

Genetička raznolikost i srodstveni odnosi populacija divlje masline u Hrvatskoj

Jankulovski, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:479747>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Tamara Jankulovski

**Genetička raznolikost i srodstveni odnosi populacija
divlje masline u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju za Filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Zlatka Libera i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**GENETIČKA RAZNOLIKOST I SRODSTVENI ODNOSI POPULACIJA DIVLJE
MASLINE U HRVATSKOJ**

Tamara Jankulovski
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kada istražujemo genetičku raznolikost masline moramo u vidu imati postojanje tri tipa maslina: divlje masline (oleaster), sjemenjaci (olivaster) i kultivirane masline. U ovom istraživanju prikupljeni su uzorci tri populacije divljih maslina s otoka Paga i Lastova, poluotoka Pelješca i 15 najčešćih hrvatskih kultivara. Provedena je analiza 12 mikrosatelitnih lokusa. Izračunati su različiti genetički parametri i upotrebljene različite statističke metode kao što su: informacijski sadržaj polimorfizma, prosječan broj alela po populaciji, alelna bogatstvo, broj privatnih alela, primijećena i očekivana heterozigotnost, koeficijent samooplodnje, genetska diferenciranost, izračun matrice genetičke udaljenosti, izrada NJ stabla, Bayesovska analiza skupina na temelju modela te faktorska analiza korespondencije. Jedinke u populaciji Pelješac određene su kao olivasteri, a ne kao prave divlje masline (oleasteri). Pravim divljim populacijama su se pokazale samo populacije Pag i Lastovo. Kultivari Piculja i Mrčakinja nisu kultivari, nego prave divlje masline koje zbog obilne i redovite cvatnje služe u maslinicima kao obilan izvor peluda tijekom sezone oprašivanja, signifikantan koeficijent samooplodnje (F_{IS}) u populaciji Pag ukazuje da je ova divlja populacija, vjerojatno zbog smanjenja veličine, prošla kroz genetičko usko grlo (eng. bottleneck). Dobiveni rezultati naglašavaju potrebu očuvanja prirodnih populacija divljih maslina kao rezervata rijetkih i vrijednih alela u oplemenjivačkim programima.

(42 stranice, 9 slika, 5 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: divlje masline, sjemenjaci, kultivari, genetička raznolikost, mikrosatelitni biljezi

Voditelj: Dr. sc. Zlatko Liber, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Zlatko Liber, red. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 18. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

GENETIC DIVERSITY AND RELATIONSHIPS OF WILD OLIVE POPULATIONS IN CROATIA

Tamara Jankulovski
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

When we research the genetic diversity of olives, we have to keep in mind the existence of three types of olives: wild olives, feral forms and cultivated olives. In this study, the samples of three wild olive populations from the islands of Pag and Lastovo, the peninsula Pelješac and 15 most common Croatian cultivars were collected. An analysis of 12 microsatellite loci was performed. Various genetic parameters were calculated and different statistical methods were used such as: polymorphism information content, average number of alleles per population, allelic richness, number of private alleles, observed and expected heterozygosity, inbreeding coefficient, genetic differentiation, calculation of genetic distances, creation of NJ tree, Bayesian model-based cluster analysis and factorial correspondence analysis. The individuals of the population Pelješac were characterized as feral forms not as true wild olives (oleaster). Wild origin has only been confirmed to the populations Pag and Lastovo. The cultivars Piculja and Mrčakinja were not cultivars but true wild olives, which, due to their abundant and regular flowering, serve as an abundant source of pollen during pollination season in the olive groves. The significant F_{IS} coefficient in the Pag population indicates that this wild population, probably due to a decrease in size, has undergone a genetic bottleneck. The obtained results underlined the need to conserve natural populations of wild olives as reserves of rare and valuable alleles in breeding programs.

(42 pages, 9 figures, 5 tables, 44 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: wild olives, feral forms, cultivars, genetic diversity, microsatellite markers.

Supervisor: Dr. Zlatko Liber, Prof.

Reviewers: Dr. Zlatko Liber, Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 18 September 2019

SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
1.1. TAKSONOMSKI POLOŽAJ I MORFOLOŠKA OBILJEŽJA MASLINE.....	2
1.2. DIVLJA MASLINA (<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i> var. <i>sylvestris</i>).....	4
1.3. PODRIJETLO I UDOMAĆENJE MASLINE.....	5
1.4. MIKROSATELITI KAO GENETIČKI BILJEZI	7
1.5. STATISTIČKE METODE U ANALIZI GENETIČKE RAZNOLIKOSTI	9
1.5.1. Deskriptivna statistika	9
1.5.2. Mjerila genetičke udaljenosti i izrada stabala srodnosti	11
1.5.3. Bayesovska analiza populacijske strukture	12
1.5.4. Faktorijalna analiza korespondencije (FCA).....	13
2. CILJ RADA.....	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. BILJNI MATERIJAL	17
3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA	18
3.3. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA.....	19
3.4. STATISTIČKA ANALIZA.....	21
4. REZULTATI.....	23
4.1. DETEKCIJA I SVOJSTVA MIKROSATELITNIH BILJEGA	24
4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST	24
4.3. GENETIČKA UDALJENOST IZMEĐU JEDINKI I NJ STABLO SRODNOSTI	25
4.4. BAYESOVA ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE	27
4.5. FAKTORIJALNA ANALIZA KORESPODENCIJE	28
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. ZAHVALA	34
8. POPIS LITERATURE	36
9. ŽIVOTOPIS.....	41

1. UVOD

1.1. TAKSONOMSKI POLOŽAJ I MORFOLOŠKA OBILJEŽJA MASLINE

Prema APG sustavu (APG IV 2016) maslina (*Olea europea* L.) je tipična vrsta porodice Oleaceae, koja je kao pripadnik reda Lamiales smještena u središnje dvosupnice unutar kritosjemenjača. Porodica Oleaceae sadrži 25 rodova unutar kojih se nalazi oko 600 vrsta koje su zastupljene na svim kontinentima. (Besnard i sur., 2002).

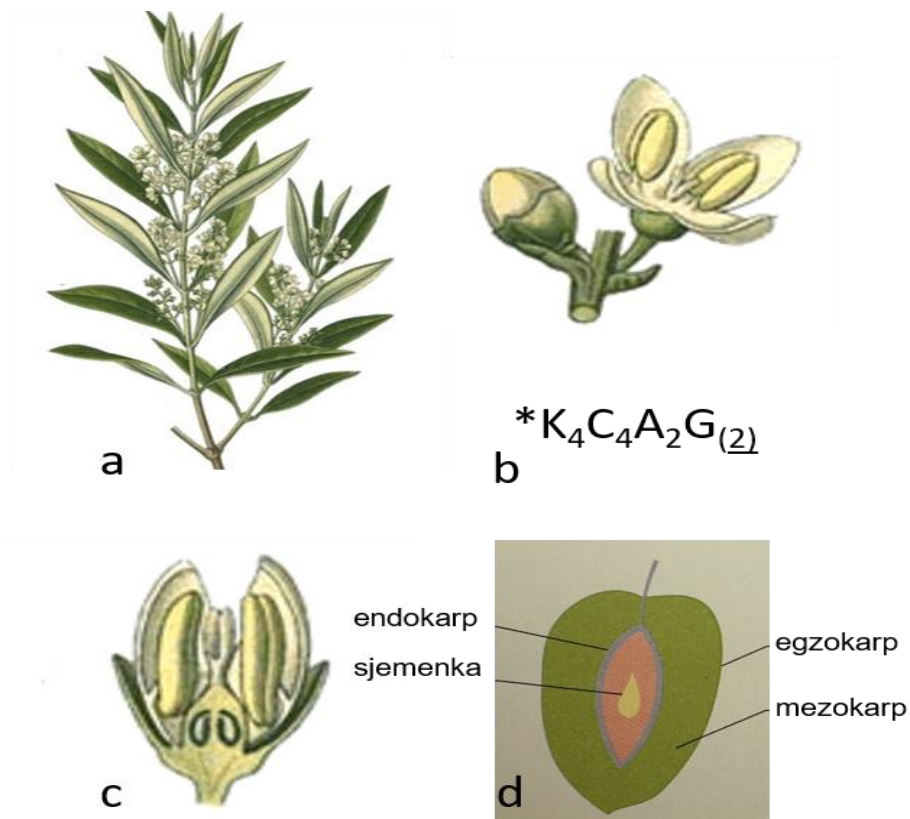
Jedan od najistaknutijih rodova unutar spomenute porodice je rod *Olea* koji se ističe svojom iznimnom agroekonomskom vrijednošću. Rod *Olea* sadrži između 30 i 40 vrsta koje su rasprostranjene na području Australije, Azije, Afrike i Mediterana. Unatrag nekoliko desetljeća provedene su opsežnije studije koje su se bavile taksonomijom ovog roda primjenom molekularnih metoda. Najnovija klasifikacija dijeli rod na dva podroda *Olea* i *Panniculata* s time da se podrod *Olea* dalje diferencira u dvije sekcije *Olea* i *Legustroides*. Unutar sekcije *Olea* smještena je vrsta *Olea europaea* s dva varijeteta: *Olea europaea* sub. *europaea* var. *europaea* (kultivirana maslina) i *Olea europaea* sub. *europaea* var. *sylvestris* (divlja maslina) (Besnard i sur., 2002; Green, 2002).

Maslina je dugovječno bogato razgranjeno zimzeleno stablo ili grm s nepravilnim i izrazito kvrgavim deblom te vretenastim i jako razgranjenim korijenom. Krošnja masline je asimetrična sastavljena od kožastih, zim zelenih listova koji su na ograncima raspoređeni nasuprotno. Listovi su s kratkom peteljkom, duguljastog oblika (3-10 cm duljine i do 2 cm širine) s cjelovitim rubom i ušiljeni s tipično kserofitskim uvučenim pučima. Lice lista je glatko tamno zeleno boje, a naličje je dlakavo, srebrnosive boje. Listovi su za grane pričvršćeni kratkim peteljka (Sl. 1a).

