

ANALIZA GENETSKE RAZNOLIKOSTI "LOVRANSKOG MARUNA" (*Castanea sativa* Mill.) KORIŠTENJEM MIKROSATELITNIH BILJEGA

ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF "LOVRAN MARRON" (*Castanea sativa* Mill.) USING MICROSATELLITE MARKERS

Marilena IDŽOJTIĆ¹, Marko ZEBEC², Igor POLJAK³, Zlatko ŠATOVIĆ⁴, Zlatko LIBER⁵

Sažetak

Maruni (maroni) su sorte europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) dobivene selekcijom, koje se od davnina uzgajaju radi proizvodnje krupnih i kvalitetnih plodova. Maruni su u Hrvatskoj sađeni na privatnim posjedima istočnih padina Učke, u okolici Lovrana i poznati su pod nazivom "lovranski marun". Do sada nije bilo znanstvenih istraživanja lovranskog maruna te nije poznato s kojim su biljnim materijalom nasadi podignuti, odnosno koliko je različitih genotipova zastupljeno. Ta saznanja ključna su za sve daljnje korake koje treba poduzeti kako bi se očuvali postojeći genetski izvori. Cilj ovoga istraživanja bila je analiza genetske raznolikosti stabala lovranskog maruna u postojećim nasadima, korištenjem mikrosatelitnih biljega. Istraživanje je rađeno na uzorku od 72 stabla, korištenjem 5 mikrosatelitnih biljega. Analiza je pokazala prisutnost 11 multilokusnih genotipova, što govori u prilog raznovrsnosti i bogatstvu svojiti pitomog kestena na lovranskom području, koje još uvijek nisu taksonomski određene, a vode se pod kolektivnim nazivom "lovranski marun". Većina uzorkovanih stabala, 58, pripada istom genotipu, što se može tumačiti statičnošću u smislu introdukcije novih svojiti na istraživano područje i forsiranjem, tj. ekstenzivnim uzgojem.

KLJUČNE RIJEČI: lovranski marun, *Castanea sativa* Mill., genetska raznolikost, mikrosatelitni biljezi

Uvod Introduction

Pitomi kesten plemenita je listača koja raste u šumama brežuljkasto-brdskog područja kontinentalnog dijela Hrvatske, u Istri te na otocima Krku i Cresu. Vrsta je od koje ljudi imaju višestruku korist (drvo, plod, med, tanin, očuvanje ekoloških i krajobraznih vrijednosti).

Maruni (maroni) su sorte europskog pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.) dobivene selekcijom, koje se od davnina uzgajaju radi proizvodnje krupnih i kvalitetnih plodova. U Hrvatskoj su sađeni na privatnim posjedima istočnih padina Učke, u okolici Lovrana, gdje su najstariji nasadi stari više stotina godina. Maruni iz toga područja poznati su pod nazivom "lovranski marun". Manji nasadi maruna nalaze

¹ Prof. dr. sc. Marilena Idžojić, Sveučilište u Zagrebu – Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb; e-mail: idzajt@sumfak.hr

² Doc. dr. sc. Marko Zebec, Sveučilište u Zagrebu – Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb; e-mail: mzebec@sumfak.hr

³ Igor Poljak, dipl. ing. šum., Sveučilište u Zagrebu – Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb; e-mail: ipoljak@sumfak.hr

⁴ Prof. dr. sc. Zlatko Šatović, Sveučilište u Zagrebu – Agronomski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb; e-mail: zsatovic@agr.hr

⁵ Izv. prof. dr. sc. Zlatko Liber, Sveučilište u Zagrebu – Prirodoslovno-matematički fakultet, Marulićev trg 9a/II, Zagreb; e-mail: zlatko.liber@botanic.hr

se u Istri i na Cresu. Maruni su se izvozili još u 17. stoljeću te su uz masline, vinovu lozu i trešnje bili jedna od kultura od kojih je stanovništvo toga kraja stoljećima živjelo. Proizvodnja i izvoz doživjeli su vrhunac u 19. stoljeću, dok u 20. stoljeću slijedi stagnacija te potom i zapuštanje nasada (Medak i dr. 2009).

U mediteranskim zemljama poput Italije, Francuske, Španjolske, Turske i dr. postoji duga tradicija uzgoja sorti pitomog kestena. Za vrijeme Rimskog carstva legije su proširile uzgoj pitomog kestena na cijeli Apeninski poluotok, ali i na druge europske zemlje. Tako je već u Srednjem vijeku kesten postao dominantna vrsta drveća u mnogim talijanskim pokrajinama te je ljudima značio život, jer je osiguravao hranu i drvo (Conedera 1996, Conedera i dr. 2004a, 2004b, Bounous 2005). Početkom 20. stoljeća proizvodnja plodova pitomog kestena u Italiji bila je na vrhuncu, oko 650.000 t godišnje. Međutim, došlo je do zapuštanja nasada i sječe velikih površina radi dobivanja drva i proizvodnje tanina, a bolesti koje su se širile (rak kestenove kore i tintna bolest), to su stanje dodatno pogoršale. Zahvaljujući višestrukim koristima, unatrag tridesetak godina postupno se vraća interes za uzgoj kestena u cijeloj Italiji. Današnja je proizvodnja oko 55.000 t plodova godišnje, od kojih se 75 % konzumira svježe, a ostatak se prerađuje. Krajem 19. stoljeća u Francuskoj je proizvodnja plodova pitomog kestena bila oko 500.000 t, a tijekom 20. stoljeća značajno je smanjena (na 15.000 t 1983. godine, a danas tek 7.000–10.000 t godišnje) zbog pojave bolesti, promijenjenog načina života, napuštanja nasada i dr. (Agnoletti 2007, Idžojtić i dr. 2010a). Danas su u uzgoju tradicionalne sorte, čija se proizvodnja sve više smanjuje i nove, hibridnog porijekla, koje ih postupno zamjenjuju (Martin i dr. 2007).

