

## Genetic variability within and among generative dog rose (*Rosa* spp.) offsprings

### Genetska varijabilnost unutar i između generativnih potomstava divlje ruže (*Rosa* spp.)

Nikola TOMLJENOVIC<sup>1</sup> (✉), Tomislav JEMRIĆ<sup>2</sup>, Silvio ŠIMON<sup>3</sup>, Maja ŽULJ MIHALJEVIĆ<sup>4</sup>, Fuad GAŠI<sup>5</sup>, Ivan PEJIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Agricultural School Zagreb, Gjуре Prejca 2, 10040 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Pomology, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Croatian Center for Agriculture, Food and Rural Affairs, Institute of Viticulture and Enology, Jandrićeva 42, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Plant Breeding, Genetics and Biometrics, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>5</sup> University of Sarajevo, Faculty of Agriculture and Food Sciences, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

✉ Corresponding author: [tomljenovic.nikola@gmail.com](mailto:tomljenovic.nikola@gmail.com)

#### ABSTRACT

Dog rose (*Rosa canina* L.) is a cosmopolitan plant species that due to its nutritional, medical and cosmetic values deserves more attention. Dog roses are cultivated in Croatia on very small scale and most of the rose hip used in the domestic processing industry is imported. In this study, three dog rose F1 progeny populations developed from selected plants collected in Korčula, Malešnica and Prigorje Brdovečko, originating from two climatic regions (P1 - Mediterranean and P2 and P3 - continental) have been studied as a part of a field experiment for two growing seasons, in order to assess the level of genetic variability for pomological and agronomic traits. In addition, genetic variation within and among examined three dog rose populations has been assessed using 6 polymorphic SSR (Simple Sequence Repeats) markers. The highest variability, as well as the most desirable agronomic traits were found within the P3 population, while the lowest ones were present in the P1 population. Most desirable properties and highest values for commercially important traits were detected in the genotype RC29 (P3). Molecular data was sufficient to separate three studied populations but not all individuals within the populations. Through selection and hybridization of perspective genotypes of dog roses from Croatia, it would be possible to create clonally propagated varieties suitable for commercial cultivation.

**Keywords:** dog rose, genetic variability, pomological traits, *Rosa canina*, selection, SSR

## SAŽETAK

Divlja ruža (*Rosa canina* L.) je kozmopolitska biljna vrsta koja zbog svoje prehrambene, medicinske i kozmetičke vrijednosti zaslužuje veću pažnju. Divlja ruža uzgaja se u Hrvatskoj na vrlo malim površinama, a plodovi za preradu uglavnom se uvoze. U ovom istraživanju kroz dvije vegetacije praćena su F1 potomstva (populacije) triju elitnih biljaka porijeklom iz Korčule (P1), Malešnice (P2) i Prigorja Brdovečkog (P3) porijeklom iz dvije regije (mediteranska i kontinentalna) radi procjene genetske varijabilnosti pomoloških i agronomskih svojstava. Dodatno, genetska varijabilnost unutar i između tri ispitivane populacije divlje ruže analizirana je i primjenom 6 polimorfnih SSR (Simple Sequence Repeats) markera. Najveća varijabilnost, kao i najpoželjnija agronomska svojstva ustanovljena su unutar populacije P3 dok su najniže vrijednosti istih svojstava utvrđene u populaciji P1. Genotip RC29 (P3) za većinu važnih svojstava pokazao je najviše vrijednosti. Molekularni podaci omogućili su potpuno razdvajanje populacija, ali ne i svih jedinki unutar pojedinih populacija. Selekcijom i hibridizacijom perspektivnih genotipova divljih ruža iz Hrvatske bilo bi moguće kreirati vegetativno razmnožene populacije i sorte prikladne za komercijalni uzgoj.

**Ključne riječi:** divlja ruža, genetska varijabilnost, pomološka svojstva, *Rosa canina*, selekcija, SSR

## DETAILED ABSTRACT

Dog rose (*Rosa canina* L.) is a cosmopolitan plant species that due to its nutritional, medical and cosmetic values deserves more attention. In dog rose breeding, the greatest attention is paid to the quality of fruit, which is crucial for greater market expansion. Dog roses are cultivated in Croatia on very small scale and most of the rose hip used in domestic processing industry is imported. In this study, three dog rose F1 progeny populations developed from selected plants collected in Korčula, Malešnica and Prigorje Brdovečko and originating from two climatic regions (P1 - Mediterranean and P2 and P3 - continental) have been studied as a part of a field experiment for two growing seasons, in order to assess the level of genetic variability for pomological and agronomic traits. Each offspring contained 11 plants that were analyzed in *ex situ* conditions at experimental station Jazbina (Zagreb). During 2010 and 2012, 80 rose hips were harvested from each plant and used for the analysis of pomological traits. Morphometric measurements of fruits and analysis of total dry matter were carried out according to standard methods. The obtained data on morphological and pomological traits of genotypes was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA1), while the difference between mean values were examined using Tukey test at significance level  $P \leq 0.05$ . Standard statistical indicators (mean value, variation width, standard deviation and coefficient of variation) were used for the characterization of individual genotypes. The UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) dendrogram using Mahalanobis Distance ( $M_D$ ) of morphological properties was constructed. SAS software package was used in the analysis of the pomological traits. Isolation of the genomic DNA was conducted using young leaves, harvested from the shoot tips, and the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Genetic analysis has been performed by using 6 SSR markers (Table 3) according to protocol of Esselink et al. (2003). For separation and visualization of the amplified fragments ABI-3130 Genetic Analyzer and Gene Mapper 4.0 software were used. The number of alleles, gene diversity and F statistics were calculated using the SPAGeDI 1.3 software. The molecular variance analysis according to the SMM approach was computed using the GenoType software, applying 1,000 permutations. The level of genetic similarity among tested individuals has been calculated in the NTSYS software (Rohlf, 1993) based on the Jaccard coefficient of similarity. Clustering based on genetic distances was performed in the MEGA 5 software, based on the UPGMA algorithm. Multivariate FCA analysis was performed using the "dudi.coa" procedure in R 2.15.2 (R Core Team, 2012). Graphical display of FCA results was made using the rgl package version 0.93.945 in the same software.