Cvijet masline je dvospolan ili muški sa sterilnim tučkom, a izrasta iz pazušaca lista. Radijalne je simetrije i ugodnog mirisa, a na drvu masline ga možemo vidjeti u rahlim metličastim cvatovima sastavljenim od 15-30 cvjetova (Sl. 1a). Unutar cvijeta masline nalaze se dva prašnika, a plodnica je nadržala, sastavljena od dva plodna lista (Sl. 1b). Oprašivanje je dominantno vjetrom, ali jednim dijelom i kukcima (Free, 1993). Morfološka sterilnost cvijeta primijećena je osobito kod kultivara u vidu nepotpuno razvijene plodnice. Na ovaj način maslina sprečava samooprašivanje pa su većini kultivara redovito potrebni oprašivači u maslenicima (Benčić, 1991). Unutar plodnice se razvijaju dva sjemene zametka (Sl. 1c). Plod je mesnata, jajasta koštunica duga 1-3 cm i široka do 2 cm. Na početku je koštunica zelene boje, a sazrijevanjem poprima tamnoplavu, crnu ili smeđezelenu boju. U poprečnom prerezu koštunice jasno se razlikuju tri sloja: vanjski kožičasti egzokarp, mesnati mezokarp te drvenasti

endokarp (Sl. 1d). U kemijskom sastavu plod se sastoji od: 45-55% vode, 18-24% ugljikohidrata, 13-28% ulja, 5-8 % celuloze, 1,5-2 % bjelančevina te 1-2 % minerala (Škarica, 1996).

Upravo kemijski sastav ploda masline, a prije svega zasićenih i nezasićenih masnih kiselina koje su temelj maslinovog ulja, čine maslinu jednom od agroekonomski najvrjednijih biljnih vrsta. Prema posljednjim podacima za 2017./2018. godinu, proizvodnja maslinova ulja na globalnoj razini iznosila je preko 3 milijuna tona (<http://www.oliofficina.net/>).



Slika 1. a) Ogranak s metličastim cvatom masline, b) dvospolni cvijet masline s cvjetnom formulom, c) uzdužni prerez kroz dvospolni cvijet masline i vidljiva dva sjemena zametka u plodnici, d) uzdužni prerez ploda masline (Preuzeto i izmijenjeno iz <https://www.narodnilijek.com/web/herbarium-maslina/>; Škarica i sur., 1996)

1.2. DIVLJA MASLINA (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*)

U divlje masline se ubrajaju; 1) izvorno divlje masline (oleaster) koje se nalaze u prirodnim zonama pod malim utjecajem čovjeka i 2) feralne masline (olivaster) kao sjemenjaci kultiviranih maslina ili sjemenjaci nastali križanjem kultivara i divljih maslina (Klepo, 2014).

Glavna obilježja divljih maslina su izrazito veća genetička varijabilnosti u odnosu na kultivare, a koja im omogućuje jako dobru prilagodbu staništima (Erre i sur., 2010), bodljasti mladi ogranci, sitni okruglasti plodovi čiji polumjer ne prelazi 8 mm, slabo mesnat mezokarp s niskim postotkom uljnih sastojka (ispod 15%) te ornitokorno i endozookorno rasprostriranje drugim životinjama, za razliku od kultivara koji se isključivo rasprostiru klonalno planiranim aktivnostima čovjeka (Belaj i sur., 2011).

Divlje masline su uz rogač (*Ceratonia siliqua*), tršlju (*Pistacia lentiscus*), mirtu (*Myrtus communis*), tetiviku (*Smilax aspera*), borovicu (*Juniperus oxycedrus* i *Juniperus macrocarpa*), sparožinu (*Asparagus acutifolius*), krkavinu (*Rhamnus sp.*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), crniku (*Quercus ilex*), oštriku (*Quercus cocifera*) itd., prirodni sastojak šuma alepskog bora ili makije u stenomediteranskoj zoni mediteranske biljnogeografske regije. One su izuzetno važne za očuvanje tla, održavanje bioraznolikosti te u oplemenjivanju domaćih kultivara u vidu povećanja produktivnosti, sastava i kvalitete maslinova ulja (Klepo, 2014). Divlje masline su poznate po svojoj dugovječnosti, a kao primjer možemo uzeti one u blizini naselja Lun na otoku Pagu (Sl. 2).



Slika 2. Stara divlja maslina s lokaliteta Lun na otoku Pagu (autorica: T. Klepo)

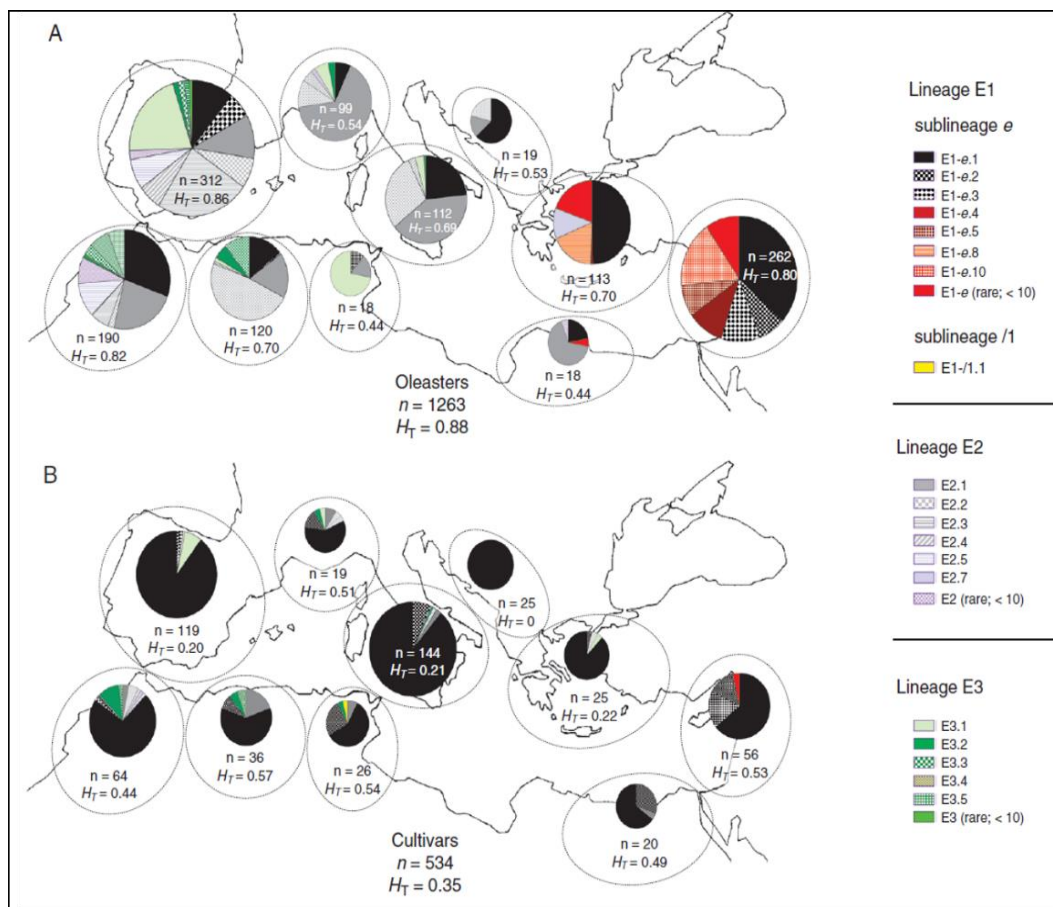
Između više desetaka tisuća divljih maslina na ovom otoku svojom se jedinstvenošću izdvaja oko 1500 divljih maslina starosti i preko 1600 godina, visokih od 5 do 8 metara. Ovo nalazište divljih maslina, površine 23,6 ha jedino je takve vrste na Jadranu te je, zbog velike botaničke i estetske vrijednosti, 1963. godine zaštićeno i proglašeno botaničkim rezervatom (<https://www.lun.hr/slides/flashmasline/index.html>).

1.3. PODRIJETLO I UDOMAĆENJE MASLINE

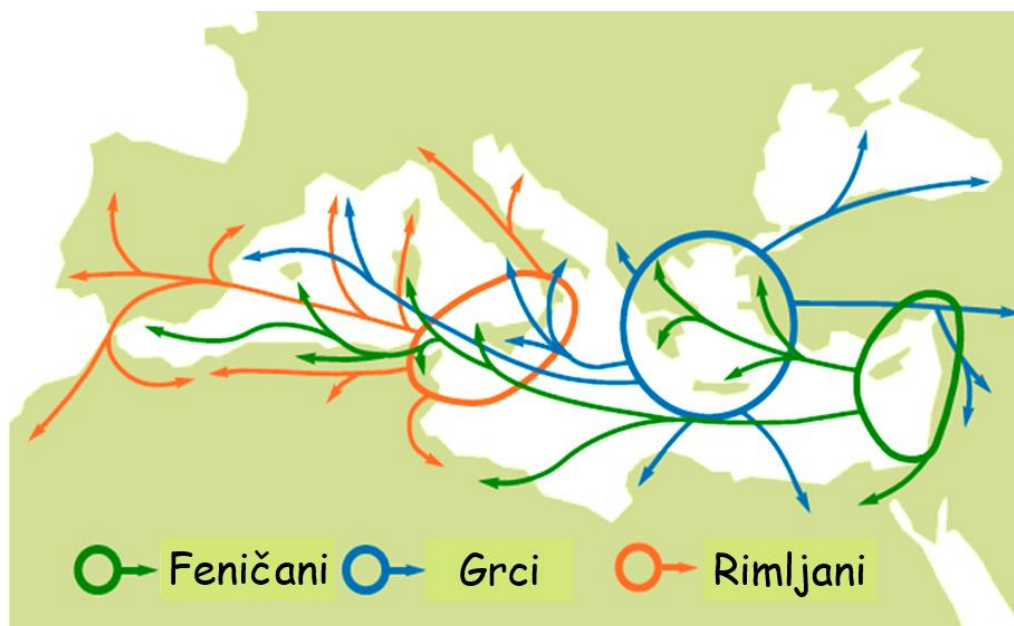
Posljednjih desetak godina intenzivno se istražuje podrijetlo masline, postanak prvih kultivara i širenje masline diljem svijeta (Breton i sur., 2006; Belaj i sur., 2007; Besnard i sur., 2013, 2016, 2018). Može se reći da su danas prisutne dvije teorije koje pokušavaju objasniti podrijetlo divlje masline i podrijetlo kultivara: monocentrična i multicentrična. Monocentrična teorija pretpostavlja da su izvorno divlje masline rasprostranjene samo u istočnom Sredozemlju, a da ono što se smatra divljim maslinama u zapadnom Sredozemlju predstavlja tzv. sjemenjake ili olivastere, tj. masline koje samo izgledaju kao divlje, ali su se razvile iz sjemena kultivara. Po ovoj teoriji današnji kultivari maslina su domestificirani iz divljih maslina isključivo u istočnom Sredozemlju. Multicentrična teorija pretpostavlja da su izvorno divlje masline prisutne u cijelom Sredozemlju i da postoji mogućnost da su neki kultivari nastali udomaćivanjem lokalnih divljih maslina (npr. Maroko, Sicilija, Korzika). Ovu posljednju teoriju podržava većina najnovijih istraživanja. Tako su koristeći podatke kloroplastnog genoma Besnard i sur. (2009, 2013, 2018) zaključili da je divlja maslina bila prisutna u Mediteranu u kasnom miocenu ili ranom pliocenu, a detekcijom tri glavna kloroplastna haplotipa u zapadnom, središnjem i istočnom Mediteranu uspjeli rekonstruirati rasprostranjenost izvornih divljih maslina (Sl. 3a). Zanimljivo je da su kloroplastni haplotipovi divljih maslina ostavili svoj trag u kloroplastnom genomu modernih kultivara (Sl. 3b).

