

Unutarsortna varijabilnost klonskih kandidata višnje Maraske

Intracultivar variability of Maraska sour cherry
clonal candidates

S. Šimon, D. Vončina, J. Ražov, I. Pejić

SAŽETAK

Kvalitetan i sortno čist sadni materijal preduvjet je uspješne voćarske proizvodnje. Glavna sorta višnje (*Prunus cerasus* L.) u Dalmaciji je Maraska. S ciljem poboljšanja kvalitete sadnog materijala, pred berbu 2014. godine u najvećem su nasadu višnje Maraske u Republici Hrvatskoj – Vlačine (koji je u vlasništvu tvrtke Maraska d.d.) odabrana stabla s elitnim fenotipskim karakteristikama (n=50) korištenjem metoda masovne klonske selekcije. Uzorci lista i izbojka odabranih stabala testirani na prisutnost svih virusa prema EPPO certifikacijskoj shemi za trešnju i višnju kao i na prisutnost virusa šarke šljive (*Plum pox potyvirus*). Utvrđeno je da je 11 odabranih stabala slobodno od svih testiranih virusa i neposredno pred berbu 2015. godine stabla su ocijenjena fenotipski, a analizirane su i karakteristike plodova (visina, širina i debljina ploda, duljina peteljke, masa ploda, sadržaj topljive suhe tvari, sadržaj ukupnih kiselina u soku i pH vrijednost soka). Utvrđeno je postojanje velike razine unutarsortne varijabilnosti višnje Maraske koja bi mogla biti iskorištena u programu individualne klonske selekcije

Ključne riječi: višnja, Maraska, klonska selekcija, virusi

ABSTRACT

Good quality planting material is a prerequisite of a successful fruit production. Main sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivar in Dalmatia is Maraska. With the aim of improving the quality of planting material, in the year 2014 before harvest in the largest plantation of Maraska in Croatia, selection of trees with elite phenotypic characteristics (n=50) were selected. Samples of leaves and branches from the selected trees were tested on the presence of all viruses compulsory by the EPPO certification scheme as well as *Plum pox potyvirus*. Out of 50 selected elite trees, 11 were found to be free from all of the tested viruses, and just before harvest in the year 2015 they were evaluated visually and characteristics of fruits (length, height and diameter of fruit, length of the petiole, total soluble solids content, total acidity content, pH value of the juice) were

analyzed. High level of intracultivar variability was detected that can be used in an individual clonal selection program.

Key words: sour cherry, Maraska, clonal selection, virus

UVOD

Voćarska proizvodnja zauzima značajno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji Republike Hrvatske. Prema podacima Agencije za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju u 2018. godini u ARKOD sustavu zabilježeno je 30 157 ha zasadenih voćnim vrstama, od čega na višnju otpada 2 315 ha. Iako se procjenjuje da je na prostorima dalmatinskih županija (Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska) zasadeno između 500 i 600 ha višnje Maraske, u ARKOD sustavu ih je zabilježeno samo 353 ha Klasična tehnologija uzgoja s razmacima sadnje od 6 x 6 m odnosno 6 x 5 i 5 x 4 m (Miljković, 1991.) koristeći vazu kao uzgojni oblik (kotlasta krošnja) s tri do četiri primarne skeletne grane bez provodnice odgovarali su tadašnjim proizvodnim uvjetima, agrotehnički i pomotehnički zahvati koristeći klasične traktore, a berba je obavljana ručno. Razvojem mehanizacije i pojavom voćarskih traktora i kombajna, intenzivira se strojna berba voćnih nasada višnje, što podrazumijeva korištenje mehanizirane rezidbe i strojne berba tresaćima ili kombajnima što zahtijeva i prilagodbe u sustavu uzgoja (manji razmaci sadnje, niži uzgojni oblici, itd.). Iako je u voćarstvu introdukcija novih sorata uobičajena za povećanje kvalitete i održivosti proizvodnje, tradicionalne i autohtone sorte predstavljaju prirodno bogatstvo država i regija te daju proizvodima dodanu vrijednost. Međutim, moguće je u identičnim proizvodnim uvjetima, na dva stabla koja rastu jedno pored drugoga uočiti razlike u gospodarskim obilježjima. Uzroci tome mogu biti dvojaki: zaraženost biljnim virusima i pojava mutacija u genomu sorte (Gaši i sur., 2013.). Zaraženost virusima kao i prisutnost bilo kojeg drugog biljnog patogena najčešće negativno utječe na količinu i kvalitetu priroda. Budući da su nasadi višnje višegodišnji nasadi prilikom sadnje potrebno je koristiti najkvalitetniji sadni materijal odnosno certificirane sadnice za koje postoji sljedivost da su proizvedene u sustavu kontrole bez zaraze biljnim virusima. Također, pojava mutacija u višegodišnjim biljnim vrstama nije neuobičajena i postoje brojni primjeri pozitivnog učinka male promjene genoma koja rezultira superiornim fenotipskim karakteristikama. Brojni literaturni izvori (Gaši i sur., 2013., Maletić i sur., 2008.) navode da je moguće poboljšanje postojećih sorata kroz postupak poznat pod nazivom klonska selekcija, identificiranjem i evaluacijom pozitivnih (elitnih) jedinki (stabala, genotipova) unutar proizvodnih nasada

