

GENOTIPSKA RAZNOLIKOST DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.) U DIJELU PRIRODNE RASPROSTRANJENOSTI U HRVATSKOJ

GENOTYPIC DIVERSITY OF WILD CHERRY (*Prunus avium* L.)
IN THE PART OF ITS NATURAL DISTRIBUTION IN CROATIA

Olivera TANČEVA CRMARIĆ¹, Snježana ŠTAMBUK², Zlatko ŠATOVIĆ³, Davorin KAJBA⁴

SAŽETAK: Klonski materijal za istraživanje genotipske raznolikosti divlje trešnje korišten je iz klonske sjemenske plantaže (Šumarija Kutina), a činila su ga 24 selekcionirana plus stabla iz područja sjeverozapadne Hrvatske. Klonovi su analizirani pomoću 15 odabranih mikrosatelitnih DNK biljega (SSR), koji su odabrani od organizacije ECPGR. Otkriveno je bogatstvo alelnih varijacija kod SSR lokusa, a utvrđen visok stupanj polimorfizma potvrdio je postojanje ne samo opsežne morfološke, već i vrlo značajne genetske raznolikosti. Na temelju udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) izračunata je prosječna genetska udaljenost od 0.573. Najmanja genetska udaljenost ($D_{PSAM} = 0.100$) zabilježena je između genotipova 'KP2' i 'KP5' (Kloštar Podravski, regija Koprivnica), koji su se podudarali u 27 od 30 alela, dok je najveća genetska udaljenost ($D_{PSAM} = 0.933$) zabilježena između genotipova 'Đu2' (Đulovac, regija Bjelovar) i 'L3' (Lipovljani, regija Zagreb) koji su se razlikovali u 28 od 30 alela. Matrica genetske udaljenosti, temeljena na udjelu zajedničkih alela (D_{PSAM}), nije utvrdila jasno svrstavanje jedinki divlje trešnje s obzirom na njihovo porijeklo, odnosno regiju (Koprivnica, Bjelovar, Zagreb). Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđeno je da je znatno veći postotak (95.88 %) ukupne mikrosatelitne raznolikosti uzrokovan razlikama između jedinki unutar regija, od onog uzrokovanog razlikama između istraživanih regija (4.12 %). ϕ – statistika je iznosila 0.041 i bila je visokosignifikantna ($P < 0.01$) što ukazuje na postojanje određene regionalne strukturiranosti genetske raznolikosti, a prikazana je osima faktorijalne analize korespondencije (FCA). Prva os objašnjava 63.76 % ukupne inercije, i razdvojila je jedinke iz regije Zagreb od jedinki iz regije Bjelovar i Koprivnica, dok je druga os sa 36.24 % razdvojila jedinke iz regije Bjelovar od onih iz regije Koprivnica.

Ključne riječi: *Prunus avium* L., mikrosatelitni biljezi SSR, genetska raznolikost.

UVOD – Introduction

Divlja trešnja (*Prunus avium* L.) potječe iz Europe gdje raste u prekinutom arealu na šumskim padinama južne, središnje i zapadne Europe. Općenito je to rijetka

plemenita vrsta iz mješovitih šuma, a obitava u prirodnim šumskim populacijama ograničene veličine u većini europskih zemalja. Znanje o autohtonom porijeklu divlje trešnje te njezina rasprostranjenost nikako nije dovoljna kako bi se omogućilo očuvanje tih autohtonih grupa i individualnih stabala. Osim šumske trešnje postoje i udomaćeni oblici poznati kao slatka trešnja koji su već stoljećima izvor poželjne ljudske prehrane, te se zbog toga kultiviraju od davnih vremena. Ova se vrsta u prošlosti ekstenzivno sadila, međutim često se posljed-

¹ Dr. sc. Olivera Tančeva Crmarić, Vitroplant d.o.o., S. Radića 38, 21 210 Solin

² Dr. sc. Snježana Štambuk, Sveučilišni studijski centar za forenzične znanosti, R. Boškovića 31, 21 000 Split

³ Prof. dr. sc. Zlatko Šatović, Agronomski fakultet, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb

⁴ Prof. dr. sc. Davorin Kajba, Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb, e-mail: davorin.kajba@zg.t-com.hr

njih godina javlja nedostatak sjemena i sadnica kao ograničavajući čimbenik za veći uzgoj. Zbog visoko kvalitetnog drva, kao i zbog kraće ophodnje, ona je vrlo interesantna vrsta za pošumljavanje rubnih obradivih površina, te istovremeno ima velik potencijal primjene, kako u državnim tako i u privatnim šumama niskog i srednjeg uzgojnog oblika. Može se koristiti i pri popunjavanju u oplodnim sječama, a pogodna je za osnivanje šumskih kultura na napuštenim poljoprivrednim površinama, livadama, vinogradima i voćnjacima.

Sveobuhvatna europska istraživanja varijabilnosti divlje trešnje kroz testove provenijencija nisu još provedena, dok su dosadašnji rezultati najčešće dobiveni samo iz pojedinih regionalnih provenijencija/potomstava i pokazuju priličnu varijabilnost morfoloških i fenoloških značajki. Rezultati dosadašnjih istraživanja provedenih uglavnom na regionalnoj razini ukazuju na veliku raznolikost morfoloških i fenoloških svojstava divlje trešnje (Santi i Lemoine 1990, Weiser 1996, Meier-Dinkel i sur. 1997, Kleinschmit i sur. 1999, Kleinschmit i sur. 2003, Kitin i sur. 2005).

Velik je broj istraživanja proveden u svrhu utvrđivanja genetskih odnosa između slatke trešnje i divlje trešnje (Archese i sur. 2007, Guarino i sur. 2009, Jing-Yong i sur. 2009), te identifikacije kultivara slatke trešnje (Gerlach i Stosser 1998, Boritzki i sur. 2000, Aradhya i sur. 2004, Ducci i Santi 2004, Turkec i sur. 2005).

Mikrosatelitni biljezi razvijeni za breskvu i ostale vrste porodice *Rosaceae* uspješno se koriste i u analizi genetske raznolikosti divlje trešnje (Cipriani i sur. 1999, Testolin i sur. 2000, Downey i Iezzoni 2000, Dirlewanger i sur. 2002, Russell 2003, Clark i Tobutt 2003, Schueler i sur. 2003, Vaughan i Russel 2004, Wunsch i Hormaza 2004).

Organizacija ECPGR (Europski program suradnje u svezi biljnih genetskih izvora) dala je preporuke za korištenje 15 mikrosatelitnih markera s kojima je napravljena genotipizacija plus stabala divlje trešnje i u ovim istraživanjima. Tako su istraživanja divlje trešnje početkom ovog stoljeća bila orijentirana na određivanje efektivnih markera za SSR analizu divlje trešnje. Mikrosatelitni markeri biljezi predstavljaju iznimno dobre cjelokupne mjere za određivanje stupnja neutralne genetske raznolikosti koja je prisutna u populaciji. Uz to što su mutacijske stope visoke u mikrosatelitnim regijama, vjerojatnost je da visoka alelna raznolikost indicira visok stupanj opće genetske varijacije. Visoka pak neutralna varijabilnost mogla bi biti pokazatelj za potencijalno signifikantnu adaptivnu varijabilnost, dok je

broj mikrosatelitnih lokusa dostupnih za rod *Prunus* povećan (Amprimo 1997, Ballian 2002, Struss i sur. 2003, Wunsch i Hormaza 2004, Stoechel i sur. 2006, Lācis 2010, Turkoglu i sur. 2010, Ercisli i sur. 2011).

Postojeći podaci iz različitih izvora mikrosatelitnih početnica mogu se usporediti, pa će imati vrijednost i za očuvanje genetske raznolikosti divlje trešnje u europskom programu očuvanja šumskih vrsta drveća (EUFORGEN), kao i nekih drugih plemenitih listača u Hrvatskoj (Zebec i sur. 2010). S ciljem omogućavanja uspoređivanja genetske raznolikosti klonova između uspostavljenih kolekcija divlje trešnje u Europi, ali i zbog cijelokupnih podataka za rodove *Prunus*, *Malus* i *Pyrus*, 2006. godine osnovan je ECPGR koji je dao preporuke za standardizirani set mikrosatelitnih biljega za fingerprinting odabranih “plus” klonova u osnovanim sjemenskim plantažama.

Očuvanje genetske strukture divlje trešnje (*Prunus avium* L.) i korištenje metoda oplemenjivanja predstavljaju osnovu održavanja njenog evolucijski stvorenog adaptacijskog potencijala. Istraživanjem genetske raznolikosti i genetske strukture uporabom molekularnih biljega za divlju trešnju mora se intenzivirati u suradnji s drugim europskim zemljama. Uspostava klonske kolekcije i informacije o takvom materijalu olakšala bi očuvanje i razmnožavanje, a vrijedne bi klonove trebalo uvesti u klonske plantaže.