Tijekom holocena, osobito tijekom posljednjih 8000 godina, dolazi do stabilizacije klime mediteranskog područja, ali i do sve naglašenijeg ljudskog utjecaja, što je dovelo do intenzivnog širenje areala kako divlje tako i kultivirane masline (Figueiral and Terral, 2002). Bez obzira na teorije o podrijetlu masline, većina autora smatra da danas najčešći kultivari maslina potječe iz istočnog Sredozemlja te da su se na zapad širili uz pomoć drevnih civilizacija kao što su civilizacije Feničana, Grka i Rimljana (Sl. 4.). Arheobotanički ostaci plodova divljih maslina iz Izraela (Kislev i sur., 1995) ukazuju da je prva upotreba maslina za razne ljudske

potrebe (npr. konzumiranje plodova, korištenje lišća u prehrani domaćih životinja, upotreba drva maslina itd.) bila u vrijeme prvih civilizacija koje su se uspostavile na Bliskom Istoku u vrijeme neolitika prije oko 10000 godina. Domestifikacija divlje masline se odvijala prije svega vegetativnom propagacijom najpoželjnijih genotipova divlje masline. Čini se da je vegetativna propagacija bila većinom kalemljenje jer je poznato da su reznice izuzetne osjetljivosti na patogene u tlu.



Slika 3. Rasprostranjenost kloroplastnih haplotipova masline u Sredozemlju (A) divlja maslina, (B) kultivari (Prerađeno iz Besnard i sur., 2018).



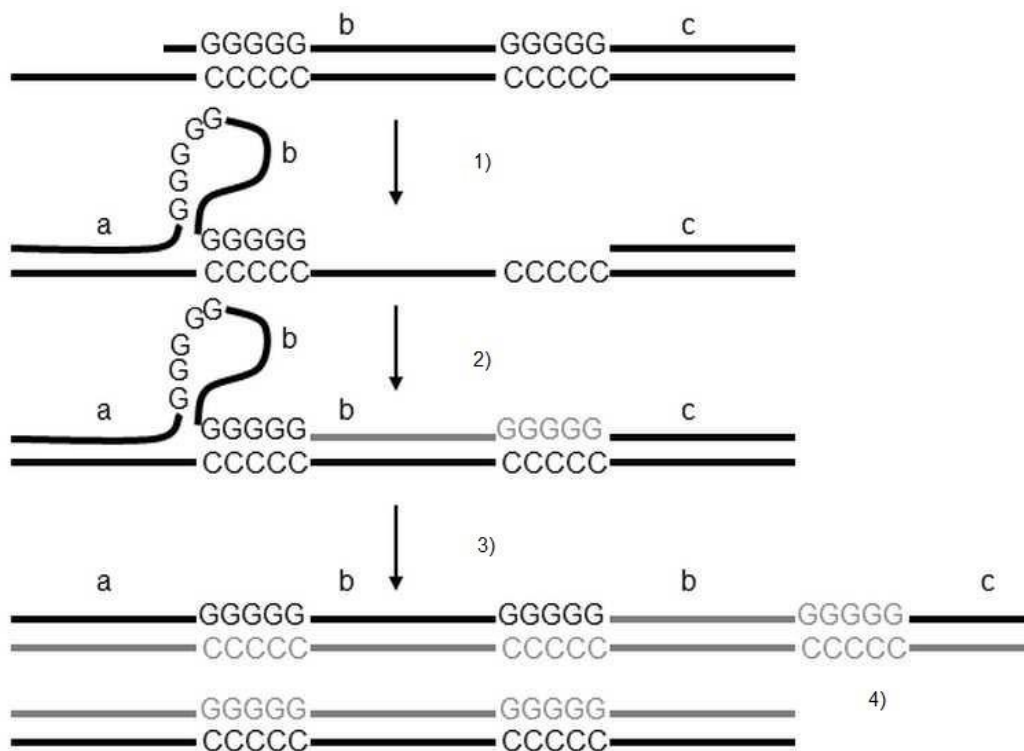
Slika 4. Antropogeno širenje kultivirane masline iz istočnog Sredozemlja na zapad.

1.4. MIKROSATELITI KAO GENETIČKI BILJEZI

U genetičkim istraživanjima kao alat za utvrđivanje genetičke raznolikosti upotrebljavaju se različiti genetički biljezi (eng. *genetic markers*). Različiti oblici biljega nazivaju se alelima, a mjesto biljega na kromosomu lokusom. Tradicionalno se genetički biljezi dijele na morfološke i molekularne, ali zbog mogućnosti otkrivanja genetičke raznolikosti izravno na razini DNA danas se gotovo isključivo koriste DNA biljezi kao podtip molekularnih biljega.

Od mnogobrojnih DNA biljega, mikrosateliti ili jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. *Simple Sequence Repeats*, SSR) su zbog svoji dobrih osobina (npr. ravnomjerna zastupljenost u genomu, kodominantnost, visok nivo polimorfizma) najčešće upotrebljavani genetički biljezi (Moxon i Willis, 1999). Inače, mikrosateliti su dijelovi DNA sastavljeni od tandema ponavljajućih motiva nukleotida koji nikad nisu duži od 6 bp. Najčešće se nalaze u nekodirajućim dijelovima genoma; gdje je stopa točkastih mutacija znatno viša nego u kodirajućim regijama. No, stopa mutacije u mikrosatelitnoj regiji je znatno veća i od ostatka nekodirajućeg dijela genoma te iznosi od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotida po lokusu po generaciji, što ih čini iznimno varijabilnim, a samim time i vrlo informativnim (Radosavljević, 2012). Visoka razina polimorfizma SSR-biljega objašnjava se najčešće pomoću mehanizma poznatog kao replikacijsko klizanje (eng. *replication slippage*) (Sl. 5). Naime, tijekom replikacije

mikrosatelitne regije, zbog nesavršenosti rada DNA polimeraze, osobito u ponavljajućem mikrosatelitnom motivu, dolazi do pomaka ili „proklizavanja“ jednog lanca u odnosu na drugi što dovodi do pogreške u sparivanju baza, a to za posljedicu ima stvaranje omče. Ukoliko se omča nalazi na rastućem lancu, u sljedećem replikacijskom ciklusu doći će do delecije određenog broja mikrosatelitnih motiva, a ukoliko se omča nalazi na lancu kalupa u sljedećem replikacijskom ciklusu doći će do insercije određenog broja mikrosatelitnih motiva. Regije koje omeđuju mikrosatelit nisu toliko podložne mutacijama kao sama mikrosatelitna sekvenca pa ako je poznat redosljed nukleotida za takve regije moguće je sintetizirati PCR početnice za umnažanje mikrosatelitnog lokusa. Kada je jednom određen redosljed nukleotida za PCR početnice koje omeđuju mikrosatelitni lokus, laboratorijska analiza mikrosatelita je prilično jednostavna i svodi se samo na lančanu reakciju polimerazom i detekciju alela na kapilarnoj elektroforezi.



Slika 5. Shematski prikaz replikacijskog klizanja. 1) „klizanje“ novosintetiziranog lanca uz stvaranje petlje 2) izgled dvolančane DNA prije druge replikacije 3) replikacija 4) usporedba novonastalih lanaca s i bez promjene broja mikrosatelitnih motiva. (Izvor: <https://www.frozevolution.com/vi224-multiplication-can-also-be-product-nucleotide-slipped-strand-mispairing-mechanism>)

1.5. STATISTIČKE METODE U ANALIZI GENETIČKE RAZNOLIKOSTI

1.5.1. Deskriptivna statistika

Određivanje informativnosti mikrosatelitnih biljega i genetičke raznolikosti unutar i između populacija vrši se deskriptivnom statistikom. Informativnost mikrosatelitnih biljega procjenjuje se na temelju informacijskog sadržaja polimorfizma i ukupnog broja uočenih alela (N_a) u analiziranoj populaciji. Informacijski sadržaj polimorfizma (eng. *Polymorphism Information Content*, skraćena *PIC*) (Botstein i sur., 1980) predstavlja mjeru broja i učestalosti alela na nekom lokusu. Procjenjuje se na temelju sljedeće jednadžbe:

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

gdje je:

p_i = učestalost alela i ,

$p_i^2 \times p_j^2$ = umnožak kvadratne učestalosti za svaki par alela,

I = ukupan broj alela.

Genetička raznolikost unutar i između populacije analizira se obično tako da se izračunava alelno bogatstvo (N_{ar}), broj jedinstvenih alela (N_{pa}), zapažena heterozigotnost (H_O), očekivana heterozigotnost ili genska raznolikost (H_E), inbreeding koeficijent (F_{IS}) te indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}).

Alelno bogatstvo (El Mousadik i Petit, 1996) je prosječan broj alela u populaciji kada bi broj jedinki unutar različitih populacija u istraživanju bio jednak. Procjenjuje se na temelju rarefakcijskog indeksa prema sljedećoj jednadžbi:

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

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.

Aleli koji se mogu pronaći samo u jednoj populaciji nazivaju se jedinstvenim alelima (N_{pa}). Zapažena heterozigotnost (eng. *observed heterozygosity*, H_O) predstavlja udio heterozigotnih jedinki u analiziranim populacijama. Očekivana heterozigotnost (eng. *expected heterozygosity*, H_E) predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne nakon jedne generacije nasumične oplodnje. Očekivana heterozigotnost se obično izračunava pomoću nepristrane formule po Neiju:

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

gdje je:

H_E – nepristrana genetička raznolikost po Neiju,

n – veličina uzorka,

p_i = učestalost alela i u populaciji,

I – ukupan broj alela,

H_O – zapažena heterozigotnost

Koeficijent samooplodnje (eng. *inbreeding coefficient*) (F_{IS}) je mjerilo smanjenja heterozigotnosti u populaciji u odnosu na populaciju koja je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, a izračunava se prema formuli:

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

gdje je:

H_O - zapažena heterozigotnost,

H_E - očekivana heterozigotnost.

Indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) je mjera populacijske diferencijacije uvjetovana genetičkom strukturom. Indeks genetičke diferencijacije kreće se od $F_{ST} = 0$ (nema genetičke diferencijacije između podpopulacija) do 1 (potpuna genetička diferencijacija). Indeks genetske diferencijacije izračunava se prema formuli:

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

gdje je:

H_S - prosječna očekivana heterozigotnost podpopulacija,
 H_T - očekivana heterozigotnost populacije.

1.5.2. Mjerila genetičke udaljenosti i izrada stabala srodnosti

Najčešće upotrebljavano mjerilo udaljenosti između jedinki na temelju mikrosatelitnih biljega je genetička udaljenost temeljem udjela zajedničkih alela (*Proportion of Shared Alleles Distance*, DPSAM) (Bowcock i sur., 1994), a koja se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$D_{SA} = -\ln \left(\frac{\sum_{l=1}^L s}{2L} \right)$$

gdje je:

s - broj zajedničkih alela
 L - broj mikrosatelitnih lokusa

U svrhu grafičkog prikaza genetičkih odnosa na temelju matrica udaljenosti između jedinki ili populacija obično se koriste multivarijantne metode razvrstavanja (classification methods) u koje spadaju i različiti algoritmi za izradu stabala. Jedan od najčešće korištenih metoda izrade stabla je metoda sparivanja susjeda (Neighbor Joining; Saitou i Nei, 1987). Izrada stabla metodom sparivanja susjeda započinje zvjezdastim stablom kod kojeg su sve jedinke jednako udaljene od korijena kao i međusobno. Izračunava se korigirana matrica

udaljenosti kod koje se udaljenosti između svakog para jedinki korigiraju na temelju prosječne udaljenosti tih jedinki od svih ostalih jedinki u analizi. Razlaganje zvjezdastog stabla započinje od para jedinki koje imaju minimalnu korigiranu udaljenost. Nakon izračunavanja duljina grana od novonastalog članka i para jedinki koje su preko njega povezane, izračunavaju se udaljenosti između članka i svih ostalih jedinki u analizi. Time se tvori nova izvorna matrica, te se cjelokupan postupak ponavlja.

1.5.3. Bayesovska analiza populacijske strukture

Bayesovska analiza populacijske strukture ima za cilj utvrditi optimalan broj skupina u svrhu razvrstavanja jedinki u genetski diferencirane skupine pretpostavljajući Hardy Weinbergovu razvnotežu kao i ravnotežu vezanosti gena (eng. linkage equilibrium) unutar svake skupine (Pritchard i sur., 2000; Corander i sur., 2003). Analiza se temelji na Bayesovom teoremu:

$$P(H|D) = \frac{P(D|H)P(H)}{P(D)}$$

gdje je:

$P(H|D)$ - posteriorna vjerojatnost hipoteze H istinita uz dane podatke D ,

$P(D|H)$ - uvjetna vjerojatnost podatka D uz danu hipotezu H ,

$P(H)$ - priorna vjerojatnost hipoteze H ,

$P(D)$ - marginalna vjerojatnost podatka D ,

D - multilokusni genotipovi jedinki u analizi.

Nakon što se odredi optimalan broj skupina K , pripadnost jedinki pojedinim skupinama određuje se izračunom udjela genoma svake pojedine jedinke, koji potječe iz određene skupine, odnosno izvorne populacije. Pretpostavlja se postojanje 1 do N skupina K , te se za svaku hipotezu provede odgovarajući broj neovisnih prohoda (eng. *run*). Svaki se prohod sastoji od velikog broja ponavljanja (npr. 200000) tijekom perioda zagrijavanja lanca (eng. *burn-in*), dok se podatci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljaju tijekom ponavljanja (npr. 1 000000)

algoritma Markovljevog lanca Monte Carlo (eng. *Markov Chain Monte Carlo*). Usporedbom posteriornih vrijednosti podataka za svaku vrijednost K (Pritchard i sur., 2000), te izračunom stope promjene posteriornih vrijednosti ΔK između uzastopnih vrijednosti K , moguće je odabrati najvjerodostojnije hipoteze, a jedinke pridružiti pojedinim skupinama.

$$\Delta K = \frac{L_{K-1} + L_{K+1} - 2 \times L_K}{sd_K}$$

gdje je:

L_K - prosječna posteriorna vrijednost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina K izračunata na temelju više prohoda,

L_{K-1} - prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K-1$,

L_{K+1} - prosječna posteriorna vjerojatnost podataka $[\ln P(X|K)]$ broja skupina $K+1$,

sd_K - standardna devijacija posteriornih vrijednosti podataka za broj skupina K (Greguraš, 2013).

1.5.4. Faktorijalna analiza korespodencije (FCA)

Faktorijalna analiza korespodencije (eng. *Factorial Correspondence Analysis*) je višedimenzionalna statistička metoda koja se koristi za sažimanje informacija i prikaza odnosa između genotipova na temelju simultane analize većeg broja biljega. Cilj analize je pronaći kompozitne osi dobivene kombinacijom alela, a koje objašnjavaju dio ukupne opažene inercije tablice. Na taj se način jedinke nanose na dvije složene osi koje optimiziraju razlike između analiziranih jedinki koristeći prosječnu inerciju predefiniраниh skupina (Benzécri, 1973.).

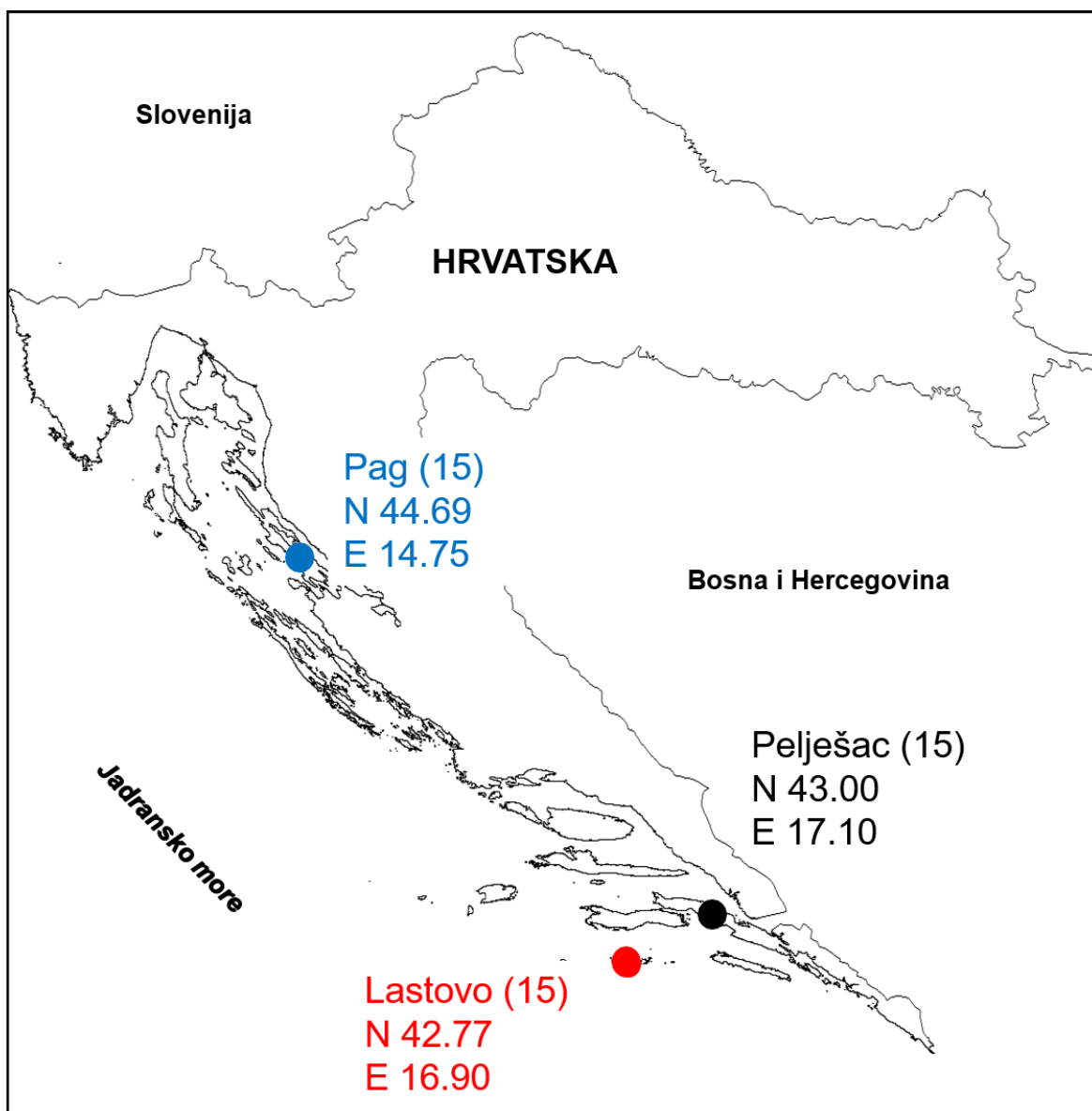
2. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati 12 mikrosatelitnih lokusa 45 jedinki divlje masline iz populacija Pag, Lastovo i Pelješac i 15 najčešćih hrvatskih kultivara kako bi se: (1) dobio bolji uvid u razinu genetičke raznolikosti populacija divlje masline u Hrvatskoj, (2) procijenila genetička srodnost hrvatskih divljih maslina s najčešćim hrvatskim kultivarima, (3) potvrdila ili odbacila autohtonost divlje masline na ovim prostorima te (4) potvrdila ili odbacila prisutnost i podrijetlo feralnih jedinki („sjemenjaka“).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Biljni materijal za molekularnu analizu je sakupljen s 15 jedinki u svakoj od tri populacije divlje masline (Sl. 6) te s 15 kultivara masline (Tab. 1). S ukupno 60 biljaka sakupljeni su mladi ogranaci i pohranjeni u terenski hladnjak te u što kraćem vremenu dopremljeni u Laboratoriji za filogeniju i molekularnu sistematiku Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 6. Geografska pozicija istraživanih populacija divlje masline

Tablica 1. Kultivari masline i lokacija njihova podrijetla

Kultivar	Lokacija	Zemljopisna dužina (E)	Zemljopisna širina (N)
Bjelica	Orašac	18.006678	42.704177
Buža	Bale	13.786025	45.043114
Crnica	Vitaljina	18.479712	42.442074
Drobnica	Kaštel Stari	16.345261	43.553794
Istarska Bjelica	Bale	13.786025	45.043114
Istarska Crnica	Bale	13.786025	45.043114
Karbunčela	Kaštel Stari	16.345261	43.553794
Lastovka	Kaštel Stari	16.345261	43.553794
Levantinka	Gornje selo, Grohote	16.362224	43.362224
Mastrinka	Šolta	16.286097	43.388243
Mrčakinja	Slano	17.893664	42.787918
Oblica	Šolta	16.286097	43.388243
Perišićeva mastrinka	Kaštel Štafilić	16.335393	43.550262
Piculja	Stanice za južne kulture	18.083502	42.652547
Sitnica	Pelješac	17.498207	42.893484

3.2. IZOLACIJA UKUPNE STANIČNE DNA

Izolacija ukupne genomske DNA provedena je upotrebom izolacijskog kompleta DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) i uređaja za automatsku izolaciju DNA QIAcube (Qiagen®).