The analysis of pomological traits revealed a substantial genetic variation of studied populations, which is comparable with similar studies. UPGMA analysis of pomological properties enabled separation of P1 population only (of Mediterranean origin). The highest variability, as well as the most desirable agronomic traits were found within population P3, while the lowest ones were present in population P1. Genotype RC29 (P3) has shown most desirable traits with highest commercially important values. Genetic variation within and among three dog rose populations was also assessed using 6 polymorphic SSR markers. Molecular data was sufficient to separate three studied populations. The

analysis of pomological traits revealed a substantial genetic variation of studied populations, which is comparable with similar studies. UPGMA analysis of pomological properties enabled separation of P1 population only (of Mediterranean origin).

The highest variability, as well as the most desirable agronomic traits were found within population P3, while the lowest ones were present in population P1. Genotype RC29 (P3) has shown most desirable traits with highest commercially important values. Genetic variation within and among three dog rose populations was also assessed using 6 polymorphic SSR markers. Molecular data was sufficient to separate three studied populations. Even though average number of alleles was rather high compared to similar studies, the set of used markers was not sufficient to separate all individuals within particular populations. Subclusters sharing identical genotype at 6 SSR loci (2–6 individuals with Jaccard similarity = 1) have been observed in all three populations which might be partly the consequence of apomixis which is quite common in dog rose (Nybom et al., 2004). However, considering the substantial variation of pomological traits within these „subgroups of identical genotypes“ the inability of microsatellites to distinguish all genotypes could be also due to insufficient number of applied polymorphic SSR loci and matroclinal inheritance observed in dog rose (Fedorova et al., 2010).

In conclusion, through selection and hybridization of perspective genotypes of dog roses from Croatia it would be possible to create clonally propagated populations and varieties suitable for commercial cultivation.

## UVOD

Divlja ruža (*Rosa canina* L.) je kozmopolitska biljna vrsta umjerenih i subtropskih klimatskih područja sjeverne hemisfere i uspješan kolonizator koji naseljava različita staništa te se zajedno s ostalim srodnicima iz roda *Rosa* rasprostire na svim kontinentima. Njen filogenetski razvoj još uvijek nije završen pa postoje poteškoće u označavanju granica vrste. Zbog svoje prehrambene vrijednosti *R. canina* L. i druge vrste iz ovog roda imaju potencijal za upotrebu u medicini, kozmetici i prehrambenoj industriji pa je sve veći interes za razvoj sorti i hibrida te povećanje proizvodnje u konvencionalnom i ekološkom uzgoju (Joublan i Rios, 2005; Celik i sur., 2009). U oplemenjivanju divlje ruže najveća pažnja posvećuje se kvaliteti ploda što je glavni ključ za veću tržišnu ekspanziju. Plod (šipak) sadrži 10 do 50 puta više vitamina C od naranče (Türkben i sur., 2005), a neki autori navode i znatno veće vrijednosti. *R. canina* L., uz vrstu *Rosa rugosa*, najvažnija je za prehrambenu industriju u Europi (Najda i Buczkowska, 2013).

Kao jedan od glavnih svjetskih centara biljne bioraznolikosti, Turska ima 25-30 vrsta iz roda *Rosa* (Ercisli, 2005; Güneş, 2010). Rosu i sur. (2011) navode da u Rumunjskoj postoji 29 spontanih i subspontanih vrsta te 5 hibrida iz roda *Rosa*. Prema Kovács i sur. (2005), u Mađarskoj postoji 20 vrsta iz roda *Rosa*, od toga istražuje

se 19 vrsta i 3 mikrovrste, među ostalima i *R. canina*. U Hrvatskoj postoji 37 vrsta iz roda *Rosa* (Nikolić, 2018), a u Europi 47 (Wrońska-Pilarek i Jagodziński, 2009). Prema Tomljenović i Pejić (2018), posljednjih 200 godina vrste iz roda *Rosa* predmet su taksonomskih, a u posljednjih stotinjak godina citoloških i genetičkih istraživanja. Nema preciznih podataka o broju vrsta pa se njihov broj, ovisno o autoru, procjenjuje na 100 do 200 ili više (Rehder, 1940; Allkin i sur., 2013). Poteškoće u identifikaciji vrsta javljaju se kao posljedica heterogamne canina mejoze, varijabilnosti unutar vrste, dominantnog matroklinalnog nasljeđivanja, poliploidije i međuvrsne hibridizacije (De Cock i sur., 2008). Prema Riaz i sur. (2007) biljni deskriptori za *Rosa* vrste nisu dobro definirani. Kako klasična istraživanja nisu dovoljna, u novije vrijeme za analize uzoraka koriste se anatomske, mikromorfološke i palinološke analize te različiti molekularni markeri. U istraživanju filogenije roda *Rosa* uz korištenje morfologije te upotrebom molekularnih alata, a naročito AFLP-a i SSR-a, stvoren je bolji uvid u intersekcijske i interspecijesne odnose iako konačnog rješenja još uvijek nema. Detaljan povijesni pregled klasifikacija unutar roda *Rosa* i korištenih istraživačkih metoda iznose Tomljenović i Pejić (2018).

U Hrvatskoj do sada nije bilo sustavnih istraživanja roda *Rosa*. Preliminarna istraživanja ukazuju na postojanje pomološke i genetske varijabilnosti autohtonih populacija

divlje ruže za agronomski važna svojstva (Šindrak i sur., 2012; Tomljenović i sur., 2016).

Sa svrhom procjene potencijala divlje ruže za komercijalni uzgoj i oplemenjivanje provedeno je sakupljanje uzoraka iz različitih geografskih regija Hrvatske. U svjetlu fenomena predominantnog matroklinalnog nasljeđivanja (asimetrična mejoza) kakav je utvrđen kod divlje ruže, može se očekivati manja varijabilnost unutar jednog potomstva i dominantan utjecaj majke, a što može biti od važnosti u oplemenjivanju.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razinu genetske varijabilnosti unutar i između tri generativna potomstva divlje ruže porijeklom od tri elitne matične biljke iz dvije različite geografske regije koje su uzgojene na jednoj lokaciji, analizom pomoloških svojstava i polimorfizma mikrosatelitskih markera.