Istraživanja populacijske strukture kao i genetske raznolikosti, prijeko su potrebne jer omogućavaju kvalitetno očuvanje i određuju strategiju upravljanja genetskim resursima divlje trešnje. Pod oplemenjivanjem divlje trešnje podrazumijevamo selekciju najkvalitetnijih stabala prema fenotipskim svojstvima, osnivanje klonskih sjemenskih plantaža odabranih genotipova, te naknadno povećanje genetske dobiti s odabranim željenim svojstvima kroz klonske testove, testove potomstva i sekundarnu selekciju (Pavelić 2006, Kajba i sur. 2006, Tančeva Crmarić 2011).

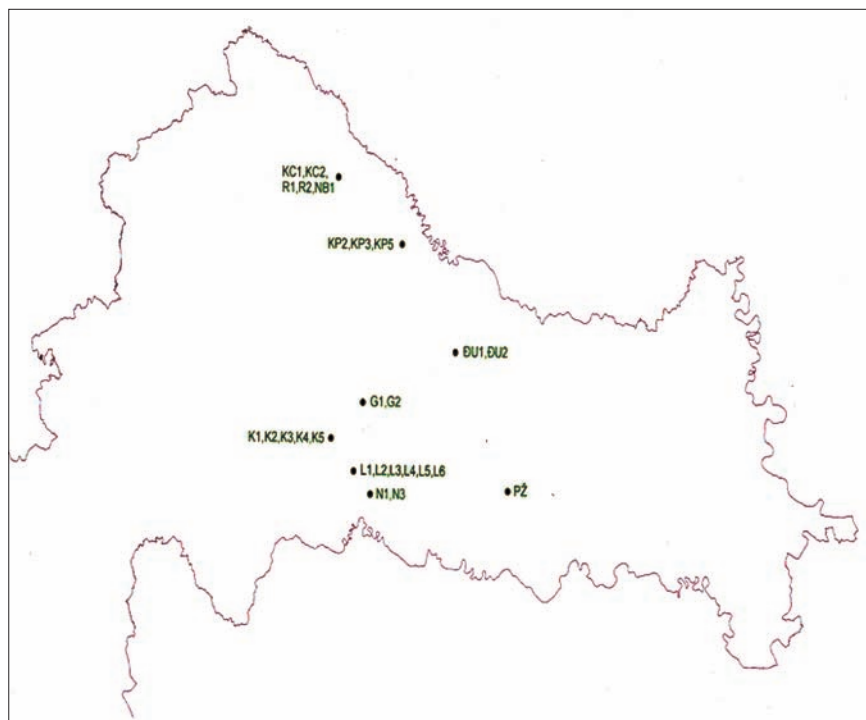
Očuvanje genetske strukture divlje trešnje (*Prunus avium* L.) i korištenje metoda oplemenjivanja predstavljaju osnovu održavanja njenog evolucijski stvorenog adaptacijskog potencijala. Istraživanja genetske varijabilnosti i njezine genetske strukture, uporabom molekularnih biljega, intenzivirani su u većini europskih zemalja, dok se osnivanjem klonskih kolekcija i informacijama o takvom materijalu olakšava njezino očuvanje i razmnožavanje, a superiorniji klonovi uključuju se u klonske sjemenske plantaže.

MATERIJAL I METODE RADA – Material and methods

Klonski materijal korišten za istraživanje genotipske raznolikosti divlje trešnje uziman je iz klonske sjemenske plantaže, koja je osnovana 2001. godine na području

Šumarije Kutina, UŠP Zagreb. Istraživana 24 genotipa predstavljali su selekcionirana plus stabla iz područja sjeverozapadne Hrvatske. Stabla su bila starosti od 50 do

80 godina, a po svojim fenotipskim karakteristikama i objektivnom kriteriju selekcije odgovarala su plus stablima. Po dva stabla potječu s područja Šumarije Đulovac ('ĐU 1', 'ĐU 2'), Šumarije Novska ('N 1', 'N 3') i Šumarije Garešnice ('G 1' i 'G 2'), iz Šumarije Kloštar Podravski su tri stabla ('KP 2', 'KP 3', 'KP 5'), iz Šumarije Koprivnica četiri stabla ('KC 1', 'KC 2', 'R 1', 'R 2'), Šumarija Lipovljani zastupljena je sa šest stabala ('L 1', 'L 2', 'L 3', 'L 4', 'L 5', 'L 6'), iz Šumarije Kutina uključeno je pet stabala ('K 1', 'K 2', 'K 3', 'K 4', 'K 5'). Prostorni raspored selekcioniranih stabala u području rasprostranjenja prikazan je na slici 1. Navedeni autohtoni klonovi divlje trešnje uvedeni su u proizvodnju *in vitro*, a za analizu DNA uzeta je po jedna nakupina umnoženih biljčica iz faze multiplikacije od svakog klona. Izolacija



Slika 1. Rasprostranjenost i položaj istraživanih klonova divlje trešnje
Figure 1. Distribution and location of the selected wild cherry clones

sveukupne stanične DNA vršena je tijekom faze mikro-razmnožavanja sa po jednom nakupinom za 24 klona.

Postupak izolacije ukupne DNA iz nakupina mikro-biljčica bio je prilagođen postupak o izolaciji ukupne DNA (Štambuk i sur. 2007). Određivanje količine

DNA određen je pomoću spektrometra (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech (Biochorn) Ltd. Cambridge, UK).

Svih 24 klonova divlje trešnje analizirano je pomoću 15 odabranih mikrosatelitnih biljega prikazanih u tablici 1.

Tablica 1. Duljine alela (pb), broj alela (N_a), broj genotipova (N_g), zapažena (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_e), te Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) 15 mikrosatelitnih biljega analiziranih u skupini od 24 klonova divlje trešnje (*Prunus avium* L.)

Table 1. Allele lengths (bp), number of alleles (N_a), number of genotypes (N_g), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), and Polymorphic Information Content (PIC) for 15 microsatellite markers analysed in 24 wild cherry (*Prunus avium* L.) clones

Biljeg / Marker	Duljina alela (pb) / Allele lengths (bp)	N_a	N_g	H_o	H_e	PIC
EMPA002	106, 108	2	3	0.625	0.500	0.371
EMPA004	182, 184, 188, 190, 192, 194, 196	7	11	0.625	0.758	0.698
EMPA005	145, 230, 234, 237, 240, 241, 243, 245, 247, 252, 254	11	12	0.875	0.767	0.722
EMPA015	213, 215, 217, 221, 223, 225, 227, 240, 250	9	12	0.667	0.788	0.734
EMPA017	223, 234, 238, 240, 242	5	5	0.417	0.365	0.340
EMPA018	83, 99, 100, 103, 105, 111, 113	7	10	0.833	0.739	0.683
EMPAS10	149, 151, 153, 157, 159, 163, 167, 175, 185	9	12	0.750	0.733	0.675
EMPAS11	65, 75, 86, 104	4	7	0.375	0.517	0.456
EMPAS12	123, 137, 139, 145, 147	5	10	0.708	0.763	0.700
EMPAS14	198, 200, 211	3	5	0.333	0.383	0.336
EMPASO1	225, 230, 232, 234, 235, 236, 240	7	10	0.708	0.697	0.638
EMPASO2	132, 135, 139, 141, 144, 146, 148	7	14	0.750	0.813	0.764
EMPASO6	203, 205, 207, 209, 215, 221, 223, 227	8	13	0.542	0.819	0.767
PCeGA	129, 133, 135, 141, 143, 152, 154, 156, 160, 169	10	12	1.000	0.833	0.798
UDPA	118, 120, 122, 124, 126, 132	6	10	0.708	0.728	0.659
Prosjeak / Average		6.667	9.733	0.661	0.680	0.623
Minimum / Minimum		2	3	0.333	0.365	0.336
Maksimum / Maximum		11	14	1.000	0.833	0.798

Ti su biljezi odabrani od organizacije ECPGR po načelima dva mikrosatelitna biljega po kromosomu za rod *Prunus* i bazirani na brojnim mjerilima: publicirani su i slobodno dostupni; razvijeni su za *Prunus avium* (isključujući UDPA 98-412 i PceGA34); imaju jednostavan model amplifikacije, jedan do dva alela po diploidu; polimorfni su sa visokim PIC (Informacijski sadržaj polimorfizma) i DP vrijednostima; odsustvo null alela; distribuirani su kroz genom, nisu strogo vezani i imaju mogućnost za multiplex istraživanja (<http://www.ecpgr.cgiar.org/networks/fruit/prunus.html>).