1. Izvaže se 100 mg svježeg lisnog tkiva i pomoću sterilne pincete stavi u epruvetu od 2 mL (Safe-lock 2 mL tube, Eppendorf®), u koju se još doda sterilizirana čelična kuglica ($d = 7$ mm) za usitnjavanje;
2. Epruvete se slože u stalak za 24 uzorka uređaja za usitnjavanje Tissue Lyser (Qiagen®), urone u tekući dušik i nakon stajanja oko jednu minutu usitne u uređaju za usitnjavanje jednu minutu na frekvenciji od 30 Hz/s;
3. Na usitnjeno biljno tkivo doda se 400 μ L AP1 pufera i 4 μ L RNaze A. Smjesa se promiješa na „vorteks“ miješalici (GVLab-Gilson®);
4. Dobiveni homogenat inkubira se 10 minuta na 65 ° C uz povremeno miješanje na „vorteks“ miješalici (GVLab-Gilson®);

5. Doda se 130 μ L P3 pufera, sadržaj dobro promiješa na vorteks miješalici (GVLab-Gilson®) i stavi 7 minuta na -20° C;
6. Uzorci se potom centrifugiraju (centrifuga 5415 D-Eppendorf®) 5 min na 16 000 x g;
7. 400 μ L gornjeg vodenog sloja prenese se u novu epruvetu od 2 mL (Safe-lock 2 mL tube, Eppendorf®);
8. Epruvete se stave u vorteks inkubator QIAcube uređaj, a odgovarajući adapteri s pripadajućim kolonama izolacijskog kompleta u rotor centrifuge QIAcube uređaja
Napomena! Broj pozicije u rotoru QIAcube uređaja (gdje će nakon postupka izolacije završiti izolat DNA) mora odgovarati broju uzorka u vorteks inkubatoru QIAcube uređaja.
9. U područje QIAcube uređaja na mjesta za puferu stave se bočice s puferom AW1, puferom AW2 i puferom AE. Neposredno prije početka rada, uklone se čepovi s bočica pufera te se uređaj napuni s filter-nastavcima od 1000 μ L;
10. Zatvore se vrata QIAcube uređaja i na zaslonu na glavnom izborniku odabere protokol: „Purification of total DNA from plant cells and tissues”, a u podizborniku „DNeasy® Plant Mini Kit“;
11. Kada protokol završi (oko 1 sat) na ekranu se prikaže poruka da su uzorci obrađeni, otvore se vrata QIAcube uređaja i izvade adapteri iz rotora, a iz adaptera se izvade i zaklope epruvete od 1,5 mL s pročišćenom DNA;
12. Izolirana DNA pohrani se u zamrzivač na -20° C.

3.3. UMNOŽAVANJE MIKROSATELITNIH LOKUSA LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZOM I DETEKCIJA ALELA

Prije umnožavanja mikrosatelitnih lokusa izmjerena je koncentracija izoliranih DNA pomoću spektrofotometra NanoPhotometer P300 (Implen®). Prije početka mjerenja potrebno je kalibrirati uređaj pomoću AE pufera koji se koristio u zadnjem koraku izolacije DNA. Kako bi se dodatno potvrdila vjerodostojnost mjerenja, poslije mjerenja koncentracija izoliranih DNA izmjerena je koncentracija λ -DNA poznate koncentracije (100 ng/ μ l). Osim što je za sve uzorke izmjerena koncentracija, određen je i omjer apsorbancije 260/280 kao mjera čistoće izoliranih DNA.

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženo je 12 mikrosatelitnih lokusa (Sefc i sur., 2000; De la Rosa i sur., 2002; Carriero i sur., 2002; Cipriani i sur., 2002). Nazivi mikrosatelitnih lokusa, sekvence početnica i očekivane duljine umnoženih fragmenata i ponavljajući motivi DNA navedeni su u Tablici 2.

PCR otopina za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa za jedan uzorak ukupnog volumena 20 μ L imala je sljedeći sastav:

- 9.1 μ L H₂O (sterilizirana, deionizirana)
- 2.0 μ L 10 \times PCR pufer (TAKARA[®])
- 1.6 μ L dNTP (TAKARA[®])
- 0.2 μ L BSA (20 μ g/mL)
- 0.1 μ L Taq Hs (TAKARA[®])
- 5.0 μ L otopine DNA (2 μ g/mL)
- 1,0 μ l početnica F (na 5' - kraju florescencijska oznaka Fam, Ned, Vic ili Pet)
- 1,0 μ l početnica R

Umnožavanje mikrosatelitnih SSR regija lančanom reakcijom polimerazom provedeno je u uređaju GeneAmp 9700 (Applied Biosystems[®]) prema programu:

- inicijalni korak denaturacije: 7 minuta na 95 °C,
- 35 ciklusa ponavljanja tri temperature: 20 sekundi na 95 °C (denaturacija), 30 sekundi na 50 °C (vezanje PCR početnice na DNA kalup), 30 sekundi na 72 °C (sinteza novih DNA lanaca),
- završni korak elongacije od 8 minuta na 72 °C.

Za preliminarnu provjeru umnožavanja mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom upotrebljena je elektroforeza na agaroznom gelu. Uzorci koji su na gelu agaroze nakon bojanja i UV-svjetla pokazivali DNA trakicu u veličinskom rasponu od 100 – 300 bp poslani su na detekciju kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems[®]) u DNA servisu Macrogen (Seoul, Južna Koreja). Nakon kapilarne elektroforeze rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka.

Tablica 2. Nazivi mikrosatelitnih lokusa, ponavljajući SSR motiv i očekivane duljine umnoženih SSR lokusa u parovima baza (bp)

Lokus	Ponavljajući motiv	Raspon duljina PCR-fragmenata (pb)
ssrOeUA-DCA3	(GA) ₁₉	228-250
ssrOeUA-DCA4	(GA) ₁₆	1280-186
ssrOeUA-DCA9	(GA) ₂₃	161-205
ssrOeUA-DCA11	(GA) ₂₆ (GGGA) ₄	125-161
ssrOeUA-DCA16	(GT) ₁₃ (GA) ₂₉	120-178
ssrOeUA-DCA18	(CA) ₄ CT(CA) ₃ (GA) ₁₉	168-184
EMO3	(CA) ₇	205-215
GAPU59	(CT) ₉	oko 227
UDO99-011	(CT) ₇ (CA) ₁₀ (CT) ₂ (CA) ₂ CT(CA) ₂ CT(CA) ₉	oko 115
UDO99-019	(GT) ₂₀ (AT) ₅	oko 165
UDO99-039	(AT) ₅ (GT) ₁₁	oko 170
UDO99-043	(GT) ₁₂	oko 174

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati kapilarne elektroforeze mikrosatelitnih alela u obliku .fsa računalnih podataka očitani su računalnim programom GeneMapper (Applied Biosystems®).

Ukupan broj alela po biljegu (N_a) i informacijski sadržaj polimorfizma (eng. *Polymorphism Information Content*, skraćeno *PIC*) svakog mikrosatelitnog biljega izračunati su uz pomoć računalnog programa PowerMarker (Liu i Muse, 2005). Ukupan broj alela, zapažena heterozigotnost (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_E) te koeficijent samooplodnje (F_{IS}) izračunati su za svaki mikrosatelitni lokus u svakoj populaciji pomoću računalnog programa GENEPOP 4.0 (Raymond i Rousset, 1995). Alelno bogatstvo (N_{ar}) ili broj alela koji je neovisan o veličini uzorka izračunat je u programu FSTAT (Goudet, 1995), a broj jedinstvenih alela (N_{pr}) u programu MICROSAT (Minch i sur., 1997). U računalnom programu FSTAT, pomoću nepristranog procjenitelja θ po metodi Weira i Cockerhama (1984), izračunat je indeks genetičke diferencijacije (F_{ST}) između svih parova populacija kao i negova signifikantnost 10000 nasumičnih permutacija.

Genetička udaljenost na temelju udjela zajedničkih alela (proportion-of-shared-alleles distance; Bowcock i sur., 1994) izračunata je upotrebom računalnog programa MICROSAT (Minch i sur., 1997). Uz pomoć podprograma NEIGHBOR računalnog paketa PHYLIP ver. 3.6

b (Felsenstein, 1993) iz dobivene matrice genetičke udaljenosti između jedinki izrađeno je srodstveno stablo upotrebom algoritma NJ (Neighbor Joining).

Bayesovska analiza populacijske strukture provedena je pomoću računalnog programa STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000; Hubisz i sur., 2009). Broj pretpostavljenih skupina bio je od 1 do 7 ($K = 1 - 7$), te je za svaku hipotezu provedeno 10 neovisnih prohoda (*run*). Svaki se prohod sastojao od 200,000 ponavljanja tijekom razdoblja zagrijavanja lanca (*burn-in*). Podaci o posteriornoj vjerojatnosti podataka prikupljeni su tijekom 1,000,000 ponavljanja algoritma Markov Chain Monte Carlo uz pretpostavku modela koji dozvoljava mješovito podrijetlo jedinki (admixture model) i korelirane alelne učestalosti bez uključivanja prethodnih informacija o populacijskoj pripadnosti pojedinih jedinki.