Zapuštanje starih nasada i nepodizanje novih veliki je problem, koji je osim u Hrvatskoj prisutan u svim mediteranskim zemljama. Najveći uzroci ovoga problema su promijenjeni način života lokalnog stanovništva i pojava raka kestenove kore (*Cryphonectria parasitica* /Murr./ Barr.). Budući da je rak kore od sredine prošloga stoljeća do danas osim pitomog kestena u šumskim sastojinama uzrokovao djelomično ili potpuno sušenje velikoga broja stabala maruna te neprestano otežava podizanje novih nasada (Beccaro i dr. 2009, Bounous 2009a), smatramo ga najvećom prijetnjom genetskim izvorima maruna (Fernandez-Lopez i Alia 2003). U zadnjih nekoliko godina u Europi sve je veći problem kestenova osa šiškarica (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), štetnik prenesen iz Kine u Italiju 2002. godine, koji uzrokuje stvaranje šiški na izbojcima i listovima pitomog kestena. Taj karantenski štetnik 2010. godine nađen je i na nekoliko lokaliteta u Hrvatskoj, a prvi puta upravo na području Lovrana. Stvaranje šiški zaustavlja normalan razvoj izbojaka te uzrokuje smanjeni urod plodova (Matošević i dr. 2010).

Većina zemalja u kojima raste europski pitomi kesten ima svoje autohtone sorte, koje su dobivene dugotrajnim i upornim radom, odnosno selekcijom tijekom više stoljeća. Vremenom je samo u Italiji selekcionirano više od 300 različitih sorti, čije je genetske izvore važno očuvati (Piccioli 1922, Bellini 2005). Camus (1929) je za Francusku naveo više od 250 sorti, Pereira-Lorenzo i dr. (2001) za Španjolsku više od 200 sorti, a Conedera i dr. (1994) za južnu Švicarsku 120 sorti. Međutim, maruni, odnosno maroni, prema talijanskim su standardima samo oni kultivari (sorte) europskog pitomog kestena s najkvalitetnijim, ukusnim, krupnim plodovima duguljastog oblika, s malim hilumom, svjetlije smeđe boje, s malo izbočenim, uzdužnim, tamnim prugama, koji se lako ljušte i rijetko imaju dvostruke sjemenke. Francuska definicija maruna slična je prethodnoj, a naznačeno je da moraju imati manje od 12 % plodova s dvije sjemenke. Među najbolje marune ubrajaju se talijanski kultivari: 'Chiusa Pesio', 'Luserna', 'Val Susa', 'Castel del Rio', 'Marradi' i 'Fiorentino', kao i francuski: 'Montagne', 'Sardonne' i 'Comballe' (Bounous 2009b, Hennion 2009).

Za velik broj različitih sorti u pojedinim zemljama ili regijama rađena su istraživanja morfoloških svojstava (Pereira-Lorenzo i dr. 1996a, Pereira-Lorenzo i Fernandez-Lopez 1997, Rudow i Conedera 2001, Pereira-Lorenzo i dr. 2001, Ramos-Cabrer i Pereira-Lorenzo 2005, Alvarez-Alvarez i dr. 2006, Martin i dr. 2007, Furones-Perez i Fernandez-Lopez 2009, Cutino i dr. 2010), kao i istraživanja genetske raznolikosti pitomog kestena uz pomoć različitih genetskih biljega (Müller-Starck i dr. 1994, Fineschi i dr. 1994, Pereira-Lorenzo i dr. 1996b, Galderisi i dr. 1998, Oraguzie i dr. 1998, Pereira i dr. 1999, Santana i dr. 1999, Goulao i dr. 2001, Boccacci i dr. 2004, Beccaro i dr. 2005, Botta i dr. 2005, Costa i dr. 2005, Gobbin i dr. 2007, Cantini i Autino 2010, Martin i dr. 2010 i dr.). Primjena DNK biljega u identifikaciji genotipova ima veliku prednost zbog svoje brzine i točnosti, kao i neovisnosti o starosti biljke i utjecaju okolišnih čimbenika. Zbog toga su posebno našli primjenu u identifikaciji sorti različitih vrsta s jestivim plodovima, određivanju sličnosti, odnosno međusobne genetske udaljenosti između različitih sorti, razjašnjavanju sinonima i homonima, utvrđivanju geografskog porijekla i dr. (Wünsch i Hormaza 2002).

Prvi biokemijski i molekularni biljezi upotrijebljeni za analizu genetske raznolikosti kultivara pitomog kestena bili su izoenzimi (Sawano i dr. 1984, Müller-Starck i dr. 1994, Pereira-Lorenzo i dr. 1996b), kao i RAPD biljezi (Fineschi i dr. 1994). Nakon toga intenzivirana je uporaba mikrosatelita (Botta i dr. 1999, 2001, Buck i dr. 2003, Marinoni i dr. 2003, Martin i dr. 2005, Gobbin i dr. 2007). Mikrosateliti se kao kodominantni DNK biljezi općenito odlikuju visokom informativnošću, ponovljivošću, kao i niskim troškovima primjene kod već razvijenih SSR početnica.