Lančana reakcija polimerazom kao tehnika molekularne biologije koristi se za umnožavanje točno određene dijela DNA. Za izvođenje ove reakcije korišten je uređaj GeneAmp. PCR System 9700 koji omogućava zagrijavanje i hlađenje reakcijske otopine na određenim temperaturama u određeno vrijeme.

Produkti PCR analizirani su u automatskom kapilarnom sekvencioneru (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Software v. 3.2., Applied Biosystems) koji zahtijeva fluorescentno označene primere. Kapilare u polju istosmjernje struje omogućavaju razdvajanje DNA fragmenata prema veličini. Detekcija DNA fragmenata bazira se na karakteristici da specijalne fluorescentne boje osvijetljene laserom emitiraju svjetlost. Sekvencioner može detektirati istovremeno pet boja (plavu, zelenu, crvenu, žutu i narančastu). Narančasta boja se koristi za interni standard (upotrebom Genescan 500 Liz internal size standard – Applied Biosystems) poznatih veličina fragmenata, a kojim se softverski određivala duljina ostalih fragmenata.

Raznolikost mikrosatelitnih biljega analizirana je na temelju izračuna ukupnog broja alela po biljegu (N_a), ukupnog broja genotipova po biljegu (N_g), zapažene heterozigotnosti (H_o), očekivane heterozigotnosti ili genske raznolikosti (H_e), te Informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC). Izračuni navedenih parametara izračunati su pomoću računalnih programa PowerMarker V3.23 (Liu, 2002), FSTAT v. 2.9.3.2 programme package (Goudet 1995, 2002) i MICROSAT (Minch i sur. 1997).

Ishodišna matrica umnoženih fragmenata 15 mikrosatelitnih biljega korištena je u izračunavanju matrice

genetske udaljenosti na temelju udjela zajedničkih alela (*Proportion of Shared Alleles Distance; D_{PSAM}*) (Bowcock i sur. 1994). Dobivena matrica poslužila je za izradu stabla metodom sparivanja susjeda (*Neighbor-Joining; NJ*) (Saitou i Nei 1987).

Računalni program MICROSAT korišten je za izračun genetske udaljenosti na temelju udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) kao i za izradu 1,000 pseudoponaavljanja *bootstrap* uz izračun pripadajućih matrica genetske udaljenosti. Izrada stabla *NJ* provedena je pomoću računalnog programa NEIGHBOR programskog paketa PHYLIP (Felsenstein 2002). Vrijednosti *bootstrap* izračunate su pomoću računalnog programa CONSENSE (PHYLIP).

U svrhu grafičkog prikaza odnosa između analiziranih genotipova provedena je faktorijalna analiza korespondencije (*Factorial Correspondence Analysis; FCA*). FCA je multivarijatna metoda koja se koristi u svrhu sažimanja informacija i prikaza odnosa između opažaja (jedinki) na temelju simultane analize više kvalitativnih svojstava (biljega). FCA je slična Analizi glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis; PCA*) pri čemu se PCA koristi u slučaju kvantitativnih svojstava, dok se FCA temelji na tablicama kontingencije nastalih unakrsnim tabeliranjem (*cross-tabulation*). FCA je provedena pomoću programa Genetix 4.05 (Belkhir i sur. 2004) uzimajući u obzir regionalnu pripadnost jedinki u analizi.

Analizom molekularne varijance (*Analysis of Molecular Variance; AMOVA*; Excoffier i sur. 1992) raščlanjena je ukupna varijanca u sastavnice varijance: sastavnicu uzrokovanu razlikama između regija (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb), te sastavnicu uzrokovanu razlikama između jedinki unutar regija. Analiza je provedena uz pomoć programa Arlequin ver. 2.000 (Schneider i sur., 2000), a signifikantnost ϕ vrijednosti izračunata je na temelju 10 000 permutacija. Pojedinačnim analizama izračunate su ϕ_{ST} vrijednosti između svih parova regija uz izračun njihovih signifikantnosti. Tako je dobivena matrica ϕ_{ST} vrijednosti na temelju koje je moguće procijeniti udaljenost između analiziranih regija.

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA – Results of research and discussion

Procjena genetske raznolikosti – Estimation of genetic variability

Istraživana fenotipski odabrana 24 plus stabla divlje trešnje pripadaju trima sjemenskim regijama, od toga regiji Zagreb pripadaju 13, regiji Bjelovar četiri i regiji Koprivnica sedam genotipova. Utvrđeno je bogatstvo alelnih varijacija kod SSR lokusa, te je potvrđena cjelokupna značajna genetička raznolikost istraživanih klonova divlje trešnje. Unutar navedenih 15 lokusa, u ovom istraživanju detektirano je 100 različitih alela

kod 24 istraživanih klonova divlje trešnje. Odabrani SSR biljezi u genotipizaciji klonova pokazali su se kao jako informativni materijal. U dosadašnjim istraživanjima SSR biljezi korišteni su za fingerprinting, mapiranje, kao i za određivanje protoka gena (Vaughan i Russell 2004, Clark i sur. 2009).

Od odabranih 15 biljega njih 14 je pokazalo 100 %-tnu amplifikaciju kod svih 24 odabranih klonova divlje treš-

nje, dok mikrosatelitni biljeg EMPA015 nije pokazao amplifikaciju kod klonova 'N1', 'K1' i 'L2'. Tako visoki stupanj amplifikacije omogućio je korištenje svih 15 biljega u određivanju polimorfizma i daljnjih genetskih analiza i potvrdio njihov izbor napravljen od strane ECPGR. Ohta i sur. (2005) u Japanu su koristili 85 SSR biljega za određivanje genetske varijacije 144 jedinki *Prunus cerasus*, od kojih je 25 pokazalo amplifikaciju kod svih jedinki, ali 25 nije davalo produkt ni kod jedne jedinke. PceGA34 korišten u ovom istraživanju razvijen je za *P. cerasus* "Napoleon" (Downy i Lezzi 2000). Upotrebljen je kod breskve gdje je razvio alelnu duljinu u rasponu od 140 do 148 pb (Arzana i sur. 2003). U genotipizaciji divlje trešnje diljem Hrvatske duljina alela u pb za biljeg PceGA34 se kretala u rasponu 129–169, a broj alela N_a bio je 10.

Clark i Tobutt (2003) razvili su primere (početnice) za 21 mikrosatelitni lokus izoliranih iz bogatstva *Prunus avium* 'Napoleon', a Vaughan i Russel (2004) karakterizirali su liniju SSR primera za 14 mikrosatelita ili SSR lokusa identificiranih za *P. avium* genomske DNA zbirke EMPaS (01–18), te izvijestili o pouzdanoj seriji SSR biljega za divlju trešnju. Sedam polimorfnih lokusa identificiranih u tom istraživanju uneseni su u genomsku mapu divlje trešnje, i korišteni su i u ovom istraživanju. Duljina istraživanih alela u Hrvatskoj kolekciji trešnje (24 klonova) za tih 7 lokusa iznosila je za biljeg EMPAS01 od 225 do 240 kod sveukupno 7 alela, za EMPAS02 od 132 do 148 kod 7 alela, za EMPAS06 od 203 do 227 kod 8 alela, za EMPAS10 od 149 do 185 za 9 alela, za EMPAS11 od 65 do 104 kod 4 alela, za EMPAS12 od 123 do 147 kod 5 alela i za EMPAS14 od 198 do 211 kod 3 alela (Tablica 1).

