive study of the genomic differentiation between temperate Dent and Flint maize. Genome Biol.

USDA, 2020. United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service, National Agricultural Statistics Service.

Wegary, D., Teklewold, A., Prasanna, B.M., Ertiro, B.T., Alachiotis, N., Negera, D., Awas, G., Abakemal, D., Ogugo, V., Gowda, M., Semagn, K., 2019. Molecular diversity and selective sweeps in maize inbred lines adapted to African highlands. Sci. Rep. 9, 1–15.

White, M.R., Mikel, M.A., de Leon, N., Kaeppler, S.M., 2020. Diversity and heterotic patterns in North American proprietary dent maize germplasm. Crop Sci. 60, 100–114.

3.12. Genetska raznolikost europske germplazme soje

ZOE ANDRIJANIĆ, NELSON NAZZICARI, HRVOJE ŠARČEVIĆ,
MAJA ŽULJ MIHALJEVIĆ, ALEKSANDRA SUDARIĆ, IVAN PEJIĆ

3.12.1. ZNAČAJ SOJE U SVIJETU I HRVATSKOJ

Soja (*Glycine max* (L.) Merill) je zeljasta biljka iz porodice Fabaceae (ex Leguminosae) (mahunarke ili lepirnjače), a kao ratarska kultura uzgaja se više od četiri tisuće godina. Podrijetlom je iz Kine, odakle se postupno proširila na druge kontinente, a danas predstavlja jednu od najvažnijih bjelančevinastih i uljnih kultura u svijetu (Miladinović i sur., 2008.). Značaj soje proizlazi iz kakvoće njenog zrna koje sadrži 35 – 50 % visokovrijednih bjelančevina te 18 – 24 % ulja, ovisno o kultivaru i uvjetima uzgoja (Vratarić i Sudarić, 2008.). Soja se može koristiti kao ljudska hrana, stočna hrana te sirovina u prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Osim što je poželjna u prehrambenoj industriji, soja je vrlo poželjna i u plodoredu, zbog izuzetne sposobnosti što korijen soje ulazi u simbiozu s kvržičnim bakterijama i tako obogaćuje tlo atmosferskim dušikom. U Hrvatskoj se zrno soje najčešće koristi u industriji stočne hrane kao sojina sačma i brašno namijenjeno sastavljanju krmnih smjesa, a manje u ljudskoj prehrani.

Budući da je većina soje uvezena u Europsku uniju, posebno iz Sjeverne i Južne Amerike, proizvedena s genetski modificiranim (GM) kultivarima i što su europski potrošači nepovjerljivi prema toj tehnologiji te uzimajući u obzir to što postoji rastući interes za lokalne proizvode, trgovački lanci i druge relevantne institucije podržavaju održive sustave u proizvodnji ne-GM soje (EK, 2018). U Europi postoje brojni programi oplemenjivanja soje usmjereni na razvoj elitnih ne-GM kultivara za brzo rastuće tržište GM-free proteina za stočnu hranu.

Soja se na prostoru današnje Republike Hrvatske pojavljuje početkom 20. stoljeća, no ozbiljnijeg uzgoja nema sve do 1988. kada površine pod sojom dosežu 34.177 ha (Vratarić i Sudarić, 2008.). Od 2000. godine, kada ukupne površine zauzimaju 47.487 ha, uzgoj soje ima stalnu tendenciju porasta. Danas je soja treća kultura po zasijanim površinama u Republici Hrvatskoj i uzgaja se na otprilike 90.000 ha s godišnjom proizvodnjom zrna od 320.000 t (DZS, 2020). U Republici Hrvatskoj proizvodnja genetski modificirane soje nije dozvoljena (NN 126/2019) te zbog navedenog ne-GM soja može imati perspektivu na tržištima koja isključuju uporabu GM organizama. U Hrvatskoj je razvijen oplemenjivački rad s ciljem dobivanja kultivara koji su dobro prilagođeni uzgojnim uvjetima sjeverozapadne i istočne Hrvatske. Poljoprivredni institut u Osijeku i Agronomski fakultet u Zagrebu sustavno provode oplemenjivačke programe koji su rezultirali velikim brojem priznatih kultivara, koji danas čine glavninu sortimenta soje u Hrvatskoj.

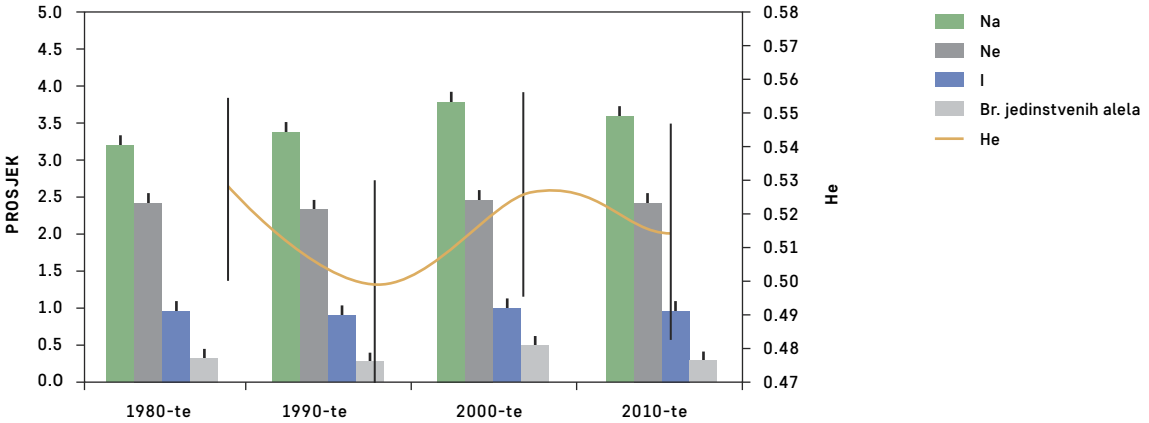
3.12.2. GENETSKA RAZNOLIKOST EUROPSKOG SORTIMENTA

Kina je primarni genski centar soje, s mnogim azijskim zemljama kao sekundarnim genskim centrima. Iako je soja raširena u azijskim zemljama prije dvije do tri tisuće godina, na Zapadu nije bila poznata sve do 18. stoljeća (Hymowitz, 2008.). Veća alelna raznolikost pronađena je u divljoj soji nego u kultiviranoj (Kuroda i sur., 2009.). Kako bi se bolje iskoristila postojeća genetska raznolikost soje, nužna je suradnja između kolekcija i programa oplemenjivanja u javnom i privatnom sektoru (Carter i sur., 2016.). Zbog male varijabilnosti morfoloških deskriptora i uglavnom nepoznatih pedigrea, odabir divergentnih roditelja za križanja veliki je izazov, kao i razlikovanje kultivara te zaštita oplemenjivačkih prava brzo rastućeg broja novih kultivara. Za učinkovito proširenje genetske osnove modernih kultivara soje potreban je detaljan uvid u genetsku raznolikost germplazme soje, a to se može postići molekularnom karakterizacijom pomoću DNA biljega, koji su informativniji, stabilniji i pouzdaniji u usporedbi s analizom pedigrea i tradicionalno korištenim morfološkim biljezima (Jamali i sur., 2019.).

Iako je uzgoj soje u Europi započeo relativno kasno, malo je pouzdanih informacija o podrijetlu ili pedigreu soje unesene u Europu. Obično se smatra da genetska pozadina soje koja rano dozrijeva, uglavnom potječe iz Sjeverne Amerike. Međutim, postoje neki srednjoeuropski oplemenjivački programi koji se provode više od 30 godina i uključuju azijsku germplazmu, kao što je program oplemenjivanja u Švicarskoj (Rotzler i sur., 2009.). S druge strane, većina oplemenjivačkih materijala i registriranih kultivara soje iz jugoistočne Europe, uključujući i Hrvatsku, usko je povezana s oplemenjivačkim programima SAD-a i Kanade (Vratarić i Sudarić, 2008.; Hahn i Würschum, 2014.; Miladinović i sur., 2018.). Općenito, uspjeh oplemenjivanja bilja ovisi o kontinuiranom proširenju genetske osnove koja ima presudnu ulogu u prilagodbi usjeva na nove uvjete okoliša. To postaje još važnije u kontekstu oštrih klimatskih promjena i povezanih biotskih i abiotskih čimbenika stresa, budući da šira genetska osnova osigurava rezervoar gena za tolerantntnost/otpornost na različite okolišne stresove. Novi kultivari obično proizlaze iz stroge selekcije na najvažnija svojstva i potječu od manjeg broja elitnih kultivara, što utječe na smanjenu genetsku raznolikost sortimenta i povećava njegovu ranjivost na stresove (Bhanu, 2017.). Razvojem tehnologije DNA biljega znatno je olakšano utvrđivanje podrijetla i genetskih odnosa unutar germplazme soje, međutim, kako soja još uvijek igra manju ulogu u europskoj poljoprivredi, samo je nekoliko objavljenih studija koje analiziraju genetsku raznolikost europske germplazme soje (Ristova i sur., 2010.; Hahn i Würschum, 2014.; Miladinović i sur., 2018.; Žulj Mihaljević i sur., 2020.; Saleem i sur., 2021.).

3.12.3. OČUVANJE RAZNOLIKOSTI U OPLEMENJIVAČKIM PROGRAMIMA HRVATSKE

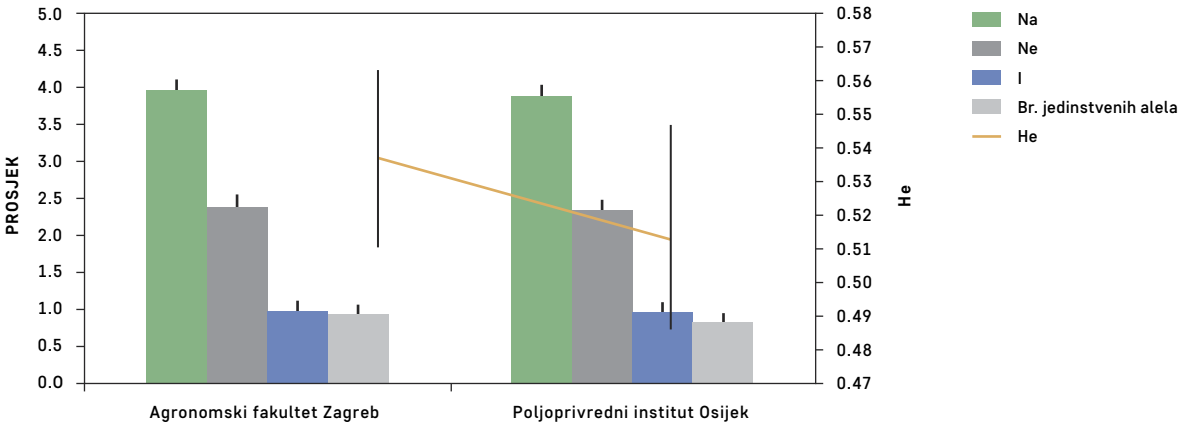
Kako bismo razumjeli povijesne genetske obrasce hrvatske germplazme soje, pomoću SSR biljega procijenjena je genetska raznolikost hrvatskih kultivara i oplemenjivačkih linija soje razvijenih na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (AFZ) i Poljoprivrednom institutu Osijek (PIO) tijekom četiri desetljeća, između 1980. i 2019. godine. Analizom su obuhvaćena 52 genotipa soje, od kojih je devet registrirano u 1980-ima, 15 u 1990-ima te 14 u 2000-ima i 2010-ima. Isti materijal svrstan je u dvije skupine koje predstavljaju oplemenjivačke programe: AFZ (23 genotipa) i PIO (29 genotipova). Materijal je za potrebe istraživanja prikupljen isključivo od oplemenjivača i pouzdanih oplemenjivačkih zbirki te je analiziran na 42 mikrosatelitna lokusa ravnomjeno raspoređena po genomu kako je opisano u radu Žulj Mihaljević i sur. (2020.). Korištenjem softvera GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse, 2012) izračunat je prosječan broj alela po lokusu (Na), broj efektivnih alela (Ne), ukupni broj alela, Shannonov informacijski indeks (I), broj jedinstvenih alela, genska raznolikost ili očekivana heterozigotnost (He) i genetske udaljenost po Neiu (GD) (Nei, 1973.) te je provedena analiza



SLIKA 3.11. PROSJEČAN BROJ ALELA PO LOKUSU (NA), PROSJEČAN BROJ EFEKTIVNIH ALELA (NE), PROSJEČAN SHANNONOV INFORMACIJSKI INDEKS (I), PROSJEČAN BROJ JEDINSTVENIH ALELA, TE PROSJEČNA OČEKIVANA HETEROZIGOTNOST (HE) ZA HRVATSKE KULTIVARE SOJE RAZVIJENE U ČETIRI DESETLJEĆA.

molekularne varijance (AMOVA) radi procjene genetske varijabilnosti između i unutar skupina. Prosječan je broj alela po lokusu iznosio 3,17, 3,36, 3,74 i 3,55 za genotipove iz 1980-ih, 1990-ih, 2000-ih i 2010-ih, dok je ukupan broj jedinstvenih alela za ista četiri desetljeća iznosio 13, 11, 20, i 12, odnosno u prosjeku 0,31, 0,26, 0,48 i 0,29. Shannonov informacijski indeks, kao i očekivana heterozigotnost bili su najveći u 2000-ima, a najniže u 1990-ima (Slika 3.11.). Ukupni broj alela također je bio najveći u 2000-ima (118), a najmanji u 1990-ima (109). Prosječna se genetska udaljenost između genotipova unutar desetljeća kretala od 0,49 u 1990-ima do 0,53 u 1980-ima, ali uočene razlike nisu bile statistički značajne.

Prosječan je broj alela po lokusu iznosio 4,09 za genotipove razvijene na AFZ i 4,00 za genotipove s PIO (Slika 3.12.). Ukupan je broj jedinstvenih alela



SLIKA 3.12. PROSJEČAN BROJ ALELA PO LOKUSU (NA), PROSJEČAN BROJ EFEKTIVNIH ALELA (NE), PROSJEČAN SHANNONOV INFORMACIJSKI INDEKS (I), PROSJEČAN BROJ JEDINSTVENIH ALELA, TE PROSJEČNA OČEKIVANA HETEROZIGOTNOST (HE) ZA HRVATSKE KULTIVARE SOJE RAZVIJENE NA AGRONOMSKOM FAKULTETU ZAGREB I POLJOPRIVREDNOM INSTITUTU OSIJEK.

za navedene oplemenjivačke kuće iznosio 40, odnosno 36, u prosjeku po lokusu 0,95 i 0,86. Shannonov informacijski indeks i očekivana heterozigotnost također su bili veći na AFZ nego na PIO (1,01 i 0,54 odnosno 0,97 i 0,51).

Oplemenjivački je program AFZ pokazao neznatno veći ukupni broj alela (162) od programa PIO (156). Prosječna je genetska udaljenost između kultivara unutar oplemenjivačkih programa bila značajno veća za AFZ (0,538) nego za PIO (0,512), vjerojatno zbog postojanja tri neovisna oplemenjivačka podprograma unutar AFZ-a. AMOVA je pokazala da varijabilnosti između desetljeća sudjeluje s 1 % a varijabilnost, a između dva oplemenjivačka programa sa 6 % u ukupnoj genetskoj varijabilnosti.

Ukupni rezultati pokazuju da se genetska varijabilnost hrvatske germplazme soje nije smanjila u proteklih 40 godina.

3.12.4. ANALIZA RAZNOLIKOSTI EUROPSKE GERMPLAZME SOJE POMOĆU MIKROSATELITNIH BILJEGA (SSR)

Kako bi se procijenile genetske raznolikosti i genetske strukture europske komercijalne germplazme te sama moć identifikacije genotipa, u istraživanju Žulj Mihaljević i sur. (2020.) provedena je karakterizacija 97 komercijalnih kultivara i oplemenjivačkih linija soje. Svi obuhvaćeni genotipovi uzgajaju se u Europi, a većina ih je razvijena u raznim istraživačkim i oplemenjivačkim institucijama u Europi (86), dok ih je 11 introducirano iz Sjeverne i Južne Amerike. Za genotipizaciju korištena su 42 mikrosatelitna biljega prema odabiru i protokolu navedenom u Žulj Mihaljević i sur. (2020.).

Skup od 27 najpolimorfnijih biljega pokazao se dovoljan za razlikovanje svih 97 genotipova. Genetski odnos među proučavanim genotipovima vizualiziran je UPGMA dendrogramom koji je 96 genotipova razdvojio u dva glavna klastera koji se sastoje od 50, odnosno 46 genotipova. Veći klaster s 50 genotipova uglavnom je bio sastavljen od kultivara podrijetlom iz talijanskih oplemenjivačkih programa, a uključivao je i sve kultivare introducirane iz SAD-a i Argentine. Ovaj je klaster dalje bio podijeljen u tri podklastera. Prvi je podklaster uključivao 21 talijanski kultivar i pet ostalih, koje potječu iz zapadno-europskih oplemenjivačkih programa. Drugi podklaster obuhvaćao je četiri kultivara iz jugoistočne Europe i tri sjevernoameričke introdukcije. Treći podklaster uključivao je većinom talijanske kultivare, zajedno s nekoliko novijih hrvatskih oplemenjivačkih linija. Drugi je veliki klaster (46 genotipova) obuhvaćao dva veća podklastera, od kojih jedan s pretežno hrvatskim kultivara, a drugi sa kultivarma proizašlim iz oplemenjivačkih programa Rumunjske, Francuske i Švicarske. Lissabon, kultivar koji potječe iz jednog kanadskog oplemenjivačkog programa, izdvojila se kao genetski najudaljenija. Klasterska je analiza pokazala da je uska genetska baza europske germplazme raspoređena u dvije velike skupine sa srednje jakom korelacijom s njezinim geografskim podrijetlom.

Genetska struktura europske germplazme procijenjena na temelju Bayesanovkog modela pokazala je postojanje dvije podskupine. Talijanska germplazma formirala je jasnu skupinu s 85 % kultivara s populacijom predaka podskupine 1. Pokazalo se da Hrvatska germplazma potječe uglavnom iz populacije predaka iz skupine 2 sa samo ~20 % miješanog podrijetla, dok francuska germplazma potječe ili iz populacije predaka 1 ili 2, ili je pak bila miješanog podrijetla. Rumunjski su kultivari uglavnom imali podrijetlo u populaciji 1, dok je ostatak potjecao iz populacije 2 ili je bio miješanog podrijetla. Srpska germplazma također je bila prilično raznolika s dijelom kultivara podrijetlom iz populacije predaka 2, a dijelom iz populacije predaka 1. Švicarska germplazma, iako zastupljena sa samo 4 kultivara, pokazala je svoje podrijetlo uglavnom iz populacije predaka 2. Žulj Mihaljević i sur. (2020.) ističu da za točne usporedbe razine genetske raznolikosti germplazme, procijenjene pomoću SSR-a, između različitih studija treba uzeti u obzir podrijetlo SSR lokusa u smislu njihove lokacije na genomu, te veličinu uzorka (broj analiziranih genotipova). SSR biljezi koje je istraživačka zajednica koristila za karakterizaciju tijekom

godina bili su uglavnom različiti, a ne standardizirani. Iako su se kriteriji za odabir lokusa temeljili na njihovoj visokoj genskoj raznolikosti (He), ne očekuje se da isti biljezi budu jednako informativni kada se primjenjuju na različite germplazme. Npr., šest SSR biljega preporučenih od Song i sur. (1999.) za identifikaciju kultivara sjevernoameričke germplazme, pokazali su znatno veći broj alela (Na) i više He vrijednosti (npr. za lokus Satt009 Na = 16 i He = 0,82) nego u studiji Žulj Mihaljević i sur. (2020.) (Na = 8 i He = 0,63). Unatoč podjednakom broju genotipova analiziranih u navedenim studijama (101 kod Song i sur., 1999. i 97 kod Žulj Mihaljević i sur., 2020.) znatno manje detektiranih alela i manja genska raznolikost, te dvostruko više biljega potrebnih za međusobno razlikovanje europskih kultivara soje, u usporedbi sa sjevernoameričkom germplazmom, ukazali su na mnogo nižu genetsku raznolikost europske germplazme. S druge strane, informativnost pet SSR biljega zajedničkih studiji Priollija i sur. (2002.), koji su analizirali 186 brazilskih elitnih kultivara, te 97 europskih kultivara analiziranih u Žulj Mihaljević i sur., (2020.) bila je slična. Obje studije pokazale su sličan prosječni broj alela po lokusu, kao i prosječnu gensku raznolikost na svim SSR lokusima (Na=5,98; He = 0,63 naspram Na = 5,3; He = 0,64). Međutim, dvostruko veći broj genotipova u brazilskoj studiji sugerira postojanje veće genetske raznolikosti unutar komercijalne europske nego brazilske germplazme. Kada se uzme u obzir raznolikost 131 genotipa iz 14 azijskih zemalja (Abe i sur., 2003) otkrivajući 11,9 alela po lokusu, 129 (Wang i sur., 2006.) i 159 (Li i sur., 2011.) kineskih kultivara koji su pokazali 12,2 i 14,2 alela po lokusu, kao i 205 kineskih i 39 japanskih genotipova (Guan i sur., 2010.), koji su pokazali 16,2 alela po lokusu, jasno je da je samo dio dostupne genetske raznolikosti prisutan u komercijalnoj europskoj germplazmi. Provedena genetska karakterizacija dala je uvid u genetsku strukturu germplazme europske soje te može poslužiti kao polazište za buduće oplemenjivačke odluke. Objavljeni SSR podaci analizirane komercijalne europske germplazme mogu poslužiti za potrebe identifikacije kultivara te kao temelj za javnu bazu podataka kultivara soje (Žulj Mihaljević i sur., 2020).

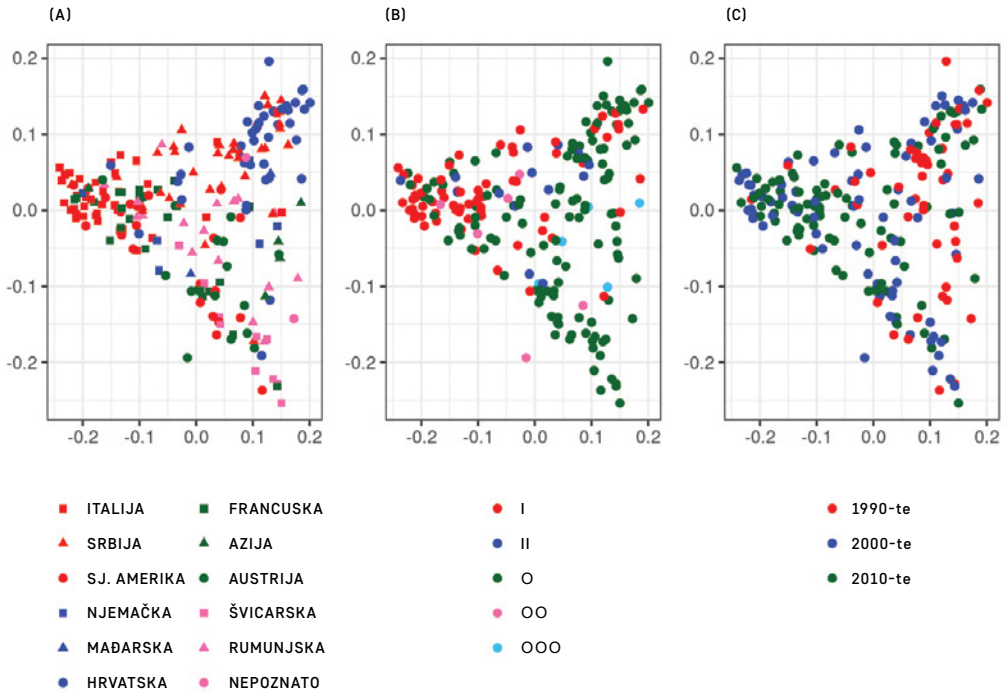
3.12.5. ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI I POPULACIJSKE STRUKTURE EUROPSKOG SORTIMENTA SOJE POMOĆU JEDNONUKLEOTIDNOG POLIMORFIZMA (SNP)

U provedenom istraživanju unutar Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, analizirana je kolekcija od 221 genotipa soje korištenjem SoySNP50K i Select Bead čipa-a, koji sadrži 50.000 SNP biljega. S ciljem dobivanja informacija o raznolikosti i strukturi populacije primijenjeno je nekoliko komplementarnih pristupa: analiza glavnih komponenti (PCA) i analiza glavnih koordinata (PCoA), Bayesovske analiza strukture genetskih skupina pomoću programa *STRUCTURE*, UPGMA klasterska analiza, AMOVA, Wrightova F statistika te računanje genetske udaljenost prema Neiu (GD). *STRUCTURE*, klasterska i PCA analize imale su slične obrasce grupiranja što ukazuje da analizirana germplazma uglavnom pripada dvjema subpopulacijama. Korištenjem PCA analize otkrivena je blaga populacijska struktura u proučavanoj kolekciji germplazme soje, s udjelom genetske varijabilnosti objašnjen s prve tri glavne komponente u iznosu od 26 %. Prve su tri glavne komponente vizualno razlikovale kultivare prema zemlji podrijetla, grupi zriobe i godinama priznavanja kultivara. S obzirom na zemlju podrijetla, talijanski su se kultivari jasno izdvojile u jednu podskupinu, dok se druga podskupina sastojala od dvije podskupine; jedna je uključivala uglavnom hrvatske kultivare, a druga austrijske, švicarske i rumunjske. Štoviše, PCA je otkrio jasnu razliku između skupina zriobe I i 0. Konačno, uzorak razdvajanja prema godini priznavanja kultivara pokazao je da su najstariji kultivari najviše raspršeni, dok su najmlađi bili najkoncentriranije, što ukazuje na smanjenje genetske raznolikosti kod novijih kultivara. PCoA analiza (Slika 3.13.) dala je sličnu sliku kao PCA podijelivši kolekciju germplazme u dvije

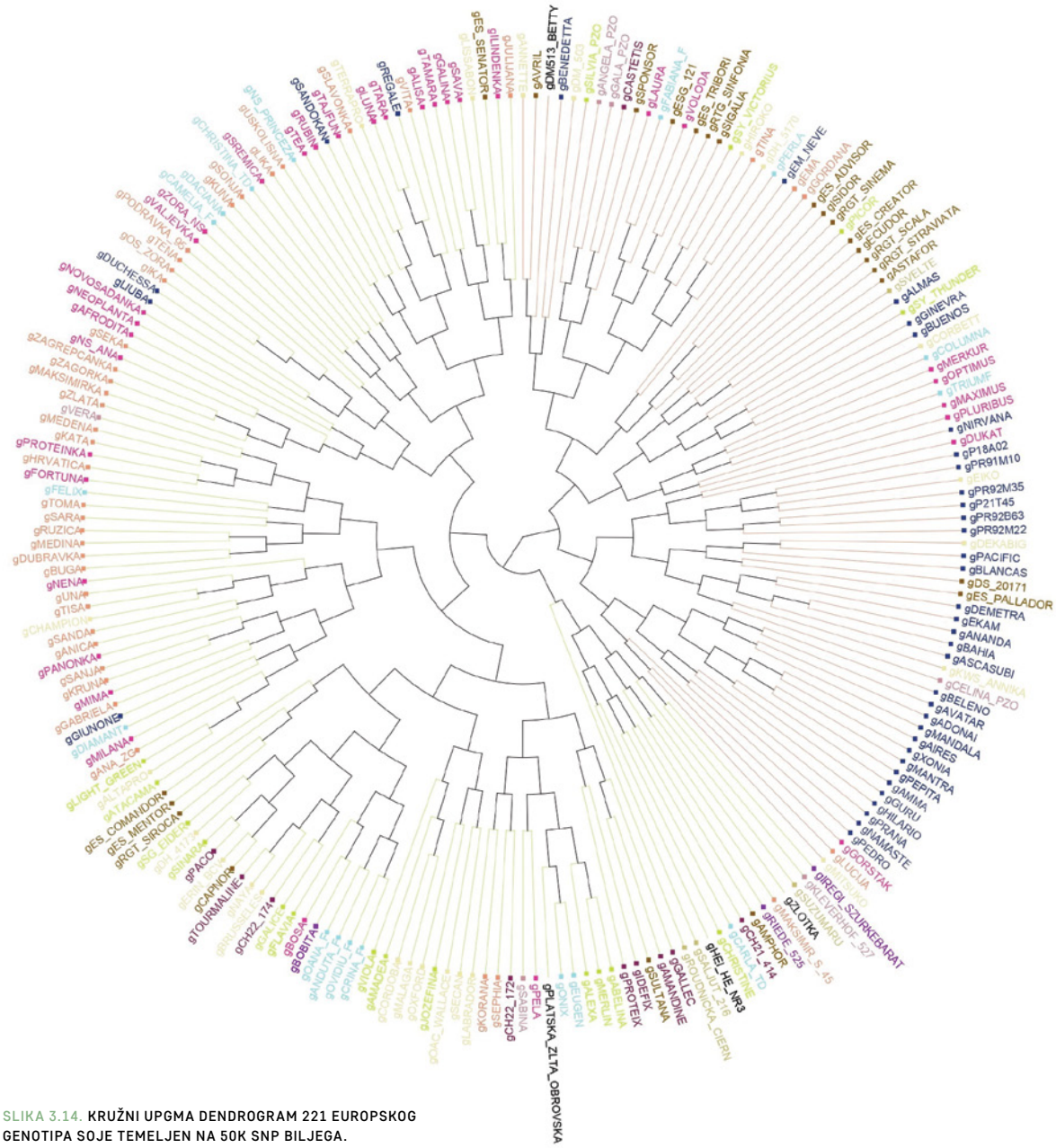
podskupine od 134, odnosno 84 kultivara. Prema podrijetlu, većina hrvatskih (36/40), švicarskih (9/10) i rumunjskih kultivara (13/17) okupljena je u jednu podskupinu. Drugu podskupinu činile su uglavnom talijanski (33/38) i francuski (16/23) kultivari, dok su kultivari iz ostalih zemalja bile zastupljene u obje podskupine. U odnosu na skupine zriobe, rani kultivari MG0 (95/121) očekivano su grupirani s vrlo ranim kultivarima MG000. U drugoj podskupini izdvojen je MGI, dok su ostale skupine zriobe bile otprilike ravnomjerno raspoređene u obje podskupine.

Genetska struktura procijenjena na temelju Bayesovskog modela kao i klasterske UPGMA analize (Slika 3.14.) također je pokazala postojanje dvije skupine. Klaster 1 (n = 88) se u dendrogramu uglavnom sastoji od talijanskih (33), francuskih (16) te srpskih kultvara (11) i introdukcija iz Sjeverne Amerike (11), dok u drugom klasteru prevladavaju kultivari s prostora jugoistočne Europe. Slično tome, hijerarhijska klaster analiza razdvojila je kultivare grupe zriobe I od grupe zriobe 0. S obzirom na godine priznavanja, najstariji kultivari iz 1990-ih objedinjene su unutar klastera 2.

S obzirom na zemlju podrijetla, Wrightova F statistika pokazala je veću diferencijaciju između kultivara nego na godinu priznavanja i grupu zriobe. Najviše su se izdvojili genotipovi iz švicarskih oplemenjivačkih programa s Fst vrijednostima od 0,15 do 0,25. Uzrok tome najvjerojatnije leži u činjenici što su švicarske oplemenjivačke kuće koristile azijske genotipove kao roditelje u križanjima (Rotzler i sur., 2009.). Hrvatski su se kultivari najviše razlikovali od švicarskih (Fst = 0,205), zatim od francuskih (Fst = 0,141), dok su bile najsličniji s kultivarima introduciranim iz Sjeverne Amerike (Fst = 0,111) i Austrije



SLIKA 3.13. REZULTATI PCoA ANALIZE 221 EUROPSKA GENOTIPA SOJE S OBZIROM NA (A) ZEMLJU PODRIJETLA, (B) GRUPU ZRIOBE 000 DO I I (C) DEKADU PRIZNAVANJA KULTIVARA.



SLIKA 3.14. KRUŽNI UPGMA DENDROGRAM 221 EUROPSKOG GENOTIPA SOJE TEMELJEN NA 50K SNP BILJEGA.

(Fst = 0,104). Vrijednosti Fst-a između grupa zriobe, kao i one između godina priznavanja, bile su relativno niske (<0,05), što je sukladno nekim drugim studijama koje su također pokazale male razlike između grupa zriobe (Bandillo i sur., 2015.; Žulj Mihaljević i sur., 2020.).

AMOVA je pokazala da u ukupnoj genetskoj varijabilnosti varijabilnost između zemalja podrijetla sudjeluje s 9,13 %, varijabilnost između grupa zriobe s 3,49 %, dok varijabilnost između godina priznavanja kultivara sudjeluje sa samo 1,66 % u ukupnoj genetskoj varijabilnosti. Najveća prosječna genetska

udaljenost (GD) otkrivena je unutar sjevernoameričke skupine (0,41), zatim kultivara iz Austrije (0,40) i Rumunjske (0,38), a najmanja unutar hrvatskog (0,34) i švicarskog (0,31) sortimenta.

3.12.6. ZAKLJUČAK

Proširenje genetske osnove soje ključno je za osiguranje budućeg napretka u oplemenjivanju. Europski oplemenjivački programi soje još su uvijek relativno mladi u usporedbi s azijskom i američkom tradicijom uzgoja i oplemenjivanja, a genetske karakterizacije europske germplazme mogu dati korisne smjernice za dizajniranje budućih programa oplemenjivanja soje. Analiza populacijske strukture i genetske povezanosti (Žulj Mihaljević i sur., 2020.) otkrila je da genetska osnova srednjoeuropske germplazme soje nije tako uska kao što bi se moglo očekivati. Osim vrlo ranih sjevernoameričkih kultivara introrduciranih u Europu, posebno je zanimljiva germplazma iz Švicarske (Hahn i Würschum, 2014.; Žulj Mihaljević i sur., 2020.) koja se kao i većina europskog sortimenta temelji na sjevernoameričkoj germplazmi, ali uključuje i azijsku komponentu ostvarenu korištenjem japanskih linija u križanjima (Ristova i sur., 2010.; Hahn i Würschum, 2014.). Introgresija alela iz neeuropske germplazme također je potrebna za daljnje proširenje genetske raznolikosti i poboljšanje željenih svojstava u europskoj germplazmi. Slijedom primjera Švicarske to se može postići križanjem europskih linija s azijskim ili sjevernoameričkim linijama, a naročito se odnosi na hrvatske oplemenjivačke programe, jer su dosadašnja istraživanja pokazala njihovu malu genetsku raznolikost.

LITERATURA

Abe, J., Xu, D.H., Suzuki, Y., Kanazawa, A., Shimamoto, Y., 2003. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. Theor. Appl. Genet. 106, 445–453.

Bandillo, N., Jarquin, D., Song, Q., Nelson, R., Cregan, P., Specht, J., Lorenz, A., 2015. A Population Structure and Genome-Wide Association Analysis on the USDA Soybean Germplasm Collection. Plant Genome 8.

Bhanu, A.N., 2017. Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants - An Overview. Adv. Plants Agric. Res. 7.

Carter, T.E., Nelson, R.L., Sneller, C.H., Cui, Z., 2016. Genetic Diversity in Soybean, u: Soybeans: Improvement, Production, and Uses. John Wiley & Sons, Ltd, str. 303–416.

Guan, R., Chang, R., Li, Y., Wang, L., Liu, Z., Qiu, L., 2010. Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. Genet. Resour. Crop Evol. 57, 229–242.

Hahn, V., Würschum, T., 2014. Molecular genetic characterization of Central European soybean breeding germplasm. Plant Breed. 133, 748–755.

Hymowitz, T., 2008. The History of the Soybean. Soybeans Chem. Prod. Process. Util. 1–31.

Jamali, S.H., Cockram, J., Hickey, L.T., 2019. Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. Theor. Appl. Genet. 132, 1911–1929.

Kuroda, Y., Tomooka, N., Kaga, A., Wanigadeva, S.M.S.W., Vaughan, D.A., 2009. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [*G. max* (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection. Genet. Resour. Crop Evol. 56, 1045–1055.

Li, Y.H., Smulders, M.J.M., Chang, R.Z., Qiu, L.J., 2011. Genetic diversity and association mapping in a collection of selected Chinese soybean accessions based on SSR marker analysis. Conserv. Genet. 12, 1145–1157.

Miladinović, J., Ćeran, M., Đorđević, V., Balešević-Tubić, S., Petrović, K., Đukić, V., Miladinović, D., 2018. Allelic variation and distribution of the major maturity genes in different soybean collections. Front. Plant Sci. 9, 1286.

Miladinović, J., Hrustić, M., Vidić, M., 2008. Soja, 1st Ed. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Sojaprotein, Bečej, Novi Sad.

Nei, M., 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3321–3323.

Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28, 2537–2539.

Priolli, R.H.G., Mendes-Junior, C.T., Arantes, N.E., Contel, E.P.B., 2002. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. 25, 185–193.

Ristova, D., Šarčević, H., Šimon, S., Mihajlov, L., Pejić, I., 2010. Genetic diversity in southeast european soybean germplasm revealed by SSR markers. Agric. Conspec. Sci. 75, 21–26.

Rotzler, D., Stamp, P., Betrix, C.-A., De Groote, J.-C., Moullet, O., Schori, A., 2009. Agronomic interest of lanceolate leaf in soybean. Agrarforschung 16, 472–477.

Saleem, A., Muylle, H., Aper, J., Ruttink, T., Wang, J., Yu, D., Roldán-Ruiz, I., 2021. A Genome-Wide Genetic Diversity Scan Reveals Multiple Signatures of Selection in a European Soybean Collection Compared to Chinese Collections of Wild and Cultivated Soybean Accessions. Front. Plant Sci. 12, 256.

Song, Q.J., Quigley, C. V., Nelson, R.L., Carter, T.E., Boerma, H.R., Strachan, J.L., Cregan, P.B., 1999. A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. Plant Var. Seeds 12, 207–220.

Vratarić, M., Sudarić, A., 2008. Soja - *Glycine max*. (L.) Merr., 2nd Ed. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek.

Wang, L., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R., Qiu, L., 2006. Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. Crop Sci. 46, 1032–1038.

Žulj Mihaljević, M., Šarčević, H., Lovrić, A., Andrijanić, Z., Sudarić, A., Jukić, G., Pejić, I., 2020. Genetic diversity of European commercial soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] germplasm revealed by SSR markers. Genet. Resour. Crop Evol. 67, 1587–1600.

3.13. Genetska raznolikost i srodstveni odnosi hrvatskih autohtonih kultivara vinove loze

MAJA ŽULJ MIHALJEVIĆ, IVAN PEJIĆ, EDI MALETIĆ I DARKO PREINER

3.13.1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je najrasprostranjenija voćna vrsta u svijetu koja svojom ukupnom proizvodnjom nadmašuje sve ostale (Maletić i sur., 2008.). Uzgaja se diljem svijeta, a čovjekov kulturni razvitak pratila je od njezine domestikacije u neolitičkom periodu, (8500 – 4000 god. pr.Kr.) (Arroyo-García i sur., 2006.). Pretpostavlja se da je kultivirana, tj. europska vinova loza (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*) udomaćena iz populacije divlje vinove loze (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) na Bliskom Istoku, od kuda se proširila po Europi, iako neka zadnja istraživanja sugeriraju da su se dva različita toka udomaćenja odvijala u istočnoj i zapadnoj Europi (Arroyo-García i sur., 2006.). Tijekom udomaćenja vršena je selekcija na svojstva bitna za njezin uzgoj i upotrebu; poput vigora, dvospolnih cvjetova, sadržaja šećera, veličine bobice i strukture grozda (Mullins i sur., 1992.). Iako je glavni izvor genetske varijabilnosti za nastanak novih kultivara (sorata) vinove loze spontana hibridizacija, njezino vegetativno razmnažanje utjecalo je na povećanu pojavu mutacija u somatskim stanicama i postalo je važno u nastajanju raznolikosti vinove loze (Maletić i sur., 2008.).

Kultivacija loze počela je tijekom neolitika, uzduž istočnih obala Crnog mora (Transkavkazija), ali arheološki nalazi sjemenki vinove loze sugeriraju da je loza u Europi bila rasprostranjena čak i ranije (Mullins i sur., 1992.). Lakoća vegetativnog razmnožavanja pogodovala je širenju mnogih kultivara u različite regije svijeta. Kao posljedica toga neki kultivari imaju i do 100 sinonima (isti kultivar ima različita imena), a također, susreću se i brojni homonimi (isto ime za različite kultivare) (Maletić i sur., 2008.). Sinonimija, homonimija i pogrešno nazivlje, značajan je problem u preko 130 kolekcija vinove loze diljem svijeta.

Rod *Vitis* raznolik je i obuhvaća 40 – 60 vrsta iz Azije, oko 25 iz Sjeverne Amerike i svega jednu vrstu iz Europe, plemenita vinova loza – *Vitis vinifera* L. Potonja je dominantna vrsta za uzgoj, dok se ostale vrste roda *Vitis* pretežno upotrebljavaju za oplemenjivanje podloga i stolnih kultivara, a u novije vrijeme i kao izvor gena u oplemenjivanju na otpornost, na ekonomski značajne gljivične bolesti. Procjenjuje se da postoji oko 6000 kultivara plemenite vinove loze (Alleweldt i Dettweiler-Münch, 1994.), od čega je u komercijalnoj upotrebi manje od 400 (This i sur., 2004.). Stoga je opstanak brojnih kultivara ugrožen, a većina kultivara *Vitis vinifera* L. danas se održava u kolekcijama germplazme.

3.13.2. NASTANAK I RAZVOJ SORTIMENTA VINOVE LOZE U HRVATSKOJ

Problem erozije hrvatskog sortimenta vinove loze prepoznat je prije dvadesetak godina kada se krenulo s nizom stručnih i znanstvenih projekata s ciljem zaštite i revitalizacije autohtonih kultivara. O važnosti i uspjehu autohtonih kultivara svjedoči sve veći interes i potražnja za njihovim vinima, a time i sve veći interes za kvalitetnim sadnim materijalom. Zbog važnosti vinove loze kao poljoprivredne kulture i kulturnog naslijeđa, bitno je razumjeti genetičke događaje koji su rezultirali nastankom i današnjom raspodjelom kultivara vinove loze. Novi kultivari nastaju spolnom reprodukcijom, a kod vinove se loze njihov genotip dalje održava vegetativnim razmnožavanjem, što znači da se u današnjem sortimentu, zahvaljujući tradicionalizmu, nalaze kultivari stari više stotina ili tisuća godina, udaljeni svega nekoliko generacija od divljeg pretka (Arroyo-García i sur., 2006.), uz bok modernih kultivara dobivenih oplemenjivanjem. Porijeklo mnogih kultivara još nije utvrđeno, pa je utvrđivanje njihove prošlosti, kao i potraga za direktnim precima, još uvijek otvoreno pitanje. Zatim se sortiment kroz stoljeća razvijao konstantnom introdukcijom i spontanim križanjima između introduciranih, udomaćenih, a moguće i divljih jedinki. Pretpostavlja se da je broj kultivara u Hrvatskoj varirao kroz godine, a koliko točno može se samo nagađati - jer do početka 19 stoljeća, kada započinje ampelografski rad na našem području, malo je povijesnih dokumenata na tu temu (Maletić i sur., 2008.).

U Hrvatskoj, na ove prostore, kulturne su forme (kultivari) vinove loze stigle prije više stotina godina s raznim narodima te se određeni dio te germplazme udomaćio ili križao i s lokalnim divljim, a možda i s kulturnim formama kroz generacije uzgoja sve do danas. Realno je da je dio sortimenta koji se tradicijski uzgajao ili se još uzgaja na prostoru današnje Hrvatske, nastao na ovim područjima, ali ne uvijek i isključivo iz lokalnih kultivara. Dio sortimenta stigao je u neka davnija vremena za koja ne postoje pisani tragovi. Ljudska preferencija, odnosno selekcija, koja ovisi o kojem se uzgojnom području radi, ima prilično važnu ulogu u razvoju sortimenta i ne bi se trebala sagledavati samo kroz današnje državne granice zemalja, već kroz širi povijesni kontekst regije, uzimajući u obzir tradicionalne trgovinske putove, migracije naroda i agro-ekološke uvjete. Mnogobrojni su mogući pristupi u definiranju autohtonosti pojedinog kultivara nastalog nakon (najčešće) spontanog križanja i dugotrajnog vegetativnog razmnožavanja praćenog širenjem u određenom prostoru. Primjerice, pod autohtone kultivare mogu se ubrojiti i stari, tradicionalni kultivari za koje su pronađeni strani sinonimi, ali njihovo strano porijeklo nije dokazano. Znanstveni pristup i dostupni moderni alati mogu barem donekle odmotati ovo klupko i dati odgovor je li nešto autohtono (nastalo u prostoru današnjeg uzgoja). Primjerice, definiranje pripadnosti kultivara nekom skupu gena unutar utvrđene genetske strukture neke populacije također pomaže u dokazivanju njegove autohtonosti.

Postoji li uopće jasno definiran skup gena vinove loze ovisno o zemljopisnom položaju, problem je na koji su istraživači pokušavali dati odgovor i dobivali različite rezultate. Za to je bilo potrebno analizirati što veći set kultivara koji obuhvaća većinu genetske raznolikosti vinove loze, stoga su ovakva istraživanja bila moguća jedino (većinom mikrosatelitskom) analizom najvećih svjetskih kolekcija. Sefc i sur. (2000., 2009.) izvješćuju o povezanosti hrvatskog i talijanskog skupa gena. Aradhya i sur. (2003.) te Zdunić i sur. (2013.) analizom su sjevernoameričkih kolekcija utvrdili strukturu koja prati klasičnu ekogeografsku podjelu kultivara (Negrul, 1938.). Cipriani i sur. (2010.) pak nisu mogli utvrditi postojanje genetske strukture s obzirom na zemljopisno porijeklo i/ili regiju trenutnog uzgoja, s napomenom da su polovicu neredundantnog seta činili talijanski kultivari. Kao rezultat naprednih srodstvenih SNP analiza, Myles i sur. (2011.) tvrde da se genetska struktura današnjih kultivara može smatrati kompleksnim pedigreom jer su se križanja provodila između elitnih kultivara te tako potvrđuju, kao što je već ranije navedeno, više centara domestikacije. Emanuelli i sur. (2013.) detektirali su različit broj

geografskih skupina. Analizom 20 SSR lokusa na najvećem setu kultivara (n = 2096) iz kolekcije Vassal, Bacilieri i sur. (2013.) potvrdili su postojanje genetske strukture i tri glavne grupe: grupa vinskih kultivara zapadne Europe, grupa vinskih kultivara Balkana i istočne Europe te grupa većinom stolnih kultivara istočnog Mediterana, Kavkaza te Bliskog, Srednjeg i Dalekog istoka.

U istraživanju Laucou i sur. (2018.) korištenjem SNP biljega uspjeli su detaljnije razdvojiti kultivare na temelju genetske strukture na čak osam različitih grupa. U navedenom je istraživanju utvrđeno kako su grupe kultivara definirane na temelju genetske strukture i nisu jasno razdvojene s obzirom na trenutnu geografsku pripadnost, što je jasan pokazatelj da su se pojedini kultivari kroz povijest premještali i sudjelovali u razvoju sortimenta na novim područjima.

Nedavna genotipizacija (Žulj Mihaljević, 2017.) velikog uzorka autohtonih i introduciranih kultivara vinove loze iz Hrvatske (više od 180 primki) i referentnih kultivara na većem broju mikrosatelitskih lokusa, kloroplastnih mikrosatelita (cpSSR) i SNP biljega, dovela je do novih spoznaja o hrvatskom sortimentu vinove loze. Ovim projektom stvorena je baza DNA profila i alelnih frekvencija koja je omogućila: dopunu i korekciju postojećih podataka o hrvatskim kultivarima u nacionalnoj (Hrvatska baza podataka o biljnim genetskim izvorima; https://cpgrd.hapih.hr/) i inozemnim javnim bazama; analizu srodstvenih odnosa i razinu međusortne genetske sličnosti hrvatske germplazme, te analizu odnosa između hrvatskih i europskih kultivara vinove loze korištenjem analognih podataka iz javno dostupnih baza, a s ciljem utvrđivanja statusa autohtonosti. Poznavanje razine i raspodjele genetske raznolikosti te međusobnih srodstvenih odnosa, kao i utvrđivanje najpouzdanijeg seta molekularnih biljega, nužno je za razvoj efektivnih strategija očuvanja i efikasnog korištenja *Vitis* germplazme.

U istraživanje koje je provela Žulj Mihaljević (2017.) bilo je uključeno ukupno 212 primki vinove loze, a svi uzorci, osim njih sedam, porijeklom su iz ukupno pet službenih nacionalnih i regionalnih kolekcijskih nasada kultivara vinove loze: Nacionalna kolekcija autohtonih kultivara (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet); Kolekcijski nasad kultivara Istre i Kvarnera (Institut za poljoprivredu i turizam, Poreč); Kolekcijski nasad dalmatinskih kultivara (Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split); Kolekcija kultivara vinove loze Hrvatskog zagorja te Kolekcija autohtonih kultivara vinove loze Primorsko-goranske županije (Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet). Te kolekcijske nasade održavaju javne znanstvene institucije uz potporu Nacionalnog programa za očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj koje financira Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske. Od 2020. godine podiže se na objektu Mandićevac, Đakovo, sigurnosna kolekcija kontinentalnih autohtonih kultivara (Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek). Prema pretpostavljenom podrijetlu skupljene primke razvrstane su u pripadajuće regije uzgoja: sjeverozapadna Hrvatska, Slavonija i Podunavlje; Istra i Hrvatsko primorje; Dalmacija. U daljnjem tekstu bit će prikazani i prokomentirani najzanimljiviji rezultati deskriptivne statistike molekularnih podataka kao i razvrstavanja jedinki u skupine, s ciljem analize genetske raznolikosti hrvatskih kultivara vinove loze.

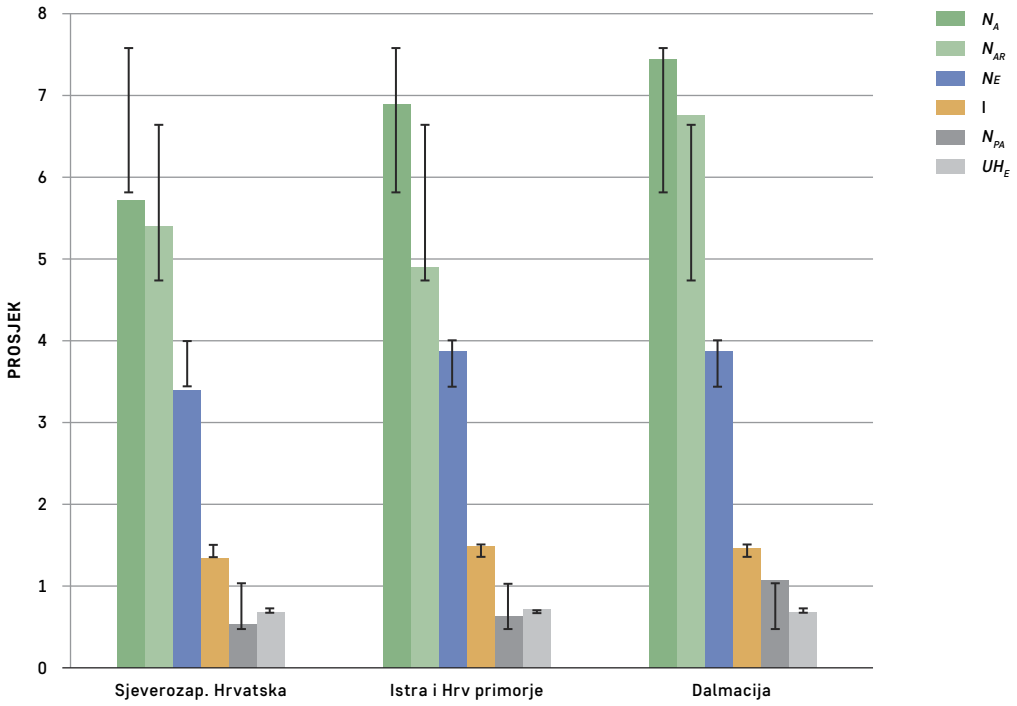
Unatoč činjenici da je većina kultivara vinove loze samooplodna, ona je visoko heterozigotna vrsta, što je potvrđeno i na hrvatskom setu kultivara vinove loze (Žulj Mihaljević i sur., 2020.), a utvrđena vrijednost bila je samo malo manja od one utvrđene za najveću svjetsku kolekciju u Vassal-u (INRA Montpellier) analiziranoj na 2096 kultivara (Bacilieri i sur., 2013.).

S obzirom na dugotrajnu povijest i specifičnosti dalmatinskog vinogradarstva i vinarstva, Dalmacija se smatrala kao ampelografski najbogatija regija Hrvatske, odnosno regija s najposebnijim sortimentom. To se posebice odražava u primjerice alelnom bogatstvu i broju privatnih alela. Analiza genetske raznolikosti za pretpostavljeno hrvatske kultivare vinove loze pokazala je i potvrdila pretpostavku da

Dalmacija ima najveću genetsku raznolikost alela, a što je vidljivo iz Slike 3.15. Na njoj su vizualizirani odnosi osnovnih parametara genetske raznolikosti izračunati za tri hrvatske regije (Slavonija i Podunavlje bili su zastupljeni samo s jednim kultivarom, stoga su bili izuzeti iz ove usporedbe).

Kako bi dobili odgovor na pitanje, krije li hrvatski set kultivara donekle jedinstvenu genetsku pozadinu, napravljena je usporedba frekvencija alela kao i potraga za specifičnim mikrosatelitskim alelima između velikog europskog seta kultivara vinove loze (GrapeGen06 set) i seta od 127 neredundantnih pretpostavljeno hrvatskih kultivara. Međutim, analize su pokazale da unutar hrvatskog seta nisu pronađeni privatni, odnosno za hrvatski set specifični aleli niti na jednom od devet standardnih mikrosatelitskih lokusa. Svejedno, apsolutne razlike u frekvencijama bili su evidentne i implicirale su postojanje genetske strukture pa su tako neki aleli bili češći (ili rjeđi) u hrvatskom setu, kao npr. aleli 234 i 256 za lokus ssrVrZAG79 (Žulj Mihaljević, 2017.).

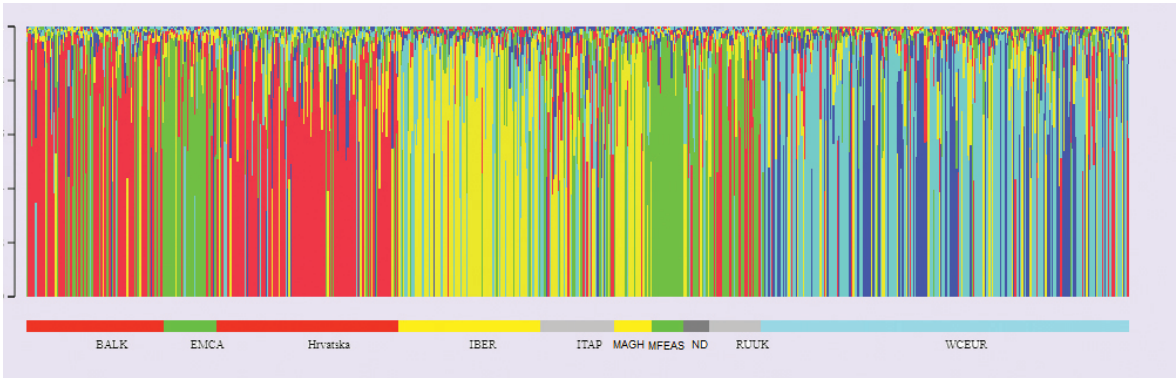
Kako bi se dobio uvid u genetsku strukturu, potrebno je obuhvatiti što veći broj kultivara kao i polimorfnih, nevezanih biljega. Programi namijenjeni analizi genetske strukture vode se osnovnim postavkama populacijske genetike, posebice korišteni program Structure koji u analiziranom uzorku definira jedinke koje pripadaju različitim skupinama sa svojstvenim alelnim učestalostima. Imajući na umu da sortiment vinove loze nekog područja ne predstavlja prirodnu populaciju, u analizu genetske strukture priključeni su publicirani profili samo tradicionalnih kultivara iz francuske kolekcije *Vassal* i uspoređene s pretpostavljeno hrvatskim setom koji uopće ne sadrži moderne kultivare, a sve kako bi se smanjio utjecaj namjerne selekcije.



SLIKA 3.15. PRIKAZ PROSJEČNIH OSNOVNIH PARAMETARA GENSKE RAZNOLIKOSTI PRETPOSTAVLJENIH HRVATSKIH POPULACIJA (N_A = BROJ AMPLIFICIRANIH ALELA, N_{AR} = ALELNO BOGATSTVO, N_E = BROJ EFEKTIVNIH ALELA, I = SHANNONOV INFORMACIJSKI INDEKS, N_{PA} = BROJ PRIVATNIH ALELA, UH_E = NEPRISTRANA OČEKIVANA HETEROZIGOTNOST) ZA TRI PRETPOSTAVLJENE POPULACIJE: ISTRA I HRVATSKO PRIMORJE (N = 29), SJEVEROZAPADNA HRVATSKA (N = 22) I DALMACIJA (N = 75) NA TEMELJU 36 ANALIZIRANIH SSR LOKUSA.