## MATERIJALI I METODE

Genetska divergentnost 33 generativna potomka (3 potomstva po 11 biljaka) divlje ruže (*R. canina* L.) proučavana je u dobro razvijenom eksperimentalnom (*ex situ*) nasadu na lokaciji Zagreb – pokušalište Jazbina (Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Potomstvo 1 (P1) čine genotipovi RC2 – RC12 uzgojeni iz sjemena matične biljke porijeklom s otoka Korčule. Potomstvo 2 (P2) čine genotipovi C13–RC23 porijeklom od matične biljke iz Zagreb – Malešnica, a potomstvo P3 (RC24–RC34) je porijeklom od matične biljke iz Prigorja Brdovečkog.

Za analizu pomoloških svojstava tokom 2010. i 2012. godine sa svake biljke ubrano je po 80 plodova. Morfometrijsko mjerenje plodova i analiza ukupne suhe tvari provedeni su prema standardnim metodama (Güneş, 2010; Ghiorghiță i sur., 2012a). Morfološka i pomološka svojstva genotipova (Tablica 1) analizirana su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA1), a razlike između srednjih vrijednosti Tukeyevim testom

**Table 1.** Average values of dogrose pomology traits of three generative offsprings (P1–P3). Jazbina 2010 and 2012.

**Tablica 1.** Prosječne vrijednosti pomoloških svojstava tri generativna potomstva (P1–P3) divlje ruže. Jazbina 2010. i 2012.

Offspring	Fruit length (mm)	Fruit width (mm)	Fruit mass (g)	Fruit flesh mass (g)	Fruit flesh ratio (%)	Fruit shape index	Dry matter (%)
Potomstvo	Dužina ploda (mm)	Širina ploda (mm)	Masa ploda (g)	Masa mesa ploda (g)	Randman mesa (%)	Indeks oblika ploda	Suha tvar (%)
P1 (n=400) (RC2–RC12) <i>Rosa canina</i> var. <i>squarrosa</i> A. Rau Origin: Korčula	14,73 <sup>c</sup>	9,45 <sup>c</sup>	1,31 <sup>b</sup>	0,83 <sup>b</sup>	63,11 <sup>b</sup>	1,6 <sup>c</sup>	29,46 <sup>a</sup>
CV (%)	17,26	23,26	31,35	31,97	6,3	16,47	19,43
P2 (n=440) (RC13–RC23) <i>Rosa canina</i> L. Origin: Malešnica	19,13 <sup>b</sup>	23,26	1,44 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>	64,12 <sup>a</sup>	1,87 <sup>b</sup>	25,08 <sup>b</sup>
CV (%)	17,08	23,26	25,58	28,33	7,78	16,15	20,65
P3 (n=419) (RC24–RC34) <i>Rosa canina</i> var. <i>squarrosa</i> A. Rau <i>Rosa squarrosa</i> (A. Rau) subvar. <i>boreau</i> Origin: Prigorje Brd.	20,69 <sup>a</sup>	23,26	1,48 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	61,4 <sup>c</sup>	2 <sup>a</sup>	24,84 <sup>b</sup>
CV (%)	17,12	23,26	32,49	33,78	9,17	31,21	17,66

<sup>a,b</sup> Average values followed by the same letter within the same row are not statistically different according to Tukey test for probability level  $P \leq 0,05$ .

<sup>a,b</sup> Prosječne vrijednosti svojstva koje prati isto slovo u jednom redu nisu statistički značajne prema Tukey testu uz razinu značajnosti  $P \leq 0,05$ .

na razini značajnosti  $P \leq 0,05$ . Za karakterizaciju pojedinih genotipova korišteni su deskriptivni statistički pokazatelji (prosječna vrijednost, varijacijska širina, standardna devijacija i koeficijent variranja (CV)). UPGMA dendrogram morfoloških svojstava napravljen je pomoću Mahalanobisove udaljenosti ( $M_D$ ) izračunatih na temelju svih analiziranih morfoloških svojstava. U analizi pomoloških svojstava korišten je računalni program SAS (SAS Institute Inc., 2004).

Od svih 33 ispitivanih biljaka (RC2–RC34) uzeti su uzorci mladog lista za ekstrakciju DNA. U dodatku na ovaj set, za analizu polimorfizma mikrosatelitskih markera korišten je i uzorak RC1 koji predstavlja matičnu biljku potomstva P1, uzet na Korčuli. Matične biljke druga dva potomstva nije bilo moguće uzorkovati jer su na originalnim lokacijama u međuvremenu uništene. Za izolaciju DNA upotrijebljeni su mladi listovi ubrani sa vrha izboja, a provedena je pomoću kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) prema uputama proizvođača.

Za analizu genetske varijabilnosti unutar i između potomstava upotrijebljeno je šest polimorfni mikrosatelitskih (Simple Sequence Repeats, SSR) primera koji su razvijeni i ustupljeni za potrebe ovog istraživanja od strane fondacije „Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek“ (DLO) - Praktijkonderzoek Plant & Omgeving/ Plant Research International (PPO/PRI), Plant Breeding, Wageningen, The Netherlands, prethodno korišteni za slična istraživanja (Esselink i sur., 2003). Preliminarno su testirana 23 SSR primera korištena u studiji Esselink i sur. (2003), a za konačnu analizu je odabrano njih 6 (RhO517, RhAB15, RhD201, RhEO506, RhP507, Rh1402). PCR reakcija provedena je prema protokolu Esselink i sur. (2003). Za razdvajanje i vizualizaciju amplificiranih fragmenata korišten je kapilarni sekvencer ABI-3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD) i Gene Mapper 4.0 software.

Broj alela, genska raznolikost (Nei, 1978) i F statistika (Weir i Cockerham, 1984) izračunati su upotrebom računalnog programa SPAGeDI 1.3 (Hardy i Vekemans, 2002). Analiza molekularne varijance prema SMM

pristupu (Excoffier i sur., 1992), izračunata je upotrebom računalnog programa GenoType (Meirmans i Van Tienderen, 2004), uz primjenu 1000 permutacija. Klaster analiza na osnovu Jaccard-ovog koeficijenta sličnosti provedena je u računalnom programu NTSYS (Rohlf, 1993), a bazirana je na UPGMA algoritmu. Vizualizacija genetičke udaljenosti u formi dendrograma izvršena je u računalnom programu MEGA 5 (Tamura i sur., 2011). Multivarijatna analiza FCA (faktorijalna korespondentna analiza) provedena je primjenom „dudi.coa“ procedure u R 2.15.2 (R Core Team, 2012) po preporuci Muller i McCusker (2009). Navedeni pristup je prethodno korišten u analizi rezultata genetičke karakterizacije heksaploidne šljive (Halapija Kazija i sur., 2014; Sehic i sur., 2015). Grafički prikaz rezultata FCA napravljen je upotrebom rgl paketa verzija 0.93.945 (Adler i Murdoch, 2013) u istom statističkom programu.