U Hrvatskoj, nažalost, do sada nije bilo znanstvenih istraživanja maruna koji se uzgajaju na lovranskom području te nije poznato s kojim su biljnim materijalom nasadi podignuti, odnosno koliko je različitih genotipova zastupljeno pod nazivom "lovranski marun". Ta saznanja su ključna za sve daljnje korake koje treba poduzeti kako bi se očuvali postojeći genetski izvori (Liber i dr. 2009, Idžojić i dr. 2010b). Cilj ovoga istraživanja bila je analiza genetske raznolikosti stabala lovranskog maruna u postojećim nasadima.

Materijal i metode

Material and Methods

Izolacija DNK, amplifikacija, detekcija mikrosatelita – DNA Extraction, PCR Amplification and Microsatellite Genotyping

Za analizu genetske raznolikosti, krajem proljeća i početkom ljeta 2008. godine, uzorkovana su 72 stabla maruna na području Općine Lovran. Stabla se nalaze u privatnim nasadima na lokalitetima Liganj, Dobreć, Lovranska Draga i u blizini tunela Učka. Od ukupnog broja uzorkovanih stabla 70 je bilo cijepljenih, a dva nisu cijepljena ("kostanji" uzgojeni iz sjemena), ali se nalaze u nasadima pored maruna i s njih se također sakupljaju plodovi. Sva su uzorkovana stabla označena brojevima i geopozicionirana. Prsni promjer stabala bio je od 32 do 140 cm.

Od stabala, određenih za molekularnu identifikaciju, sakupljeni su listovi, te je u svrhu izolacije DNK izvagano 100 mg svježeg listnog tkiva svake istraživane jedinice. Izolacija ukupne stanične DNK provedena je pomoću DNeasy® Plant Mini DNA izolacijskog kompleta (Qiagen®), prema uputama proizvođača.

Budući da su SSR biljezi u dosadašnjim studijama genetske raznolikosti kultivara pitomog kestena pokazali visoku informativnost i zadovoljavajući stupanj polimorfizma, primijenjeni su i u ovom istraživanju. Kako bi se odredila zastupljenost pojedinih kultivara u cjelokupnom uzorku, korišteno je pet mikrosatelitnih biljega iz grupe CsCAT, kao što je prikazano u Tablici 1 (Marinoni i dr. 2003).

Umnožavanje mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimerazom provedeno je u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems®), i to prema Marinoni i dr. (2003). Umnoženi mikrosateliti detektirani su pomoću kapilarne elektroforeze (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer). Ukupno 1,5 µl umnoženih mikrosatelitnih produkata nakon lančane reakcije polimerazom smješteno je u PCR ploče s 96 epruveta (72 uzorka), a zatim je svaki uzorak pomiješan s 10 µl formaldehida i 0,5 µl DNK standarda Rox 500 (Applied Biosystems®). Uzorci su tri minute denaturirani na 95 °C te neposredno nakon toga smješteni na led. Nakon kapilarne elektroforeze fragmenata DNK rezultati svih analiziranih uzoraka bili su vidljivi u obliku .fsa podataka. Pregledavanje .fsa podataka i određivanje mikrosatelitnih alela izvršeno je pomoću programa GeneMapper® 4.0 (Applied Biosystems®).

Statistička analiza – Data Analysis

U svrhu procjene raznolikosti mikrosatelitnih biljega izračunat je ukupan broj alela po biljegu (N_a), zapažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_e) te informacijski sadržaj polimorfizma (PIC). Navedeni parametri izračunati su pomoću računalnih programa PowerMarker V3.23 (Liu 2002) i FSTAT v. 2.9.3.2. programme package (Goudet 1995, 2002).

Tablica 1. Nazivi, sekvence početnica (5'–3'), ponavljajući motivi i očekivane duljine umnoženih fragmenata DNK za 5 korištenih mikrosatelitnih biljega.

Table 1 Primer sequences (5' to 3'), repeat type and predicted product length of 5 SSR markers used in this study.

Br. No	Naziv Primer code	Sekvenca 5'–3' Primer sequence (5' to 3')	Ponavljajući motiv Repeat type	Duljina (bp) Predicted product length (bp)
1	CsCAT1 F	6-FAM GAGAATGCCCACTTTTGCA	(TG) ₅ TA(TG) ₂₄	220
	CsCAT1 R	GCTCCCTTATGGTCTCG		
2	CsCAT3 F	HEX CACTATTTTATCATGGACGG	(AG) ₂₀	224
	CsCAT3 R	CGAATTGAGAGTTCATACTC		
3	CsCAT4 F	NED CATAGGTTCAAACCATACCCGTG	(CA) ₂₃	243
	CsCAT4 R	CTCATCTTTGTAGGTATAATACC		
4	CsCAT6 F	6-FAM AGTGCTCGTGGTCAGTGAG	(AC) ₂₄ AT(AC) ₄	180
	CsCAT6 R	CAACTCTGCATGATAAC		
5	CsCAT17 F	NED TTGGCTATACTTGTCTGCAAG	(CA) ₁₉ A(CA) ₂ AA(CA) ₃	147
	CsCAT17 R	GCCCCATGTTTCTTCCATGG		

Tablica 3. Genetska raznolikost 5 mikrosatelitnih lokusa u 11 jedinstvenih multilokusnih genotipova *Castanea sativa* Mill.