Ukupni broj alela za lokus UDPA 96-001 bio je 11 za trešnje sa srednjom vrijednošću 6,1, dok je za breskvu, nektarinu i slatku trešnju iznosio 2 – 6 alela (Cipriani i sur. 1999, Testolin i sur. 2000, Schueler i sur. 2003), što nam sugerira da jedinke divlje trešnje imaju visok stupanj polimorfizma, a što je sukladno našem istraživanju. Mikrosatelitni biljezi su u novije vrijeme razvijeni i specijalno za vrstu *P. avium* (Schueler i sur. 2003) ili su pak razvijeni za ostale *Prunus* vrste, ali se upotrebljavaju kod *Prunus avium* (Wunsch i Hormaza 2004). Radi se o kodominantnim biljezima koji se mogu koristiti za istraživanje genetske raznovrsnosti kod specifičnih komponenti genoma (Tavaud i sur. 2004). Genska raznolikost (H_E) za *Prunus avium* u njihovim je istraživanjima bila 0,319 u usporedbi s H_E koju smo dobili u našem istraživanju, čija vrijednost iznosi 0,680. Turkec i sur. (2005) upotrebljavali su mikrosatelitne sekvence za kloroplastnu i za nuklearnu DNA s ciljem utvrđivanja razlika, genetskog polimorfizma europske i turske trešnje kako bi pokrenuli model oplemenjivanja kultivirane i divlje trešnje. Varijabilnost mikrosatelitne DNA

u populacijama divlje trešnje iz središnje Bosne, kao i korelacijski odnosi cvijeta i sjemena divlje trešnje istraživali su (Ballian 2004, Ballian i Čabaravdić 2007). Pomoću sedam početnica RAPD Moreno i Trujillo (2005) u Španjolskoj identificirali su kultivare divlje trešnje i formirali dendrogram pomoću kojeg je uočena korelacija kod grupiranja trešnjinih genotipova, kao i blizina karakterističnih genotipova te su tako poduprli hipotezu o autohtonom porijeklu istih. Vaughan i sur. (2007) odredili su pomoću relativnih informacija o svakom SSR lokusu razlike između dvije populacije divlje trešnje (uzgajane i negospodarene), te su odredili vrijednost H_O od 0,717 i 0,723 s jednako ujednačenom vrijednosti H_E 0,663 i 0,667.

Koristeći se odabranim biljezima utvrđeno je ukupno 100 alela, od kojih je najmanji broj od dva polimorfna alela pokazao biljeg EMPA002, a najveći broj 11 alela biljeg EMPA005. Prosječni broj alela iznosio je 6,667 po mikrosatelitnom biljegu. Do sada ne postoje istovjetna istraživanja genetske raznolikosti divlje trešnje koja su koristila ovaj preporučeni mikrosatelitni set primera. Većina do sada vršenih istraživanja koristila su ih djelomično i uglavnom u kombinaciji s drugim mikrosatelitnim biljezima. Guarino i sur. (2009) istraživali su pomoću 28 mikrosatelitnih lokusa, osim kultivare slatke trešnje i populacije divlje trešnje iz pet prirodnih sastojina: Alto Garda, Casentinesi i Mugello (Italija); te po jedna iz Slovenije (Slavnik) i Hrvatske (Medvednica). U istraživanjima su dobili po 6,5 alela po lokusu. Minimalan broj od dva alela bio je za manje polimorfni lokus EMPA006, dok je maksimum od 14 alela davao polimorfni lokus EMPaS10 i EMPA019. Prema njihovom zaključivanju broj alela je ovisio o karakteristikama mikrosatelitnog ponavljanja.

Izravnu povezanost između broja alela i prosječnog broja ponavljajućeg motiva biljega također je zapazio Weber (1990).

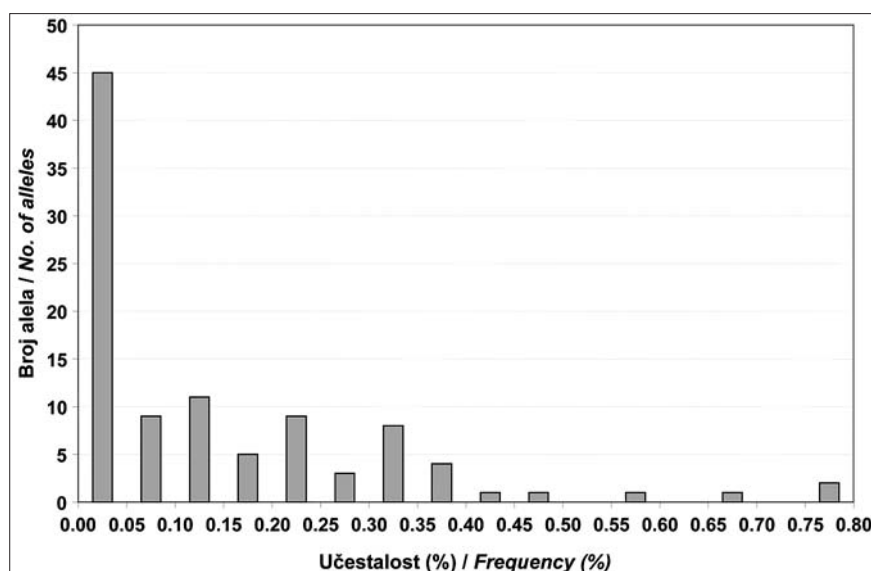
Broj alela kod breskve koje je Testolin i sur. (2000) detektirao kretao se od 2 do 8 s srednjom vrijednosti 4,5 alela po lokusu. Kod domaće trešnje te su vrijednosti bile manje i iznosile su od 1 do 6 sa srednjom vrijednosti 2,8 alela po lokusu. Wunsch i Hormaza (2004) su kod kultivirane trešnje pomoću tri para mikrosatelitnih primera, koja su se amplificirali kod svih analiziranih genotipova, dobili od dva do sedam alela po lokusu. Heterozigotnost je bila u području 0,04 do 0,94, a srednja vrijednost 0,49.

U tablici 1 prikazani su osnovni deskriptivni parametri mikrosatelitnih biljega. Broj alela (N_a) po mikrosatelitnim biljegu kretao se od dva (EMPA002) do 11 (EMPA005) s prosječnom vrijednošću od 6,667, dok je broj uočenih genotipa bio od 2 (EMPA002) do 14 (EMPAS02) s prosječnom vrijednošću od 9,733. Zapažena heterozigotnost (H_O) se kretala od 0,333

(EMPAS14) do 1,000 (PCeGA) s prosječnom vrijednošću od 0,661 ukazujući na visok udio heterozigotnih genotipova kod divlje trešnje. Viša vrijednost H_o od 0,8 je utvrđena kod mikrosatelitnih biljega EMPA005 (0,875) i EMPA018 (0,833). Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) se kretao od 0,336 (EMPAS14) do 0,798 (PCeGA) s prosječnom vrijednošću od 0,623. Samo su tri mikrosatelitna biljega imali vrijednost PIC veću od 0,75. Očekivanu heterozigotnost od 0,56 dobili su Guarino i sur. (2009). Kod ostalih *Prunus* vrsta dobiveni su rezultati za H_E kod breskve od 0,47 (Testolin i sur. 2000) i 0,45 (Sosinski i sur. 2000), a kod marelice 0,51 (Hormaza 2002). Kod kultivirane trešnje detektiran je nizak stupanj polimorfizma uporabom RAPD biljega (Stockinger i sur. 1996, Gerlach i Stosser 1998), kao i uporabom izoenzima (Bošković i Tobutt 1997, Beaver i sur. 1995). U ovim istraživanjima nizak stupanj polimorfizma s H_o od 0,5 dobiven je samo za mikrosatelitne biljega EMPA017 (0,417), EMPAS11 (0,375) i EMPAS14 (0,333) te za EMPAS06 (0,542). Istraživači koji rade na očuvanju genetskih resursa i šumari posljednjih godina intenzivno koriste brojnost alela i visoku heterozigotnost molekularnih biljega za većinu šumskih vrsta zbog genotipizacije istih, ali i fingerprintinga sadnog materijala (Pijut i sur. 2007). Vrlo je bitna uporaba molekularnih biljega za potrebe pravilnog gospodarenja šumama te certificiranje i karakterizaciju porijekla sjemena (De Cuyper i sur. 2005).

Na slici 2. prikazan je histogram učestalosti alela analiziranih mikrosatelitnih biljega. Od ukupno 100 alela, 45 ih je imalo učestalost manju od 0,05 (5%), a čak 31 alel je zabilježen samo u jednoj jedinki. Najučestaliji aleli bili su EMPA017/240 (0,791) i EMPAS14 (0,771)

U tablici 2. prikazani su osnovni parametri genetske raznolikosti analiziranih regija (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb). Prosječan broj alela (N_{av}) bio je najveći u regiji Zagreb (5,533), a najmanji u regiji Bjelovar (3,467). Procjenom alelnog bogatstva utvrđeno je da je prosječan broj alela znatno ovisio o broju uzorkovanih genotipova po regiji, tako da se nakon korekcije na veličinu uzorka, regije nisu znatno razlikovale po alelnom bogatstvu. Najveći broj jedinstvenih alela (29) zabilježen je u regiji Zagreb. Vrijednosti



Slika 2. Broj alela 15 mikrosatelitnih biljega u odnosu na učestalost u skupini od 24 klonova divlje trešnje

Figure 2 Number of alleles at 15 microsatellite markers in relation to its frequency as analysed in 24 wild cherry (*Prunus avium* L.) clones

zapažene i očekivane heterozigotnosti nisu se znatno razlikovale između regija. Istraživanje provedeno u njemačkim pokrajinama Roringen i Wibbecke (Höltken i Gregorius 2006) pokazala su prosječno 5,5 alela po lokusu. Wunsch i Hormaza (2004) u istraživanju 76 kultivara trešnje s 34 mikrosatelitnih para primera, koji su prethodno bila razvijena za breskvu, identificirala su 72 genotipska profila. Broj alela po lokusu je bio 3,7 dok je prosječna heterozigotnost bila 0,49.