odnosno postojeće populacije sorte. Osnovna pretpostavka klonske selekcije kod višnje je da iako se sorte vegetativno razmnožavaju te se identična genetska osnova prenosi s roditelja na potomke, vjerojatno je očekivati da će se spontane mutacije u genomu pojedinog stabla koje imaju pozitivni učinak na proizvodna svojstva dogoditi. Osim same genetičke klonske selekcije ona podrazumijeva i sanitarnu selekciju. Sanitarnom selekcijom se odabiru stabla slobodna od virusa, te je za višnju relevantna propisana certifikacijska shema Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (European Plant Protection Organisation, EPPO) koja uključuje 15 virusa, a zakonodavstvom Republike Hrvatske obvezno je i testiranje na virus šarke šljive (*Plum pox potyvirus*). Genetička klonska selekcija se obavlja u dvije faze pri čemu se prvo odabiru najbolja stabla (bolja od prosjeka nasada ili ona koja posjeduju svojstva na koja se radi selekcija). Odabrana stabla se testiraju na prisutnost virusa, a njihove fenotipske karakteristike se provjere kroz nekoliko vegetacija. Ukoliko se statističkim analizama potvrde njihova superiorna svojstva ona postaju kandidati za individualnu klonsku selekciju. Tijekom faze individualne selekcije odabrana stabla se vegetativno razmnože i njihovo potomstvo se testira uz odgovarajući eksperimentalni dizajn tijekom nekoliko berbi nakon ulaska u puni rod. Budući da na tržištu Republike Hrvatske ne postoji certificirani sadni materijal višnje 'Maraske' cilj ovog istraživanja bio je upotrebom metoda sanitarne i masovne klonske selekcije odabrati elitna stabla višnje 'Maraske'. Fenotipskom evaluacijom tijekom odabira kao i naknadnom evaluacijom bezvirusnih stabala željeli smo utvrditi stupanj unutarsortne varijabilnosti te mogućnost provedbe individualne klonske selekcije 'Maraske' koja bi rezultirala klonovima prilagođenim modernim tehnologijama uzgoja

MATERIJALI I METODE

Plantaža „Vlačine“ u vlasništvu tvrtke Maraska d.d. je površine cca 200 ha, podignuta 2005. – 2006. godine. Na najvećem dijelu nasada su skeletna i skeletoidna tla. Kao podloga je korišten sjemenjak rašeljke (*Prunus mahaleb*). Neposredno prije berbe 2014. godine provedeni su postupci masovne klonske i sanitarne selekcije pri čemu je vizualnim pregledom nasada odabrano 50 stabala koja su pokazivala iznadprosječno pozitivne fenotipske karakteristike (bujnost, prirod, ujednačenost dozrijevanja plodova). Srednja bujnost odnosno procijenjeni urod u kompletnom nasadu korišten je kao srednja uobičajena vrijednost, a stabla s pozitivnim odstupanjem su označavala i odabirana kao elitna. Uzorci listova i izbojaka 50 odabranih stabala analizirani su ili ELISA testom ili RT-PCR tehnikama ovisno o analiziranom virusu. Analizirani su svi