Table 3 Genetic diversity of five microsatellite loci in 11 unique multilocus genotypes of *Castanea sativa* Mill.

Lokus Locus	N_a	Duljina (bp) Size range (bp)	H_o	H_e	PIC
CsCAT1	5	193–222	1.00	0.71	0.66
CsCAT3	7	213–243	0.82	0.77	0.74
CsCAT4	4	213–237	0.45	0.38	0.35
CsCAT6	5	158–194	0.82	0.69	0.64
CsCAT17	3	130–152	0.64	0.52	0.42
Sredina Mean	4.80		0.75	0.61	0.56

***Broj alela po lokusu (N_a), zapažena (H_o) i očekivana heterozigotnost ili genska raznolikost (H_e), te informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) za svaki mikrosatelitni lokus; izračunato programom PowerMarker V3.23 software (Liu 2002).

***The number of alleles per locus (N_a), the observed heterozygosity (H_o), the expected heterozygosity or gene diversity (H_e) and the Polymorphism Information Content (PIC) for each microsatellite locus were calculated using PowerMarker V3.23 software (Liu 2002).

Najmanji je broj alela zapažen na mikrosatelitnom lokusu CsCAT17 (3 alela), a najveći na mikrosatelitnom lokusu CsCAT3 (7 alela), s prosječnom vrijednošću od 4,80 alela po lokusu. Prosječna zapažena heterozigotnost (H_o) iznosila je 0,75, a kretala se u rasponu od 0,45 kod lokusa CsCAT4

do 1,00 kod CsCAT1, što pak ukazuje na potpunu heterozigotnost analiziranih genotipova za CsCAT1. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti ili genetske raznolikosti (H_e) bile su manje od H_o , tako da je prosječna vrijednost iznosila 0,61, a kretala se od 0,38 (CsCAT4) do 0,77 (CsCAT3). Vrijednost informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC) bila je najveća za lokus CsCAT3 (0,74), a najmanja za lokus CsCAT4 (0,35), s prosjekom od 0,56 (Tablica 3).

Utvrđena segregacija izvornog genskog skupa na 11 multilokusnih genotipova, potvrđena je i vrijednostima D_{PSAM} . Genetska udaljenost na bazi udjela zajedničkih alela (D_{PSAM}) izračunata je za svaki par analiziranih genotipova, te je generirana matrica udaljenosti prikazana u tablici 4. Vrijednost prosječne genetske udaljenosti između svih parova genotipova iznosila je 0,5, što znači da su se u prosjeku genotipovi podudarali u čak 50 % alela. Najmanja udaljenost, $D_{PSAM} = 0,1$ prisutna je između genotipova MG01 i MG02, koji se razlikuju u samo jednom alelu, dok je najveća $D_{PSAM} = 0,8$ utvrđena između genotipova MG03 i MG11, odnosno između MG08 i MG11 (Tablica 4).

Kao što je vidljivo iz nezakorijenjenog *Neighbor-Joining* stabla (Slika 1), međusobno najsljličniji multilokusni genotipovi su MG01 i MG02, podržani vrijednostima pouzdanosti *bootstrap* od 53 %, odnosno multilokusni genotipovi MG10 i MG11, čije je odvajanje od ostalih formiranih grupa podržano vrijednostima pouzdanosti *bootstrap* od 63 %. Indikativna je i činjenica da su međusobno najsljličniji bili mul-

Tablica 4. Matrica genetske udaljenosti između 11 jedinstvenih multilokusnih genotipova *Castanea sativa* Mill. temeljem udjela zajedničkih alela.

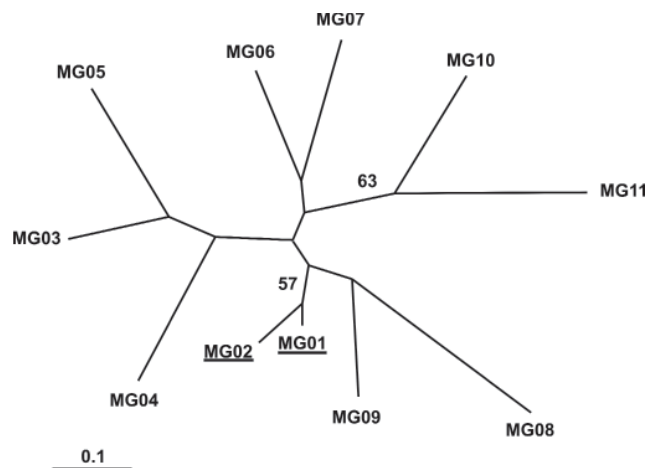
Table 4 The proportion-of-shared-alleles distance matrix among 11 unique multilocus genotypes of *Castanea sativa* Mill.

	MG01	MG02	MG03	MG04	MG05	MG06	MG07	MG08	MG09	MG10	MG11
MG01											
MG02	0.1										
MG03	0.4	0.5									
MG04	0.4	0.4	0.4								
MG05	0.5	0.6	0.3	0.4							
MG06	0.3	0.3	0.6	0.4	0.7						
MG07	0.3	0.4	0.5	0.6	0.6	0.3					
MG08	0.4	0.5	0.5	0.7	0.6	0.6	0.5				
MG09	0.2	0.3	0.4	0.6	0.4	0.5	0.4	0.4			
MG10	0.4	0.4	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.7	0.6		
MG11	0.5	0.5	0.8	0.6	0.7	0.4	0.6	0.8	0.7	0.4	

Prosječna / Average D_{psam} : 0.5

***Za izračunavanje matrice genetske udaljenosti između genotipova temeljem udjela zajedničkih alela (D_{psam} ; Bowcock i dr. 1994) korišten je računalni program MICROSAT (Minch 1997).