Očekivana heterozigotnost (H_E) u ovom istraživanju po regijama je bila ujednačena i iznosila je za Bjelovar 0,667, za Koprivnicu 0,676, te najmanje za Zagreb 0,655. Veću heterozigotnost (H_E) od 0,66, pomoću sedam SSR lokusa kod trešnje, dobili su Schueler i sur. (2003), uspoređujući s dotadašnjim rezultatima kod breskve (H_E) od 0,47 (Testolin i sur. 2000) i 0,51 (Hormaza 2002), no oni su uspoređivali samo validne rezultate informativnih lokusa u njihovim proračunima. Stoeckel i sur. (2006) ukazali su na to da je divlja trešnja djelomično samoinkompatibilna šumska vrsta sa obilatom heterozigotnošću, što je slabo istraživani fenomen.

Tablica 2. Veličina uzorka (n), prosječan broj alela (N_{av}), alelna bogatstvo (N_{ar}), broj jedinstvenih alela (N_{pr}), te zapažena (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_E) klonova divlje trešnje po regijama (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb)

Table 2 Sample size (n), average number of alleles (N_{av}), allelic richness (N_{ar}), number of private alleles (N_{pr}), and observed (H_o) and expected heterozygosity (H_E) of wild cherry clones in three regions (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb)

Regija Region	n	N_{av}	N_{ar}	N_{pr}	H_o	H_E
Bjelovar	4	3.467	3.467	6	0.667	0.653
Koprivnica	7	4.133	3.493	8	0.676	0.686
Zagreb	13	5.533	3.543	29	0.655	0.655

Tablica 3. Genetske udaljenosti temeljem udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) između 24 klonova divlje trešnje dobivena analizom 15 mikrosatelitnih biljega
 Table 3 Pairwise proportion of shared allele distance (D_{PSAM}) among 24 wild cherry (*Prunus avium* L.) clones as obtained by the analysis of 15 microsatellite markers

Br. No.	Regija Region	Genotip Genotyp	Dju1	Dju2	G1	G2	KP2	KP3	KP5	KC1	KC2	R1	R2	K1	K2	K3	K4	K5	L1	L2	L3	L4	L5	L6	N1	N3	
1	Bjelovar	Dju1	0.000																								
2	Bjelovar	Dju2	0.467	0.000																							
3	Bjelovar	G1	0.733	0.600	0.000																						
4	Bjelovar	G2	0.400	0.500	0.600	0.000																					
5	Koprivnica	KP2	0.533	0.633	0.800	0.600	0.000																				
6	Koprivnica	KP3	0.367	0.567	0.667	0.433	0.500	0.000																			
7	Koprivnica	KP5	0.567	0.700	0.833	0.633	0.100	0.500	0.000																		
8	Koprivnica	KC1	0.567	0.433	0.500	0.467	0.733	0.533	0.767	0.000																	
9	Koprivnica	KC2	0.600	0.600	0.700	0.500	0.667	0.667	0.733	0.500	0.000																
10	Koprivnica	R1	0.567	0.533	0.567	0.467	0.567	0.533	0.633	0.433	0.567	0.000															
11	Koprivnica	R2	0.500	0.433	0.600	0.367	0.733	0.633	0.767	0.533	0.400	0.667	0.000														
12	Zagreb	K1	0.500	0.536	0.500	0.357	0.714	0.536	0.714	0.536	0.500	0.536	0.321	0.000													
13	Zagreb	K2	0.500	0.600	0.500	0.500	0.667	0.633	0.667	0.500	0.633	0.567	0.467	0.393	0.000												
14	Zagreb	K3	0.567	0.700	0.633	0.433	0.633	0.567	0.667	0.633	0.567	0.633	0.467	0.321	0.467	0.000											
15	Zagreb	K4	0.667	0.633	0.567	0.500	0.733	0.667	0.767	0.600	0.733	0.567	0.500	0.357	0.467	0.333	0.000										
16	Zagreb	K5	0.533	0.567	0.633	0.533	0.633	0.567	0.600	0.600	0.733	0.533	0.533	0.429	0.433	0.533	0.467	0.000									
17	Zagreb	L1	0.500	0.600	0.667	0.467	0.567	0.567	0.633	0.667	0.667	0.600	0.467	0.464	0.533	0.433	0.467	0.467	0.000								
18	Zagreb	L2	0.571	0.536	0.679	0.536	0.607	0.500	0.643	0.536	0.607	0.643	0.571	0.536	0.500	0.536	0.464	0.607	0.500	0.000							
19	Zagreb	L3	0.800	0.933	0.833	0.767	0.633	0.633	0.600	0.867	0.767	0.767	0.800	0.714	0.767	0.633	0.800	0.700	0.733	0.786	0.000						
20	Zagreb	L4	0.467	0.533	0.733	0.467	0.600	0.600	0.667	0.533	0.567	0.500	0.467	0.429	0.467	0.500	0.500	0.567	0.567	0.500	0.700	0.000					
21	Zagreb	L5	0.633	0.500	0.667	0.600	0.667	0.667	0.633	0.533	0.600	0.600	0.533	0.500	0.500	0.667	0.600	0.467	0.600	0.536	0.700	0.500	0.000				
22	Zagreb	L6	0.700	0.567	0.567	0.567	0.667	0.667	0.667	0.667	0.600	0.633	0.533	0.357	0.533	0.567	0.500	0.533	0.600	0.500	0.700	0.533	0.333	0.000			
23	Zagreb	N1	0.607	0.571	0.643	0.429	0.464	0.500	0.464	0.571	0.643	0.500	0.571	0.464	0.536	0.429	0.393	0.536	0.536	0.536	0.643	0.464	0.536	0.429	0.000		
24	Zagreb	N3	0.467	0.433	0.533	0.500	0.667	0.633	0.733	0.400	0.667	0.467	0.600	0.571	0.567	0.667	0.633	0.633	0.667	0.571	0.867	0.433	0.567	0.667	0.536	0.000	

U tri prirodne populacije divlje trešnje pomoću osam mikrosatelita, kao i biljega za samoinkompatibilnost te postavljanjem četiri hipoteze, pokušali su objasniti negativnu vrijednost koeficijenta samooplođnje (*Fis*) te zaključili da je takav rezultat predvidljiv samo za stupnjeve klonskog približavanja, pri tome se misli na vegetativno razmnožavanje korijenovih izdanaka koji rastu uz roditeljska stabla, kao i na utjecaj ljudi naknadnim širenjem takvog materijala. Produžena klonska reprodukcija može znatno utjecati na genetsku strukturu i reproduktivnost populacije divlje trešnje (Vaughan i sur. 2007).

Osim za identifikaciju elitnih stabala divlje trešnje njihova genotipizacija je bitna i za strategiju selektivnog mapiranja roda *Prunus* (Howard i sur. 2005). Naime, Vision i sur. (2000) predlažu mapiranje kroz dva stupnja, gdje se u prvom određuju okvirne mape pomoću biljega s manjom preciznošću, a u drugom stupnju se koristi podskup biljega s visokom informativnošću za biljke.

Takvo grupiranje bi trebalo smanjiti koštanje samog procesa, a dalo bi detaljne rezultate, s obzirom da se radi o brojnim svojstava divljih i kultiviranih oblika unutar ovog roda.