virusi propisani EPPO certifikacijskom shemom kao i virus šarke šljive. Metoda ELISA odnosno Enzyme-linked immunosorbent assay je enzimsko-imuni test baziran na reakciji antigen-antitijelo. U titarske pločice se nakon adsorpcije antitijela za testirani virus stavlja ekstrakt uzorka koji se analizira te se nakon toga dodaju i antitijela koja na sebi imaju vezanu boju. Ukoliko je virus prisutan u analiziranom uzorku, postoji odgovarajući antigen te će doći do enzimske reakcije antigen-antitijelo i do pojave obojenja. Metoda RT-PCR odnosno Reverse Transcription Polymerase Reaction bazira se na reakciji umnožavanja virusne ribonukleinske kiseline (RNK), njenim prepisivanjem u komplemetarnu deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) te umnažanjem tog fragmenta DNK lančanom reakcijom polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ukoliko je u analiziranom uzorku prisutan virus, njegova RNK molekula će biti izolirana, transkribirana u DNK i umnožena lančanom reakcijom polimeraze. Protokoli za analizu svakog pojedinog virusa propisani su od EPPO-a. Svih odabranih 50 elitnih stabala testirano je navedenim metodama te je za njih 11 utvrđeno da su u 2014. godini bili bez ijednog analiziranog virusa. Elitna stabla su označena šiframa koje su se sastojale od slova M te broja. Neposredno prije berbe 2015. godine s 11 bezvirusnih stabala uzet je uzorak od 50 slučajno odabranih plodova po stablu sa svih pozicija u krošnji stabla, a ponovljeno je i uzorkovanje za testiranje na prisutnost virusa. Pojedinačni plodovi su nasumično raspoređeni u poduzorke. Na uzorku od 30 plodova (slučajno odabranih iz skupine od 50 plodova) izmjerena je masa pojedinačnog ploda (g) digitalnom vagom Adventurer Pro (OHAUS, Greifensee, Švicarska), duljina peteljke (mm), visina, širina i debljina ploda (mm) pomičnom mjerkom Mitutoyo Corp. CD-P15P (Kanagawa, Japan). Uzorak od 20 plodova je nakon ukljanjanja koštica te homogenizacije mikserom Braun MQ100 (Procter & Gamble, Kronberg, Njemačka) filtriran kroz filter papir te je ukupno dobiveni volumen korišten za mjerenje sadržaja topljive suhe tvari (Brix) refraktometrijski korištenjem RHB 32 ATC refraktometra (Huake Instrument Co., Ltd., Shenzhen, Narodna Republika Kina) i pH vrijednosti dobivenog soka pH metrom (Seven Easy, Mettler Toledo, Columbus, Sjedinjene Američke Države). Sadržaj ukupnih kiselina izraženih kao jabučna određen je metodom koja se temelji na potenciometrijskoj titraciji korištenjem otopine natrijevog hidroksida (Pravilnik, 1983.) titracijom s N/10 NaOH do vrijednosti pH od 8,1. Analiza varijance napravljena je za karakteristike plodova upotrebom SAS 9.1.3e softverskog paketa (SAS Institute, Cary, Sjedinjene Američke Države), a srednje vrijednosti varijabli za parametre ploda elitnih stabala testirane su Duncan Multiple Range post-hoc testom. Budući da su kemijske osobine ploda bile zastupljene samo jednim podatkom, statističku analizu razlika između odabranih stabala nije bilo moguće provesti.