## REZULTATI I RASPRAVA

### *Pomološka analiza agronomski važnih svojstava*

Prosječne vrijednosti dvogodišnjih mjerenja pomoloških svojstava triju populacija (P1, P2, P3) kao i prosječna odstupanja od srednje vrijednosti izražena koeficijentom varijacije i prikazane su u Tablici 1.

Prosječne vrijednosti za svojstvo dužine ploda kreću se od 14,73 do 20,69 mm, za širinu ploda od 9,45 do 10,88 mm, za masu ploda od 1,31 do 1,48 g, za masu mesa ploda od 0,83 do 0,93 g, za randman mesa od 61,4 do 64,12%, za indeks oblika 1,6 do 2 i za ukupnu suhu tvar 24,84 do 29,46%. Prema rezultatima analize varijance i primijenjenog Tukey-ovog testa, prosječne vrijednosti svih analiziranih svojstava značajno se razlikuju kod sve tri populacije osim za svojstva mase ploda i mase mesa ploda te ukupne suhe tvari gdje nema statistički značajne razlike između populacija P2 i P3 (Tablica 1). Najveće prosječne vrijednosti za svojstva dužine, širine, mase ploda i indeksa oblika ima populacija P3, za svojstva mase mesa ploda i randmana mesa populacija P2, a za ukupnu suhu tvar populacija P1. Najveći koeficijent varijacije za svojstva mase ploda, mase mesa ploda, randmana mesa i indeksa oblika ima populacija P3, za svojstva dužine i širine ploda populacija P1, a za ukupnu suhu tvar populacija P2.

Utvrđena je statistički značajna razlika između svih triju populacija u obje godine za svojstva dužine ploda i indeksa oblika (Tablica 2). Nije utvrđena statistički značajna razlika između populacija P2 i P3 za svojstvo mase ploda i mase mesa ploda.

U 2010. godini sva ispitivana pomološka svojstva (Tablica 2) imala su veće vrijednosti u odnosu na 2012., osim svojstava dužine i širine ploda u populacijama P1 i P2. To bi se moglo objasniti utjecajem ekoloških faktora, prvenstveno količine oborina u vegetaciji koja je u 2012.

godini bila manja za čak 205,8 mm u odnosu na 2010. godinu. U takvim uvjetima smanjena je produktivnost biljke što se jasno očituje i u manjoj masi mesa ploda i manjoj topljivoj suhoj tvari (Tablica 2). Slične su rezultate dobili i Ugglja i sur. (2003) u trogodišnjim istraživanjima *Rosa dumalis* subsp. *coriifolia*, *R. dumalis* subsp. *dumalis*, *R. rubiginosa* i *R. villosa* subsp. *mollis* prikupljenih sa 23 lokaliteta, u kojima je masa ploda bila smanjena u sušnoj 1995. godini. Suša nije utjecala na dužinu ploda koja se tek neznatno razlikuje u odnosu na 2010 godinu, ali je utjecala

**Table 2.** Mean values of pomological traits and coefficient of variation (in parenthesis) for analyzed populations. Jazbina 2010 and 2012.

**Tablica 2.** Prosječna vrijednost pomoloških svojstava i koeficijent varijacije (u zagradama) populacija po godinama. Jazbina 2010. i 2012.

Offspring	Fruit length (mm)	Fruit width (mm)	Fruit mass (g)	Fruit flesh mass (g)	Fruit flesh ratio (%)	Fruit shape index	Dry matter (%)
Potomstvo	Dužina ploda (mm)	Širina ploda (mm)	Masa ploda (g)	Masa mesa ploda (g)	Randman mesa (%)	Indeks oblika ploda	Suha tvar (%)
2010							
P1 (n=200)	13,32 <sup>c</sup>	7,59 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	0,95 <sup>b</sup>	63,13 <sup>b</sup>	1,78 <sup>c</sup>	34,24 <sup>a</sup>
(RC2-RC12)	(13,56)	(16,02)	(26,12)	(26,21)	(5,92)	(13,6)	(4,76)
P2 (n=220)	18,98 <sup>b</sup>	9,84 <sup>b</sup>	1,65 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	66,73 <sup>a</sup>	1,98 <sup>b</sup>	29,12 <sup>b</sup>
(RC13-RC23)	(21,03)	(26,44)	(19,58)	(19,99)	(6,12)	(15,72)	(9,66)
P3 (n=219)	21,13 <sup>a</sup>	11,08 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a</sup>	1,08 <sup>a</sup>	62,88 <sup>b</sup>	2,08 <sup>a</sup>	27,84 <sup>b</sup>
(RC24-RC34)	(17,17)	(26,17)	(25,81)	(25,75)	(8,19)	(37,81)	(10,36)
2012							
P1 (n=200)	16,14 <sup>c</sup>	11,3 <sup>a</sup>	1,13 <sup>b</sup>	0,71 <sup>b</sup>	63,09 <sup>a</sup>	1,43 <sup>c</sup>	24,67 <sup>a</sup>
(RC2-RC12)	(14,77)	(10,16)	(30,3)	(31,82)	(6,67)	(9,95)	(16,5)
P2 (n=220)	19,28 <sup>b</sup>	11,05 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>	61,52 <sup>b</sup>	1,76 <sup>b</sup>	21,05 <sup>b</sup>
(RC13-RC23)	(12,09)	(9,82)	(23,72)	(24,44)	(7,19)	(14,07)	(17,13)
P3 (n=219)	20,22 <sup>a</sup>	10,65 <sup>b</sup>	1,23 <sup>a</sup>	0,7 <sup>3ab</sup>	59,78 <sup>c</sup>	1,92 <sup>a</sup>	21,54 <sup>b</sup>
(RC24-RC34)	(16,78)	(11,97)	(31,24)	(30,88)	(9,53)	(18,68)	(15,03)

<sup>a,b,c</sup> Average values followed by the same letter within the same year are not statistically different according to Tukey test for probability level  $P \leq 0,05$ .

