

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Sara Malešević

Morfološka raznolikost tradicijskih kultivara graha

(Phaseolus vulgaris L.)

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Klaudije Carović-Stanko i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

C = vjerojatnost zabune (engl. *Confusion Probability*)

CV = varijacijski koeficijent (engl. *Coefficient of Variation*)

D = snaga razlučivosti (engl. *Discriminating Power*)

D_{EUC} = euklidska udaljenost (engl. *Euclidean Distance*)

D_{ISO} = maksimalna snaga razlučivosti (engl. *Maximum Discriminating Power*)

H = Shannonov informacijski index (engl. *Shannon Information Index*)

NTSYS = engl. *Numerical Taxonomy System*

PAST = engl. *Paleontological Statistics*

PCA = analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis*)

SAS = engl. *Statistical Analysis System*

SD = standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

SMC = koeficijent podudaranja (engl. *Simple Matching Coefficient*)

UPGMA = metoda neponderiranog sparivanja korištenjem aritmetičke sredine (engl.

Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	CILJ RADA	3
3.	PREGLED LITERATURE	4
3.1.	Podrijetlo i sistematika	4
3.2.	Hranidbena i zdravstvena vrijednost	5
4.	MATERIJAL I METODE	6
4.1.	Biljni materijal i poljski pokus	6
4.2.	Lista deskriptora	6
4.3.	Statistička analiza	7
4.3.1.	Kvalitativna svojstva	7
4.3.2.	Kvantitativna svojstva	10
5.	REZULTATI I RASPRAVA	11
5.1.	Kvalitativna svojstva	11
5.1.1.	Izračunavanje udaljenosti između primki i analiza UPGMA	14
5.2.	Kvantitativna svojstva	18
5.2.1.	Korelacije između ispitivanih svojstava	18
5.2.2.	Analiza glavnih sastavnica	19
6.	ZAKLJUČCI	22
7.	ZAHVALE	23
8.	POPIS LITERATURE	24
9.	SAŽETAK	27
10.	SUMMARY	28

1. UVOD

Mahunarke se koriste u ljudskoj prehrani i kao krmne kulture. U ljudskoj prehrani najviše se koristi grah zrnaš, nešto manje grah mahunar, a mlado zrno graha sezonski. Kao stočna hrana i u ljekovite svrhe upotrebljavaju se stabljika, lišće, korijen i ljuske zrelih mahuna. I grah zrnaš i grah mahunar su izvor hranjivih tvari, prvenstveno bjelančevina (Lešić i sur., 2004). Zajedno sa žitaricama, grah čini najvažniju škrobnu hranu te je vrijedan izvor energije velikom dijelu čovječanstva na Zemlji (De Meia i sur., 2003). Koristi se u industriji za proizvodnju limunske kiseline, a brašno od zrna graha se dodaje tjestenini zbog poboljšanja kvalitete. Zbog neutralnog okusa grah se lako kombinira s različitim namirnicama i začinima te se može koristiti i u pripremi slastica kao zamjena za brašno. Dostupan je tijekom cijele godine jer ga je moguće sušiti i konzervirati.

Jednogodišnja je zeljasta biljka, a po sistematskoj klasifikaciji pripada porodici mahunarki (Fabaceae) i rodu *Phaseolus*. Kod niskih sorti stabljika se grana i naraste od 30 do 40 cm, a kod visokih sorti i do 3 m. Među uzgajanim sortama postoje značajne morfološke razlike, a na prinos pojedine sorte različito utječu pojedine komponente (Zeven i sur., 1999; Santalla i sur., 2004; Casquero i sur., 2006). Plod graha je mahuna različitog oblika, boje i veličine te u njoj može biti od 3 do 10 sjemenki. Sjeme je različitog oblika: okruglo, ovalno, valjkasto ili bubrežasto; i boje: bijelo, ružičasto, crveno, žuto, smeđe i crno te svih mogućih prijelaznih nijansi ili šareno u dvije ili više boja (Lešić i sur., 2004). Na sekundarnom korijenu graha razvijaju se bakterije roda *Rhizobium* koje stvaraju kvržice. Glavna funkcija ovih bakterija je vezanje atmosferskog dušika i opskrba biljaka ovim hranjivom, ali još je važnije da se tlo obogaćuje dušikom. Na taj se način sprječava opasnost od onečišćenja podzemnih voda nitratima, koje se inače javlja kod intenzivne primjene mineralnih dušičnih gnojiva.

Zbog kratke vegetacije grah se može uzgajati u širokom rasponu klimatskih uvjeta. Za izravnu ljudsku prehranu grah zrnaš i grah mahunar uzgajaju se u cijelom svijetu na više od 30 milijuna hektara. Vodeći svjetski proizvođači graha zrnaša su Indija, Mijanmar i Brazil, a graha mahunara Kina (FAOSTAT, 2015).

U Hrvatskoj se grah proizvodi na malim površinama s tendencijom pada. Proizvodnja se uglavnom temelji na tradicijskim kultivarima (primitivnim varijetetima, 'starim sortama')

koje poljoprivrednici održavaju već stoljećima. Uzgajaju ga mali poljoprivredni proizvođači za vlastite potrebe na tradicionalan način, a višak prodaju na tržnicama. Organizirana proizvodnja graha gotovo ni ne postoji i odvija se na nešto manje od 400 ha.

U ovom radu su analizirana morfološka svojstva tradicijskih kultivara graha prema listi deskriptora. Također su utvrđeni jačina i smjer povezanosti svojstava. Poznavanje korelacija između pojedinih svojstava može biti od velike pomoći za unapređenje proizvodnje kroz oplemenjivačke programe.