Na Slici 3.16. vizualno je prikazan udio svake od 127 pretpostavljeno autohtonih kultivara vinove loze u jednoj od pet predloženih izvornih populacija uz sortiranje genotipova prema mjestu uzorkovanja, odnosno pretpostavljenom porijeklu. Inferirane izvorne populacije prikazane su na sljedeći način: populacija 1 (predstavljena crvenom bojom, i označena kao BALKAN) obuhvatila je najveći broj kultivara iz Mađarske, Hrvatske, Srbije i Rumunjske i mogla bi se šire gledano definirati kao Balkan. Populacija 2 (predstavljena žutom bojom, a označena kao IBER) obuhvatila je najveći broj kultivara iz Španjolske, Portugala, Alžira i Maroka te je bila definirana kao Iberijski poluotok i zemlje Maghreba. Populacija 3 (predstavljena zelenom bojom, a označena kao MFEAS) obuhvatila je zemlje istočnog Mediterana i Crnog mora te Bliskog i Srednjeg istoka poput Grčke, Turske, Bugarske, Sirija, Cipra i Uzbekistana. Populacija 4 (vizualizirana svjetlije plavom bojom a označena kao WCEUR) obuhvatila je prvenstveno kultivare jugozapadne Francuske, odnosno sortiment Bordeauxa, te manji broj kultivara sjevernog Portugala, Galicije i sjeverne Španjolske, odnosno one koje se uzgajaju uz Biskajski zaljev (priobalno područje Atlantskog oceana). Populacija 5 (vizualizirana tamnije plavom bojom) formirana je prvenstveno oko dva kultivara – 'Pinot' i 'Gouais blanc' te njihovog brojnog potomstva koje se uzgaja na području sjeveroistočne Francuske i Njemačke. Od 127 kultivara iz pretpostavljeno hrvatskog seta, gotovo polovica (57) svrstana je u balkanski genski skup (na slici označenoj kao BALKAN), što je ekvivalentno i podudara se s Negruljevom ekološkom geografskom klasifikacijom (Negrul, 1938.).

Zanimljivo je da su i kontinentalni i priobalni kultivari bili grupirani u istu balkansku populaciju iako su, s obzirom na brojne veze s talijanskom germplazmom utvrđene kroz postojanje sinonima, očekivalo se da će neki kultivari biti grupirani s talijanskom germplazmom. Međutim, analize genetske strukture (Bacilieri i sur., 2013.; Emanuelli i sur., 2013.) definiraju talijansku populaciju kao apsolutno izmiješanu populaciju. Razlog tomu, kako navode, uloga je Rimskog Carstva u širenju vinogradarstva, a time i sortimenta. Balkanski skup gena vinove loze najveću sličnost pokazuje s istočnom grupom kultivara (Žulj Mihaljević, 2017.). Rezultat da je balkanski genski skup sličniji grupi kultivara s Iberijskog poluotoka i zemalja Maghreba nego primjerice njemačkim kultivarima, s obzirom na geografski položaj ovih regija iznenađujući je, a pretpostavlja se da je rezultat migracije kultivara vinove loze koja se kroz povijest intenzivno odvijala uz Sredozemne trgovačke rute.

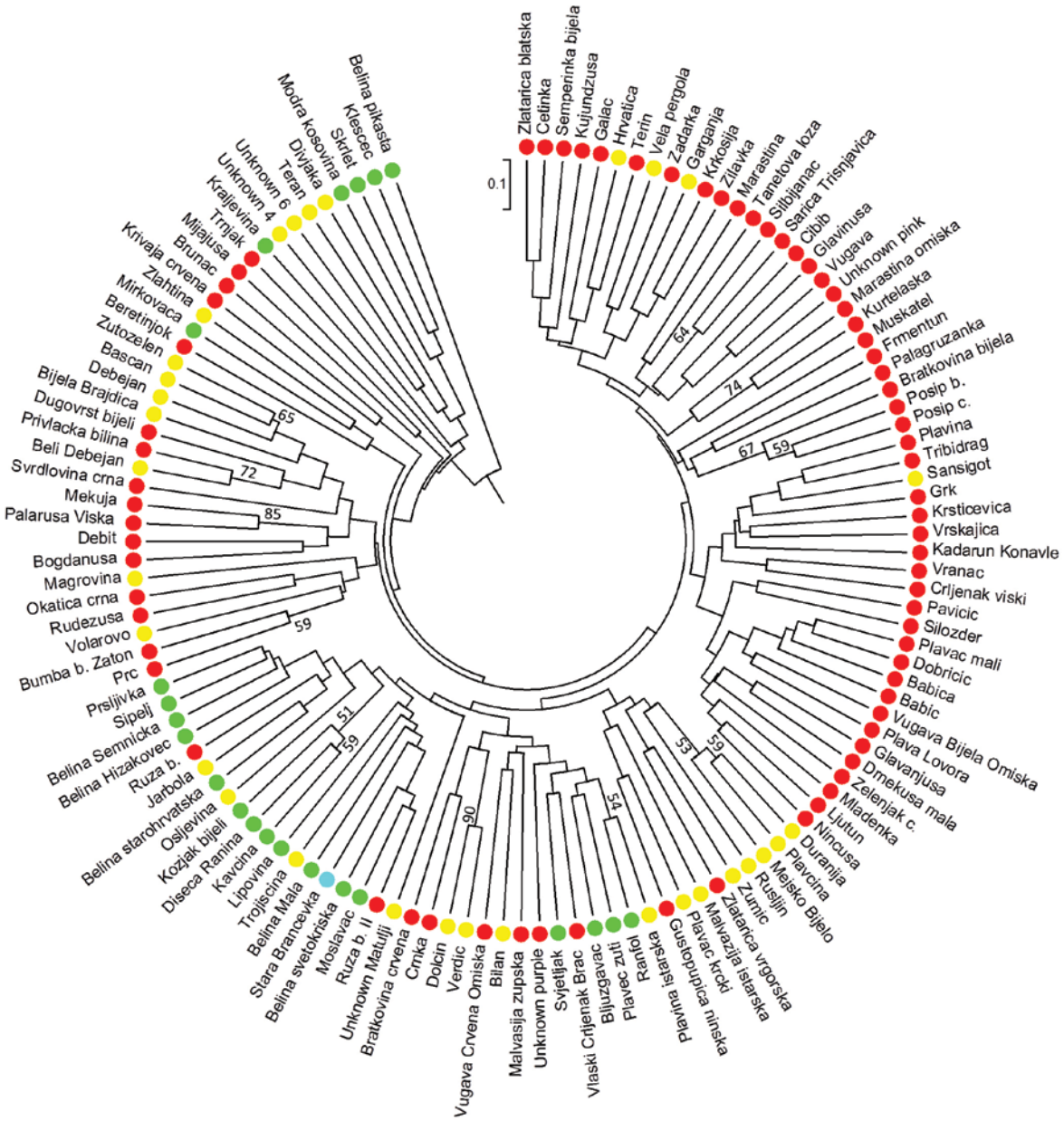


SLIKA 3.16. GRAFIČKI PRIKAZ PREDLOŽENE STRUKTURE ANALIZIRANOG SKUPA KULTIVARA ZA K = 5 PREMA STRUCTURE ANALIZI. SVAKI KULTIVAR PRIKAZAN JE VERTIKALNIM STUPCEM OBOJENIM SUKLADNO Q KOEFICIJENTU I PRIPADAJUĆOJ IZVORNOJ SKUPINI. ISPOD NAVEDENE KRATICE PREDSTAVLJAJU REGIJE UZORKOVANJA ANALIZIRANIH KULTIVARA: BALK – BALKAN; EMCA – ISTOČNI MEDITERAN I KAVKAZ; IBER – IBERIJSKI POLUOTOK; ITAP – APENINSKI POLUOTOK, MAGH – ZEMLJE MAGHREBA; MFEAS – BLISKI I DALEKI ISTOK; ND – GRUPA NEDETERMINIRANIH KULTIVARA; RUUK – RUSIJA I UKRAJINA; WCEUR – ZAPADNA I CENTRALNA EUROPA.

Dodatna 34 kultivara mogu se smatrati kultivarima miješanog porijekla s napomenom da je više od 50 % njihovog genoma porijeklom iz ranije spomenutog balkanskog skupa. Razlog velikog postotka kultivara izmiješanog porijekla možemo tražiti u kompleksnim pedigreima i migracijama kultivara.

Ukupno osam kultivara većinu svog genoma vuče iz nekog drugog genskog skupa, a to su 'Bogdanuša', 'Maraština omiška' i 'Frmentun' koje pokazuju pripadnost grupi kultivara Iberijskog poluotoka i zemalja Maghreba. 'Belina starohrvatska' pokazuje pripadnost grupi kultivara sjeveroistočne Francuske i Njemačke, dok se 'Cibib', 'Krivaja crvena', 'Mijajuša' i 'Trnjak' svrstavaju u istočnu grupu koja obuhvaća istočni Mediteran, Crno more te Bliski i Srednji istok. Međutim, iako je analiza genetske strukture sugerirala njihovo strano porijeklo, četiri kultivara, koja nalazimo samo unutar Hrvatske ('Bogdanuša', 'Trnjak', 'Krivaja crvena' i 'Cibib') možemo i dalje smatrati hrvatskim kultivarima, s obzirom da se ne uzgajaju u područjima pretpostavljenog porijekla, a povijesno su dio hrvatske baštine.

Za uvid u postojanje genetske strukture i odnosa unutar pretpostavljeno hrvatskog seta provedeno je klasteriranje na većem broju SSR markera (Slika 3.17.) i ono potvrđuje pretpostavku postojanja određene genetske strukture hrvatskog sortimenta (Žulj Mihaljević, 2017.). Dalmatinski sortiment najhomogeniji je i grupira se oko ključnih kultivara poput 'Plavca malog' i 'Tribidraga', a klasteri - odnosno skupine, prate poznate srodstvene odnose. Također se jasno izdvaja klaster koji sadrži i južno i sjeverno jadranske kultivare koji su grupirani na temelju srodstva s talijanskim kultivarom 'Bombino bianco', te veliki klaster u kojem su grupirani potomci kultivara 'Heunisch weiss' (sinonim za 'Gouais blanc' odnosno 'Belinu starohrvatsku') i vrlo zanimljivog, ali zaboravljenog kultivara naziva 'Pljuskavac' ili 'Bljuzgavac'. Kultivari koji Structure analizom nisu bili grupirani u balkanski genski skup i u samom UPGMA dendrogramu pokazali su najmanju genetsku sličnost s preostalim sortimentom i grupirani su u zasebne klastere poput npr. klastera istočnih (pretpostavljeno grčkih) kultivara: 'Mijajuša', 'Krivaja crvena', 'Trnjak' i 'Brunac'.



SLIKA 3.17. KRUŽNI UPGMA DENDROGRAM ZA 127 PRETPOSTAVLJENO HRVATSKIH KULTIVARA VINOVE LOZE NA TEMELJU 36 ANALIZIRANA SSR LOKUSA. CRVENOM BOJOM OZNAČENI SU KULTIVARI IZ DALMACIJE, ŽUTOM IZ ISTRE I HRVATSKOG PRIMORJA, ZELENOM IZ SJEVEROZAPADNE HRVATSKE, A PLAVOM KULTIVAR IZ SLAVONIJE I PODUNAVLJA.

LITERATURA

Alleweldt, G., Dettweiler-Münch, E., 1994. The Genetic Resources of Vitis: World List of Grapevine Collections, 2nd Ed. ed. Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Geilweilerhof.

Aradhya, M.K., Dangl, G.S., Prins, B.H., Boursiquot, J.M., Walker, M.A., Meredith, C.P., Simon, C.J., 2003. Genetic structure and differentiation in cultivated grape, Vitis vinifera L. Genet. Res. 81, 179–192.

Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H.I., i sur., 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. Mol. Ecol. 15, 3707–3714.

Bacilieri, R., Lacombe, T., Le Cunff, L., Di Vecchi-Staraz, M., Laucou, V., Genna, B., Péros, J.P., This, P., Boursiquot, J.M., 2013. Genetic structure in cultivated grapevines is linked to geography and human selection. BMC Plant Biol. 13, 1–14.

Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Gaspero, G. Di, Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante, M., Pezzotti, M., Pe, E., Policriti, A., Testolin, R., 2010. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. Theor. Appl. Genet. 121, 1569–1585.

Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troggio, M., Myles, S., Martinez-Zapater, J.M., Zyprian, E., Moreira, F.M., Grando, M.S., 2013. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. BMC Plant Biol. 13, 1–17.

Laucou, V., Launay, A., Bacilieri, R., Lacombe, T., Adam-Blondon, A.F., Bérard, A., Chauveau, A., De Andrés, M.T., Hausmann, L., Ibáñez, J., Le Paslier, M.C., Maghradze, D., Martinez-Zapater, J., Maul, E., Ponnaiah, M., Töpfer, R., Péros, J.P., Boursiquot, J.M., 2018. Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs. PLoS One 13, e0192540.

Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., 2008. Vinova loza: ampelografija, ekologija, oplemenjivanje, First. ed. Školka knjiga, d.d., Zagreb.

Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E., 1992. Biology of the Grapevine (The Biology of Horticultural Crops), Cambridge University Press. Cambridge University Press.

Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F., Aradhya, M.K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J.M., Ware, D., Bustamante, C.D., Buckler, E.S., 2011. Genetic structure and domestication history of the grape. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 3530–3535.

Negrul, A.M., 1938. Evolution of cultivated forms of grapes. CR Acad Sci USSR 18, 585–588.

Sefc, K.M., Lopes, M.S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ibáñez, J., Pejić, I., Wagner, H.W., Glössl, J., Steinkellner, H., 2000. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet. 2000 1003 100, 498–505.

Sefc, K.M., Pejić, I., Maletić, E., Thomas, M.R., Lefort, F., 2009. Microsatellite markers for grapevine: Tools for cultivar identification & pedigree reconstruction, u: Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology: Second Edition. Springer Netherlands, str. 565–596.

This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenheld, C., i sur., 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor. Appl. Genet. 109, 1448–1458.

Zdunić, G., Preece, J.E., Dangl, G.S., Koehmstedt, A., Mucalo, A., Maletić, E., Pejić, I., 2013. Genetic Characterization of Grapevine Cultivars Collected throughout the Dalmatian Region. Am. J. Enol. Vitic. 64, 285–290.

Žulj Mihaljević, M., 2017. Analiza genetske strukture i srodstva hrvatskih autohtonih sorti vinove loze. Doktorska disertacija. Svučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Žulj Mihaljević, M., Maletić, E., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Zyprian, E., Pejić, I., 2020. Genetic diversity, population structure, and parentage analysis of croatian grapevine germplasm. Genes (Basel). 11, 1–35.

3.14. Genetska raznolikost divljih i kulturnih maslina u Hrvatskoj

TATJANA KLEPO, ZLATKO LIBER I ZLATKO ŠATOVIĆ

3.14.1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) pripada porodici maslina (Oleaceae) koja broji 29 rodova s preko 600 vrsta drveća i polugrmova (Besnard i sur., 2009.). Unutar vrste poznato je šest podvrsta: *Olea europaea* ssp. *europaea* (Sredozemlje); *Olea europaea* ssp. *laperrinei* (Alžir); *Olea europaea* ssp. *maroccana* (Maroko); *Olea europaea* ssp. *cerasiformis* (otok Madeira, Portugal); *Olea europaea* ssp. *cuspidata* (Južna Afrika, Egipat, Australija, Havaji, Arabija, Indija i Kina) i *Olea europaea* ssp. *guanchica* (Kanarski otoci, Španjolska) (Rugini i sur., 2011.). Rezultati analize sekvenci kloroplastne DNA (cpDNA) upućuju na činjenicu da prve četiri podvrste imaju zajedničko podrijetlo (Lumaret i sur., 2004.).

Kromosomi su masline kratki, morfološki slični i brojni, što značajno otežava kariološka istraživanja i karakterizaciju kromosoma. Za podvrstu *O. e.* ssp. *cerasiformis* utvrđena je tetraploidnost, za *O. e.* ssp. *maroccana* heksaploidnost, dok su ostale podvrste *O. europaea* diploidne s 46 kromosoma (Breviglieri i Battaglia, 1954.; Besnard i sur., 2008.). Zbog identičnog broja kromosoma (2n = 46), kompatibilnosti i pretpostavljenog zajedničkog podrijetla, kulturne (*O. e.* ssp. *europaea* var. *europaea*) i divlje masline (*O. e.* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) svrstane su u dva varijeteta iste podvrste (Green, 2002.).

Maslina je jedna od prvih kultiviranih biljnih vrsta, simbol mira i Sredozemlja. Na području Sredozemlja maslina ima nezamjenjivo mjesto u kulturnom, duhovnom i materijalnom životu stanovništva kao izvor visoko vrijednih masnoća. Koristi se u kozmetici, kao ogrjev i kao hrana za domaće životinje. Prema literaturnim navodima, početak upotrebe plodova i drva divljih maslina seže u razdoblje od prije više od 100.000 godina na području Maroka (Marquer i sur., 2022.). Uzgoj maslina započeo je na Bliskom istoku najkasnije 5.000. g. pr. n. e. (Zohary i Spiegel-Roy, 1975.; Besnard i sur., 2013.). Analizom kloroplastne DNA (cpDNA) na preko 1800 jedinki divljih i kulturnih maslina uključujući i jedinke podvrste *cuspidata*, Besnard i sur. (2013.) zaključuju da su se procesi primarnog udomaćenja odvijali na području istočnog Sredozemlja. Prvi kultivari nastali su odabirom najboljih jedinki divljih maslina koje su se isticale po produktivnosti i krupnoći ploda (Rapoport, 2008.; Besnard i sur., 2013.). Velika raznolikost, ali i relativno bliski srodstveni odnosi kultivara i divljih maslina zabilježeni na cijelom Sredozemlju dovode do zaključka da su se procesi sekundarnog udomaćenja masline odvijali tijekom dužeg vremenskog razdoblja, na više lokacija (Belaj i sur., 2010.; Erre i sur., 2010.; Milanesi i sur., 2011.).

Otkrićem novih kontinenata maslina se širila izvan svog prirodnog područja rasprostranjenosti u Sjevernu i Južnu Ameriku, a u novije vrijeme i u Kinu i Australiju. Danas se maslina uzgaja na šest kontinenata između 30° i 45° sjeverne i južne zemljopisne širine na područjima sa sredozemnom klimom (Civantos, 2008.). Prema posljednjim statističkim podacima u svijetu se uzgaja na preko 12 milijuna hektara (FAO, 2018.). Plodovi masline najčešće se prerađuju u maslinovo ulje (oko 90 %), dok se manji dio (oko 10 %) konzervira i koristi za stolne masline.

Početak organiziranog uzgoja masline u Hrvatskoj se veže za osnivanje grčkih naseobina na jadranskoj obali i otocima u razdoblju od VI. do IV. stoljeća pr. n. e. (Ožanić, 1955.), no novija arheološka otkrića koštunica iz okolice Splita navode na zaključak da je upotreba ploda masline bila poznata još prije IX. stoljeća pr. n. e. (Bakarić i sur., 2008.).

Maslinarstvo je tijekom povijesti prolazilo kroz brojne uspone i padove. Ožanić (1955.) navodi da se uzgoj maslina i proizvodnja maslinovog ulja u Dalmaciji značajnije proširila tek nakon 1565. godine kao posljedica mletačke odredbe o poticanju razvoja maslinarstva u cilju smanjenja uvoza. Kraj XVIII. stoljeća smatra se zlatnim dobom hrvatskog maslinarstva kada se uzgajalo između 20 i 30 milijuna stabala. U to vrijeme postojao je veliki broj mlinova za mljevenje ploda (785 mlinova), a samo nekoliko preša (tijesaka) za cijeđenje maslina. U kratkom vremenskom razdoblju, već krajem XIX. stoljeća, ukupan se broj stabala smanjio na samo četiri milijuna (Ožanić, 1955.). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2008.) danas se u Republici Hrvatskoj maslina uzgaja na 20.087 ha što je čini našom glavnom voćnom vrstom.

3.14.2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

Dosadašnjim morfološkim i molekularnim istraživanjima utvrđena je velika raznolikost kultivara kao i unutarsortna raznolikost (engl. *intra-cultivar variability*), no točan broj kultivara u svijetu i u pojedinim zemljama, pa tako ni u Hrvatskoj, nije pouzdano ni konačno utvrđen. Najvažniji su problemi pri identifikaciji kultivara brojni sinonimi (različiti nazivi za isti kultivar) i homonimi (isti naziv za različite kultivare). Kultivari najčešće nose nazive prema tipičnom morfološkom svojstvu ili području u kojem se uzgajaju. Još davne 1914. godine Marčić (1914.) ističe problem nazivlja te navodi za primjer 'Oblicu' koja se na otoku Korčuli uzgaja pod nazivom 'Orgula', a na poluotoku Pelješcu se kultivar 'Dužica' naziva 'Orgula'. Isti autor navodi 53 sinonima za osam kultivara koji se uzgajaju na području Dalmacije, Hrvatskog primorja i Kotora (Crna Gora) (Marčić, 1914.). Stoga ne iznenađuje što se u literaturi mogu pronaći različiti podaci o broju kultivara u svijetu. Njihov broj varira od 2.000 (Lavee, 1994.) do 5.331 (Cimato i sur., 2008.) i uglavnom su lokalnog značaja. Samo nekoliko kultivara, kao što su 'Arbequina', 'Arbosane' i 'Frantoio', proširilo se cijelim svijetom.

Naš najznačajniji kultivar zastupljen s preko 65 % stabala je 'Oblica' uz koju se uzgaja još dvadesetak kultivara masline (Vrsalović, 1901.). Više od stoljeća, veliko zanimanje i znatni napori uloženi su u utvrđivanje točnog broja autohtonih kultivara. Jedno od najopsežnijih dijela temeljeno na morfološkim opažanjima objavio je Stjepo Bulić 1921. godine u kojem je naveo 18 kultivara i 218 naziva za područje Kraljevine Jugoslavije (Bulić, 1921.). Trideset godina kasnije, popisano je 87 kultivara i 85 sinonima (Zec, 1951.). Bartolini i sur. (1998.) navode 47 autohtonih kultivara i 70 sinonima za područje bivše SFR Jugoslavije. Vječni problem sinonima i homonima očit je i u publikaciji Strikić i sur. (2010.) u kojoj je opisano 46 kultivara i navedeno 154 pripadajućih sinonima i homonima.

Opis morfoloških svojstava kultivara masline koristi se za identifikaciju i vrednovanja biljnog materijala i ima široku primjenu u upravljanju poljskim kolekcijama masline kao i u oplemenjivanju. Međutim, zbog ograničene dostupnosti tijekom godine (cvjetovi, plodovi), te utjecaja okolišnih uvjeta na ekspresiju gena, identifikacija kultivara danas je nezamisliva bez primjene molekularnih biljega (Sarri i sur., 2006.).

U dosadašnjim istraživanjima hrvatskih kultivara masline primjenom molekularnih biljega utvrđena je visoka razina raznolikosti te pouzdanost biljega u identifikaciji i utvrđivanju međusobnih odnosa. Štambuk i sur. (2007.) analizirali su 44 uzorka masline iz srednje i južne Dalmacije primjenom 16 mikrosatelitnih biljega te je utvrđeno postojanje 30 različitih kultivara. Dvadeset lokalnih istarskih i sedam introduciranih kultivara analiziranih s 12 mikrosatelitnih biljega rezultirali su identifikacijom 18 različitih profila i tri slučaja sinonimije ('Bilica' = 'Bjankera', 'Karbonaca' = 'Drobna', 'Črna' = 'Karboner' i 'Karbuna') (Poljuha i sur. 2008.). Analizom 20 kultivara (14 hrvatskih i šest turskih) pomoću šest mikrosatelitnih biljega utvrđeno je razdvajanje kultivara u tri skupine. S obzirom da su se kultivari razvrstali u skupine neovisno o zemlji porijekla, autori zaključuju da postoji određena genetska srodnost i moguće zajedničko porijeklo hrvatskih i turskih kultivara masline (Ercisli i sur., 2012.). Na posljednjem popisu sorti voćnih vrsta u Republici Hrvatskoj (HAPIH, 2020.) nalazi se ukupno 28 kultivara masline od kojih je 16 autohtonih.

Za kultivar 'Oblica' utvrđena je vrlo visoka morfološka raznolikost te niska genetska raznolikost na temelju AFLP biljega (*Amplified fragment length polymorphism*) (Strikić i sur., 2009.). S druge strane, za kultivar 'Lastovka' zabilježena je visoka razina morfološke i genetske raznolikosti (Strikić i sur., 2011.). Usporedbom 190 uzoraka kultivara 'Istrska belica' (Slovenija), 'Bjelica' (Hrvatska), 'Žutica' (Crna Gora), 'Črnica' (Slovenija), 'Crnica' (Hrvatska), i 'Crnica' (Crna Gora) utvrđena je raznolikost unutar kultivara te prisustvo sinonima i homonima, kako na nacionalnoj, tako i na regionalnoj razini. Analizom 12 mikrosatelitnih biljega utvrđeno je postojanje međunarodnog sinonima 'Bjelica' (Hrvatska) i 'Žutica' (Crna Gora), homonima 'Istrska belica' i 'Bjelica' (Hrvatska)/'Žutica' (Crna Gora) te 'Črnica' (Slovenija) i 'Crnica' (Hrvatska, Crna Gora). Također, utvrđena je uniformnost kultivara 'Istrska belica' (Slovenija), niska raznolikost kultivara 'Črnica' (Slovenija) te srednja razina raznolikosti kultivara 'Crnica' (Hrvatska i Crna Gora). Za kultivar 'Bjelica' (Hrvatska)/'Žutica' (Crna Gora) utvrđeno je poliklonalno porijeklo (Lazović i sur., 2018.).

Pored kulturnih, genetsko bogatstvo masline uključuje i divlje tipove. U divlje masline (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) ubrajaju se izvorni divlji (oleastri) kao i feralni tipovi (olivastri) koji predstavljaju sjemenjake kulturnih maslina ili križanaca između kulturnih i divljih maslina (Zohary i Hopf, 1994.; García-Donas Díaz, 2001.; Vargas i Kadereit, 2001.; Belaj i sur., 2007.). Izvorni divlji i feralni tipovi uglavnom su sličnih morfoloških svojstava, osobito u juvenilnoj fazi životnog ciklusa (mali, ovalni listovi). Primjena molekularnih metoda identifikacije stoga je od iznimne važnosti. Visoka razina genetske raznolikosti divljih maslina predstavlja izniman potencijal u oplemenjivanju (Lumaret i sur., 2004.; Belaj i sur., 2007., 2010.; Besnard i sur., 2013.) naročito kao izvora otpornosti na niz biotskih i abiotskih stresova (Mulas i Francesconi, 1999.; Ciccarese i sur., 2002.; Murillo i sur., 2005.; Aranda i sur., 2011.; Hédia Hannachi, 2012.; Díaz-Rueda i sur., 2021.), ali i u svrhu dobivanja ulja visoke kakvoće (Baccouri i sur., 2008., 2011.; Hannachi i sur., 2008.; Dabbou i sur., 2011.; León i sur., 2018.). U prvom oplemenjivačkom programu koji je uključivao i izvorne divlje masline kao roditelje u križanjima, zabilježena je velika genetska raznolikost sjemenjaka divljih maslina, intenzivnija cvatnja i veći broj biljaka s kratkim juvenilnim razdobljem (neproduktivnim dijelom života biljke) u usporedbi sa sjemenjacima kultivara (Klepo i sur., 2013., 2014.). Raznolikost divljih maslina zasigurno će imati važnu ulogu u budućnosti, kao ključni čimbenik u borbi s klimatskim promjenama te novim uzročnicima bolesti maslina kao i štetnicima. Na području Hrvatske do sada nije istražena rasprostranjenost niti genetska raznolikost divljih maslina, no poznato je njihovo prisustvo na otoku Pagu (Zec, 1951.).

3.14.3. GENETSKA RAZNOLIKOST KULTURNIH I DIVLJIH MASLINA U HRVATSKOJ

U svrhu analize srodstvenih odnosa između divljih populacija i tradicijskih kultivara maslina na području Hrvatske bilo je uključeno pet populacija divljih maslina (Brijuni, Pag, Hvar, Lastovo, Pelješac) kao i skupina hrvatskih tradicijskih kultivara. Divlje su populacije bile zastupljene s 15 do 21 jedinkom, a 53 hrvatska tradicijska kultivara maslina s 63 jedinke.

Molekularne su analize provedene pomoću 12 mikrosatelitnih lokusa (ssrOeUA-DCA3, ssrOeUA-DCA4, ssrOeUA-DCA9, ssrOeUA-DCA11, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18, EMO3, GAPU59, UDO99-011, UDO99-019, UDO99-039, UDO99-043; (Sefc i sur., 2000.; Carriero i sur., 2002.; De la Rosa i sur., 2002.).

Broj različitih multilokusnih genotipova utvrđen je pomoću programa GenClone v2.0 (Arnaud-Haond i Belkhir, 2007.). U uzorku od 63 tradicijska kultivara utvrđeno je 50 različitih multilokusnih genotipova što ukazuje na visoku razinu sinonimije što je čest slučaj u svim maslinarskim zemljama. Prosječno alelno bogatstvo (N_{ar}) divljih populacija izračunato u programu FSTAT (Goudet, 1995.) iznosilo je 11,925, dok je kod tradicijskih kultivara bilo nešto niže (9,333) (Tablica 3.5.). Divlje su populacije imale ukupno 62 jedinstvena alela (N_{pr}) koji nisu bili prisutni kod kulturnih maslina, dok je kod kulturnih nađeno 12 jedinstvenih alela. Najviše alelno bogatstvo kao i najveći broj jedinstvenih alela imala je populacija divljih maslina s Hvara. Divlje su masline u prosjeku imale nešto nižu vrijednost zapažene heterozigotnosti (H_O = 0,766) od kulturnih (H_O = 0,783), ali veću očekivanu heterozigotnost (H_E = 0,783 / H_E = 0,748). Razlike u vrijednostima alelnog bogatstva (N_{ar}), te zapažene (H_O) i očekivane (H_E) heterozigotnosti između divljih i kulturnih maslina nisu bile signifikantne (P > 0,05) na temelju Kruskal-Wallisovog testa (*Kruskal–Wallis test*; KW; Kruskal i Wallis, 1952.) provedenog u programskom paketu SAS v9.3 (SAS Institute Inc., 2011.). Signifikantno odstupanje (P < 0,001) od ravnoteže po Hardyju i Winbergeru procijenjeno u programu GENEPOP (Raymond i Rousset, 1995.) utvrđeno je kod populacija P01 Brijuni i P02 Pag.

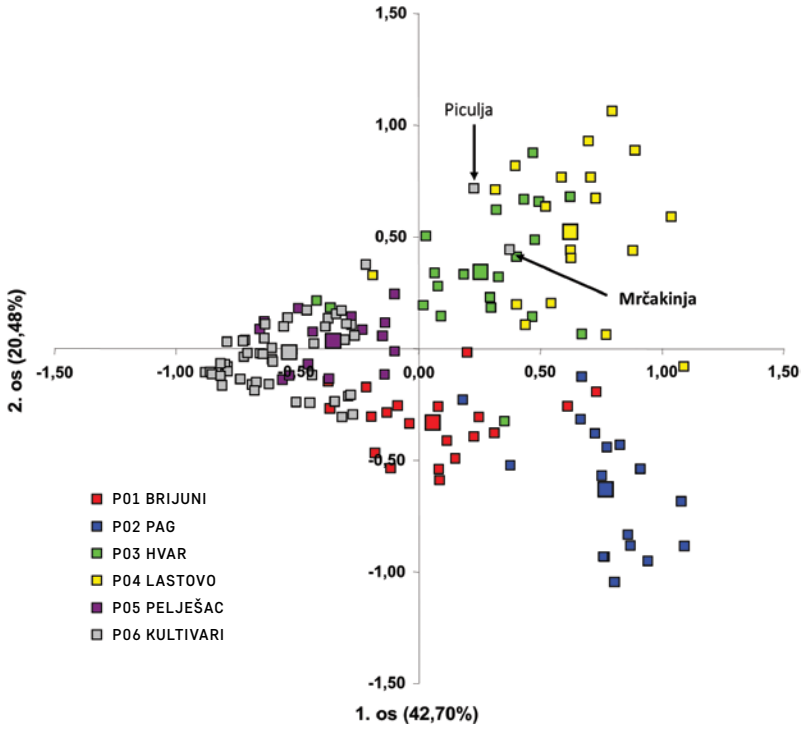
Koeficijenti genetske diferencijacije između svih parova divljih populacija izračunati po metodi Weira i Cockerhama (Weir i Cockerham, 1984.) u programu FSTAT bili su signifikantni (P < 0,05), a kretali su se od 0,014 između populacije P03 Hvar i P04 Lastovo do 0,073 između populacije P02 Pag i P05 Pelješac. Analizom molekularne varijance (engl. *analyisis of molecular variance*; AMOVA; Excoffier i sur., 1992.) u programu ARLEQUIN v3.5 (Excoffier i sur., 2005.) raščlanjena je ukupna genetska varijanca na sastavnice varijance između skupina (divlje *vs*. kulturne), između populacija unutar skupina, te unutar populacija. Većinu genetske raznolikosti (94,25 %) uvjetovale su razlike između genotipova, 3,76 % genetske varijance uvjetovano je razlikama između populacija unutar skupina, a tek 1,99 % razlikama između divljih i kulturnih maslina, pri čemu je koeficijent ϕ_{CT} izosio 0,020 i bio nesignifikantan (P = 0,166).

Faktorijalna analiza korespondencije (engl. *Factorial Correspondence Analysis*; FCA) provedena je pomoću programa Genetix v4.05 (Belkhir i sur., 2004.) u svrhu prikaza genetskih odnosa između populacija u koordinatnom sustavu (Slika 3.18.). Prve dvije osi objasnile su 63,18 % ukupne varijance. Prva je os razdvojila kulturne masline te donekle i populacije divljih maslina P01 Brijuni i P05 Pešeljac od divljih populacija P02 Pag i P04 Lastovo. Takav se rezultat može objasniti time da većina hrvatskih tradicijskih kultivara alohtona, odnosno da ti kultivari nisu nastali odabirom iz lokalnih divljih populacija već da su introducirani. Isto tako, čini se da populacije P01 Brijuni i P05 Pelješac ne predstavljaju izvorne populacije divljih maslina već da se u većini slučajeva radi o feralnim tipovima odnosno sjemenjacima i/ili križancima divljih i kulturnih genotipova. Shodno tome, populacije P02 Pag i P04 Lastovo mogle bi predstavljati izvorne divlje masline koje su tijekom posljednjeg glacijalnog maksimuma (engl. *Last Glacial Maximum*; LGM) preživjele u mikrorefugijima. Potrebno je istaknuti da su se tradicijski kultivari

TABLICA 3.5. MIKROSATELITNA RAZNOLIKOST POPULACIJA DIVLJIH MASLINA I SKUPINE HRVATSKIH KULTIVARA UTVRĐENA POMOĆU 12 MIKROSATELITNIH BILJEGA

BR.	POPULACIJA	N	N_{AV}	N_{AR}	N_{PA}	H_O	H_E	F_{IS}
P01	Brijuni	20	7,417	6,833	4	0,708	0,749	0,054*
P02	Pag	17	7,583	7,348	6	0,711	0,771	0,078*
P03	Hvar	21	9,917	8,967	16	0,810	0,821	0,013^{ns}
P04	Lastovo	20	8,500	7,751	6	0,800	0,796	-0,005^{ns}
P05	Pelješac	15	7,000	7,000	3	0,800	0,780	-0,026^{ns}
P06	Kultivari	50	9,333	6,630	12	0,783	0,748	-0,047^{na}
	Divlje	93	13,500	11,925	62	0,766	0,783	0,023
	Kulturne	50	9,333	9,333	12	0,783	0,748	-0,047
	P_{KW}			0,184		0,705	0,162	

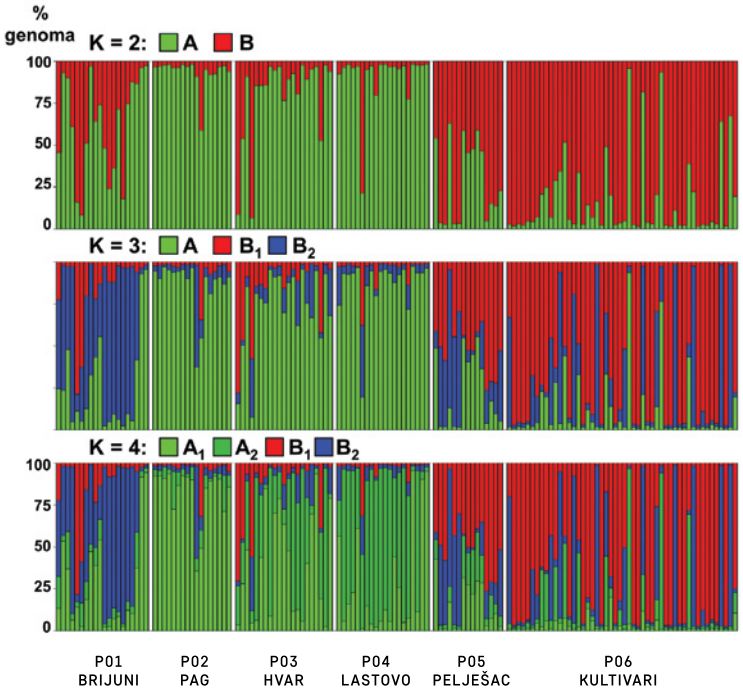
n - veličina uzorka; N_{av} - prosječan broj alela po lokusu; N_{ar} - alelno bogatstvo (za usporedbu između četiri divlje populacije i skupine hrvatskih kultivara prosječan broj alela sveden je na populaciju veličine 15 jedinki, dok je za usporedbu između divljih i kulturnih maslina prosječan broj alela sveden na populaciju veličine 50 jedinki); N_{pa} - broj jedinstvenih alela; H_O - zapažena heterozigotnost; H_E - očekivana heterizogitnost; F_{IS} - koeficijent samooplodnje (signifikantnost odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđena je za populacije divljih maslina nakon provedbe postupnog Bonferronijevog testa: *** $P < 0,001$; ** $0,001 < P < 0,01$; * $0,01 < P < 0,05$; ^{ns} $P > 0,05$; ^{na} test nije proveden jer se radi o skupini kultivara); P_{KW} - signifikantnost Kruskal-Wallisovog testa usporedbe vrijednosti alelnog bogatstva (N_{ar}), te zapažene (H_O) i očekivane (H_E) heterozigotnosti između divljih i kulturnih maslina.



SLIKA 3.18. PRIKAZ ODNOSA IZMEĐU 93 GENOTIPA DIVLJIH MASLINA (PET POPULACIJA) I 50 GENOTIPOVA HRVATSKIH KULTIVARA U KOORDINATNOM SUSTAVU ODREĐENOM PRVIM DVJEMA OSIMA FAKTORIJALNE ANALIZE KORESPONDENCIJE (FCA). POJEDINAČNI GENOTIPOVI PRIKAZANI SU MALIM KVADRATIMA, A BARICENTRI POPULACIJA DIVLJIH MASLINA I SKUPINE KULTIVARA OZNAČENI SU VEĆIM KVADRATIMA.

pod nazivima 'Piculja' i 'Mrčakinja' u koordinatnom sustavu smjestili uz populacije P02 Pag i P04 Lastovo što ukazuje na to da su ova dva kultivara srodna izvornim divljim maslinama. Određena morfološka svojstva navedenih kultivara idu tome u prilog. 'Piculja' ima sitan plod s čvrstom kožicom i tankim slojem mesa (uzgaja se najviše na otoku Lastovu), dok je 'Mrčakinja' redovite i obilne cvatnje, te služi kao veoma dobar oprašivač za većinu drugih tradicijskih kultivara maslina. Ova dva kultivara niz autora (Marčić, 1914.; Slaus-Kantschieder, 1914.; Bulić, 1921.; Zec, 1951.; Bakarić, 2002.) smatra sinonimnima, što se ne podudara s rezultatima ovog istraživanja.

Bayesovskom analizom populacijske strukture provedenom pomoću programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard i sur., 2000.) te izračunom parametra ΔK u programu StructureSelector (Li i Liu, 2018.), najviša je vrijednost parametra ΔK utvrđena pri $K = 3$ (90,47), a sljedeća najveća pri $K = 4$ (54,71). Prilikom analize na temelju hipoteze o postojanju dvije genetske skupine ($K = 2$), većina je divljih maslina bila pridružena skupini A, a kulturnih skupini B (Slika 3.19.). Pri tome su iznimke već spomenuti tradicijski kultivari 'Piculja' i 'Mrčakinja te određene jedinke divljih maslina iz populacije P05 Pelješac i P01 Brijuni koje su se, u skladu s prikazom na temelju faktorijalne analize korespondencije pokazale kao feralne. Pri $K = 3$ genetska se skupina B razdvojila na dvije genetske skupine. Skupini B_1 pripala je većina kultivara, dok je prosječna vrijednost udjela ove genetske skupine u genomu jedinki populacije P05 Pelješac iznosila $Q = 0{,}475$ što ukazuje na njeno feralno podrijetlo. Skupini B_2 pridruženo je osam jedinki populacije P01 Brijuni ($Q > 0{,}75$), jedna jedinka populacije P05 Pelješac i osam kultivara ('Istarska crnica', 'Kamasa', 'Krivulja', 'Oleaster', 'Pujizica', 'Rosulja', 'Uljarica' i 'Zuzorka') što ukazuje na to da ova genetska skupina predstavlja kultivare introducirane iz nekog drugog genetskog izvora od onog iz kojeg dolazi većina naših kultivara koji pripadaju skupini B_1. Naposljetku, pri $K = 4$, skupina A koja predstavlja divlje masline razdvojila se po zemljopisnom podrijetlu na skupinu A_1 utvrđenu



SLIKA 3.19. STRUKTURA GENETSKIH SKUPINA NA TEMELJU BAYESOVSKE ANALIZE POMOĆU PROGRAMA STRUCTURE PRI K = 2 DO 4: SVAKA JE JEDINKA PREDSTAVLJENA STUPCEM, A BOJA ODGOVARA POSTOTKU GENOMA (Q) JEDINKE KOJI POTJEČE IZ ODREĐENE GENETSKE SKUPINE.

većinom u populaciji P02 Pag i na skupinu A_2 kojoj pripadaju jedinke populacije P04 Lastovo, dok su u populaciji P03 Hvar ove dvije genetske skupine gotovo jednako zastupljene.

Navedenim je istraživanjem dokazano postojanje autohtonih divljih maslina na području Hrvatske koje nisu nastale spolnim razmnažanjem introduciranih kultivara već čine sastavni dio sredozemne makije. Autohtone divlje masline mogu se prvenstveno naći na Pagu, Hvaru i Lastovu, dok su na Pelješcu većinom prisutni feralni tipovi ili križanci divljih i kulturnih tipova. Hrvatski kultivari 'Piculja' i 'Mrčakinja' vjerojatno su nastali odabirom poželjnih jedinki iz populacije authohtonih divljih maslina. Svi su ostali kultivari maslina introducirani tijekom stoljeća, a dijele se na dvije genetske skupine. Dok većina kultivara spada u jedinstvenu skupinu, postoje određeni kultivari ('Istarska crnica', 'Kamasa', 'Krivulja', 'Oleaster', 'Pujizica', 'Rosulja', 'Uljarica' i 'Zuzorka') koji se od njih genetski jasno razlikuju, a srodni su pojedinim jedinkama uzorkovanima na Brijunima feralnog tipa koje su vjerojatno nastale spolnim razmnažanjem introduciranih kultivara. Kompleksni genetski odnosi između kultivara, učestalost sinonima i homonima te visoka razina raznolikosti divljih maslina naglašavaju potrebu za nastavkom istraživanja.

3.14.4. DALJNJA ISTRAŽIVANJA

U okviru Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv) na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša uspostavljena je poljska kolekcija hrvatskih i introduciranih kultivara te divljih maslina. Poduzeta su fenotipska istraživanja otpornosti na sušu i zaslanjenost, količine ulja u plodu te reproduktivnih svojstva alternativno rodnih i redovito rodnih jedinki kultivara 'Oblica'. Analiza podrijetla i raznolikosti kulturnih i divljih maslina Republike Hrvatske nužna je za njihovu uspješnu zaštitu, održavanje i upotrebu. Za provedbu analize podrijetla i raznolikosti istražit će se polimorfnost mikrosatelitnih biljega (Sefc i sur., 2000.; Carriero i sur., 2002.; Cipriani i sur., 2002.), biljega SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*; polimorfizam pojedinačnog nukleotida) metodom DArTseq (Melville i sur., 2017.) kao i biljega EST-SNP razvijenih sekvenciranjem nukleotidnih slijedova EST (engl. *Expressed Sequence Tag*; oznaka eksprimirane sekvence) transkriptoma masline (Belaj i sur., 2018., 2022.). Cjelogenomska studija pridruživanja (engl. *Genome-Wide Association Study*; GWAS; Visscher i sur., 2012.) bit će provedena u svrhu identifikacije gena povezanih s otpornošću masline na sušu i zaslanjenost, kao i s količinom ulja u plodu.

LITERATURA

Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M., Landa, B.B., 2011. Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against Verticillium dahliae. Plant Soil 343, 329–345.

Arnaud-Haond, S., Belkhir, K., 2007. GENCLONE: A computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. Mol. Ecol. Notes 7, 15–17.

Baccouri, B., Guerfel, M., Zarrouk, W., Taamalli, W., Daoud, D., Zarrouk, M., 2011. Wild olive (*Olea europaea* L.) selection for quality oil production. J. Food Biochem. 35, 161–176.

Baccouri, B., Zarrouk, W., Baccouri, O., Guerfel, M., Nouairi, I., Krichene, D., Daoud, D., Zarrouk, M., 2008. Composition, quality and oxidative stability of virgin olive oils from some selected wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *oleaster*). Grasas y Aceites 59, 346–351.

Bakarić, P., 2002. Sorte maslina Dubrovačkog primorja. Alfa 2, Dubrovnik.

Bakarić, P., Bjeliš, M., Brekalo, B., Bulimbašić-Botteri, M., Duić-Pribičević, V., Džidić, L., Elezović, D., Goreta, S., Gugić, J., i sur., 2008. Maslina i maslinovo ulje : A-Ž. Naklada Zadro ; Instuitut za jadranske kulture i melioraciju krša, Zagreb, Split.

Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., 1998. Olive germplasm: cultivars and world-wide collections. Rome Seed Plant Genet. Resour. Serv. FAO. 459.

Belaj, A., de la Rosa, R., Lorite, I.J., Mariotti, R., Cultrera, N.G.M., Beuzón, C.R., González-Plaza, J.J., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., Baldoni, L., 2018. Usefulness of a new large set of high throughput est-snp markers as a tool for olive germplasm collection management. Front. Plant Sci. 9, 1–13.

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

Belaj, A., Muñoz-Diez, C., Baldoni, L., Satovic, Z., Barranco, D., 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. Sci. Hortic. 124, 323–330.

Belaj, A., Ninot, A., Gómez-Gálvez, F.J., Riachy, M. El, Gurbuz-Veral, M., Torres, M., Lazaj, A., Klepo, T., Paz, S., Ugarte, J., Baldoni, L., Lorite, I.J., Šatovi´c, Z.Š., De La Rosa, R., 2022. Utility of EST-SNP Markers for Improving Management and Use of Olive Genetic Resources: A Case Study at the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba. Plants 2022, Vol. 11, Page 921 11, 921.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.

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

Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., Bakkali, A. El, Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., Savolainen, V., 2013. The complex history of the olive tree: From late quaternary diversification of mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 280, 1–7.

Besnard, G., Rubio De Casas, R., Christin, P.A., Vargas, P., 2009. Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. Ann. Bot. 104, 143–160.

Breviglieri, N., Battaglia, E., 1954. Ricerche cariologiche in *Olea europaea* L. Caryologia 6, 271–283.

Bulić, S., 1921. Građa za dalmatinsku elajografiju. Odl. Tisak. lit. Zavod E. Vitaliani, Šibenik.

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

Ciccarese, F., Ambrico, A., Longo, O., Schiavone, D., 2002. Search for resistance to verticillium-wilt and leaf spot in Olive, u: Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science, str. 717–720.

Cimato, A., Attilio, C., Feci, E., Franchini, E., 2008. Proizvodnja i bioraznolikost u modernom maslinarstvu. Pomol. Croat. 14, 179–194.

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

Civantos, L., 2008. La olivicultura en el mundo y en España, u: Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Ur.), El cultivo del olivo. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, str. 18–35.

Dabbou, Samia, Dabbou, Sihem, Selvaggini, R., Urbani, S., Taticchi, A., Servili, M., Hammami, M., 2011. Comparison of the chemical composition and the organoleptic profile of virgin olive oil from two wild and two cultivated Tunisian olea europaea. Chem. Biodivers. 8, 189–202.

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

Díaz-Rueda, P., Aguado, A., Romero-Cuadrado, L., Capote, N., Colmenero-Flores, J.M., 2021. Wild Olive Genotypes as a Valuable Source of Resistance to Defoliating *Verticillium dahliae*. Front. Plant Sci. 12, 1253.

DZS, 2008. Državni zavod za statistiku. https://dzs.gov.hr/ (pristupljeno 25.8.2022).

Ercisli, S., Benčić, Đ., Ipek, A., Barut, E., Liber, Z., 2012. Genetic relationships among olive (*Olea europaea* L.) cultivars native to Croatia and Turkey. J. Appl. Bot. food Qual. 85, 144–149.

Erre, P., Chessa, I., Muñoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I., 2010. Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers. Genet. Resour. Crop Evol. 57, 41–54.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1, 47.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491.

FAO, 2018. FAOSTAT. Production: Crops. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL (pristupljeno 5.12.2021).

García-Donas Díaz, M.A., 2001. Caracterización morfológica, agronómica y elaiotécnica de los acebuchales de la provincia de Cádiz. Universidad de Córdoba.

Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. J. Hered. 86, 485–486.

Green, P.S., 2002. A Revision of *Olea* L. (Oleaceae). Kew Bull. 57, 91.

Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., Bervillé, A., 2008. Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. Sci. Hortic. 116, 280–290.

HAPIH, Center for Seed and Seedlings, 2020. List of fruit varieties. HAPIH, Center for Seed and Seedlings, Osijek.

Hédia Hannachi, 2012. Flowering in the wild olive (*Olea europaea* L.) tree (oleaster): Phenology, flower abnormalities and fruit set traits for breeding the olive. African J. Biotechnol. 11, 8142–8148.

Klepo, T., De la Rosa, R., Satovic, Z., León, L., Belaj, A., 2013. Utility of wild germplasm in olive breeding. Sci. Hortic. 152, 92–101.

Klepo, T., Toumi, A., De La Rosa, R., León, L., Belaj, A., 2014. Agronomic evaluation of seedlings from crosses between the main spanish olive cultivar 'Picual' and two wild olive trees. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 89.

Kruskal, W.H., Wallis, W.A., 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. J. Am. Stat. Assoc. 47, 583–621.

Lavee, S., 1994. Porqué la necesidad de nuevas variedades de olivos? Frutic. Prof. 29–37.

Lazović, B., Klepo, T., Adakalić, M., Šatović, Z., Arbeiter, A.B., Hladnik, M., Strikić, F., Liber, Z., Bandelj, D., 2018. Intra-varietal variability and genetic relationships among the homonymic East Adriatic olive (*Olea europaea* L.) varieties. Sci. Hortic. 236, 175–185.

León, L., De La Rosa, R., Velasco, L., Belaj, A., 2018. Using wild olives in breeding programs: Implications on oil quality composition. Front. Plant Sci. 9, 232.

Li, Y.L., Liu, J.X., 2018. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. Mol. Ecol. Resour. 18, 176–177.

Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.-F., Di Giusto, F., 2004. Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. Heredity (Edinb). 92, 343–51.

Marčić, M., 1914. Uzgoj masline na istočnim obalama Jadranskog mora. Vrsti masline. Šumarski List 12, 465–475.

Marquer, L., Otto, T., Arous, E. Ben, Stoetzel, E., Campmas, E., Zazzo, A., Tombret, O., Seim, A., Kofler, W., Falguères, C., El Hajraoui, M.A., Nespoulet, R., 2022. The first use of olives in Africa around 100,000 years ago. Nat. Plants 2022 83 8, 204–208.

Melville, J., Haines, M.L., Boysen, K., Hodkinson, L., Kilian, A., Smith Date, K.L., Potvin, D.A., Parris, K., 2017. Identifying hybridization and admixture using SNPs: Application of the DArTseq platforminphylogeographic research on vertebrates. R. Soc. Open Sci. 4, 1–14.

Milanesi, C., Sorbi, A., Paolucci, E., Antonucci, F., Menesatti, P., Costa, C., Pallottino, F., Vignani, R., Cimato, A., Ciacci, A., Cresti, M., 2011. Pomology observations, morphometric analysis, ultrastructural study and allelic profiles of „olivastra Seggianese" endocarps from ancient olive trees (*Olea europaea* L.). C. R. Biol. 334, 39–49.

Mulas, M., Francesconi, A.H.D., 1999. Wild olive (*Olea europaea* L.) as forestry species. S.I.S.E.F. 2, 55–60.

Murillo, J.M., Madejón, E., Madejón, P., Cabrera, F., 2005. The response of wild olive to the addition of a fulvic acid-rich amendment to soils polluted by trace elements (SW Spain). J. Arid Environ. 63, 284–303.

Ožanić, S., 1955. Poljoprivreda Dalmacije u prošlosti: Prilozi za Povijest poljoprivrede Dalmacije. Društva agronoma NRH-Podružnica Split.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Rapoport, H.F., 2008. Botánica y Morfología, u: Barranco, D., Escobar, R., Rallo, L. (Ur.), El cultivo del olivo. Mundi-Prensa y Junta de Andalucía, Madrid, str. 37–62.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered. 86, 248–249.

Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., Muleo, R., 2011. Olea, u: Kole, C. (Ur.), Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Temperate fruits. Springer, Berlin, str. 79–117.

Sarri, V., Baldoni, L., Porceddu, A., Cultrera, N.G.M., Contento, A., Frediani, M., Belaj, A., Trujillo, I., Cionini, P.G., 2006. Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. Genome 49, 1606–1615.

SAS Institute Inc., 2011. The SAS System for Windows, Release 9.3; Statistical Analysis Systems Institute: Cary, NC, USA.

Sefc, K.M., Lopes, M.S., Mendonça, D., Rodrigues Dos Santos, M., Laimer Da Câmara Machado, M., Da Câmara Machado, A., 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Mol. Ecol. 9, 1171–1173.

Slaus-Kantschieder, G., 1914. Olivicultura e produzione d'olio d'oliva nelle provincie meridionali Austriache. Tipografia sociale spalatina, Split.

Štambuk, S., Sutlović, D., Bakarić, P., Petričević, S., Andelinović, Š., 2007. Forensic botany: Potential usefulness of microsatellite-based genotyping of Croatian olive (*Olea europaea* L.) in forensic casework. Croat. Med. J. 48, 556–562.

Strikić, F., Klepo, T., Rošin, J., Radunić, M., 2010. Udomaćene sorte masline u Republici Hrvatskoj. Instiut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split.

Strikić, F., Liber, Z., Bandelj Mavsar, D., Čmelik, Z., Perica, S., Radunić, M., Javornik, B., Šatović, Z., 2011. Intracultivar diversity in the Croatian olive cultivar, „Lastovka". J. Hortic. Sci. Biotechnol. 86, 305–311.

Strikic, F., Mavsar, D.B., Perica, S., Cmelik, Z., Satovic, Z., Javornik, B., 2009. The main croatian olive cultivar, „oblica", shows high morphological but low molecular diversity. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 84, 345–349.

Vargas, P., Kadereit, J.W., 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (Oleaceae) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. Flora 196, 142–152.

Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., Yang, J., 2012. Five years of GWAS discovery. Am. J. Hum. Genet. 90, 7–24.

Vrsalović, M., 1901. Maslinarstvo i uljarstvo za puk. Nagragjena tiskarnica Vitaliani, Zadar.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. Evolution (N. Y). 38, 1358.

Zec, J., 1951. Sortiment masline u Dalmaciji. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.

Zohary, D., Hopf, M., 1994. Domestification of plants in the Old world. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, U.K.

Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975. Beginnings of fruit growing in the old world. Science 187, 319–327.

3.15. Genetska raznolikost tradicijskih kultivara raštike (*Brassica oleracea* var. *acephala*)

BERNARD PREKALJ I SMILJANA GORETA BAN

3.15.1. UVOD

Unutar porodice Brassicaceae svrstano je oko 350 rodova s 3.500 vrsta te se smatra jednom od ekonomski najvažnijih porodica s vrstama koje se odlikuju brojnim poželjnim agronomskim i nutritivnim svojstvima. Jedna od vrsta unutar te porodice, odnosno roda *Brassica* je raštika (*Brassica oleracea* var. *acephala*) za koju se smatra da je najstarija forma kupusa podrijetlom s Istočnog Mediterana (Balkaya i Yanmaz, 2005.).

Raštika se na području Hrvatske uzgaja na Jadranskoj obali, te ju Ožanić (1938.) u svojoj knjizi o najvažnijim primorskim vrstama povrća opisuje kao: „*Ova vrst kupusa vrlo je stara i bliza divljoj kupusnici. Postoje tri skupine odlika lisnatog kupusa, nu malo se odlika gaji za hranu ljudima, nego se većim dijelom gaje kao ukrasne biljke, ili pak za krmljenje stoke. Kod nas se gaji visoka raštika, koja je do pred nekoliko desetljeća bila naš glavni kupus. Gaji se i danas po primorju i otocima, pa uspijeva i u mršavoj zemlji, a podnosi i najveću žegu i sušu, te odolijeva i ledu. Naša raštika daje i davala je vrlo tečno varivo, ako se s njom postupa kako treba. Da joj se dade malo više gnoja i malo više vode i ona bi bila bolja, pa bi zaslužila da joj se da malo mjesta u svakom povrtnjaku. Velika joj je prednost, da se može saditi cijele godine. Uspijeva i u hladu među stablima.*" Narodni nazivi za raštiku su i broskva, krmni kelj, lisnati kelj, prokula, prokulica, raščika, raštan, stočni kelj, ukret i vukret (Nikolić, 2015.). Raštika predstavlja tradicijsku kulturu našeg jadranskog područja, a osobito je bila zastupljena na našem južnom jadranskom obalnom području, otocima te dalmatinskom zaleđu. Prehranila je generacije na tom području jer dobro podnosi nepovoljne klimatske uvjete kao što su suša te visoke kao i niske temperature. Listovi raštike uzgojeni tijekom ljeta koristili su se za ishranu stoke, a tijekom zime nakon razdoblja niskih temperatura raštika je postajala „slađa" te prikladnija za ishranu ljudi. Iako je raštika česta kultura u Hrvatskoj i dalje ne postoji ni jedna priznata sorta kao ni registrirana sjemenska proizvodnja u našoj zemlji, što bi bilo od velikog značaja zbog visoke nutritivne vrijednosti, te jednostavnosti uzgoja (Batelja i sur., 2009.).