Faktorijalna analiza korespondencije (Factorial Correspondence Analysis; FCA) provedena je pomoću programa Genetix 4.05 (Belkhir i sur., 2004).

4. REZULTATI

4.1. DETEKCIJA I SVOJSTVA MIKROSATELITNIH BILJEGA

Analizom 12 mikrosatelitnih lokusa (Tablica 3) na 45 jedinki divljih maslina iz tri populacije (Pag, Pelješac, Lastovo) i 15 najčešćih kultivara u Hrvatskoj uspješno je identificirano 139 mikrosatelitnih alela. Broj alela se kretao od 5 (UDO99-019) do 19 (UDO99-043). Vrijednosti *PIC*-a oscilirale su od 0.452 (UDO99-019) do 0.871 (UDO99-039), s prosječnom vrijednosti od 0.774.

Tablica 3. Raspon duljina PCR fragmenata, ukupan broj alela (N_a) i informacijski sadržaj polimorfizma (*PIC*) za 12 mikrosatelitnih lokusa analiziranih u ovom radu.

Lokus	Raspon duljina PCR umnoženih fragmenata (pb)	N_a	<i>PIC</i>
ssrOeUA-DCA3	232-258	9	0.734
ssrOeUA-DCA4	130-188	15	0.818
ssrOeUA-DCA9	161-207	15	0.869
ssrOeUA-DCA11	127-179	7	0.725
ssrOeUA-DCA16	123-183	18	0.859
ssrOeUA-DCA18	156-196	14	0.792
EMO3	205-219	8	0.809
GAPU59	208-228	8	0.685
UDO99-011	103-135	11	0.847
UDO99-019	99-167	5	0.452
UDO99-039	105-189	10	0.871
UDO99-043	168-220	19	0.829
Prosjek		11.58	0.774
Ukupno		139	

4.2. GENETIČKA RAZNOLIKOST

Rezultati unutarpopulacijske raznolikosti svake populacije divljih maslina i kultivara prikazani su u Tablici 4. Najniža vrijednost prosječnog broja alela po lokusu (N_{av}) utvrđena je za skupinu kultivara (6.917), a najveća za populaciju Lastovo (7.583). Najveći broj jedinstvenih alela zabilježen je za populacije divlje masline Lastovo (13) i Pag (12), a najmanji za skupinu kultivara (4). Populacija divlje masline s poluotoka Pelješca imala je puno manji broj jedinstvenih alela (8) od druge dvije populacije divljih maslina. Zapažena (H_O) i očekivana (H_E) heterozigotnost bile su najmanje za populaciju Pag ($H_O=0.717$, $H_E=0.769$), a u istoj populaciji koeficijent samooplodnje (F_{IS}) ukazivao je na signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove

ravnoteže. Izračun koeficijenta samooplodnje kultivara nije proveden jer se tu radi o kolekciji kultivara skupljenih s različitih geografskih lokacija, a ne o populaciji koja obitava na istom području izmjenjujući gene između jedinki.

Tablica 4. Mikrosatelitna raznolikost tri populacija divljih maslina i skupine hrvatskih kultivara.

Populacija	<i>n</i>	<i>N_{av}</i>	<i>N_{pa}</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	P
Pag	15	7,250	12	0,717	0,769	0,068	*
Lastovo	15	7,583	13	0,833	0,771	-0,080	ns
Pelješac	15	7,000	8	0,800	0,780	-0,026	ns
Kultivari	15	6,917	4	-	-	-	-

n = veličina uzorka, *N_{av}* = prosječan broj alela po lokusu, *N_{pa}* = broj jedinstvenih alela, *H_O* = zapažena heterozigotnost, *H_E* = očekivana heterozigotnost, *F_{IS}* = koeficijent samooplodnje

Rezultati izračuna indeksa genetičke diferencijacije divljih populacija masline (*F_{ST}*) prikazani su u Tablici 5. Vrijednosti indeksa *F_{ST}* za sve parove populacija bile su signifikantne pri $0.001 < P(F_{ST}) < 0.01$. Najveća vrijednost *F_{ST}* zabilježena je između populacija Pag i Pelješac (0.078), dok je najmanja zabilježena između populacija Pag i Lastovo (0.050). Kao i u slučaju koeficijenta samooplodnje, izračun indeksa genetičke diferencijacije kultivara nije proveden jer se tu radi o kolekciji kultivara skupljenih s različitih geografskih lokacija, a ne o populaciji.

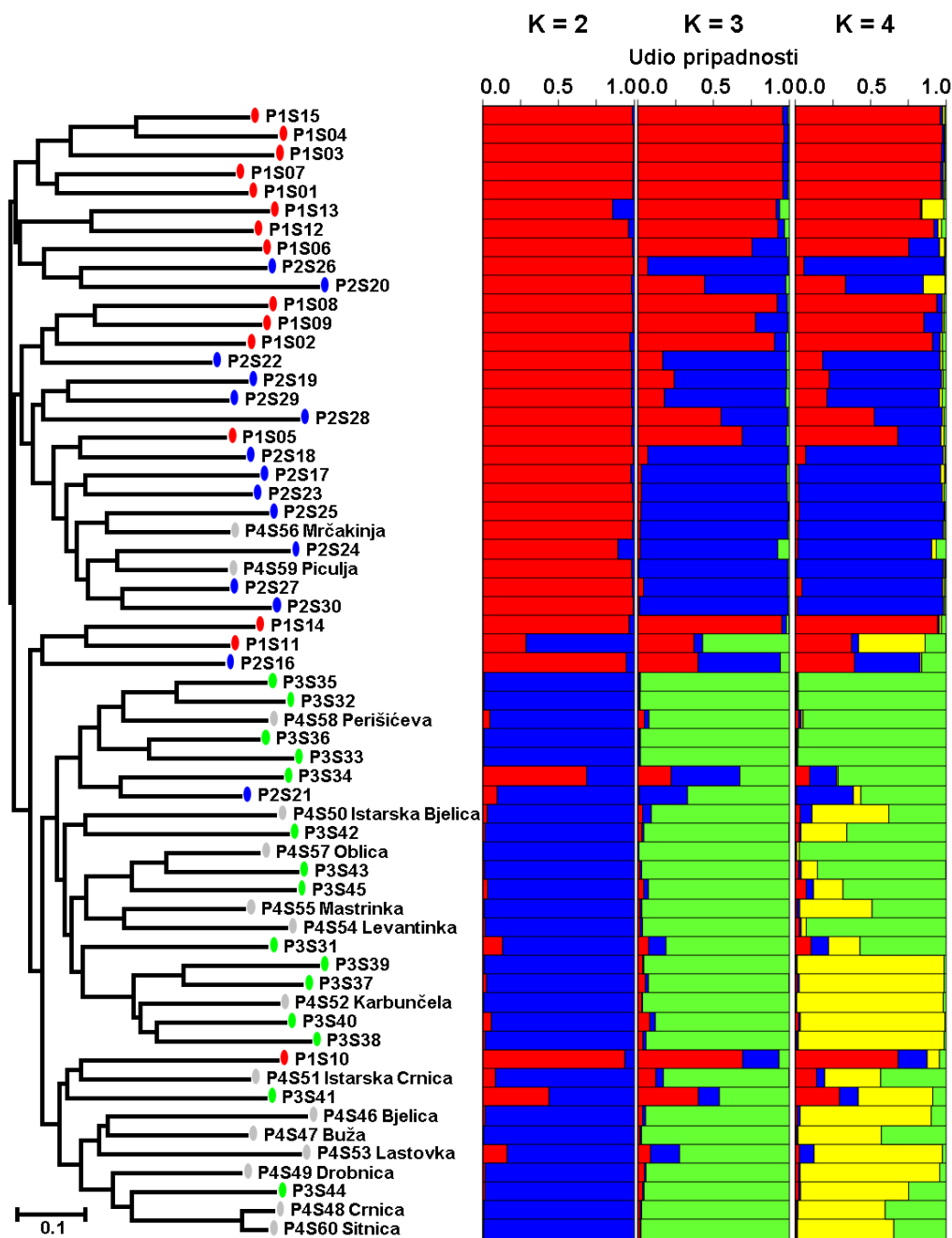
Tablica 5. Matrica vrijednosti *F_{ST}* između populacija divlje masline

Populacija	Pag	Lastovo	Pelješac
Pag		**	**
Lastovo	0,050		**
Pelješac	0,078	0,065	

Signifikantnost *F_{ST}*: ** $0.001 < P(F_{ST}) < 0.01$

4.3. GENETIČKA UDALJENOST IZMEĐU JEDINKI I NJ STABLO SRODNOSTI

Nezakorijenjeno NJ (Neighbor Joining) stablo je izrađeno na temelju matrice genetske udaljenosti (udjel zajedničkih alela ili eng. *Proportion of Shared Alleles, P_{SA}*) između svih 60 analiziranih genotipova (Slika 7a).

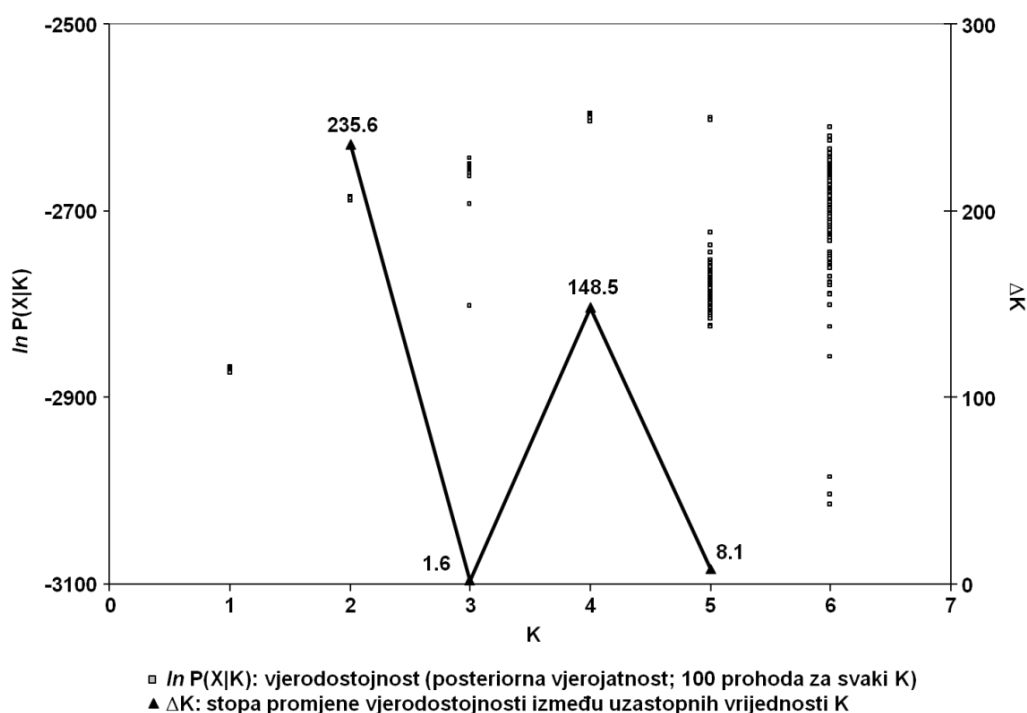


Slika 7. a) Nezakorijenjeno NJ (Neighbor Joining) stablo srodnosti izrađeno na temelju matrice genetske udaljenosti udjela zajedničkih alela, ● Pag, ● Lastovo, ● Pelješac, ● kultivari, b) Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE pri $K = 2$ do 4. Svaka je jedinka predstavljena stupcem, a stupac odgovara grani u srodstvenom stablu koja je u istom redu kao i stupac; Boja odgovara postotku genoma (Q) jedinke koji potječe iz određene izvorne populacije.