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je analizirati morfološka svojstva prikupljenih tradicijskih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.) pomoću liste deskriptora, u sklopu projekta „Genetska osnova količine bioaktivnih hranjivih tvari hrvatskih tradicijskih kultivara graha“ koji financira Hrvatska zaklada za znanost.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Podrijetlo i sistematika

Brojni biotipovi graha potječu od divlje vrste *Phaseolus aborigineus* Burk. autohtone na području Anda u Južnoj Americi, odakle se proširio u Srednju Ameriku i Meksiko, gdje i danas ima najviše ekotipova ove vrste. Rašireni su na različitim nadmorskim visinama u sušnoj i vlažnoj klimi. U najstarijim južnoameričkim i srednjeameričkim civilizacijama pored kukuruza i tikvi bio je glavna udomaćena vrsta, a uzgaja se već oko 6000 godina. Nakon otkrića Amerike grah je vrlo brzo prenesen u Španjolsku te dalje u cijelu Europu, Aziju i Afriku. Prvo se upotrebljavalo samo zrelo zrno, a u nekim krajevima i mladi izboji i lišće. Tek kasnije se kao povratna kultura koriste mlade mahune i mlado zrno. Prve mahune bez niti selekcionirane su oko 1800. godine (Lešić i sur., 2002).

Porodica mahunarki (Fabaceae) obuhvaća 643 roda koji su grupirani u 40 plemena koji se mogu pronaći u tropskim i umjerenim krajevima (Lavin i sur., 1990; Maberley, 1998; Pollhill, 1981, 1994). Pleme *Phaseoleae* [obični grah (*Phaseolus vulgaris* L.), dugi grah (*Vigna unguiculata* L.) i soja (*Glycine max* L.)] je ekonomski najznačajnija skupina. Unutar roda *Phaseolus* opisano je više od 200 vrsta (Roemer i Rudolf, 1962), a udomaćeno ih je pet: *Phaseolus vulgaris* L., *P. polyantus* Greenm, *P. coccineus* L., *P. acutifolius* L. i *P. lunatus* L. Obični grah (*Phaseolus vulgaris* L.) je najraširenija vrsta iz roda *Phaseolus* (Kolák, 1994). Prema građi stabljike svi se kultivari običnog graha dijele na dvije podvrste:

- a) *Phaseolus vulgaris* ssp. *volubilis* – s polegljivom stabljikom
- b) *Phaseolus vulgaris* ssp. *nanus* – s uspravnom stabljikom.

Prema građi sjemena svaka od ove dvije podvrste dijeli se u nekoliko varijeteta. Prema duljini vegetacije kultivari mogu biti:

- a) Rani (60-80 dana)
- b) Srednje rani (80-100 dana) i
- c) Kasni (više od 100 dana vegetacije) (Kolák, 1994).

Prema namjeni uzgoja graha, kultivari se dijele na zrnaše (uzgoj za zrno) i mahunare (uzgoj za mahunu), koji se razlikuju u sadržaju celuloze u mahuni. Kod graha mahunara je razvoj celuloze minimaliziran i usporen (Haramija, 2007).

Značajne vrste unutar roda *Phaseolus* su: *P. vulgaris* L. i *P. coccineus* L., koji se uzgajaju u tropskim i suptropskim područjima. U umjerenim područjima *P. vulgaris* L. uzgaja se kao povrtna kultura i mahune se jedu dok su još zelene i mekane. U tom stadiju također se mogu zamrzavati ili konzervirati. U toplijim područjima mogu se koristiti kao povrtna kultura, ali češće se ostavljaju da sazriju, a suho se sjeme kuha i konzumira (Kolak, 1994).

3.2. Hranidbena i zdravstvena vrijednost

Grah je vrlo dobar izvor hranjivih tvari u ljudskoj prehrani. Sadrži bjelančevine, ugljikohidrate, minerale, vitamine i vlakna. Svi oblici graha bogati su brojnim potrebnim mineralima: fosforom, magnezijem, manganom, željezom, kalijem te u nešto manjoj mjeri cinkom, bakrom i kalcijem (Broughton i sur., 2003). Od vitamina značajno se izdvaja skupina vitamina B (Lešić i sur., 2002). Bogat je različitim bjelančevinama koje imaju esencijalnu ulogu u ljudskoj prehrani i nadopunjavaju ostale namirnice (npr. kukuruz u Južnoj Americi i istočnoj Africi te rižu u Brazilu) koje su primarni izvori ugljikohidrata. Zrno graha sadrži između 20 i 25% bjelančevina, koje su najvećim dijelom sastavljene od skladišnog proteina fazeolina (Ma i Bliss, 1978). Kao i ostale bjelančevine u sjemenu mahunarki, fazeolin je u nedostatku s aminokiselinama koje sadrže sumpor, poput metionina. Bjelančevine u sjemenu žitarica najčešće sadrže dovoljnu količinu aminokiselina sa sumporom, ali imaju nedostatak drugih esencijalnih aminokiselina, poput lizina. Kombinirana konzumacija žitarica i mahunarki u omjeru 2:1 osigurava uravnoteženu prehranu (Bressani, 1983).

Zrno graha potrebno je namočiti i prokuhati kako bi bilo prikladno za konzumaciju. Kuhanjem se inaktiviraju termolabilne antinutritivne komponente, ali se i omogućava probavljanje te asimilacija bjelančevina i škroba (Kigel, 1999). Antinutritivne komponente su prisutne u sjemenu brojnih mahunarki. U njih se ubrajaju: inhibitori α -amilaze, lektini, fitati, arcelini, fenolne tvari i tanini (Kigel, 1999).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Biljni materijal i poljski pokus

Poljski pokus je bio postavljen na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na pokušalištu Zavoda za sjemenarstvo tijekom vegetacijske sezone 2014. godine (Slika 1.). U istraživanjima je korišteno 338 tradicijskih kultivara graha, prikupljenih iz svih dijelova Hrvatske u sklopu projekta „Genetska osnova količine bioaktivnih hranjivih tvari hrvatskih tradicijskih kultivara graha“ koji financira Hrvatska zaklada za znanost, na osnovi liste deskriptora.



Slika 1. Poljski pokus

4.2. Lista deskriptora

U bankama biljnih gena cjelokupna dokumentacija primki temelji se na listama deskriptora. Deskriptori se sastoje od četiri dijela:

- a) Putovnički podaci (*Passport data*)
- b) Opis i pripremna procjena svojstava (*Characterization and preliminary evaluation*)
- c) Daljnji opis i procjena (*Further characterization and evaluation*)
- d) Rukovanje (*Management data*).

Putovnički podaci zapisuju se na svakoj lokaciji prikupljanja i prate primku sve do ulaska u banku biljnih gena. Ovi podaci osiguravaju točno taksonomsko određenje primke i omogućavaju daljnju procjenu uzoraka u kontekstu lokacije prikupljanja (Fabijanić, 2011).