Posljednjih godina povećavaju se površine pod raštikom u nekim dijelovima svijeta zbog utvrđenog visokog sadržaja vitamina C, kalcija, te male kalorijske vrijednosti u njenim listovima (Šamec i sur., 2019.b). Procjenjuje se da je godišnja proizvodnja na Sredozemlju oko 10.000 tona (Demir i Balkaya, 2011.). S obzirom na to da se kod nas u proizvodnji koriste uglavnom tradicijski kultivari nameće se potreba za njihovom morfološkom i molekularnom

karakterizacijom kako bi se utvrdila bioraznolikost na našem području. Nadalje, prikupljanje biljnog materija na cijelom području te njegova detaljna karakterizacija omogućila bi i pronalaženje tradicijskih kultivara otpornijih na biotičke i abiotičke stresove, te ostala poželjna biološka i agronomska svojstva (Copeland i McDonald, 2001.; Šamec i sur., 2019.a). Iako postoji više različitih morfotipova raštike, sve njih karakterizira razvoj dubokog i snažnog korijena, a stabljika može narasti do jednog metra, te na vrhu formira rozetu. Donji listovi su okruglog do ovalnog oblika, valovitih do nazubljenih rubova, te se nalaze na dugim peteljkama. Površina lista je glatka i pomalo valovita, te prekrivena voskom. Boja listova je zelena do plavo zelena s pojavom ljubičaste boje (Lešić i sur., 2016.).

3.15.2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

Uz brokulu, cvjetaču, kelj, kelj pupčar, korabicu i kupus, raštika (uključujući i lisnati kelj; *Brassica oleracea* var. *acephala*) je jedan od kulturnih varijeteta nastalih udomaćenjem divljeg kupusa (*Brassica oleracea* ssp. *oleracea*). Uglavnom se uzgaja u sredozemnoj regiji, koja se također smatra područjem udomaćenja ove vrste (Maggioni i sur., 2014.; Mabry i sur., 2021.). Trend proizvodnje raštike je u porastu s godišnjom svjetskom proizvodnjom vrsta koje pripadaju rodu *Brassica* oko 70 milijuna tona (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.), a samo na području Sredozemlja godišnje se proizvede oko 10.000 tona raštike (Demir i Balkaya, 2011.). Veća gospodarska važnost komercijalnih kultivara raštike utvrđena je u crnomorskoj regiji, Pirinejskom poluotoku i talijanskoj regiji Toskani, s trendom porasta proizvodnje u SAD-u (Cartea i sur., 2003.; Balkaya i Yanmaz, 2005.; Dixon, 2006.; Christensen i sur., 2011.; Šamec i sur., 2019.b). Raštika se uglavnom uzgaja kao uzdržavajuća kultura (engl. *subsistence crop*), kultura koja služi za izravnu upotrebu na gospodarstvu, za razliku od brojnih isplativih kultura (engl. *cash crops*) koje se uzgajaju isključivo radi prodaje na tržištu. Budući da je oplemenjivanje raštike vrlo ograničeno, uzgoj koji se temelji isključivo na tradicijskim kultivarima često dovodi do gubitka potencijalno korisnih gena (Branca i sur., 2013.; Lotti i sur., 2018.). Klimatski uvjeti za proizvodnju kupusnjača općenito podrazumijevaju hladnija područja, ali se lako može uzgajati i u područjima s toplijim uvjetima, poput primorskog dijela Hrvatske (Batelja i sur., 2009.; Emebu i Anyika, 2011.). U Hrvatskoj raštiku uglavnom uzgajaju u kućanstvima starije osobe na ograničenom zemljopisnom području koje obuhvaća obalni dio Jadranskog mora. Zbog utvrđenih visokih nutritivnih vrijednosti, te pozitivnog utjecaja na zdravlje ljudi, posljednjih godina povećan je broj znanstvenih istraživanja usmjerenih prema utvrđivanju genetske strukture i raznolikosti raštike. Proučavanje genetske varijabilnosti raštike često se provodi korištenjem mikrosatelitnih biljega (engl. *microsatellite markers*/*Simple Sequence Repeats*; SSR) zbog visokog polimorfizma i na unutarvrsnoj razini (Tautz, 1989.; Jarne i Lagoda, 1996.; Branca i sur., 2013.). Na području Irske je provedeno istraživanje s ciljem utvrđivanja genetske varijabilnosti biljnih genetskih izvora vrste *Brassica oleracea* te su u tu svrhu korišteni biljezi SSR i AFLP (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (El-Esawi i sur., 2016.a, 2016.b). Okumus i Balkaya (2007.) su proveli istraživanje na 20 morfološki različitih populacija raštike iz Turske te utvrdili da se iste genetski razlikuju koristeći RAPD (engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) metodu, a istraživane populacije podijelile su se u tri veće grupe ovisno o morfološkim svojstvima. Batelja i sur. (2009.) su proučavali morfološku raznolikost populacija raštika s područja Istre i Dalmacije, te utvrdili da se populacije nisu razdvojile prema geografskoj pripadnosti. Slično utvrđuju i Sefo i sur. (2010.) na području Hercegovine gdje se većina svojstava istraživanih populacija nije značajno razlikovala. Morfološka svojstva raštike su daleko više istraživana u drugim dijelovima svijeta. Tako je za raštike sa sjeverozapadnog dijela Španjolske utvrđena značajna varijabilnost između svih istraživanih populacija (Cartea i sur., 2003.). U istom istraživanju utvrđeno je da je morfološka raznolikost priobalnih populacija veća u odnosu na

kontinentalne populacije. Značajna varijabilnost morfoloških karakteristika raštike utvrđena je i na području Italije (Lotti i sur., 2018.), Turske (Balkaya i Yanmaz, 2005.) i Indije (Gorka i sur., 2018.). Proučavanje morfoloških svojstava raštike u Hrvatskoj provedeno je samo na ograničenom broju populacija, dok genetska raznolikost do sada nije proučavana (Batelja i sur., 2009.). Nadalje, Lotti i sur. (2018.) su u svom istraživanju okarakterizirali germplazmu vrste raštike koja se uzgaja u Apuliji (južna Italija). Istraživanje je provedeno na 19 populacija raštika koristeći 12 mikrosatelitnih biljega koji su u preliminarnom istraživanju istih autora bili polimorfni. U istraživanju je utvrđeno ukupno 46 alela, a broj alela po lokusu je varirao od dva do sedam. Informacijski sadržaj polimorfizma (engl. *Polymorphism Information Content*; PIC) mikrosatelitnih biljega se kretao od 0,086 do 0,742. Utvrđena je visoka razina genetske raznolikosti između populacija, dok su se četiri populacije jasno odvojile. Maggioni i sur. (2014.) ukazuju na važnost visoke genetske raznolikosti tradicijskih kultivara u odnosu na komercijalne što su utvrdili korištenjem AFLP metode. Moderni, komercijalni kultivari raštike polako istiskuju iz proizvodnje tradicijske kultivare što može dovesti do gubitka poželjnih alela. Stoga su genetska istraživanja različitih tradicijskih kultivara raštike preduvjet za uspješne oplemenjivačke programe. Skorašnje istraživanje genetske raznolikosti različitih populacija raštike s područja Bosne i Hercegovine ukazuje na znatnu genetsku raznolikost i na ovom području (Šutković i sur., 2021.).

3.15.3. GENETSKA RAZNOLIKOST TRADICIJSKIH KULTIVARA

U istraživanje je bilo uključeno 25 populacija stranooplodnih tradicijskih kultivara raštike prikupljenih duž hrvatske obale, otoka te s područja Bosne i Hercegovine (Tablica 3.6.). Sjeme se održava i čuva u kolekciji Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Poljski pokus s ciljem morfološke i molekularne karakterizacije proveden je na pokušalištu Instituta. Sjeme je posijano u srpnju, a biljke su presađene u kolovozu 45 dana nakon sjetve i to u fazi 4 - 5 pravih listova (BBCH14 - 15). Pokus je postavljen prema slučajnom bloknom rasporedu u četiri ponavljanja, a osnovna parcela je uključivala četiri reda po pet biljaka. Biljke su bile posađene na razmak od 50 cm unutar i između redova. U uzgoju su primijenjene uobičajene agrotehničke mjere za uzgoj kupusnjača (Lešić i sur., 2016.).

Uzorci lista su prikupljeni s 20 biljaka po populaciji u tehnološkoj zrelosti i osušeni u silika-gelu za izolaciju DNA. Genetska raznolikost raštike je utvrđena analizom mikrosatelitnih biljega. Mikrosatelitni biljezi su odabrani pregledom dosadašnjih istraživanja (El-Esawi i sur., 2016.b; Lotti i sur., 2018.). Statistička analiza podataka obuhvatila je procjenu unutarpopulacijske raznolikosti, procjenu genetske diferencijacije, analizu molekularne varijance, Bayesovsku analizu skupina, izračun genetske udaljenosti između populacija, te izradu filogenetske mreže.

U svrhu molekularne analize korišteno je 13 mikrosatelitnih biljega prethodno razvijenih za kupusnjače, od kojih je osam bilo informativno (BRMS-005, Ol10-H02, Ol11-D12, Ol11-G11, Ol11-H02, Ol12-A04, Ra2-A01, Ra2-E12). Upotrebom osam mikrosatelitnih biljega identificirano je ukupno 86 alela. Prosječno alelno bogatstvo (N_{ar}) izračunato u programu FSTAT (Goudet, 1995.) iznosilo je 3,185, a kretalo se od 2,125 kod populacije Labinci (P02), do 4,075 kod populacije iz Čarskog polja s otoka Korčule (P21). Zapažena heterozigotnost (H_O) izračunata je u programu GENEPOP (Raymond i Rousset, 1995.) iznosila je 0,442, a kretala se u rasponu od 0,225 (P18, Mostar) do 0,588 (P21, Čarsko polje). Prosječna vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_E) iznosila je 0,459 i bila je veća kod svih populacija u odnosu na zapaženu, a kretala se u rasponu od 0,276 (P02, Labinci) do 0,577 (P14, Vrgorac). Koeficijent samooplodnje (F_{IS}) bio je signifikantan ($P < 0,05$) kod četiri populacije: Preko (P08), Baška voda (P12), Vrgorac (P14) i Mostar (P18) (Tablica 1). Prosječna genetska diferencija (F_{ST}) između 25 analiziranih populacija iznosila je 0,357, a kretala se od 0,055 između populacija iz Katuna

TABLICA 3.6. **UNUTARVRSNA RAZNOLIKOST POPULACIJA TRADICIJSKIH KULTIVARA RAŠTIKE (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *ACEPHALA*)**

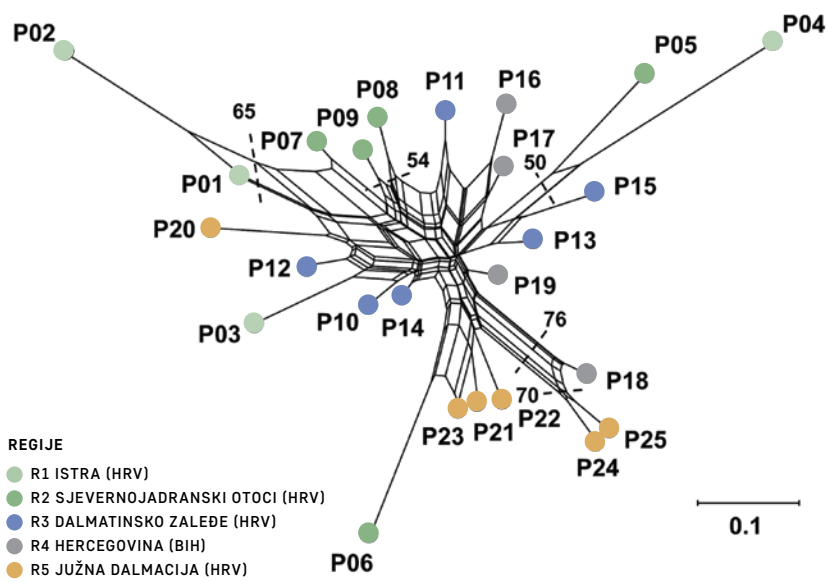
POP	POPULATION	VEGNO	N	N_{AR}	H_O	H_E	F_{IS}
P01	Kaštelir	IPT-202	17	3,123	0,478	0,504	0,052 ns
P02	Labinci	IPT-206	13	2,125	0,231	0,276	0,165 ns
P03	Fuškulin	IPT-379	16	3,474	0,477	0,508	0,063 ns
P04	Rovinj	IPT-174	17	2,192	0,250	0,286	0,126 ns
P05	Lošinj	IPT-396	19	2,369	0,342	0,337	-0,015 ns
P06	Lošinj	IPT-390	20	3,648	0,494	0,552	0,106 ns
P07	Ugljan	IPT-391	19	3,128	0,474	0,483	0,019 ns
P08	Preko	IPT-381	20	3,582	0,456	0,490	0,069**
P09	Iž	IPT-380	18	3,697	0,486	0,492	0,013 ns
P10	Katuni	IPT-402	17	3,420	0,478	0,474	-0,008 ns
P11	Kostanje	IPT-422	20	3,533	0,525	0,508	-0,033 ns
P12	Topići, Baška voda	IPT-387	19	3,518	0,434	0,490	0,114***
P13	Vrgorac	IPT-397	20	3,791	0,500	0,555	0,100 ns
P14	Vrgorac	IPT-383	19	3,307	0,533	0,577	0,076*
P15	Vrgorac	IPT-386	17	2,986	0,404	0,397	-0,019 ns
P16	Drinovci	IPT-403	18	3,155	0,486	0,472	-0,031 ns
P17	Vitina, Mostar	IPT-385	20	2,980	0,425	0,464	0,083 ns
P18	Mostar	IPT-395	15	2,941	0,225	0,349	0,356***
P19	Mostar	IPT-393	20	3,952	0,450	0,486	0,073 ns
P20	Oključina, Vis	IPT-394	17	2,603	0,463	0,477	0,029 ns
P21	Čarsko polje, Korčula	IPT-399	20	4,075	0,588	0,524	-0,121 ns
P22	Zavalatica, Korčula	IPT-401	19	3,878	0,461	0,467	0,014 ns
P23	Ponikve, Pelješac	IPT-400	20	3,736	0,575	0,557	-0,033 ns
P24	Dubrovnik	IPT-392	18	2,641	0,396	0,356	-0,112 ns
P25	Pavlje Brdo, Konavle	IPT-384	17	2,779	0,427	0,398	-0,073 ns

N – veličina uzorka; N_{ar}—alelno bogatstvo; H_O—zapažena heterozigotnost; H_E—očekivana heterozigotnost; F_{IS}—koeficijent samooplodnje (ns–nije značajno; * značajno pri P < 0,05; ** značajno pri P < 0,01; *** značajno pri P < 0,001

(P10) i Vrgorca (P14) do 0,591 između populacija iz Labinaca (P02) i Rovinja (P04). Najveću prosječnu genetsku diferenciju pokazali su tradicijski kultivari s područja Istre (0,357), a najmanju oni s područja južne Dalmacije (0,198). Analiza molekularne varijance (engl. *Analysis of molecular variance*; AMOVA; Excoffier i sur., 1992.) provedena u programu ARLEQUIN (Excoffier i Lischer, 2010.) pokazala je da većinu genetske raznolikosti (76,43 %) uvjetuju razlike između jedinki unutar populacija, no signifikantna vrijednost ($P < 0{,}0001$) parametra ϕ_{ST} između populacija ukazala je na postojanje populacijske strukture.

Bayesovska analiza populacijske strukture provedena pomoću programa STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000.) pokazala je najvišu vrijednost parametra ΔK (12,57) pri hipotezi o postojanju dvije genetske skupine ($K = 2$). Postotak pripadnosti (Q) genetskoj skupini A se smanjivao od sjevera prema jugu kako se povećavao postotak pripadnosti genetskoj skupini B. Populacije karakteristične za genetsku skupinu A ($Q > 90$ %) bile su tri istarske populacije (P01, P02, P04), ali i populacija s Visa (P20), dok je najviši postotak pripadnosti genetskoj skupini B zapažen kod populacija iz južne Dalmacije (P22 - P25). Shodno tome, većina populacija koje su nastale miješanjem dviju genetskih skupina ($Q < 75$ %) potjecala je iz Dalmatinskog zaleđa (P10; P11-P15).

Srodstveni odnosi između analiziranih populacija prikazani su filogenetskom mrežom (Slika 3.20.) izrađenom po metodi sparivanja susjeda (engl. *neighbor-net*) u programu SplitsTree4 (Huson i Bryant, 2006.) na temelju matrice standardne genetske udaljenosti po Neiju (Nei, 1972.). Iako su se mnoge populacije podrijetlom iz iste regije pokazale genetski srodnima, postojanje niza izuzetaka ukazuje na čestu razmjenu sjemena između proizvođača iz različitih regija. Uglavnom niske vrijednosti *bootstrap* za većinu skupina na filogenetskoj mreži ukazuju na slobodan protok gena (engl. *gene flow*) između populacija raštike koje je omogućen visokom razinom stranooplodnje kod navedene biljne vrste. Time se održava visoka razina unutarpopulacijske raznolikosti, no istodobno otežava precizna karakterizacija svojstava određenog tradicijskog kultivara raštike u svrhu njegove zaštite uključivanjem na Sortnu listu Republike Hrvatske kao čuvane sorte (engl. *conservation variety*).



SLIKA 3.20. FILOGENETSKA MREŽA IZRAĐENA NA TEMELJU NEIJEVE GENETSKE UDALJENOSTI IZMEĐU 25 POPULACIJA TRADICIJSKIH KULTIVARA RAŠTIKE ANALIZIRANIH POMOĆU OSAM MIKROSATELITNIH BILJEGA. BROJEVI UZ ISPREKIDANE LINIJE OZNAČAVAJU VRIJEDNOSTI *BOOTSTRAP* VEĆE OD 50%. OZNAKE POPULACIJA SU NAVEDENE U TABLICI 3.16

3.15.4. DALJNJA ISTRAŽIVANJA

Prethodno je navedeno kako unatoč tradiciji i proširenosti uzgoja ne postoji ni jedna domaća registirana sorta raštike na sortnoj listi RH. Stoga je u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) provedena morfološka, molekularna i biokemijska karakterizacija populacija raštike s jadranskog područja te se planira daljnje prikupljanje primki i kontinuirano popunjavanje kolekcije osobito s izoliranih lokacija (otoci). Na prikupljenom materijalu već je provedeno testiranje populacija na otpornost na visoke temperature i sušu te su odabrane one koje bolje podnose oba abiotička stresa (Bauer i sur., 2022.). U daljnjim istraživanjima nastavit će se testiranje populacija na otpornost na abiotičke i biotičke stresove kako bi se izdvojile one koje će se lakše prilagoditi budućim klimatskim promjenama. Posebna pažnja će se posvetiti očuvanju genetske strukture prikupljenih tradicijskih kultivara, a što zbog visoke stranooplodnje pretpostavlja umnažanje sjemena s dovoljnog broja biljaka u uvjetima umjetne ili prostorne izolacije pojedinih populacija. Osim započetog testiranja i selekcije na abitičke i biotičke stresove, potrebno je provesti i selekciju na važna agronomska i nutritivna svojstva. Ovakvim pristupom bilo bi moguće dobiti registrirane kultivare za različite namjene, kako za prehranu ljudi i životinja, tako i za zelenu gnojidbu ili ornamentalne svrhe.

LITERATURA

Balkaya, A., Yanmaz, R., 2005. Promising kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) populations from Black Sea region, Turkey. New Zeal. J. Crop Hortic. Sci. 33, 1–7.

Batelja, K., Goreta Ban, S., Žanić, K., Miloš, B., Dumičić, G., Matotan, Z., 2009. Autochtonous kale populations (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) in Croatian coastal region. Poljoprivreda 15, 8–14.

Bauer, N., Tkalec, M., Major, N., Talanga Vasari, A., Tokić, M., Vitko, S., Ban, D., Ban, S.G., Salopek-Sondi, B., 2022. Mechanisms of Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Tolerance to Individual and Combined Stresses of Drought and Elevated Temperature. Int. J. Mol. Sci. 23, 11494.

Branca, F., L., C., Lucia, R., Argento, S., 2013. Morphological Characterization of the ECPGR Wild *Brassica* Species Collection. Acta Hortic. 1005, 157–164.

Cartea, M.E., Picoaga, A., Soengas, P., Ordás, A., 2003. Morphological characterization of kale populations from northwestern Spain. Euphytica 129, 25–32.

Christensen, S., Bothmer, R., Poulsen, G., Maggioni, L., Phillip, M., Andersen, B., Jørgensen, R., 2011. AFLP analysis of genetic diversity in leafy kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* (DC.) Alef.) landraces, cultivars and wild populations in Europe. Genet. Resour. Crop Evol. 58, 657–666.

Copeland, L.C., McDonald, M.B., 2001. Principles of Seed Science and Technology. 4th Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Demir, E., Balkaya, A., 2011. Seed development stages of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) genotypes in Turkey. Hortic. Sci. 32, 147–153.

Dixon, G.R., 2006. Origins and diversity of *Brassica* and its relatives., u: Dixon, G.R. (Ur.), Vegetable Brassicas and Related Crucifers. CABI, Wallingford, str. 1–33.

El-Esawi, M.A., Germaine, K., Bourke, P., Malone, R., 2016a. Genetic diversity and population structure of *Brassica oleracea* germplasm in Ireland using SSR markers. C. R. Biol. 339, 133–140.

El-Esawi, M.A., Germaine, K., Bourke, P., Malone, R., 2016b. AFLP analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of *Brassica oleracea* in Ireland. C. R. Biol. 339, 163–170.

Emebu, P.K., Anyika, J.U., 2011. Proximate and Mineral Composition of Kale (*Brassica oleracea*) Grown in Delta State, Nigeria. Pakistan J. Nutr. 10, 190–194.

Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. 10, 564–567.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. Genetics 131, 479–491.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. FAOSTAT Database. Rome, Italy. http://faostat3.fao.org/home/E (pristupljeno 15.5.2017.).

Gorka, S., Samnotra, R.K., Kumar, S., Chopra, S., Gupta, M., 2018. Analysis of Genetic Diversity in Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) Genotypes of Jammu and Kashmir Region based on Morphological Descriptors. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7, 2176–2181.

Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. J. Hered. 86, 485–486.

Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Mol. Biol. Evol. 23, 254–267.

Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol. 11, 424–429.

Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Herak Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D., 2016. Povrćarstvo, 3rd ed. Zrinski d.d., Čakovec.

Lotti, C., Iovieno, P., Centomani, I., Marcotrigiano, A.R., Fanelli, V., Mimiola, G., Summo, C., Pavan, S., Ricciardi, L., 2018. Genetic, Bio-Agronomic, and Nutritional Characterization of Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) Diversity in Apulia, Southern Italy. Diversity 10, 25.

Mabry, M.E., Turner-Hissong, S.D., Gallagher, E.Y., McAlvay, A.C., An, H., Edger, P.P., Moore, J.D., Pink, D.A.C., Teakle, G.R., i sur., 2021. The Evolutionary History of Wild, Domesticated, and Feral *Brassica oleracea* (Brassicaceae). Mol. Biol. Evol. 38, 4419–4434.

Maggioni, L., von Bothmer, R., Poulsen, G., Branca, F., Bagger Jørgensen, R., 2014. Genetic diversity and population structure of leafy kale and *Brassica rupestris* Raf. in south Italy. Hereditas 151, 145–158.

Nei, M., 1972. Genetic Distance between Populations. Am. Nat. 106, 283.

Nikolić, T., 2015. Flora Croatica Database. http://hirc.botanic.hr/fcd, Faculty of Science, University of Zagreb (pristupljeno 21.3.2022.).

Okumus, A., Balkaya, A., 2007. Estimation of genetic diversity Among Turkish kale populations (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) using RAPD markers. Genetika 43, 516–520.

Ožanić, S., 1938. Najvažnije vrsti povrća i njihovo gajenje u Primorju. Trgovačka tiskara Desman i drug, Split, Croatia.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. J. Hered. 86, 248–249.

Šamec, D., Kruk, V., Ivanišević, P., 2019a. Influence of Seed Origin on Morphological Characteristics and Phytochemicals Levels in *Brassica oleracea* var. *acephala*. Agronomy 9, 502.

Šamec, D., Urlić, B., Salopek-Sondi, B., 2019b. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59, 2411–2422.

Sefo, E., Matotan, Z., Knezović, Z., Karić, L., 2010. Evaluation of autochthonous kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) germplasm from Herzegovina region. Sjemenarstvo 27, 139–154.

Šutković, J., Glamoclija, P., Karic, L., Yildirim, A., 2021. Genetic Characterization of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC cultivars from Bosnia and Herzegovina. Genet. Appl. 5, 40.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17, 6463–6471.

ANALIZA LOKUSA ZA KVANTITATIVNA SVOJSTVA

4

Domagoj Šimić i Zlatko Šatović

4.1. UVOD

Mnogim svojstvima od značenja, kako za evoluciju tako i za oplemenjivanje bilja, nije u potpunosti poznata genetska osnova, budući da nije poznato koji geni i koliko je gena uključeno u njihovu pojavnost. Ovakva složena svojstva nazivaju se kvantitativnima i predmet su proučavanja kvantitativne genetike već više od jednog stoljeća (Wallace i sur., 2013.; Bernardo, 2020.b). U početku je bilo vrlo teško odrediti broj gena i njihove učinke na kvantitativna svojstva. To je bilo moguće isključivo statističkim metodama, pri čemu se izdvaja jedno stoljeće stara Castle-Wright-ova formula (Castle, 1921.; Wright, 1968.; Lynch i Walsh, 1998.). Prema najjednostavnijoj verziji procjenitelj minimalnog broja efektivnih gena (n_e) bio bi:

$$n_e = \frac{\left(\overline{P}_1 - \overline{P}_2\right)^2}{8V}$$

gdje su $\overline{P}_1$ i $\overline{P}_2$ fenotipske srednje vrijednosti dviju parentalnih populacija, a V genetska varijanca F_2 generacije između tih dviju populacija. Pretpostavke su da geni nisu vezani, a da aditivni geni imaju jednaki učinak koji se razlikuje između dviju populacija, tako da je $\overline{P}_1 - \overline{P}_2 = 2n$ i $V = n/2$ i onda je n_e jednak stvarnom broju gena (n). Osnova je ovoga odnosa, što se razlika između dviju populacija razdvaja u sve više gena, genetska varijanca F_2 generacije trebala bi biti manja. Ako su geni vezani, imaju nejednak učinak, nisu aditivni ili postoji epistaza. Ovaj procjenitelj iskazuje niže vrijednosti, pa se zato govori o minimalnom broju gena ($n_e < n$). Općenito, često se susrećemo s većim brojem pretpostavki u kvantitativnoj genetici i, konkretno, u analizi lokusa za kvantitativna svojstva (engl. *Quantitative trait loci analysis; QTL analysis*). Pretpostavke će tek najnovijim agnostičkim metodama strojnog učenja u potpunosti nestati. Na povijesnom početku analiza lokusa za kvantitativna svojstva koja koristi molekularne biljege, statistička je analiza podrazumijevala da se koristi poboljšani izračun minimalnog broja gena prema Landeu (Lande, 1981.) i da se u analizi F_2 (mahom biparentalne) generacije koriste roditelji koji se bitno fenotipski razlikuju u istraživanom kvantitativom svojstvu prema klasičnoj Castle-Wright-ovoj formuli. Brzim i snažnim razvojem novih metodologija molekularne analize lokusa za kvantitativna svojstva zadnjih nekoliko desetljeća, postupno se napuštaju načela uporabe divergentnih roditelja i jednostavne biparentalne populacije.

4.2. NAČELA

Metode molekularne biologije omogućuju raščlambu genetske varijacije za kvantitativno svojstvo na doprinose pojedinačnih gena i utvrđivanje učinaka različitih alela na te gene kako bi se u konačnici odabrali genotipovi sa željenim alelima. Međutim, DNA sekvenca i točna funkcija ovih gena uglavnom nisu poznati, pa se umjesto „gena" opreznije govori o lokusima za kvantitativna svojstva (engl. *Quantitative trait loci*; QTLs; hrv. „QTL-ovi"), odnosno mjestima na kromosomima koja utječu na nasljeđivanje kvantitativnih svojstava. Collard i sur. (2005) daju tehnički nezahtjevan pregled osnovnih koncepata QTL analize. Postoji cijeli niz metoda različitih sustava molekularnih biljega koje se koriste za detekciju i identifikaciju QTL-ova, no sve metode počivaju na četiri osnovna načela (Becker, 2011.):

1. Biljni materijal za istraživanje QTL-ova mora biti genetski varijabilan,
2. Materijal mora prethodno biti karakteriziran pomoću molekularnih biljega,
3. Materijal mora prethodno biti fenotipski karakteriziran za agronomsko svojstvo od interesa,
4. Rezultati molekularne analize biljega i fenotipske analize spajaju se kako bi se mogli detektirati i identificirati QTL-ovi i izraditi genetska karta na kojoj je vidljiva pozicija identificiranih lokusa na pojedinim kromosomima.

Biljni materijal za QTL analizu ili točnije kartirajuća populacija uglavnom je jedna ili više razdvajajućih populacija; primjerice F_2 ili kasnije generacije

uzgajane u različitom stupnju srodstva, ili povratni križanci, samooplodne linije, linije dobivene slučajnim međukrižanjem u jednoj ili više generacija (engl. *random mated lines*), ili dihaploidne linije dobivene iz jedne ili više populacija. U počecima QTL-analiza, razvoj kartirajućih populacija bio je najmukotrpniji proces koji može trajati više uzgojnih godina, pogotovo što je za kartirajuću populaciju trebalo proizvesti što više jedinki – linija kako rezultati ne bi bili pristrani (engl. *biased*) prema detekciji zapravo nepostojećih QTL-ova. Zbog toga je u posljednje vrijeme uvriježeno da broj linija po kartirajućoj populaciji ne bi trebao biti manji od 200 jedinki (Becker, 2011), ili čak 250 (Bernardo, 2020a). Međutim, neovisno o veličini kartirajućih populacija koje mogu sadržavati i po nekoliko tisuća linija, ukupni broj nepristrano detektiranih lokusa zapravo je samo broj razdvajajućih QTL-ova, a ne ukupni broj QTL-ova koje kontroliraju pojedino svojstvo. Dakle, i ovdje se radi o nekom minimalnom broju „gena" slično kao i kod Castle-Wright-ove formule.

U novije vrijeme, karakterizacija kartirajuće populacije pomoću molekularnih biljega naziva se genotipizacija koja je sastavni dio i analize genetske raznolikosti kada imamo više kartirajućih populacija ili kada se analiziraju samooplodne (inbred) linije *per se,* odnosno neke druge primke pojedinih biljnih vrsta. Fenotipska se karakterizacija zove i fenotipizacijom, koja predstavlja zapravo dio uobičajene rutine u klasičnom oplemenjivanju bilja upražnjavane daleko prije molekularnog oplemenjivanja.

Detekcija i identifikacija QTL-ova u združenoj statističkoj analizi genotipizacije i fenotipizacije posljednji je i najosjetljivi korak u analizi lokusa za kvantitativna svojstva. Niz se statističkih metoda rabi ili se rabilo kako za detekciju (ima li „pravih" QTL-ova uopće), tako i za identifikaciju (gdje se detektirani QTL-ovi nalaze na kromosomu). Kearsey i Farquhar (1998.) daju prvu kritiku tadašnje QTL metodologije naglašavajući da metode detekcije i identifikacije nisu precizne, pa je razvoj statističkih metoda zadnjih desetljeća zajedno s razvojem metoda genotipizacije išao uglavnom u smjeru povećane preciznosti analize. Pri tome, važno je reći da točnost detekcije i identifikacije nije nikada općenito dovedena u pitanje: novije preciznije metode nakon nekoliko desetljeća mogle su mahom potvrditi točne rezultate starijih i jednostavnijih statističkih analiza.

4.3. STATISTIČKE METODE

Uobičajene statističke metode za analizu lokusa za kvantitativna svojstva su analiza pojedinačnih biljega (engl. *single-marker analysis*), jednostavno kartiranje intervala (engl. *simple interval mapping*; SIM), sastavljeno kartiranje intervala (engl. *composite interval mapping*; CIM) i višestruko kartiranje intervala (engl. *multiple interval mapping*; MIM).

4.3.1. Analiza pojedinačnih biljega

Analiza pojedinačnih biljega (engl. *single-marker analysis*) najjednostavnija je metoda za detekciju lokusa za kvantitativna svojstva i provodi se za svaki biljeg posebno (Soller i sur., 1976.; Weller, 1986.; Edwards i sur., 1987.; Stuber i sur., 1987.). Pretpostavka je da je QTL povezan s određenim biljegom ukoliko su fenotipske vrijednosti analiziranog svojstva signifikantno različite između genotipova biljega. Ako je pretpostavljeni QTL vezan s biljegom M uz učestalost rekombinacije *r*, povezanost između vrijednosti svojstva i obrasca razdvajanja biljega može se izraziti kao:

$$y_j = \mu + f(M_j) + \varepsilon_j$$

gdje je y_j vrijednost svojstva jedinke *j*, μ prosjek populacije, $f(M_j)$ funkcija genotipa biljega, a ε_j rezidualna pogreška povezana s jedinkom j^{th}.

Očekivana vrijednost funkcije $f(M_j)$ ovisi o genetskoj vrijednosti genotipa pretpostavljenog QTL-a i povezanosti (*r*) između biljega i QTL-a, a može se izračunati upotrebom uvjetnih vjerojatnosti:

$$Pr(Q_k|M_j) = \frac{Pr(Q_k M_j)}{Pr(M_j)}$$

gdje je $Pr(Q_k|M_j)$ uvjetna vjerojatnost da je genotip QTL-a Q_k, ukoliko je genotip biljega M_j,, $Pr(Q_kM_j)$ je zajednička vjerojatnost, a $Pr(M_j)$ marginalna vjerojatnost koja ovisi o tipu populacije za kartiranje. Srednja vrijednost svojstva za genotip biljega M_j izračunava se kao:

$$\mu_{M_j} = \sum_{k=1}^{K} \mu_{Q_k} \times Pr(Q_k|M_j)$$

gdje je μ_{Mj} srednja vrijednost genotipa biljega M_j, μ_{Qk} je srednja vrijednost genotipa QTLa Q_k, $Pr(Q_k|M_j)$ uvjetna vjerojatnost da je genotip QTL-a Q_k, ukoliko je genotip biljega M_j.

U populaciji povratnog križanja nastaloj križanjem F_1 generacije i homozigotnog roditelja (*MmQq* x *MMQQ*), srednja vrijednost svojstva za genotip biljega *MM* je:

$$\mu_{MM} = \mu_{QQ} \times Pr(QQ|MM) + \mu_{Qq} \times Pr(Qq|Mm).$$

Na temelju pretpostavke da su biljeg *M* i QTL vezani uz učestalost rekombinacija *r*, srednja vrijednost svojstva genotipskih klasa biljega *MM* i *Mm* je:

$$\mu_{MM} = (1-r)\mu_{QQ} + r\mu_{Qq}$$

$$\mu_{Mm} = r\mu_{QQ} + (1-r)\mu_{Qq},$$

te je tako razlika između srednjih vrijednosti svojstava između genotipskih klasa jednaka:

$$\mu_{MM} - \mu_{Mm} = (1-2r)(\mu_{QQ} - \mu_{Qq})$$

Stoga je nulta hipoteza koju treba testirati:

$$H_0: \mu_{MM} - \mu_{Mm} = 0.$$

Ukoliko je nulta hipoteza odbačena (srednje vrijednosti svojstva se razlikuju između genotipskih klasa biljega), zaključujemo da postoji QTL koji je povezan s analiziranim biljegom. Statističke metode kojima se navedena hipoteza može provjeriti uključuju analizu varijance (ANOVA) ili linearnu regresiju.

Glavna je prednost analize pojedinačnih biljega jednostavnost, pri čemu nije potrebna genetska karta i analiza se može provesti uobičajenim računalnim programima. Nedostatak je analize pojedinačnih biljega nemogućnost istovremene procjene lokacije QTL-a i njegovog učinka. Lokacija QTL-a može se nazrijeti analizom biljega za koje postoje najveće razlike između prosjeka genotipskih klasa, no procijenjeni će učinak QTL-a izračunat za pojedini biljeg biti manji od stvarnog učinka pretpostavljenog QTL-a kao rezultat rekombinacija između biljega i QTL-a. Budući da nije moguće razlučiti lokaciju od učinka QTL-a statistička je snaga testa smanjena, naročito u slučaju nedovoljno saturirane genetske karte. Štoviše, ovom se metodom ne može odrediti je li biljeg vezan s jednim ili više QTL-ova.

4.3.2. Jednostavno kartiranje intervala

Primjenom metode Jednostavnog kartiranja intervala (*simple interval mapping*; SIM) (Lander i Botstein, 1989.) koriste se rezultati dobiveni izradom genetske karte te se umjesto analize pojedinačnih biljega analiziraju intervali između susjednih gena uzduž kromosoma. Ako su biljezi A i B vezani uz učestalost rekombinacija r, a QTL je lociran između ta dva biljega i to s učestalosti rekombinacija r_1 s A i r_2 s B, odnos između navedenih učestalosti rekombinacije je $r = r_1 + r_2 - 2r_1r_2$ ako pretpostavimo odsutnost interferencije. Ukoliko pretpostavimo da je interferencija potpuna jer je učestalost rekombinacija vrlo niska te je dvostruko cross-over rijetka pojava, formulu možemo reducirati na $r = r_1 + r_2$. U tom slučaju lokaciju QTL-a možemo izraziti na relativan način u odnosu na interval između biljega A i B tako da je $\rho = r_1/r$ i $1-\rho = r_2/r$. Ukoliko su poznati podaci o genotipu biljega, moguće je izračunati uvjetne vjerojatnosti genotipova QTL-a u svakoj poziciji između susjednih biljega.

Prateći dva biljega u populaciji povratnog križanja nastaloj križanjem F_1 generacije i homozigotnog roditelja (*AaBb* x *AABB*), očekujemo pojavu

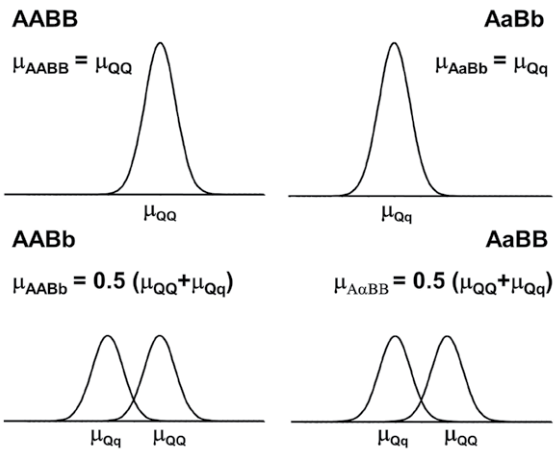
četiri genotipske klase biljega (*AABB*, *AABb*, *AaBB*, *AaBb*). Očekivana učestalost genotipa QTL-a ovisi o njegovoj lokaciji između dva biljega. Ako se QTL nalazi na sredini intervala tako da je $\rho = r_1/r = 0{,}5$ očekivane učestalosti genotipa QTL-a ovisno o genotipovima omeđujućih biljega su:

GENOTIP QTL-A	GENOTIP OMEĐUJUĆIH BILJEGA			
	AABB	AABB	AABB	AABB
QQ	1,0	0,5	0,5	0,0
Qq	0,0	0,5	0,5	0,0

Predpostavimo da vrijednosti svojstva imaju normalnu raspodjelu te da svaki genotip biljega/QTL-a ima identičnu varijancu (σ^2). Ukoliko znamo genotipove omeđujućih biljega, uvjetne fenotipske vrijednosti prate ili jednostavne normalne raspodjele (u slučaju genotipova *AABB* i *AaBb*) ili pak kombinaciju dvaju normalnih raspodjela s različitim srednjim vrijednostima (μ_{QQ}, μ_{Qq} u slučaju genotipova *AABb* i *AaBB*) kao što je to prikazano na Slici 4.1.

GENOTIP BILJEGA	GENOTIP BILJEGA I QTL-A	OČEKIVANE RASPODJELE VRIJEDNOSTI KVANTITATIVNOG SVOJSTVA
AABB	AAQQBB	$N(\mu_{QQ}, \rho^2)$
AABb	AAQQBb i AAQqBb	$(1 - \rho) \times N(\mu_{QQ}, \rho^2) + \rho \times N(\mu_{Qq}, \rho^2)$
AaBB	AaQQBB i AaQqBB	$\rho \times N(\mu_{QQ}, \rho^2) + (1 - \rho) \times N(\mu_{Qq}, \rho^2)$
AaBb	AaQqBb	$N(\mu_{Qq}, \rho^2)$

Ukoliko QTL nije između ta dva biljega, srednje vrijednosti svojstva svih genotipskih klasa biljega trebale bi biti jednake. Ukoliko se pretpostavljeni QTL nalazi između ta dva biljega, možemo izračunati procjenitelje maksimalne vjerodostojnosti za sva tri parametra ($\hat{\mu}_{QQ}$, $\hat{\mu}_{Qq}$, $\hat{\sigma}^2$) koji su definirani kao vrijednosti, pri kojima uvjetna vjerojatnost da



SLIKA 4.1. OČEKIVANE RASPODJELE VRIJEDNOSTI SVOJSTVA ZA ČETIRI GENOTIPSKE KLASE BILJEGA U POPULACIJA POVRATNOG KRIŽANJA U SLUČAJU DA SE QTL NALAZI NA SREDINI INTERVALA IZMEĐU BILJEGA A I B ($\rho = R_1/R = 0{,}5$)

zapaženi podaci proizlaze iz te hipoteze postiže svoju maksimalnu vrijednost. U svrhu testiranja signifikantnosti učinka pretpostavljenog QTL možemo izračunati vrijednost LOD (*likelihood of odds*) između vjerodostojnosti dvije hipoteze:

$$LOD = log_{10}\left[\frac{L(H_1)}{L(H_0)}\right]$$

gdje je, $L(H_0)$ funkcija vjerodostojnosti nulte hipoteze pri kojoj se QTL ne nalazi u analiziranom intervalu L ($\mu_{QQ} = \mu_{Qq} = \mu$), a $L(H_1)$ je funkcija vjerodostojnosti modela koji uključuje postojanje QTL-a u analiziranom intervalu QTL, ($\hat{\mu}_{QQ} = \hat{\mu}_{Qq} = \hat{\sigma}^2$) . Vrijednost LOD stoga je mjerilo vjerodostojnosti nazočnosti QTL-a u analiziranom intervalu u usporedbi s vjerodostojnošću nepostojanja QTL-a. Vrijednost LOD izračunava se za svako mjesto u intervalu (npr. za svaki cM). Vrijednosti LOD mogu se nacrtati uzduž skupina vezanih gena i ukoliko prelaze kritičnu vrijednost ukazuju na postojanje QTL-a u analiziranoj kromosomskoj regiji. Najvjerojatnija je pozicija QTL ona na kojoj je vrijednost LOD-a najveća.

Jednostavno kartiranje intervala ima niz prednosti pred analizom pojedinačnih biljega. Analizom usko vezanih biljega moguće je prevladati problem

pojave rekombinacija između biljega i QTL-a te tako povećati vjerojatnosti identifikacije QTL-a uz točnu procjenu njegovog učinka. Međutim, ukoliko postoji više QTL-ova koji razdvajaju u analiziranoj populaciji jednostavno kartiranje intervala ne uzima u obzir genetsku varijancu uzrokovanu QTL-ovima izvan intervala koji se analizira, što naročito dolazi do izražaja u slučaju vezanih QTL-ova kao i prilikom postojanja interakcija između QTL-ova.

4.3.3. Sastavljeno kartiranje intervala

Sastavljeno kartiranje intervala (*Composite interval mapping*; CIM) (Jansen i Stam, 1994.; Zeng, 1994.) kombinira jednostavno kartiranje intervala i višestruku regresiju na biljege koji su povezani s QTL-ovima, a koji su izvan intervala koji se analizira. U slučaju Jednostavnog kartiranja intervala procjena učinka QTL-a bit će pristrana ukoliko postoji više QTL-ova. Stoga se u sastavljenom kartiranju intervala dodatni biljezi uključuju u model kao kovarijable (kofaktori) prilikom analize određenog intervala u svrhu kontrole genetskog zaleđa. Tako se pokušava eliminirati genetska varijanca drugih QTL-ova, pri čemu se smanjuje rezidualna varijanca i povećava snaga testa u svrhu identifikacije QTL-a.

U populaciji povratnog križanja analiza intervala između biljega i i i+1 pomoću jednostavnog kartiranja intervala (SIM) može se izraziti sljedećim statističkim modelom:

$$y_j = \beta_0 + \beta_i X_{ij} + \varepsilon_j$$

gdje je, y_j vrijednost svojstva jedinke j; β_0 je odsječak regresijskog pravaca koji predstavlja srednju vrijednost svojstva u populaciji; β_i je nagib regresijskog pravaca koji predstavlja genetski učinak pretpostavljenog QTL-a koji se nalazi između biljega i i i+1, a X_{ij} je indikatorska varijabla (engl. *dummy variable*) koja ima vrijednost 1 u slučaju genotipa biljega *AABB*, 0 za *AaBb*, 1-ρ i ρ za *AaBB*, ρ i 1- ρ za *AABb*, a ε_j je rezidual modela.

U slučaju analize navedenog intervala pomoću sastavljenog kartiranja intervala u model uključeni su i dodatni biljezi (K) koji se nalaze izvan intervala između biljega i i i+1, tako da se model može izraziti kao:

$$y_j = \beta_0 + \beta_i X_{ij} + \sum_{k \neq i, i+1}^{K} \beta_k X_{kj} + \varepsilon_j$$

gdje je β_k parcijalni regresijski koeficijent biljega k, a X_{kj} je indikatorska varijabla biljega k i jedinke j, koja ima vrijednost 1, ukoliko je genotip biljega *AA* odnosno 0 za *Aa*.

U svrhu testiranja signifikantnosti učinka pretpostavljenog QTL-a, vrijednost LOD može se izračunati kao logaritam omjera vjerodostojnosti potpunog i reduciranog modela, pri čemu reducirani model pretpostavlja da se u analiziranom intervalu ne nalazi QTL:

$$y_j = \beta_0 + \sum_{k \neq i, i+1}^{I} \beta_k X_{kj} + \varepsilon_j.$$

Dodavanjem kofaktora smanjuje se varijanca uzrokovana QTL-ovima koji se nalaze izvan analiziranog inervala na način da se blokira njihov dopinos cjelokupnoj genetskoj varijanci svojstva, te se tako povećava snaga testa. Međutim, ostaje problem kako odrediti koji bi biljezi trebali biti uključeni kao kofaktori u model.

Iako postoji niz provizornih rješenja (npr. korištenje jednog biljega po kromosomu, korištenje omeđujućih biljega pretpostavljenog QTL-a), biljezi koji će biti korišteni kao kofaktori u Sastavljenom kartiranju intervala obično se identificiraju postupnom regresijom prema naprijed (engl. *Forward Stepwise Regression*; FS), prema natrag (engl. *Backward Elimination Regression*; BE) ili prema naprijed i prema natrag (engl. *Forward Backward Stepwise Regression*; FB). Tim se postupcima biljezi rangiraju po njihovim učincima na kvantitativno svojstvo izračunom parcijalne F-statistike pomoću linearne regresije. Ne postoji opće pravilo koliko bi se biljega trebalo uključiti u model, no previsok broj kofaktora može smanjiti statističku snagu testa, naročito ukoliko je veličina populacije relativno mala.

Nakon određivanja biljega koji će se uključiti u model kao kofatkori Sastavljenim se kartiranjem intervala na sustavan način mogu identificirati višestruki QTL-ovi. Međutim, Zeng i sur. (1999.) saželi su ograničenja upotrebe Sastavljenog kartiranja intervala na sljedeći način: (a) analiza je pristrana zbog nejednolike raspodjele biljega po genomu, što znači da je snaga testa u regijama u kojima postoji mnogo biljega znatno veća od one u regijama u kojima je broj biljega manji; (b) nije moguće procijeniti zajednički genetski učinak vezanih QTL-ova; (c) Sastavljeno kartiranje intervala ne rješava problem epistatičkih interakcija; (d) upotreba vezanih biljega kao kofaktora može znatno smanjiti statističku snagu testa.

4.3.4. Višestruko kartiranje intervala

U višestrukom kartiranju intervala (engl. *Multiple interval mapping*; MIM; Kao i Zeng, 1997.; Kao i sur., 1999.; Zeng i sur., 1999.) istovremeno se analizira više intervala u svrhu identifikacije više QTL-ova, te za procjenu njihovih pojedinačnih kao i epistatičkih učinaka. Višestruko kartiranje intervala model je koji se temelji na (a) genetskom modelu po Cockerhamu (Cockerham, 1954.) za procjenu genetskih parametera i modeliranje odnosa između vrijednosti svojstva i genetskih parametara, te (b) metodi maksimalne vjerodostojnosti za procjenu genetskih parametara (Kao i sur., 1999.). Višestruko kartiranje intervala stoga je kombinacija analize lokusa za kvantitativna svojstva i analize genetske arhitekture kvantitativnih svojstava, a sastoji se od četiri faze (Zeng i sur., 1999.): (a) *Faza procjene vjerodostojnosti*: analiza vjerodostojnosti genetskog modela (broj, pozicije i epistatičke interakcije QTL-ova), (b) *Faza potrage:* izbor najboljeg genetskog modela, (c) *Faza procjene parametara*: kvantitativnog svojstva na temelju izabranog modela (broj, pozicije i epistatičke interakcije QTL-ova, te genetske varijance i kovarijance objašnjenje učincima QTL-ova), te (d) *Faza predikcije*: procjena genotipske vrijednosti jedinki i njihovog potomstva na temelju izabranog genetskog modela.

U usporedbi s Jednostrukim i Sastavljenim kartiranjem intervala, Višestruko kartiranje intervala obično je snažniji test te preciznije detektira QTL-ove. Štoviše, moguće je procijeniti epistatičke interakcije između QTL-ova, genotipske vrijednosti jedinki kao i heritabilnost kvantitativnog svojstva. Budući da je broj mogućih genetskih modela ogroman, nije moguće sa sigurnošću tvrditi je li izabrani model stvarno i najbolji (globalni maksimum) ili je to samo lokalni maksimum, dok optimalan model nije niti uzorkovan. Kako god bilo, višestruko kartiranje intervala kombinira i ujedinjava tri vrlo značajna znanstvena pristupa analizi nasljeđivanja kvantitativnim svojstvima: analiza lokusa za kvantitativna svojstva, analiza genetske arhitekture svojstva i odabir pomoću biljega (engl. *marker-assisted selection*; MAS).

4.4. POZICIJA I UČINCI QTL-A

4.4.1. Kritične vrijednosti

Da bi se određeni QTL smatrao signifikantnim, vrijednost LOD mora biti veća od određene kritične vrijednosti. Morton (Morton, 1955) je na temelju teorije sekvencionalnog testiranja predložio kritičnu vrijednost tri u svrhu dokazivanja veze između dva lokusa na karti. U slučaju analize lokusa za kvantitativna svojstva kritična vrijednost od LOD = 3 znači da je hipoteza o postojanju QTL na određenoj poziciji tisuću puta vjerodostojnija od nulte hipoteze (QTL nije na toj poziciji).

Budući da analiza lokusa za kvantitativna svojstva uključuje višestruka testiranja po cjelokupnom genomu, nominalna kritična vrijednost povećava razinu pogreške tipa I (odbacivanje nulte hipoteze kada je ona istinita). Ukoliko se provodi n neovisnih testova na razini signifikantnosti α, vjerojatnost da se barem u jednom slučaju odbacuje nulta hipoteza, iako je istinita je (Lynch i Walsh, 1998):

$$\gamma = 1 - (1 - \alpha)^n$$

Bonferronijeva korekcija za višestruke usporedbe nalaže ukoliko želimo da je signifikantnost cjelokupnog

pokusa na razini γ, svaki pojedinačni test treba se temeljiti na razini signifikantnosti:

$$\alpha = 1 - (1 - \gamma)^{\frac{1}{n}}$$

gdje je, α razina pogreške pojedinačnog testa (engl. *comparison-wise error rate*), γ razina pogreške cjelokupnog pokusa (engl. *experiment-wise error rate*), a *n* je broj međusobno ovisnih testova (odnosno broj intervala koji se analiziraju).

Robusniji pristup nalaže upotrebu postupka poduzorkovanja, kao što su npr. permutacijski testovi. U permutacijskom testu fenotipske se vrijednosti jedinki slučajno permutiraju, dok genotipovi biljega ostaju konstantni. Analiza lokusa za kvantitativna svojstva provodi se na originalnom setu podataka kao i na većem broju permutiranih setova (npr. 1.000 ili 10.000) u svrhu utvrđivanja razine pogreške tipa I (Churchill i Doerge, 1994.).

4.4.2. Pozicije QTL-ova i intervali pouzdanosti

Iako je najvjerojatnija pozicija QTL-a na karti ona na kojoj je postignuta najveća vrijednost LOD, poznavanje intervala pouzdanosti (regija u kojoj se QTL nalazi s određenom vjerojatnoću) ključno je za učinkovitu upotrebu omeđujućih biljega u postupku odabira pomoću biljega (engl. *marker-assisted selection*; MAS). Upotrebom pravila jednog LOD-a (engl. *one-LOD rule*) krajnje su točke intervala pouzdanosti one na kojima je vrijednost LOD-a za jedan manja od one procijenjene na poziciji QTL-a (Conneally i sur., 1985.; Lander i Botstein, 1989.). Na temelju simulacija van Ooijen (1992.) je zaključio da je vjerojatnost postojanja QTL na razini $P < 0{,}05$ u intervalu pouzdanosti od dvije LOD vrijednosti. Visscher i sur. (1996.) su u svrhu određivanja intervala pouzdanosti predložili neparametrijsku tehniku temeljenu na poduzorkovanju *bootstrap* (Efron, 1979.). Poduzorci *bootstrap* iste su veličine kao i izvorni set podataka, a tvore se postupkom uzorkovanja s ponavljanjima podataka (kombinacije s ponavljanjem) koji se sastoje od genotipa biljega i fenotipa (vrijednosti kvantitativnog svojstva). Na temelju većeg broja (1.000 i više) poduzoraka bootstrap utvrđuje se empirijska raspodjela učestalosti, te 95 %-tni interval povjerenja pozicije određenog QTL-a.

4.4.3. Genetski učinci

Nakon utvrđivanja pozicije QTL-a, moguće je procijeniti genetski učinak i način djelovanja QTL-a. Genetski učinak QTL izračunava se na temelju vrijednosti svojstva pojedinih genotipskih klasa QTL koja se procjenjuje na onoj poziciji na kojoj je vrijednost LOD maksimalna. Definicije genetskih učinaka identične su onima koje se koriste u klasičnoj kvantitativnoj genetici (Falconer i Mackay, 1996.), te ovise o fenotipskim vrijednostima pojedinih genetskih klasa određene populacije za kartiranje:

GENOTIP QTL-A	OČEKIVANA VRIJEDNOST SVOJSTVA		
	BC	F_2	RIL
QQ	μ + g	μ + a	μ + a
Qq	μ - g	μ + d	N/A
qq	N/A	μ - a	μ - a

U populaciji povratnog križanja (BC) genetski je učinak (g) kombinacija aditivnog (a) i dominacijskog učinka i može se izračunati pomoću sljedeće formule:

$$g = \frac{\mu_{QQ} - \mu_{Qq}}{2}$$

gdje je, *g* genetski učinak QTL-a, a μ_{QQ} i μ_{Qq} fenotipske su vrijednosti svojstva homozigotne i heterozigotne genotipske klase QTL-a. Dok se u populaciji povratnog križanja dominacijski učinak ne može razdvojiti od aditivnog učinka zbog nepostojanja jedne homozigotne genotipske klase, F_2 populacija omogućava procjenu i aditivnog (a) i dominacijskog (d) učinka:

$$a = \frac{\mu_{QQ} - \mu_{qq}}{2}$$

$$d = \mu_{Qq} - \frac{\mu_{QQ} + \mu_{qq}}{2}$$

U populaciji rekombinantnih inbred linija (RIL) moguće je procijeniti samo aditivni učinak (d), dok procjena dominacijskog učinka (d) nije moguća jer ne postoji heterozigotna genotipska klasa.

4.4.4. Udio varijance objašnjen QTL-om

Na kraju je moguće i procijeniti udio fenotipske varijance analiziranog svojstva objašnjen pretpostavljenim QTL-om:

$$r^2 = \frac{(\sigma_0^2 - \sigma_1^2)}{\sigma^2}$$

gdje je, r^2 udio fenotipske varijance objašnjen QTL-om, σ_1^2 varijanca je pri nultoj hipotezi (H0: ne postoji QTL u intervalu), σ^2 rezidualna varijanca pri alternativnoj hipotezi (H1: postoji QTL u intervalu, a σ^2 je ukupna fenotipska varijanca svojstva. Ukupna fenotipska varijanca objašnjena svim QTL-ovima za određeno svojstvo može se procijeniti na izravan način tako da u linearni model istovremeno uključimo biljege koji se nalaze uz svaki identificirani QTL, ali se time dobije samo približna vrijednost. Višestruko kartiranje intervala (MIM) omogućava uključivanje više QTL-a u model. Na taj se način može procijeniti ukupna fenotipska varijanca objašnjena svim QTL-ovima na točnim pozicijama imajući na umu ne samo genetske učinke (aditivnih i dominacijskih) svih QTL-ova, već i epistatičke učinke proizašle iz interakcije.