<sup>a,b,c</sup> Prosječne vrijednosti svojstva koje prati isto slovo u jednoj godini nisu statistički značajne prema Tukey testu uz razinu značajnosti  $P \leq 0,05$ .

na širinu ploda koja je manja u populaciji P1 u 2010. godini (Tablica 2). To bi se moglo objasniti specifičnom reakcijom populacije P1 na klimatske čimbenike, s obzirom da ona potječe s otoka Korčule, a istraživanje je provedeno u uvjetima kontinentalne klime.

Populacija P1 imala je veći koeficijent varijacije u 2012. za svojstva dužine, mase ploda, mase mesa ploda, randmana mesa i ukupne suhe tvari, a u 2010. za svojstva širine ploda i indeksa oblika. Populacija P2 u 2012. imala je veći koeficijent varijacije za svojstva mase ploda, mase mesa ploda, randmana i ukupne suhe tvari, a u 2010. za dužinu i širinu ploda te indeks oblika. Populacija P3 imala je veći CV za ista svojstva u obje godine kao i populacija P2.

Slike 1-6 prikazuju prosječne vrijednosti pomoloških svojstava genotipova ispitivanih populacija. Prosječne vrijednosti dužine ploda (Slika 1) kreću se od 12,69 mm do 24,32 mm pri čemu je najmanja varijacijska širina genotipova populacije P1 (12,69-15,69 mm), a najveća kod P3 (17,47-24,32 mm).

Najveći raspon za svojstvo širine ploda (Slika 2) uočljiv je kod genotipova populacije P3 (6,95-12,87 mm), najmanji kod P1 (8,28-10 mm). Najviše vrijednosti za ova dva svojstva pokazuje genotip RC29.

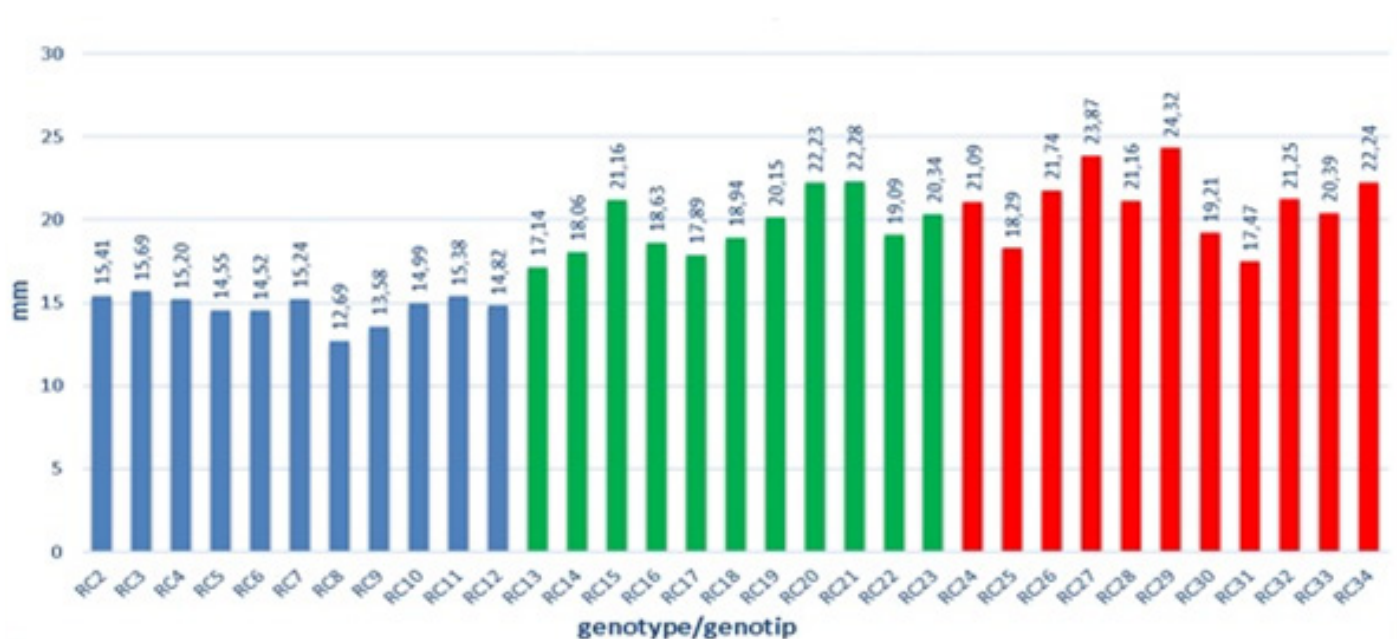
U pogledu indeksa oblika (Slika 3) najveći raspon vrijednosti imaju genotipovi populacija P3 (1,52-3,14), najmanji P1 (1,47-1,72). Najveći indeks oblika ima genotip RC28.

Prosječne vrijednosti dužine i širine ploda te indeksa oblika pokazuju veći raspon kod kontinentalnih populacija (P2, P3) u odnosu na mediteransku (P1). Primjetno je veće variranje svojstava dužine i širine ploda te indeksa oblika u kontinentalnim populacijama (P2, P3) u odnosu na mediteransku (P1). Najveće vrijednosti za svojstva dužine i širine ploda ima genotip RC29. Prema podacima istraživanja kvalitete ploda kod Rosa vrsta u Mađarskoj za 1996. i 1997. koje iznose Kovács i sur. (2000), prosječna dužina ploda bila je 24,44 i 21,18 mm, širina 13,41 i 13,9 mm, a indeks oblika 1,82 i 1,52. Güneş (2010) u istraživanju pomoloških i fenoloških svojstava Rosa spp.