Prilikom opisa primke bilježe se podaci o svojstvima primke koja su visoko heritabilna i neovisna o uvjetima okoline, a mogu se zamijetiti golim okom. Uobičajeno se opis i procjena svojstava provode samo na jednoj lokaciji i u jednoj vegetacijskoj sezoni. Pod procjenom svojstava podrazumijeva se bilježenje svojstava čija je heritabilnost niža nego kod svojstava koja se upotrebljavaju pri karakterizaciji. Većinom se radi o kvantitativnim svojstvima koja pokazuju značajnu raznolikost između lokacija i između vegetacijskih sezona. Razlikuje se pripremna (*Preliminary evaluation*) i daljnja (*Further evaluation*) procjena svojstava. Pripremna procjena je zapis manjeg broja dogovorno određenih svojstava u svrhu lakše klasifikacije i pretraživanja baze podataka koja se provodi u okviru banaka gena. Daljnja procjena obuhvaća veći broj korisnih svojstava u oplemenjivanju bilja koju provode oplemenjivači ili drugi znanstvenici tijekom više vegetacijskih sezona i na više različitih lokacija (Ožanić, 2005).

Podaci o rukovanju obuhvaćaju podatke o fazi regeneracije u kojoj se primka nalazi, količinama sjemena svake primke, zapažanjima o genetskom integritetu primke i dr. (Orlandini i sur., 1996).

Primke graha tradicijskih kultivara opisane su na osnovu 18 svojstava: boja zastavice, boja krila, habitus rasta, položaj mahuna, temeljna boja zrna, boja mozaika, obrazac mozaika, sjajnost zrna, oblik zrna po dužini, oblik zrna po širini, boja mikropile, boja hiluma, broj dana od sjetve do cvatnje, trajanje cvatnje, duljina zrna (mm), širina zrna (mm), debljina zrna (mm) i masa 100 zrna (g). Lista analiziranih svojstava preuzeta je sa Phaseolus Database (<http://www.genbank.at/en/ecpgr-phaseolus.html>).

4.3. Statistička analiza

4.3.1. Kvalitativna svojstva

Shannonov informacijski indeks (*Shannon information index*; Shannon, 1949) kao mjerilo raznolikosti za kvalitativne podatke izračunat je za svako kvalitativno svojstvo po sljedećoj formuli (Lewontin, 1972):

$$H_j = -\sum_{i=1}^I p_i \log_2 p_i$$

gdje je,

H_j – Shannonov informacijski indeks svojstva j ,

p_i - učestalost i - te kategorije,

I - ukupan broj kategorija svojstva j .

Za svako ispitivano svojstvo izračunata je vjerojatnost zabune (C ; *confusion probability*) prema formuli po Tessier i sur., 1999.:

$$C_s = \sum_{k=1}^K p_k \frac{(Np_k - 1)}{N - 1}$$

gdje je,

C_s - vjerojatnost zabune svojstva s

p_k - učestalost kategorije k svojstva s

K - ukupan broj kategorija svojstva s

N - veličina uzorka.

Vjerojatnost zabune (C) je vjerojatnost da će dvije primke u uzorku imati jednaku kategoriju određenog svojstva odnosno da ih se po tom svojstvu ne može razlikovati.

Pritom je broj nerazlučenih parova primki jednak:

$$P_s = \frac{N(N-1)}{2} C_s$$

u kojoj izraz

$$\frac{N(N-1)}{2} = \frac{338 \times 337}{2} = \frac{113906}{2} = 56953$$

označava ukupan broj parova primki. Budući da smo u analizi imali 338 primki ukupan broj parova primki iznosi 56 953.

Na temelju vjerojatnosti zabune moguće je izračunati broj i snagu razlučivosti (D ; *discriminating power*) svakog svojstva prema formuli:

$$D_s = 1 - C_s = 1 - \sum_{k=1}^K p_k \frac{(Np_k - 1)}{N - 1}$$

Snaga razlučivosti označava udio parova primki koje je moguće razlikovati na temelju određenog svojstva, a ovisi o broju primki u analizi i učestalosti kategorija određenog svojstva.

Maksimalna snaga razlučivosti (D_{ISO}) određenog svojstva s k kategorija može se izračunati tako da pretpostavimo izofrekventnu situaciju, tj. slučaj pri kojem svakoj kategoriji pripada isti broj primki.

Sličnost između primki na temelju kvalitativnih svojstava primki izračunata je upotrebom koeficijenta podudaranja (*simple matching coefficient*; SMC) prema formuli:

$$S_{SM} = \frac{m}{n}$$

gdje je,

m - broj svojstava po kojima se dvije primke podudaraju

n - ukupni broj svojstava

Udaljenost između primki dobivena je po formuli:

$$D_{SM} = 1 - S_{SM}$$

Na temelju matrice fenotipske udaljenosti izrađeno je stablo upotrebom algoritma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*; Metoda neponderiranog sparivanja korištenjem aritmetičke sredine; Sneath i Sokal, 1973) koristeći program PAST (Hammer i sur., 2001).

4.3.2. **Kvantitativna svojstva**

Na temelju Pearsonovog korelacijskog koeficijenta izračunate su korelacije između šest kvantitativnih svojstava koristeći naredbu PROC CORR u programu SAS (SAS Institute, 2004).

Na temelju šest kvantitativnih svojstava provedena je Analiza glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*; PCA) pomoću naredbe PROC PRINCOMP u programu SAS. Izrađen je dijagram u kojem je u koordinatnom sustavu točkama prikazan položaj analiziranih jedinki, a vektorima pojedina kvantitativna svojstva.

Standardizirane vrijednosti primki za prve dvije glavne sastavnice su pomnožene korijenom svojstvene vrijednosti glavnih sastavnica te korištene za izračun Euklidske udaljenosti između primki na temelju kvantitativnih svojstava koristeći naredbu PROC DISTANCE u programu SAS.

Matrice udaljenosti između primki na temelju kvalitativnih i kvantitativnih svojstava uspoređene su izračunom korelacijskog koeficijenta i provedbom Mantelovog testa (Mantel, 1967). Mantelov se neparametrijski test proveo na temelju 1,000 permutacija u programu NTSYS-pc (Rohlf, 2005).