Na stablu je vidljivo grupiranje jedinki u pet skupina. Tri skupine u gornjem dijelu stabla čine jedinke s otoka Paga i Lastova i dva kultivara (Mrčakinja i Piculja). Dvije donje skupine na srodstvenom stablu čine jedinke iz populacije divljih maslina s poluotoka Pelješca, jedna jedinka s otoka Pag i Lastovo te većina kultivara.

4.4. BAYESOVA ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE

Bayesovskom analizom populacijske strukture utvrđen je optimalan broj skupina, uz prethodnu pretpostavku (hipoteze) da postoji od jedna do 7 skupina (Slika 8). Na temelju usporedbe posteriornih vjerojatnosti podataka [$\ln P(X|K)$] za svaku vrijednost K i izračunom vrijednosti ΔK utvrđena je najveća vrijednost za $K=2$ i $K=4$.

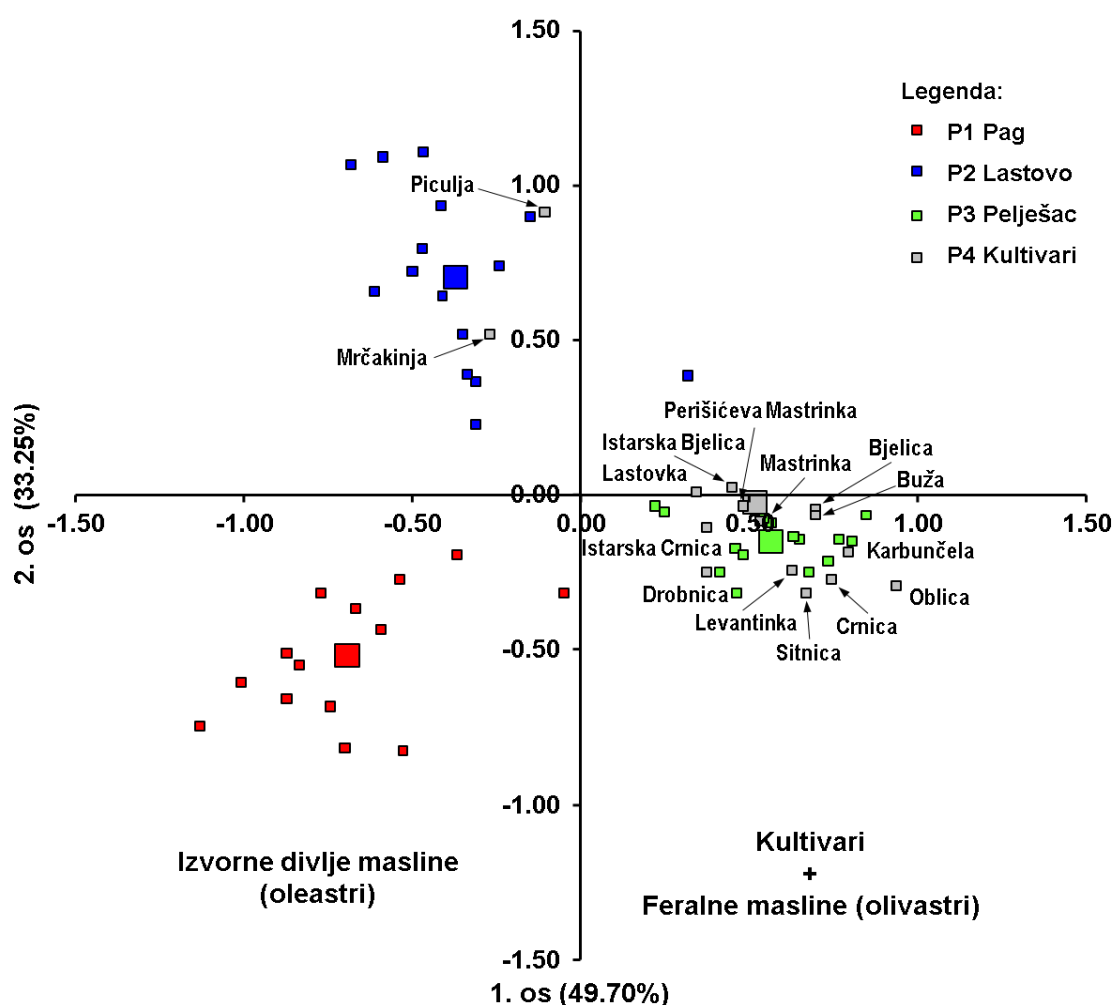


Slika 8. Struktura izvornih populacija na temelju Bayesovske analize pomoću programa STRUCTURE.

Kod $K = 2$, podjele s najvišim ΔK , vidljiva je podjela u skupinu koju čine jedinke iz populacija divlje masline Pag i Lastovo te kao kod NJ srodstvenog stabla, dva kultivara Mrčakinja i Piculja te skupinu koju čine jedinke iz populacije Pelješac i većina kultivara (Sl. 7b). Zanimljivo je da ova podjela u analizi Structure, za razliku od srodstvenog stabla, ne podrazumijeva uvrštavanje dvije jedinke iz populacija divlje masline Pag i Lastovo u skupinu u kojoj su jedinke iz populacije Pelješac i kultivari. Kod $K = 3$ i $K = 4$ jasna je vidljiva podjela skupine divljih populacija na odvojene skupine Pag i Lastovo, te kod $K = 4$ podjela skupine Pelješac i kultivari u dvije skupine u kojima nema čiste podjele na samo kultivare i samo jedinke populacije Pelješac.

4.5. FAKTORIJALNA ANALIZA KORESPONDENCIJE

Faktorijskom analizom korespondencije (FCA) prikazani su odnosi između 45 jedinki divlje masline i 15 najčešćih hrvatskih kultivara (Sl. 9). Prve dvije osi objašnjavaju gotovo 83 % ukupne varijance, s tim da prva os iznosi 49.70 %, a druga 33.25 % ukupne varijance, ukazujući na veliku razinu raznolikosti između i unutar istraživanih populacija. Prva os razdvaja populaciju divlje masline Lastovo i kultivare Mrčakinja i Piculja od populacije divlje masline Pag, dok su jedinice divlje populacije Pelješac i većine kultivara smještene između ove dvije populacije tek nešto bliže populaciji Pag. Druga os razdvaja populacije divlje masline Pag i Lastovo te dva kultivara (Mrčakinja i Piculja) od divlje populacije Pelješac i većine kultivara.



Slika 9. Prikaz odnosa između 45 jedinki iz tri populacije divlje masline i 15 najčešćih hrvatskih kultivara masline u koordinatnom sustavu određenom prvim dvjema osima faktorijske analize korespondencije (FCA). Pojedinačni genotipovi prikazani su malim kvadratima, a baricentri populacija i skupine kultivara većim kvadratima.

5. RASPRAVA

Raznolikost masline podrazumijeva divlje (oleaster), sjemenjake (olivaster) i kultivirane forme. Na području Republike Hrvatske maslina se uzgaja na otocima i obalnom dijelu, svugdje gdje dopire mediteranska klima. U ovom istraživanju prikupljeni su uzorci tri populacije divljih maslina (45 jedinki) s otoka Paga i Lastova te poluotoka Pelješca i 15 najčešćih hrvatskih kultivara.

Svi analizirani mikrosatelitni lokusi su bili polimorfni, s visokim ukupnim (139) i prosječnim (11.58) brojem detektiranih alela te visokom prosječnom vrijednošću informacijskog sadržaja polimorfizma (0.774) što ukazuje na veliku diskriminacijsku moć upotrebljenih mikrosatelitnih biljega.

Nadalje, zabilježena je velika genetska raznolikost populacija divljih i skupine kultiviranih maslina koje su vidljive iz rezultata ukupnog i prosječnog broja alela, alelnog bogatstva, broja jedinstvenih alela te zapažene i očekivane heterozigotnosti (Tablica 4). Vrijednosti gotovo svih parametara bile su veće za divlje nego za kultivirane masline ukazujući na njihovu veću genetsku raznolikost, a što je bilo i očekivano (Lumaret i sur., 2004; Belaj i sur., 2007, 2010; Besnard i sur., 2013). Naime, kultivari su produkt ljudskog uzgoja. Čovjek je u prirodnim (divljim) populacijama birao mali broj jedinki s naglašenim ekonomski vrijednim osobinama (npr. veličina ploda ili veći postotak ulja) koje je onda klonski razmnožavao. Na ovaj način, zbog ljudskog utjecaja, došlo je do nastanka fenomena poznatog kao genetičko usko grlo (eng. *bottleneck*) i efekt osnivača (eng. *founder effect*), a koji snažno utječu na smanjenje genetičke raznolikosti.