***The proportion-of-shared-alleles distance (D_{psam} ; Bowcock et al. 1994) between pairs of lines was calculated using MICROSAT (Minch 1997).



***Brojevi iznad članaka predstavljaju postotak vrijednosti bootstrap iznad 50 % u 1000 pseudoponavljanja.

***Genski skupovi utvrđeni u više od jednog stabla su podcrtni (MG01 i MG02).

***Numbers above branches indicate bootstrap support percentage over 50 % in 1,000 pseudoreplicats.

***Multilocus genotypes detected in more than one tree are underlined (MG01 and MG02).

Slika 1. Nezakorijenjeno *Neighbour Joining* stablo generirano korištenjem genetske udaljenosti temeljem udjela zajedničkih alela, dobivene na osnovi mikrosatelitnih podataka *Castanea sativa* Mill.

Figure 1 Unrooted *Neighbour Joining* tree using proportion-of-shared-alleles distances of the *Castanea sativa* Mill. microsatellite data.

tilokusni genotipovi MG07 (necijepljeno stablo, C82) i MG06 (C41), odnosno MG03 (necijepljeno stablo, C89) i multilokusni genotip MG05 (C83), na što ćemo se osvrnuti u nastavku.

Rasprava i zaključak

Discussion and Conclusion

Primjenom mikrosatelitnih biljega utvrđeno je da je na promatranom području prisutna relativno homogena genetska struktura, ukoliko uzmemo u obzir broj promatranih jedinki, budući da je većina uzorkovanih individua alocirana genotipu MG01. Brojnost i pripadnost glavne uzorkovanih jedinki samo jednom genotipu (MG01), odnosno kultivaru, može se tumačiti forsiranjem, tj. ekstenzivnim uzgojem sorte MG01 na istraživanom području. S druge strane, prisutnost 11 različitih genskih skupova na relativno malom području uzorkovanja, govori u prilog raznovrsnosti i bogatstvu svojiti pitomog kestena na lovranskom području, koje još uvijek nisu taksonomski određene, a vode se pod zajedničkim nazivom "lovranski marun".

Genetsku sličnost između generativne (necijepljene) jedinke C82 i heterovegetativno razmnožene (cijepljene) jedinke C41, odnosno necijepljene jedinke C89 i cijepljene jedinke C83, moguće je objasniti skorašnjom hibridizacijom jedinki iz lokalnih populacija i cijepljenih jedinki u nasadima, prilikom čega je došlo do introgresije germplazme sorti na samonikle, autohtone jedinke. Budući da uzorkovana necijepljena stabla rastu u voćnjaku, u neposrednoj blizini kultiviranih stabala, hibridizacija, a time i introgresija gena vrlo je izvjesna. Razlika u samo jednom alelu između kultivara MG01 i MG02 može se objasniti akumulacijom somatskih mutacija tijekom višestoljetnog uzgoja i vegetativnog razmnažanja (Sanz-Cortés i dr. 2003, Belaj i dr. 2004).

Ovo istraživanje imalo je za cilj utvrditi trenutni spektar genetske raznolikosti operativne taksonomske jedinice (OTU) "lovranski marun", a ne konačno definirati taksonomski status istraživane OTU putem referenciranja na postojeće europske kolekcije germplazme pitomog kestena. Usporedba s drugim istraživanjima genetske raznolikosti kultiviranih svojiti pitomog kestena na području Europe, a u kojima su korišteni mikrosatelitni biljezi i izoenzimi, moguća je samo orijentacijski. Dobivene više vrijednosti prosječne opažene (0,75) i niže vrijednosti prosječne očekivane heterozigotnosti (0,61), zatim vrijednosti prosječnog broja alela po lokusu (4,80) i PIC (0,56) ukazuju na zadovoljavajući stupanj polimorfizma, odnosno informativnosti korištenih SSR biljega. Ovi rezultati korespondiraju s rezultatima većine studija genetske raznolikosti kultivara pitomog

kestena u Europi. Marinoni i dr. (2003) koristili su 14 mikrosatelita za analizu genetske raznolikosti 20 kultivara pitomog kestena na području sjeverne Italije. Mikrosateliti su pokazali visoki stupanj polimorfizma s ukupno 90 alela, broj alela 4–10 po lokusu, prosjek 6,4. Srednja očekivana i zapažena heterozigotnost iznosile su 0,724 i 0,793. Boccacci i dr. (2004) koristili su 12 polimorfnih lokusa kako bi genotipizirali 12 kultivara europskog pitomog kestena s područja sjeverozapadne Italije. Broj alela po lokusu bio je od 3 do 8, dok je srednja očekivana heterozigotnost iznosila 0,592, a srednja opažena heterozigotnost 0,667. Dobiveni rezultati potvrdili su primjenjivost mikrosatelita razvijenih za rod *Quercus* prilikom genotipizacije kultivara roda *Castanea*. Gobbin i dr. (2007) genotipizirali su 164 jedinke pitomog kestena iz kolekcije germplazme pitomog kestena južne Švicarske pomoću osam mikrosatelita. Unutar uzorkovanog genskog skupa utvrdili su 98 genotipova, 10 klonskih grupa pitomog kestena, 4 grupe taksonomskih sinonima i 12 grupa homonima, koje odražavaju kompleksnu etnogeografsku strukturu rasprostranjenosti pitomog kestena na području južne Švicarske.