4.5. OGRANIČENJA QTL ANALIZA

Međutim, u praksi ukupni udio fenotipske varijance analiziranog svojstva objašnjen svim detektiranim QTL-ovima najčešće je oko 50 % (Bernardo, 2020.a). Štoviše, udio fenotipske varijance za složena svojstva kao što je prinos, malen je: između 1 i 5 %, budući da većina QTL-ova s malim genetskim učincima ostaju zapravo nedetektirana. Glavno je pitanje je li klasična analiza lokusa svrsishodna u slučaju složenih kvantitativnih svojstava koji su kontrolirani s mnogo lokusa malog učinka. Štoviše, modernije pridružujuće kartiranje podesnije je za takva svojstva, pogotovo što ovdje nema potrebe za razvojem kartirajućih populacija. S druge strane, oplemenjivači bilja ionako rutinski razvijaju svoje razdvajajuće populacije u sklopu svojih oplemenjivančkih programa, pa informacije dobivene QTL analizom mogu biti oplemenjivački korisne. To se pogotovo odnosi na kvantitativna svojstva koja su kontrolirana s nekoliko lokusa velikih učinaka. Nadalje, visoki udio fenotipske varijance analiziranog svojstva pojavljuje se redovito kod interspecies i drugih vrlo divergentnih križanaca gdje su maksimizirane razlike za neko kvantitativno svojstvo između roditelja kartirajuće populacije.

Osnovna ograničenja pri detekciji QTL-ova s malim genetskim učincima mala je snaga detekcije i nepoklapanje QTL-ova kroz više kartirajućih populacija. Snaga detekcije QTL-ova je funkcija veličine kartirajuće populacije i heritabilnosti (Lande i Thompson, 1990.), što znači da se veličina kartirajuće populacije mora dodatno povećavati za svojstvo niske heritabilnosti. Primjerice, snaga detekcije 10 QTL-ova pri heritabilnosti od 0,30 i veličine F_2 populacije od 100 linija je samo 0,12. Nepoklapanje QTL-ova pokazana je u mnogim publikacijama gdje se ponekad prikazuju sasvim različiti setovi identificiranih QTL-ova u različitim kartirajućim populacijama (Bernardo, 2020.a). Možda još veći problem predstavlja detekcija zapravo nepostojećih QTL-ova (engl. *false positives*) (Kearsey i Farquhar, 1998.) kao rezultata, između ostaloga, male veličine kartirajućih populacija. Pristranost (engl. *bias*) i pogreška uzorkovanja procijenjenog udjela genotipske varijance objašnjenog QTL-ovima mogu biti veliki, no oni se mogu smanjiti uporabom različitih validacijskih modela (Utz i sur., 2000.; Melchinger i sur., 2004.; Schön i sur., 2004.). Sva ova veća ograničenja razriješena su detekcijom i identifikacijom QTL-ova pomoću modernijih metoda pridružujućeg kartiranja.

LIITERATURA

Becker, H., 2011. Pflanzenzüchtung 2. Auflage. Ulmer, UTB GmbH, Stuttgart.

Bernardo, R., 2020.a. Reinventing quantitative genetics for plant breeding: something old, something new, something borrowed, something BLUE. Hered. 2020 1256 125, 375–385.

Bernardo, R., 2020.b. Breeding for Quantitative Traits in Plants. Third Edition. Stemma Press, Woodbury, MN, USA.

Castle, W.E., 1921. An Improved Method of Estimating the Number of Genetic Factors Concerned in Cases of Blending Inheritance. Science (80-.). 54, 223–223.

Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138, 963–971.

Cockerham, C.C., 1954. An Extension of the Concept of Partitioning Hereditary Variance for Analysis of Covariances among Relatives When Epistasis Is Present. Genetics 39, 859–882.

Conneally, P.M., Edwards, J.H., Kidd, K.K., Lalouel, J.M., Morton, N.E., Ott, J., White, R., 1985. Report of the Committee on Methods of Linkage Analysis and Reporting. Cytogenet. Cell Genet. 40, 356–359.

Edwards, M.D., Stuber, C.W., Wendel, J.F., 1987. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. Genetics 116, 113–125.

Efron, B., 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. Ann. Stat. 7, 1–26.

Falconer, D., Mackay, T., 1996. Introduction to quantitative genetics. Prentice Hall.

Jansen, R.C., Stam, P., 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136, 1447–1455.

Kao, C.H., Zeng, Z..B., 1997. General Formulas for Obtaining the MLEs and the Asymptotic Variance- Covariance Matrix in Mapping Quantitative Trait Loci When Using the EM Algorithm. Biometrics 53, 653.

Kao, C.H., Zeng, Z.B., Teasdale, R.D., 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. Genetics 152, 1203–1216.

Kearsey, M.J., Farquhar, A.G.L., 1998. QTL analysis in plants; where are we now? Hered. 1998 802 80, 137–142.

Lande, R., 1981. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. Genetics 99, 541–553.

Lander, E.S., Botstein, S., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121, 185.

Lynch, M., Walsh, B., 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Assocs. Inc., Sunderland, MA 980.

Melchinger, A.E., Utz, H.F., Schön, C.C., 2004. QTL analyses of complex traits with cross validation, bootstrapping and other biometric methods. Euphytica 2004 1371 137, 1–11.

Morton, N.E., 1955. Sequential tests for the detection of linkage. Am. J. Hum. Genet. 7.

Schön, C.C., Utz, H.F., Groh, S., Truberg, B., Openshaw, S., Melchinger, A.E., 2004. Quantitative trait locus mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. Genetics 167, 485–498.

Soller, M., Brody, T., Genizi, A., 1976. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. Theor. Appl. Genet. 47, 35–39.

Stuber, C.W., Edwards, M.D., Wendel, J.F., 1987. Molecular Marker-Facilitated Investigations of Quantitative Trait Loci in Maize. II. Factors Influencing Yield and its Component Traits1. Crop Sci. 27, 639–648.

Utz, F.H., Melchinger, A.E., Schön, C.C., 2000. Bias and Sampling Error of the Estimated Proportion of Genotypic Variance Explained by Quantitative Trait Loci Determined From Experimental Data in Maize Using Cross Validation and Validation With Independent Samples. Genetics 154, 1839.

van Ooijen, J.W., 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. Theor. Appl. Genet. 1992 847 84, 803–811.

Visscher, P.M., Thompson, R., Haley, C.S., 1996. Confidence Intervals in Qtl Mapping by Bootstrapping, u: Genetics. Oxford University Press, str. 1013.

Wallace, J.G., Larsson, S.J., Buckler, E.S., 2014. Entering the second century of maize quantitative genetics. Heredity (Edinb). 112, 30–38.

Weller, J.I., 1986. Maximum Likelihood Techniques for the Mapping and Analysis of Quantitative Trait Loci with the Aid of Genetic Markers. Biometrics 42, 627.

Wright, S., 1968. Evolution and the genetics of populations. I. Genetic and biometric foundations. University of Chicago Press.

Zeng, Z.B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136, 1457–1468.

Zeng, Z.B., Kao, C.H., Basten, C.J., 1999. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. Genet. Res. 74, 279–289.

ANALIZA LOKUSA ZA KVANTITATIVNA SVOJSTVA
STUDIJE SLUČAJA

Kukuruz
Pšenica

4.6. Istraživanja lokusa kvantitativnih svojstava kukuruza u Hrvatskoj

DOMAGOJ ŠIMIĆ

4.6.1. UVOD

Kvantitativna je genetika kod kukuruza, kao modelne i ključne poljoprivredne biljne vrste, vrlo razvijena i ima dugu tradiciju. Hallauer i sur. (2010.) daju iscrpan pregled uporabe metoda kvantitativne genetike u oplemenjivanju kukuruza neulazeći neposredno u metode molekularnog oplemenjivanja. Također, nije uključena niti procjena minimalnog broja efektivnih gena kao klasičnog parametra (Castle-Wright formula), budući da je oplemenjivačima kukuruza od vrlo ograničene koristi zbog niza genetičkih i oplemenjivačkih pretpostavki koje bi trebale biti ispunjene (Šimić i Hallauer, 2001.). Međutim, pojavom molekularnih analiza lokusa za kvantitativna svojstva, Castle-Wright formula učinila se interesantnom kao paralelni statistički parametar za procjenu broja gena. Najveći je izazov razviti populaciju u kojoj bi se vezanost i nejednaki učinci alela drastično smanjili. Stoga Hallauer i suradnici razvijaju međukrižanu (engl. *random mated*) populaciju od dvaju roditelja, inbred linija B73 i Mo17 koju međukrižaju tijekom 10 generacija kako bi se dobila približna Hardy-Weinbergova genetička ravnoteža. Uspoređujući nekoliko verzija Castle-Wright formule, rezultati pokazuju da je moguće u velikoj populaciji (>1000) detektirati nekoliko desetaka gena koji kontroliraju visinu biljke i visinu do klipa (Šimić i Hallauer, 2001.).

Već su prve prave QTL analize pokazale da je većina agronomski značajnih svojstava kod kukuruza kontrolirana većim brojem gena maloga učinka koji pojedinačno uglavnom ne prelaze 5 % ukupne varijacije (Wallace i sur., 2014.). Zbog malog uzorka i malog broja biljega, broj detektiranih QTL-ova bio je tada vrlo skroman. Kasnije, naprednije QTL analize, s većim populacijama i većim brojem biljega identificirale su genetsku varijaciju raspoređenu na nekoliko desetaka gena koje kontroliraju niz najvažnijih svojstava kod kukuruza; primjerice za sadržaj ulja u zrnu (Laurie i sur., 2004.), datum cvatnje (Buckler i sur., 2009.), otpornost na bolesti (Kump i sur., 2011.), arhitekturu lista (Tian i sur., 2011.) sadržaja ukupnih proteina, škroba i ulja (Cook i sur., 2012.). Vrlo je rijetko utvrđeno da je pojedino svojstvo kontrolirano s manjim brojem QTL-ova velikog učinka, primjerice - sadržaj karotenoida u zrnu (Wallace i sur., 2014.). Buckler i sur. (2009.) zaključuju da nije detektiran niti jedan QTL s velikim učinkom od detektiranih 36 i 39 QTL-ova za svojstva broj dana do polinacije, odnosno broj dana do svilanja, ali su objasnili 89 % ukupne varijance kroz osam okolina. Osim toga su utvrdili nepotpuno poklapanje QTL-ova kroz više kartirajućih populacija.

Počevši s prvim pionirskim radom (Helentjaris i sur., 1986.) pa do danas, više tisuća znanstvenih radova objavljeno je o QTL-ovima na kukuruzu. Prema bazi podataka „Web of Science Core collection", natuknice „QTL+maize" generiraju izlistanje od >2700 indeksiranih znanstvenih radova (Web of Science Databases, 2022.). U referentnoj bazi „Maize genetics and genomic database" prikupljeno je više od 1700 različitih QTL-ova za različita svojstva s podrobnim opisima (Woodhouse i sur., 2021.). S druge strane, znanstvenih članaka koji se bave QTL analizom kod kukuruza u Hrvatskoj je vrlo malo. Natuknica „QTL+maize+Croatia" generira izlistanje od samo 12 radova nakon filtriranja od članaka koji QTL-ove spominju, ali nisu predmet istraživanja. Od toga, u dva rada sudjeluju hrvatski znanstvenici na pokusima i materijalu izvan okvira oplemenjivačkih programa u Hrvatskoj (Vaz Patto i sur., 2008.; Mendes-Moreira i sur., 2015.).

Pregled svih objavljenih znanstvenih radova o QTL analizi na kukuruzu u Hrvatskoj prikazan je u Tablici 4.1. Pionirski rad Kozumplik i sur. (1996.) godine uključivao je dvije kartirajuće populacije stvorene u Hrvatskoj i potječu iz Hrvatske, što zasigurno predstavlja jedinstven doprinos. U tom radu korišteni su izozimi, RFLP-ovi i SSR-ovi kao molekularni biljezi u relativno malim populacijama. Svi sljedeći znanstveni radovi o QTL analizi u razdoblju od 2009. do 2020. godine uključivali su po samo jednu kartirajuću populaciju i to B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) stvorenu na Poljoprivrednom institutu Osijek i četiri puta međukrižanu populaciju B73×Mo17 nazvanu IBM (Syn4) nastalu u Sjedinjenim Američkim Državama (Lee i sur., 2002). Osnovni razlozi zašto je korištena populacija IBM (Syn4) jesu: i) značajno je produžena genetska karta generirana uslijed dodatnih rekombinacija nastalih međukrižanjem (smanjena vezanost gena), ii) značajno je više polimorfnih molekularnih biljega različite provenijencije, i iii) radi se o referentnoj populaciji koju su koristili istraživači diljem svijeta. Od 2017. godine, kao kartirajuću populaciju koristilo se set testkrižanaca te populacije koja je omogućila i analizu QTL-ova za prinos zrna (Galić i sur., 2017.).

Prvi rad nakon Kozumplik i sur. (1996.), objavljen je tek trinaest godina kasnije (Šimić i sur., 2009.) u kojem je predstavljena genetska karta populacije B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) sastavljena od 121 polimorfnog biljega podjednako raspoređenih po cijelom genomu. Slično kao kod Helentjaris i sur. (1986.), težište ovoga rada bilo je prikazati genetske karakteristike pojedinih biljega i samu genetsku kartu. U idućim radovima s pravim QTL analizama, fenotipizirana su kvantitativna svojstva koncentracije elemenata (Cd, Cu, Fe, K, Mg, Sr, P, Zn) u listu i zrnu (Sorić i sur., 2009., 2011.; Šimić i sur., 2012.; Zdunić i sur., 2014.). Od ovih znanstvenih radova izdvaja se rad Sorić i sur. (2009.) u kojem je detektiran jedan QTL s velikim učinkom („major-gen") za koncentraciju kadmija u listu koji je objasnio čak 49,8 % fenotipske varijance. Osim toga, u radu Šimić i sur. (2012.) prvi je put obuhvaćena interakcija QTL×okolina koja će kao posebni izazov biti predmet istraživanja u većini narednih publikacija.

Od 2014. godine nadalje, fenotipizacija za QTL analize obuhvaćala je različita kvantitativna svojstva: parametre fluorescence klorofila (Šimić i sur., 2014.; Galić i sur., 2019.a), sadržaj ulja, proteina i hektolitarska masa (Galić i sur., 2017.), tolerantnost na biotske stresove (Galić i sur., 2019.b; Brkić i sur., 2020.), kao i prinos u uvjetima blagog i umjerenog toplinskog stresa (Galić i sur., 2019.a). Potonje istraživanje provedeno na šest okolina u Hrvatskoj i Turskoj ukazalo je na očekivano nepoklapanje prepoznatih QTL-ova na okolinama u kojima je prisutan toplinski stres različitoga intenziteta. Galić i sur. (2017.) koristili su ~92.000 filtriranih biljega iz javne baze podataka genotipizacije IBM (Syn4) populacije dobivenih metodom genotipizacije sekvenciranjem (GBS).

Iz Tablice 4.1. vidljivo je da je tijekom vremena povećan ukupan broj polimorfnih biljega u istraživanjima, što je trend koji se geometrijskom progresijom nastavlja i dalje. Od početnih 33 biljega (Kozumplik i sur., 1996.) preko setova od 121, 142 i ~2170 biljega u kasnijim radovima do značajno većih setova od ~40.000 i 600.000 biljega u novijim radovima (Mazur i sur., 2019.; Galić i sur., 2020.a; Galić i

TABLICA 4.1. **PREGLED OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH ČLANAKA O QTL ANALIZI NA KUKURUZU U OKVIRU OPLEMENJIVAČKIH PROGRAMA U HRVATSKOJ**

KARTIRAJUĆA POPULACIJA	VELIČINA KARTIRAJUĆE POPULACIJE	SUSTAV MOLEKULARNIH BILJEGA	UKUPAN BROJ POLIMORFNIH BILJEGA	FENOTIPIZIRANA KVANTITATIVNA SVOJSTVA	BROJ DETEKTIRANIH QTL-OVA	OBUHVAĆENA INTERAKCIJA QTL×OKOLINA	REF.
L131f x Lnf1 (F_3) / L131f x L219 (F_3) *per se*	40/40	Izozimi, RFLP, SSR	33	prinos visina biljke broj dana do polinacije	2/1 3/2 3/3	ne	Kozumplik i sur., 1996.
B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) *per se*	294	SSR, SNP	121	-	-	-	Šimić i sur., 2009.
B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) *per se*	290	SSR, SNP	121	koncentracija Cd u listu	1	ne	Sorić i sur., 2009.
B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) *per se*	290	SSR, SNP	121	koncentracija u listu Cd/Cu/Fe/K/Mg/Sr	3/1/3/1/1/2	ne	Sorić i sur., 2011.
B84×Os6-2 ($F_{3:2}$) *per se*	294	SSR, SNP	142	koncentracija u zrnu P/Fe/Fe:P/Zn/Zn:P/Mg/Mg:P	8/3/7/1/1/4/8	da	Šimić i sur., 2012.
IBM (Syn4) *per se*	205	različiti	2178	parametri fluorescence klorofila TRABS/ETTR/ABSRC/ETRC/DIRC/TRDI/PIABS	1/1/1/2/2/2/1	da	Šimić i sur., 2014.
IBM (Syn4) *per se*	203	različiti	2161	koncentracija u listu Cd/Cu/Fe/K/Mg/Sr	1/1/2/1/2/2	da	Zdunić i sur., 2014.
IBM (Syn4) testkrižanci	276	različiti/GBS SNP	2178/~92000	sadržaj ulja sadržaj proteina hektolitarska masa	1 1 4	ne	Galić i sur., 2017.
IBM (Syn4) testkrižanci	221	različiti	2178	parametri fluorescence klorofila blagi stres RCABS/PIABS/ prinos umj. stres RCABS/PIABS/ prinos	3/1/1 2/1/1	da	Galić i sur., 2019.a
IBM (Syn4) testkrižanci	191	različiti	2178	intenzitet zaraze *Fusarium* truleži klipa	1	da	Galić i sur., 2019.b
IBM (Syn4) *per se*	207	različiti	2178	Tolerantnost na kukuruznu zlaticu oštećenje/sek. porast/veličina	7/5/5	da	Brkić i sur., 2020.

sur., 2020.b) koji ne pripadaju u nejasan podskup radova o analizi lokusa kvantitativnih svojstava u užem smislu, već u analizu QTL-ova pomoću pridružujućeg kartiranja.

4.6.2. LOKUSI KVANTITATIVNIH SVOJSTAVA ZA SVOJSTVA BIOFORTIFIKACIJE U ZRNU KUKURUZA

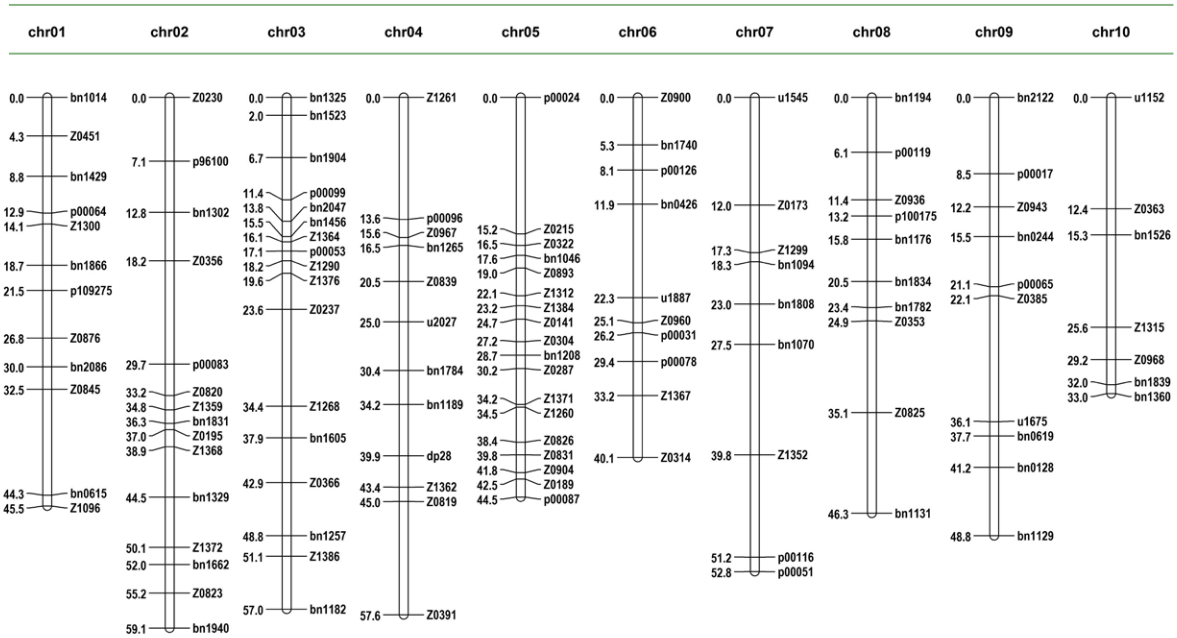
Biofortifikacija je proces obogaćivanja biljnih kulturnih vrsta povećanjem koncentracija esencijalnih ili beneficijalnih minerala i/ili povećanjem njihove bioraspoloživosti. Dhaliwal i sur. (2022.) daju širi pregled problematike, kao i pregled važnijih metoda biofortifikacije kod ratarskih kultura. Biofortifikacija se može provesti agronomskim ili genetičkim pristupom, pri čemu genetički pristup može biti proveden putem klasičnog i molekularnog oplemenjivanja, odnosno genetičkim preinačavanjem. Tijekom prošloga desetljeća, analiza lokusa kvantitativnih svojstava kod kukuruza također je dala svoj doprinos. Ciljevi ovoga rada bili su utvrditi i) QTL-ove za koncentraciju fosfora (P), željeza (Fe), cinka (Zn) i magnezija (Mg), ii) QTL-ove za bioraspoložive sadržaje Fe, Zn i Mg u zrnu jedne kartirajuće populacije kukuruza. Bioraspoloživost ovih metala u zrnu kukuruza smanjena je sadržajem fosfora, odnosno njegovim spojem fitatom koji čini 80 % ukupnog P u zrnu kukuruza, pa se raspoloživost Fe, Zn i Mg može izračunati kao kvocijent koncentracije tih metala i koncentracije ukupnog P u zrnu (Fe/P, Zn/P, Mg/P).

Dvije genetski divergentne inbred linije kukuruza B84 i Os6-2 značajno različitog ionomskog profila križane su u svrhu stvaranja kartirajuće populacije. Od tog križanca razvijena je populacija od 294 $F_{2:3}$ linija (Šimić i sur., 2009.b). Fenotipizacija tih linija *per se* provedena je tijekom tri vegetacijske godine u poljskim pokusima postavljenim u Osijeku prema 30 × 10 alpha planu u dva ponavljanja. Uzorci zrna uzeti su u punoj fiziološkoj zriobi na pet prethodno ručno samooplođenih klipova po liniji kako bi se izbjegle ksenije. Ionomski profili svih linija napravljeni su na Institutu za pedologiju i agrokemiju u Budimpešti nakon mljevenja uzoraka pomoću induktivno spregnute plazme – optičke spektrometrije (*inductively coupled plasma – optical spectometry*). Bioraspoloživost sadržaja Fe, Zn i Mg procijenjeni su kao omjeri koncentracije Fe/P, Zn/P i Mg/P koji su ekvivalentni molarnim omjerima P/Fe, P/Zn i P/Mg uz pretpostavku da je udio fitata u ukupnom sadržaju P konstantan. Konstantan udio fitata empirijski je utvrđen kemijskom analizom na parentalnim linijama u kemijskom laboratoriju Instituta za kukuruz „Zemun polje" u Beogradu, Srbija.

Genotipizacija je provedena na 294 $F_{2:3}$ linija pomoću seta polimorfnih molekularnih biljega koji su u konačnici uključivali 65 mikrosatelita (*simple sequence repeats;* SSRs) i 56 SNP-ova (*single nucleotide polymorphism*; SNP). Sveukupna DNA analiza učinjena je u TraitGenetics GmbH, Njemačka prema standardnim protokolima (Šimić i sur., 2009.a). U prosjeku su SNP biljezi imali samo 1,5 % nedostajućih podataka, jedan SNP biljeg pokazao je dominantno nasljeđivanje, a kod drugih pet utvrđena je značajna segregacijska distorzija (Šimić i sur., 2009.a). Svi biljezi (121 biljeg) uspješno su kartirani prema Haldaneovoj funkciji čineći genetsku kartu duljine od 484,6 cM s prosječnom udaljenošću između biljega od 4,4 cM (Slika 4.2.). Uspoređujući ovu kartu s drugim tadašnjim javno dostupnim genetskim kartama, utvrđena je istovjetnost pozicija svih biljega, te ukupno dobra kvaliteta karte koja omogućuje valjanu QTL analizu.

Za analizu lokusa kvantitativnih svojstava primijenila se metoda sastavljenog kartiranja intervala koristeći regresijski pristup uz kofaktore. Kofaktori su automatski odabrani pomoću korištenog softwarea PLABQTL (Utz i Melchinger, 1996.) i dodani u model s F-to-enter = 3,5. Empirijski prag LOD vrijednosti određen je testiranjem 1000 permutacija podataka (Churchill i Doerge, 1994.). Udio fenotipske varijance analiziranih svojstava objašnjenih detektiranim QTL-ovima prilagođen je brojem parametara u višestrukoj regresiji (Hospital i Charcosset, 1997.).

U rezultatima ovoga rada prikazani su histogrami s raspodjelama učestalosti za istraživana kvantitativna svojstva, srednje vrijednosti po okolinama, kao



SLIKA 4.2. GENETSKA KARTA NA BAZI 121 POLIMORFNOG BILJEGA DETEKTIRANIH U $F_{2:3}$ LINIJAMA POPULACIJE KUKURUZA B84×OS6-2 STVORENIH NA POLJOPRIVREDNOM INSTITUTU OSIJEK. RELATIVNA POZICIJA BILJEGA IZRAŽENA JE U CM LIJEVO OD KROMOSOMSKIH STUPIĆA (PREMA ŠIMIĆ I SUR., 2009.A).

i analiza varijance koja uključuje i dvočimbenične interakcije genotip × okolina i QTL × okolina. Potonja je interakcija bila uglavnom statistički značajna na razini P≤0,05. Heritabilnost je bila između 0,53 i 0,71. Najvažnija je tablica koja prikazuje LOD vrijednosti, broj značajnih QTL-ova i prilagođene postotke fenotipske i genotipske varijance (Tablica 4.2.). Empirijski pragovi LOD vrijednosti bili su između 3,92 i 4,13 kojima su deklarirani značajni QTL-ovi. Najviše njih (8) detektirano je za kon-

TABLICA 4.2. LOD VRIJEDNOSTI UTVRĐENE TESTIRANJEM 1000 PERMUTACIJA PODATAKA (CHURCHILL I DOERGE, 1994.), BROJ ZNAČAJNIH QTL-OVA, PRILAGOĐENI POSTOTAK FENOTIPSKE VARIJANCE (R^2_{ADJ}) I GENOTIPSKE VARIJANCE (Q_2) OBJAŠNJENIH DETEKTIRANIM QTL-OVIMA ZA SEDAM SVOJSTAVA BIOFORTIFIKACIJE U ZRNU KUKURUZA.

SVOJSTVO	LOD VRIJEDNOST - EMPIRIJSKI PRAG (α = 0,05)	BROJ ZNAČAJNIH QTL-OVA	R^2_{ADJ}	Q_2
P	4,13	8	28,4	44,3
Fe	4,07	3	21,1	17,0
Fe/P	4,09	7	33,2	49,7
Zn	4,04	1	4,2	6,4
Zn/P	3,96	1	3,6	7,3
Mg	4,00	4	21,0	35,3
Mg/P	3,92	8	46,4	66,5

centraciju P i omjer Mg/P objašnjavajući sveukupno 28,4 %, odnosno 46,4 % fenotipske varijance. Pojedini QTL-ovi za Mg/P objašnjavaju čak više od 10 % fenotipske varijance i raspoređeni su po svim kromosomima kukuruza. Utvrđeni su statistički značajni aditivni učinci za sve istraživane QTL-ove ukazajući da su svojstva biofortifikacije zrna kod kukuruza kontrolirana mahom brojnim QTL-ovima maloga učinka predviđenim jednostavnim aditivnim modelom.

Općenito, utvrđeni su jednostavni mehanizmi nasljeđivanja akumulacije minerala u zrnu kukuruza, ponajviše najvažnijih elemenata Fe, Zn i Mg, što ima direktne implikacije na programe oplemenjivanja za ova svojstva. Nadalje, moguće je istovremeno postići povećane koncentracije minerala uz zadržavanje njihove bioraspoloživosti koje su dostižne u samo nekoliko generacija selekcije, zbog vjerojatno manjeg broje gena koji kontroliraju svojstva biofortifikacije. Važnost ovih rezultata prepoznati su i u recentnim znanstvenim člancima koji ukazuju na globalni problem nedostatka minerala u ljudskoj prehrani, pogotovo ondje gdje je kukuruz osnovna namirnica (Hossain i sur., 2022.; Kumar i sur., 2022.).

LITERATURA

Brkić, A., Šimić, D., Jambrović, A., Zdunić, Z., Ledenčan, T., Raspudić, E., Brmeţ, M., Brkić, J., Mazur, M., Galić, V., 2020. Qtl analysis of western corn rootworm resistance traits in maize IBM population grown in continuous maize. Genetika 52, 137–148.

Buckler, E.S., Holland, J.B., Bradbury, P.J., Acharya, C.B., Brown, P.J., Browne, C., Ersoz, E., Flint-Garcia, S., Garcia, A., i sur., 2009. The genetic architecture of maize flowering time. Science (80-.). 325, 714–718.

Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138, 963–971.

Cook, J.P., McMullen, M.D., Holland, J.B., Tian, F., Bradbury, P., Ross-Ibarra, J., Buckler, E.S., Flint-Garcia, S.A., 2012. Genetic Architecture of Maize Kernel Composition in the Nested Association Mapping and Inbred Association Panels. Plant Physiol. 158, 824–834.

Dhaliwal, S.S., Sharma, V., Shukla, A.K., Verma, V., Kaur, M., Shivay, Y.S., Nisar, S., Gaber, A., Brestic, M., Barek, V., Skalicky, M., Ondrisik, P., Hossain, A., 2022. Biofortification-A Frontier Novel Approach to Enrich Micronutrients in Field Crops to Encounter the Nutritional Security. Molecules 27, 1340.

Galić, V., Anđelković, V., Kravić, N., Grčić, N., Ledenčan, T., Jambrović, A., Zdunić, Z., Nicolas, S.D., Charcosset, A., Šatović, Z., Šimić, D., 2020.a. First results on diversity patterns and selective sweeps in a Southeast European panel of maize inbred lines as combined with two West European panels. Preprint. bioRxiv 376087.

Galić, V., Franic, M., Jambrovic, A., Ledencan, T., Brkic, A., Zdunic, Z., Simic, D., 2019.a. Genetic correlations between photosynthetic and yield performance in maize are different under two heat scenarios during flowering. Front. Plant Sci. 10, 566.

Galić, V., Franić, M., Jambrović, A., Zdunić, Z., Brkić, A., Šimić, D., 2017. QTL mapping for grain quality traits in testcrosses of a maize biparental population using genotyping-by-sequencing data. Poljoprivreda 23, 28–33.

Galić, V., Mazur, M., Brkić, A., Brkić, J., Jambrović, A., Zdunić, Z., Šimić, D., 2020.b. Seed Weight as a Covariate in Association and Prediction Studies for Biomass Traits in Maize Seedlings. Plants 9, 275.

Galić, V., Šimić, D., Franić, M., Brkić, A., Jambrović, A., Brkić, J., Ledenčan, T., 2019.b. Analysis of Fusarium ear rot and fumonisin contamination in testcrosses of a maize biparental population. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 19, 40–46.

Hallauer, A.R., Carena, M.J., Filho, J.B.M., 2010. Quantitative Genetics in Maize Breeding (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., Nienhuis, J., 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72, 761–769.

Hospital, F., Charcosset, A., 1997. Marker-Assisted Introgression of Quantitative Trait Loci. Genetics 147, 1469–1485.

Hossain, F., Zunjare, R.U., Muthusamy, V., Bhat, J.S., Mehta, B.K., Sharma, D., Talukder, Z.A., Chhabra, R., Katral, A., Dutta, S., Chand, G., Bhatt, V., Mishra, S.J., Gain, N., Kasana, R., Ikkurti, G., Duo, H., 2022. Biofortification of Maize for Nutritional Security, u: Biofortification of Staple Crops. Springer Singapore, str. 147–174.

Kozumplik, V., Pejic, I., Senior, L., Pavlina, R., Graham, G., Stuber, C., 1996. Use of molecular markers for QTL detection in segregating maize populations derived from exotic germplasm. Maydica 41, 211–218.

Kumar, S., Dikshit, H.K., Mishra, G.P., Singh, A., Aski, M., Virk, P.S., 2022. Biofortification of Staple Crops: Present Status and Future Strategies, u: Biofortification of Staple Crops. Springer Singapore, str. 1–30.

Kump, K.L., Bradbury, P.J., Wisser, R.J., Buckler, E.S., Belcher, A.R., Oropeza-Rosas, M.A., Zwonitzer, J.C., Kresovich, S., McMullen, M.D., Ware, D., Balint-Kurti, P.J., Holland, J.B., 2011. Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. Nat. Genet. 2011 432 43, 163–168.

Laurie, C.C., Chasalow, S.D., LeDeaux, J.R., McCarroll, R., Bush, D., Hauge, B., Lai, C., Clark, D., Rocheford, T.R., Dudley, J.W., 2004. The genetic architecture of response to long-term artificial selection for oil concentration in the maize kernel. Genetics 168, 2141–2155.

Lee, M., Sharopova, N., Beavis, W.D., Grant, D., Katt, M., Blair, D., Hallauer, A., 2002. Expanding the genetic map of maize with the intermated B73 x Mo17 (IBM) population. Plant Mol. Biol. 48, 453–461.

Mazur, M., Brkić, A., Šimić, D., Brkić, J., Jambrović, A., Zdunić, Z., Galic, V., 2019. Genomewide analysis of biomass responses to water withholding in young plants of maize inbred lines with expired plant variety protection certificate. Preprint. bioRxiv 704668.

Mendes-Moreira, P., Alves, M.L., Satovic, Z., Dos Santos, J.P., Santos, J.N., Souza, J.C., Pêgo, S.E., Hallauer, A.R., Vaz Patto, M.C., 2015. Genetic Architecture of Ear Fasciation in Maize (*Zea mays*) under QTL Scrutiny. PLoS One 10, e0124543.

Šimić, D., Hallauer, A., 2001. Information from Castle-Wright experiment. Maize Genet. Coop. Newsl. 75, 3–4.

Šimić, D., Ledencan, T., Jambrović, A., Zdunić, Z., Brkić, J., Brkić, A., Mladenović-Drinić, S., Brkić, I., Mladenović, S., 2009.a. SNP and SSR marker analysis and mapping of a maize population. Genetika 41, 237–246.

Šimić, D., Lepeduš, H., Jurković, V., Antunović, J., Cesar, V., 2014. Quantitative genetic analysis of chlorophyll a fluorescence parameters in maize in the field environments. J. Integr. Plant Biol. 56, 695–708.

Šimić, D., Mladenović Drinić, S., Zdunić, Z., Jambrović, A., Ledenan, T., Brkić, J., Brkić, A., Brkić, I., 2012. Quantitative trait loci for biofortification traits in maize grain. J. Hered. 103, 47–54.

Šimić, D., Sudar, R., Ledenčan, T., Jambrović, A., Zdunić, Z., Brkić, I., Kovačević, V., 2009.b. Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. J. Cereal Sci. 50, 392–397.

Sorić, R., Ledenčan, T., Zdunić, Z., Jambrović, A., Brkić, I., Lončarić, Z., Kovačević, V., Šimić, D., 2011. Quantitative trait loci for metal accumulation in maize leaf. Maydica 56, 323–329.

Sorić, R., Loncaric, Z., Kovacevic, V., Brkic, I., Simic, D., 2009. A major gene for leaf cadmium accumulation in maize (*Zea mays* L.), u: The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. UC Davis, California, USA, str. 1–6.

Tian, F., Bradbury, P.J., Brown, P.J., Hung, H., Sun, Q., Flint-Garcia, S., Rocheford, T.R., McMullen, M.D., Holland, J.B., Buckler, E.S., 2011. Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. Nat. Genet. 43, 159–162.

Utz, H.F., Melchinger, A.E., 1996. PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. J Quant Trait Loci 2, 1–5.

Vaz Patto, M.C., Moreira, P.M., Almeida, N., Satovic, Z., Pego, S., 2008. Genetic diversity evolution through participatory maize breeding in Portugal. Euphytica 161, 283–291.

Wallace, J.G., Larsson, S.J., Buckler, E.S., 2014. Entering the second century of maize quantitative genetics. Heredity (Edinb). 112, 30–38.

Web of Science Databases, 2022. Web of Science Core Collection. Clarivate Analytics. https://clarivate.com/products/web-of-science/databases/ (pristupljeno 17.3.2022).

Woodhouse, M.R., Cannon, E.K., Portwood, J.L., Harper, L.C., Gardiner, J.M., Schaeffer, M.L., Andorf, C.M., 2021. A pan-genomic approach to genome databases using maize as a model system. BMC Plant Biol. 21, 1–10.

Zdunić, Z., Grljušić, S., Ledenčan, T., Duvnjak, T., Šimić, D., 2014. Quantitative trait loci mapping of metal concentrations in leaves of the maize IBM population. Hereditas 151, 55–60.

4.7. Analiza lokusa za kvantitativno svojstvo povezano s otpornošću pšenice na priježetveno proklijavanje

HRVOJE ŠARČEVIĆ, BRUNO RAJKOVIĆ I ZLATKO ŠATOVIĆ

4.7.1. UVOD

Krušna ili obična pšenica, *Triticum aestivum* L., iz porodice trava (Poaceae), nastala je prije oko 10.000 godina na području Plodnog polumjeseca. Aloheksaploidna je vrsta koja ima tri podgenoma, A, B i D (genomska formula: 2n = 6x = 42 kromosoma, genomski kod: AABBDD). Krušna je pšenica evoluirala tijekom dva događaja spontanog križanja (Petersen i sur., 2006.; Mayer i sur., 2014.) koji su uključivali tri diploidne divlje vrsta iz tribusa *Triticeae*: vrstu *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan (donor podgenoma A), nepoznatog bliskog srodnika vrste *Aegilops speltoides* Tausch (donor podgenoma B) i vrstu *Aegilops tauschii* Coss. (donor podgenoma D). Nakon svakog križanja uslijedilo je spontano udvostručenje kromosoma koje je omogućilo normalno sparivanje kromosoma (tvorbu bivalenta) u mejozi i time nastanak fertilnih križanaca. Spomenute tri vrste imaju jednak broj kromosoma (2n = 2x = 14). Pretpostavlja se da se prvo križanje dogodilo između donora podgenoma A i B što je rezultiralo alotetraploidnom divljom pšenicom *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (Asch. & Graebn.) Thell. (2n = 4x = 28; AABB), divljim pretkom kulturnog pira dvozrnca (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* (Schrank ex Schübl.) Thell.) kao i tvrde ili durum pšenice (*Triticum turgidum* ssp. *durum* (Desf.) Husn.), koja se danas uzgaja širom svijeta radi proizvodnje tjestenine. Spontanim križanjem tetraploidne vrste *Triticum turgidum ssp. dicoccoides* (AABB) i diploidne *Aegilops tauschii* (DD) nastao je aloheksaploidni predak današnje krušne pšenice *Triticum aestivum* L. S 21 parom kromosoma, krušna je pšenica strukturno alopoliploid s tri homeologna seta od sedam kromosoma u svakom od triju podgenoma. Međutim, genetski se ponaša kao diploid jer je sparivanje homeolognih kromosoma spriječeno *Ph* genima od kojih je najpoznatiji gen *Ph1* smješten na dugom kraku kromosoma 5B (Svačina i sur., 2020.). Heksaploidna priroda genoma pšenice ključna je za njezinu bolju adaptabilnost u odnosu na njezine pretke jer interakcije između triju genoma doprinose fleksibilnosti pšenice u razinama ekspresije gena (Dubcovsky i Dvorak, 2007.). Aloheksaploidni genom krušne pšenice veličine je približno 17 milijardi parova baza (17 Gb; 17 gigabaza) i osobito je kompleksan zbog brojnih genomskih preuređenja (engl. *genomic rearrangement*) koje uključuju delecije, duplikacije, inverzije i recipročne translokacije kao i vrlo visokog postotka ponavljajućih sekvenci (Mayer i sur., 2014.). Iz tih je razloga referentna sekvenca cjelokupnog genoma pšenice sastavljena znatno kasnije od referentnih sekvenci mnogih drugih biljnih vrsta.

Rezultati sekvencioniranja cjelokupnog genoma heksaploidne pšenice (Appels i sur., 2018.) pokazali su postojanje podjednakog broja kodirajućih gena u podgenomima A, B i D (35.345, 35.643 odnosno 34.212). Međutim, na osnovi studija raznolikosti germplazme pšenice različitog podrijetla pomoću različitih tipova DNA biljega uključujući biljege SNP, RFLP, SSR, AFLP i DArT, na kromosomima podgenoma D pronađen je znatno manji broj polimorfnih biljega u odnosu na homeologne kromosome podgenoma A i B (Liu i Tsunewaki, 1991.; Röder i sur., 1998.; Peng i sur., 2000.; Chao i sur., 2009.; Nielsen i sur., 2014.; Voss-Fels i sur., 2015.; Alipour i sur., 2017.; Eltaher i sur., 2018.; Ali i sur., 2022.). Niska razina polimorfizma pronađena u podgenomu D proizlazi iz evolucijske povijesti heksaploidne pšenice koja je nastala prije manje od 10.000 godina hibridizacijom tetraploidne pšenice s ograničenim brojem jedinki vrste *Aegilops tauschii* (Dvorak i sur., 1998.; Talbert i sur., 1998.). U evolucijskoj genetici ova je pojava poznata pod nazivom genetsko usko grlo uslijed poliploidizacije (engl. *polyploidy bottleneck*) (Dubcovsky i Dvorak, 2007.).

Pšenica je druga najvažnija prehrambena kultura nakon riže i najraširenija je žitarica u svijetu, koja s oko 20 % ukupnih kalorija a također i sličnim udjelom ukupnih bjelančevina sudjeluje u prehrani svjetske populacije, zbog čega je važna za globalnu sigurnost hrane (Dreisigacker i sur., 2021.). Kako bi išli ukorak s budućim zahtjevima proizvodnje pšenice, naročito u svjetlu sve većih potreba rastuće svjetske populacije za hranom, oplemenjivači se kontinuirano okreću novim tehnologijama i oplemenjivačkim strategijama. Tehnologija molekularnih biljega nudi mogućnost povećanja efikasnosti selekcije u oplemenjivanju pšenice kroz razne pristupe, kao što su selekcija potpomognuta biljezima (engl. *Marker Assisted Selection*; MAS), a u novije vrijeme i genomska selekcija (engl. *Genomic Selection*; GS). Pretpostavka je za provođenje MAS-a prethodna informacija o povezanosti određenog biljega odnosno lokusa za kvantitativno svojstvo (engl. *Quantitative trait loci*; QTL) sa svojstvom od interesa. Analiza QTL-ova kod pšenice provedena je za niz pojedinačnih svojstava pomoću metode kartiranja QTL-ova u biparentalnim populacijama ili pridružujućim kartiranjem (engl. *association mapping*) u različitim kolekcijama kultivara uz korištenje različitih vrsta molekularnih biljega. Danas su poznate tisuće QTL-ova s pripadajućim pozicijama na genomu pšenice i njihovim doprinosom fenotipskoj varijabilnosti različitih svojstava (Singh i sur., 2021.). Prvi radovi o kartiranju QTL-ova kod pšenice publicirani su u 90-im godinama prošloga stoljeća i od tada se njihov broj ubrzano povećava. Biparentalne kartirajuće populacije u tim su studijama uključivale pretežno $F_{2:3}$ potomstva, rekombinantne inbred linije (engl. *Recombinant Inbred Lines*; RILs) i potomstva udvostručenih haploida (engl. *Doubled Haploid*; DH). Međutim, od druge dekade 2.000-ih do danas raste interes za pridružujuće kartiranje na pšenici kod kojeg nema potrebe za razvojem populacije za kartiranje, budući da se ono provodi u kolekcijama kultivara i/ili oplemenjivačkih linija. Štoviše, u kolekcijama kultivara postiže se bolja razlučivost kartiranja (engl. *mapping resolution*) zbog velikog broja povijesnih događaja rekombinacije (engl. *historical recombination events*). Zanimanje za pridružujuće kartiranje kod pšenice, kao i drugih poljoprivrednih kultura, u velikoj je mjeri i posljedica brzog napretka u visokoprotočnom sekvencioniranju i tehnologijama genotipizacije, pomoću kojih su oplemenjivačima postale dostupne tisuće SNP biljega. Ipak, unatoč spomenutim prednostima u odnosu na kartiranje QTL-ova, pridružujuće se kartiranje pokazalo kao manje uspješno u pronalaženju QTL-ova jakoga učinka na ciljano svojstvo, prvenstveno zbog nemogućnosti detektiranja QTL-ova u slučaju kada je poželjni alel u maloj učestalosti u istraživanoj kolekciji genotipova (Bernardo, 2016.). Ovo je vjerojatno razlog da su QTL-ovi jakoga učinka na ciljano svojstvo, kao što je npr. *Fhb1* za otpornost na fuzarijski palež klasa kod pšenice, u pravilu otkriveni pomoću kartiranja QTL-ova u biparentalnim populacijama, a ne pomoću pridružujućeg kartiranja.

4.7.2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

Priježetveno je proklijavanje (*engl. Pre-Harvest Sprouting*, PHS) pojava klijanja sjemena u klasu dok je usjev još na polju, a događa se kod pšenice kao i kod ostalih strnih žitarica uslijed obilnih oborina, neposredno prije ili u vrijeme žetvene zriobe. Ova pojava smanjuje prinos po jedinici površine, hektolitarsku masu zrna kao i pekarsku kakvoću uslijed povećane aktivnosti α-amilaze i drugih hidrolitičkih enzima koji razgrađuju škrobne i bjelančevinaste rezerve u endospermu zrna pšenice (Derera i sur., 1989.; Šarčević i sur., 2000.; Mares i sur., 2009.). Otpornost na PHS je kompleksno kvantitativno svojstvo pod utjecajem genetskih i okolišnih faktora. Genetska komponenta otpornosti na priježetveno proklijavanje uključuju nekoliko fizioloških i morfoloških svojstava sjemena i klasa kao što su dormantnost sjemena, boja i propusnost sjemene ljuske i perikarpa, aktivnost α-amilaze te fitohormona apscizinske i giberelinske kiseline u sjemenu, oblik i zbijenost klasa, prisutnost voštane prevlake na klasu, položaj klasa u zriobi (uspravan, pognut), prisutnost osja te koncentraciju vodotopivih inhibitora klijanja u pljevicama (Šarčević i sur., 2000.; Mares i Mrva, 2014.; Ali i sur., 2019.). Dormantnost sjemena (*engl. Seed Dormancy*; SD) definirana je izostankom klijanja u uvjetima optimalnim za klijanje i najznačajnija je genetska komponenta kontrole otpornosti na priježetveno proklijavanje (Mares i Mrva, 2014.; Kumar i sur., 2015.). Rezultati velikog broja ranije publiciranih istraživana koja su uključivala fiziološke, biokemijske, genetičke i oplemenjivačke aspekte priježetvenog proklijavanja objedinjeni su u knjizi urednika Derera (1989.). Kasnijim istraživanjima fokus je bio na dormantnosti sjemena, naslanjajući se u određenoj mjeri na opsežna istraživanja dormantnosti sjemena kod ječma i riže kao i kod modelne biljne vrste, talijinog uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (Mares i Mrva, 2014.). Globalna važnost rješavanja problema priježetvenog proklijavanja rezultirala je i u više međunarodnih simpozija posvećenih priježetvenom proklijavanju kod žitarica koji se redovito održavaju od 1975. godine (Mares i Mrva, 2014.).

Gubici uzrokovani štetama uslijed priježetvenog proklijavanja na globalnoj su razini veći i od milijardu dolara godišnje (DePauw i sur., 2012.). Priježetveno proklijavanje izrazito je velik problem u područjima gdje prevladava maritimna klima poput sjeverozapada SAD-a, sjevera Japana, zapadne Australije i sjeverozapadne Europe (Lunn i sur., 2002.). Međutim, uslijed klimatskih promjena nerijetko se događa da se i na području jugoistočne Europe može zabilježiti dulji kišni period u vrijeme žetve koji uzrokuje značajne štete na usjevima pšenice zbog priježetvenog proklijavanja. Neredovita pojava priježetvenog proklijavanja na području jugoistočne Europe otežava selekciju genotipova otpornih na ovaj abiotski stres jer su zbog izostanka selekcijskog pritiska u sukcesivnim razdvajajućim generacijama oplemenjivači upućeni na testiranje otpornosti u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Ocjena otpornosti na priježetveno proklijavanje tradicionalno se provodi laboratorijskim testovima klijavosti s ovršenim zrnima (standardni testovi klijavosti) ili testovima s intaktnim klasovima (Derera i sur., 1989.; Humphreys i Noll, 2002.; Shorter i sur., 2005.; Zhu i sur., 2019.). Testovi klijavosti osiguravaju direktno mjerenje dormantnosti sjemena, dok testovi s intaktnim klasovima mogu uključivati i druge mehanizme povezane sa svojstvima klasa. Druge metode kao što su određivanje padajućeg broja prema Hagbergu (engl. *Hagberg falling number*) i mjerenje aktivnosti α-amilaze indirektne su metode za procjenu otpornosti na priježetveno proklijavanje i usmjerene su prvenstveno na procjenu štete od proklijavanja (Hagemann i Ciha, 1984.; Singh i sur., 2008.; Rasul i sur., 2012.; Martinez i sur., 2018.). Međutim, navedene su metode vremenski i radno zahtjevne, naročito u ranim razdvajajućim generacijama kada oplemenjivači moraju testirati veliki broj genotipova.

Brzi napredak u razvoju molekularnih biljega kao i statističkih metoda za detekciju QTL-ova otvara mogućnost implementiranja selekcije potpomognute biljezima (MAS) radi povećanja efikasnosti oplemenjivanja s ciljem kreiranja genotipova povećane otpornosti na priježetveno proklijavanje kod pšenice.

Do danas je otkriven velik broj QTL-ova za otpornost na priježetveno proklijavanje na kromosomima sva tri podgenoma pšenice u germplazmi australskog, kineskog, sjevernoameričkog i srednjoeuropskog podrijetla (Rehman Arif i sur., 2012.; Cabral i sur., 2014.; Lin i sur., 2016.; Ali i sur., 2019.; Wang i sur., 2020.). Međutim, QTL-ovi najvećeg učinka detektirani su na kromosomima 3A i 4A (Shao i sur., 2018.). Neki od gena koji se nalaze u blizini značajnih QTL-ova na kromosomima skupine 3 (3A, 3B i 3D) i kromosomu 4A identificirani su i njihovi su učinci na otpornost od priježetvenog proklijavanja dokumentirani, uključujući gene *TaPHS1* (Nakamura i sur., 2011.; Liu i sur., 2013.; Lin i sur., 2018.), *TaMKK3* (Shorinola i sur., 2016.; Torada i sur., 2016.), *TaVP1* (Yang i sur., 2007.) i *TaMyb10* (Lin i sur., 2016.; Wang i sur., 2016.).

Unatoč velikom broju pronađenih QTL-ova za otpornost na priježetveno proklijavanje, nedostaje informacija o njihovoj prisutnosti i učinku u germplazmi pšenice relevantnoj za oplemenjivačke programe jugoistočne Europe.

4.7.3. KARTIRANJE LOKUSA ZA KVANTITATIVNA SVOJSTVA POVEZANA S OTPORNOŠĆU NA PRIJEŽETVENO PROKLIJAVANJE KOD PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Populacija rekombinantnih inbred linija (RIL) razvijena je na Poljoprivrednom institutu Osijek iz križanja nedormantnog kultivara 'Bezostaja 1' neotpornog na posliježetveno proklijavanje i dormantnog kultivara 'Klara' koji je otporan na priježetveno proklijavanje. Prema početnim slovima roditeljskih kultivara populacija je nazvana BK. Korištenjem metode potomstva jednog sjemena (engl. *Single Seed Descent*; SSD) počevši od F2 generacije populacija je dovedena do sedme filijalne generacije (F7), nakon čega su pojedinačne linije održavane u smjesi (engl. *bulk*). Populacija BK koju je činilo 119 RIL-ova zajedno je s roditeljima 'Bezostajom 1' i 'Klarom' posijana u poljskom pokusu prema shemi slučajnoga bloknog rasporeda (engl. *Randomized Complete Block Design*; RCBD) u dvije repeticije u vegetacijskim godinama 2015./2016. i 2016./2017. na lokaciji Zagreb. Članovi pokusa sijani su u troredne parcelice površine 0,72 m². U žetvenoj je zriobi u svakoj parcelici nasumičnim izborom prikupljen uzorak od 30 klasova. Svi klasovi ručno su ovršeni i po 40 zrna svakog uzorka stavljeno je na klijanje u Petrijeve zdjelice koje su potom inkubirane u komori rasta u periodu od šest dana na 20 °C. Brojanje proklijalih sjemenki provedeno je nakon tri i šest dana. Sjemenke koje su pokazivale bilo kakav vidljiv znak razvoja vegetativnih primordija (minimalni stadij odgovara probijenom perikarpu iznad embrija), bilježena su kao proklijala. Indeks klijanja (engl. *Germination Indeks*; GI) računat je prema formuli (Ikić i sur., 2012.):

$$GI = ((6 \times D3) + (3 \times D6))/(6 \times 100)$$

gdje *D3* i *D6* predstavljaju broj proklijalih zrna treći i šesti dan od postavljanja pokusa. Indeks klijanja obrnuto je proporcionalan dormantnosti sjemena (otpornosti na priježetveno proklijavanje).

Tijekom godina analiza je varijance za indeks klijanja (GI) provedena korištenjem GLM procedure u statističkom programu SAS 9.4. (SAS Institute Inc., 2013.) prema sljedećem modelu:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + e_j + r_k(e_j) + ge_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

U modelu Y_{ijk} je GI i-tog genotipa u j-toj godini i k-toj repeticiji, gdje je μ ukupni prosjek, g_i, e_j i r_k su odstupanja genotipa, godine i repeticije od ukupnog prosjeka, ge_{ij} je interakcija genotip × godina, a ε_{ijk} je pogreška.

Heritabilnost u širem smislu, h^2, izračunata je prema formuli:

$$h^2 = \sigma_g^2/(\sigma_g^2 + \frac{\sigma_{ge}^2}{e} + \frac{\sigma_\varepsilon^2}{er})$$

gdje su σ_g^2, σ_{ge}^2 i σ_ε^2 genotipska varijanca, varijanca interakcije genotip × godina i varijanca pogreške, izračunate iz očekivanog prosječnog kvadrata u analizi varijance, a e i r broj godina odnosno repeticija.

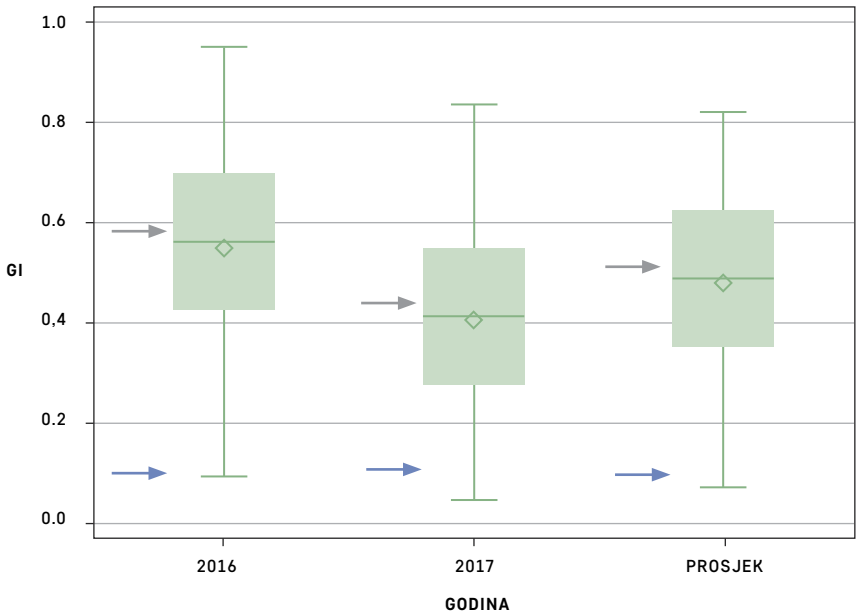
F7 potomstvo biparentalne populacije BK zajedno s roditeljima za potrebe genotipizacije uzgojeno je u komori rasta. Uzorkovano je biljno tkivo u fazi 4 do 5 listova koje se koristilo za izolaciju DNA. Uzorci DNA poslani su na University of Canberra, Bruce, Australija, na sekvenciranje pomoću DArT (engl. *Diversity Arrays Technology*) tehnologije kojom su generirani DArT SNP biljezi korišteni u ovom istraživanju. Prvotno je očitanje sadržavalo 4.874 biljega. Nakon uklanjanja biljega s nepoznatom pozicijom na kromosomu, s učestalošću heterozigotnosti većom od 30 %, te s učestalošću manje zastupljenog alela (engl. *minor alelle frequency*; *MAF*) nižom od 5 % preostalo je 1.087 DArT SNP biljega koji su korišteni u istraživanju. Skupine vezanih gena (engl. *linkage group*) konstruirane su pomoću računalnog programa MAPMAKER v3.0 (Lander i Green, 1987.) koristeći LOD vrijednost 5.0 kao prag za definiranje signifikantne povezanosti. Redoslijed biljega utvrđen je pomoću algoritma RECORD (engl. *REcombination Counting and ORDering*) uz daljnje podešavanje pomoću algoritma SARF (engl. *Sum of Adjacent Recombination Fractions*) u računalnom programu QTL IciMapping v4.1 (Meng i sur., 2015.). Računalni program MAPMAKER korišten je kako bi se potvrdio poredak biljega definiran računalnim programom QTL IciMapping, a učestalosti rekombinacija (engl. *recombination frequency*; *r*) između biljega konvertirane su u centiMorgane (cM) koristeći Kosambijevu (1943.) kartirajuću funkciju (engl. *mapping function*).