REZULTATI I RASPRAVA

Neposredno prije berbe 2014. godine odabrana su elitna stabla višnje 'Maraske' u nasadu Vlačine temeljem vizualnog pregleda. Uobičajeni uzgojni oblici nisu potpuno prilagođeni modernoj mehanizaciji te su kao cilj klonske selekcije postavljeni bujnost i veličina ploda. Kako na fenotip i proizvodna svojstva svakog pojedinog stabla kod višegodišnjih biljaka značajno utječu brojni vanjski čimbenici (dostupnost hranjiva, sadržaj oborina, tip tla, itd.), prosječna bujnost svih stabala (zabilježena od autora, ali podaci nisu prikazani u ovome radu), odnosno veličina svih izmjerenih plodova korištena je kao vrijednost za srednji odnosno uobičajeni fenotip. Unutar skupine odabranih elitnih stabala – klonskih kandidata višnje 'Maraske' (n=50) njih 43% je tijekom 2014. godine bilo ocijenjeno kao srednje bujno, 41% kao bujno i 16% kao manje bujno. Analizirajući distribuciju vizualnih ocjena veličine ploda u berbi 2014. godine utvrđeno je da je 63% od odabranih 50 stabala imalo srednji plod, 23% sitniji plod te 14% krupniji plod. Nakon analize na prisutnost virusa propisanih EPPO certifikacijskom shemom i zakonodavstvom Republike Hrvatske 11 stabala se pokazalo slobodnim od svih testiranih virusa pa je pred berbu 2015. godine ponovljena fenotipska evaluacija te je utvrđeno da je njih 9 veće bujnosti, a dva stabla su ocijenjena kao prosječno bujna uzimajući prosječno stanje nasada kao srednju vrijednost. Svih 11 elitnih stabala ocijenjeno je kao vrlo nadprosječno rodno, dobre obojenosti plodova. Rezultati analize mase, visine, širine i debljine plodova te duljine peteljke 30 slučajno odabranih plodova svakog od bezvirusnih stabala neposredno pred berbu 2015. godine prikazani su u tablici 1.

Statistički značajna razlika između stabala utvrđena je za svojstva masa ploda, duljina peteljke, širina i debljina ploda. Za svojstvo visina ploda nije utvrđena statistički značajna razlika između odabranih elitnih stabala. Prosječna masa ploda kretala se između 1,88 i 3,14 grama. Dobivene vrijednosti su u rasponu ranijih istraživanja na višnji i višnji Maraski (Medin, 1961.), kao i onih provedenih u posljednje vrijeme (Čoga i sur., 2017; Nikolić i sur., 2014.); Puškar 2005; Repajić i sur., 2018; Viljevac i sur., 2017.) iako su utvrđene i znatne razlike između odabranih elitnih stabala. Primjerice, istraživanja provedena u 2015. godini na odabranim elitnim bezvirusnim stablima pokazala su da se masa ploda 'Maraske', ovisno o tipu rasta (*pendula – recta*) kretala između 2,74 i 3,11 g, ovisno o godini. Slijedom prethodno navedenog moguće je utvrditi da neka od odabranih bezvirusnih elitnih stabala imaju znatno manju prosječnu masu ploda. Odabrana stabla su označena slovom M i troznamenkastim brojem. Analizom varijance utvrđeno je da postoje statistički

Tablica 1. Rezultati analize varijance i Duncan Multiple Range post-hoc testa za svojstva: masa ploda; duljina peteljke; širina, visina i debljina ploda odabranih elitnih stabala 'Maraske'

Table 1. Analysis of variance and Duncan Multiple Range post-hoc test for the traits: fruit weight, length of pedicel, length, width and thickness of fruit of selected elite Maraska trees