Iako je primijenjeno samo pet SSR biljega, mikrosateliti su se pokazali učinkovitim za diferenciranje osnovnog uzorkovanog genskog skupa na 11 zasebnih genotipova, što ukazuje na dovoljnu senzitivnost i opravdanost korištenja SSR sustava biljega u ovom istraživanju.

Prema tome, za operativnu taksonomsku jedinicu "lovranski marun", koja se uzgaja na području Općine Lovran, iako nije taksonomski određena, na osnovi analize genetske raznolikosti pomoću 5 mikrosatelitnih biljega možemo reći da uključuje više različitih genotipova, odnosno kultivara, od kojih je jedan (MG01) prisutan s puno većom frekvencijom od ostalih.

Zahvala

Acknowledgement

Na suradnji i velikoj pomoći zahvaljujemo djelatnicima Šumarije Opatija-Matulji, posebno Slavenu Kuliću, dipl. ing. šum. i načelnicima Općine Lovran, Eduardu Primožiću i Emilu Gržinu. Nesebičnu i najveću pomoć pri sakupljanju uzoraka pružio nam je gospodin Adriano Gržević, na čemu mu iskreno zahvaljujemo, kao i na vrlo vrijednim informacijama o njegovom praktičnom radu na uzgoju i korištenju lovranskog maruna. Također zahvaljujemo svim ostalim vlasnicima nasada maruna koji su nam dopustili označavanje i uzorkovanje stabla na svojim posjedima. Ovaj rad izrađen je u okviru projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i sporta Republike Hrvatske (068-0242108-2773): "Varijabilnost i očuvanje genofonda plemenitih listača u Hrvatskoj".

Literatura

References

- Agnoletti, M., 2007: The degradation of traditional landscape in a mountain area of Tuscany during the 19th and 20th centuries: Implications for biodiversity and sustainable management. *For. Ecol. Manage.* 249: 5–17.
- Alvarez-Alvarez, P., M. Barrio-Anta, U. Dieguez-Aranda, 2006: Differentiation of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars by leaf, nut and burr dimensions. *Forestry* 79 (2): 149–158.
- Beccaro, G. L., M. G. Mellano, A. Barrel, C. Trasino, 2009: Restoration of old and abandoned chestnut plantations in Northern Italy. U: A. Soylu, C. Mert (ur.), Proceedings of the International Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries: Problems and Prospects. October 23–25, 2007, Bursa, Turkey. *Acta Hort.* 815: 185–189.
- Beccaro, G. L., R. Botta, D. Torollo Marinoni, A. Akkak, G. Bounous, 2005: Application and evaluation of morphological, phenological and molecular techniques for the characterization of *Castanea sativa* Mill. cultivars. *Acta Hort.* 693: 453–458.
- Belaj, A., G. Cipriani, R. Testolini, L. Rallo, I. Trujillo, 2004: Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple-sequence-repeat markers. *Hort. Science* 39: 1557–1561.
- Bellini, E., 2005: The chestnut and its resources: Images and considerations. *Acta Hort.* 693: 85–92.
- Boccacci, P., A. Akkak, D. T. Marinoni, G. Bounous, R. Botta, 2004: Typing European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars using oak simple sequence repeat markers. *Hort. Science* 39 (6): 1212–1216.
- Botta, R., A. Akkak, D. Marinoni, G. Bounous, S. Kampfer, H. Steinkellner, C. Lexer, 1999: Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Hort.* 494: 277–282.
- Botta, R., D. Marinoni, G. Beccaro, A. Akkak, G. Bounous, 2001: Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *For. Snow Landsc. Res.* 76: 425–428.
- Botta, R., A. Akkak, P. Guaraldo, G. Bounous, 2005: Genetic characterization and nut quality of chestnut cultivars from Piemonte (Italy). U: C. G. Abreu i dr. (ur.), Proceedings of the Third international chestnut congress. *Acta Hort.* 693: 395–401.
- Bounous, G., 2005: The chestnut: A multipurpose resource for the new millennium. U: C. G. Abreu i dr. (ur.), Proceedings of the Third international chestnut congress. *Acta Hort.* 693: 33–40.
- Bounous, G., 2009a: Italy. U: D. Avanzato (ur.), Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – Cultivation and culture, folklore and history, traditions and use. *Scripta Hort.* 9: 72–84.
- Bounous, G., 2009b: Sustainable management of the chestnut plantations to obtain quality produce. *Acta Hort.* 815: 19–24.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. R. Kidd, L. L. Cavalli-Sforza, 1994: High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455–457.
- Buck, E. J., M. Hadonou, J. James, D. Blakesley, K. Russell, 2003: Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Mol. Ecol. Notes* 3: 239–241.
- Camus, A., 1929: Les chataigniers. Monographie des genres *Castanea* et *Castanopsis*. *Encycl. Econ. Sylvic.* 3: 1–604.
- Cantini, C., A. Autino, 2010: Genetic characterization of Tuscan chestnut germplasm: genetic and genotypic variation among populations of three different areas. *Acta Hort.* 866: 233–238.
- Conedera, M., 1996: Die Kastanie: der Brotbaum. Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft der "Waldfucht par excellence". *Bündnerwald* 49: 28–46.
- Conedera, M., G. Müller-Starck, S. Fineschi, 1994: Genetic characterization of cultivated varieties of European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. I. Inventory of chestnut varieties: history and perspectives. U: E. Antognozzi (ur.), Proceedings of the International Congress on Chestnut, 20–23 October 1993, Spoleto, Italy, 299–302.
- Conedera, M., M. C. Manetti, F. Giudici, E. Amorini, 2004a: Distribution and economic potential of the Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Europe. *Ecol. Medit.* 30: 179–193.
- Conedera, M., P. Krebs, W. Tinner, M. Pradella, D. Torriani, 2004b: The cultivation of *Castanea sativa* Mill. in Europe, from its origin to its diffusion on a continental scale. *Veget. Hist. Archaeobot.* 13: 161–179.
- Costa, R., T. Valdivieso, L. Marum, L. Fonseca, O. Borges, J. Soeiro, 2005: Characterization of traditional Portuguese chestnut cultivars by nuclear SSRs. *Acta Hort.* 693: 437–440.
- Cutino, I., A. Marchese, F. P. Marra, T. Caruso, 2010: Genetic improvement of sweet chestnut in Sicily (*Castanea sativa* Mill.) by the selection of superior autochthonous genotypes. *Acta Hort.* 866: 175–180.
- Felsenstein, J., 1985: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Felsenstein, J., 1993: Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.
- Fernandez-Lopez, R. Alia, 2003: Technical guidelines for genetic conservation and use for chestnut (*Castanea sativa*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 6 str.
- Fineschi, S., D. Turchini, G. Müller-Starck, M. Conedera, 1994: Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. III. Analysis of RAPD's molecular markers. U: E. Antognozzi (ur.), Proceedings of the International Congress on Chestnut, 20–23 October 1993, Spoleto, Italy, 303–307.
- Furonés-Perez, P., J. Fernandez-Lopez, 2009: Morphological and phenological description of 38 sweet chestnut cultivars (*Castanea sativa* Miller) in a contemporary collection. *Span. J. Agric. Res.* 7 (4): 829–843.
- Galderisi, U., M. Cipollaro, C. Dibernardo, L. Demasi, G. Galano, A. Cascino, 1998: Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (2): 259–263.
- Gobbin, D., L. Hohl, L. Conza, M. Jermini, C. Gessler, M. Conedera, 2007: Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *Genome* 50: 1089–1103.
- Goudet, J., 1995: FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Goudet, J., 2002: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