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Kvalitativna svojstva

U istraživanje je bio uključen veliki broj primki, 338, između kojih je primijećena velika fenotipska raznolikost. Rezultati prikazani u Tablici 1. pokazuju učestalost pojedinih kategorija (k) za ispitivana kvalitativna svojstva (QL01-QL11) po primkama (n). Iz dobivenih je rezultata vidljivo da najveći broj kategorija (19) ima svojstvo QL05 (Temeljna boja zrna), a najmanji QL03 (Habitus rasta) i QL09 (Oblik zrna po dužini).

Hrvatski tradicijski kultivari su prilagođeni specifičnim uzgojnim uvjetima i pokazuju veliku raznolikost morfoloških i agronomskih svojstava. Nazivi su im tradicionalno dodjeljivani obzirom na porijeklo, način upotrebe, oblik zrna te boju sjemene ljuske, što ne znači nužno i genetsku raznolikost. Prema provedenim morfološkim analizama, lokalni nazivi su u većini slučajeva točno povezani s bojom sjemene ljuske i/ili oblikom zrna.

Tablica 1. Broj primki (n) po pojedinoj kategoriji (k) kvalitativnog svojstva (QL01-QL11)

Svojstvo	QL01		QL02		QL03		QL04		QL05		QL06		QL07		QL08		QL09		QL10		QL11		
Parametar	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	k	n	
	1	123	1	120	1	182	2	128	1	53	1	2	0	24	3	33	2	290	1	1	1	43	
	3	204	3	207	4	156	3	38	2	112	2	4	1	143	5	280	4	48	2	39	3	221	
	10	7	9	7			4	50	3	3	3	17	2	9	7	25			3	281	4	9	
	11	2	10	2			1/2	6	4	1	5	6	3	11					4	9	8	8	
	12	2	11	2			2/3	116	6	3	6	7	4	3					5	8	11	12	
									7	6	8	41	6	132								3/1	1
									8	3	9	16	9	2								48	2
									9	5	10	3	1/6	2								3/10	38
									10	57	11	75	2/6	1								4/10	4
									11	5	12	3	3/6	11									
									12	46	13	1											
									13	4	14	1											
									14	9	15	1											
									15	1	16	1											
									17	20	17	5											
									18	1	18	3											
									19	2	99	152											
									20	5													
									21	2													
Ukupno	5	338	5	338	2	338	5	338	19	338	17	338	10	338	3	338	2	338	5	338	9	338	

Legenda: k - kategorija svojstva; n - broj primki

Za svako ispitivano svojstvo izračunat je Shannonov informacijski indeks (H) i snaga razlučivosti (D) (Tablica 2.). Od ukupno 12 kvalitativnih svojstava 11 ih je bilo polimorfno između analiziranih primki graha. Jedno svojstvo, QL12 (Boja hiluma), bilo je monomorfno i prema njemu nije bilo moguće razlikovati analizirane primke stoga je uklonjeno iz daljnje analize.

Najveću su raznolikost između analiziranih primki pokazala svojstva QL05 (Temeljna boja zrna) i QL06 (Boja mozaika), dok je najveću snagu razlučivosti pokazalo svojstvo QL05 (Temeljna boja zrna), što znači da je 81,5% parova bilo moguće razlikovati pomoću svojstva QL05 (Temeljna boja zrna). Veliku snagu razlučivosti pokazala su i svojstva QL06 (Boja mozaika), QL04 (Položaj mahuna) te QL07 (Obrazac mozaika). Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima dobivenim u istraživanju koje su proveli Piergiovanni i sur., 2000., Pereira i sur., 2009. te Scarano i sur., 2014. Njihovi rezultati također pokazuju veliku morfološku raznolikost između tradicijskih kultivara, posebice kod svojstava temeljna boja zrna i oblik zrna.

Tablica 2. Raznolikosti 12 kvalitativnih svojstava kod 338 primki graha

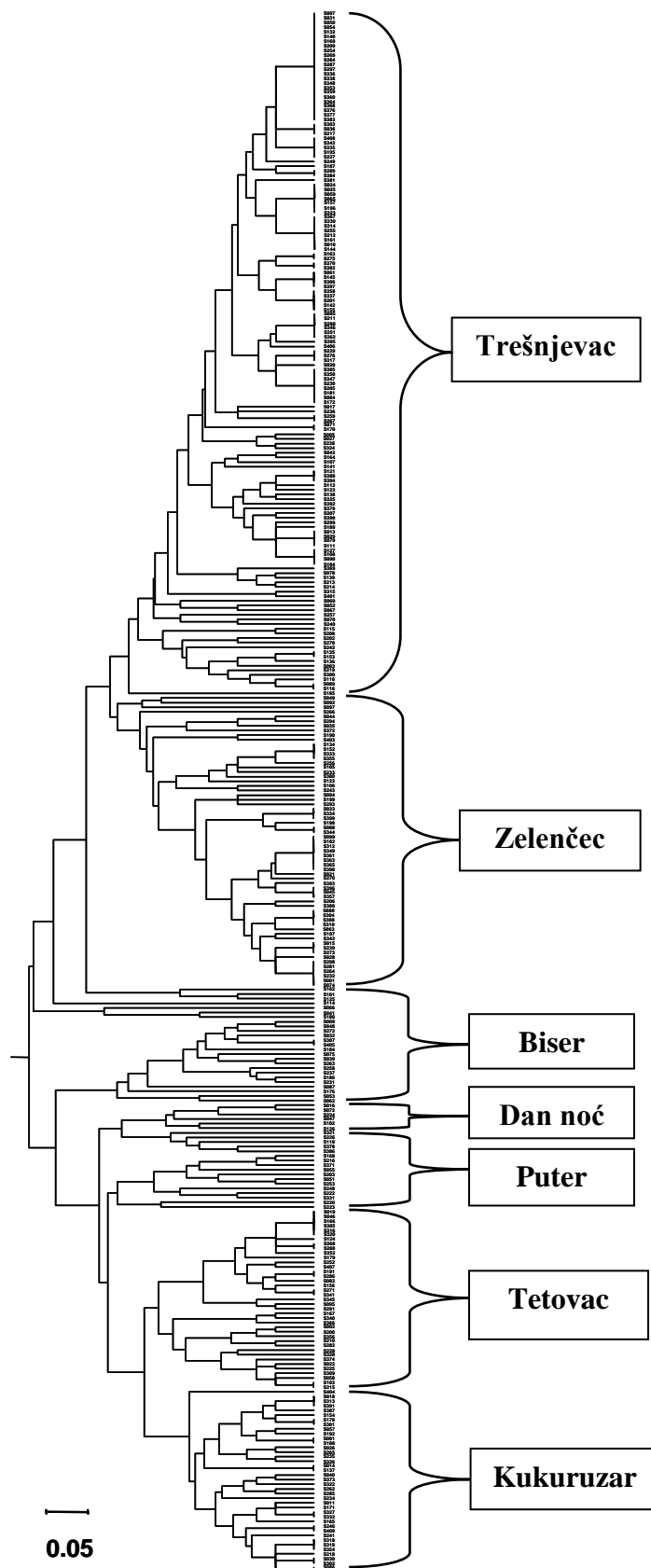
Br.	Svojstvo	Oznaka	k	H	D
1	Boja zastavice	QL01	5	1.174	0.504
2	Boja krila	QL02	5	1.167	0.500
3	Habitus rasta	QL03	2	0.996	0.499
4	Položaj mahuna	QL04	5	1.926	0.706
5	Temeljna boja zrna	QL05	19	2.945	0.815
6	Boja mozaika	QL06	17	2.504	0.730
7	Obrazac mozaika	QL07	10	1.960	0.662
8	Sjajnost zrna	QL08	3	0.831	0.300
9	Oblik zrna po dužini	QL09	2	0.589	0.244
10	Oblik zrna po širini	QL10	5	0.873	0.295
11	Boja mikropile	QL11	9	1.716	0.543
12	Boja hiluma	QL12	1	-*	-*