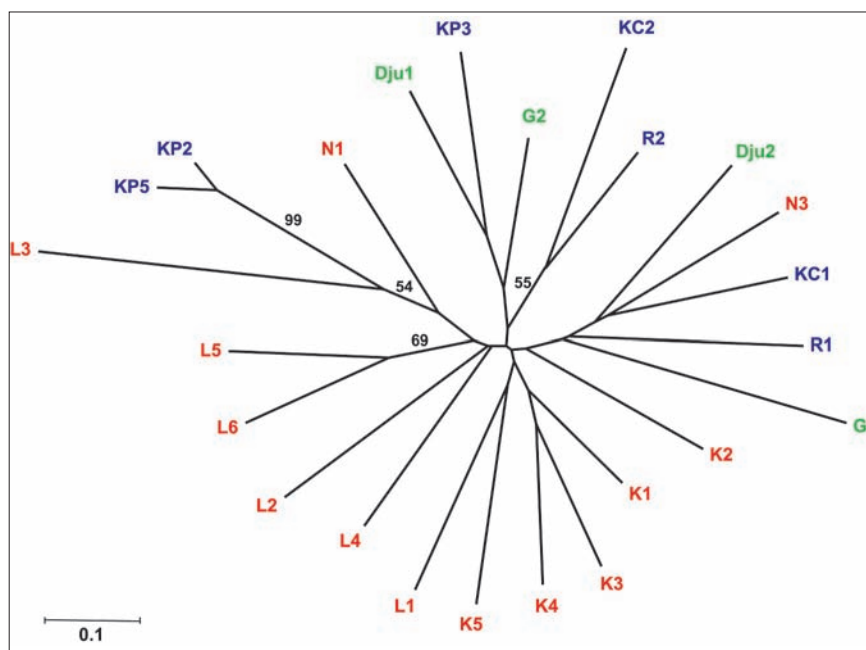
Izračun genetske udaljenosti (D_{PSAM}) između genotipova i izrada stabla*Proportion of shared allele distances (D_{PSAM}) among genotypes and neighbor-joining tree*

Prosječna genetska udaljenost izračunata na temelju udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) između 24 genotipa divlje trešnje iznosila je 0,573 (tablica 3). Najmanja je genetska udaljenost ($D_{PSAM} = 0,100$) zabilježena između genotipova KP2 i KP5 iz regije Koprivnica ($D_{PSAM} = 0,1009$ koji su se podudarali u 27 od 30 alela, dok je najveća genetska udaljenost ($D_{PSAM} = 0,933$) za-

bilježena između genotipova “Dju2” (Bjelovar) i “L3” (Zagreb) koji su se razlikovali u 28 od 30 alela. Na nezakorijenjenom stablu nastalom metodom sparivanja susjeda (*Neighbour-Joining*) nije primijećeno jasno svrstavanje jedinki s obzirom na regiju (slika 3). Vrijednosti *bootstrap* pojedinih skupina na stablu su uglavnom bile niske (<50 %).

Slika 3. Stablo nastalo metodom sparivanja susjeda (*Neighbor-Joining*) na temelju matrice genetske udaljenosti temeljem udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) između 24 klonova divlje trešnje dobivena analizom 15 mikrosatelitnih biljega. Vrijednosti pouzdanosti *bootstrap* iznad 50 % prikazane su na granama. Regije su označene bojama: Bjelovar (zeleno), Koprivnica (plavo) i Zagreb (crveno)

Figure 3 *Neighbor-joining tree based on matrix of proportion of shared allele distances (D_{PSAM}) among 24 wild cherry (*Prunus avium L.*) clones as obtained by the analysis of 15 microsatellite markers. Bootstrap support values higher than 50 % are given above the branches. Regions are indicated by colours: Bjelovar (green), Koprivnica (blue), Zagreb (red)*

**Faktorijalna analiza korespondencije (FCA)***Factorial correspondence analysis (FCA)*

Faktorijalna analiza korespondencije (FCA) napravljena pomoću programa Genetix 4,05 (Belkhir i sur. 2004), a provedena je uzimajući u obzir regionalnu pripadnost jedinki u analizi, i dala je grafički prikaz odnosa između analiziranih klonova divlje trešnje. Na slici 4. prikazana je projekcija jedinki i baricentara regija u koordi-

natnom sustavu određenom prvim dvjema osima faktorijalne analize korespondencije (FCA). Prva je os objašnjavala 63,76 % ukupne inercije, a druga 36,24 %. Prva je os razdvojila jedinke iz regije Zagreb od jedinki iz regije Bjelovar i Koprivnica, dok su se po drugoj osi razdvojile jedinke iz regije Bjelovar od onih iz regije Koprivnica.

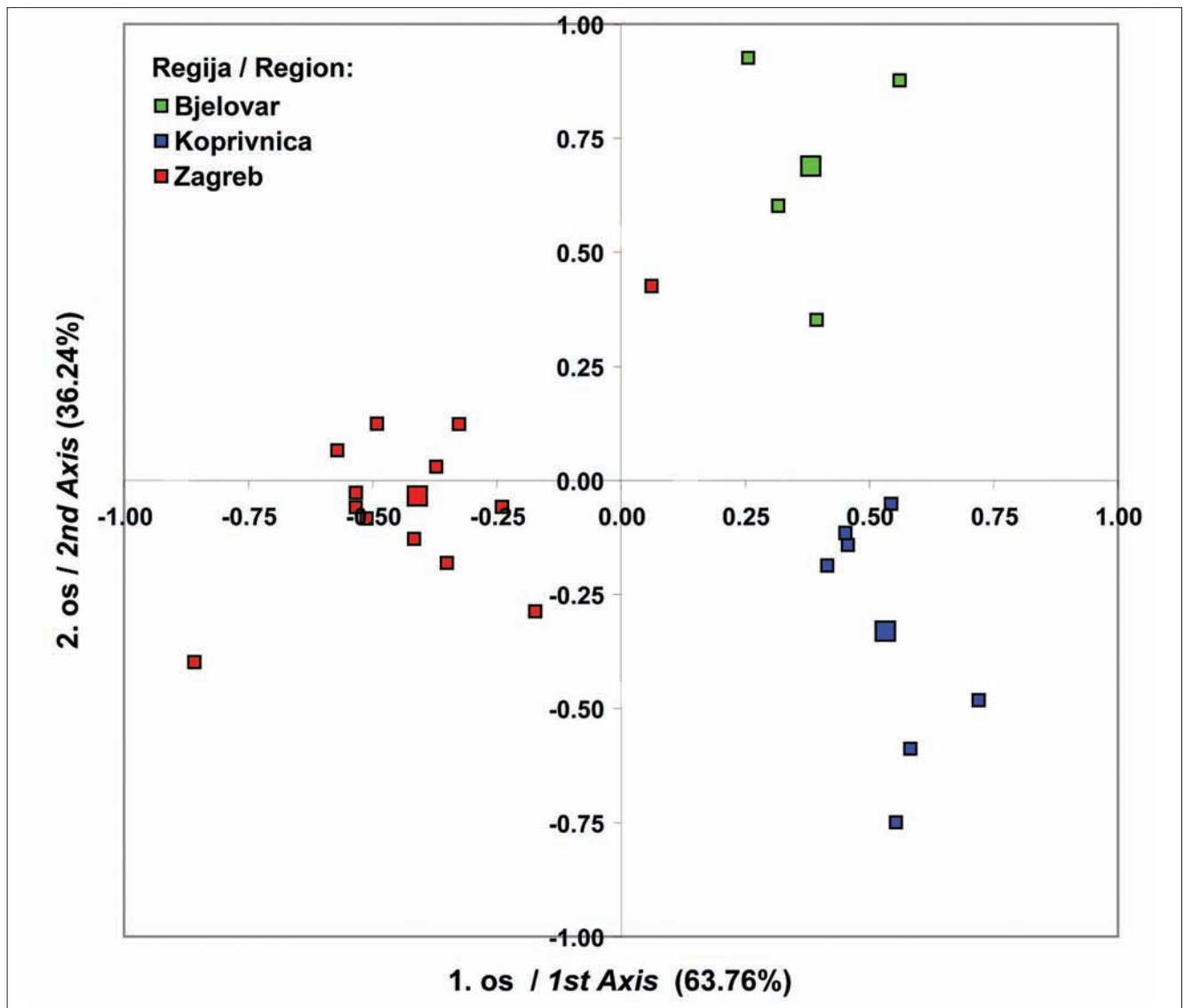
Analiza molekularne varijance (AMOVA)*Analysis of Molecular Variance (AMOVA)*

Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđeno je da je znatno veći postotak (95,88 %) ukupne mikrosatelitne raznolikosti uzrokovan razlikama između jedinki unutar regija od onog uzrokovanog razlikama između regija (4,12 %). ϕ -statistika je iznosila 0,041 i bila je visokosignifikantna ($P < 0,01$) što ukazuje na postojanje određene regionalne strukturiranosti genetske raznolikosti (tablica 4). Izračunavanjem ϕ_{ST} vrijednosti između parova regija i pripadajućih P-vrijednosti (tablica 5) utvrđeno je da ϕ_{ST} vrijednost između regije Bjelovara i Koprivnice nije bila signifikantna ($P > 0,05$), dok je između regije Bjelovar i Zagreb bila signifikantna ($0,05 < P < 0,01$), a između regije Koprivnica i Zagreb visokosignifikantna ($P < 0,01$).