genotipova, za vrstu *R. canina* dva najbolja genotipa imala su dvogodišnje prosjeke dužine (25,4 i 25,1 mm) i širine ploda (17,9 i 18,8 mm). Rezultati sličnog istraživanja svojstava autohtonih populacija Rosa spp. u Turskoj (Ercişli i Eşitken, 2004) provedena na 10.000 sjemenjaka pokazali su veće prosječne vrijednosti (dužina ploda 24,54-33,36 mm, širina ploda 15,04-19,69 mm). Ekincialp i Kazankaya (2012), Celik i sur. (2015) te Ersoy i Özen (2016) navode vlastite i podatke većeg broja autora s vrijednostima svojstava ploda koji su usporedivi s istraživanjima u Hrvatskoj. Istraživanja 68 genotipova vrste *R. canina* u njihovim prirodnim staništima u Rumunjskoj (Ghiorghiță i sur., 2012a) pokazala su prosječne vrijednosti dužine ploda u rasponu 16,49-26,22 mm, širine 10,92-16,8 mm i indeksa oblika 1,09-2,26 i navode da dužina i širina (promjer) ploda statistički pokazuju općenito nisku (ponekad prosječnu) varijabilnost. U drugom sličnom istraživanju u Rumunjskoj, Soare i sur. (2015) utvrdili su vrijednosti dužine ploda u rasponu od 14,2 do 24,9 mm, a širine od 9,1 do 14,4 mm. U ovom istraživanju koeficijent varijacije za dužinu ploda pokazao je nisku do srednju varijabilnost i kretao se između 5,37 i 18,54%, dok je koeficijent varijacije za širinu ploda imao nisku do visoku varijabilnost (7,13–24,25%). Prema istim autorima, dužina ploda je svojstvo s visokom varijabilnošću. Iz svega navedenog može se zaključiti da je krupnoća ploda ispitivanih genotipova (izražena kroz dužinu i širinu) u ovom istraživanju unutar raspona utvrđenih u drugim relevantnim zemljama.

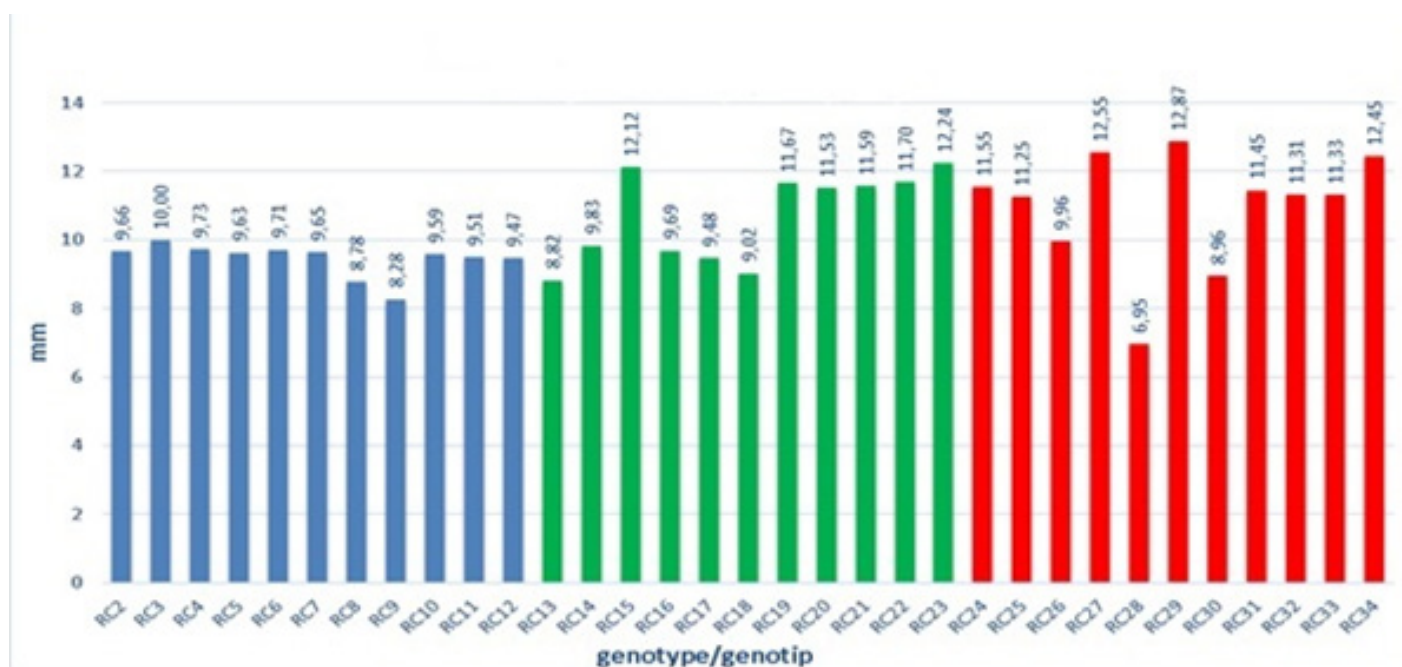
Masa ploda i sadržaj mesa važne su komponente priroda. Najveću varijacijsku širinu za svojstvo mase ploda (Slika 4) ima populacija P3 (1,06-1,93 g), a najmanju P2 (1,29-1,57 g). Svojstvo mase mesa ploda (Slika 5) također ima najveće variranje kod populacije P3 (0,67-1,21 g), a najmanje kod P2 (0,81-1,04 g). Najveću ujednačenost u ovim svojstvima pokazuje populacija P2. Najviše vrijednosti za ova svojstva pokazuju genotipovi RC 29, RC26 i RC27 (P3).