Prosječan broj alela kao i broja jedinstvenih alela kod populacije Pelješac je vrlo nizak za divlju populaciju pa se po ovim parametrima populacija Pelješac našla između divljih populacija i skupine kultivara (Tab. 4). Njezinu posebnost naglašavaju i vrijednost indeksa genetičke diferenciranosti (F_{ST}) koji su ukazivali da je ova populacija najrazličitija od prvotno zamišljene tri divlje populacije u analizi (Tab. 5). Nakon izračuna genetskih udaljenosti među jedinkama i njihova prikaza u obliku NJ-stabla (Sl. 7a), Bayesovske (Sl. 7b) i Faktorijske analize korespondencije (Sl. 9), a koje su u pravilu sve jedinice iz populacije Pelješac smještale u zajedničku skupinu s kultivarima, došlo se do zaključka da je populacija Pelješac populacija sjemenjaka tj. populacija koja se je oformila klijanjem plodova kultivara. Naime, sjemenjaci u pravilu morfološki izgledaju kao divlje masline, ali su genetički tek nešto jače raznoliki od kultivara jer im je majčinski dio genoma podrijetlom od kultivara, a očinski može biti podrijetlom i od kultivara i od divljih jedinki. S druge strane sjemenjaci su nešto manje

raznoliki od divljih maslina kod kojih i majčinski i očinski dio genoma potječe od jedinki iz divljih populacija s potpuno slobodnom oplodnjom.

Svojom genetičkom raznolikošću i smještajem na NJ-srodstvenom stablu, u Structure i FCA analizi pravim divljim populacijama (oleastri) su se pokazale populacije Pag i Lastovo. Signifikantan koeficijent samooplodnje ($F_{IS}=0.0680$) zabilježen je za populaciju divlje masline s Paga. Ovaj rezultat ukazuje da su jedinke u ovoj populaciji srodstveno bliže nego što bi trebale biti pri slobodnoj oplodnji tj. da je populacija Pag izolirana s povećanim stupnjem samooplodnje. Temeljem navedenog, možemo pretpostaviti da su populacije divlje masline nekoć bile puno veće, no razvojem i širenjem poljoprivredne proizvodnje, prirodne populacije su se smanjivale što je uzrokovalo gubitak dijela raznolikosti (genetsko usko grlo). Ovi rezultati naglašavaju potrebu očuvanja prirodnih populacija divljih maslina kao rezervata rijetkih i vrijednih alela što predstavlja izniman potencijal u oplemenjivačkim programima (Klepo i sur., 2013, 2014).

Donekle iznenađujući rezultat je da su se u svim primijenjenim analizama kultivari Piculja i Mrčakinja uvijek svrstavali u prave divlje masline. Ovaj rezultat je u skladu s tradicionalnim korištenjem ova dva kultivara, ne kao izvora plodova bogatih uljem, nego, zbog obilne i redovite cvatnje, kao izvora peluda u maslinicima tijekom sezone oprašivanja. Nadalje, Bakarić (2002) kultivar 'Mrčakinju' smatra jednim od sinonima za 'Divljaku' što samo potvrđuje rezultat iz ovog rada da je 'Mrčakinja' zapravo divlja maslina, a ne kultivar.

Tijekom nekih analiza (npr. NJ, FCA) po jedna jedinka iz populacija divlje masline Pag i Lastovo grupirale su se sa skupinom kultivara, no u Bayesovskoj analizi populacijske strukture one su se pokazale kao jedinke divljih maslina (Sl. 7a, b). Tijekom daljnjih istraživanja trebalo bi ponoviti izolaciju DNA ovih jedinki i analizu mikrosatelitnih lokusa jer postoji sumnja na krivo skoriranje pojedinih alela ili na zagađenje stranom DNA.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih populacijsko-genetičkih analiza na 12 mikrosatelitnih lokusa 45 jedinki iz tri populacije divlje masline i 15 jedinki najčešćih hrvatskih kultivara može se zaključiti sljedeće:

- upotrebljeni mikrosatelitni biljezi bili su polimorfni s velikom moći razlučivanja analiziranih jedinki,
- utvrđena je velika genetička raznolikost divljih populacija kao i skupine kultivara, pri čemu su vrijednost svih populacijsko-genetičkih parametara bile veće za divlje masline nego za kultivare,
- relativno mali prosječan broj alela i jedinstvenih alela, velika vrijednost genetičke diferencijacije u odnosu na druge divlje populacije, položaj na NJ-stable, u Structure analizi i FCA plotu ukazuju da je populacija Pelješac populacija sjemenjaka (olivaster), a ne populacija divlje masline (oleaster),
- pravim divljim populacijama su se pokazale samo populacije Pag i Lastovo,
- kultivari Piculja i Mrčakinja nisu kultivari; nego prave divlje masline koje zbog obilne i redovite cvatnje služe u maslinicima kao obilan izvor peluda tijekom perioda oprašivanja,
- signifikantan koeficijent samooplodnje (F_{IS}) u populaciji Pag ukazuje da je ova divlja populacija, vjerojatno zbog smanjenja veličine, prošla kroz genetičko usko grlo (eng. *bottleneck*), a to je dovelo do povećanja stupnja samooplodnje,
- dobiveni rezultati naglašavaju potrebu očuvanja prirodnih populacija divlje maslina kao rezervata rijetkih i vrijednih alela u oplemenjivačkim programima.

7. ZAHVALA

Za početak, veliko Hvala prof. dr. sc. Zlatku Liberu, mentoru kojeg odlikuju strpljenje, stručnost i iznimna radna etika. Bila mi je čast raditi s Vama.

Veliku zahvalnost dugujem i dr. sc. Tatjani Klepo s Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu koja je hrvatsku znanstvenu zajednicu oplemenila svojim prekrasnim radovima o divljim i pitomim maslinama.

Hvala mojoj obitelji, a posebice mom zaručniku Nikici.

...prije, nakon i iznad svega Gospodinu...

8. POPIS LITERATURE

- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105–121.
- Bakarić P. 2002. Sorte maslina Dubrovačkog primorja. Alfa 2, Dubrovnik.
- Belaj A., Muñoz-Díez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D., Satovic Z. 2007. Genetic diversity and population structure of wild olives from North-Western Mediterranean assessed by SSR markers. *Annals of Botany* **100**: 449-458.
- Belaj A., Muñoz-Díez C., Baldoni L., Satovic Z., Barranco D. 2010. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae* **124**: 323–330.
- Belaj A., León L., Satovic Z., De la Rosa R. 2011. Variability of wild olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agro-morphological traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae* **129** (4): 561-569.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000.
- Benčić Đ. 1991. Morfološki sterilitet sorti maslina u Istri. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet, Zagreb.
- Benzécri J. P. 1973. Analyse des Donnees, Paris: Dunod.
- Besnard G., Khadari B., Baradat P., Bervillé A. 2002. *Olea europaea* (*Oleaceae*) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical Applied Genetics* **104** (8): 1353-1361.
- 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. *Annals of Botany* **104**: 143-160.
- Besnard G., Khadari B., Navascués M., Fernández-Mazuecos M., El Bakkali A., Arrigo N., Baali-Cherif D., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Santoni S., Vargas P., Savolainen V. 2013. The complex history of the olive tree: from Late Quaternary diversification of Mediterranean lineages to primary domestication in the northern Levant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20122833. doi: 10.1098/rspb.2012.2833
- Besnard G., Casas R. R. 2016. Single vs multiple independent olive domestications: The jury is (still) out. *New Phytologist* **209**: 466-470.
- Besnard G., Terral J. F., Cornille A. 2018. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany* **121**: 385-403.

- Botstein D., White R. L., Sholnick M., David R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**: 314–331.
- Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L. L. 1994. High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457.
- Breton C., Tersac M., Bervillé A. 2006. Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Plesitocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *Journal of Biogeography* **33**: 1916-1928.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 301-307.
- 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 *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 223-228.
- Corander J., Waldmann P., Sillanpää M. J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* **163**: 367-374.
- De la Rosa R., James C., Tobutt K. R. 2002. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the *Oleaceae*. *Molecular Ecology Notes* **2**: 265-267.
- El Mousadik A., Petit R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832-839.
- 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. *Genetic Resources Crop Evolution* **57**: 41–54.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Figueiral I., Terral J. F. 2002. Late Quaternary refugia of Mediterranean taxa in the Portuguese Estremadura: charcoal based palaeovegetation and climatic reconstruction. *Quaternary Science Reviews* **21**: 549–558.
- Free J. B. 1993. Insect pollination of crops. London, 2nd ed. Academic Press, str. 96–104.
- Goudet J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- Green P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin* **57**: 91–140.

- Greguraš D. 2013. Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**:1322-1332.
- Kislev M. E. 1995. Wild olive stones at submerged chalcolithic Kfar Samir, Haifa, Israel. *Journal of The Israel Prehistoric Society* **26**: 134-145.
- Klepo T., De la Rosa R., Satovic Z., León L., Belaj A. 2013. Utility of wild germplasm in olive breeding. *Scientia Horticulturae* **152**: 92-101.
- Klepo T. 2014. Genetska raznolikost kultiviranih i divljih maslina (*Olea europea* L.) u Hrvatskoj. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Klepo T., Toumi A., De La Rosa R., León L., Belaj A. 2014. Agronomic evaluation of seedlings obtained from crosses between the main Spanish olive cultivar ‘Picual’ and two wild olive trees”. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **89**: 508-512.
- Liu K. J., Muse S. V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* **21**: 2128-2129.
- 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* **92**: 343-351.
- Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza L. L. 1997. MICROSAT. A Computer Program for Calculating Various Statistics on Microsatellite Allele Data. ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA
- Moxon E. R., Wills C. 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution?. *Scientific American* **280**: 72-77.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Radosavljević I. 2012. Izolacija i karakterizacija mikrosatelitnih biljega ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.

Sefc K. M., Lopes M. S., Mendonca D., Rodrigues dos Santos M., Laimer da Câmara Machado M., Da Câmara Machado A. 2000. Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* **9**: 1171-1173.

Škarica B., Žužić I., Bonifačić M. 1996. Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj. Rijeka, Tipograf d.d., str. 33-35.

Weir B.S., Cockerham A. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.05.1983. godine u Zagrebu. Školovanje sam započela 1991. godine u Osnovnoj školi Augusta Šenoje u Zagrebu. Kroz sve razrede osnovnoškolskog obrazovanja ostvarujem odličan uspjeh.

Godine 1998., upisujem XVI. Gimnaziju u Zagrebu; jezičnog usmjerenja. Na temelju odličnog uspjeha tijekom sve četiri godina srednje škole, bila sam oslobođena polaganja završnog ispita-mature te stekla srednju školsku spremu; profil: administrativni djelatnik.

Na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, upisala sam se 2002. godine izvršavajući obveze redovnog studenta, istovremeno radeći i financirajući sve troškove fakultetskog obrazovanja.