Tablica 4. Raspodjela mikrosatelitne raznolikosti divlje trešnje između i unutar tri regije (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb) na temelju Analize molekularne varijance (AMOVA)

Table 4 *Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for the partitioning of microsatellite diversity of wild cherry among and within three regions (Bjelovar, Koprivnica, Zagreb)*

Regija / Region	Bjelovar	Koprivnica	Zagreb
Bjelovar		0.3856	0.0285
Koprivnica	0.0019		0.0038
Zagreb	0.0396	0.0539	



Slika 4. Prikaz 24 klonova divlje trešnje u koordinatnom sustavu određenom prvim dvjema osima faktorijalne analize korespondencije (FCA). Pojedinačni genotipovi prikazani su malim kvadratima, a baricentri regija označeni su većim kvadratima.

Figure 4 Factorial correspondence analysis (FCA) plot of 24 wild cherry (*Prunus avium* L.) clones. Each individual genotype is indicated by a small symbol, while the regional barycentres are represented by larger ones.

Tablica 5. Matrica ϕ_{ST} vrijednosti (ispod dijagonale) i pripadajuće P-vrijednosti (iznad dijagonale) između regija. P-vrijednosti su utvrđene na temelju 10,000 permutacija.

Table 5 Marix of pairwise ϕ_{ST} values among regions (lower diagonal) and corresponding P-values (upper diagonal). P-values were obtained after 10,000 permutations.

Izvor / Source	df	Sastavnice varijance / Variance components	% Ukupne varijance / % Total variance	ϕ -statistika / ϕ -statistics	$P(\phi)^1$
Između regija / Among regions	2	0.209	4.12	$\phi_{ST} = 0.041$	0.006
Unutar regija / Within regions	45	4.879	95.88		

ZAKLJUČCI – Conclusions

Istraživanjem 15 mikrosatelitnih biljega DNK (SSR) procijenjena je i potvrđena cjelokupna genetska raznolikost istraživanih klonova divlje trešnje. Otkriveno je bogatstvo alelnih varijacija kod SSR lokusa, a utvrđen visok stupanj polimorfizma potvrdio je postojanje ne

samo opsežne morfološke, već i vrlo značajne genetske raznolikosti.

Na temelju udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}), između 24 genotipova divlje trešnje, izračunata je prosječna genetska udaljenost od 0.573. Najmanja genetska udaljenost

($D_{PSAM} = 0.100$) zabilježena je između genotipova KP2 i KP5 (Kloštar Podravski, regija Koprivnica) koji su se podudarali u 27 od 30 alela, dok je najveća genetska udaljenost ($D_{PSAM} = 0.933$) zabilježena između genotipova Đu2 (Đulovac, regija Bjelovar) i L3 (Lipovljani, regija Zagreb) koji su se razlikovali u 28 od 30 alela.

Matrica genetske udaljenosti, temeljena na udjelu zajedničkih alela (D_{PSAM}), nije utvrdila jasno svrstavanje jedinki divlje trešnje s obzirom na njihovo porijeklo, odnosno regiju (Koprivnica, Bjelovar, Zagreb).

Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđeno je da je znatno veći postotak (95.88 %) ukupne

mikrosatelitne raznolikosti uzrokovan razlikama između jedinki unutar regija, od onog uzrokovanog razlikama između istraživanih regija (4.12 %). ϕ - statistika je iznosila 0.041 i bila je visokosignifikantna ($P < 0.01$) što ukazuje na postojanje određene regionalne struktuiranosti genetske raznolikosti, a prikazana je osim faktorijalne analize korespondencije (FCA). Prva os objašnjava 63.76 % ukupne inercije, i razdvojila je jedinice iz regije Zagreb od jedinki iz regije Bjelovar i Koprivnica, dok je druga os sa 36.24 % razdvojila jedinice iz regije Bjelovar od onih iz regije Koprivnica.

LITERATURA – References

- Amprimo G., 1997: Primi rilevamenti in collezioni di fenotipi superiori di *Prunus avium* e *Juglans regia*. *Annali Inst. Sper. Silvic.*, 1994–1995, 25–26: 71–79.
- Aradhya, M. K., C. Weeks, Ch. J. Simon, 2004: Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. using amplified fragment length polymorphism, *Scientia Horticulturae* 103: 131–144.
- Aranzana, M.J., A. Pineda, P. Cosson i sur., 2003: A set of simple sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 819–825.
- Archese, A., K. Tobutt, R. Raimondo, A. Motisi, A. Bošković, R.I. Clark, J.
- Ballian, D., 2002: Variability of characteristics of the wild cherry blossom (*Prunus avium* L.) in the region of central Bosnia, *Annales forestales* 25/2: 1–19, Zagreb.
- Ballian, D., A. Čabaravdić, 2007: Neki korelacijski odnosi između svojstava pupova, cvijeta i sjemena divlje trešnje (*Prunus avium* L.) iz populacije Mrkovići, No.1, 29–38.
- Ballian, D., 2004: Varijabilnost mikrosatelitne DNK u populacijama divlje trešnje (*Prunus avium* L.) iz središnje Bosne. *Šum. list* 11–12: 649–653.
- Beaver, J.A., A. F. Iezzoni, C. W. Ramm, 1995: Isozyme diversity in sour, sweet and ground cherry. *Theor. Appl. Genet* 90: 847–852.
- Belkhir, K, P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme, 1996–2001: GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université Montpellier II.
- Boritzki, M., J. Plieske, D. Struss, 2000: Cultivar identification in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using AFLP and micro-satellite markers. *Acta Hort.* 538: 505–510.
- Bošković, R., K.R. Tobutt, F.J. Nicoll, 1997: Inheritance of isoenzymes and their linkage relationships in two interspecific cherry progenies, *Euphytica* 93: 129–143.
- Bowcock, A.M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J.R. Kidd, L.L. Cavalli-Sforza, 1994: High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455–457.
- Cipriani, G., G. Lot, W.G. Huang, M.T. Marrazzo, E. Peterlunger, R. Testolin, 1999: AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*, *Theor. Appl. Genet.* 99: 65–72.
- Clark, J. B., K.R. Tobutt, 2003: Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* “Napoleon”. *Molecular Ecology Notes* 3: 578–580.
- Clark, J. B., D. J. Sargent, R. I. Bošković, A. Belaj, K. R. Tobutt, 2009: A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* “Napoleon” × *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers.
- De Cuyper, B., T. Sonneveld, K. R. Tobutt, 2005: Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology* 14: 945–955.
- Dirlewanger, E., P. Cosson, M. Tavaud, M. J. Aranzana, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arús, F. Laigret, 2002: Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica*(L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Springer-Verlag.
- Downey, S.L., A.F. Iezzoni, 2000: Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 125: 76–80.