Najda i Buczkowska (2013) navode da težina ploda može varirati u širokom rasponu od 0,95 do 3,27 g, a na njih utječu mnogi čimbenici kao što su: vrsta, sorta, uvjeti



**Figure 1.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations fruit length (mm) from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

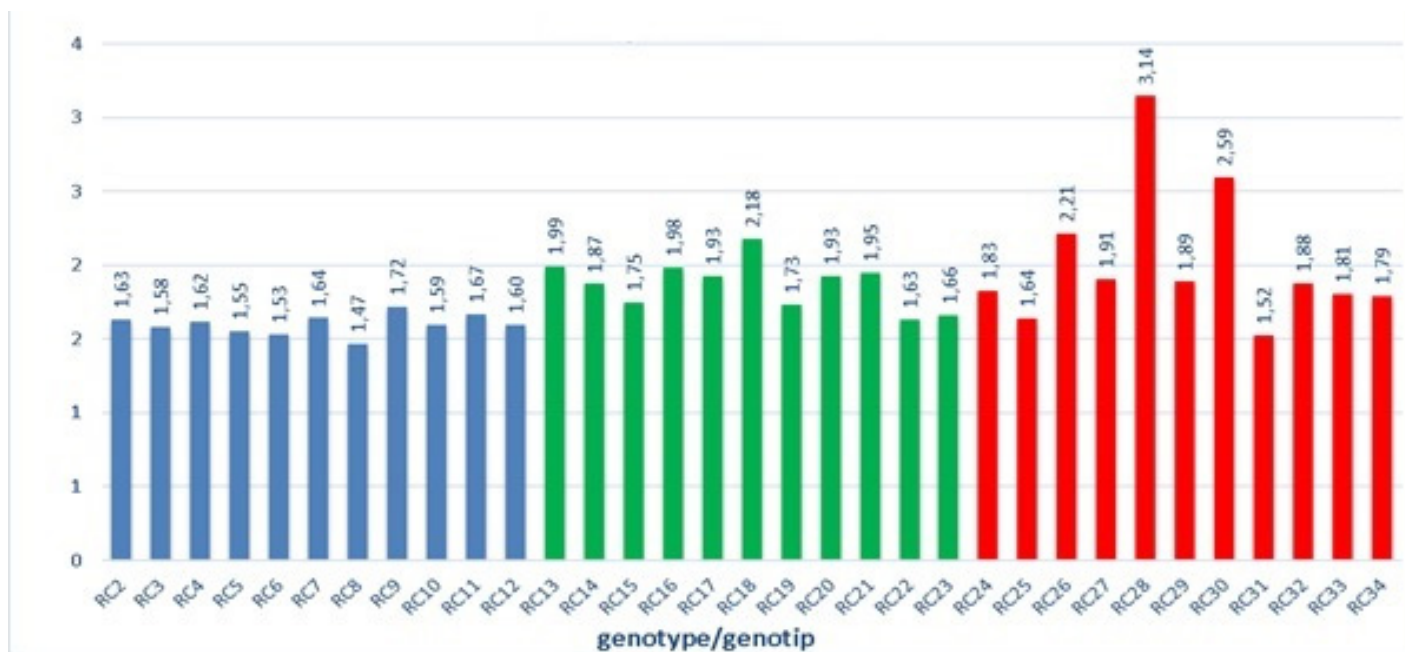
**Slika 1.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo dužine ploda (mm), različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.



**Figure 2.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations fruit width (mm) from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

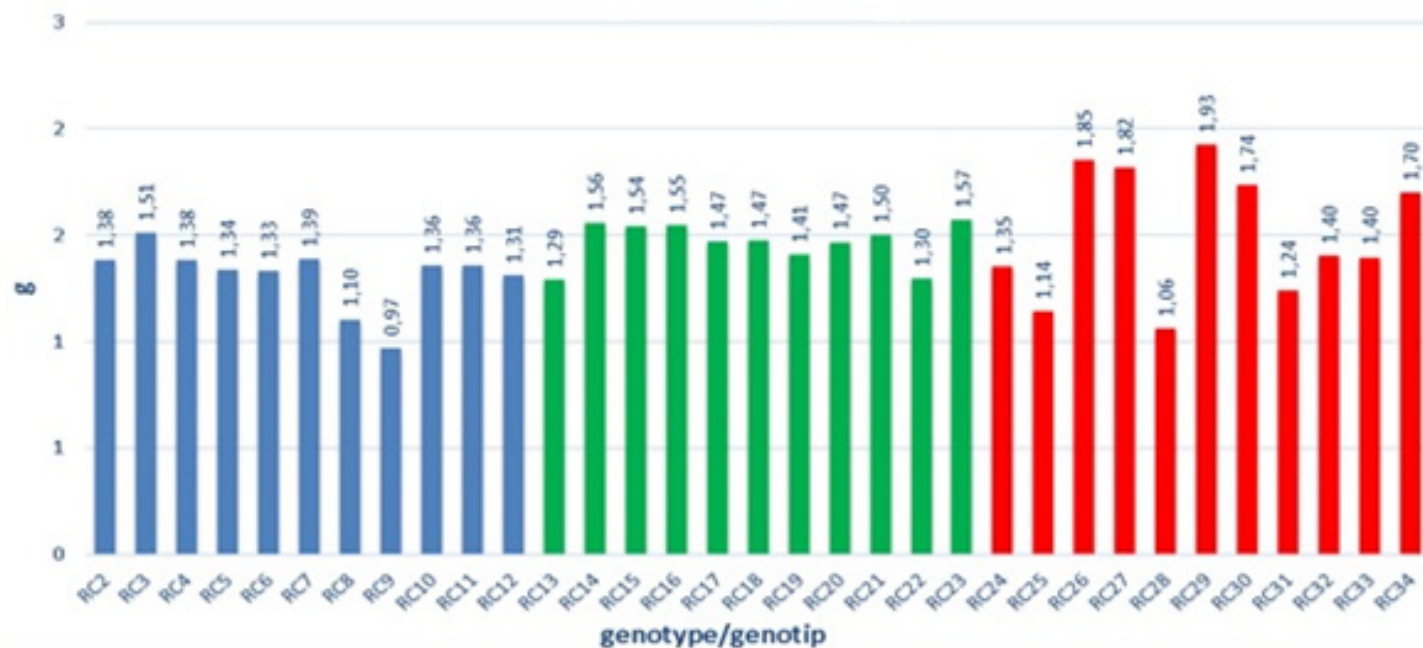
**Slika 2.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo širine ploda (mm), različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.





**Figure 3.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations fruit shape index from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

**Slika 3.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo indeksa oblika, različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.



**Figure 4.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations fruit width (mm) from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

**Slika 4.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo širine ploda (mm), različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.

uzgoja i lokacija. Za vrstu *R. canina* Kovács i sur. (2000) navode dvogodišnje prosjeke težine ploda 1,59 i 2,06 g. Dvogodišnji prosjeci za težinu ploda koje navodi Güneş (2010) za ovu vrstu iznose 3,7 i 5,1 g. Ercişli i Eşitken (2004), iznose prosječne vrijednosti *Rosa* vrsta u Turskoj koje se kreću u rasponu 3,15–4,8 g. Soare i sur. (2015) utvrdili su vrijednosti mase ploda u rasponu 1,06–2,74 g pokazujući srednju do vrlo visoku varijabilnost (9,98–41,87%).