Legenda: k - broj kategorija svojstva; H – Shannonov informacijski indeks; D - snaga razlučivosti; * - monomorfno svojstvo

5.1.1. Izračunavanje udaljenosti između primki i analiza UPGMA

Prosječna udaljenost između 338 analiziranih primki na temelju 11 kvalitativnih svojstava iznosila je $DSM = 0.527$, a kretala se od 0.000 (primke se podudaraju u svim svojstvima) do 1.000 (primke se razlikuju po svim svojstvima). Od ukupno 56 953 parova primki, broj nerazlučenih parova primki iznosio je 520 (0,913%), a broj primki koje su se razlikovale u svim svojstvima bio je 307 (0,539%). Nakon provedene analize metodom UPGMA na temelju matrice morfološke udaljenosti, odnose između analiziranih primki možemo vidjeti na dendrogramu prikazanom u Grafikonu 1.

Grafikon 1. Dendrogram dobiven metodom UPGMA na temelju matrice udaljenosti između 338 primki graha upotrebom 11 kvalitativnih svojstava



Ispitivane primke graha odvajaju se u dvije osnovne skupine unutar kojih postoji nekoliko podskupina. Svojstva QL01 (Boja zastavica) i QL02 (Boja krila) osnovna su svojstva koja su zajednička populacijama graha koje spadaju u dvije osnovne skupine. O navedenim svojstvima ovisna su i sva ostala ispitivana kvalitativna svojstva koja odvajaju analizirane populacije u podskupine. Manju skupinu od 120 primki čine tradicijski kultivari koje karakterizira bijela boja cvijeta dok veću skupinu čine one s ljubičastim cvijetom. Unutar te dvije skupine primke su razvrstane u sedam podskupina, odnosno morfotipova: trešnjevac (Slika 2.), zelenčec (Slika 3.), biser (Slika 4.), dan noć (Slika 5.), puter (Slika 6.), tetovac (Slika 7.) i kukuruzar (Slika 8.).



Slika 2. Trešnjevac



Slika 3. Zelenčec



Slika 4. Biser



Slika 5. Dan noć



Slika 6. Puter



Slika 7. Tetovac



Slika 8. Kukuruzar

5.2. Kvantitativna svojstva

Deskriptivni statistički parametri analiziranih kvantitativnih svojstava prikazani su u Tablici 3. Prilikom analize kvantitativnih svojstava korištena su mjerila disperzije, tj. standardna devijacija (SD) i varijacijski koeficijent (CV). Prema dobivenim podacima možemo zaključiti da je najmanja varijabilnost zabilježena za svojstvo QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) (12,36%), a najveća kod svojstva QN2 (Trajanje cvatnje) (28,89%).

Tablica 3. Raznolikosti šest kvantitativnih svojstava kod 338 primki graha

Br.	Svojstvo	Oznaka	Prosjek	SD	CV	Min	Max
1	Broj dana od sjetve do cvatnje	QN1	58.81	7.27	12.36	49.00	76.00
2	Trajanje cvatnje	QN2	22.64	6.54	28.89	7.00	37.00
3	Duljina zrna (mm)	QN3	14.46	2.16	14.95	7.75	20.51
4	Širina zrna (mm)	QN4	8.20	1.05	12.81	5.51	12.96
5	Debljina zrna (mm)	QN5	6.19	0.86	13.90	4.26	8.62
6	Masa 100 zrna (g)	QN6	48.51	13.15	27.10	13.18	110.10

Legenda: SD - standardna devijacija; CV - koeficijent variranja

5.2.1. Korelacije između ispitivanih svojstava

Kao parametar prilikom određivanja povezanosti pojedinih ispitivanih svojstava korišten je Pearsonov korelacijski koeficijent r . Rezultati koji nam govore o jakosti i smjeru korelacije su prikazani u Tablici 4. Vrlo jake (signifikantne) korelacije, na razini $P < 0.001$, su između svojstava QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN2 (Trajanje cvatnje), QN2 (Trajanje cvatnje) i QN3 (Duljina zrna), QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN4 (Širina zrna), QN2 (Trajanje cvatnje) i QN4 (Širina zrna), QN3 (Duljina zrna) i QN4 (Širina zrna), QN4 (Širina zrna) i QN5 (Debljina zrna), QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN6 (Masa 100 zrna), QN2 (Trajanje cvatnje) i QN6 (Masa 100 zrna), QN3 (Duljina zrna) i QN6 (Masa 100 zrna), QN4 (Širina zrna) i QN6 (Masa 100 zrna), QN5 (Debljina zrna) i QN6 (Masa 100 zrna). Vrlo slaba pozitivna korelacija, na razini $P < 0.05$, utvrđena je za svojstva QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN3 (Duljina zrna), dok je vrlo slaba negativna korelacija utvrđena za svojstva QN2 (Trajanje cvatnje) i QN5 (Debljina zrna). Nesignifikantna korelacija utvrđena je za svojstva QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN5 (Debljina zrna) te QN3 (Duljina zrna) i QN5 (Debljina zrna).