- Ducci, F., F. Santi, 2004: The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium* L.). *Can. J. For. Res.* 27: 1998–2004.
- Ercilsi, S., G. Agar, N. Yildirim, B. Duralija, A. Vokurka, H. Karlıdag, 2011: Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. *Genetics and Molecular Research* 10 (2): 1211–1219.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, J. M. Quattro, 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131: 479–491.
- Felsenstein, J., 2000: PHYLIP 3.573 (Phylogeny inference package). Department of Genetics. University of Washington, Seattle.
- Gerlach, H.K., R. Stosser, 1998: Sweet cherry cultivar identification using RAPD-derived DNA fingerprints. *Acta Hort.* 468: 63–69
- Goudet, J., 1995: FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86: 485–486.
- Goudet, J., 2002: FSTAT: a program for Windows (95 and above) to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie, Université de Lausanne, Dorigny.
- Guarino, C., S. Santoro, L. De Simone, G. Cipriani, 2009: Source *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars, *Genome* 52: 320–337.
- Hormaza, J. I., 2002: Molecular characterisation and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 104: 321–328.
- Howad, W., T. Yamamoto, E. Dirlewanger, R. Testolin, P. Cosson, G. Cipriani, A. J. Monforte, L. Georgi, A. G. Abbott, P. Arús, 2005: Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics* 171: 1305–1309.
- Höltken, A. M., H. R. Gregorius, 2006: Detecting local establishment strategies of wild cherry (*Prunus avium* L.). *BMC Ecology*, 6: 13doi: 10.1186/1472–6785–6–13.
- Jing-Yong, Z., L. Xiu-Lan, L. Ren-Dao, C. Hong-Qiang, 2009: Relationship of Sweet Chery (*Prunus avium* L.) Based on SSR Markers. *Plant Sciences Research* 2 (1): 6–10.
- Kajba D., J. Gračan, M. Ivanković, S. Bogdan, M. Gradečki-Poštenjak, T. Littvay, I. Katičić, 2006: Očuvanje genofonda šumskih vrsta drveća u Hrvatskoj, *Glas. šum. pokuse*, pos. izd. 5: 235–249.
- Kitin P., I. Iliev, A. Scaltsoyiannes, C. Nellas, A. Rubos, R. Funada, 2005: A comparative histological study between normal and fasciated shoots of *Prunus avium* generated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 141–150.
- Kleinschmit, J., R. Stephan, I. Wagner, 2003: European Forest Genetic resources Programme: Wild Fruit Trees Genetic Resources Conservation Strategy. <http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/networks/>.
- Kleinschmit, J., B. R. Stephan, F. Ducci, P. Rotach, C. Matyas, 1999: Inventories of Noble Hardwoods genetic resources: basic requirements. Pp.92–97 in Noble Hardwoods Network. Report of the Third Meeting, 13–16 June 1998, Sagadi, Estonia. IPGRI.
- Lācis, G., 2010: Characterisation of the Latvian and Swedish Sweet and Sour Cherry Genetic Resources *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae* 89.
- Liu, J., 2002: Powermarker - A Powerful Software for Marker Data Analysis. North Carolina State University Bioinformatics Research Center, Raleigh NC, (www.powermarker.net)
- Meier-Dinkel, A., J. Svoboda, J. Kleinschmit, 1997: Selektierte, mikrovermehrte Vogelkirschen – Klone. *AFZ – Der Wald, Allgemeine Forst Zeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge* 52: 963–964.
- Minch, E., A. Ruiz-Linares, D. Goldstein, M. Feldman, L.L. Cavalli-Sforza, 1997: MICROSAT: a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data, ver. 1.5d. Stanford University, Stanford, CA.
- Moreno, J., I. Trujillo, 2005: Genetic Characterization and Relatedness among Cherry Cultivars in a Germplasm Bank by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Agriculturae Consectus Scientificus* 4: 105–111.
- Ohta, S., T. Ktsuki, T. Tanaka, T. Hayashi, Y. Sato, T. Yamamoto, 2005: Genetic variation in Flowering Cherries (*Prunus subgenus Cerasus*) Characterized by SSR Markers. *Breeding Science* 55: 415–424.
- Pavelić, D., 2006: Šumsko-uzgojna svojstva divlje trešnje (*Prunus avium* L.) s posebnim naglaskom na proizvodnju sadnica. Stručni magistarski rad, Šumarski fakultet, Zagreb, 84 str.
- Pijut, P. A., K. E. Woeste, G. Vengadesan, C.H. Michler, 2007: Technological advances in temperate hardwood tree improvement including breeding and molecular marker applications, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 43 (4): 283–303.

- Russell, K., 2003: EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Saitou, N., M. Nei, 1987: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Santi, F., M. Lemoine, 1990: Genetic markers for *Prunus avium* L. 2. Clonal identifications and discrimination from *P. cerasus* and *P. cerasus* *P. avium*. *Ann. Sci. For.* 47: 219–227. [doi: 10.1051/forest:19900303].
- Schueler, S., A. Tusch, M. Schuster, B. Ziegenhagen, 2003: Characterisation of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome* 46: 95–102.
- Schneider, S., D. Roessli, L. Excoffier, 2000: ARLEQUIN Version 2.000: A Software for Population Genetic Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Sosinski, B., M. Gannavarapu, L. D. Hager, L. E. Beck, G. J. King, C. D.
- Ryder, S. Rajapakse, W. V. Baird, R. E. Ballard, A. G. Abbott, 2000: Characterisation of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* 101: 421–428.
- Stockinger, E.J, C. A. Mulinix, C. M. Long, T. S. Brettin, A. F. Iezzoni, 1996: A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *J. Hered.* 87: 214–218.
- Stoeckel, S., J. Grange, J. F. Fernández-Mañjarres, I. Isabelle Bilger, N. Frascaria-Lacoste, S. Mariette, 2006: Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species — *Prunus avium* L. *Molecular Ecology* 15:2109–2118.
- Struss, D., R. Ahmad, S. M. Southwick, M. Boritzki, 2003: Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP marker. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128: 904–909.
- Štambuk, S., D. Sutlović, P. Bakarić, S. Petričević, S. Anđelinović, 2007: Sudskomedicinska botanika: moguća korist od mikrosatelitne genotipizacije hrvatske masline (*Olea europaea* L.) u sudskomedicinskoj praksi, *CMJ* 48: 556–562.
- Tančeva Crmarić, O., 2011: Mikrorazmnožavanje i genotipska raznolikost divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u dijelu prirodne rasprostranjenosti u Hrvatskoj. Disertacija, Šumarski fakultet Zagreb.
- Tavaud, M., A. Zanetto, J. L. David, F. Laigret, E. Dirlewanger, 2004: Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity*: 1–8.
- Testolin, R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M. T. Dettori, M. Pancaldi, S. Sansavini, 2000: Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43 (3): 512–520.
- Turkec, A., M. Sayar, B. Heinze, 2005: Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1635–1641.
- Turkoglu Z., S. Bilgener, S. Ercisli, M. Bakir, A. Koc, M. Akbulut, R. Gercekcioglu, M. Gunes, A. Esitken, 2010: Simple sequence repeat-based assessment of genetic relationships among *Prunus* rootstocks, *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2156–2165.
- Vaughan, S. P., K. Russell, 2004: Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Molecular Ecology Notes* 4: 429–431.
- Vaughan, S. P., J. E. Cottrell, D. J. Moodley, T. Connolly, K. Russell, 2007: Clonal structure and recruitment in British wild cherry (*Prunus avium* L.)
- Vision, T. J., D. G. Brown, D. B. Shmoys, R. T. Durrett, S. D. Tanksley, 2000: Selective mapping: a strategy for optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics* 155: 407–420.
- Weber, R. P., 1990: Basic Content Analysis, 2nd ed. Newbury Park, CA.
- Weiser, F., 1996: Ergebnisse einer 33 jährigen Einzelbaum – Nachkommenschaftsprüfung nach freiem Abblühen von Vogelkirsche, *Prunus avium* L. var. *avium*. *Silvae Genet.* 45: 260–266.
- Wunsch, A., J. I. Hormaza, 2004: Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 635–641.
- Zebec, M., M. Idžojtić, I. Poljak, I. Mihaldinac, 2010: Varijabilnost nizinskog brijesta (*Ulmus minor* Mill. sensu latissimo) na području hrvatske Podravine prema morfološkim svojstvima listova. *Šum. list* 11–12: 569–580, Zagreb.

SUMMARY: Wild cherry (Prunus avium L.) has recently drawn great attention because of its noble and high quality wood, but also because of its importance in preserving genetic diversity. Clonal material used to investigate genotypic diversity of the wild cherry was taken from the clonal seed orchard (Kutina Forest Office) and consisted of 24 selected plus trees from the area of north-western Croatia. The clones were analyzed by 15 selected microsatellite markers (SSR), chosen by the ECPGR. A wealth of allelic variations was found in SSR loci, while a high degree of polymorphism confirmed the existence not only of extensive morphological but also a very significant genetic diversity. Based on pairwise proportion of shared allele distance (D_{PSAM}) among the 24 clones of wild cherry, the average genetic distance of 0.573 was calculated. The smallest genetic distance ($D_{PSAM} = 0.100$) was recorded between the genotypes 'KP2' and 'KP5' (Kloštar Podravski, region Koprivnica), which coincided in 27 out of 30 alleles, whereas the largest genetic distance ($D_{PSAM} = 0.933$) was found between the genotypes 'Đu2' (Đulovac, Bjelovar region) and 'L3' (Lipovljani, Zagreb region), which differed in 28 out of 30 alleles. The genetic distance matrix, based on pairwise proportion of shared allele distance (D_{PSAM}), did not show a clear classification of wild cherry individuals with regard to their origin, i.e. region (Koprivnica, Bjelovar, Zagreb). The analysis of molecular variance (AMOVA) revealed a significantly higher percentage (95.88 %) of the total microsatellite diversity caused by the differences among the individuals within the regions, compared to that caused by the differences between the studied regions (4.12 %). The ϕ -statistics, amounting to 0.041, was highly significant ($P < 0.01$) and indicates the existence of specific regional structurality of genetic diversity. It is presented by the axes of factorial correspondence analysis (FCA). The first axis explains 63.76 % of the total inertia and discriminates the individuals from the Zagreb region from those from the Bjelovar and Koprivnica regions, while the second axis with 36.24 % discriminates the individuals from the Bjelovar region from those in Koprivnica region.

Key words: Prunus avium L., microsatellites SSR, genetic diversity