Analiza lokusa za kvantitativna svojstva (engl. *Quantitative Trait Loci analysis*; QTL analysis) provedena je pomoću sastavljenog kartiranja intervala (engl. *Composite interval mapping*; CIM) (Jansen i Stam, 1994.; Zeng, 1994.) i višestrukog kartiranja intervala (engl. *Multiple Interval Mapping*, MIM; Kao i sur., 1999.; Zeng i sur., 1999.) korištenjem računalnog programa Windows QTL Cartographer v2.5 (Wang i sur., 2012.). Biljezi koji su korišteni kao kofaktori u sastavljenom kartiranju intervala (CIM) izabrani su postupnom regresijom prema naprijed i prema natrag (engl. *Forward Backward Stepwise Regression*; FB). Prag za detekciju QTL-ova procijenjen je permutacijskom analizom (Churchill i Doerge, 1994.) na osnovi 1.000 permutacija. Višestruko kartiranje intervala (MIM) temeljilo se na modelu koji je uključivao QTL-ove detektirane pomoću sastavljenog kartiranja intervala (CIM). Aditivni učinci QTL-ova kao i njihove epistatske interakcije testirane su pomoću Bayesovskog informacijskog kriterija (engl. *Bayesian information crtierion*; BIC; Zeng i sur., 1999.). Na temelju konačnog modela procijenjeni su aditivni i epistatski učinci QTL-ova kao i udjeli (R^2) fenotipske varijance analiziranog svojstva koji su bili objašnjeni pretpostavljenim QTL-ovima i njihovim epistatskim interakcijama.

TABLICA 4.3. ANALIZA VARIJANCE KROZ GODINE ZA INDEKS KLIJANJA (GI)

IZVOR VARIJABILNOSTI	DF	SS	MS	EMS	*F*	*P* > *F*
Godina (E)	1	2,58	2,58			< 0,001
Genotip (G)	120	15,83	0,13	$\sigma_\varepsilon^2 + 2\sigma_{ge}^2 + 4\sigma_g^2$	6,90	< 0,001
G × E	120	2,30	0,02	$\sigma_\varepsilon^2 + 2\sigma_{ge}^2$	4,95	< 0,001
Pogreška	240	0,93	0,00	σ_ε^2		
Ukupno	483	21,95	0,05			

DF – STUPANJ SLOBODE; SS – SUMA KVADRATA; MS – PROSJEČNI KVADRAT; EMS – OČEKIVANI PROSJEČNI KVADRAT; *P* > *F* –SIGNIFIKANTNOST *F* VRIJEDNOSTI



SLIKA 4.3. DISTRIBUCIJA INDEKSA KLIJANJA (GI) KOD 119 REKOMBINANTNIH INBRED LINIJA ZA 2016. I 2017. GODINU TE PROSJEK DVIJU GODINA. PLAVA (DORMANTNI) I SIVA (NEDORMANTNI) STRELICA UPUĆUJU NA POLOŽAJ VRIJEDNOSTI GI KOD OTPORNOG RODITELJA 'KLARA' ODNOSNO NEOTPORNOG RODITELJA 'BEZOSTAJA 1'.

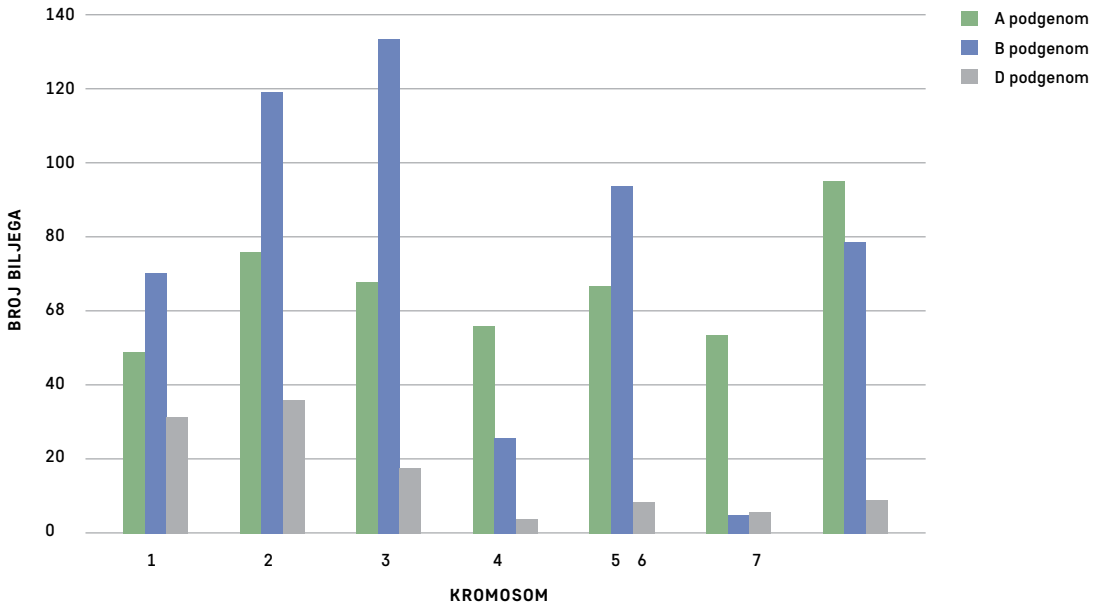
Kombinirana je analiza varijance koja je uključivala obje godine godine (Tablica 4.3.) pokazala signifikantno variranje između godina i genotipova, kao i signifikantnu interakciju genotip × godina. Heritabilnost u širem smislu za GI iznosila je 0,95.

Indeks klijanja u RIL populaciji varirao je u rasponu od 0,09 do 0,95 u 2016. te od 0,05 do 0,84 u 2017. godini. Transgresivna segregacija uočena je u RIL populaciji u obje godine, uglavnom u smjeru niže dormantnosti sjemena (Slika 4.3.), dok je samo nekoliko linija imalo izraženiju dormantnost sjemena od dormantnog roditelja 'Klara'.

Genetska karta (engl. *genetic map*, *linkage map*) konstruirana je na osnovi 1.087 visokokvalitetnih SNP biljega generiranih pomoću DArTseq tehnologije i sastojala se od 26 skupina vezanih gena (engl. *linkage groups*; LG) koje pokrivaju sve kromosome pšenice. Kromosomi 1D, 2A, 4A, 6A, i 7B podijeljeni su u dvije skupine vezanih gena.

Skupine vezanih gena bile su sastavljene od tri (LG 4D) do 133 (LG - 3B) biljega, duljina karte iznosila je 4,660 cM s prosječnim intervalom između biljega 5,24 cM. Podgenomi A, B i D bili su pokriveni s 458 (42,13 %), 522 (48,02 %) i 107 (9,84 %) biljega s ukupnom duljinom od 2.215 cM, 1.993 cM i 451 cM (Slika 4.4.). To je u skladu s rezultatima prikazanima u radu (Liton i sur., 2021). U populaciji dvostrukih haploida (DH) razvijenih iz križanja sorti pšenice Roblin × RL4137, najveći je broj polimorfnih biljega SNP zabilježen na kromosomima podgenoma B, a najmanji na kromosomima podgenoma D.

Korištenjem sastavljenog kartiranja intervala (CIM) i višestrukog kartiranja intervala (MIM) u BK populaciji 2016. godine kartirana su četiri QTL-a povezana s dormantnošću sjemena na kromosomima 4A, 3B, 2D i 2A (Tablica 4.4.). Metoda višestrukog kartiranja intervala nije detektirala signifikantne interakcije između QTL-ova, a konačni model objasnio je 46 % fenotipske varijance svojstva dormantnosti sjemena (SD). Na temelju fenotipskih podataka za SD u BK populaciji 2017. godine detektirana su dva QTL-a na kromosomima 4A i 3A, koji zajedno objašnjavaju 28,93 % fenotipske varijance (Tablica 4.4.).



SLIKA 4.4. GENETSKA KARTA PŠENICE NA TEMELJU 119 REKOMBINANTNIH INBRED LINIJA (RIL) PODRIJETLOM IZ KRIŽANJA 'BEZOSTAJA 1' × 'KLARA' ANALIZIRANIH POMOĆU BILJEGA DARTSEQ SNP.

TABLICA 4.4. DETEKTIRANI QTL-OVI ZA DORMANTNOST SJEMENA (SD) IDENTIFICIRANI U BIPARENTALNOJ RIL POPULACIJI 'BEZOSTAJA 1' × 'KLARA' (BK) U VEGETACIJSKOJ GODINI 2015/2016 I 2016/2017 KORISTEĆI SASTAVLJENO KARTIRANJE INTERVALA (CIM) VIŠESTRUKO KARTIRANJE INTERVALA (MIM).

GODINA	QTL	LG	CIM				MIM		
			POZICIJA	LOD	A	R^2	POZICIJA	A	R^2
2016.	dor16-1	$4A_2$	53,00	5,17	0,074	14,27	53,00	0,072	14,77
2016.	dor16-2	3B	6,01	4,21	-0,077	15,76	6,01	-0,078	17,3
2016.	dor16-3	2D	16,26	3,63	-0,058	8,89	16,26	-0,06	8,57
2016.	dor16-4	$2A_1$	26,95	3,55	-0,06	8,93	26,95	-0,054	5,77
2016.	Ukupno								*46,41*
2017.	dor17-1	$4A_2$	76,14	3,86	0,07	13,82	76,14	0,084	20,18
2017.	dor17-2	3A	151,62	3,84	-0,058	9,59	153,62	-0,056	8,75
2017.	Ukupno								28,93

LG – SKUPINA VEZANIH GENA; POZICIJA – POZICIJA QTL-A U CM; A – ADITIVNI UČINAK QTL-A; R^2 – UDIO FENOTIPSKE VARIJANCE ANALIZIRANOG SVOJSTVA OBJAŠNJEN PRETPOSTAVLJENIM QTL-OM (%).

Aleli QTL-ova na kromosomu 4A (detektirani u obje godine) koji smanjuju indeks klijanja odnosno povećavaju dormantnost sjemena (otpornost na priježetveno proklijavanje) potječu od dormantnog roditelja 'Klara', dok su kod preostalih detektiranih QTL-ova (u obje godine) aleli koji doprinose smanjenju GI dolazili od ne dormantnog roditelja 'Bezostaja 1'.

Konzistentnost pojavljivanja QTL-ova u obje godine godine ili lokacije u kojima se provodi fenotipizacija, odnosno ocjena ciljanoga svojstva kao i njihov konzistentan učinak u različitim oplemenjivačkim populacijama, važne su odrednice stabilnog QTL-a (usko vezanog biljega) čineći ga prikladnim za korištenje u MAS-u. U prethodnim studijama pronađeno je preko 100 QTL-ova povezanih s otpornošću na priježetveno proklijavanje kod pšenice koji su pokazivali različitu stabilnost izraženu brojem okoliša u kojima su manifestirali signifikantni učinak na dotično svojstvo (Zhou i sur., 2017.). Iako su QTL-ovi pronađeni na svim kromosomima pšenice (Mohan i sur., 2009.; Cabral i sur., 2014.; Cao i sur., 2016.; Fakthongphan i sur., 2016.), najkonzistentnija područja pripadala su kromosomskoj skupini 3 (Kato i sur., 2001.; Osa i sur., 2003.; Kulwal i sur., 2004.; Mori i sur., 2005.; Liu i Bai, 2010.) i kromosomu 4A (Mares i sur., 2005.; Chen i sur., 2008.; Cabral i sur., 2014.; Zhou i sur., 2017.) što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Geni otpornosti na PHS koji se nalaze na kromosomima 3A, 3B i 3D smatraju se usko vezanim s genima koji kontroliraju crvenu boju sjemene ljuske, iako postoji mogućnost da se radi o istim genima s plejotropnim učinkom na oba svojstva (Himi i sur., 2002.). Ovo je u skladu s već dugo poznatom činjenicom da su kultivari pšenice s tamnijom nijansom crvene (smeđe) boje sjemene ljuske otporniji na priježetveno proklijavanje od kultivara sa svjetlijom ili bijelom bojom sjemene ljuske (Warner i sur., 2000). S druge strane, glavni QTL na kromosomu 4A identificiran u brojnim studijama nije povezan s bojom sjemena (Mares i sur., 2005.; Tan i sur., 2006.; Chen i sur., 2008.; Imtiaz i sur., 2008.; Ogbonnaya i sur., 2008.; Gbs i sur., 2011.; Cabral i sur., 2014.), već se vjerojatno radi o genu *TaMKK3* kojeg su klonirali Torada i sur. (2016.). Mi smo u našem istraživanju pomoću KASP biljega analizirali alelni profil za gen *TaMKK3* (lociran na kromosomu 4A) u kolekciji kultivara ozime pšenice, relevantnoj za oplemenjivačke programe jugoistočne Europe, koja je uključivala i roditelje populacije BK. Analiza je pokazala da na dotičnom genskom lokusu kultivar 'Klara' (dormantni roditelj u provedenom križanju) posjeduje „rezistentni" alel, a 'Bezostaja 1' „osjetljivi" alel za priježetveno proklijavanje. To je u skladu s rezultatima provedene QTL analize u populaciji BK koji su pokazali da aleli QTL-ova na kromosomu 4A, koji doprinose većoj otpornosti na PHS potječu od dormantnog roditelja 'Klara'.

4.7.4. DALJNJA ISTRAŽIVANJA

Stabilni QTL-ovi ili funkcionalni biljezi visokog učinka na otpornost genotipa na priježetveno proklijavanje identificirani su u germplazmi relevantnoj za oplemenjivačke programe pšenice u Hrvatskoj i jugoistočnoj Europi, te mogu poslužiti kao potencijalni alat u selekciji potpomognutoj markerima (MAS). U sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) formirana je kolekcija od 200 kultivara i oplemenjivačkih linija ozime pšenice adaptiranih na uzgojne uvjete Hrvatske i jugoistočne Europe. Kolekcija je tijekom više godina fenotipizirana u više okoliša na nekoliko svojstava povezanih s otpornošću na PHS. Fenotipizirana svojstva uključivala su visinu biljke, datum cvatnje, dormantnost sjemena i embrija te osjetljivost embrija na apscizinsku kiselinu. Kolekcija kultivara također je genotipizirana u SGS Institut Fresenius GmbH TraitGenetics Section (Gatersleben, Njemačka) korištenjem 25k Infinum iSelect SNP čipa, kojeg čini 24.145 SNP biljega. Generirani fenotipski i genotipski podaci poslužit će za cjelogenomsku studiju pridruživanja (engl. *Genome-Wide Association Study*; GWAS) u svrhu identifikacije lokusa kvantitativnih svojstava s visokim učinkom na otpornost od PHS.

LITERATURA

Ali, A., Cao, J., Jiang, H., Chang, C., Zhang, H.P., Sheikh, S.W., Shah, L., Ma, C., 2019. Unraveling molecular and genetic studies of wheat (*Triticum aestivum L.*) resistance against factors causing pre-harvest sprouting. Agronomy 9.

Ali, M., Danting, S., Wang, J., Sadiq, H., Rasheed, A., He, Z., Li, H., 2022. Genetic Diversity and Selection Signatures in Synthetic-Derived Wheats and Modern Spring Wheat. Front. Plant Sci. 13, 0–10.

Alipour, H., Bihamta, M.R., Mohammadi, V., Peyghambari, S.A., Bai, G., Zhang, G., 2017. Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. Front. Plant Sci. 8, 1–14.

Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., i sur., 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science (80-.). 361.

Bernardo, R., 2016. Bandwagons I, too, have known. Theor. Appl. Genet. 129, 2323–2332.

Cabral, A.L., Jordan, M.C., McCartney, C.A., You, F.M., Humphreys, D.G., MacLachlan, R., Pozniak, C.J., 2014. Identification of candidate genes, regions and markers for pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum L.*). BMC Plant Biol. 14, 1–12.

Cao, L., Hayashi, K., Tokui, M., Mori, M., Miura, H., Onishi, K., 2016. Detection of QTLS for traits associated with pre-harvest sprouting resistance in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). Breed. Sci. 66, 260–270.

Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M.C., Dubcovsky, J., 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars. Mol. Breed. 23, 23–33.

Chen, C.X., Cai, S. Bin, Bai, G.H., 2008. A major QTL controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting resistance on chromosome 4A in a Chinese wheat landrace. Mol. Breed. 21, 351–358.

Churchill, G.A., Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138, 963–971.

DePauw, R.M., Knox, R.E., Singh, A.K., Fox, S.L., Humphreys, D.G., Hucl, P., 2012. Developing standardized methods for breeding preharvest sprouting resistant wheat, challenges and successes in Canadian wheat. Euphytica 188, 7–14.

Derera, N.F., Kruger, J.E., Gale, M.D., Mac Key, J., King, R.W., Mares, D., 1989. Preharvest field sprouting in cereals. CRC Press.

Dreisigacker, S., Crossa, J., Pérez-Rodríguez, P., Montesinos-López, O.A., Rosyara, U., Juliana, P., Mondal, S., Crespo-Herrera, L., Govindan, V., Singh, R.P., Braun, H.-J., 2021. Implementation of genomic selection in the CIMMYT global wheat program, findings from the past 10 years. Crop Breeding, Genet. Genomics 3, e210004.

Dubcovsky, J., Dvorak, J., 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science (80-.). 316, 1862–1866.

Dvorak, J., Luo, M.C., Yang, Z.L., 1998. The Origins of Agriculture and Crop Domestication: The Harlan Symposium.

Eltaher, S., Sallam, A., Belamkar, V., Emara, H.A., Nower, A.A., Salem, K.F.M., Poland, J., Baenziger, P.S., 2018. Genetic diversity and population structure of F3:6 Nebraska Winter wheat genotypes using genotyping-by-sequencing. Front. Genet. 9.

Fakthongphan, J., Bai, G., St. Amand, P., Graybosch, R.A., Baenziger, P.S., 2016. Identification of markers linked to genes for sprouting tolerance (independent of grain color) in hard white winter wheat (HWWW). Theor. Appl. Genet. 129, 419–430.

Gbs, G., Lin, M., Cai, S., Wang, S., Liu, S., Bai, G., 2011. Fine Mapping of a Quantitative Trait Loci for Wheat Resistance to Pre-harvest Sprouting Using 109947, 212432.

Hagemann, M.G., Ciha, A.J., 1984. Evaluation of Methods Used in Testing Winter Wheat Susceptibility to Preharvest Sprouting1. Crop Sci. 24, 249.

Himi, E., Mares, D.J., Yanagisawa, A., Noda, K., 2002. Effect of grain colour gene (R) on grain dormancy and sensitivity of the embryo to abscisic acid (ABA) in wheat. J. Exp. Bot. 53, 1569–1574.

Humphreys, D.G., Noll, J., 2002. Methods for characterization of preharvest sprouting resistance in a wheat breeding program. Euphytica 126, 61–65.

Ikić, I., Maričević, M., Tomasović, S., Gunjača, J., Šatović, Z., Šarčević, H., 2012. The effect of germination temperature on seed dormancy in Croatian-grown winter wheats. Euphytica 188, 25–34.

Imtiaz, M., Ogbonnaya, F.C., Oman, J., Van Ginkel, M., 2008. Characterization of quantitative trait loci controlling genetic variation for preharvest sprouting in synthetic backcross-derived wheat lines. Genetics 178, 1725–1736.

Jansen, R.C., Stam, P., 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136, 1447–1455.

Kao, C.H., Zeng, Z.B., Teasdale, R.D., 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. Genetics 152, 1203–1216.

Kato, K., Nakamura, W., Tabiki, T., Miura, H., Sawada, S., 2001. Detection of loci controlling seed dormancy on group 4 chromosomes of wheat and comparative mapping with rice and barley genomes. Theor. Appl. Genet. 102, 980–985.

Kosambi, D.D., 1943. The estimation of map distances from recombination values 1, 1–8.

Kulwal, P.L., Singh, R., Balyan, H.S., Gupta, P.K., 2004. Genetic basis of pre-harvest sprouting tolerance using single-locus and two-locus QTL analyses in bread wheat. Funct. Integr. Genomics 4, 94–101.

Kumar, S., Knox, R.E., Clarke, F.R., Pozniak, C.J., DePauw, R.M., Cuthbert, R.D., Fox, S., 2015. Maximizing the identification of QTL for pre-harvest sprouting resistance using seed dormancy measures in a white-grained hexaploid wheat population. Euphytica 205, 287–309.

Lander, E.S., Green, P., 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 2363–2367.

Lin, M., Liu, S., Zhang, G., Bai, G., 2018. Effects of TAPHS1 and TAMKK3-A genes on wheat pre-harvest sprouting resistance. Agronomy 8, 1–9.

Lin, M., Zhang, D., Liu, S., Zhang, G., Yu, J., Fritz, A.K., Bai, G., 2016. Genome-wide association analysis on preharvest sprouting resistance and grain color in U.S. winter wheat. BMC Genomics 17.

Liton, M.M.U.A., McCartney, C.A., Hiebert, C.W., Kumar, S., Jordan, M.C., Ayele, B.T., 2021. Identification of loci for pre-harvest sprouting resistance in the highly dormant spring wheat RL4137. Theor. Appl. Genet. 134, 113–124.

Liu, S., Bai, G., 2010. Dissection and fine mapping of a major QTL for preharvest sprouting resistance in white wheat Rio Blanco 1395–1404.

Liu, S., Sehgal, S.K., Li, J., Lin, M., Trick, H.N., Yu, J., Gill, B.S., Bai, G., 2013. Cloning and characterization of a critical regulator for preharvest sprouting in wheat. Genetics 195, 263–273.

Liu, Y.-G., Tsunewaki, K., 1991. Restriction fragment lenght polymorphism RFLP analysis in wheat. Jpn.J. Genet. 66, 617–633.

Lunn, G.D., Kettlewell, P.S., Major, B.J., Scott, R.K., 2002. Variation in dormancy duration of the U.K. wheat cultivar Hornet due to environmental conditions during grain development. Euphytica 126, 89–97.

Mares, D., Mrva, K., Cheong, J., Williams, K., Watson, B., Storlie, E., Sutherland, M., Zou, Y., 2005. A QTL located on chromosome 4A associated with dormancy in white- and red-grained wheats of diverse origin. Theor. Appl. Genet. 111, 1357–1364.

Mares, D., Rathjen, J., Mrva, K., Cheong, J., 2009. Genetic and environmental control of dormancy in white-grained wheat (Triticum aestivum L.). Euphytica 168, 311–318.

Mares, D.J., Mrva, K., 2014. Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase. Planta 240, 1167–1178.

Martinez, S.A., Godoy, J., Huang, M., Zhang, Z., Carter, A.H., Garland Campbell, K.A., Steber, C.M., 2018. Genome-wide association mapping for tolerance to preharvest sprouting and low falling numbers in wheat. Front. Plant Sci. 9, 1–16.

Mayer, K.F.X., Marcussen, T., Sandve, S.R., Heier, L., Pfeifer, M., Kugler, K.G., Zhan, B., Spannagl, M., Pfeifer, M., Jakobsen, K.S., Wulff, B.B.H., Steuernagel, B., Olsen, O.-A., 2014. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat Structural and functional pa. Science 345, 1250092.

Meng, L., Li, H., Zhang, L., Wang, J., 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. Crop J. 3, 269–283.

Mohan, A., Kulwal, P., Singh, R., Kumar, V., Mir, R.R., Kumar, J., Prasad, M., Balyan, H.S., Gupta, P.K., 2009. Genome-wide QTL analysis for pre-harvest sprouting tolerance in bread wheat. Euphytica 168, 319–329.

Mori, M., Uchino, N., Chono, M., Kato, K., Miura, H., 2005. Mapping QTLs for grain dormancy on wheat chromosome 3A and the group 4 chromosomes, and their combined effect. Theor. Appl. Genet. 110, 1315–1323.

Nakamura, S., Abe, F., Kawahigashi, H., Nakazono, K., Tagiri, A., Matsumoto, T., Utsugi, S., Ogawa, T., Handa, H., Ishida, H., Mori, M., Kawaura, K., Ogihara, Y., Miura, H., 2011. A wheat homolog of MOTHER of FT and TFL1 acts in the regulation of germination. Plant Cell 23, 3215–3129.

Nielsen, N.H., Backes, G., Stougaard, J., Andersen, S.U., Jahoor, A., 2014. Genetic diversity and population structure analysis of European hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum L.*) varieties. PLoS One 9.

Ogbonnaya, F.C., Imtiaz, M., Ye, G., Hearnden, P.R., Hernandez, E., Eastwood, R.F., Van Ginkel, M., Shorter, S.C., Winchester, J.M., 2008. Genetic and QTL analyses of seed dormancy and preharvest sprouting resistance in the wheat germplasm CN10955. Theor. Appl. Genet. 116, 891–902.

Osa, M., Kato, K., Mori, M., Shindo, C., Torada, A., Miura, H., 2003. Mapping QTLs for seed dormancy and the Vp1 homologue on chromosome 3A in wheat. Theor. Appl. Genet. 106, 1491–1496.

Peng, J., Korol, A.B., Fahima, T., Röder, M.S., Ronin, Y.I., Li, Y.C., Nevo, E., 2000. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, Triticum dicoccoides: Genoma-wide coverage, massive negative interference, and putative Quasi-linkage. Genome Res. 10, 1509–1531.

Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen, K., 2006. Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). Mol. Phylogenet. Evol. 39, 70–82.

Rasul, G., Humphreys, G.D., Wu, J., Brûlé-Babel, A., Fofana, B., Glover, K.D., 2012. Evaluation of preharvest sprouting traits in a collection of spring wheat germplasm using genotype and genotype×environment interaction model. Plant Breed. 131, 244–251.

Rehman Arif, M.A., Neumann, K., Nagel, M., Kobiljski, B., Lohwasser, U., Börner, A., 2012. An association mapping analysis of dormancy and pre-harvest sprouting in wheat. Euphytica 188, 409–417.

Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W., 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149, 2007–2023.

SAS Institute Inc., 2013. The SAS System for Windows, Release 9.4; Statistical Analysis Systems Institute: Cary, NC, USA 556p.

Shao, M., Bai, G., Rife, T.W., Poland, J., Lin, M., Liu, S., Chen, H., Kumssa, T., Fritz, A., Trick, H., Li, Y., Zhang, G., 2018. QTL mapping of pre-harvest sprouting resistance in a white wheat cultivar Danby. Theor. Appl. Genet. 131, 1683–1697.

Shorinola, O., Bird, N., Simmonds, J., Berry, S., Henriksson, T., Jack, P., Werner, P., Gerjets, T., Scholefield, D., Balcárková, B., Valárik, M., Holdsworth, M.J., Flintham, J., Uauy, C., 2016. The wheat Phs-A1 pre-harvest sprouting resistance locus delays the rate of seed dormancy loss and maps 0.3 cM distal to the PM19 genes in UK germplasm. J. Exp. Bot. 67, 4169–4178.

Shorter, S.C., Munro, C.A., Hodgkinson, J., 2005. Predicting pre-harvest sprouting susceptibility in New Zealand wheat cultivars. Euphytica 143, 309–312.

Singh, K., Batra, R., Sharma, Shiveta, Saripalli, G., Gautam, T., Singh, R., Pal, S., Malik, P., Kumar, M., Jan, I., Singh, S., Kumar, D., Pundir, S., Chaturvedi, D., Verma, A., Rani, A., Kumar, A., Sharma, H., Chaudhary, J., Kumar, K., Kumar, Sourabh, Singh, V.K., Singh, V.P., Kumar, Sachin, Kumar, R., Gaurav, S.S., Sharma, Shailendra, Sharma, P.K., Balyan, H.S., Gupta, P.K., 2021. WheatQTLdb: a QTL database for wheat. Mol. Genet. Genomics 296, 1051–1056.

Singh, R., Matus-Cádiz, M., Båga, M., Hucl, P., Chibbar, R.N., 2008. Comparison of different methods for phenotyping preharvest sprouting in white-grained wheat. Cereal Chem. 85, 238–242.

Svačina, R., Sourdille, P., Kopecký, D., Bartoš, J., 2020. Chromosome Pairing in Polyploid Grasses. Front. Plant Sci. 11, 1–17.

Šarčević, H., Martinčić-Jerčić, Z., Barić, M., Gunjača, J., 2000. Pre-Harvest Sprouting and Dormancy in Diverse Wheat Genotypes. Agric. Conspec. Sci. 65, 115–121.

Talbert, L.E., Smith, L.Y., Blake, N.K., 1998. More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. Genome 41, 402–407.

Tan, M.K., Sharp, P.J., Lu, M.Q., Howes, N., 2006. Genetics of grain dormancy in a white wheat. Aust. J. Agric. Res. 57, 1157–1165.

Torada, A., Koike, M., Ogawa, T., Takenouchi, Y., Tadamura, K., Wu, J., Matsumoto, T., Kawaura, K., Ogihara, Y., 2016. A causal gene for seed dormancy on wheat chromosome 4A encodes a MAP kinase kinase. Curr. Biol. 26, 782–787.

Voss-Fels, K., Frisch, M., Qian, L., Kontowski, S., Friedt, W., Gottwald, S., Snowdon, R.J., 2015. Subgenomic Diversity Patterns Caused by Directional Selection in Bread Wheat Gene Pools. Plant Genome 8, 1–13.

Wang, D., Pang, Y., Dong, L., Li, A., Kong, L., Liu, S., 2020. Allelic impacts on pre-harvest sprouting resistance and favorable haplotypes in TaPHS1 of Chinese wheat accessions. Crop J. 8, 515–521.

Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.-B., 2012. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics. North Carolina State Univ. Raleigh, NC.

Wang, Y., Wang, X.L., Meng, J.Y., Zhang, Y.J., He, Z.H., Yang, Y., 2016. Characterization of Tamyb10 allelic variants and development of STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese bread wheat. Mol. Breed. 36.

Warner, R.L., Kudrna, D.A., Spaeth, S.C., Jones, S.S., 2000. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (Triticum aestivum L.). Seed Sci. Res. 10, 51–60.

Yang, Y., Zhao, X.L., Xia, L.Q., Chen, X.M., Xia, X.C., Yu, Z., He, Z.H., Röder, M., 2007. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats. Theor. Appl. Genet. 115, 971–980.

Zeng, Z., 1994. Precision of Quantitative Trait Loci. Genetics 136, 1457–1468.

Zeng, Z.B., Kao, C.H., Basten, C.J., 1999. Estimating the genetic architecture of quantitative traits. Genet. Res. 74, 279–289.

Zhou, Y., Tang, H., Cheng, M.P., Dankwa, K.O., Chen, Z.X., Li, Z.Y., Gao, S., Liu, Y.X., Jiang, Q.T., Lan, X.J., Pu, Z.E., Wei, Y.M., Zheng, Y.L., Hickey, L.T., Wang, J.R., 2017. Genome-wide association study for pre-harvest sprouting resistance in a large germplasm collection of chinese wheat landraces. Front. Plant Sci. 8, 1–13.

Zhu, Y., Wang, S., Wei, W., Xie, H., Liu, K., Zhang, C., Wu, Z., Jiang, H., Cao, J., Zhao, L., Lu, J., Zhang, H., Chang, C., Xia, X., Xiao, S., Ma, C., 2019. Genome-wide association study of pre-harvest sprouting tolerance using a 90K SNP array in common wheat (*Triticum aestivum L.*). Theor. Appl. Genet. 132.

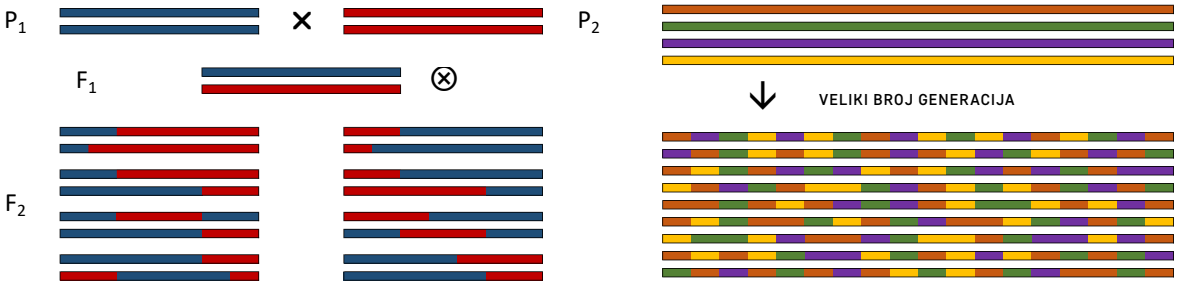
PRIDRUŽUJUĆE KARTIRANJE 5

Jerko Gunjača

5.1. UVOD

Analiza lokusa za kvantitativna svojstva (QTL) podrazumijeva pronalaženje genskih lokusa koji su odgovorni za fenotipsku varijabilnost analiziranog svojstva. Osim što se koriste za izradu genskih karata, rekombinacijski događaji služe i kao osnova za otkrivanje povezanosti između molekularnih biljega i fenotipske varijabilnosti. Statističke metode koje se koriste u analizi QTL-a mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: metode koje su opisane u prethodnom poglavlju za koje se koristi zajednički naziv „kartiranje vezanosti (gena)" (engl. *linkage mapping*) i metode koje se nazivaju „pridružujuće kartiranje" (engl. *association mapping*), kojima je posvećeno ovo poglavlje. Osnovna je razlika između ove dvije skupine metoda u razini kontrole rekombinacijskih događaja: kartiranje vezanosti iskorištava pojave rekombinacije koje se događaju tijekom razvitka populacija za kartiranje, a pridružujuće kartiranje pojave rekombinacije koje su se dogodile u bilo kojoj generaciji u povijesti neke populacije odabrane za kartiranje (Slika 5.1.).

U kontroliranom eksperimentu na kojem se temelji kartiranje vezanosti za kartiranje se koriste populacije u kojima je poznata srodnost između jedinki, a kod biljnih vrsta to su najčešće potomstva biparentalnog križanja. Takve specifično razvijene populacije nisu potrebne za pridružujuće kartiranje, jer se u njemu mogu koristiti vrlo divergentne populacije (za koje se često koristi izraz „panel") koje se odlikuju velikom genotipskom i fenotipskom raznolikošću. U tim populacijama srodnost između jedinki nije poznata, nego se procjenjuje na temelju genotipskih podataka. Opisujući ove temeljne razlike između dviju skupina metoda, Myles i sur. (2009.) za kartiranje vezanosti koriste naziv „kartiranje porodica" (engl. *family mapping*), a pridružujuće kartiranje nazivaju „kartiranje populacija" (engl. *population mapping*). U pridružujućem se kartiranju koriste molekularni biljezi koji osiguravaju znatno veću zasićenost genetske karte, čime se postiže i znatno veća razlučivost analize. Kartiranjem vezanosti QTL-i se uglavnom mogu locirati tek unutar većih kromosomskih regija (10 do 20 cM), dok pridružujuće kartiranje, zbog iskorištavanja znatno većeg broja rekombinacijskih događaja može razlučivati znatno manje ulomke genoma. Osim toga, kartiranjem vezanosti mogu se detektirati samo oni QTL-i za koje su roditelji čijim je križanjem nastala populacija za kartiranje imali različite genotipove. Kod pridružujućeg kartiranja nema takvog ograničenja, pa bi se njime potencijalno mogli detektirati svi QTL-i koji kontroliraju neko svojstvo, zbog čega se istraživanja koja se temelje na pridružujućem kartiranju još nazivaju i cjelogenomske studije pridruživanja (engl. *genome-wide association studies* – GWAS). Udio otkrivenih QTL-a ovisi o tome koliko je ukupne genetske varijabilnosti koja postoji u prirodi sačuvano unutar populacije za kartiranje (Zhu i sur., 2008.). Sumirajući sve prednosti i nedostatke pridružujućeg kartiranja, Myles i sur. (2009.)



SLIKA 5.1. SHEMATSKI PRIKAZ REKOMBINACIJSKIH DOGAĐAJA U POPULACIJAMA ZA KARTIRANJE KOD KARTIRANJA VEZANOSTI (LIJEVO) I PRIDRUŽUJUĆEG KARTIRANJA (DESNO), PREMA ZHU I SUR. (2008.)

još navode i veću učinkovitost i smanjenje troškova u odnosu na skup i dugotrajan proces razvoja populacija za kartiranje vezanosti, ali i povećanje troškova i smanjenje pouzdanosti fenotipiziranja populacija, koje se sastoje od velikog broja jedinki prilagođenih vrlo raznolikim okolišnim uvjetima.

5.2. NERAVNOTEŽA VEZANOSTI

Dakle, analiza QTL-a temelji se na pronalaženju lokusa biljega na kojima se javljaju fenotipske razlike u analiziranom svojstvu između jedinki s različitim alelima na tom lokusu. Tada se može pretpostaviti da se lokus tog biljega nalazi u neposrednoj blizini gena koji kontrolira to svojstvo. Zbog toga između lokusa biljega i genskog lokusa (QTL-a) nikada ne dolazi do rekombinacije, odnosno, oni se nalaze u neravnoteži vezanosti (engl. *linkage disequilibrium* – LD). U pojednostavnjenom prikazu (Slika 5.2.) hipotetski QTL predstavljen je također jednim polimorfnim nukleotidom. Jedan od dva susjedna biljega (SNP1) ne nalazi se u neravnoteži vezanosti s QTL-om jer između njih očito dolazi do rekombinacije, budući da se u populaciji pojavljuju sva četiri moguća genotipa. Obje alelne varijante QTL-a pojavljuju se isključivo u kombinaciji s jednom od dviju alelnih varijanata biljega SNP2, što ukazuje na postojanje LD-a odnosno vezanosti QTL-a i tog biljega. Fenotipske vrijednosti jedinki ovise o genotipu QTL-a, pa se fenotipske razlike javljaju samo između jedinki koje nose različite alele QTL-a. Zbog neravnoteže vezanosti fenotipske se razlike također uočavaju i između jedinki s različitim alelom SNP2, pa se u tom kontekstu taj biljeg naziva nukleotidom kvantitativnog svojstva (engl. *quantitative trait nucleotide* – QTN).

	SNP1	QTL	SNP2
P1	G	T	C
P2	A	T	C
P3	G	A	T
P4	A	A	T

SLIKA 5.2. HIPOTETSKI PRIKAZ SEGMENTA KROMOSOMA S QTL-OM I DVA BILJEGA (PREMA MYLES I SUR., 2009., POJEDNOSTAVNJENO).

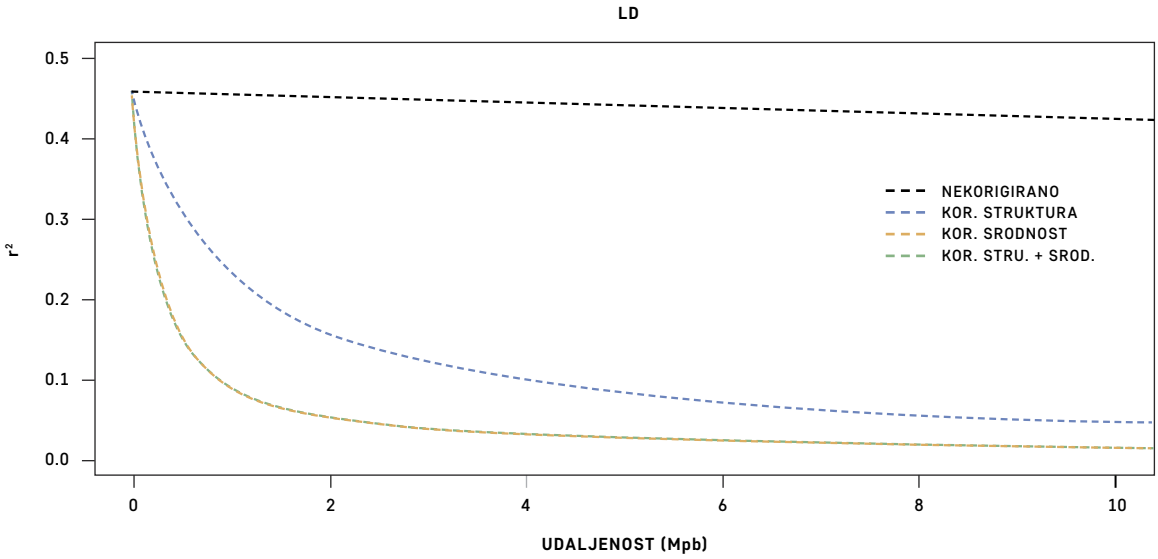
Jačina neravnoteže vezanosti (LD) može se mjeriti na različite načine, a jedan od najčešće primjenjivanih i najjednostavnijih izračunavanje je korelacije između alelnih učestalosti dvaju lokusa (kvadratna vrijednost korelacijskog koeficijenta – r^2). S povećanjem udaljenosti između lokusa opada jačina neravnoteže vezanosti, a o stopi opadanja jačine LD-a ovisi i rezolucija kartiranja. Stopa opadanja specifična je za populaciju koja se koristi za kartiranje, pa je prije same analize QTL-a potrebno provesti i analizu strukture LD-a u populaciji. Obično se vrijednost r^2 od 0,1 ili 0,2 uzima kao granična vrijednost u smislu da se za lokuse između kojih je korelacija slabija od te granične vrijednosti smatra da nisu u LD-u (Zhu i sur., 2008.). Među biljnim vrstama postoje velike razlike u stopi opadanja jačine LD-a (Flint-Garcia i sur., 2003.), a načelno je stopa opadanja znatno sporija kod samooplodnih vrsta u odnosu na stranooplodne (Nordborg, 2000.). LD prestaje već na udaljenosti od nekoliko stotina parova baza (100 – 300 bp) kod stranooplodnih vrsta kao što su smreka (Heuertz i sur., 2006.) ili vinova loza (Lijavetzky i sur., 2007.), ali se proteže i na više stotina tisuća parova baza kod samooplodnih vrsta kao što je riža (Mather i sur., 2007.). Unutar vrsta također postoje velike razlike između populacija, a jačina LD-a znatno brže opada s udaljenošću u prirodnim populacijama u odnosu na populacije tradicijskih kultivara, a još brže u odnosu na populacije sastavljene od elitnih oplemenjivačkih linija, što su na primjeru kukuruza pokazali Tenaillon i sur. (2001.). Te razlike nastaju zbog utjecaja strukture populacije i srodnosti između jedinki, koje mogu prouzročiti prividno protezanje LD-a na znatno veće udaljenosti nego što bi se to dogodilo uslijed (isključivo) fizičke povezanosti. Kako bi se mogle dobiti nepristrane procjene jačine LD-ja, Mangin i sur. (2012.) razvili su procjene r^2 korigirane na srodnost i strukturu populacije. Koliko mogu biti velike razlike između korigiranih i nekorigiranih

procjena r^2 dobro ilustrira primjer populacije hrvatskih tradicijskih kultivara graha (Slika 5.3.).

5.3. STRUKTURA POPULACIJE

Slučajno sparivanje jedinki teorijska je pretpostavka koja se ne ostvaruje čak ni u prirodnim populacijama. Zbog toga se u prirodnim populacijama, kao i u oplemenjivačkim populacijama kultiviranih biljnih vrsta, javljaju vrlo kompleksni obrasci srodnosti jedinki i populacijske strukture. Kada se analizira fenotipsko svojstvo čija je varijabilnost korelirana s tim obrascima, kartiranjem će mu se pridružiti veliki broj biljega od kojih će tek rijetki stvarno biti u LD-u s genima koji kontroliraju to svojstvo. Kako bi se smanjio broj tih „lažnih otkrića" (engl. *false discoveries*), u model koji se koristi u analizi mora se uključiti i učinak strukture populacije.

U studijama pridruživanja najčešće se koristi Bayesovska analiza populacijske strukture koja je opisana u trećem poglavlju (Pritchard i sur., 2000.). Nakon što se odredi najvjerodostojniji broj skupina K, za svaku se jedinku izračuna udio genoma (Q) koji potječe iz određene skupine. Procijenjene Q vrijednosti za odabrane skupine koriste se za procjenu učinka strukture populacije. Bayesovska analiza vrlo je kompleksna, pa može biti i iznimno dugotrajna – najprije se mora provesti za svaki pretpostavljeni broj skupina K, nakon čega je potrebno pronaći najvjerodostojniji K. Relativno jednostavniji pristup procjeni učinka strukture populacije sažimanje je genotipskih podataka svih jedinki primjenom analize glavnih sastavnica (engl. *principal component analysis* – PCA). Na taj se način većina ukupne genotipske varijabilnosti preraspodjeljuje na nekoliko glavnih sastavnica (Price i sur., 2006.), a sama analiza neusporedivo je brža. Rezultat PCA vrlo se često podudara (Zhao i sur., 2007.) s rezultatom Bayesovske analize implementirane u računalnom programu STRUCTURE, kao što se vidi i na primjeru hrvatskih tradicijskih kultivara graha (Slika 5.4.). Najvjerodostojniji K = 3, pa STRUCTURE razdvaja populaciju na tri skupine, od kojih je jedna srednjoameričkog, a dvije andskog porijekla (označene različitim bojama). Na temelju rezultata PCA također se mogu razlučiti tri



SLIKA 5.3. NEKORIGIRANE I KORIGIRANE PROCJENE R^2 U POPULACIJI OD 174 HRVATSKA TRADICIJSKA KULTIVARA GRAHA (PREMA GUNJAČA I SUR., 2021.).

skupine, pri čemu prva glavna sastavnica razdvaja srednjoameričke od andskih, a druga dvije skupine andskog porijekla.

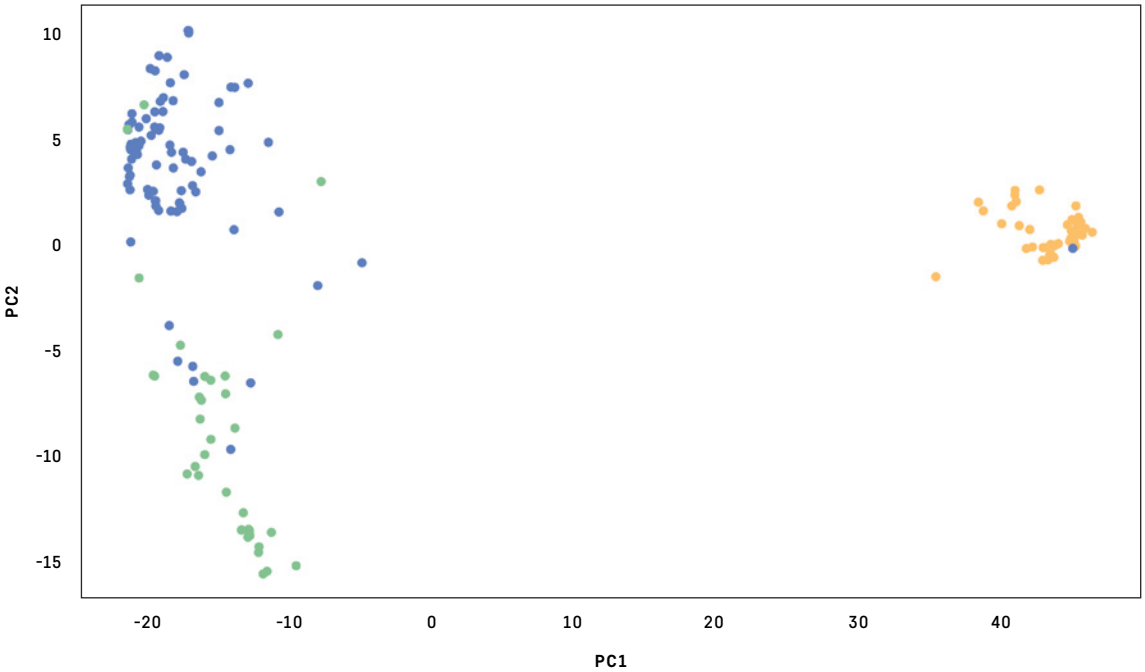
5.4. SRODNOST

Obrasci odnosa između jedinki mogu biti znatno kompleksniji nego oni koji se opisuju pripadnošću jednoj od nekoliko skupina, odnosno potpopulacija. Definiranje tih složenih obrazaca zahtijeva procjenu srodnosti za svaki par jedinki u populaciji. Tako se dobivena matrica srodnosti K (engl. *kinship*) može uvesti u model i koristiti za predikciju fenotipskih svojstava, što je standardna metoda koja se koristi u oplemenjivanju životinja. U izvornom su se obliku za konstrukciju matrice srodnosti koristili podatci o rodoslovlju (pedigreu) jedinki, ali se u pridružujućem kartiranju za procjenu srodnosti koriste genetski biljezi.

Za razliku od genetske sličnosti (odnosno udaljenosti) o kojoj se raspravljalo u trećem poglavlju, procjena srodnosti predstavlja pokušaj razlučivanja jesu li dvije jedinke koje nose iste alele (engl. *identity by state* – IBS) ujedno i naslijedile te alele od zajedničkog pretka (engl. *identity by descent* – IBD). Razlikovanje IBD-a od IBS-a temeljni je problem procjene srodnosti, u svrhu čijeg je rješavanja razvijen niz različitih metoda. Taj se problem može jednostavno definirati formulom za koeficijent srodnosti K, prema (Lynch, 1988.):

$$K_{ij} = \frac{S_{ij} - T_{ij}}{1 - T_{ij}}$$

gdje je S_{ij} genetska sličnost (IBS) jedinki i i j, a T_{ij} prosječna sličnost između nesrodnih jedinki. Dakle, srodnost se može procijeniti tako da se iz ukupne genetske sličnosti (IBS) izdvoji onaj dio koji ne predstavlja sličnost koja je naslijeđena od zajedničkog pretka (koja nije IBD), a problem je u tome što je T_{ij} parametar čija vrijednost u praksi nikada nije



SLIKA 5.4. STRUKTURA POPULACIJE HRVATSKIH TRADICIJSKIH KULTIVARA GRAHA. NARANČASTOM SU BOJOM OZNAČENI TRADICIJSKI KULTIVARI SREDNJOAMERIČKOG PORIJEKLA, A PLAVOM I ZELENOM DVIJE SKUPINE TRADICIJSKIH KULTIVARA ANDSKOG PORIJEKLA.

poznata. Ovdje je važno napomenuti da se Lyncheva formula u literaturi pojavljuje u različitim oblicima, pri čemu se koriste različiti simboli i različite definicije njihovog značenja. Radi dosljednosti, ovdje se koriste oznake prema Stich i sur. (2008.). Isti autori predlažu i vrlo jednostavno rješenje za procjenu T_{ij} koje zahtijeva da se pored populacije na kojoj se provodi pridružujuće kartiranje u istraživanje uključi i nekoliko (toj populaciji) nesrodnih jedinki. Tada se T_{ij} može procijeniti kao prosječna S_{ij} između svih jedinki u populaciji i svake od nesrodnih jedinki. Međutim, Stichu i sur. (2008.) zaključuju da je ovo jednostavno rješenje manje učinkovito od drugih, kompleksnijih metoda procjene srodnosti koje se uobičajeno koriste u studijama pridruživanja.

Prve studije pridruživanja provedene na biljnim vrstama koristile su procjene srodnosti na temelju metoda implementiranih u računalnom programu SPAGeDi (Hardy i Vekemans, 2002.). Loša je strana tih metoda da njihova primjena rezultira generiranjem matrica srodnosti s velikim brojem negativnih vrijednosti. Te su negativne vrijednosti Yu i sur. (2006.) tumačili kao vrijednosti onih parova jedinki čija je srodnost manja od srodnosti slučajno odabranih parova jedinki iz populacija, pa su kao praktično rješenje predložili da se sve negativne vrijednosti zamijene s vrijednošću 0. Većina aktualnih metoda procjene srodnosti temelje se na VanRadenovoj normaliziranoj (engl. *normalized*) matrici sličnosti (VanRaden, 2008.). Procjena sličnosti između jedinki može se definirati uz pomoć formule:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^{m}\left[1 + (x_{ik} - 1)(x_{jk} - 1)\right]}{2}$$

gdje je m broj biljega, a x_{ik} i x_{jk} brojevi kopija biljega k kod jedinki i i j. Druga od tri VanRadenove metode za procjenu srodnosti temelji se na standardizaciji s obzirom na učestalost alela:

$$K_{ij} = \frac{1}{m}\sum_{k=1}^{m}\frac{(x_{ik} - 2p_k)(x_{jk} - 2p_k)}{2p_k(1 - p_k)}$$

gdje je p_k učestalost referentnog alela. Izvorno, VanRaden ovu je formulu prikazao u matričnom obliku:

$$K_{ij} = ZDZ'$$

gdje je Z matrica razlika između matrice biljega M veličine $n \times m$ i standardizirane matrice alelnih učestalosti P čiji je svaki element jednak $2(p_k - 0{,}5)$; D je dijagonalna matrica čiji su elementi:

$$D_{kk} = \frac{1}{m[2p_k(1 - p_k)]}$$

a Z' inverzna matrica matrice Z. Endelman i Jannink (2012.) predlažu metodu koja se umjesto normalizacije koristi centriranjem matrice sličnosti, a može se definirati formulom:

$$K_{ij} = \frac{\delta\langle COV_{ii}\rangle I + (1 - \delta)COV + \langle M_{\cdot k}\rangle\langle M'_{\cdot k}\rangle}{2\sum_{k=1}^{m} p_k(1 - p_k)}$$

gdje je δ intenzitet skupljanja (engl. *shrinkage*), $\langle COV_{ii}\rangle$ prosjek dijagonalnih elemenata matrice kovarijanci COV, a $\langle M_{\cdot k}\rangle$ i $\langle M'_{\cdot k}\rangle$ prosjeci redaka matrice biljega M i njene inverzne matrice M'. Matrica kovarijanci uzorka (COV) koristi se kao procjenitelj cjelogenomske matrice kovarijanci Σ:

$$COV = \frac{MM'}{m} - \langle M_{\cdot k}\rangle\langle M'_{\cdot k}\rangle$$

Osim navedenih razvijene su i druge metode za procjenu srodnosti, od kojih su najkompleksnije one u kojima se koriste zasebne matrice srodnosti s obzirom na te aditivne, dominacijske i epistatske genske učinke (Muñoz i sur., 2014.).

5.5. RAČUNALNI PROGRAMI

Kompleksnost metoda koje se koriste u okviru studija pridruživanja ogleda se i u brojnosti računalnih programa koji su razvijeni radi njihove provedbe. Osim alata koji se koriste za rješavanje specifičnih problema

razvijena su i cjelovita rješenja, odnosno setovi alata ili platforme koje se koriste za provedbu svih faza studije pridruživanja. Neki od specifičnih alata bit će spomenuti u idućim potpoglavljima, a ovdje će biti ukratko opisana najčešće korištena cjelovita rješenja.

PLINK (Purcell i sur., 2007.) je skup alata za GWAS razvijen na Sveučilištu Harvard, MIT-u (*Massachusetts Institute of Technology*) i pridruženim institucijama. Uključuje alate za upravljanje podatcima, kontrolu kvalitete, analizu strukture populacije, procjenu srodnosti i analizu pridruživanja. Može se koristiti samostalno ili uz pomoć posebno razvijenog grafičkog sučelja (gPLINK) koje omogućava integraciju s računalnim programom Haploview (Barrett i sur., 2005.) radi grafičkog prikaza rezultata analize. Primarno je namijenjen za primjenu u humanoj genetici.

GAPIT (*Genome Association and Prediction Integrated Tool*) je integrirani alat namijenjen za studije pridruživanja i genomsku selekciju. Instalira se kao paket u R okruženju, a u novoj verziji 3 (Wang i Zhang, 2021.) pored niza metoda za analizu pojedinačnih lokusa uključuje i nekoliko različitih multilokusnih modela. Integracija u R okruženje pruža mogućnosti korištenja alata za upravljanje podatcima, statističku analizu i grafički prikaz rezultata.

TASSEL (*Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage*) je računalni program koji uključuje integrirane alate za studije pridruživanja i genomsku selekciju (Bradbury i sur., 2007.). Dostupan je u tri verzije: kao samostalni program (engl. *stand-alone*) s grafičkim sučeljem (GUI) ili bez njega („*pipeline*"), te kao paket za R. Kako je ovaj računalni program korišten u studijama slučaja koje će biti prikazane u nastavku ovog poglavlja, u iduća će dva potpoglavlja detaljnije biti opisane metode koje su dostupne u TASSEL-u.

5.6. KONTROLA KVALITETE I NADOMJEŠTANJE NEDOSTAJUĆIH PODATAKA

U svom izvornom obliku, skupovi genotipskih podataka nisu pogodni za izravnu upotrebu u studijama pridruživanja uslijed prisutnosti različitih tipova pogrešaka koje se u njima mogu pojaviti tijekom genotipiziranja. Te pogreške mogu nastati uslijed loše kvalitete uzoraka, zamjene uzoraka, kontaminacije i drugih razloga (Marees i sur., 2018.).