| Elite tree code | Masa ploda (g) Fruit weight (g) | Duljina peteljke (mm) Length of pedicel (mm) | Širina ploda (mm) Fruit length (mm) | Visina ploda (mm) Fruit width (mm) | Debljina ploda (mm) Fruit thickness (mm) |
|------------------------------------|------------------------------------|---|--|---------------------------------------|---|
| M038 | 1,88 ^F | 26,84 ^E | 12,87 ^G | 11,67 | 14,81 ^F |
| M041 | 2,87 ^B | 19,75 ^F | 14,87 ^{AB} | 13,56 | 16,75 ^A |
| M043 | 2,46 ^{CD} | 30,07 ^D | 14,07 ^{DE} | 13,02 | 15,74 ^D |
| M062 | 2,28 ^{DE} | 38,24 ^B | 14,11 ^{DE} | 16,19 | 16,03 ^{BCD} |
| M066 | 2,53 ^C | 41,06 ^A | 14,62 ^{BC} | 12,87 | 16,21 ^{BC} |
| M070 | 2,36 ^{DE} | 40,23 ^{AB} | 13,85 ^{EF} | 12,52 | 15,66 ^D |
| M072 | 2,3 ^{DE} | 38,9 ^{AB} | 14,04 ^{DE} | 12,45 | 15,88 ^{CD} |
| M082 | 1,92 ^F | 37,88 ^{BC} | 12,89 ^G | 12,26 | 14,88 ^{EF} |
| M088 | 2,19 ^E | 37,7 ^{BC} | 13,58 ^F | 12,72 | 15,22 ^E |
| M199 | 3,14 ^A | 27,3 ^E | 15,15 ^A | 14,00 | 17,03 ^A |
| M205 | 2,5 ^C | 35,21 ^C | 14,37 ^{BC} | 12,47 | 16,27 ^B |
| Analiza varijance ANOVA results | | | | | |
| F _{exp} | 51,05** | 62,13** | 26,41** | 1,18 | 27,48** |
| Pr > F | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,3056 | <0,001 |

Prosječne vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju sukladno Duncan-Multiple Range post-hoc testu. Razina značajnosti analiziranog modela prikazana je uz F_{exp} vrijednost.

Average values labeled with the same letter are not statistically different based on the results of Duncan Multiple Range post hoc test

opravdane razlike između odabranih elitnih stabala, a post-hoc testom je utvrđeno da su najveću masu ploda imala su stabla s oznakama M199 (3,14 g), M041 (2,87 g) i M066 (2,53 g). Prema duljini peteljke izdvaja se stablo M066 sa prosječnom duljinom od 41,06 mm te stablo M070 (40,23 mm) i M072 (38,90 mm). Prosječna izmjerena širina ploda s elitnih stabala kretala se u rasponu od 12,87 do 15,15 mm. Stablo M199 imalo je statistički značajno najveću širinu ploda (15,15 mm), a stablo M038 je imalo najmanju širinu ploda (12,87 mm). Kod svojstva debljina ploda raspon prosječnih vrijednosti kretao se

Tablica 2. Rezultati analize kemijskog sastava soka odabranih elitnih stabala

Table 2. Results of fruit chemical analysis of selected elite trees

| Oznaka elitnog stabla Elite tree code | Topljiva suha tvar (% Brix) Soluble solids content | Ukupna kiselost izražena kao jabučna (gL^{-1}) Total acidity determined by titration as malic acid | pH ph value |
|--|---|--|----------------|
| M038 | 23,00 | 20,10 | 3,50 |
| M041 | 24,20 | 17,60 | 3,53 |
| M043 | 22,60 | 17,20 | 3,54 |
| M062 | 18,80 | 20,10 | 3,35 |
| M066 | 18,20 | 20,00 | 3,40 |
| M070 | 19,80 | 18,80 | 3,34 |
| M072 | 24,00 | 21,70 | 3,46 |
| M082 | 18,20 | 19,40 | 3,29 |
| M088 | 20,20 | 18,80 | 3,33 |
| M199 | 24,50 | 15,40 | 3,58 |
| M205 | 21,20 | 21,80 | 3,43 |
| Prosjeak Average value | 21,34 | 19,20 | 3,43 |
| Minimum Minimum | 18,20 | 15,40 | 3,29 |
| Maksimum Maximum | 24,50 | 21,80 | 3,58 |

između 14,81 i 17,03 mm. Izmjerena prosječna debljina ploda elitnih stabala je također najveća kod stabla M199 (17,03 mm), a statistički značajno se ne razlikuju niti plodovi stabla M041. Promatrajući kemijski sastav soka (tablica 2.) reprezentativnih uzoraka elitnih stabala utvrđen je prosječan sadržaj topljive suhe tvari od 21,34 % Brix-a, a raspon vrijednosti je bio između 18,20 do 24,50. Ukupna kiselost kretala se od 15,40 do 21,80 gL^{-1} jabučne kiseline, a pH vrijednost soka je prosječno iznosila 3,43 pri čemu je elitno stablo M082 imalo najnižu izmjerenu pH vrijednost (3,29), a stablo M199 imalo najvišu (3,58). Budući da veličina ploda direktno utječe na kemijski sastav ploda nužno je nastaviti istraživanja u pogledu kvalitete samih plodova uzimajući u obzir i uobičajene agronomske parametre (prirod po stablu odnosno hektaru). Individualna klonska selekcija je nužna da bi se osigurao sadni materijal višnje 'Maraske' najboljih mogućih proizvodnih svojstava.