Tablica 4. Korelacijski koeficijent (r ; ispod dijagonale) i oznaka signifikantnosti (iznad dijagonale) između šest kvantitativnih svojstava kod 338 primki graha

Br	Svojstvo	Oznaka	QN1	QN2	QN3	QN4	QN5	QN6
1	Broj dana od sjetve do cvatnje	QN1		***	*	***	ns	***
2	Trajanje cvatnje	QN2	0.332		***	***	*	***
3	Duljina zrna (mm)	QN3	0.139	0.250		***	ns	***
4	Širina zrna (mm)	QN4	0.259	0.243	0.605		***	***
5	Debljina zrna (mm)	QN5	-	-	0.027	0.460		***
6	Masa 100 zrna (g)	QN6	0.213	0.182	0.672	0.769	0.445	

Legenda: *** - $P < 0.001$; ** - $0.001 < P < 0.01$; * - $0.01 < P < 0.05$; ns - $P > 0.05$

5.2.2. Analiza glavnih sastavnica

Analizom glavnih sastavnica ustanovljeno je da prve tri sastavnice objašnjavaju 82,16% ukupne varijabilnosti. Prva i druga glavna sastavnica imale su svojstvene vrijednosti veće od jedan, dok je najveća razlika utvrđena između prve i druge svojstvene vrijednosti. U Tablici 5. su prikazane korelacije između prve dvije glavne sastavnice i svih šest kvantitativnih svojstava. Grafikon 2. prikazuje dijagram u kojem je u koordinatnom sustavu točkama prikazan položaj analiziranih populacija, a vektorima šest kvantitativnih svojstava.

Iz priložene Tablice 5. i Grafikona 2. vidljivo je da je prva glavna sastavnica objasnila 45,36% ukupne varijabilnosti i razdvojila populacije s većom masom 100 zrna (QN6), sastavnicom koja je s njom u visoko značajnoj pozitivnoj korelaciji. Svojstva QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN2 (Trajanje cvatnje) su bila visoko značajno korelirana ($P < 0.001$) s drugom glavnom sastavnicom, koja je objasnila 22,39% ukupne varijabilnosti. S drugom glavnom sastavnicom svojstvo QN5 (Debljina zrna) je bilo negativno korelirano.

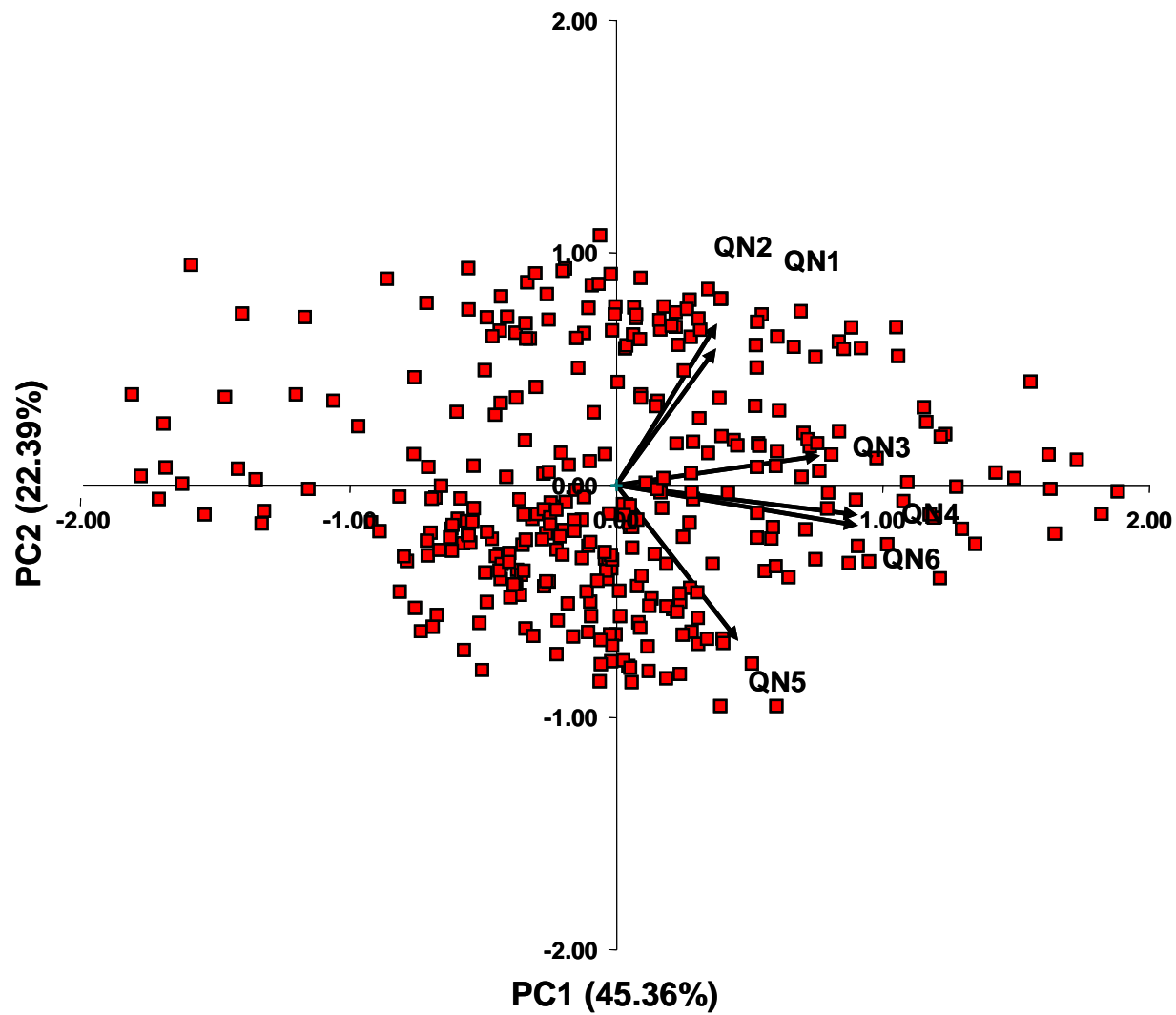
Tablica 5. Pearsonov korelacijski koeficijent između šest kvantitativnih svojstava i vrijednosti prve tri glavne sastavnice