5.6.1. Formati genotipskih podataka

Razvojem novih metoda genotipiziranja (engl. *Next Generation Sequencing* – NGS; *Genotyping-by-Sequencing* – GBS) moguće je ostvariti iznimno visoku pokrivenost biljnih genoma generiranjem podataka o stotinama tisuća ili čak nekoliko milijuna SNP biljega, ovisno o veličini genoma (He i sur., 2014.). Zbog izuzetne veličine tako nastalih skupova genotipskih podataka (engl. *big data*) za njihovu pohranu koristi se niz posebnih datotečnih formata, koji uglavnom predstavljaju specijalne forme tekstualnih datoteka. TASSEL pruža mogućnost učitavanja podataka pohranjenih u nekoliko različitih formata, koji će ovdje biti ukratko opisani. To su:

1. Hapmap – tekstualne datoteke u kojima su podatci pohranjeni u obliku tablice čiji su stupci razdvojeni tabulatorima. Redci tablice predstavljaju biljege, a stupci jedinke. Prvih 11 stupaca sadrže neke dodatne informacije: oznaku referentnog alela, oznaku (broj) kromosoma, poziciju biljega i dr. Za alele biljega koriste se dvoslovne ili jednoslovne oznake (prema kodu IUPAC-a – Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju).
2. VCF (Variant Call Format) – sličan Hapmapu, osim što prvih nekoliko redaka sadrži neke meta-informacije. Aleli su kodirani na sličan način. Ovo je najšire korišteni format, pa predstavlja najbolje rješenje za prebacivanje podataka u druge računalne programe.
3. PLINK – format u kojem su informacije razdijeljene u dvije tekstualne datoteke: .ped (informacije o jedinkama) i .map (informacije o biljezima).
4. Numerički format – primarno se koristi za ostale vrste podataka (fenotip, struktura populacije), ali se može koristiti i za genotipske podatke, koji se interpretiraju kao vjerojatnosti (pojave referentnog

alela) pa mogu poprimati vrijednosti koje se kreću u rasponu [0,1].

5.6.2. Kontrola kvalitete

Prva očita posljedica pogrešaka nastalih pri genotipiziranju nedostatak je određenih podataka, pa se iz cjelokupnog skupa najprije moraju odstraniti one jedinke i biljezi kod kojih nedostaje veliki udio genotipskih podataka (npr. više od 20 %). Nakon toga uklanjaju se svi biljezi s rijetkim alelima, najčešće oni s učestalostima manje zastupljenog alela (engl. *minor allele frequency* – MAF) nižom od 5 %. Njih je potrebno ukloniti zato što su znatno osjetljiviji na pogreške pri genotipiziranju, a kod njih je također i veća učestalost „lažnih" pridruživanja. Treći je indikator mogućih pogrešaka učestalost heterozigotnih lokusa – za samooplodne vrste kod kojih se očekuje visoka razina homozigotnosti, a veći udjeli heterozigotnih lokusa ukazuju na vjerojatne pogreške pri genotipiziranju, pa je takve lokuse, odnosno jedinke, također potrebno odstraniti. Kada je broj genotipiziranih lokusa iznimno velik, može se provesti prorjeđivanje (engl. *pruning*) biljega kojim se unutar regije kromosoma zadane veličine zadržavaju samo oni biljezi koji nisu korelirani (odnosno nisu u LD-u). Filtriranje jedinki i biljega nije zahtjevan postupak, a TASSEL ima integrirane alate koji to rade na vrlo jednostavan način.

5.6.3. Nadomještanje nedostajućih podataka

U tako „pročišćenom" setu preostat će još određeni broj jedinki koje nisu uspješno genotipizirane na svim lokusima, odnosno, određeni će udio genotipskih podataka nedostajati. Kako primjena nekih statističkih metoda nije moguća bez cjelovitih setova podataka (npr. PCA) nakon filtracije potrebno je nadomjestiti (engl. *impute*) nedostajuće podatke. Osim toga, pouzdane metode procjene nedostajućih podataka također će povećati i pouzdanost pridružujućeg kartiranja, odnosno genomske selekcije. TASSEL nudi nekoliko opcija za nadomještanje (engl. *imputation*) nedostajućih genotipskih podataka. Najjednostavnija opcija su dvije numeričke metode koje se osim za genotipske mogu koristiti i za nadomještanje nedostajućih fenotipskih podataka. U situacijama kada nisu poznate točne pozicije svih biljega na genskoj karti, može se koristiti metoda LD-kNNi (Money i sur., 2015.), odnosno metoda k najbližih susjeda (engl. *k-nearest neighbors*) koja u obzir uzima LD između biljega. Preostale dvije metode namijenjene su za specifične tipove populacija, za biparentalne porodice – FSFHap, a za oplemenjivačke populacije – FILLIN (Swarts i sur., 2014.). Osim toga, TASSEL još nudi pripremu podataka za računalni program Beagle (Browning i sur., 2018.), koji predstavlja bolje rješenje za raznolike i heterozigotne populacije. Osim korištenja jedine metode dostupne unutar TASSEL-a, nedostajući fenotipski podatci mogu se prethodno nadomjestiti također primjenom nekih drugih programskih rješenja kao što je npr. PHENIX, R paket s istoimenom metodom koja se koristi korelacijama između svojstava kao i korelacijama između jedinki, odnosno njihovom srodnošću (Dahl i sur., 2016.).

5.7. STATISTIČKA ANALIZA

Pročišćeni i upotpunjeni genotipski i fenotipski podatci podvrgavaju se statističkoj analizi, uz eventualan dodatak matrica Q (struktura populacije) i K (srodnost) generiranih uz pomoć specijaliziranih računalnih programa.

5.7.1. Statistički model

TASSEL pruža mogućnosti provođenja analize pridruživanja prema nekoliko različitih modela. Najjednostavniji je od tih modela onaj koji se koristi primjenom funkcije GLM (*general linear model*). Radi se o fiksnom modelu – analognom modelu predstavljenom u okviru metode „Analiza pojedinačnih biljega" iz prethodnog poglavlja. Ovdje je taj osnovni model proširen, pa se u njemu osim fiksnog učinka biljega mogu pojaviti i neki drugi fiksni učinci (strukture populacije, učinci elemenata

dizajna pokusa, kovarijable, itd.). Korekcija na kompleksnije obrasce srodnosti provodi se uvođenjem u model slučajnog učinka genetskog zaleđa (engl. *genetic background*), odnosno primjenom mješovitih modela. Funkcija MLM (*mixed linear model*) podrazumijeva primjenu Q + K modela (Yu i sur., 2006.), zadanog u matričnoj formi pomoću izraza:

$$y = X\beta + S\alpha + Qv + Zu + e$$

gdje je y vektor fenotipskih opažanja, β vektor ostalih fiksnih učinaka, α vektor učinaka biljega, v vektor učinaka populacijske strukture, u vektor učinaka genetskog zaleđa, e vektor reziduala (pogrešaka), Q matrica populacijske strukture koja definira odnos između y i v, a X, S i Z matrice incidencije koje definiraju odnos između y i redom β, α i u. Varijanca slučajnog učinka genetskog zaleđa jednaka je:

$$VAR(u) = 2KVg$$

gdje je K matrica srodnosti, a V_g genetska varijanca. Kada fenotipski set sadrži više podataka za svaku jedinku, analiza se može provesti tako da se izravno analiziraju svi podatci ili tako da se analiziraju podatci koji su prethodno uprosječeni po jedinkama. Kako je prva varijanta izuzetno zahtjevna u smislu trošenja računalnih resursa i vremena, češće se analiziraju prosječne fenotipske vrijednosti jedinki. Radi različitog broja opažanja za različite jedinke, ta se analiza mora ponderirati pogreškama procjena (Xue i sur., 2017.) što se postiže primjenom opcije „ponderirani MLM" (*weighted MLM*).

Analogno kompleksnijim metodama predstavljenim u prethodnom poglavlju, i u studijama pridruživanja umjesto navedenih modela za analizu pojedinačnih biljega mogu se koristiti modeli koji kao kovarijable uključuju biljege koji su već prethodno pridruženi analiziranom svojstvu, odnosno multilokusni (engl. *multi-locus*) modeli. U TASSEL-u je za sada dostupna samo metoda postupne regresije koja, međutim, nije namijenjena za pridružujuće, nego za kartiranje vezanosti. Zato bi iduća verzija TASSEL-a trebala uključivati novorazvijenu metodu MSTEP (*multi-trait multi-locus stepwise model selection*) koja se zasniva na modelima koji pored više lokusa uključuju i više svojstava (Fernandes i sur., 2022.). S druge strane, GAPIT pruža mogućnost korištenja čak tri multilokusne metode: MLMM (*Multi-Locus Mixed Model*; Segura i sur., 2012.), FarmCPU (*Fixed and random model Circulating Probability Unification*; Liu i sur., 2016.) i BLINK (*Bayesian-information and Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway*; Huang i sur., 2019.).

5.7.2. KOREKCIJE VIŠESTRUKIH TESTOVA

Problem koji je naveden u prethodnom poglavlju ponavlja se i u analizama pridruživanja: analiza pojedinačnih biljega podrazumijeva provođenje zasebne analize, odnosno zasebnog F-testa za učinak svakog biljega. Uslijed provođenja velikog broja testova raste vjerojatnost da će neki od signifikantnih testova lažno ukazivati na postojanje LD-a između biljega i QTL-a, odnosno raste vjerojatnost pojave „lažnih otkrića" (Sorić, 1989.). Osnovni je problem Bonferronijeve korekcije (opisane u trećem poglavlju) što se temelji na pretpostavci da su svi provedeni testovi međusobno neovisni, što ne odgovara istini zbog postojanja LD-a između biljega, pa primjena takve pretpostavke rezultira vrlo strogom graničnom vrijednošću te posljedično vrlo malim brojem preostalih „otkrića". Radi toga se u studijama pridruživanja češće koriste znatno liberalnije metode korekcije koje se temelje na određivanju „stope lažnih otkrića" (engl. *false discovery rate* – FDR). Naime, kada u analiziranom setu podataka uopće ne bi bilo biljega koji bi se mogli pridružiti nekom QTL-u, p-vrijednosti bi slijedile uniformnu raspodjelu u rasponu od 0 do 1. Na temelju usporedbe stvarne i (te) pretpostavljene raspodjele može se odrediti granica koja razdvaja „istinita" od „lažnih otkrića" (Benjamini i Hochberg, 1995.). Storey (2002.) redefinira FDR kao pFDR (*positive false discovery rate*) te uvodi analognu q-vrijednost koja se može interpretirati kao vjerojatnost pojave „lažnih otkrića" u odnosu

na broj signifikantnih testova. TASSEL nema mogućnost korekcije p-vrijednosti, a GAPIT provodi korekciju p-vrijednosti po FDR metodi Benjaminija i Hochberga. U jednom i drugom slučaju p-vrijednosti mogu se naknadno korigirati nekom (drugom) metodom, primjenom specijaliziranih paketa za R.

LITERATURA

Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21, 263–265.

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B 57, 289–300.

Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23, 2633–2635.

Browning, B.L., Zhou, Y., Browning, S.R., 2018. A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. Am. J. Hum. Genet. 103, 338–348.

Dahl, A., Iotchkova, V., Baud, A., Johansson, S., Gyllensten, U., Soranzo, N., Mott, R., Kranis, A., Marchini, J., 2016. A multiple-phenotype imputation method for genetic studies. Nat. Genet. 48, 466–472.

Endelman, J.B., Jannink, J.L., 2012. Shrinkage estimation of the realized relationship matrix. G3 Genes, Genomes, Genet. 2, 1405–1413.

Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Buckler, E.I.S., 2003. Structure of Linkage Disequilibrium in Plants. Annu. Rev. Plant Biol.

Gunjača, J., Carović-Stanko, K., Lazarević, B., Vidak, M., Petek, M., Liber, Z., Šatović, Z., 2021. Genome-Wide Association Studies of Mineral Content in Common Bean. Front. Plant Sci. 12.

Hardy, O.J., Vekemans, X., 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol. Ecol. Notes 2, 618–620.

He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.X., Liu, H.K., Li, Z., 2014. Genotyping-by-sequencing (GBS), An ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. Front. Plant Sci.

Heuertz, M., De Paoli, E., Källman, T., Larsson, H., Jurman, I., Morgante, M., Lascoux, M., Gyllenstrand, N., 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). Genetics 174, 2095–2105.

Huang, M., Liu, X., Zhou, Y., Summers, R.M., Zhang, Z., 2019. BLINK: A package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. Gigascience 8.

Lijavetzky, D., Cabezas, J., Ibáñez, A., Rodríguez, V., Martínez-Zapater, J.M., 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. BMC Genomics 8.

Lynch, M., 1988. Estimation of Relatedness by DNA Fingerprinting. Mol. Biol. Evol. 5, 584–599.

Mangin, B., Siberchicot, A., Nicolas, S., Doligez, A., This, P., Cierco-Ayrolles, C., 2012. Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. Heredity. 108, 285–291.

Marees, A.T., de Kluiver, H., Stringer, S., Vorspan, F., Curis, E., Marie-Claire, C., Derks, E.M., 2018. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. Int. J. Methods Psychiatr. Res. 27.

Mather, K.A., Caicedo, A.L., Polato, N.R., Olsen, K.M., McCouch, S., Purugganan, M.D., 2007. The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics 177, 2223–2232.

Muñoz, P.R., Resende, M.F.R., Gezan, S.A., Resende, M.D.V., de los Campos, G., Kirst, M., Huber, D., Peter, G.F., 2014. Unraveling additive from nonadditive effects using genomic relationship matrices. Genetics 198, 1759–1768.

Myles, S., Peiffer, J., Brown, P.J., Ersoz, E.S., Zhang, Z., Costich, D.E., Buckler, E., 2009. Association mapping: Critical considerations shift from genotyping to experimental design. Plant Cell.

Nordborg, M., 2000. Linkage Disequilibrium, Gene Trees and Selfing: An Ancestral Recombination Graph With Partial Self-Fertilization. Genetics 154, 923–929.

Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A., Reich, D.E., 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. Nat. Genet. 38, 904–9.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am. J. Hum. Genet. 81, 559–575.

Sorić, B., 1989. Statistical "Discoveries" and Effect-Size Estimation. J. Am. Stat. Assoc. 84, 608–610.

Stich, B., Möhring, J., Piepho, H.-P., Heckenberger, M., Buckler, E.S., Melchinger, A.E., 2008. Comparison of mixed-model approaches for association mapping. Genetics 178, 1745–54.

Storey, J.D., 2002. A direct approach to false discovery rates. J. R. Stat. Soc. Ser. B 64, 479–498.

Swarts, K., Li, H., Romero Navarro, J.A., An, D., Romay, M.C., Hearne, S., Acharya, C., Glaubitz, J.C., Mitchell, S., Elshire, R.J., Buckler, E.S., Bradbury, P.J., 2014. Novel Methods to Optimize Genotypic Imputation for Low-Coverage, Next-Generation Sequence Data in Crop Plants. Plant Genome 7.

Tenaillon, M.I., Sawkins, M.C., Long, A.D., Gaut, R.L., Doebley, J.F., Gaut, B.S., 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). PNAS 98, 9161–9166.

VanRaden, P.M., 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. J. Dairy Sci. 91, 4414–4423.

Wang, J., Zhang, Z., 2021. GAPIT Version 3: Boosting Power and Accuracy for Genomic Association and Prediction. Genomics, Proteomics Bioinforma. 19, 629–640.

Xue, S., Ogut, F., Miller, Z., Verma, J., Bradbury, P.J., Holland, J.B., 2017. Comparison of one-stage and two-stage genome-wide association studies 1 2.

Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nat. Genet. 38, 203–8.

Zhao, K., Aranzana, M.J., Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Zheng, H., Dean, C., Marjoram, P., Nordborg, M., 2007. An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. PLoS Genet. 3, e4.

Zhu, C., Gore, M., Buckler, E.S., Yu, J., 2008. Status and Prospects of Association Mapping in Plants. Plant Genome 1, 5–20.

PRIDRUŽUJUĆE KARTIRANJE STUDIJE SLUČAJA

Grah

5.8. Cjelogenomska studija pridruživanja za sadržaj minerala u sjemenkama graha

KLAUDIJA CAROVIĆ-STANKO, JERKO GUNJAČA, BORIS LAZAREVIĆ I MONIKA VIDAK

5.8.1. UVOD

Grah (*Phaseolus vulgaris* L.) je jednogodišnja zeljasta biljna vrsta iz porodice mahunarki (Fabaceae). Gospodarski je najznačajnija i najraširenija kultivirana vrsta iz roda *Phaseolus* iz kojeg su, uz *Ph. vulgaris* L., udomaćene još četiri vrste: *Ph. lunatus* L., *Ph. coccineus* L., *Ph. acutifolius* A. Gray i *Ph. polyantus* Greenman (Gepts, 2001.).

Divlje oblike graha, koji rastu od sjevernog Meksika do sjeverozapadne Argentine, karakteriziraju tri eko-geografske zalihe gena. Dvije od njih, andska i srednjoamerička, glavne su zalihe gena vrste, a uključuju i divlje i udomaćene oblike. Treću zalihu gena predstavljaju divlje populacije koje rastu u sjevernom Peruu i Ekvadoru. Udomaćenje graha odvijalo se neovisno u Srednjoj Americi (dolina Oaxaca u južnom Meksku) i Andama (vjerojatno na području između juga Bolivije i sjevera Argentine) (Bitocchi i sur., 2017.). Protok gena između udomaćenog i divljeg graha doveo je do značajne introgresije alela (Pathania i sur., 2014.). Srednjoamerički i andski tipovi graha u različito su vrijeme uvedeni iz Srednje i Južne Amerike u Europu. Srednjoamerički je grah vjerojatno stigao u Europu preko Španjolske i Portugala 1506. godine, a andski na isti način 1528., nakon Pizarrovog istraživanja Perua (Gioia i sur., 2013.). Naknadno širenje kultivara graha diljem Europe bilo je vrlo složeno s nekoliko reintrodukcija iz različitih regija Amerike, u kombinaciji s čestim razmjenama između europskih i zemalja mediteranskog područja (Papa i sur., 2006.). Danas su i kultivari srednjoameričkog i andskog porijekla, kao i njihovi hibridi, rasprostranjeni po cijelom svijetu (Papa i sur., 2006.; Chávez-Servia i sur., 2016.). Tako u Europi prevladavaju tradicijski kultivari iz andskog centra udomaćenja, u Brazilu srednjoamerički, u Africi je jednaka učestalost andskih i srednjoameričkih, dok u Kini prevladavaju srednjoamerički (De Ron i sur., 2015.).

U Hrvatskoj je grah važna prehrambena kultura, no proizvodnja se gotovo isključivo temelji na tradicijskim kultivarima jer u novije vrijeme nema ni oplemenjivačkih programa koji bi stvarali nove sorte (Carović-Stanko i sur., 2017.). S druge strane, tijekom duge tradicije uzgoja graha u Hrvatskoj razvilo se mnoštvo tradicijskih kultivara s velikom genetskom i morfološkom raznolikošću koji su poznati pod svojim narodnim nazivima; uglavnom temeljenim na morfološkim osobinama sjemena, odnosno na boji i mozaiku sjemene ljuske (Čupić i sur., 2012.; Vidak i sur., 2015.; Carović-Stanko i sur., 2017.; Šatović i sur., 2018.). Tradicijski su kultivari važan izvor gena za prilagodbu na lokalne uvjete uzgoja i otpornost na bolesti (Carović-Stanko i sur., 2017.; Azeez i sur.,

2018.). Međutim, posljednjih godina, u opasnosti su od genetske erozije uzrokovane složenim socioekonomskim promjenama u ruralnim zajednicama (niska profitabilnost poljoprivrednih gospodarstava, njihova mala veličina i poodmakla dob poljoprivrednika, zamjena tradicionalnih kultivara modernim kultivarima graha i/ili drugih profitabilnijih kultura) (FAO, 2008.). U Europi se posljednjih desetljeća, kao odgovor na zahtjeve tržišta, opaža trend zamjene tradicijskih kultivara novima stvorenim u suvremenim oplemenjivačkim programima (Lioi i sur., 2005.).

Grah je od velike važnosti za ljudsku prehranu u cijelom svijetu, kao izvor visokokvalitetnih bjelančevina, ugljikohidrata, vitamina, minerala, dijetalnih vlakana, fitonutrijenata (flavonoidi, lignini, fitosteroli) i antioksidansa (Câmara i sur., 2013.). Mnogi od ovih spojeva imaju važne blagotvorne učinke na zdravlje ljudi te grah ima značajan potencijal kao funkcionalna hrana. Grah sadrži sve aminokiseline, ali je siromašan aminokiselinama koje sadrže sumpor, kao što su metionin, cistein i triptofan te je u kombinacijama sa žitaricama, koje njima obiluju, odlična zamjena za meso (Bennetau-Pelissero, 2019.). Nutritivni sastav sjemenki kultivara graha ovisi o čimbenicima kao što su podrijetlo, genotip i uvjeti okoliša (Gouveia i sur., 2014.). Istraživanja koja su analizirala genetsku kontrolu sastava sjemena uglavnom su bila usmjerena na minerale; kao što su željezo, fosfor i cink (Blair i sur., 2009.; Cichy i sur., 2009.), budući da je njihov nedostatak među najvažnijim nutritivnim nedostatcima u ljudskoj prehrani (Gregory i sur., 2017.; Bindraban i sur., 2020.).

5.8.2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

Arheološkim i genetskim istraživanjima utvrđeno je da je do udomaćenja graha došlo kroz dva različita događaja u Srednjoj Americi i na području Anda, pa postoje dva neovisna centra podrijetla kultiviranog graha: Srednjoamerički i Andski (Kami i sur., 1995.; Gioia i sur., 2013.). Zbog toga se populacije kultiviranog graha, s obzirom na svoje podrijetlo, mogu podijeliti na dvije skupine koje se razlikuju po svojoj genetskoj strukturi i razini genetske raznolikosti (Papa i sur., 2006.). Istraživanja su pokazala da postoje razlike između i unutar skupina koje se očituju u brojnim fiziološkim, agronomskim, morfološkim, biokemijskim i citogenetskim svojstvima te da postoji različita alelna učestalost na određenim lokusima zbog adaptacije na lokalne biotske i abiotske čimbenike (Pathania i sur., 2014.; Schmutz i sur., 2014.).

U svrhu klasifikacije i analize raznolikosti populacija graha koriste se morfološki biljezi, tip fazeolina, SSR i SNP biljezi (Chávez-Servia i sur., 2016.; Valdisser i sur., 2017.). Dostupnost molekularnih biljega omogućila je utvrđivanje podrijetla i raznolikosti populacija, kao i rasvjetljavanje genetske osnove važnih složenih agronomskih svojstava uz povećanu razlučivost (Gioia i sur., 2013.; Chávez-Servia i sur., 2016.; Valdisser i sur., 2017.). Dokazano je da je fazeolin, glavni protein za skladištenje sjemena graha, važan molekularni biljeg u istraživanjima genetske raznolikosti i evolucije divljih i kultiviranih populacija graha zbog svojih funkcionalnih i strukturnih svojstava (De La Fuente i sur., 2012.). Primke, porijeklom iz Srednjoameričkog i Andskog centra udomaćenja mogu se razlikovati prema svojim morfološkim karakteristikama kao i tipovima fazeolina (De La Fuente i sur., 2012.). Prevladavajući su tipovi fazeolina 'S' (srednjoamerički) ili 'T'/'C'/'H' (andski) (Raggi i sur., 2013.). Prema istraživanjima temeljenim na analizama fazeolina, kultivari graha andskog porijekla prevladavajući su u Europi, gdje njihov udio u pojedinim zemljama varira između 66 i 76 % (Lioi, 1989.; Logozzo i sur., 2007.; Angioi i sur., 2010.).

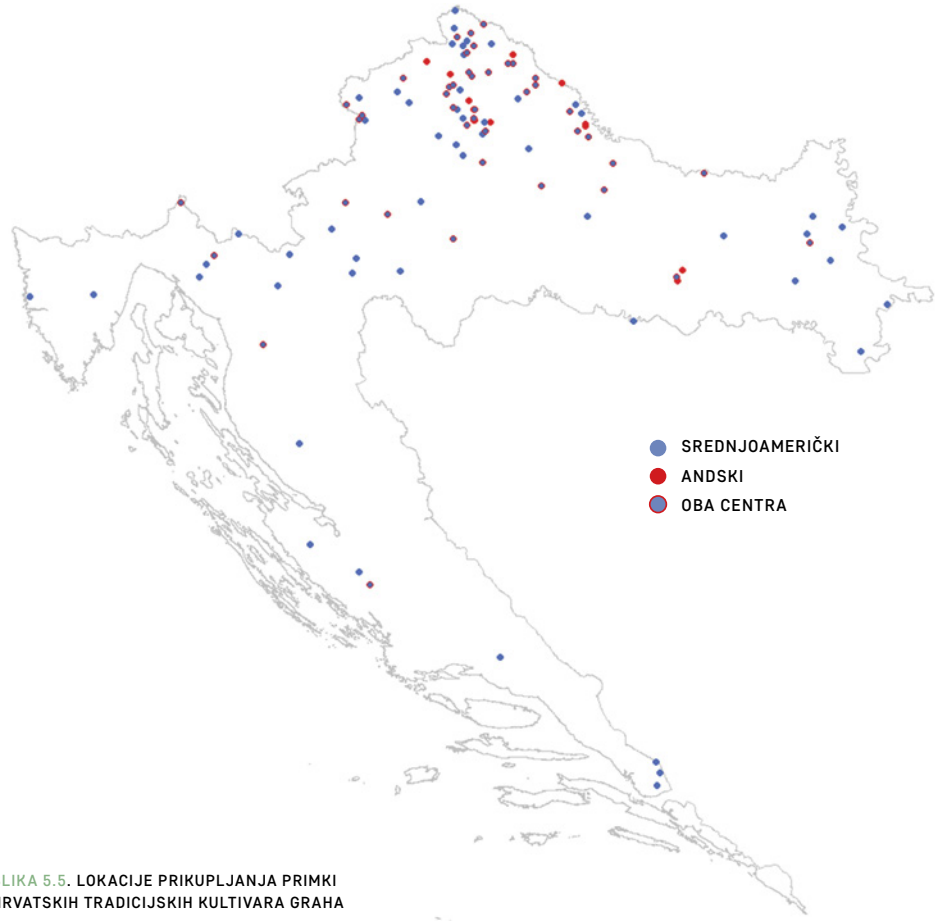
SNP-ovi se koriste u genetskoj analizi graha jer su široko rasprostranjeni i najzastupljeniji su molekularni biljezi u genomu (Nemlı i sur., 2017.; Valdisser i sur., 2017.) i dostupno ih je nekoliko tisuća (Resende i sur., 2018.). Posljednjih godina SNP biljezi sve se više razvijaju i koriste za genetske i evolucijske studije na grahu; analizu strukture genoma, analizu genetske raznolikosti, cjelogenomske studije pridruživanja i integraciju genetskih mapa (Goretti i sur., 2014.; Villordo-Pineda i sur., 2015.; Nemlı i sur., 2017.; Valdisser i sur., 2017.). Za grah, metodologija DArTseq pruža učinkovitu i isplativu strategiju za

generiranje SNP-ova za velike studije u cijelom genomu (Valdisser i sur., 2017.). Kako bi ove analize bile korisne za buduće programe uzgoja, rezultati se moraju usporediti s rezultatima morfoloških analiza kako bi se uzgajivačima pomoglo u odabiru izvornog materijala (Nkhata i sur., 2020.).

U grahu, GWAS je korišten za identifikaciju gena koji kontroliraju svojstva kao što je otpornost na bolesti (Shi i sur., 2011.; Perseguini i sur., 2016.; Zuiderveen i sur., 2016.; Tock i sur., 2017.; Fritsche-Neto i sur., 2019.), osobine povezane s tolerancijom na sušu (Galeano i sur., 2012.; Hoyos-Villegas i sur., 2017.), agronomske osobine općenito (Nemlı i sur., 2014.; Kamfwa i sur., 2015.b; Moghaddam i sur., 2016.; Ates i sur., 2018.; Nascimento i sur., 2018.; Resende i sur., 2018.), fiksacija dušika (Kamfwa i sur., 2015.a), vrijeme kuhanja (Cichy i sur., 2015.), tolerancija na poplavu (Soltani i sur., 2017., 2018.), sadržaj mikronutrijenata (Mahajan i sur., 2017.; Katuuramu i sur., 2018.; Myers i sur., 2019.; Diaz i sur., 2020.; Erdogmus i sur., 2020.) i pucanje mahuna (Rau i sur., 2019.).

5.8.3. OTKRIVANJE GENSKIH LOKUSA VEZANIH ZA SADRŽAJ MINERALA U SJEMENKAMA GRAHA

Istraživanje je provedeno na Zavodu za sjemenarstvo Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta na 174 primke hrvatskih tradicijskih kultivara graha prikupljene u domaćinstvima i obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima iz različitih dijelova Hrvatske (Slika 5.5.). Primke su odabrane na način da uklju-



SLIKA 5.5. LOKACIJE PRIKUPLJANJA PRIMKI HRVATSKIH TRADICIJSKIH KULTIVARA GRAHA

čuju najraširenije hrvatske tradicijske kultivare koji se jasno razlikuju po morfološkim svojstvima sjemenki.

Fenotipski podaci o sadržaju minerala prikupljeni su u istraživanju Palčića i sur. (Palčić i sur., 2018) i uključuju podatke za dušik (N), fosfor (P), kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), željezo (Fe), cink (Zn) i mangan (Mn) za širi panel od 226 primki.

Genotipizacija je provedena korištenjem SSR i SNP biljega dobivenih DarTseq metodom. Dvadesetšest SSR-a s ukupno 135 alela u panelu od 174 primke graha korišteno je za utvrđivanje strukture populacije korištenjem računalnog programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard i sur., 2000.). Tip fazeolina za svaku je primku određen amplifikacijom fazeolinskih sekvenci (Kami i sur., 1995.) na način opisan u Carović-Stanko i sur. (2017.).

Analiza temeljena na 26 SSR-a identificirala je K = 2 kao najvjerojatniji broj skupina (ΔK = 20 533, 24) pripisujući primke srednjoameričkog podrijetla (fazeolin tip 'S') skupini A, dok su primke andskog podrijetla (fazeolin tip 'H'/'C' ili 'T') formirale skupinu B. Kod K = 3 (ΔK = 1 935, 93), skupina B razdvojila se u dvije skupine (B1 i B2) koje odvajaju veliku većinu primki tipa fazeolin 'H'/'C' od onih koji imaju fazeolin tip 'T'. Tako je kod K = 3 skupini A pripadalo 48 primki (27,59 %), 29 (16,67 %) skupini B1, a 80 (45,96 %) skupini B2. Za 17 primki (9,77 %), vjerojatnost pripadnosti bila je niža od 75 % za bilo koju od skupina i stoga su smatrane "primkama mješovitog podrijetla". Q-vrijednosti svake primke dobivene kod K = 3 korištene su za kontrolu genetske pozadine u GWAS-u.

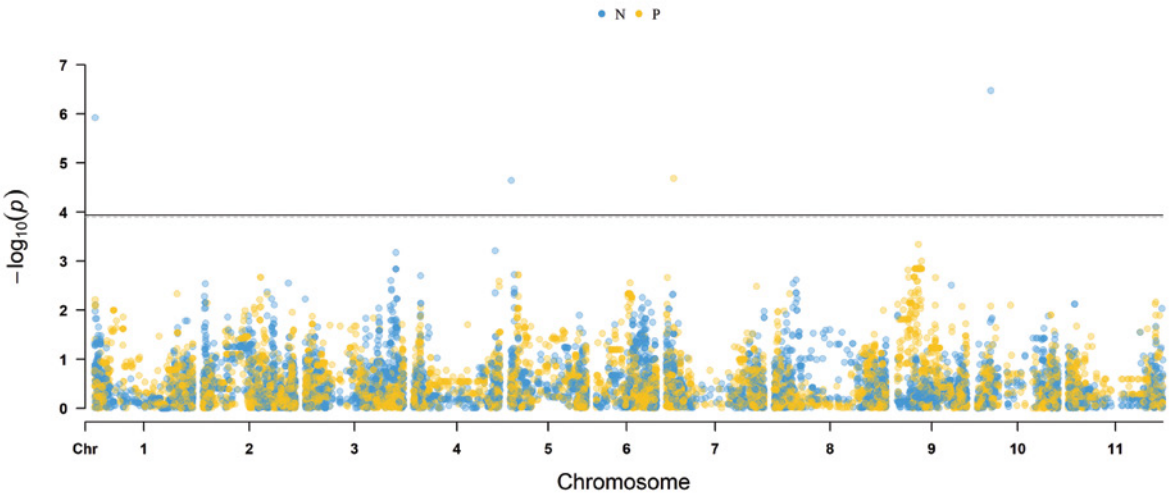
DArTseq analizu proveo je Diversity Arrays Technology Pty Ltd., Bruce, Australija. Kvaliteta SNP biljega izvedenih iz DarTseq-a određena je parametrima 'reproducibilnost' (postotak tehnički ponovljenih parova koji identično ocjenjuju za dati biljeg), 'call-rate' (postotak uzoraka za koje je dati biljeg bodovan) i 'MAF' (učestalost pojavljivanja rjeđeg alela) (Wenzl i sur., 2004.). Sekvence biljega usklađene su s referentnim genomom *Phaseolus vulgaris* (Schmutz i sur., 2014.) korištenjem BLASTN-a (Zhang i sur., 2000.). Od 17 514 polimorfnih biljega 8 092 (46 %) imalo je visoku reproducibilnost bodovanja (> 0,95), visoku stopu 'call-rate' (> 0,90) i učestalost rjeđih alela (MAF) višu od 5 %. Od 8 092 SNP sekvence, 6 599 (82 %) visokokvalitetnih SNP-ova raspoređeno je na 11 kromosoma graha. Prosječan broj SNP-ova po kromosomu bio je 599,91 u rasponu od 403 na kromosomu 4 do 834 na kromosomu 2. Prosječan broj SNP-ova po 1 Mbp-u bio je 12,85 ili jedan SNP na svakih 77 828 parova baza. Dvjesto osamdeset osam SNP-ova za koje je više od 5 % primki bilo heterozigotno uklonjeno je iz daljnje analize, a podaci koji nedostaju imputirani su korištenjem metode imputacije genotipa Beagle 5.1 (Browning i sur., 2018.) za preostalih 6311 SNP-ova. Skup podataka dopunjen je imputacijom, a zatim korišten za konstruiranje matrice srodstva primjenom četiri metode implementirane u softveru TASSEL 5 (Bradbury i sur., 2007.): (1) centrirani IBS (Endelman i Jannink, 2012.), (2) normalizirani IBS (Yang i sur., 2011.), (3) dominacijski IBS (Muñoz i sur., 2014.) i (4) dominacijski normalizirani IBS (Zhu i sur., 2015.). Dodatno, korištena je korigirana matrica srodnosti koju su predložili Diniz i sur. (2019.).

Neravnoteža vezanosti, neovisnost alela na različitim lokusima procijenjena je pomoću kvadratne vrijednosti korelacijskog koeficijenta (r^2). Pristranost uzrokovana srodnošću i/ili strukturom populacije uklonjena je korigiranjem r^2: (a) na srodnost korištenjem različitih matrica srodstva (r_V^2), (b) na strukturu populacije korištenjem Q-vrijednosti dobivenih pomoću STRUCTURE-a (r_S^2) ili (c) na oboje (r_{VS}^2) (Mangin i sur., 2012.). Kako bi se vizualiziralo opadanje LD-a kao funkcije udaljenosti između lokusa korišten je model Hilla i Weira (Hill i Weir, 1988.). Prema nekorigiranoj procjeni r^2 jačina LD-a uopće nije opadala ni na udaljenosti od 10 Mbp, a vrijednost r^2 ostala je iznad 0,3, čak i za parove lokusa na suprotnim krajevima kromosoma (vidi poglavlje 5.2, slika 5.3). Pristranost uzrokovana srodstvom jača je od pristranosti uzrokovane strukturom populacije i nije bilo gotovo nikakve razlike između korekcije samo na srodstvo i na srodstvo i strukturu populacije, pri čemu je u oba slučaja vrijednost r^2 pala ispod

0,1 na približno 1 Mbp. Iako razlike između krivulja za različite matrice srodnosti nisu bile toliko izražene, ipak je zbog nešto boljeg rezultata centralizirana IBS matrica korištena za GWAS.

Prije provođenja GWAS-a, nedostajući fenotipski podaci imputirani su pomoću PHENIX metode koja je implementirana u istoimenom R paketu (Dahl i sur., 2016.). Prije imputacije, odstupnici (*outliers*) (> 1,96 standardne devijacije) su uklonjeni pomoću opcije "trim" u "phenix-u" (od jedne do deset najekstremnijih vrijednosti po svojstvu). GWAS je proveden korištenjem modela za analizu pojedinačnih biljega (*single-locus*) (Yu i sur., 2006.) i multilokusnih modela (*multi-locus*) (Segura i sur., 2012.). Mješoviti model primijenjen u oba slučaja uključivao je korekcije za strukturu populacije i genetsku povezanost (Q i K matrice). Analiza za pojedinačne biljege provedena je primjenom računalnog programa TASSEL 5, a multilokusna analiza primjenom MLMM paketa za R (Segura i sur., 2012.). Inicijalne *p*-vrijednosti iz TASSEL-a podvrgnute su korekciji za višestruke testove, uz pomoć "qvalue" paketa za R (Storey i sur., 2020.), a *q*-vrijednost od 0,2 odabrana je kao prag značajnosti. Distribucija „sirovih" *p*-vrijednosti iz TASSEL-a prikazana je Manhattan dijagramima kreiranim primjenom "CMplot" paketa za R (Yin i sur., 2021.). Pri izradi Manhattan dijagrama za svako je svojstvo izračunat približan prag kao *p*-vrijednost hipotetskog SNP-a koji bi imao *q*-vrijednost od 0,2. Sličan približni prag značajnosti izračunat je i za MLMM, gdje su *p*-vrijednosti iz nultog koraka korištene za procjenu *p*-vrijednosti hipotetskog SNP-a koji bi imao *q*-vrijednost od približno 0,2. Distribucija alela po subpopulacijama za svaki QTN (engl. *quantitative trait nucleotide*) vizualizirana je kreiranjem violinskih dijagrama.

Najveći broj QTN-ova otkriven je za N, ukupno 22 značajna QTN-a na sedam kromosoma. Među njima, najviše su vrijednosti $-\log_{10}(p)$ uočene za dva para QTN-ova koji se nalaze na kromosomu Pv03 i kromosomu Pv10, te objašnjavaju 7 % ukupne fenotipske varijabilnosti. Pet QTN-ova povezano je s P: četiri na kromosomu Pv07 i jedan na kromosomu Pv08, objašnjavajući 8 – 9 % varijabilnosti. Pronađen je po jedan značajan QTN za Ca na kromosomu Pv09 i Mg na Pv08, objašnjavajući 9 odnosno 13 % varijabilnosti. Konačno, dva QTN-a povezana sa Zn nalazila su se 1,4 Mbp jedan od drugog na Pv06, objašnjavajući 8 i 10 % varijabilnosti. Nisu pronađeni QTN-ovi povezani s K, Fe i Mn.



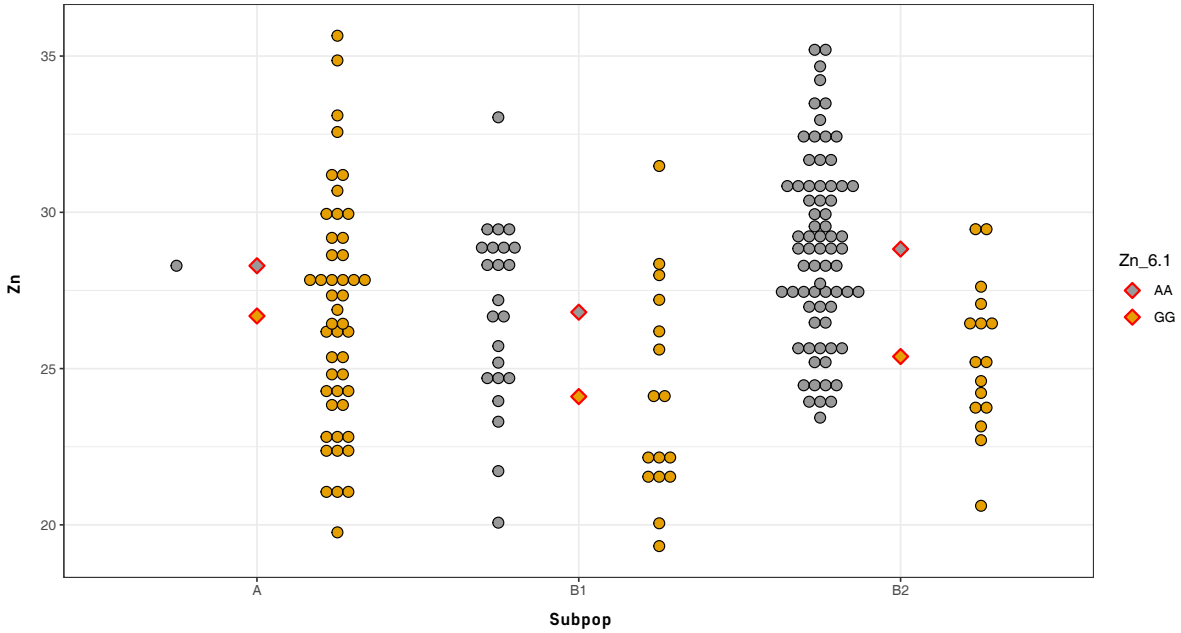
SLIKA 5.6. MANHATTAN PLOT ZA ZNAČAJNE BILJEGE OTKRIVENE MLMM-OM

Kao što se i očekivalo, višelokusni model koji se uklapa u MLMM rezultirao je s mnogo manje otkrića povezanosti biljega i svojstava. Od 22 QTN-a koje je TASSEL povezao s N, MLMM je potvrdio samo dva: jedan od četiri na Pv01 i prvi od dva QTN-a na Pv10. Slično tome, samo jedan QTN od četiri koje je TASSEL pronašao na Pv07 bio je povezan s P. Dodatno otkriće MLMM-a bio je QTN povezan s N na Pv05 (Slika 5.6.).

Što se tiče odnosa između veličina različitih procjena komponenata varijance dobivenih MLMM-om, usporedba dijagrama rezidualnog zbroja kvadrata (RSS) za N i P može se sažeti u dvije ključne točke: (1) struktura populacije objašnjava 40 % ukupne varijabilnosti za N i 0 % ukupne varijabilnosti za P; (2) varijabilnost pogreške bila je slične veličine kao genetska varijabilnost za N i dvostruko veća za P. Posljedično, unatoč sličnoj relativnoj veličini genetske varijabilnosti za N i P, MLMM je otkrio tri QTN-a s *p*-vrijednostima ispod kritične vrijednosti za N i samo jedan za P.

Najveći udio ukupne fenotipske varijabilnosti objašnjen je QTN-om Mg_8, koji objašnjava 13 % ukupne fenotipske varijabilnosti za Mg. Pridruženi biljezi bili su raspoređeni po cijelom genomu, osim kromosoma Pv04 i Pv11 na kojima nije otkriven ni jedan. N je svojstvo povezano s najvećim brojem biljega, ali su pojedinačni učinci biljega bili manji nego kod ostalih svojstava. Većina biljega bila je smještena bliže krajevima kromosoma, a samo nekoliko bliže centromernom području.

Jak učinak strukture populacije na N može se povezati s učinkom supstitucije alela na QTN mjestima. Referentni alel za sve QTN-ove uvijek je bio prisutan u svim subpopulacijama, a srednji sadržaj N kod individua koje nose referentni alel u subpopulaciji A (srednjoameričko podrijetlo) uvijek je negdje između srednjih vrijednosti subpopulacija B1 i B2 (andsko podrijetlo). Postoje tri moguća scenarija za distribuciju SNP alela. Mogli su biti prisutni samo u subpopulacijama andskog podrijetla, ali je njihov pozitivan učinak vidljiv u B1 i B2 gotovo nestao na



SLIKA 5.7. DISTRIBUCIJA ZN ZA KLASE ALELA UNUTAR SUBPOPULACIJA (A SREDNJOAMERIČKA; B1 ANDSKA; B2 ANDSKA). ROMBOVI OZNAČAVAJU SREDNJE VRIJEDNOSTI SUBPOPULACIJE ZA HOMOZIGOTE REFERENTNOG ALELA (SIVO) I HOMOZIGOTE SNP (ŽUTO).

razini cijele populacije, prikriven učinkom strukture populacije. U drugom scenariju, alel SNP prisutan je samo u subpopulaciji A (srednjoameričko podrijetlo) s očitim negativnim učinkom, koji je umanjen zbog učinka strukture populacije. Konačno, ako je SNP alel prisutan u svim subpopulacijama, njegov učinak varira od jedne do druge subpopulacije, da bi postao gotovo nevidljiv na razini cijele populacije. Isti scenariji pojavljuju se i kod drugih elemenata, npr. kod cinka (Slika 5.7.).

Rezultati GWAS-a mogu poslužiti kao osnova za razumijevanje genetičke arhitekture nutritivnih svojstava sjemenke graha, s ciljem povećanja sadržaja makro- i mikronutrijenata u okviru programa oplemenjivanja graha.

5.8.4. DALJNJA ISTRAŽIVANJA

Uzgojem biljaka u kontroliranim uvjetima komora rasta koje omogućuju upravljanje i kontrolu okolišnih čimbenika kao što su temperatura, trajanje, spektralni sastav i intenzitet svjetlosti, pristupačnost hranjiva i vode, u kombinaciji s najnovijih dostupnim metodama spektralnih analiza (VIS, NIR, IR), klorofile fluorescencije i mjerenja izmjene plinova, na inovativan način se analiziraju fenotipska svojstva biljaka, odnosno složena interakcija genotipova s njihovom okolišem. Primjena ovih metoda omogućuje fenotipizaciju visoke propusnosti (*high throughput phenotyping*, HTP), odnosno, omogućuje nedestruktivnu, objektivnu, brzu i preciznu kvantifikaciju morfoloških, anatomskih, fizioloških i biokemijskih svojstava biljaka i modeliranje ideotipa poljoprivrednih kultura prilagođenih uzgoju u specifičnim agroekološkim uvjetima. Osim toga, opisana tehnologija omogućuje proučavanje i razumijevanje temeljnih fizioloških procesa kod biljaka.

Kombinacijom ovih (HTP) metoda s naprednim tehnikama genotipizacije visoke propusnosti u *genome-wide association* studijama (GWAS) omogućit će se identifikacija genskih regija i gena povezanih uz specifična fenotipska svojstva (poput svojstva otpornosti na sušu, povećanja efikasnosti iskorištenja hranjiva ili otpornosti na bolesti). Implementacija rezultata ovakvih istraživanja u oplemenjivačkim programima putem biljezima potpomognutog oplemenjivanja će omogućiti brži i efikasniji oplemenjivački proces kojim će se stvoriti novi učinkovitiji i produktivniji genotipovi poljoprivrednih kultura.

LITERATURA

Angioi, S.A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Zeuli, P.L.S., Papa, R., 2010. Beans in Europe: Origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. Theor. Appl. Genet. 121, 829–843.

Ates, D., Asciogul, T.K., Nemlı, S., Erdogmus, S., Esiyok, D., Tanyolac, M.B., 2018. Association mapping of days to flowering in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by DArT markers. Mol. Breed. 38.

Azeez, M.A., Adubi, A.O., Durodola, F.A., 2018. Landraces and Crop Genetic Improvement, u: Grillo, O. (Ur.), Rediscovery of Landraces as a Resource for the Future. IntechOpen, London, str. 1–19.

Bennetau-Pelissero, C., 2019. Plant Proteins from Legumes, u: Mérillon, J., Ramawat, K. (Ur.), Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham., str. 223–265.

Bindraban, P.S., Dimkpa, C.O., Pandey, R., 2020. Exploring phosphorus fertilizers and fertilization strategies for improved human and environmental health. Biol. Fertil. Soils 56, 299–317.

Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M.L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., Papa, R., 2017. Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop evolution. Front. Plant Sci. 8, 1–21.

Blair, M.W., Astudillo, C., Grusak, M.A., Graham, R., Beebe, S.E., 2009. Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol. Breed. 23, 197–207.

Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23, 2633–2635.

Browning, B.L., Zhou, Y., Browning, S.R., 2018. A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. Am. J. Hum. Genet. 103, 338–348.

Câmara, C., Urrea, C., Schlegel, V., 2013. Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Functional Food: Implications on Human Health. Agriculture 3, 90–111.

Carović-Stanko, K., Liber, Z., Vidak, M., Barešić, A., Grdiša, M., Lazarević, B., Šatović, Z., 2017. Genetic diversity of Croatian common bean landraces. Front. Plant Sci. 8.

Chávez-Servia, J.L., Heredia-García, E., Mayek-Pérez, N., Aquino-Bolaños, E.N., Hernández-Delgado, S., Carrillo-Rodríguez, J.C., Gill-Langarica, H.R., Vera-Guzmán, A.M., 2016. Diversity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces and the Nutritional Value of their Grains. Grain Legum.

Cichy, K.A., Caldas, G. V., Snapp, S.S., Blair, M.W., 2009. QTL analysis of seed iron, zinc, and phosphorus levels in an andean bean population. Crop Sci. 49, 1742–1750.

Cichy, K.A., Wiesinger, J.A., Mendoza, F.A., 2015. Genetic diversity and genome-wide association analysis of cooking time in dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet. 128, 1555–1567.

Čupić, T., Gantner, R., Popović, S., Tucak, M., Sudar, R., Stjepanović, M., 2012. Widespread annual legumes in Croatia, u: Stipešević, B., Sorić, R. (Ur.), Proceedings & abstracts 5th international scientific/professional conference. Glas Slavonije d.d., Osijek, Croatia, str. 220–225.

Dahl, A., Iotchkova, V., Baud, A., Johansson, S., Gyllensten, U., Soranzo, N., Mott, R., Kranis, A., Marchini, J., 2016. A multiple-phenotype imputation method for genetic studies. Nat. Genet. 2016 484 48, 466–472.

De La Fuente, M.D., López-Pedrouso, M., Alonso, J., Santalla, M., De Ron, A.M., Álvarez, G., Zapata, C., 2012. In-depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Food Technol. Biotechnol. 50, 315–325.

De Ron, A.M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A.M., Debouck, D.G., Brick, M.A., Fourie, D., Marsolais, F., Beaver, J., Geffroy, V., McClean, P., Santalla, M., Lozano, R., Yuste-Lisbona, F.J., Casquero, P.A., 2015. Common bean, u: De Ron, A. M. (Ur.), Grain Legumes. Springer New York, str. 1–36.

Diaz, S., Ariza-Suarez, D., Izquierdo, P., Lobaton, J.D., de la Hoz, J.F., Acevedo, F., Duitama, J., Guerrero, A.F., Cajiao, C., Mayor, V., Beebe, S.E., Raatz, B., 2020. Genetic mapping for agronomic traits in a MAGIC population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under drought conditions. BMC Genomics 21, 1–20.

Diniz, W.J.S., Mazzoni, G., Coutinho, L.L., Banerjee, P., Geistlinger, L., Cesar, A.S.M., Bertolini, F., Afonso, J., De Oliveira, P.S.N., Tizioto, P.C., Kadarmideen, H.N., Regitano, L.C.A., 2019. Detection of Co-expressed Pathway Modules Associated With Mineral Concentration and Meat Quality in Nelore Cattle. Front. Genet. 10.

Endelman, J.B., Jannink, J.L., 2012. Shrinkage estimation of the realized relationship matrix. G3 Genes, Genomes, Genet. 2, 1405–1413.

Erdogmus, S., Ates, D., Nemlı, S., Yagmur, B., Asciogul, T.K., Ozkuru, E., Karaca, N., Yilmaz, H., Esiyok, D., Tanyolac, M.B., 2020. Genome-wide association studies of Ca and Mn in the seeds of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Genomics 112, 4536–4546.

FAO, 2008. Country Report on the State of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Croatia.

Fritsche-Neto, R., De Souza, T.L.P.O., Pereira, H.S., De Faria, L.C., Melo, L.C., Novaes, E., Brum, I.J.B., Jannink, J.L., 2019. Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. Sci. Agric. 76, 321–327.

Galeano, C.H., Cortés, A.J., Fernández, A.C., Soler, Á., Franco-Herrera, N., Makunde, G., Vanderleyden, J., Blair, M.W., 2012. Gene-Based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean. BMC Genet. 13.

Gepts, P., 2001. *Phaseolus vulgaris* (Beans), u: Brenner, S., Miller, J.H. (Ur.), Encyclopedia of Genetics. Elsevier Science Inc., str. 1444–1445.

Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Bellucci, E., Benedettelli, S., Negri, V., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P., 2013. Evidence for Introduction Bottleneck and Extensive Inter-Gene Pool (Mesoamerica x Andes) Hybridization in the European Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm. PLoS One 8, 1–14.

Goretti, D., Bitocchi, E., Bellucci, E., Rodriguez, M., Rau, D., Gioia, T., Attene, G., McClean, P., Nanni, L., Papa, R., 2014. Development of single nucleotide polymorphisms in *Phaseolus* vulgaris and related *Phaseolus* spp. Mol. Breed. 33, 531–544.

Gouveia, C.S.S., Freitas, G., Brito, J.H. de, Slaski, J.J., Carvalho, M.Â.A.P. de, 2014. Nutritional and Mineral Variability in 52 Accessions of Common Bean Varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) from Madeira Island. Agric. Sci. 5, 317–329.

Gregory, P.J., Wahbi, A., Adu-Gyamfi, J., Heiling, M., Gruber, R., Joy, E.J.M., Broadley, M.R., 2017. Approaches to reduce zinc and iron deficits in food systems. Glob. Food Sec. 15, 1–10.

Hill, W.G., Weir, B.S., 1988. Variances and covariances of squared linkage disequilibria in finite populations. Theor. Popul. Biol. 33, 54–78.

Hoyos-Villegas, V., Song, Q., Kelly, J.D., 2017. Genome-wide Association Analysis for Drought Tolerance and Associated Traits in Common Bean. Plant Genome 10.

Kamfwa, K., Cichy, K.A., Kelly, J.D., 2015.a. Genome-wide association study of agronomic traits in common bean. Plant Genome 8, 1–12.

Kamfwa, K., Cichy, K.A., Kelly, J.D., 2015.b. Genome-wide association analysis of symbiotic nitrogen fixation in common bean. Theor. Appl. Genet. 128, 1999–2017.

Kami, J., Velásquez, V.B., Debouck, D.G., Gepts, P., 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 1101–1104.

Katuuramu, D.N., Hart, J.P., Porch, T.G., Grusak, M.A., Glahn, R.P., Cichy, K.A., 2018. Genome-wide association analysis of nutritional composition-related traits and iron bioavailability in cooked dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Mol. Breed. 38, 1–18.

Lioi, L., 1989. Geographical variation of phaseolin patterns in an old world collection of *Phaseolus vulgaris*. Seed Sci. Technol. 17, 317–324.

Lioi, L., Piergiovanni, A.R., Pignone, D., Puglisi, S., Santantonio, M., Sonnante, G., 2005. Genetic diversity of some surviving on-farm Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. Plant Breed. 124, 576–581.

Logozzo, G., Donnoli, R., Macaluso, L., Papa, R., Knüpffer, H., Zeuli, P.S., 2007. Analysis of the contribution of Mesoamerican and Andean gene pools to European common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and strategies to establish a core collection. Genet. Resour. Crop Evol. 54, 1763–1779.

Mahajan, R., Zargar, S.M., Salgotra, R.K., Singh, R., Wani, A.A., Nazir, M., Sofi, P.A., 2017. Linkage disequilibrium based association mapping of micronutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a collection of Jammu & Kashmir, India. 3 Biotech 7.

Mangin, B., Siberchicot, A., Nicolas, S., Doligez, A., This, P., Cierco-Ayrolles, C., 2012. Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. Heredity (Edinb). 108, 285–291.

Moghaddam, S.M., Mamidi, S., Osorno, J.M., Lee, R., Brick, M., Kelly, J., Miklas, P., Urrea, C., Song, Q., Cregan, P., Grimwood, J., Schmutz, J., McClean, P.E., 2016. Genome-wide association study identifies candidate loci underlying agronomic traits in a middle American diversity panel of common bean. Plant Genome 9, 1–21.

Muñoz, P.R., Resende, M.F.R., Gezan, S.A., Resende, M.D.V., de los Campos, G., Kirst, M., Huber, D., Peter, G.F., 2014. Unraveling additive from nonadditive effects using genomic relationship matrices. Genetics 198, 1759–1768.

Myers, J.R., Wallace, L.T., Moghaddam, S.M., Kleintop, A.E., Echeverria, D., Thompson, H.J., Brick, M.A., Lee, R., McClean, P.E., 2019. Improving the health benefits of snap bean: Genome-wide association studies of total phenolic content. Nutrients 11.

Nascimento, M., Nascimento, A.C.C., Silva, F.F. e., Barili, L.D., Do Vale, N.M., Carneiro, J.E., Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S., Serão, N.V.L., 2018. Quantile regression for genome-wide association study of flowering time-related traits in common bean. PLoS One 13, 1–14.

Nemlı, S., Asciogul, T.K., Kaya, H.B., Kahraman, A., Eşiyok, D., Tanyolac, B., 2014. Association mapping for five agronomic traits in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Sci. Food Agric. 94, 3141–3151.

Nemlı, S., Kaygisiz Aşçioğul, T., Ateş, D., Eşıyok, D., Tanyolaç, M.B., 2017. Diversity and genetic analysis through DArTseq in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Turkey. Turkish J. Agric. For. 41, 389–404.

Nkhata, W., Shimelis, H., Melis, R., Chirwa, R., Mzengeza, T., Mathew, I., Shayanowako, A., 2020. Population structure and genetic diversity analyses of common bean germplasm collections of East and Southern Africa using morphological traits and high-density SNP markers. PLoS One 15, 1–23.

Palčić, I., Karažija, T., Petek, M., Lazarević, B., Herak Ćustić, M., Gunjača, J., Liber, Z., Carović-Stanko, K., 2018. Relationship between origin and nutrient content of Croatian common bean landraces 19, 490–502.

Papa, R., Nanni, L., Sicard, D., Rau, D., Attene, G., 2006. Evolution of genetic diversity in Phaseolus vulgaris L., u: Motley, T.J., Zerega, N., Cross, H. (Ur.), Darwin 's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution, and Conservation of Crops. Columbia University Press, New York, str. 121–142.