- Goulao, L., T. Valdivieso, C. Santana, C. Moniz Oliveira, 2001: Comparison between phenetic characterization using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 329–338.
- Hennion, B., 2009: France. U: D. Avanzato (ur.), Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – Cultivation and culture, folklore and history, traditions and use. *Scripta Hort.* 9: 44–47.
- Idžojić, M., J. Medak, I. Poljak, M. Zebec, B. Tutić, 2010a: Slijedeći tragove pitomog kestena (*Castanea* spp.). *Uzgoj i kultura, folklor i povijest, tradicija i korištenje*. Šum. list 5–6: 294–300.
- Idžojić, M., M. Zebec, I. Poljak, Z. Liber, Z. Šatović, N. Vahčić, 2010b: Očuvanje genofonda maruna. U: N. Jasprica i dr. (ur.), Treći Hrvatski botanički kongres 2010., 24–26 rujana 2010., Murter. *Knjiga sažetaka*, 92–93.
- Liber, Z., M. Idžojić, M. Zebec, Z. Šatović, I. Poljak, 2009: Genetic characterization of sweet chestnut cultivars in Croatia. U: *Castanea 2009*, 1st European Congress on Chestnut, Cuneo (Italy), 13–16 October 2009, Abstract book, 130 str.
- Liu, J., 2002: POWERMARKER – a Powerful Software for Marker Data Analysis. North Carolina State University, Bioinformatics Research Center, Raleigh. <http://www.powermarker.net>
- Marinoni, D., A. Akkak, G. Bounous, K. J. Edwards, R. Botta, 2003: Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* Mill. *Mol. Breed.* 11: 127–136.
- Martin, A. C., M. J. Gimenez, J. B. Alvarez, 2005: Varietal identification of chestnut using microsatellites markers. *Acta Hort.* 693: 441–446.
- Martin, M. A., A. Moral, L. M. Martin, J. B. Alvarez, 2007: The genetic resources of European sweet chestnut (*Castanea sativa* Miller) in Andalusia, Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 379–387.
- Martin, M. A., C. Mattioni, M. Cherubini, D. Turchini, F. Villani, 2010: Genetic characterization of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats). *Annals of Applied Biology* 157 (1): 37–44.
- Matošević, D., M. Pernek, B. Hrašovec, 2010: Prvi nalaz kestenove ose šiškarice (*Dryocosmus kuriphilus*) u Hrvatskoj. *Šum. list* 9–10: 497–502.
- Medak, J., M. Idžojić, S. Novak-Agbaba, M. Ćurković-Perica, I. Mujić, I. Poljak, D. Juretić, Ž. Prgomet, 2009: Croatia. U: D. Avanzato (ur.), Following chestnut footprints (*Castanea* spp.) – Cultivation and culture, folklore and history, traditions and use. *Scripta Hort.* 9: 40–43.
- Minch, E., 1997: MICROSAT, Version 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford.
- Müller-Starck, G., M. Conedera, S. Fineschi, 1994: Genetic characterization of cultivated varieties of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. II. Genetic inventory based on enzyme gene markers. U: E. Antognozzi (ur.), Proceedings of the International Congress on Chestnut, 20–23 October 1993, Spoleto, Italy, 303–307.
- Oraguzie, N. C., D. L. McNeil, A. M. Paterson, H. Chapman, 1998: Comparison of RAPD and morpho-nut markers for revealing genetic relationships between chestnut species (*Castanea* spp.) and New Zealand chestnut selections. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 26: 109–115.
- Pereira, M. J., L. F. Castro, J. M. Torres-Pereira, S. P. Lorenzo, 1999: Isozyme polymorphism in Portuguese chestnut cultivars. *Acta Hort.* 494: 283–286.
- Pereira-Lorenzo, S., J. Fernandez-Lopez, J. Moreno-Gonzalez, 1996a: Variability and grouping of Northwestern Spanish chestnut cultivars. I. Morphological traits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121 (2): 183–189.
- Pereira-Lorenzo, S., J. Fernandez-Lopez, J. Moreno-Gonzalez, 1996b: Variability and grouping of Northwestern Spanish chestnut cultivars. II. Isoenzymatic traits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121 (2): 190–197.
- Pereira-Lorenzo, S., J. Fernandez-Lopez, 1997: Description of 80 cultivars and 36 clonal selections of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from Northwestern Spain. *Fruit Varieties Journal* 51 (1): 13–27.
- Pereira-Lorenzo, S., A. M. Ramos-Cabrer, B. Diaz-Hernandez, J. Ascasibar-Errasti, F. Sau, M. Ciordia-Ara, 2001: Spanish chestnut cultivars. *Hortic. Sci.* 36 (2): 344–347.
- Piccioli, L., 1922: Monografia del castagno. Suoi caratteri morfologici, variegata, coltivazione, prodotti e nemici. Stabilimento Tipo-Litografico G. Spinelli, Florenz, 178 str.
- Ramos-Cabrer, A. M., S. Pereira-Lorenzo, 2005: Genetic relationship between *Castanea sativa* Mill. trees from north-western to south Spain based on morphological traits and isoenzymes. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 879–890.
- Rudow, A., M. Conedera, 2001: Floral characteristics and recognition of cultivars of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Southern Switzerland. *Bot. Helv.* 111 (1): 1–23.
- Santana, C., T. Valdivieso, C. M. Oliveira, 1999: Molecular typing of rootstock hybrids (*Castanea sativa* × *Castanea crenata*) and Portuguese *Castanea sativa* cultivars based on RAPD markers. *Acta Hort.* 494: 295–301.
- Saitou, N. i M. Nei, 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–25.
- Sanz-Cortés, F., D. E. Parfitt, C. Romero, D. Struss, G. Llácer, M. L. Badenes, 2003: Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Plant Breeding* 122: 173–177.
- Sawano, M., T. Ichii, T. Nakanishi, Z. Kotera, 1984: Studies on identification of chestnut species and varieties by isozyme analysis. *Sci. Rpt. Faculty Agr. Kobe Univ.* 16:67–71.
- Wünsch, A., J. I. Hormaza, 2002: Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59–67.