Br	Svojstvo	Oznaka	PC1		PC2		PC3	
1	Broj dana od sjetve do cvatnje	QN1	0.374	***	0.589	***	0.562	***
2	Trajanje cvatnje	QN2	0.378	***	0.695	***	0.080	ns
3	Duljina zrna (mm)	QN3	0.765	***	0.127	*	- 0.543	***
4	Širina zrna (mm)	QN4	0.906	***	- 0.128	*	0.033	ns
5	Debljina zrna (mm)	QN5	0.457	***	- 0.671	***	0.489	***
6	Masa 100 zrna (g)	QN6	0.908	***	- 0.174	**	- 0.086	ns
Svojstvena vrijednost			2.722		1.343		0.864	
% Ukupne varijance			45.36		22.39		14.41	

Legenda: *** - $P < 0.001$; ** - $0.001 < P < 0.01$; * - $0.01 < P < 0.05$; ns - $P > 0.05$

Na temelju vrijednosti svojstvenih vektora (*eigenvectors*) prvih dviju glavnih sastavnica izračunata je Euklidska udaljenost koja je u ovom slučaju predstavljala udaljenosti između 338 primki graha na temelju šest kvalitativnih svojstava. Prosječna udaljenost između svih analiziranih primki iznosila je $D_{EUC} = 2.486$, a kretala se od 0.009 do 12.279. Korelacijski koeficijent između matrica udaljenosti između primki na temelju kvalitativnih i kvantitativnih svojstava, nakon 10,000 permutacija Mantelovog testa, iznosio je $r = 0.393$ ($P_{Mantel} < 0.0001$).

Grafikon 2. Biplot dobiven Analizom glavnih sastavnica na temelju šest kvantitativnih svojstava 338 primki graha. Oznake svojstava (QN1-QN6) su navedene u Tablici 2.



6. ZAKLJUČCI

U Hrvatskoj je grah zapostavljena kultura koju uzgajaju mali poljoprivredni proizvođači na tradicionalan način u proizvodnim sustavima s manjim ulaganjima (*low input*). To je razlog sužavanja genetske raznolikosti i postepenog gubitka biljnih genetskih izvora.

Cilj ovog istraživanja bio je opisati morfološka svojstva prikupljenih tradicijskih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.), u sklopu projekta „Genetska osnova količine bioaktivnih hranjivih tvari hrvatskih tradicijskih kultivara graha; BeanQual“ koji financira Hrvatska zaklada za znanost, na osnovi liste deskriptora.

Prikupljene primke opisane su na osnovi 18 morfoloških svojstava sjemena graha; 12 kvalitativnih i 6 kvantitativnih.

Od kvalitativnih, najveću su raznolikost između analiziranih primki pokazala svojstva QL05 (Temeljna boja zrna) i QL06 (Boja mozaika), dok je najveću snagu razlučivosti pokazalo svojstvo QL05 (Temeljna boja zrna).

Kod kvantitativnih je svojstava najmanja varijabilnost zabilježena za svojstvo QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje), a najveća za svojstvo QN2 (Trajanje cvatnje).

Obzirom na analizirana morfološka svojstva ispitivane primke možemo svrstati u sedam morfotipova: trešnjevac, zelenčec, biser, dan noć, puter, tetovac i kukuruzar.

Provedenim istraživanjem uočeno je da hrvatski tradicijski kultivari pokazuju veliku raznolikost morfoloških i agronomskih svojstava. Nadalje, ove populacije prilagođene su specifičnim uzgojnim uvjetima i kao takve poželjan su izvor varijabilnosti za buduće oplemenjivačke programe.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se Zavodu za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji mi je omogućio provođenje svih potrebnih analiza za istraživanje.

Posebne zahvale mentorici doc. dr. sc. Klaudiji Carović-Stanko na podršci i značajnoj pomoći pri izradi rada.

8. POPIS LITERATURE

1. Bressani R. (1983). Research needs to upgrade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Qual. Pl. Plant Foods Human Nutr. 32: 101-110
2. Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. Plant and Soil 252: 55-128
3. Casquero P. A., Lema M., Santalla M., De Ron A. M. (2006). Performance of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from Spain in the Atlantic and Mediterranean environments. Resource and Crop Evolution 53: 1021-1032
4. De Meia E., Guzman-Maldonado S. H., Acosta-Gallegos J. A., Reynoso-Camacho R., Ramirez-Rodriguez E., Pons-Hernandez J. L., Gonzales-Chavira M. M., Castellanos J. Z., Kelly J. D. (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins and lecithins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. J. Agric. Food Chem. 51: 5962-5966
5. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontolo Electron 4 (1): 9
6. Haramija J. (2007). Utjecaj kvalitete sjemena graha mahunara na klijavost te rast i razvoj klice. Sjemenarstvo 24 (2): 97-110
7. Kigel J. (1999). Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. Biotech. Agron. Soc. Environ. 3: 205-209
8. Kolak I. (1994). Sjemenarstvo ratarskih i krmnih kultura. Nakladni zavod Globus, Zagreb
9. Lavin M., Doyle J. J., Palmer J. D. (1990). Evolutionary significance of the loss of the chloroplast - DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae. Evolution 44: 390-402
10. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2002). Povrčarstvo. Zrinski d. d., Čakovec
11. Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak Ćustić M., Poljak M., Romić D. (2004). Povrčarstvo, 2. izdanje, Zrinski d. d., Čakovec
12. Lewontin R. C. (1972). The apportionment of human diversity. Evolutionary Biology 6: 381-398
13. Ma Y., Bliss F. A. (1978). Seed proteins of common bean. Crop Sci. 17: 431-437
14. Mabberley D. J. (1998). The Plant Book. Cambridge University Press, Cambridge

15. Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220
16. Orlandini S., Kolak I., Šatović Z., Rukavina H. (1996). Prikupljanje germplazme krupnosjemenih mahunarki za potrebe Hrvatske banke biljnih gena. *Sjemenarstvo* 5-6: 399-415
17. Ožanić Z. (2005). Opis svojstava sjemena lokalnih populacija graha (*Phaseolus vulgaris* L.) Hrvatske banke biljnih gena. Diplomski rad, Zagreb
18. Pereira T., Coelho C. M. M., Bogo A., Guidolin A. F., Miquelluti D. J. (2009). Diversity in common bean landraces from south Brazil. *Acta Bot. Croat.* 68: 79-92
19. Piergiovanni A. R., Cerbino D., Brandi M. (2000). The common bean populations from Basilicata (southern Italy). An evaluation of their variation. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 47: 489-495
20. Pollhill R. M. (1981). Papilionoideae. In: *Advances in Legume Systematics* (R. M. Pollhill, P. H. Raven, eds), Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey
21. Pollhill R. M. (1994). Classification of the Leguminosae. In: *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae* (F. A. Bisby, J. Buckingham, J. B. Harborne, eds), Chapman and Hall, London
22. Roemer T., Rudolf W. (1962). *Handbuch der Pflanzenzuchtung*. Paul Pareyln, Berlin – Hamburg, Germany
23. Rohlf F. J. (2005). NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software: Setauket, NY
24. Santalla M., Menendez-Sevillano M. C., Monteagudo A. B., De Ron A. M. (2004). Genetic diversity of Argentinian common bean and its evolution during domestication. *Euphytica* 135: 75-87
25. SAS Institute 2004. SAS/STAT[®] 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC
26. Scarano D., Rubio F., Ruiz J. J., Rao R., Corrado G. (2014). Morphological and genetic diversity among and within common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the Campania region (southern Italy). *Scientia Horticulturae* 180: 72-78
27. Shannon C. E. (1949). A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27 (3): 379-423
28. Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco
29. Tessier C. J., David P., This J., Boursiquot M., Charrier A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98: 171-177

30. Zeven A. C., Waning J., Hintum T., Singh S. P. (1999). Phenotypic variation in a core collection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Netherlands. *Euphytica* 109: 93-106
31. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Pristupljeno 25. veljače 2015.
32. <http://www.genbank.at/en/ecpgr-phaseolus.html>. Pristupljeno 2. lipnja 2014.

9. SAŽETAK

Sara Malešević

Morfološka raznolikost tradicijskih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.)

Grah je vrlo značajna i visokovrijedna povrtna kultura i premda u Hrvatskoj postoje povoljni agroekološki uvjeti za njegov uzgoj, činjenica je da je u našoj zemlji ova kultura zapostavljena i da su površine pod grahom nedostatne. Iz ovog razloga provodi se istraživanje u sklopu kojeg je utvrđena morfološka raznolikost tradicijskih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.). U istraživanje je uključeno 338 primki graha između kojih je primijećena značajna raznolikost morfoloških i agronomskih svojstava. Najveću su raznolikost pokazala svojstva QL05 (Temeljna boja zrna) i QL06 (Boja mozaika). Također, najmanja varijabilnost zabilježena je za svojstvo QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje), a najveća kod svojstva QN2 (Trajanje cvatnje). Proučavane su i korelacije između ispitivanih svojstava čime je uočena vrlo slaba pozitivna korelacija za svojstva QN1 (Broj dana od sjetve do cvatnje) i QN3 (Duljina zrna) te vrlo slaba negativna korelacija za svojstva QN2 (Trajanje cvatnje) i QN5 (Debljina zrna). Obzirom na analizirana svojstva ispitivane primke možemo svrstati u sedam morfotipova: trešnjevac, zelenčec, biser, dan noć, puter, tetovac i kukuruzar koji za većinu primki zapravo odgovaraju tradicijskim imenima.

Ključne riječi: grah (*Phaseolus vulgaris* L.), morfološka raznolikost, korelacija, tradicijski kultivar

10. SUMMARY

Sara Malešević

Morphological diversity of Croatian common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.)

Bean is very important and high-quality vegetable crop and there are favorable agroecological conditions in Croatia for its cultivation, but it is in fact underrated crop. For this reason within the larger project an experiment was carried out and morphological diversity of local bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) was determined. Research was carried out on 338 bean accessions which showed significant morphological diversity. The highest diversity have been detected for traits QL05 (Seed color) and QL06 (Mosaic color). Also, the lowest variability was shown for the trait QN1 (Number of days from sowing to flowering) while the highest was for the trait QN2 (Duration of flowering). Correlations between analyzed traits showed very weak positive correlation between traits QN1 (Number of days from sowing to flowering) and QN3 (Seed length) and very weak negative correlation for the traits QN2 (Duration of flowering) and QN5 (Seed width). According to results seven clearly defined clusters have been detected representing distinct morphotypes: *trešnjevac*, *zelenčec*, *biser*, *dan noć*, *puter*, *tetovac* i *kukuruzar*. Names of morphotypes are conforming traditional names of most of the populations.

Key words: bean (*Phaseolus vulgaris* L.), morphological diversity, correlation, landraces

ŽIVOTOPIS AUTORICE

Sara Malešević rođena je 1. svibnja 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila je u Zagrebu. Preddiplomski studij Biljne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2009. godine te završava obranom završnog rada na temu „Fenotipska karakterizacija autohtonih i referentnih sojeva *Rhizobium* spp. izoliranih iz tala Zagrebačke županije“, čime stječe akademski naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka biljnih znanosti. Nakon toga upisuje i diplomski studij Agroekologija-usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. U lipnju 2014. godine položila je C2 stupanj engleskog jezika u Centru za strane jezike Vodnikova. Područja znanstvenog interesa su joj mikrobiološke analize i sigurnost hrane.