Pathania, A., Sharma, S.K., Sharma, P.N., 2014. Common Bean, u: Singh, M., Bisht, I.S., Dutta, M. (Ur.), Broadening the Genetic Base of Grain Legumes. Springer New Delhi, str. 11–50.

Perseguini, J.M.K.C., Oblessuc, P.R., Rosa, J.R.B.F., Gomes, K.A., Chiorato, A.F., Carbonell, S.A.M., Garcia, A.A.F., Vianello, R.P., Benchimol-Reis, L.L., 2016. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). PLoS One 11, 1–19.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945–959.

Raggi, L., Tiranti, B., Negri, V., 2013. Italian common bean landraces: Diversity and population structure. Genet. Resour. Crop Evol. 60, 1515–1530.

Rau, D., Murgia, M.L., Rodriguez, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Fois, D., Albani, D., Nanni, L., Gioia, T., Santo, D., Marcolungo, L., Delledonne, M., Attene, G., Papa, R., 2019. Genomic dissection of pod shattering in common bean: mutations at non-orthologous loci at the basis of convergent phenotypic evolution under domestication of leguminous species. Plant J. 97, 693–714.

Resende, R.T., de Resende, M.D. V., Azevedo, C.F., Silva, F.F. e., Melo, L.C., Pereira, H.S., Souza, T.L.P.O., Valdisser, P.A.M.R., Brondani, C., Vianello, R.P., 2018. Genome-wide association and Regional Heritability Mapping of plant architecture, lodging and productivity in *Phaseolus vulgaris*. G3 Genes, Genomes, Genet. 8, 2841–2854.

Šatović, Z., Liber, Z., Vidak, M., Gunjača, J., Grdiša, M., Lazarević, B., Carović-Stanko, K., 2018. Origin and Genetic Diversity of Croatian Common Bean Landraces, u: Uzelac, B. (Ur.), 3rd International Conference on Plant Biology, Beograd, Serbia, 9-12 June 2018. Serbian Plant Physiology Society; Institute for Biological Research, Beograd, str. 80.

Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., i sur., 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. Nat. Genet. 46, 707–713.

Segura, V., Vilhjálmsson, B.J., Platt, A., Korte, A., Seren, Ü., Long, Q., Nordborg, M., 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. Nat. Genet. 44, 825–830.

Shi, C., Navabi, A., Yu, K., 2011. Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations. BMC Plant Biol. 11.

Soltani, A., Mafimoghaddam, S., Oladzad-Abbasabadi, A., Walter, K., Kearns, P.J., Vasquez-Guzman, J., Mamidi, S., Lee, R., Shade, A.L., Jacobs, J.L., Chilivers, M.I., Lowry, D.B., McClean, P., Osorno, J.M., 2018. Genetic analysis of flooding tolerance in an andean diversity panel of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Front. Plant Sci. 9, 767.

Soltani, A., MafiMoghaddam, S., Walter, K., Restrepo-Montoya, D., Mamidi, S., Schroder, S., Lee, R., McClean, P.E., Osorno, J.M., 2017. Genetic architecture of flooding tolerance in the dry bean middle-American diversity panel. Front. Plant Sci. 8, 1183.

Storey, J., Bass, A., Dabney, A., Robinson, D., 2020. Q-value estimation for false discovery rate control.

Tock, A.J., Fourie, D., Walley, P.G., Holub, E.B., Soler, A., Cichy, K.A., Pastor-Corrales, M.A., Song, Q., Porch, T.G., Hart, J.P., Vasconcellos, R.C.C., Vicente, J.G., Barker, G.C., Miklas, P.N., 2017. Genome-wide linkage and association mapping of halo blight resistance in common bean to race 6 of the globally important bacterial pathogen. Front. Plant Sci. 8, 1–17.

Valdisser, P.A.M.R., Pereira, W.J., Almeida Filho, J.E., Müller, B.S.F., Coelho, G.R.C., de Menezes, I.P.P., Vianna, J.P.G., Zucchi, M.I., Lanna, A.C., Coelho, A.S.G., de Oliveira, J.P., Moraes, A. da C., Brondani, C., Vianello, R.P., 2017. In-depth genome characterization of a Brazilian common bean core collection using DArTseq high-density SNP genotyping. BMC Genomics 18, 1–19.

Vidak, M., Malešević, S., Grdiša, M., Šatović, Z., Lazarević, B., Carović-Stanko, K., 2015. Phenotypic diversity among Croatian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces. Agric. Conspec. Sci. 80.

Villordo-Pineda, E., González-Chavira, M.M., Giraldo-Carbajo, P., Acosta-Gallegos, J.A., Caballero-Pérez, J., 2015. Identification of novel drought-tolerant-associated SNPs in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Front. Plant Sci. 6, 1–9.

Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., Kilian, A., 2004. Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 9915–9920.

Yang, J., Lee, S.H., Goddard, M.E., Visscher, P.M., 2011. GCTA: A Tool for Genome-wide Complex Trait Analysis. Am. J. Hum. Genet. 88, 76.

Yin, L., Zhang, H., Tang, Z., Xu, J., Yin, D., Zhang, Z., Yuan, X., Zhu, M., Zhao, S., Li, X., Liu, X., 2021. rMVP: A Memory-efficient, Visualization-enhanced, and Parallel-accelerated Tool for Genome-wide Association Study. Genomics. Proteomics Bioinformatics 19, 619–628.

Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S., 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nat. Genet. 38, 203–8.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203–214.

Zhu, Z., Bakshi, A., Vinkhuyzen, A.A.E., Hemani, G., Lee, S.H., Nolte, I.M., Van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Snieder, H., Esko, T., Milani, L., Mägi, R., Metspalu, A., Hill, W.G., Weir, B.S., Goddard, M.E., Visscher, P.M., Yang, J., 2015. Dominance genetic variation contributes little to the missing heritability for human complex traits. Am. J. Hum. Genet. 96, 377–385.

Zuiderveen, G.H., Padder, B.A., Kamfwa, K., Song, Q., Kelly, J.D., 2016. Genome-Wide association study of anthracnose resistance in andean beans (*Phaseolus vulgaris*). PLoS One 11, 1–17.

GENOMSKA SELEKCIJA 6

Ivana Plavšin i
Dario Novoselović

6.1. UVOD

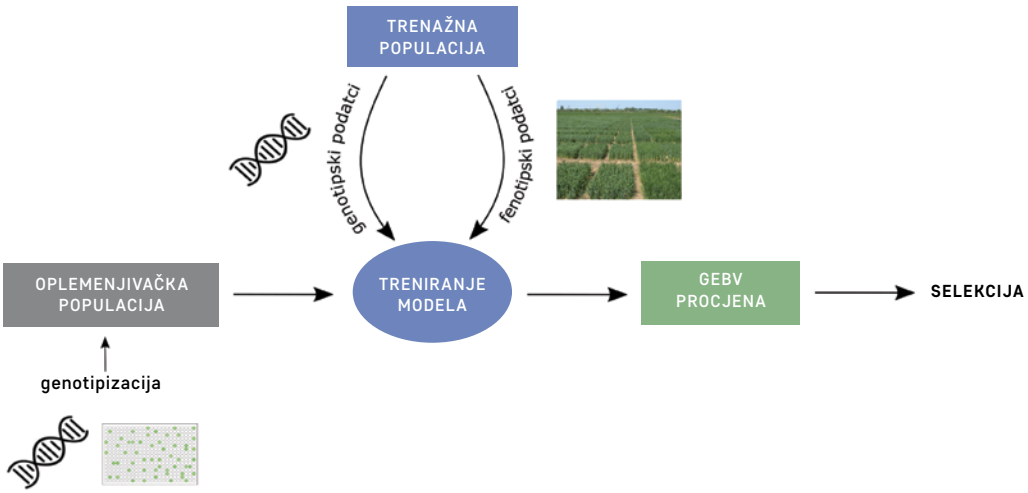
Genomska selekcija (engl. *genomic selection*; GS) noviji je pristup biljezima potpomognutoj selekciji (engl. *marker-assisted selection*; MAS) koji, za razliku od ranije korištenih metoda, koristi molekularne biljege cijelog genoma te ne zahtijeva utvrđivanje biljega povezanih s lokusima kvantitativnih svojstava (engl. *quantitative trait loci*, QTL; Bernardo i Yu, 2007.). GS kao pristup oplemenjivanju prvi je put opisana još 2001. godine kad su Meuwissen i sur. (2001.) utvrdili da je pomoću biljega visoke gustoće moguće precizno odrediti oplemenjivačku vrijednost jedinki za koje fenotipski podaci nisu dostupni. Najprije je korištena u oplemenjivanju mliječnih goveda, a do danas je stekla široku primjenu te se koristi i u oplemenjivanju bilja (Annicchiarico i sur., 2019.; Cui i sur., 2020.; Haile i sur., 2020.; Keller i sur., 2020.; Xu i sur., 2020.; Krishnappa i sur., 2021.). Iako se GS smatra jednim od oblika MAS-a, navedena dva pristupa razlikuju se u nekoliko ključnih karakteristika navedenih u Tablici 6.1 (Singh i Singh, 2015.).

U praktičnoj primjeni GS koristi dva skupa podataka: (1) trenažnu populaciju (engl. *training population*; TP) – referentna populacija za koju su poznati fenotipski i genotipski podaci, i (2) oplemenjivačku populaciju (engl. *breeding population*; BP) – obuhvaća selekcijske kandidate za koje su poznati samo genotipski podaci (Sorrells, 2015.). TP se koristi kako bi se uz pomoć statističkih modela procijenili učinci molekularnih biljega na kvantitativna svojstva od interesa. Zatim se tako procijenjeni učinci molekularnih biljega primjenjuju na BP kako bi se izračunala genomska procjena oplemenjivačke vrijednosti (engl. *genomic estimated breeding value*; GEBV), odnosno kako bi se predvidjela oplemenjivačka vrijednost selekcijskih kandidata (Lorenz i sur., 2011.; Voss-Fels i sur., 2019.) (Slika 6.1).

TABLICA 6.1. OSNOVNE SLIČNOSTI I RAZLIKE U PRISTUPU OPLEMENJIVANJU IZMEĐU BILJEZIMA POTPOMOGNUTE SELEKCIJE (MAS) I GENOMSKE SELEKCIJE (GS)

PRISTUP	GS	MAS
Ciljani QTL-i	Svi koji utječu na svojstvo	QTL-i sa značajnim i velikim učincima
Osnova selekcije	GEBV vrijednost procijenjena pomoću biljega	Molekularni biljezi
Broj korištenih biljega	Veliki broj biljega duž cijelog genoma	Nekoliko biljega povezanih s ciljanim QTL-ima
Pronalazak, potvrda i provjera QTL-a	Nije potrebno, procjenjuju se QTL učinci povezani s biljezima	Potrebno
Populacija korištena za treniranje modela/pronalazak QTL-a	U srodstvu s populacijom na kojoj se provodi GS	Ne mora biti u srodstvu s populacijom na kojoj se provodi MAS
Dugovječnost populacije korištene za treniranje modela/pronalazak QTL-a	Populacija se održava i redovno ažurira dodavanjem novih linija	Populacija se uglavnom ne održava
Fenotipska procjena	Ograničena na trenažnu populaciju	Tijekom pronalaska, potvrde i provjere QTL-a
Cilj oplemenjivačkog programa	Poboljšanje ciljanih kvantitativnih svojstava	Introgresija/Akumulacija ciljanih QTL-a
Selekcija na više svojstava	Koriste se isti genotipski podaci za sva svojstva	Koriste se zasebni genotipski podaci za svaki QTL

SLIKA 6.1. SHEMATSKI PRIKAZ GENOMSKE SELEKCIJE.



Osnova je GS-a istovremeno korištenje velikog broja molekularnih biljega, najčešće jednonukleotidnih polimorfizama (engl. *single-nucleotide polimorphism*; SNP), koji gusto i ravnomjerno prekrivaju genom. Takvi molekularni biljezi nazivaju se biljezima visoke gustoće, a upravo visoka gustoća osigurava da su svi QTL-i svojstva od interesa u neravnoteži vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*; LD) s barem jednim biljegom. Pomoću visoke gustoće pokrivenosti genoma biljezima, GS nastoji obuhvatiti ukupnu aditivnu genetičku varijancu na temelju zbroja učinaka velikog broja molekularnih biljega, pritom obuhvaćajući sve QTL-e koji doprinose varijabilnosti svojstva. Točnost predviđanja GS opisuje se Pearsonovom korelacijom između GEBV vrijednosti procijenjene za BP i prave (genetske) oplemenjivačke vrijednosti (engl. *true breeding value*; TBV). Budući da TBV vrijednost nije poznata u praktičnoj primjeni, za izračun korelacije s GEBV koristi se njezina procjena – procijenjena oplemenjivačka vrijednost (engl. *estimated breeding value*, EBV), kako bi se utvrdila uspješnost modela (Heffner i sur., 2009.). Dobivena korelacija predstavlja točnost procjene GS. Međutim, prije praktične provedbe GS-a i uključivanja u oplemenjivački program, točnost predviđanja procjenjuje se korištenjem unakrsne validacije (engl. *cross-validation*). Postupkom unakrsne validacije populacija za koju su poznati genotipski i fenotipski podaci podijeli se na trenažni skup podataka ili TP, i validacijski skup podataka ili validacijsku populaciju (engl. *validation population*, VP). U tom slučaju točnost predviđanja GS izračunava se korelacijom između procijenjene GEBV vrijednosti i stvarne, opažene fenotipske vrijednosti za VP (van den Berg i sur., 2019.; Krishnappa i sur., 2021.). Uspješnost GS-a ovisit će o dobivenoj točnosti predviđanja, a koja je pod utjecajem različitih čimbenika, uključujući molekularne, genetičke i fenotipske čimbenike, te čimbenike odabranog statističkog modela. Genetički čimbenici podrazumijevaju raspodjelu i jačinu LD-a između biljega i QTL-a, mjeru kolinearnosti između biljega, efektivnu veličinu i strukturu populacije, razlike u frekvenciji alela između TP i VP, itd. (Habier i sur., 2007.; Isidro i sur., 2015.; Edwards i sur., 2019.). U fenotipske čimbenike ubrajaju se čimbenici vezani uz sama svojstva, kao što su heritabilnost i fenotipska varijanca TP (Heffner i sur., 2009.; Ornella i sur., 2012.). Ostali su čimbenici koji utječu na točnost predviđanja veličina TP-a, broj i vrsta molekularnih biljega, srodnost TP i VP, te značajke odabranog statističkog modela (Heslot i sur., 2012.; Poland i sur., 2012.).

6.2. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA TOČNOST PREDVIĐANJA GENOMSKE SELEKCIJE

6.2.1. Veličina trenažne populacije i srodnost trenažne i oplemenjivačke (validacijske) populacije

Prvi korak za postizanje optimalne vrijednosti točnosti predviđanja i uspješno uključivanje GS-a u oplemenjivački program biljaka pravilno je definiranje TP (Jannink i sur., 2010.; Crossa i sur., 2016.b; Edwards i sur., 2019.). Prilikom dizajniranja TP treba uzeti u obzir BP, odnosno odabrati TP na osnovu rezultata koje nastojimo dobiti na BP (Krishnappa i sur., 2021.). U ovom koraku važna su dva međusobno ovisna čimbenika – veličina TP te srodnost TP i BP. Točnost predviđanja raste s porastom veličine TP sve dok se ne dosegne maksimalna vrijednost nakon koje povećanje veličine TP više nema značajan utjecaj na povećanje točnosti predviđanja (Heffner i sur., 2011.a; Arruda i sur., 2015.; Maulana i sur., 2019.). Za postizanje visokih vrijednosti točnosti predviđanja, TP i BP bi trebale biti visoko srodne (Asoro i sur., 2011.; Rutkoski i sur., 2015.). Brojna su istraživanja, jednako u biljnim i životinjskim oplemenjivačkim programima, pokazala da je točnost predviđanja GS značajno smanjena u slučaju da trenažna i kandidatna populacija nisu srodne (Windhausen i sur., 2012.; Ly i sur., 2013.; Albrecht i sur., 2014.; Lorenz i Smith, 2015.). Točnost predviđanja može rezultirati i nultim vrijednostima ili vrijednostima vrlo blizu nuli, ako se prilikom dizajniranja TP koriste isključivo jedinke nesrodne jedinkama u BP (Riedelsheimer i sur., 2013.). Čimbenici koji rezultiraju većom točnošću predviđanja u srodnim su populacijama višestruki: (1) manja je vjerojatnost da se dogodila rekombinacija između biljega i QTL-a, budući da dijele zajedničkog bliskog pretka (očuvana je veza QTL-biljeg), (2) veća je vjerojatnost prisutnosti istog polimorfnog lokusa koji uzrokuje genetsku varijaciju, (3) bliski srodnici dijele veći udio genetičke pozadine te je veća vjerojatnost da će pokazivati i slične uzorke postojanja interakcije između QTL-a i genetičke pozadine u odnosu na udaljene srodnike (Lorenz i Smith, 2015.; Mohammadi i sur., 2015.). Međusobna ovisnost veličine i srodnosti TP očituje se u činjenici: što su promatrane populacije međusobno srodnije, to je manja veličina TP potrebna za postizanje maksimalne vrijednosti točnosti predviđanja (Rutkoski i sur., 2015.; Huang i sur., 2016.). Istraživanja koja su provedena na svojstvima kvalitete pšenice pokazala su da je za postizanje približno iste vrijednosti točnosti predviđanja dovoljna tri puta manja TP za biparentalne populacije u usporedbi s populacijom koja sadrži više različitih genotipova (engl. *multifamily population*) (Heffner i sur., 2011.a; Heffner i sur., 2011.b). Battenfield i sur. (2016.) također navode da točnost predviđanja raste s porastom veličine TP, ali i s dodavanjem punih srodnika (engl. *full-sib*) u TP i VP čime se povećava genetska povezanost. Prema navodima Kristensen i sur. (2018.) srodnost populacija ima veći utjecaj na točnost predviđanja GS-a nego veličina TP. Uzimajući u obzir da je fenotipizacija često dugotrajan i skup proces, za uspješno uključivanje GS-a u oplemenjivački program ključno je dizajnirati TP koja istovremeno omogućava postizanje visokih vrijednosti točnosti predviđanja, ali i čija veličina još uvijek omogućuje fenotipizaciju koja je vremenski i financijski isplativa (Crossa i sur., 2016.b).

Da bi se to postiglo tri su moguća cilja o kojima treba voditi računa u dizajniranju TP: maksimaliziranje varijance biljega odabirom individua s različitim GEBV, smanjenje kolinearnosti između biljega dodatnim križanjima uz povećano fenotipiziranje rekombinacijskih varijanti i uniformno uzorkovanje genetske raznolikosti oplemenjivačkog programa uz pomoć multivarijacijske statistike, s ciljem poboljšanja procjene učinaka rijetkih alela (Jannink i sur., 2010.).

6.2.2. Gustoća molekularnih biljega

Istraživanja GS-a koja su ispitivala učinak gustoće molekularnih biljega dovela su do istog zaključka – da se točnost predviđanja povećava s povećanjem gustoće biljega. Kao i u slučaju veličine TP, točnost predviđanja raste s povećanjem gustoće biljega sve

dok ne dosegne maksimalnu vrijednost (tzv. plato predviđanja), (Heffner i sur., 2011.b; Haile i sur., 2018.). Koristeći simulacije, Meuwissen (2009.) je procijenio da je najmanji broj biljega potreban za postizanje visoke vrijednosti točnosti predviđanja u GS jednak umnošku efektivne veličine populacije i veličine genoma izražene u Morganima. Uzimajući u obzir pšenicu, čija veličina genoma iznosi otprilike 30 Morgana, i pretpostavljenu efektivnu veličinu populacije od 50 jedinki, potrebna gustoća iznosila bi 1500 biljega. Međutim, istraživanja na pšenici pokazala su da se i uz znatno manju gustoću biljega mogu postići zadovoljavajuće vrijednosti točnosti predviđanja (Heffner i sur., 2011.a; Heffner i sur., 2011.b) te da u nekim slučajevima broj biljega potreban za postizanje maksimalne vrijednost točnosti predviđanja može biti i veći od 1500 (Arruda i sur., 2015.; Maulana i sur., 2019.). Jedan je od najvažnijih čimbenika koji određuje gustoću biljega potrebnu za GS stopa LD-a između biljega i QTL-a (Solberg i sur., 2008.; Sorrells, 2015.). Ako biljezi nisu u potpunom LD-u s QTL-om, povećanje broja biljega dovodi do povećanja točnosti predviđanja. Optimalan broj biljega za GS koristeći visoko srodne populacije (npr. biparentalne populacije) obično je manji u odnosu na broj biljega potrebnih u slučaju manje srodnih populacija (npr. linije iz različitih populacija) (Heffner i sur., 2011.b). Mali broj genskih rekombinacija prisutan u biparentalnim populacijama biljaka koje nisu nasumično sparivane uzrokuje postojanje velikih blokova vezanih gena (*linkage blocks*) što ograničava lokalizaciju QTL-a na relativno velike intervale od 10 do 20 cM, te uzrokuje visoku stopu LD-a između biljega i QTL-a. Posljedično, manji je broj biljega potreban za predviđanja unutar biparentalnih populacija u odnosu na predviđanja unutar populacije polusrodnika (Lorenzana i Bernardo, 2009.). Prema istraživanju Juliana i sur. (2019.) jednom kad se postigne genomska razlučivost kod vrsta koje pokazuju visoku stopu LD-a, gustoća biljega ima neznatan utjecaj na točnost predviđanja GS-a. Potrebna gustoća biljega također ovisi o srodnosti TP i VP, odnosno; što su dvije populacije srodnije, maksimalna vrijednost točnosti predviđanja postiže se pri manjoj gustoći biljega (Liu i sur., 2015.).

6.2.3. Heritabilnost svojstva

Brojna su istraživanja na različitim biljnim vrstama pokazala da na točnost previđanja GS značajno utječe heritabilnost svojstva, tj. udio genetske komponente u ekspresiji fenotipa. Iako ne postoji jednoznačna kategorizacija vrijednosti heritabilnosti, u većini istraživanja ona se opisuje kao niska (ako je vrijednost < 0,4), umjerena (0,4 – 0,7) ili visoka (> 0,7) (Heffner i sur., 2011.a; Heffner i sur., 2011.b). Heritabilnost svojstva utječe na GS tako što je njena vrijednost niža, to je manja i točnost predviđanja, i obrnuto (Bernardo i Yu, 2007.; Combs i Bernardo, 2013.; Zhang i sur., 2015.). Za svojstva koja pokazuju nisku heritabilnost potrebno je značajno povećati broj fenotipskih opažanja ili povećati TP kako bi se postigle slične vrijednosti točnosti predviđanja, kao u slučaju svojstava s visokom heritabilnošću (Meuwissen i sur., 2001.; Sorrells, 2015.; Hayes i sur., 2017.).

6.2.4. Interakcija genotip × okolina

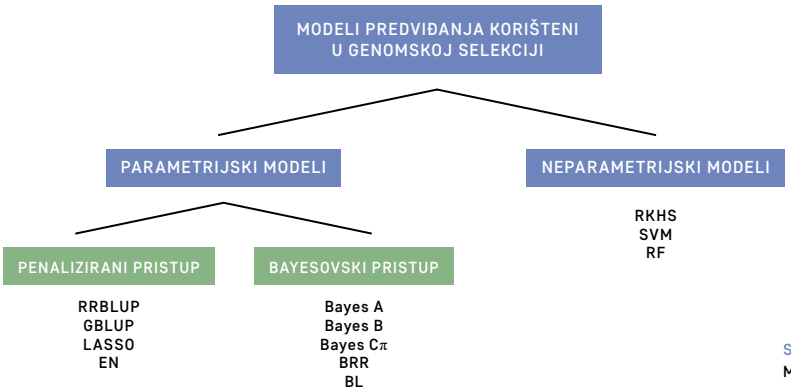
Na točnost predviđanja GS modela u određenoj mjeri utječe i postojanje interakcije genotip × okolina (engl. *genotype-by-environment interaction*; GEI). Većina kompleksnih i ekonomski važnih svojstava pod snažnim je utjecajem okolišnih uvjeta, te kod takvih svojstava prisutnost GEI može dovesti do promjene poretka uspješnosti genotipova u različitim okolinama. U tom slučaju otežana je selekcija na široko prilagođen genotip jer, ovisno o okolinama, može postojati i više od jednog najuspješnijeg genotipa (Heslot i sur., 2014.). Utjecaj GEI na točnost predviđanja GS-a očituje se kroz njen negativan utjecaj na heritabilnost svojstva, a što će posljedično uzrokovati i smanjenje genetske dobiti. Dosadašnja su istraživanja pokazala i da točnost predviđanja značajno varira između testiranih okolina (Crossa i sur., 2016.a). Točnost predviđanja svojstava koja

su pod snažnim utjecajem okoline bit će smanjena, posebno ako se provode višeokolinski pokusi (engl. *multi-environmental trial*; MET). Odabir okolina za MET treba biti pravilno isplaniran kako bi se smanjio utjecaj okoline i GEI na fenotipske vrijednosti (Xu, 2016.). Promatrajući točnost predviđanja GS-a za svojstvo uroda pšenice, Belamkar i sur. (2018.) zaključili su da je ona uslijed prisutnosti GEI značajno niža kad se predviđanja provode između različitih godina u odnosu na predviđanje unutar iste godine pokusa. Neka istraživanja predlažu uključivanje GEI u GS model (Jarquín i sur., 2014.; Lopez-Cruz i sur., 2015.; Lado i sur., 2016.) ili uključivanje informacija iz visoko koreliranih okolina (Burgueño i sur., 2012.; Ornella i sur., 2012.) kako bi se povećala točnost predviđanja. Identifikacija i uklanjanje okolina iz skupa podataka koji se koristi za treniranje modela također predstavljaju uspješnu strategiju za poboljšanje točnosti predviđanja (Heslot i sur., 2013.).

6.3. MODELI PREDVIĐANJA KORIŠTENI U GENOMSKOJ SELEKCIJI

U posljednjih nekoliko desetljeća značajno su se povećali dostupnost i brzina genotipizacije, dok je fenotipizacija ostala ograničavajući faktor u oplemenjivanju bilja. Kao rezultat velikog broja informacija dobivenih razvojem i primjenom visoko propusne genotipizacije, prilikom primjene biljega u procjeni fenotipa, oplemenjivači se suočavaju s problemom premalog broja opažanja u odnosu na broj biljega. Kada je broj varijabli predviđanja (broj biljega) veći od broja opažanja (fenotipske vrijednosti), rezultat je beskonačan broj procjena učinaka biljega. Kako bi se smanjio problem visoko-dimenzioniranih podataka, koriste se različite metode sažimanja na osnovu kojih su razvijeni i različiti modeli korišteni u GS-u. Modeli se uglavnom razlikuju u pretpostavkama distribucije i varijance učinaka biljega, odnosno pretpostavkama kako učinci biljega doprinose ukupnoj varijanci (Meuwissen i sur., 2001.; Liu i sur., 2018.). Za potrebe predviđanja, uz pomoć GS-a, koriste se različiti parametrijski i neparametrijski modeli (Heffner i sur., 2009.; de los Campos i sur., 2013.; Merrick i Carter, 2021.), a klasifikacija najčešće korištenih modela prikazana je na Slici 6.2. Parametrijski modeli pretpostavljaju da je veza između fenotipskih i genotipskih vrijednosti linearna, stoga uzimaju u obzir samo aditivne učinke gena, dok neparametrijski modeli tu vezu objašnjavaju nelinearnim funkcijama, te uzimaju u obzir i neaditivne učinke gena (Desta i Ortiz, 2014.). Točnost predviđanja različitih modela ovisi o genetskoj arhitekturi promatranog svojstva (Larkin i sur., 2019.).

Predviđanje po principu najboljih linearnih nepristranih predviđanja (engl. *best linear unbiased prediction*; BLUP) temelj je tzv. BLUP modela, među kojima su najčešće korišteni GBLUP (engl. *genomic BLUP*) i RRBLUP (engl. *ridge-regression BLUP*). Prema Meuwissen i sur. (2001.) model prema kojem se odvijaju predviđanja kod BLUP modela je sljedeći:



SLIKA 6.2. KLASIFIKACIJA NAJČEŠĆE KORIŠTENIH MODELA PREDVIĐANJA U GENOMSKOJ SELEKCIJI.

$$y = \mu + Zu + e$$

gdje je y vektor prilagođenih prosjeka za promatrano svojstvo, μ je ukupni prosjek, Z je matrica biljega, u je vektor učinaka biljega (uz pretpostavku $u \sim N(0, I\sigma_u^2)$), a e je pogreška ostatka. Za izračun učinaka biljega RRBLUP model koristi hrbatnu regresiju (engl. *ridge-regression;* RR) koja predstavlja metodu sažimanja koeficijenata regresije prema nuli i jedan prema drugome. Ovaj model pretpostavlja biljege nasumičnim učinkom sa zajedničkom varijancom, a svi učinci biljega jednako se sažimaju prema nuli, iako mogu imati nejednake učinke (Meuwissen i sur., 2001.; Heffner i sur., 2011.a; Heslot i sur., 2012.). Glavna pretpostavka RRBLUP modela je da svi lokusi objašnjavaju jednaki dio genetske varijance te da učinci biljega slijede normalnu distribuciju. Prema Piepho (2009.), veličinu sažimanja učinaka određuje parametar složenosti λ, koji se izračunava prema jednadžbi $\lambda = \sigma_e^2/\sigma_u^2$, gdje je σ_e^2 varijanca pogreške ili reziduala, a σ_u^2 varijanca biljega. RRBLUP se modelom GEBV vrijednosti selekcijskih kandidata predviđaju na osnovu procijenjenih učinaka biljega iz trenažnog skupa podataka (Whittaker i sur., 2000.). GBLUP model ne oslanja se na procjenu učinaka biljega, već uz pomoć biljega procjenjuje matricu odnosa između fenotipiziranih jedinki trenažnog skupa podataka i nefenotipiziranih selekcijskih kandidata, koja se zatim koristi za procjenu matrice varijanci/kovarijanci genetskih vrijednosti (Zhong i sur., 2009.; Tan i sur., 2017.). Ova dva modela istovjetna su pod uvjetima koji se obično susreću u praktičnoj primjeni GS-a (Habier i sur., 2007.; Hayes i sur., 2009.).

Osim BLUP modela, u parametrijske modele s penalizacijskim pristupom, između ostalih, još se ubrajaju i modeli operator najmanjeg apsolutnog skupljanja i odabira (engl. *least absolute shrinkage and selection operator;* LASSO) i elastična mreža (engl. *elastic net*; EN). LASSO model istovremeno na učinke biljega primjenjuje metodu odabira varijabli (iz para usko povezanih biljega izabire jedan, a ostale zanemaruje) i metodu sažimanja njihovih regresijskih koeficijenata (Wang i sur., 2018.). EN model predstavlja analizu kombinacijom LASSO i RR regresije. Primjenjuje ponderiranu penalizaciju uz čimbenik α koji određuje koliko se težine dodjeljuje svakoj od dvije metode. EN vrši odabir skupina visoko koreliranih biljega, dok istovremeno primjenjuje kontinuirano sažimanje biljega (Zou i Hastie, 2005.; Friedman i sur., 2010.).

Bayesovski modeli također pripadaju parametrijskim modelima, a svoju osnovu nalaze u Bayesovom teoremu. Za razliku od BLUP modela čija je osnovna pretpostavka da svi učinci biljega imaju zajedničku varijancu, što može dovesti do prevelikog sažimanja velikih učinaka, bayesovski modeli dopuštaju da biljezi imaju različite učinke i varijance. Osmišljene su kako bi se preciznije modelirali učinci biljega različitih veličina, što je realističnija pretpostavka, budući da je poznato da je većina kompleksnih svojstava pod utjecajem nekoliko biljega s velikim učinkom, dok većina biljega ima mali učinak na svojstvo, ili on u potpunosti izostaje (Heffner i sur., 2009.). Pretpostavka Bayesovskih modela je da genetska varijanca i-tog lokusa (V_{gi}) prati početnu (unaprijed određenu) raspodjelu, $p(V_{gi})$. Za svaki se biljeg procjenjuje zasebna varijanca (varijance mogu varirati), a na osnovu informacija iz početne se raspodjele procjenjuje genetska varijanca (V_{gi}) (Meuwissen i sur., 2001.). Ovisno o unaprijed određenim parametrima raspodjele, razlikujemo više Bayesovskih modela koje se često još nazivaju i bayesovskim abecednim modelima. BayesA model pretpostavlja da genetska varijanca slijedi invertiranu χ^2 raspodjelu sa stupnjevima slobode i parametrima skaliranja tako odabranima kako bi srednja vrijednost i varijanca raspodjele odgovarale očekivanim srednjim vrijednostima i varijancama biljega. BayesA ne omogućuje postojanje nultih vrijednosti učinaka biljega, što često nije realna pretpostavka, budući da postoje dijelovi genoma koji ne nose informaciju o QTL-u te će stoga učinci nekih biljega sigurno izostati (Heffner i sur., 2009.). Za razliku od BayesA modela, BayesB i BayesCπ omogućuju da bi učinci nekih biljega bili procijenjeni na 0, odnosno da neki biljezi nemaju

učinka. BayesB model primjenjuje t-raspodjelu na varijance učinaka biljega, dok Bayes Cπ primjenjuje gausijansku raspodjelu (Habier i sur., 2011.). BayesB i BayesCπ modeli uvode čimbenik π koji određuje vjerojatnost da je učinak biljega jednak nuli (Heffner i sur., 2009.). Oba modela zahtijevaju da je π (udio biljega koji ne pridonose značajno svojstvu od interesa) unaprijed poznat. Međutim, ako je udio biljega koji nemaju učinak nepravilno procijenjen, to može imati negativne posljedice za procjenu točnosti predviđanja u GS-u (Wang i sur., 2018.). Stoga BayesCπ model dodatno pretpostavlja da bi učinci biljega koji su uključeni u model imali jednaku varijancu. BayesLASSO (BL) model predstavlja inačicu LASSO regresije opisane u radu autora Park i Casella (2008.). BL pretpostavlja da su učinci biljega normalno distribuirani, da je varijanca specifična za svaki biljeg i slijedi eksponencijalnu raspodjelu s nepoznatim parametrom λ koji slijedi gama distribuciju, a određuje jačinu sažimanja (de los Campos i sur., 2009.; Crossa i sur., 2010.; Tan i sur., 2017.). Uzimajući u obzir navedene pretpostavke, vidljivo je da BL model uzrokuje jače sažimanje regresijskih koeficijenata koji su bliže nuli (biljezi s vrlo malim učinkom), dok koeficijente čija je apsolutna vrijednost velika sažima manje (biljezi s većim učinkom, bez obzira na predznak) (Heslot i sur., 2012.). Slično kao i kod RRBLUP modela, bayesovska hrbatna regresija (engl. *Bayesian ridge regression*; BRR) sažima učinke biljega jednako prema nuli, ali još dodatno primjenjuje prethodnu normalnu raspodjelu na učinke biljega (de los Campos i sur., 2013.).

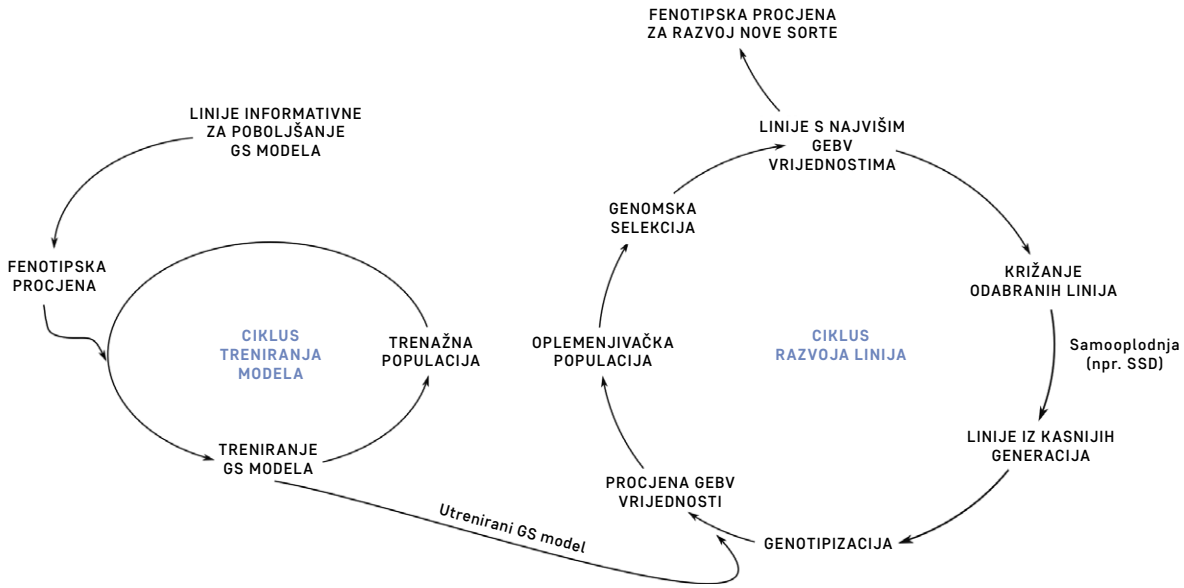
U neparametrijske modele korištene u GS-u ubrajaju se modeli zasnovani na različitim jezgrenim metodama (engl. *kernel methods*) od kojih je najpoznatiji model reproduciranje Hilbertovih prostora jezgre (engl. *reporoducing kernel Hilbert space*; RKHS). RKHS model pretvara varijable predviđanja (biljege) u skup međusobnih udaljenosti kako bi se proizvela matrica vrijednosti koja će zatim biti korištena u linearnom modelu (Wang i sur., 2018.). Ovaj model kombinira aditivni genetski model s jezgrenom funkcijom te se pokazao korisnim za hvatanje neaditivnih učinaka gena (Gianola i Van Kaam, 2008.). Osim RKHS, ovoj skupini pripadaju još i različiti modeli zasnovani na metodama strojnog učenja (engl. *machine learning*) i metodama dubokog učenja (engl. *deep learning*). Model slučajnih šuma (engl. *random forest*; RF) zasniva se na izgradnji velikog broja jednako raspodijeljenih stabala odluke (engl. *decision trees*). Prilikom izgradnje svakog od stabala odluke optimalni poduzorak trenažnog seta podataka odabire se koristeći *bootstrap* metodu. Za svako pojedinačno stablo odluke vrši se predviđanje korištenjem regresijskog modela, a konačna vrijednost točnosti predviđanja izračunava se kao srednja vrijednost predviđanja za sva stabla odluke (Breiman, 2001.; Shah i sur., 2019.). Model stroja s potpornim vektorima (engl. *support vector machines*; SVM) zasniva se na primjeni principa strukturne minimizacije rizika te uzima u obzir složenost podataka korištenih za treniranje modela. Istraživanja su pokazala da su RF i SVM modeli učinkoviti u otkrivanju interakcija između biljega (Jannink i sur., 2010.; Desta i Ortiz, 2014.).

6.4. UKLJUČIVANJE GENOMSKE SELEKCIJE U OPLEMENJIVAČKI PROGRAM BILJAKA

Iako je u svojim začecima GS uglavnom bila primjenjivana u životinjskim oplemenjivačkim programima, posebno u oplemenjivanju na mliječnost goveda, do danas je stekla široku primjenu i u biljnim oplemenjivačkim programima (Xu i sur., 2020.; Krishnappa i sur., 2021.). Unatoč brojnim preprekama koje postoje u biljnim u odnosu na životinjske oplemenjivačke programe (npr. GEI), do danas je GS uspješno korištena u oplemenjivanju na različita kvantitativna svojstva pšenice (Heffner i sur., 2011.b; Arruda i sur., 2015.; Bassi i sur., 2016.; Crossa i sur., 2016.b), ječma (Lorenzana i Bernardo, 2009.; Lorenz i Smith, 2015.; Sallam i sur., 2015.), raži (Wang i sur., 2014.; Schulthess i sur., 2016.), zobi (Asoro i sur., 2011.), kukuruza (Bernardo i Yu, 2007.; Crossa i sur., 2013.; Albrecht i sur., 2014.; Zhang i sur., 2015.), riže (Guo i sur., 2014.; Grenier

i sur., 2015..; Cui i sur., 2020), graška (Zhong i sur., 2009.; Burstin i sur., 2015.; Annicchiarico i sur., 2019.), krumpira (Slater i sur., 2016.; Caruana i sur., 2019.), rajčice (Duangjit i sur., 2016.; Yamamoto i sur., 2016.), soje (Duhnen i sur., 2017.; Qin i sur., 2019.; Stewart-Brown i sur., 2019.) i mnogih drugih vrsta, uključujući i neke višegodišnje, drvenaste vrste (Grattapaglia i Resende, 2011.; Isik, 2014.).

Najvažnija je prednost GS-a povećanje genetske dobiti uslijed skraćivanja selekcijskog ciklusa u oplemenjivačkom procesu (Heffner i sur., 2010.; Sorrells, 2015.; Voss-Fel i sur., 2019.). GS poboljšava točnost selekcije i omogućuje raniji odabir linija u uzgojnom ciklusu, čime se smanjuje potencijalni trošak fenotipizacije (Belamkar i sur., 2018.). Budući da GS uzima u obzir sve dostupne biljege bez njihovog predodabira, navodi se da je posebno prikladna za predviđanje kvantitativnih svojstava, na čije ispoljavanje utječe veliki broj biljega s malim učinkom (Kristensen i sur., 2018.).U usporedbi s uobičajeno korištenim MAS strategijama u oplemenjivanju na agronomski važna složena svojstva, GS zahtijeva manje opsežnu fenotipizaciju za identifikaciju agronomski superiornijih linija. Heffner i sur. (2010.) procijenili su da je za svaki ciklus MAS-a moguće provesti 2,33 ciklusa oplemenjivačkog programa ozime pšenice zasnovanog na GS-u, te da uz uvjet postizanja točnosti predviđanja od 0,5 genetska dobit na godišnjoj razini premašuje dobit od MAS-a za dva puta. Oplemenjivači biljaka do danas su stekli vrijedne spoznaje o primjeni i načinima uključivanja GS-a u oplemenjivački program, međutim te su primjene uglavnom ograničene na istu populaciju unutar uzgojnog ciklusa. Prema Auinger i sur. (2016.) točnost predviđanja GS-a dobivena unutar jednog ciklusa može se smatrati gornjom graničnom vrijednosti, budući da su jedinke unutar jednog ciklusa obično visoko srodne, te se njihov razvoj odvija pod utjecajem istih okolišnih čimbenika. Predviđanje kroz više uzgojnih ciklusa rezultira smanjenjem točnosti predviđanja jer je u tom slučaju smanjena srodnost promatrane populacije, a zbog utjecaja okoline i fenotipski podaci pokazuju veću varijabilnost. Međutim, istraživanje Belamkar i sur. (2018.) pokazalo je da GS može biti korištena i u preliminarnim procjenama prinosa u oplemenjivačkom programu pšenice



SLIKA 6.3. SHEMATSKI PRIKAZ OPLEMENJIVAČKOG PROGRAMA ZASNOVANOG NA GENOMSKOJ SELEKCIJI (PREMA HEFFNER I SUR., 2009.).

te da i niske vrijednosti točnosti predviđanja mogu uspješno biti korištene za procjenu i selekciju u ranim generacijama. Također je uočeno da korištenje podataka o GEBV vrijednostima zajedno s fenotipskim vrijednostima u preliminarnim pokusima povećava mogućnost odabira boljih linija kroz više okolina (lokacija i godina) u odnosu na odabiranje isključivo na osnovu fenotipskih vrijednosti tijekom jedne godine.

Heffner i sur. (2009.) predložili su strategiju prema kojoj se GS može vrlo učinkovito uključiti u oplemenjivačke programe biljaka, a koja se sastoji od dva odvojena ciklusa: (1) ciklusa treniranja modela, i (2) ciklusa razvoja linija (Slika 6.3.). Svrha je ciklusa treniranja modela poboljšanje točnosti predviđanja što se postiže kontinuiranim uključivanjem superiornih linija u treniranje modela, a koje su razvijene u ciklusu razvoja linija. Linije koje se uključuju u ciklus treniranja modela procjenjuju se fenotipski, a njihovi genotipski podaci preuzimaju se iz ciklusa razvoja linija. U ciklusu razvoja linija, superiorne se linije odabiru na osnovu GEBV vrijednosti od kojih se zatim razvijaju cijepajuće generacije. U kasnijim se generacijama linije genotipiziraju te se odabiru linije s najboljim procjenama GEBV vrijednosti koje se mogu i fenotipizirati te služiti kao nove sorte, ali se koriste i za križanja iz kojih će se razviti nova populacija za sljedeći ciklus GS-a. Kako bi ovakve strategije pronašle praktičnu primjenu u oplemenjivačkom programu, nužno je da se najprije utvrde optimalni parametri za provođenje GS-a na kulturi od interesa, kao što su model predviđanja, veličina trenažne populacije i gustoća biljega, a što će prvenstveno ovisiti o srodnosti promatrane populacije te promatranom svojstvu.

GS u suštini predstavlja metodološki pristup ili strategiju korištenja podataka o fenotipskim svojstvima te velikog broja biljega kroz različite predikcijske modele s ciljem povećanja genetske dobiti od selekcije. Ukoliko selekcija temeljena na GEBV vrijednostima može skratiti vrijeme trajanja u bilo kojoj fazi oplemenjivačkog ciklusa može se očekivati da će se ostvariti veća dobit primjenom GS u odnosu na klasičnu fenotipsku selekciju. S praktične strane to je naglašenije ukoliko se GS primjenjuje u ranim fazama, iako rezultati ukazuju da je točnost GS i fenotipske selekcije varirala ovisno o korištenom materijalu i ovisno o okolini. Što je točnost fenotipske selekcije bila niža tako su i vrijednosti za GS bile niže, uz napomenu da su troškovi za GS uvijek bili niži (Belamkar i sur., 2018.; Borrenpohl i sur., 2020.). Za očekivati je da će se i u bliskoj budućnosti nastaviti trend snižavanja troškova genotipizacije, ali i rasta troškova fenotipizacije. Nadalje, primjena GS-a daje točniju procjenu oplemenjivačke vrijednosti u odnosu na informaciju o rodoslovlju genotipa. Prema teoriji, GS uzrokuje sporije povećanje srodnosti između jedinki (tzv. *inbreeding*) ili gubitak genetske raznolikosti u usporedbi sa selekcijom na oplemenjivačku vrijednost temeljenu na osnovi informacija o rodoslovlju (Daetwyler i sur., 2007.). Međutim, treba naglasiti da GS u praksi može uzrokovati genetski pomak (engl. *drift*) ne detektirajući QTL (koji samim tim neće biti ni odabran), pa ukoliko fiksirani biljeg i QTL nisu u savršenom LD-u, odabirom biljega neće se nužno odabrati ni fiksirani QTL (Muir, 2007.). Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da osnovna genetska arhitektura svojstva od interesa, karakterizirana s odgovarajućim brojem QTL-a, distribucijom alelnih učinaka i frekvencijom alela, utječe na uspješnost različitih GS modela (Jannink i sur., 2010.). Uzimajući u obzir sve prednosti i ograničenja, GS nedvojbeno ima veliki potencijal primjene u oplemenjivanju bilja, neovisno o oplemenjivačkim ciljevima.

LITERATURA

Albrecht, T., Auinger, H.J., Wimmer, V., Ogutu, J.O., Knaak, C., Ouzunova, M., Piepho, H.P., Schön, C.C., 2014. Genome-based prediction of maize hybrid performance across genetic groups, testers, locations, and years. Theor. Appl. Genet. 127, 1375–1386.

Annicchiarico, P., Nazzicari, N., Pecetti, L., Romani, M., Russi, L., 2019. Pea genomic selection for Italian environments. BMC Genomics 20, 1–18.

Arruda, M.P., Brown, P.J., Lipka, A.E., Krill, A.M., Thurber, C., Kolb, F.L., 2015. Genomic selection for predicting fusarium head blight resistance in a wheat breeding program. Plant Genome 8, 1–12.

Asoro, F.G., Newell, M.A., Beavis, W.D., Scott, M.P., Jannink, J.-L., 2011. Accuracy and training population design for genomic selection on quantitative traits in elite North American oats. Plant Genome J. 4, 132–144.

Auinger, H.J., Schönleben, M., Lehermeier, C., Schmidt, M., Korzun, V., Geiger, H.H., Piepho, H.P., Gordillo, A., Wilde, P., Bauer, E., Schön, C.C., 2016. Model training across multiple breeding cycles significantly improves genomic prediction accuracy in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 129, 2043–2053.

Bassi, F.M., Bentley, A.R., Charmet, G., Ortiz, R., Crossa, J., 2016. Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). Plant Sci. 242, 23–36.

Battenfield, S.D., Guzmán, C., Gaynor, R.C., Singh, R.P., Peña, R.J., Dreisigacker, S., Fritz, A.K., Poland, J.A., 2016. Genomic Selection for Processing and End-Use Quality Traits in the CIMMYT Spring Bread Wheat Breeding Program. Plant Genome 9.

Belamkar, V., Guttieri, M.J., Hussain, W., Jarquín, D., Elbasyoni, I., Poland, J., Lorenz, A.J., Baenziger, P.S., 2018. Genomic selection in preliminary yield trials in a winter wheat breeding program. G3 Genes, Genomes, Genet. 8, 2735–2747.

Bernardo, R., Yu, J., 2007. Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. Crop Sci. 47, 1082–1090.

Borrenpohl, D., Huang, M., Olson, E., Sneller, C., 2020. The value of early-stage phenotyping for wheat breeding in the age of genomic selection. Theor. Appl. Genet. 133, 2499–2520.

Breiman, L., 2001. Random Forests. Mach. Learn. 45, 5–32.

Burgueño, J., de los Campos, G., Weigel, K., Crossa, J., 2012. Genomic prediction of breeding values when modeling genotype × environment interaction using pedigree and dense molecular markers. Crop Sci. 52, 707–719.

Burstin, J., Salloignon, P., Chabert-Martinello, M., Magnin-Robert, J.B., Siol, M., Jacquin, F., Chauveau, A., Pont, C., Aubert, G., Delaitre, C., Truntzer, C., Duc, G., 2015. Genetic diversity and trait genomic prediction in a pea diversity panel. BMC Genomics 16, 1–17.

Caruana, B.M., Pembleton, L.W., Constable, F., Rodoni, B., Slater, A.T., Cogan, N.O.I., 2019. Validation of genotyping by sequencing using transcriptomics for diversity and application of genomic selection in tetraploid potato. Front. Plant Sci. 10.

Combs, E., Bernardo, R., 2013. Accuracy of genomewide selection for different traits with constant population size, heritability, and number of markers. Plant Genome 6, 1–7.

Crossa, J., Beyene, Y., Semagn, K., Pérez, P., Hickey, J.M., Chen, C., de los Campos, G., Burgueño, J., Windhausen, V.S., Buckler, E., Jannink, J.L., Cruz, M.A.L., Babu, R., 2013. Genomic prediction in maize breeding populations with genotyping-by-sequencing. G3 Genes, Genomes, Genet. 3, 1903–1926.

Crossa, J., De Los Campos, G., Maccaferri, M., Tuberosa, R., Burgueño, J., Pérez-Rodríguez, P., 2016.a. Extending the marker × environment interaction model for genomic-enabled prediction and genome-wide association analysis in durum wheat. Crop Sci. 56, 2193–2209.

Crossa, J., Jarquín, D., Franco, J., Pérez-Rodríguez, P., Burgueño, J., Saint-Pierre, C., Vikram, P., Sansaloni, C., Petroli, C., i sur., 2016.b. Genomic prediction of gene bank wheat landraces. G3 Genes, Genomes, Genet. 6, 1819–1834.

Crossa, J., Vargas, M., Joshi, A.K., 2010. Linear, bilinear, and linear-bilinear fixed and mixed models for analyzing genotype × environment interaction in plant breeding and agronomy. Can. J. Plant Sci. 90, 561–574.

Cui, Y., Li, R., Li, G., Zhang, F., Zhu, T., Zhang, Q., Ali, J., Li, Z., Xu, S., 2020. Hybrid breeding of rice via genomic selection. Plant Biotechnol. J. 18, 57–67.

Daetwyler, H.D., Villanueva, B., Bijma, P., Woolliams, J.A., 2007. Inbreeding in genome-wide selection. J. Anim. Breed. Genet. 124, 369–376.

de los Campos, G., Hickey, J.M., Pong-Wong, R., Daetwyler, H.D., Calus, M.P.L., 2013. Whole-genome regression and prediction methods applied to plant and animal breeding. Genetics 193, 327–345.

de los Campos, G., Naya, H., Gianola, D., Crossa, J., Legarra, A., Manfredi, E., Weigel, K., Cotes, J.M., 2009. Predicting quantitative traits with regression models for dense molecular markers and pedigree. Genetics 182, 375–385.

Desta, Z.A., Ortiz, R., 2014. Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. Trends Plant Sci. 19, 592–601.

Duangjit, J., Causse, M., Sauvage, C., 2016. Efficiency of genomic selection for tomato fruit quality. Mol. Breed. 36, 29.

Duhnen, A., Gras, A., Teyssèdre, S., Romestant, M., Claustres, B., Daydé, J., Mangin, B., 2017. Genomic selection for yield and seed protein content in soybean: A study of breeding program data and assessment of prediction accuracy. Crop Sci. 57, 1325–1337.

Edwards, S.M.K., Buntjer, J.B., Jackson, R., Bentley, A.R., Lage, J., Byrne, E., Burt, C., Jack, P., Berry, S., Flatman, E., Poupard, B., Smith, S., Hayes, C., Gaynor, R.C., Gorjanc, G., Howell, P., Ober, E., Mackay, I.J., Hickey, J.M., 2019. The effects of training population design on genomic prediction accuracy in wheat. Theor. Appl. Genet. 132, 1943–1952.

Friedman, J., Hastie, T., Tibshirani, R., 2010. Regularization paths for generalized linear models via coordinate descent. J. Stat. Softw. 33, 1–22.

Gianola, D., Van Kaam, J.B.C.H.M., 2008. Reproducing kernel Hilbert spaces regression methods for genomic assisted prediction of quantitative traits. Genetics 178, 2289–2303.

Grattapaglia, D., Resende, M.D.V., 2011. Genomic selection in forest tree breeding. Tree Genet. Genomes 7, 241–255.

Grenier, C., Cao, T.V., Ospina, Y., Quintero, C., Châtel, M.H., Tohme, J., Courtois, B., Ahmadi, N., 2015. Accuracy of genomic selection in a rice synthetic population developed for recurrent selection breeding. PLoS One 10, e0136594.

Guo, Z., Tucker, D.M., Basten, C.J., Gandhi, H., Ersoz, E., Guo, B., Xu, Z., Wang, D., Gay, G., 2014. The impact of population structure on genomic prediction in stratified populations. Theor. Appl. Genet. 127, 749–762.

Habier, D., Fernando, R.L., Dekkers, J.C.M., 2007. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. Genetics 177, 2389–2397.

Habier, D., Fernando, R.L., Kizilkaya, K., Garrick, D.J., 2011. Extension of the bayesian alphabet for genomic selection. BMC Bioinformatics 12, 186.

Haile, J.K., N'Diaye, A., Clarke, F., Clarke, J., Knox, R., Rutkoski, J., Bassi, F.M., Pozniak, C.J., 2018. Genomic selection for grain yield and quality traits in durum wheat. Mol. Breed. 38, 75.

Haile, T.A., Heidecker, T., Wright, D., Neupane, S., Ramsay, L., Vandenberg, A., Bett, K.E., 2020. Genomic selection for lentil breeding: Empirical evidence. Plant Genome 13, 1–15.

Hayes, B.J., Panozzo, J., Walker, C.K., Choy, A.L., Kant, S., Wong, D., Tibbits, J., Daetwyler, H.D., Rochfort, S., Hayden, M.J., Spangenberg, G.C., 2017. Accelerating wheat breeding for end-use quality with multi-trait genomic predictions incorporating near infrared and nuclear magnetic resonance-derived phenotypes. Theor. Appl. Genet. 130, 2505–2519.

Hayes, B.J., Visscher, P.M., Goddard, M.E., 2009. Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. Genet. Res. (Camb). 91, 47–60.

Heffner, E.L., Jannink, J.-L., Iwata, H., Souza, E., Sorrells, M.E., 2011.a. Genomic selection accuracy for grain quality traits in biparental wheat populations. Crop Sci. 51, 2597–2606.

Heffner, E.L., Jannink, J.-L., Sorrells, M.E., 2011.b. Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. Plant Genome 4, 65–75.

Heffner, E.L., Lorenz, A.J., Jannink, J.L., Sorrells, M.E., 2010. Plant breeding with genomic selection: Gain per unit time and cost. Crop Sci. 50, 1681–1690.

Heffner, E.L., Sorrells, M.E., Jannink, J.L., 2009. Genomic selection for crop improvement. Crop Sci. 49, 1–12.

Heslot, N., Akdemir, D., Sorrells, M.E., Jannink, J.L., 2014. Integrating environmental covariates and crop modeling into the genomic selection framework to predict genotype by environment interactions. Theor. Appl. Genet. 127, 463–480.

Heslot, N., Jannink, J.L., Sorrells, M.E., 2013. Using genomic prediction to characterize environments and optimize prediction accuracy in applied breeding data. Crop Sci. 53, 921–933.

Heslot, N., Yang, H.P., Sorrells, M.E., Jannink, J.L., 2012. Genomic selection in plant breeding: A comparison of models. Crop Sci. 52, 146–160.

Huang, M., Cabrera, A., Hoffstetter, A., Griffey, C., Van Sanford, D., Costa, J., McKendry, A., Chao, S., Sneller, C., 2016. Genomic selection for wheat traits and trait stability. Theor. Appl. Genet. 129, 1697–1710.