Summary

Marrons are varieties of the European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) obtained through selection, which have been grown since antiquity for the production of large and high quality fruits. In Croatia, marrons were planted on private properties on the eastern slopes of the Učka mountain, in the environs of Lovran, and are hence known as the "Lovran marron". There has been no scientific research of the Lovran marron to date, and it is unknown which plant material was used to raise the plantations, or how many different genotypes are represented. Those insights are crucial for any further steps to be undertaken in order to conserve the existing genetic resources. The aim of this study was to analyze the genetic diversity of the Lovran marron trees in the existing plantations, by using microsatellite markers. The study was conducted on a sample of 72 trees, using 5 microsatellite markers (Table 1). The analysis demonstrated the presence of 11 multilocus genotypes, pointing to the diversity and abundance of sweet chestnut taxa in the Lovran area, which have not yet been taxonomically defined and bear the collective name of the "Lovran marron". The majority of analyzed trees, specifically 58 individuals, had a uniform genetic structure and are assigned to the MG01 cultivar, which is therefore the most represented cultivar in the researched area, i.e. the one most often grown. However, not all trees are uniform, which is proven by the fact that the remaining 14 analyzed trees belong to 10 different gene pools. Of the 14 trees, 2 had not been grafted, but are found in the plantations together with the grafted marrons and are genetically specific as is to be expected. The remaining 12 grafted trees belong to 9 gene pools. Out of those, 5 trees share common alleles on all loci and are assigned the MG02 cultivar, whereas 7 trees were genetically unique and classified into 7 different cultivars (Tables 2, 3, 4 and Figure 1). Consequently, with regard to the "Lovran marron" operational taxonomic unit grown in the area of the Municipality of Lovran, although it is not taxonomically specified, on the basis of the genetic diversity analysis conducted using 5 microsatellite markers, it can be said to include several different genotypes, or cultivars, one of which (MG01) is present at a much higher frequency than others.

KEY WORDS: Lovran marron, *Castanea sativa* Mill., genetic diversity, microsatellite markers, Croatia