ZAKLJUČCI

Upotrebom metoda masovne klonske selekcije, odabirom 50 elitnih stabala u nasadu Vlačine veličine 200 ha utvrđeno je da usprkos nadprosječnim fenotipskim karakteristikama samo 11 od odabranih 50 stabala nije zaraženo virusima. Neposredno prije berbe 2015. godine analizirana je razina unutarsortne varijabilnosti za svojstva ploda te su utvrđene statistički značajne razlike između odabranih stabala za svojstva masa ploda, debljina i širina ploda te duljina peteljke. Utvrđene su i razlike u kemijskim parametrima iako nije bilo moguće testirati statističku opravdanost razlika između odabranih elitnih stabala. Navedeni rezultati ukazuju na visok stupanj unutarsortne varijabilnosti kod višnje 'Maraske' te na postojanje stabala sa superiornim proizvodnim karakteristikama. Individualna klonska selekcija potrebna je kao nastavak ovog istraživanja s ciljem odabira genotipova koji zadovoljavaju uvjete moderne tehnologije proizvodnje.

LITERATURA

- ČOGA, L., JURKIĆ, V., ZEMAN, S., JURKIĆ, A., SLUNJSKI, S. (2017.): Kemijski sastav ploda maraske u klimatski dvije različite godine. Glasnik zaštite bilja, 40(5):6-13.
- GAŠI, F., KURTOVIĆ, M., NIKOLIĆ, D., PEJIĆ, I. (2013.): Genetika i oplemenjivanje jabuke. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.
- MEDIN, A. (1971.): Rast i rodnost maraske u nekim staništima sjeverne Dalmacije. „Agrozadar“ poljoprivredni kombinat Zadar.
- MILJKOVIĆ, I. (1991.): Suvremeno voćarstvo. Štamparski zavod „Ognjen Prica“, Zagreb.
- MALETIĆ, E., KAROGLAN KONTIĆ, J., PEJIĆ, I., (2008.): Vinova loza. Školska knjiga, Zagreb.
- PRAVILNIK o metodama uzimanja uzoraka te obavljanja kemijskih i fizikalnih analiza radi kontrole kvalitete proizvoda voća i povrća (1983.): Službeni list SFRJ br. 29 (Narodne novine 53/91), Zagreb.
- PUŠKAR, B. (2005.): Unutarsortna varijabilnost Oblačinske višnje. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

REPAJIĆ, M., VIDRIH, R., HRIBAR, J., PUŠKAR, B., DUGALIĆ, K., JURKOVIĆ, Z., LEVAJ, B. (2018.): Effect of climate and ripening on sour cherry Maraska and Oblačinska bioactive properties. Glasnik zaštite bilja 41 (6):10-20.

SAS Institute Inc., System 9.3e, Cary, NC, USA.

VILJEVAC VUČETIĆ, M., DUGALIĆ, K., MIHALJEVIĆ, I., TOMAŠ, V., VUKOVIĆ, D., ZDUNIĆ, Z., PUŠKAR, B., JURKOVIĆ, Z. (2017.): Season, location and cultivar influence on bioactive compounds of sour cherry fruits. Plant, soil and environment. 63(9):389-395.

Adresa autora – Author's address:

Silvio Šimon,
e-mail: silvio.simon@hapih.hr
Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo
Zavod za voćarstvo i povrćarstvo,
Gorice 68b, Zagreb

Darko Vončina,
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za fitopatologiju,
Svetošimunska 25, Zagreb

Josip Ražov,
Syngenta Agro d.o.o.
Samoborska cesta 147, 10000 Zagreb

Ivan Pejić,
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku,
Svetošimunska 25, Zagreb