Isidro, J., Jannink, J.L., Akdemir, D., Poland, J., Heslot, N., Sorrells, M.E., 2015. Training set optimization under population structure in genomic selection. Theor. Appl. Genet. 128, 145–158.

Isik, F., 2014. Genomic selection in forest tree breeding: the concept and an outlook to the future. New For. 45, 379–401.

Jannink, J.L., Lorenz, A.J., Iwata, H., 2010. Genomic selection in plant breeding: From theory to practice. Briefings Funct. Genomics Proteomics 9, 166–177.

Jarquín, D., Crossa, J., Lacaze, X., Du Cheyron, P., Daucourt, J., Lorgeou, J., Piraux, F., Guerreiro, L., Pérez, P., Calus, M., Burgueño, J., de los Campos, G., 2014. A reaction norm model for genomic selection using high-dimensional genomic and environmental data. Theor. Appl. Genet. 127, 595–607.

Juliana, P., Poland, J., Huerta-Espino, J., Shrestha, S., Crossa, J., Crespo-Herrera, L., Toledo, F.H., Govindan, V., Mondal, S., Kumar, U., Bhavani, S., Singh, P.K., Randhawa, M.S., He, X., Guzman, C., Dreisigacker, S., Rouse, M.N., Jin, Y., Pérez-Rodríguez, P., Montesinos-López, O.A., Singh, D., Mokhlesur Rahman, M., Marza, F., Singh, R.P., 2019. Improving grain yield, stress resilience and quality of bread wheat using large-scale genomics. Nat. Genet. 51, 1530–1539.

Keller, B., Ariza-Suarez, D., de la Hoz, J., Aparicio, J.S., Portilla-Benavides, A.E., Buendia, H.F., Mayor, V.M., Studer, B., Raatz, B., 2020. Genomic Prediction of Agronomic Traits in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Under Environmental Stress. Front. Plant Sci. 11, 1–15.

Krishnappa, G., Savadi, S., Tyagi, B.S., Singh, S.K., Mamrutha, H.M., Kumar, S., Mishra, C.N., Khan, H., Gangadhara, K., Uday, G., Singh, G., Singh, G.P., 2021. Integrated genomic selection for rapid improvement of crops. Genomics 113, 1070–1086.

Kristensen, P.S., Jahoor, A., Andersen, J.R., Cericola, F., Orabi, J., Janss, L.L., Jensen, J., 2018. Genome-wide association studies and comparison of models and cross-validation strategies for genomic prediction of quality traits in advanced winter wheat breeding lines. Front. Plant Sci. 9, 69.

Lado, B., Barrios, P.G., Quincke, M., Silva, P., Gutiérrez, L., 2016. Modeling genotype × environment interaction for genomic selection with unbalanced data from a wheat breeding program. Crop Sci. 56, 2165–2179.

Larkin, D.L., Lozada, D.N., Mason, R.E., 2019. Genomic selection—considerations for successful implementation in wheat breeding programs. Agronomy 9, 479.

Liu, H., Zhou, H., Wu, Y., Li, X., Zhao, J., Zuo, T., Zhang, X., Zhang, Y., Liu, S., Shen, Y., Lin, H., Zhang, Z., Huang, K., Lübberstedt, T., Pan, G., 2015. The impact of genetic relationship and linkage disequilibrium on genomic selection. PLoS One 10, e0132379.

Liu, X., Wang, Hongwu, Wang, Hui, Guo, Z., Xu, X., Liu, J., Wang, S., Li, W.X., Zou, C., Prasanna, B.M., Olsen, M.S., Huang, C., Xu, Y., 2018. Factors affecting genomic selection revealed by empirical evidence in maize. Crop J. 6, 341–352.

Lopez-Cruz, M., Crossa, J., Bonnett, D., Dreisigacker, S., Poland, J., Jannink, J.L., Singh, R.P., Autrique, E., de los Campos, G., 2015. Increased prediction accuracy in wheat breeding trials using a marker × environment interaction genomic selection model. G3 Genes, Genomes, Genet. 5, 569–582.

Lorenz, A.J., Chao, S., Asoro, F.G., Heffner, E.L., Hayashi, T., Iwata, H., Smith, K.P., Sorrells, M.E., Jannink, J.L., 2011. Genomic selection in plant breeding: Knowledge and prospects. Adv. Agron. 110, 77–123.

Lorenz, A.J., Smith, K.P., 2015. Adding genetically distant individuals to training populations reduces genomic prediction accuracy in barley. Crop Sci. 55, 2657–2667.

Lorenzana, R.E., Bernardo, R., 2009. Accuracy of genotypic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations. Theor. Appl. Genet. 120, 151–161.

Ly, D., Hamblin, M., Rabbi, I., Melaku, G., Bakare, M., Gauch, H.G., Okechukwu, R., Dixon, A.G.O., Kulakow, P., Jannink, J.L., 2013. Relatedness and genotype × environment interaction affect prediction accuracies in genomic selection: A study in cassava. Crop Sci. 53, 1312–1325.

Maulana, F., Kim, K.-S., Anderson, J.D., Sorrells, M.E., Butler, T.J., Liu, S., Baenziger, P.S., Byrne, P.F., Ma, X.-F., 2019. Genomic selection of forage quality traits in winter wheat. Crop Sci. 59, 1–11.

Merrick, L.F., Carter, A.H., 2021. Comparison of genomic selection models for exploring predictive ability of complex traits in breeding programs. Plant Genome 14, 1–41.

Meuwissen, T.H.E., 2009. Accuracy of breeding values of „unrelated" individuals predicted by dense SNP genotyping. Genet. Sel. Evol. 41, 35.

Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. Genetics 157, 1819–1829.

Mohammadi, M., Blake, T.K., Budde, A.D., Chao, S., Hayes, P.M., Horsley, R.D., Obert, D.E., Ullrich, S.E., Smith, K.P., 2015. A genome-wide association study of malting quality across eight U.S. barley breeding programs. Theor. Appl. Genet. 128, 705–721.

Muir, W.M., 2007. Comparison of genomic and traditional BLUP-estimated breeding value accuracy and selection response under alternative trait and genomic parameters. J. Anim. Breed. Genet. 124, 342–355.

Ornella, L., Sukhwinder-Singh, Perez, P., Burgueño, J., Singh, R., Tapia, E., Bhavani, S., Dreisigacker, S., Braun, H.J., Mathews, K., Crossa, J., 2012. Genomic prediction of genetic values for resistance to wheat rusts. Plant Genome 5, 136–148.

Park, T., Casella, G., 2008. The Bayesian Lasso. J. Am. Stat. Assoc. 103, 681–686.

Piepho, H.P., 2009. Ridge regression and extensions for genomewide selection in maize. Crop Sci. 49, 1165–1176.

Poland, J., Endelman, J.B., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S., Manes, Y., Dreisigacker, S., Crossa, J., Sánchez-Villeda, H., Sorrells, M., Jannink, J.L., 2012. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. Plant Genome 5, 103–113.

Qin, J., Shi, A., Song, Qijian, Li, S., Wang, F., Cao, Y., Ravelombola, W., Song, Qi, Yang, C., Zhang, M., 2019. Genome wide association study and genomic selection of amino acid concentrations in soybean seeds. Front. Plant Sci. 10, 1445.

Riedelsheimer, C., Endelman, J.B., Stange, M., Sorrells, M.E., Jannink, J.L., Melchinger, A.E., 2013. Genomic predictability of interconnected biparental maize populations. Genetics 194, 493–503.

Rutkoski, J.E., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Bhavani, S., Poland, J., Jannink, J.-L., Sorrells, M.E., 2015. Efficient use of historical data for genomic selection: A case study of stem rust resistance in wheat. Plant Genome 8, 1–10.

Sallam, A., Endelman, J.B., Jannink, J.-L., Smith, K.P., 2015. Assessing genomic selection prediction accuracy in a dynamic barley breeding population. Plant Genome 8, 1–15.

Schulthess, A.W., Wang, Y., Miedaner, T., Wilde, P., Reif, J.C., Zhao, Y., 2016. Multiple-trait- and selection indices-genomic predictions for grain yield and protein content in rye for feeding purposes. Theor. Appl. Genet. 129, 273–287.

Shah, S.H., Angel, Y., Houborg, R., Ali, S., McCabe, M.F., 2019. A random forest machine learning approach for the retrieval of leaf chlorophyll content in wheat. Remote Sens. 11, 920.

Singh, B.D., Singh, A.K., 2015. Marker-assisted plant breeding: Principles and practices, Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices.

Slater, A.T., Cogan, N.O.I., Forster, J.W., Hayes, B.J., Daetwyler, H.D., 2016. Improving genetic gain with genomic selection in autotetraploid potato. Plant Genome 9, 1–15.

Solberg, T.R., Sonesson, A.K., Woolliams, J.A., Meuwissen, T.H.E., 2008. Genomic selection using different marker types and densities. J. Anim. Sci. 86, 2447–2454.

Sorrells, M.E., 2015. Genomic selection in plants: Empirical results and implications for wheat breeding, u: Ogihara, Y., Takumi, S., Handa, H. (Ur.), Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field. Springer Japan KK, Yokohama, Japan, str. 401–409.

Stewart-Brown, B.B., Song, Q., Vaughn, J.N., Li, Z., 2019. Genomic selection for yield and seed composition traits within an applied soybean breeding program. G3 Genes, Genomes, Genet. 9, 2253–2265.

Tan, B., Grattapaglia, D., Martins, G.S., Ferreira, K.Z., Sundberg, B., Ingvarsson, P.K., 2017. Evaluating the accuracy of genomic prediction of growth and wood traits in two Eucalyptus species and their F1 hybrids. BMC Plant Biol. 17, 110.

van den Berg, I., Meuwissen, T.H.E., MacLeod, I.M., Goddard, M.E., 2019. Predicting the effect of reference population on the accuracy of within, across, and multibreed genomic prediction. J. Dairy Sci. 102, 3155–3174.

Voss-Fels, K.P., Cooper, M., Hayes, B.J., 2019. Accelerating crop genetic gains with genomic selection. Theor. Appl. Genet. 132, 669–686.

Wang, X., Xu, Y., Hu, Z., Xu, C., 2018. Genomic selection methods for crop improvement: Current status and prospects. Crop J. 6, 330–340.

Wang, Y., Mette, M.F., Miedaner, T., Gottwald, M., Wilde, P., Reif, J.C., Zhao, Y., 2014. The accuracy of prediction of genomic selection in elite hybrid rye populations surpasses the accuracy of marker-assisted selection and is equally augmented by multiple field evaluation locations and test years. BMC Genomics 15, 556.

Whittaker, J.C., Thompson, R., Denham, M.C., 2000. Marker-assisted selection using ridge regression. Genet. Res. 75, 249–252.

Windhausen, V.S., Atlin, G.N., Hickey, J.M., Crossa, J., Jannink, J.-L.L., Sorrells, M.E., Raman, B., Cairns, J.E., Tarekegne, A., Semagn, K., Beyene, Y., Grudloyma, P., Technow, F., Riedelsheimer, C., Melchinger, A.E., 2012. Effectiveness of genomic prediction of maize hybrid performance in different breeding populations and environments. G3 Genes, Genomes, Genet. 2, 1427–1436.

Xu, Y., 2016. Envirotyping for deciphering environmental impacts on crop plants. Theor. Appl. Genet. 129, 653–673.

Xu, Y., Liu, X., Fu, J., Wang, H., Wang, J., Prasanna, B.M., Olsen, M.S., Wang, G., Zhang, A., 2020. Enhancing genetic gain through genomic selection: from livestock to plants. PLANT Commun. 1, 100005.

Yamamoto, E., Matsunaga, H., Onogi, A., Ohyama, A., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Nunome, T., Iwata, H., Fukuoka, H., 2016. Efficiency of genomic selection for breeding population design and phenotype prediction in tomato. Heredity 118, 202–209.

Zhang, X., Pérez-Rodríguez, P., Semagn, K., Beyene, Y., Babu, R., López-Cruz, M.A., San Vicente, F., Olsen, M., Buckler, E., Jannink, J.-L.L., Prasanna, B.M., Crossa, J., 2015. Genomic prediction in biparental tropical maize populations in water-stressed and well-watered environments using low-density and GBS SNPs. Heredity 114, 291–299.

Zhong, S., Dekkers, J.C.M., Fernando, R.L., Jannink, J.-L., 2009. Factors affecting accuracy from genomic selection in populations derived from multiple inbred lines: A barley case study. Genetics 182, 355–364.

Zou, H., Hastie, T., 2005. Regularization and variable selection via the elastic net. J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol. 67, 301–320.

GENOMSKA SELEKCIJA STUDIJE SLUČAJA

Pšenica

6.5. Genomska selekcija za svojstva kvalitete pšenice

IVANA PLAVŠIN, KREŠIMIR DVOJKOVIĆ I DARIO NOVOSELOVIĆ

6.5.1. UVOD

Selekcija za svojstva kvalitete pšenice (*Triticum aestivum* L.) često iziskuje mnogo vremena i financijskog ulaganja, budući da zahtijeva fenotipizaciju u završnim fazama razvoja novih linija i sorata. Većina su svojstava kvalitete pšenice kvantitativna svojstva, a budući da je nasljednost takvih svojstava često niska, tradicionalno korištene metode oplemenjivanja mogu biti dugotrajne, skupe i u konačnici mogu dovesti do nepouzdanih rezultata. Genomska selekcija (engl. *genomic selection*; GS) jedna je od metoda koje omogućuju predviđanje oplemenjivačke vrijednosti jedinki koja istovremeno u model uključuje informacije o cjelogenomskim biljezima, a ranija istraživanja već su pokazala da ovaj pristup može biti uspješno korišten i u oplemenjivanju na različita svojstva pšenice (Heffner i sur., 2011.a; Heffner i sur., 2011.b; Rutkoski i sur., 2011.; Guzman i sur., 2016.). Cilj istraživanja čiji su rezultati ovdje prikazani bio je utvrditi potencijal genomske selekcije za predviđanje svojstava kvalitete pšenice te odrediti utjecaj različite veličine TP, heritabilnosti svojstva, gustoće biljega i modela na točnost predviđanja, s ciljem predlaganja optimalnog scenarija za primjenu GS-a na svojstva kvalitete pšenice.

6.5.2. MATERIJAL I METODE

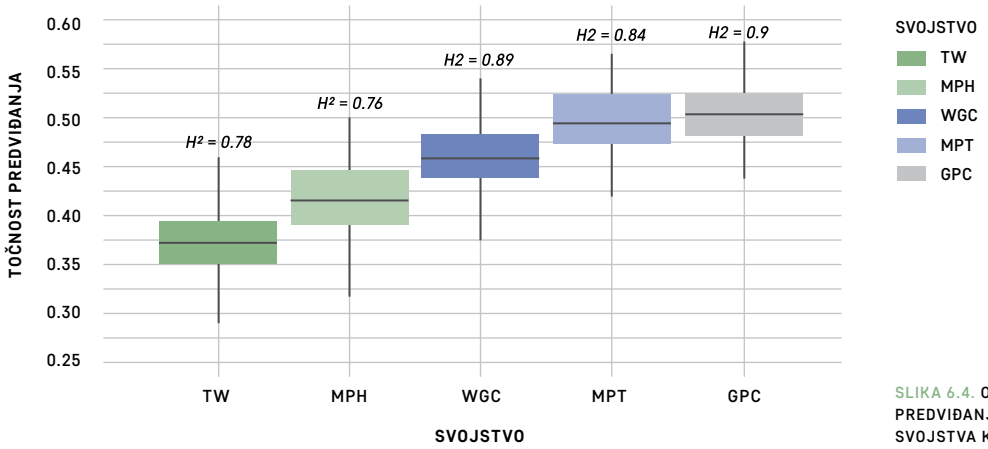
U istraživanju je korištena biparentalna populacija porijeklom iz križanja sorti ozime pšenice Monika i Golubica (MG populacija). Roditeljski genotipovi odabrani su prema kriteriju da se ne razlikuju niti u jednoj gluteninskoj podjedinici visoke mase (engl. *high molecular weight glutenin subunits*; HMW-GS). Nakon križanja u cijepajućim generacijama slučajno su odabirane jedinke do F7 generacije te je MG populacija u konačnici sadržavala 153 rekombinantne inbred linije (engl. *recombinant inbred line*; RIL). Populacija je genotipizirana korištenjem DArTseq tehnologije (engl. *Diversity Arrays Technology*), a nakon uklanjanja biljega s nepotpunim podatcima i sadržajem heterozigota višim od 30 %, preostao je skup od 2231 SNP biljega koji je korišten za GS. Poljski pokusi provedeni su na dvije lokacije (Osijek i Slavonski Brod) tijekom tri uzastopne godine. Na svakoj lokaciji pokus je bio postavljen u dva ponavljanja, prema redno-stupčanom dizajnu. Za potrebe istraživanja GS-a praćeni su pokazatelji kvalitete zrna – hektolitarska masa (engl. *test weight*; TW) i sadržaj proteina (engl. *grain protein content*; GPC), te pokazatelji kvalitete brašna – sadržaj vlažnog glutena (engl. *wet gluten content*; WGC) i svojstva kvalitete tijesta dobivena

pomoću miksograf uređaja (engl. *midline peak time*; MPT / engl. *midline peak height*; MPH) (Johnson i sur., 1943.; Swanson, 1993.).

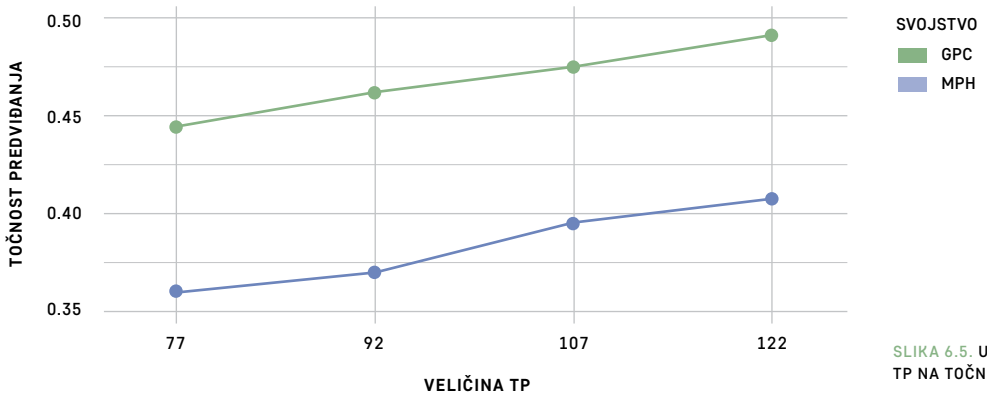
6.5.3. REZULTATI I RASPRAVA

Unakrsna validacija nasumičnim dijeljenjem skupa podataka na TP i VP za svaki od prikazanih scenarija i korištenih modela predviđanja provedena je 1000 puta, a konačna točnost predviđanja GS-a prikazana je kao srednja vrijednost Pearsonovih korelacija dobivenih za svaku od provedenih unakrsnih validacija. Heritabilnost u širem smislu (engl. *broad-sense heritability;* H^2) procijenjena je za sva promatrana svojstva, a odnos heritabilnosti i točnosti predviđanja dobivene korištenjem RRBLUP modela prikazan je na Slici 6.4. Iz rezultata je vidljivo da povećanje točnosti predviđanja modela prati povećanje heritabilnosti svojstva. Iako odnos nije u potpunosti linearan, može se zaključiti da će se svojstva s visokom heritabilnošću moći bolje predvidjeti korištenjem GS-a, dok će točnost predviđanja svojstava s niskom heritabilnošću biti niža. Brojna druga istraživanja također potvrđuju da za postizanje visoke točnosti predviđanja važnu ulogu ima heritabilnost svojstva. Koristeći simulirane biparentalne populacije pšenice, Yao i sur. (2018.) istražili su sposobnost različitih modela GS-a za za predviđanje 11 svojstava uroda i kvalitete zrna. Rezultati su pokazali da je najvažniji utjecaj na točnost predviđanja imala heritabilnost svojstva. Neovisno o primijenjenom modelu, točnost se kretala od 0,17 do 0,22 za svojstva s niskom heritabilnosti (≤ 0,3), od 0,25 do 0,32 za svojstva s umjerenom heritabilnosti (~ 0,5), te od 0,37 do 0,42 za svojstva s visokom heritabilnosti (≥ 0,8). U istraživanju Ornella i sur. (2012.) na 5 RIL populacija koje dijele jednog zajedničkog roditelja korištena su tri različita modela za genomsku selekciju na otpornost na crnu žitnu hrđu i žutu hrđu. U slučaju svih populacija, sva tri modela pokazala su bolju sposobnost predviđanja otpornosti na crnu žitnu hrđu u odnosu na žutu hrđu, što je vrlo vjerojatno posljedica veće heritabilnosti svojstva otpornosti na crnu žitnu hrđu.

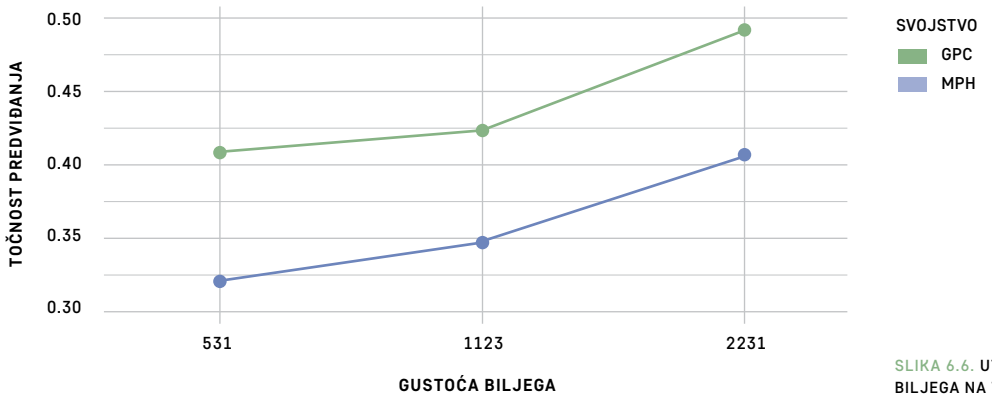
Kako bi se utvrdio utjecaj veličine TP na točnost predviđanja, skup podataka podijeljen je na TP i VP u omjerima 50:50, 60:40, 70:30 i 80:20 (N_{TP} = 77, 92, 107 i 122 linije). Utjecaj gustoće biljega (N_M) procijenjen je korištenjem cjelokupnog skupa podataka (N_M = 2231), te dva manja skupa podataka koji su uključivali otprilike 50 % (N_M = 1123 biljega) i 25 % (N_M = 531) od ukupnog broja biljega. U oba slučaja korišten je RRBLUP model, a Slika 6.5. i Slika 6.6. prikazuju rezultate dobivene za svojstva GPC i MPH. Rezultati su potvrdili pretpostavku da veličina TP i gustoća biljega utječu na točnost



SLIKA 6.4. ODNOS TOČNOSTI PREDVIĐANJA I HERITABILNOSTI ZA SVOJSTVA KVALITETE PŠENICE.



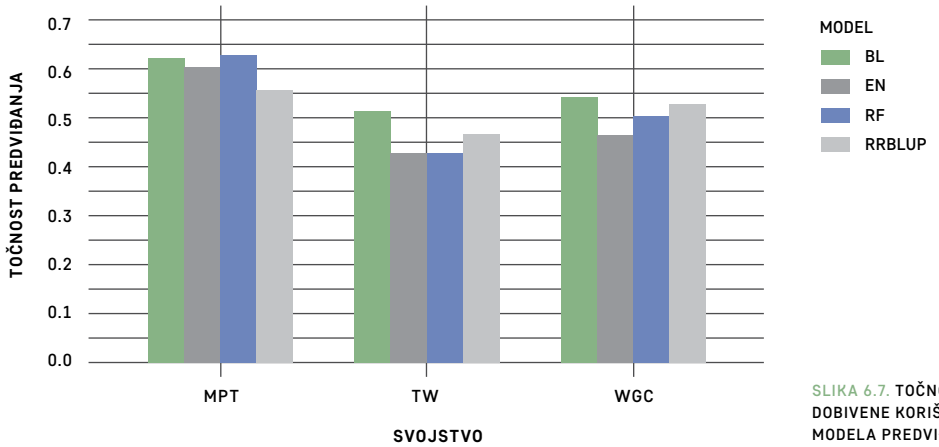
SLIKA 6.5. UTJECAJ VELIČINE TP NA TOČNOST PREDVIĐANJA.



SLIKA 6.6. UTJECAJ GUSTOĆE BILJEGA NA TOČNOST PREDVIĐANJA.

predviđanja, odnosno da je za postizanje viših vrijednosti točnosti predviđanja potrebno imati dovoljno veliku TP i zadovoljavajuću gustoću biljega. Do istih su zaključaka došli i Heffner i sur. (2011.a) koristeći dvije međusobno nepovezane biparentalne populacije pšenice i ispitujući mogućnost primjene GS-a za svojstva kvalitete zrna kao što su predžetveno proklijavanje, izbrašnjavanje, hektolitarska masa, sadržaj proteina, tvrdoća te sposobnost zadržavanja različitih otapala. Najviše srednje vrijednosti točnosti predviđanja zabilježene su pri najvećoj veličini TP (96 linija), dok su srednje vrijednosti točnosti predviđanja dosegle maksimalnu vrijednost korištenjem 256 biljega, a daljnje povećanje broja biljega uzrokovalo je pad vrijednosti točnosti predviđanja. Utjecaj različitih čimbenika na točnost predviđanja uroda zrna, datuma klasanja, visine i komponenata prinosa koristeći RRBLUP model istraživali su i Lozada i sur. (2019.) koji su zaključili da povećanje veličine TP rezultira povećanjem točnosti predviđanja, s tim da je maksimalna vrijednost postignuta korištenjem 60 % skupa podataka kao TP. Također su pokazali da povećanje srodnosti TP i VP ima pozitivan učinak na točnost predviđanja.

Budući da su ovdje rezultati prikazanog istraživanja pokazali da su najviše vrijednosti točnosti



SLIKA 6.7. TOČNOSTI PREDVIĐANJA DOBIVENE KORIŠTENJEM RAZLIČITIH MODELA PREDVIĐANJA.

predviđanja postignute u slučaju korištenja 80 % skupa podataka kao TP i cjelokupnog skupa genotipskih podataka, za usporedbu utjecaja različitih modela predviđanja na točnost predviđanja korištene su upravo te postavke. Usporedba modela uključivala je tri parametrijska modela (RRBLUP, EN i BL) te jedan neparametrijski model (RF). Rezultati usporedbe modela za svojstva WGC, TW i MPT prikazani su na Slici 6.7.

Iz rezultata vidljivo je da je za sva tri promatrana svojstva BL model nadmašio RRBLUP i EN model, iako se nije pokazao najboljim modelom za sva svojstva. Uz vrlo malu razliku u vrijednosti točnosti predviđanja u odnosu na BL model, RF model pokazao se kao najbolji model za predviđanje svojstva MPT. Za preostala dva svojstva RF je pokazao najlošiju (TW) ili gotovo najlošiju sposobnost predviđanja (WGC). Međutim, prilikom odabira modela koji će se koristiti u GS-u treba uzeti u obzir i njihovu vremensku i kompjutersku zahtjevnost. Uspoređujući navedena četiri modela, EN model pokazao se najmanje zahtjevnim, odnosno, za njegovu provedbu bilo je potrebno otprilike 19 minuta, dok su ostali modeli bili nešto zahtjevniji (za RRBLUP potrebno je oko 38 minuta, a za RF 72 minute). Najzahtjevnijim se pokazao BL model za čiju je provedbu bilo potrebno gotovo 3 sata (172 minute). Uzevši u obzir da je mnogo zahtjevniji po pitanju provedbe, a ne rezultira znatno višom točnošću predviđanja u odnosu na puno manje zahtjevan EN model, BL model vjerojatno ne bi bio model od interesa na predviđanje ovih svojstava, a posebno ne u slučaju kad je potrebno relativno brzo donijeti odluku o tome koje linije ulaze u daljnju selekciju. Da sposobnost BL modela ne nadilazi sposobnosti npr. RRBLUP modela pokazuje i istraživanje Ornella i sur. (2012.). Oba modela pokazala su dobru sposobnost predviđanja (~ 0,5) za svojstvo otpornosti na crnu hrđu, dok su za žutu hrđu vrijednosti predviđanja oba modela bile vrlo niske (~ 0,15). Usporedbom modela za svojstva vrijeme cvatnje i broj zrna u klasu koristeći dvije populacije dvostrukih haploida, Thavamanikumar i sur. (2015.) pokazali su da BayesB model ima bolju ili jednaku sposobnost predviđanja u odnosu na BL i RRBLUP modele u slučaju da su populacije u srodstvu. Kada populacije nisu u srodstvu, BayesB model značajno nadmašuje ostale korištene modele za sva ispitivana, jednostavna i kompleksna svojstva. Ovakve rezultate autori su pripisali sposobnosti BayesB modela da učinkovito obuhvati LD između biljega i QTL-a. Neznatne razlike između pet primijenjenih modela (RRBLUP, BayesA, BayesB, BRR i BL) uočili su Yao i sur. (2018.), pri čemu su one najviše varirale za svojstvo datum klasanja i maksimalnog otpora tijesta. Neka novija istraživanja GS-a za različita

svojstva pšenice pokazuju da različiti modeli strojnog i dubokog učenja mogu značajno nadmašiti uobičajeno korištene modele predviđanja kao što su BLUP i bayesovski modeli. Merrick i Carter (2021.) zaključili su da će pri predviđanju svojstva datuma nicanja SVM model biti model od izbora. Uspoređujući sposobnost predviđanja dva modela strojnog učenja (RF i SVM) i dva modela dubokog učenja (CNN i višeslojna mreža perceptrona), Sandhu i sur. (2021.) pokazali su da za svih 13 svojstava kvalitete pšenice koja su promatrali, modeli dubokog učenja značajno nadmašuju RRBLUP i ostale modele.

6.5.4. ZAKLJUČAK

Glavni cilj ovdje prikazanog istraživanja bio je istražiti potencijal nekoliko modela GS-a za predviđanje različitih svojstava kvalitete koristeći dvije biparentalne populacije ozime pšenice te predložiti neke optimalne vrijednosti parametara korištenih u selekciji (veličina TP, gustoća biljega i sl.) s ciljem budućeg smanjenja troškova genotipizacije i fenotipizacije u selekcijskom procesu. Ovdje prikazani rezultati istraživanja potvrđuju da je korištenjem GS-a moguće s visokom točnošću predvidjeti svojstva kvalitete zrna pšenice te da na točnost predviđanja modela značajno utječe heritabilnost svojstva, veličina TP i gustoća biljega. Utvrđivanje optimalnog modela i parametara GS-a omogućit će korištenje molekularnih biljega u postupku predselekcije za svojstva kvalitete zrna te racionalizaciju klasične metode oplemenjivanja pšenice. Rezultati dobiveni takvim istraživanjem pomoći će oplemenjivačima u razvoju strategija zasnovanim na genomskoj selekciji za učinkovitiji razvoj novih linija i sorata.

LITERATURA

Guzman, C., Peña, R.J., Singh, R., Autrique, E., Dreisigacker, S., Crossa, J., Rutkoski, J., Poland, J., Battenfield, S., 2016. Wheat quality improvement at CIMMYT and the use of genomic selection on it. Appl. Transl. Genomics 11, 3–8.

Heffner, E.L., Jannink, J.-L., Iwata, H., Souza, E., Sorrells, M.E., 2011a. Genomic selection accuracy for grain quality traits in biparental wheat populations. Crop Sci. 51, 2597–2606.

Heffner, E.L., Jannink, J.-L., Sorrells, M.E., 2011b. Genomic selection accuracy using multifamily prediction models in a wheat breeding program. Plant Genome 4, 65–75.

Johnson, J.A., Swanson, C.O., Bayfield, E.G., 1943. The correlation of mixogram with baking results. Cereal Chem. 20, 625–644.

Lozada, D.N., Mason, R.E., Sarinelli, J.M., Brown-Guedira, G., 2019. Accuracy of genomic selection for grain yield and agronomic traits in soft red winter wheat. BMC Genet. 20, 82.

Merrick, L.F., Carter, A.H., 2021. Comparison of genomic selection models for exploring predictive ability of complex traits in breeding programs. Plant Genome 14, 1–41.

Ornella, L., Sukhwinder-Singh, Perez, P., Burgueño, J., Singh, R., Tapia, E., Bhavani, S., Dreisigacker, S., Braun, H.J., Mathews, K., Crossa, J., 2012. Genomic prediction of genetic values for resistance to wheat rusts. Plant Genome 5, 136–148.

Rutkoski, J.E., Heffner, E.L., Sorrells, M.E., 2011. Genomic selection for durable stem rust resistance in wheat. Euphytica 179, 161–173.

Sandhu, K.S., Aoun, M., Morris, C.F., Carter, A.H., 2021. Genomic selection for end-use quality and processing traits in soft white winter wheat breeding program with machine and deep learning models. Biology 10, 689.

Swanson, C., 1993. Testing of the quality of flour by the recording dough mixer. Cereal Chem. 10, 1–29.

Thavamanikumar, S., Dolferus, R., Thumma, B.R., 2015. Comparison of genomic selection models to predict flowering time and spike grain number in two hexaploid wheat doubled haploid populations. G3 Genes, Genomes, Genet. 5, 1991–1998.

Yao, J., Zhao, D., Chen, X., Zhang, Y., Wang, J., 2018. Use of genomic selection and breeding simulation in cross prediction for improvement of yield and quality in wheat (*Triticum aestivum* L.). Crop J. 6, 353–365.

POGOVOR

Brzi razvoj raznih znanosti i tehnologija omogućuje postupni prelazak na „molekularno oplemenjivanje bilja“, a što podrazumijeva uporabu znanja i tehnika iz različitih područja brzo razvijajuće biotehnologije; prije svega genomike i bioinformatike, s namjerom da se postupci selekcije učine učinkovitijim, a vrijeme razvoja novih kultivara skrati. U tome su vrlo bitni i novi iskoraci u unapređenju fenotipizacije primjenom dronova, fenotipizacijskih platformi i GPS-vođenih samohodnih strojeva opremljenih različitim senzorima. Oplemenjivanje bilja postupno prestaje biti strpljivo i dugoročno zanimanje pojedinaca i malih timova unutar pojedinačnih ustanova (kompanija), a sve više dobro organizirana multidisciplinarna djelatnost koja integrira stručnjake iz područja genetike, fiziologije, bioinformatike, robotike, komunikacijske tehnologije i drugih struka koji djeluju iz više različitih ustanova (kompanije, sveučilišta, javni instituti). Ovakvi timovi jako ovise o laboratorijima i pokusnoj infrastrukturi koja podrazumijeva primjenu uređaja za visokopropusnu genotipizaciju i fenotipizaciju, superračunala i napredne statističke modele, dronove i GPS tehnologiju integriranu u poljoprivredne strojeve.

Stoga, oplemenjivanje bilja budućnosti očekuje praktične alate koji će proisteći iz istraživanja koja koriste napredne laboratorijske metode u području genomike, proteomike i fenomike, a koje u cjelinu povezuje bioinformatika. Dosadašnja praksa malobrojnih višegodišnjih poljskih pokusa za procjenu vrijednosti genotipa u poljskim uvjetima morat će prerasti u ubrzano i široko testiranje genotipa primjenom umjetne inteligencije i „pametnih” žetvenih strojeva[1]. Osim zadovoljenja potrebnih količina hrane za ishranu ljudi i stoke, pred oplemenjivanje bilja sve se više postavljaju i ciljevi biofortifikacije osnovnih poljoprivrednih kultura, tj. genetsko poboljšanje nutritivnih svojstava globalnih poljoprivrednih kultura[2]. Isto tako, ciljevi oplemenjivanja bilja šire se na razvoj specijalnih kultivara za proizvodnju biogoriva, kao i posebnih kultivara i populacija prilagođenih uzgoju prema kriterijima ekološkog uzgoja[3].

Trenutni globalni status oplemenjivanja bilja u rasponu je od još uvijek dominantnog konvencionalnog oplemenjivanja koje se zasniva na prirodnoj rekombinaciji i prijenosu poželjnih gena spolnim putem, sve više potpomognutim raznim molekularnim metodama, do tzv. „novih tehnika oplemenjivanja” (*New Breeding Techniqeus,* NBT) koje podrazumijevaju tehnike genetičkog inženjerstva (*transgenic breeding* i *RNA interference,* RNAi) i tehnike uređenja genoma (*gene editing*)[4].

Privlačna aktualna paradigma molekularnog oplemenjivanja bilja zasniva se na detekciji superiornih biljaka u oplemenjivačkoj populaciji isključivo analizom genotipa na molekularnom nivou. Međutim, čini se da ni jedna zasebna metoda i solitarni pristup neće riješiti aktualne izazove konvencionalnog oplemenjivanja, tim više što se globalni okolinski i socijalni scenariji mijenjaju ubrzanim ritmom. Stvaranje novih superiornih genotipova i rješavanje problema koji izviru iz interakcije genotipa i okoline, zahtijeva holistički pristup. Tek naprednom integracijom različitih znanstvenih disciplina i tehnologija bit će moguće polučiti nove genetski poboljšane kultivare za potrebe buduće (pametne) poljoprivrede.

1 Harfouche, A.L., Jacobson, D.A., Kainer, D., Romero, J.C., Harfouche, A.H., Scarascia Mugnozza, G., Moshelion, M., Tuskan, G.A., Keurentjes, J.J.B., Altman, A., 2019. Accelerating Climate Resilient Plant Breeding by Applying Next-Generation Artificial Intelligence. Trends Biotechnol. 37, 1217–1235.

2 Garg, M., Sharma, A., Vats, S., Tiwari, V., Kumari, A., Mishra, V., Krishania, M., 2021. Vitamins in Cereals: A Critical Review of Content, Health Effects, Processing Losses, Bioaccessibility, Fortification, and Biofortification Strategies for Their Improvement. Front. Nutr. 8.

3 Messmer, M., Wilbois, K., Baier, C., Schaefer, F., Arncken, C., Drexler, D., Hildermann, I., 2015. Plant Breeding Techniques. 2nd edition. FiBL-Dossier. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL).

4 Jung, C., Capistrano-Gossmann, G., Braatz, J., Sashidhar, N., Melzer, S., 2018. Recent developments in genome editing and applications in plant breeding. Plant Breed. 137, 1–9.

ŽIVOTOPISI AUTORA

ZOE ANDRIJANIĆ

Zoe Andrijanić (1990.) završila je diplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2018. zapošljava se kao asistentica na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku te iste godine upisuje doktorski studij Poljoprivredne znanosti. Znanstveni interesi Zoe Andrijanić obuhvaćaju područje populacijske genetike, genetsko kartiranje te oplemenjivanje soje s naglaskom na primjenu molekularnih metoda. Članica je radne skupine Soja Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

KLAUDIJA CAROVIĆ-STANKO

Klaudija Carović-Stanko (1977.) diplomirala je (2003.) i doktorirala (2009.) na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 2003. godine radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na kojem je 2018. izabrana u zvanje izvanredne profesorice. Znanstveni interesi Klaudije Carović-Stanko su ljekovito i aromatično bilje, sjemenarstvo, očuvanje biljnih genetskih izvora i fenotipizacija. Voditeljica je radne skupine za grah Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) te prodekanica za znanost i infrastrukturu Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta.

KREŠIMIR DVOJKOVIĆ

Krešimir Dvojković (1975.) diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (1999.). Magistrirao je (2005.) i doktorirao (2009.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na Poljoprivrednom institutu Osijek zaposlen je od 1999. godine na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku strnih žitarica. Ponovno je izabran na radno mjesto višeg znanstvenog suradnika 2021. godine. Znanstveni interes usmjeren mu je na oplemenjivanje i genetiku kvantitativnih svojstava pšenice, razvoj i unapređenje nove germplazme pšenice, genetsku raznolikost pšenice te na razvoj i očuvanje biljnih genetskih izvora pšenice. Član je Nacionalnog programa očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu.

VLATKO GALIĆ

Vlatko Galić (1990.) diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (2014.), a doktorirao na Odjelu za biologiju (2018.) istog sveučilišta. Na Poljoprivrednom institutu Osijek zaposlen je od 2015. godine, a 2019. je izabran u zvanje Znanstvenog suradnika. Znanstveni interesi Vlatka Galića obuhvaćaju primjenu metoda podatkovnih znanosti u oplemenjivanju bilja i predviđanju agronomskih svojstava, te primijenjenu genomiku i bioinformatiku. Sudjelovao je kao doktorand, poslijedoktorand ili suradnik u provedbi nekoliko znanstvenih projekata.

SMILJANA GORETA BAN

Smiljana Goreta Ban (1969.) diplomirala je (1992.), magistrirala (1997.) i doktorirala (2002.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1994. do 2014. godine radila je na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša, a od 2014. godine radi na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču, a od 2019. je izabrana u trajno zvanje znanstvene savjetnice. Znanstveni je interes Smiljane Goreta Ban očuvanje biljnih genetskih izvora te mogućnost održivog korištenja biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu, bavi se i proučavanjem mehanizama otpornosti kultiviranih biljaka na abiotički i biotički stres. Članica je radne skupine kupusnjače/lukovi te voditeljica radne skupine za diseminaciju Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

MARTINA GRDIŠA

Martina Grdiša (1978.) diplomirala je (2004.) i doktorirala (2011.) na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 2006. zaposlena je na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na kojem je 2021. izabrana u izvanrednu profesoricu. Znanstveni je interes Martine Grdiša ljekovito i aromatično bilje, očuvanje biljnih genetskih izvora te analiza molekularne i biokemijske raznolikosti. Članica je radne skupine za kadulje i dalmatinski buhač Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

JERKO GUNJAČA

Jerko Gunjača (1966.) diplomirao je (1992.), magistrirao (1998.) i doktorirao (2001.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1994. radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na kojem je 2018. izabran u redovitog profesora u trajnom zvanju. Znanstveni interes Jerka Gunjače uključuje dizajn eksperimenata i različita područja kvantitativne genetike s posebnim naglaskom na interakciju genotipa i okoliša i svegenomske studije pridruživanja. Od 2006. godine predsjednik je Povjerenstva za priznavanje sorti krmnog bilja, žitarica, repa, povrća, krumpira, uljarica i predivog bilja. Član je radne skupine za grah Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

RENATA HANZER

Renata Hanzer (1976.) diplomirala je na Prehrambeno tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Osijeku 2003. godine. Doktorsku disertaciju obranila je 2016. godine u sklopu Poslijediplomskog sveučilišnog interdisciplinarnog studija Molekularne bioznanosti iz područja prirodnih znanosti. Trenutno radi kao rukovoditeljica Odjela za biotehnološke analize, mikotoksine i rezidue pesticida, Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu. Znanstveni interes Renate Hanzer je primjena molekularno-genetičkih metoda u poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima, te kontrola i praćenje genetski modificiranih organizama na tržištu. Od 2013. godine je članica Vijeća za genetski modificirane organizme, a od 2017. godine obnaša dužnost predsjednice Vijeća za genetski modificirane organizme RH. Članica je radne skupine za soju i radne skupine za krumpir pri Europskom uredu za koegzistenciju, te je imenovana predstavnica EFSA znanstvene mreže za procjenu rizika od GMO.

ANTUN JAMBROVIĆ

Antun Jambrović (1964.) diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku (1993.). Magistrirao je (1998.) i doktorirao (2001.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na Poljoprivrednom institutu Osijek zaposlen je od 1994. na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku kukuruza, a od 2018. godine obnaša dužnost predstojnika Odjela. Izabran je na radno mjesto u Znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju 2018. godine. Tijekom rada na oplemenjivanju kukuruza konvencionalnim postupkom inicirao je stvaranje sintetičkih populacija raznih heterotičnih skupina i njihovo korištenje u praktičnom oplemenjivanju. Zajedno sa kolegama na odjelu inicirao je uvođenje nekih metoda molekularnih analiza, prvenstveno u cilju kvalitetnije i točnije determinacije selekcijskog materijala po genotipu. Autor je i koautor više od 50 novopriznatih hibrida kukuruza u Republici Hrvatskoj od kojih se neki proizvode na značajnim poljoprivrednim površinama. Kao voditelj i suradnik sudjelovao je na većem broju znanstvenih projekata. Član je radne skupine za kukuruz Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

TATJANA KLEPO

Tatjana Klepo (1984.) diplomirala je na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu 2007. godine. Magistrirala je 2011. godine na Univeristy of Cordoba (UCO), Andalusian Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA) Cordoba, Španjolska. Doktorsku disertaciju obranila je 2014. na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu. Od 2007. do 2020. radila je na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu, a od 2020. radi u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu (HAPIH) kao stručni savjetnik-specijalist za južno voće. U znanstveno zvanje viši znanstveni suradnik izabrana je 2020. god. Znanstveni je interes Tatjane Klepo maslinarstvo, voćarstvo Mediterana, fenološke, morfološke i molekularne analize voćnih vrsta te očuvanje biljnih genetskih izvora.

BORIS LAZAREVIĆ

Boris Lazarević (1982.) diplomirao je (2007.) i doktorirao (2013.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2008. radi na Agronomskom fakultetu na kojem je 2021. izabran za izvanrednog profesora. Osnivač je Laboratorija za fenotipizaciju. Znanstveni interesi Borisa Lazarevića su fiziologija bilja, ekofiziologija, ishrana bilja, abiotski stres, fenotipizacija. Član je radne skupine za grah Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

ZLATKO LIBER

Zlatko Liber (1964.) diplomirao je (1990.), magistrirao (1996.) i doktorirao (2000.) na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1992. radi na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu na kojem je 2021. izabran za redovitog profesora u trajnom zvanju. Osnivač je Laboratorija za genetičku raznolikost, filogeniju i molekularnu sistematiku bilja. Znanstveni je interes Zlatka Libera filogenija, taksonomija, populacijska, krajobrazna i konzervacijska genetika vaskularnih biljaka s posebnim naglaskom na primjenu molekularno-bioloških i računalnih metoda te razvoj novih molekularnih biljega. Voditelj je radne skupine za kadulje i dalmatinski buhač Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

EDI MALETIĆ

Edi Maletić (1962.) diplomirao je (1986.) i doktorirao (1999.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a magistrirao (1993.) na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani. Od 1987. radi na Agronomskom fakultetu (Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo) na kojem je 2016. izabran za redovitog profesora u trajnom zvanju. Znanstveni interes Edija Maletića je očuvanje biljnih genetskih izvora vinove loze (osnivač je Nacionalne kolekcije hrvatskih autohtonih sorata), ampelografija te klonska selekcija vinove loze. Voditelj je radne skupine vinovu lozu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

NELSON NAZZICARI

Nelson Nazzicari (1981.) završio je doktorski studij 2008. godine iz područja bioinformatike (*Doctor of Philosophy in Informatics and Electrics Engineering*), a 2014. zapošljava se kao znanstveni suradnik u Talijanskom vijeću za poljoprivredna istraživanja i analizu poljoprivredne ekonomije (CREA – Lodi, Italia). Njegov znanstveni rad fokusiran je na strojno učenje primijenjeno na biljnu i životinjsku genomiku. Kao bioinformatičar objavio je radove o populacijskoj strukturi, genomskoj selekciji, studijama povezanosti i raznolikosti te statističkom modeliranju. Od 2020. godine predaje uvodni tečaj o dubokom učenju u Physalia školi za znanstvenu specijalizaciju u suradnji sa Freie Universität u Berlinu. Temeljem potpisanog bilateralnog sporazuma između ZCI CroP-BioDiv i CREA, sudjeluje unutar radne skupine za soju kao vanjski suradnik.

DARIO NOVOSELOVIĆ

Dario Novoselović (1967.) diplomirao je na Fakultetu poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu 1992. godine. Magistrirao je 1997. godine Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Doktorsku disertaciju obranio je 2002. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 1993. radi na Poljoprivrednom institutu Osijek na kojem je 2018. izabran u znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju. Znanstveni je interes Daria Novoselovića je razvoj i očuvanje biljnih genetskih izvora pšenice, oplemenjivanje pšenice na najznačajnija kvantitativna svojstva, analiza molekularne raznolikosti i molekularno oplemenjivanje pšenice. Voditelj je radne skupine za pšenicu u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

IVAN PEJIĆ

Ivan Pejić (1962.) diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku 1986. godine. Magristrirao je 1992. godine na na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Doktorsku disertaciju obranio je 1996. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 1987. radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na kojem je 2011. izabran u redovitog profesora u trajnom zvanju. Područja znanstvenog djelovanja Ivana Pejića su usmjerena na analizu genetske raznolikosti poljoprivrednih vrsta i tranziciju klasičnog u molekularno oplemenjivanje bilja. Kreator je nekoliko registriranih sorata soje i klonova vinove loze. Član je radne skupine za soju Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

IVANA PLAVŠIN

Ivana Plavšin (1990.) diplomirala je na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera 2015. te na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku 2016. godine. Doktorsku disertaciju obranila je u srpnju 2022. godine na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 2018. radi na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku strnih žitarica Poljoprivrednog instituta Osijek kao asistent. Znanstveni interesi Ivane Plavšin obuhvaćaju šire područje genomike pšenice, kvantitativno-genetičku analizu te oplemenjivanje pšenice s naglaskom na primjenu molekularnih metoda. Članica je radne skupine Pšenica Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

DARKO PREINER

Darko Preiner (1982.) diplomirao je (2006.) i doktorirao (2012.) na Agronomskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu na kojem je 2019. izabran u zvanje izvanrednog profesora. Suradnik je i voditelj na brojnim projektima klonske selekcije vinove loze koji su rezultirali sa preko 30 registriranih klonova najvažnijih autohtonih sorata te uspostavom matičnih nasada izdvojenih klonova najviše kategorije. 2016. pokrenuo je oplemenjivački program s ciljem razvoja otpornih sorata korištenjem autohtonih sorata i različitih izvora otpornosti na najvažnije bolesti vinove loze. Voditelj je mjere za očuvanje, održivo korištenje i razvoj genetskih izvora u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu i suradnik Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI Crop-BioDiv).

BERNARD PREKALJ

Bernard Prekalj (1988.) završio je diplomski studij Hortikulture na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu (2013.). Godine 2018. zapošljava se kao asistent na Zavodu za poljoprivredu i prehranu na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču te iste godine upisuje doktorski studij Poljoprivredne znanosti. Znanstveni interesi Bernarda Prekalja su kvantitativna genetika i primjena molekularnih biljega u utvrđivanju genetske raznolikosti i strukture populacija raštike i njihovih srodnika divljih kupusa, te očuvanje biljnih genetskih izvora. Član je radne skupine za kupusnjače Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

BRUNO RAJKOVIĆ

Bruno Rajković (1992.) završio je diplomski studij Biljne znanosti na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu (2017.). Godine 2018. zapošljava se kao asistent na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te iste godine upisuje doktorski studij Poljoprivredne znanosti. Znanstveni interesi Brune Rajkovića su kvantitativna genetika i primjena molekularnih biljega u oplemenjivanje pšenice s naglaskom na otpornost na abiotske stresove. Član je radne skupine za pšenicu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

ALEKSANDRA SUDARIĆ

Aleksandra Sudarić (1965.) diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta u Osijeku 1989. godine. Magistrirala je 1996. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorsku disertaciju obranila je 1999. godine na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Od 1990. godine radi u Poljoprivrednom institutu Osijek, a od 2015. godine je na radnom mjestu znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju. Znanstveni je interes Aleksandre Sudarić konvencionalno oplemenjivanje soje s posebnim naglaskom na nutritivna svojstva, implementacija novih molekularnih tehnika, te očuvanje genetskih izvora krupno sjemenih leguminoza, primarno soje. Voditelj je radne skupine za soju Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

HRVOJE ŠARČEVIĆ

Hrvoje Šarčević (1963.) diplomirao je (1991.), magistrirao (1998.) i doktorirao (2003.) na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 1994. radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu, na kojem je 2019. izabran u redovitog profesora u trajnom zvanju. Znanstveni interesi Hrvoja Šarčevića su populacijska genetika, genetika kvantitativnih svojstava pšenice, kukuruza i soje s naglaskom na otpornost na biotske i abiotske stresove, očuvanje biljnih genetskih izvora te primjena molekularnih biljega u oplemenjivanju bilja. Član je radne skupine za pšenicu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

ZLATKO ŠATOVIĆ

Zlatko Šatović (1965.) diplomirao je na Fakultetu poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu 1990. godine. Magristrirao je 1995. godine na International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Mediterranean institute of Zaragoza (IAMZ), Zaragoza, Španjolska. Doktorsku disertaciju obranio je 1999. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 1990. radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu na kojem je 2012. izabran u redovitog profesora u trajnom zvanju. Znanstveni je interes Zlatka Šatovića očuvanje biljnih genetskih izvora, analiza molekularne raznolikosti i filogenetika, molekularno oplemenjivanje bilja te ljekovito i aromatično bilje. Voditelj je Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

DOMAGOJ ŠIMIĆ

Domagoj Šimić (1965.) diplomirao je 1989. na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, magistrirao 1994. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i doktorirao 1999. na Sveučilištu Hohenheim u Stuttgartu, SR Njemačka. U razdobljima 1989. - 1995. i od 1998. do danas radi na Poljoprivrednom institutu Osijek, na kojem od 2018. radi na mjestu znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju. Znanstveni je interes Domagoja Šimića konvencionalno i molekularno oplemenjivanje kukuruza, kvantitativna genetika i fiziologija stresa, istraživanje interakcije genotip × okolina kod ratarskih kultura. Voditelj je radne skupine za kukuruz Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

FILIP VARGA

Filip Varga (1989.) diplomirao je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2014. godine. Doktorsku disertaciju obranio je 2021. na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Od 2015. radi na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu, prvo kao asistent, a trenutno kao poslijedoktorand. Znanstveni interesi Filipa Varge uključuju analizu molekularne raznolikosti, etnobotaniku, primjenu GIS-a u ekologiji i poljoprivredi te otvorene podatke. Član je radne skupine za kadulje i dalmatinski buhač Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

MONIKA VIDAK

Monika Vidak (1985.) diplomirala je 2013. godine na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Doktorsku disertaciju je obranila 2019. godine u sklopu uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu gdje je i zaposlena od 2015. godine. Znanstveni je interes Monike Vidak sjemenarstvo, očuvanje biljnih genetskih izvora, molekularne metode u identifikaciji kultivara i analizi bioraznolikosti, fenotipizacija te ljekovito i aromatično bilje. Poslijedoktorandica je na elementu projekta „Grah“ u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

ZVONIMIR ZDUNIĆ

Zvonimir Zdunić (1970.) diplomirao je na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku (1994.). Magistrirao je (1998.) i doktorirao (2001.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na Poljoprivrednom institutu Osijek zaposlen je od 1995. na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku kukuruza, a od 2009. godine obnaša dužnost ravnatelja. Izabran je u Znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju 2017. godine, a u zvanje redovitog profesora 2019. godine. Godine 2017. stekao je zvanje Executive Master of Business Administration na poslovnoj školi COTRUGLI Business School. Znanstveni interesi Zvonimira Zdunića obuhvaćaju strateško planiranje poduzeća, kvantitativnu genetiku i konvencionalno oplemenjivanje kukuruza, te procjenu upotrebne vrijednosti molekularnih alata za oplemenjivanje bilja u oplemenjivačkim programima. Sudjelovao je na većem broju znanstvenih projekata. Član je radne skupine za pšenicu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv).

MAJA ŽULJ MIHALJEVIĆ

Maja Žulj Mihaljević (1985.) diplomirala je (2010.) i doktorirala (2017.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2011. do 2022. radila je na Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u statusu doktoranda i poslijedoktoranda. Njezini znanstveni interesi uključivali su oplemenjivanje bilja te molekularno oplemenjivanje bilja s posebni naglaskom na očuvanje autohtonog sortimenta Republike Hrvatske. Trenutno je vlasnica privatne obiteljske destilerije.

Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv)

Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (ZCI CroP-BioDiv) istraživačka je mreža usmjerena na prijenos znanja i tehnologije sa svrhom izravnog doprinosa napretku istraživanja u poljoprivredi.

Istraživačka skupina uključuje znanstvenike triju fakulteta (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet; Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti; Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet) i triju instituta (Institut za poljoprivredu i turizam Poreč; Poljoprivredi institut Osijek i Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split), te stoga uključuje ugledne znanstvenike sa svih visokoškolskih institucija kao i znanstvenih instituta iz područja poljoprivrede u Hrvatskoj.

Ciljevi Znanstvenog centra izvrsnosti su: (a) povećanje dobiti koja proizlazi iz upotrebe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu, (b) identifikacija ključnih svojstava biljnih vrsta pomoću poljskih pokusa i laboratorijskih analiza, te optimizacija protokola fenotipizacije, (c) optimizacija protokola genotipizacije uvođenjem standardiziranih laboratorijskih postupaka, te (d) primjena novih pristupa u statističkoj analizi podataka.

Istraživanja se provode na osam biljnih vrsta - modela koje predstavljaju glavne poljoprivredne kulture kao i kulture koje bi mogle postati zanimljive za poljoprivrednu proizvodnju u budućnosti u R. Hrvatskoj: kukuruz, pšenica, soja, vinova loza, maslina, kupusnjače/lukovi, grah i dalmatinski buhač/kadulje.

Krajnji je cilj Znanstvenog centra izvrsnosti poticanje suradnje i sinergije između hrvatskih sveučilišta i znanstvenih instituta na području poljoprivrede u svrhu utemeljenja nove istraživačke platforme koja će objediniti nova znanstvena saznanja i tehnološka postignuća u svrhu prevladavanja poteškoća u području oplemenjivanja bilja.

ZA VIŠE INFORMACIJA POSJETITE: http://biodiv.iptpo.hr

Prof. dr. sc. Zlatko Šatović, voditelj projekta
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb
TEL: 01 239 3935 / E-MAIL: zsatovic@agr.hr

Europska unija
Zajedno do fondova EU

STRUKTURNI I INVESTICIJSKI
FONDOVI

Operativni program
KONKURENTNOST
I KOHEZIJA

Republika Hrvatska