Razlike u vrijednostima pripisuju se razlikama u nadmorskoj visini i klimatskim uvjetima na istraživanim lokacijama. Istraživanja rumunjskih genotipova divlje ruže (Ghiorghiță i sur., 2012a) imala su prosječne vrijednosti mase ploda 1,33–3,23 g.

Isti autori navode da je masa ploda parametar koji ima prosječnu do visoku varijabilnost. Prema Ghiorghiță i sur. (2012b), plodovi s najvećom prosječnom masom (iznad 2,8 g po plodu) sadržavali su manje količine vitamina C.

Uspoređujući sve ovo s rezultatima našeg istraživanja vidljivo je da su prosječne vrijednosti mase ploda hrvatskih populacija ispod ili blizu prosjeka većine gore navedenih vrijednosti.

Kako se plodovi divlje ruže najčešće prerađuju, randman mesa predstavlja ekonomski važno svojstvo. Vrijednosti za masu mesa ploda izražene kao postotak čistog mesa u odnosu na masu ploda (randman) kreću se u rasponu od 56,21 do 68,23% (Slika 5). Obje ove ekstremne vrijednosti imaju jedinke iz populacije P3 koja u ovom svojstvu pokazuje najveće variranje, međutim ujedno ima i najniži prosjek za ovo svojstvo. Najmanje variranje te signifikantno najvišu prosječnu vrijednost za randman mesa ima populacija P2 (Tablica 2, Slika 5). Među ispitivanim genotipovima najviše se izdvaja RC28 sa 68,23% randmana mesa, međutim ovaj genotip ima vrlo malu prosječnu masu ploda pa stoga nije interesantan s aspekta razmnožavanja ili korištenja u oplemenjivanju.

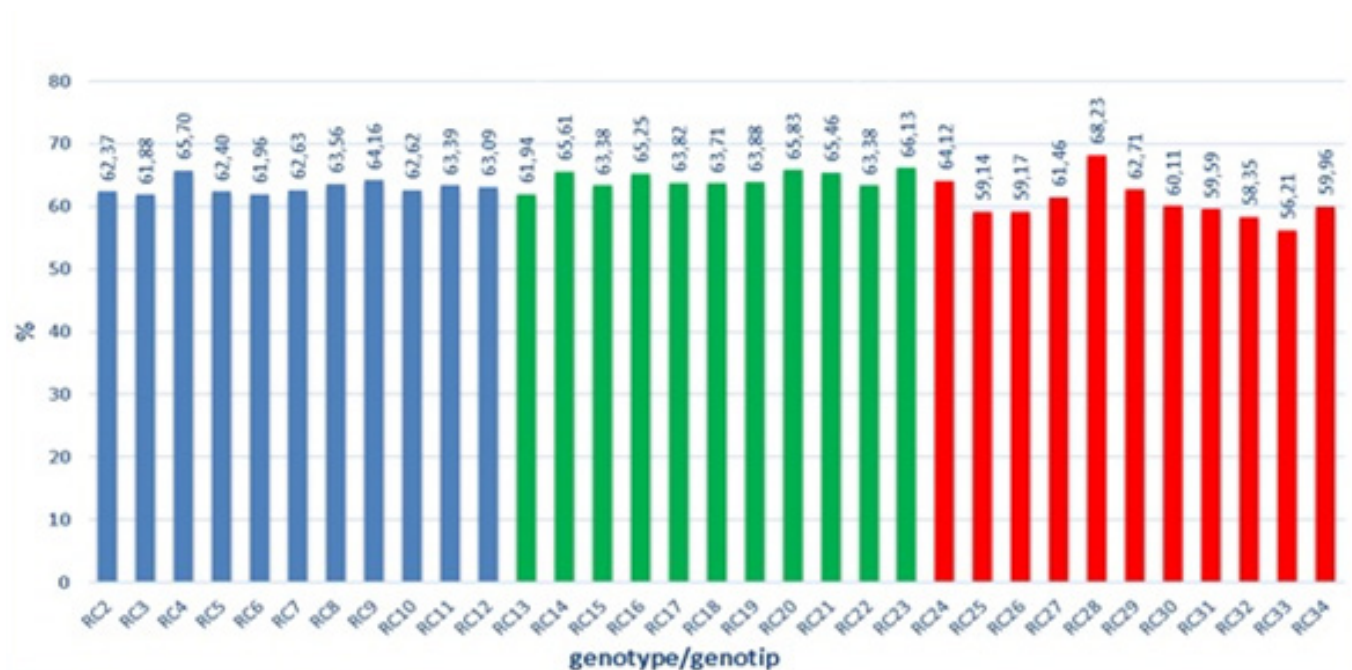
Prema Kovács i sur. (2000), prosječni randman mesa za vrstu *R. canina* u populacijama iz Mađarske iznosio je 62,66%, dok prema Ercişli i Eşitken (2004) prosječne vrijednosti randmana *Rosa* vrsta u Turskoj kreću se u 63,11–71,13%, a prema Güneş (2010) dvogodišnji prosjeci

iznose 73,6 i 77,9%. Güneş također prenosi podatke o randmanu kod *Rosa* vrsta koje iznosi Ugğla (2004), a koji se kretao između 65 i 70% te podatke većeg broja drugih autora iz Turske po kojima vrijednosti randmana mesa mogu varirati u širem rasponu, od 55 do 92%, uz obrazloženje da na randman mesa znatno utječu ekološki uvjeti i tehnologija uzgoja, posebno navodnjavanje.

Najveće variranje sadržaja ukupne suhe tvari ima populacija P3 (22,02–29,49%), a najmanje P2 (22,8–27,6%). Najviše vrijednosti za ovo svojstvo ima populacija P1 s genotipovima RC7 i RC2 kod kojih postotak ukupne suhe tvari prelazi 33% čime se značajno izdvajaju od ostalih genotipova (Slika 6).

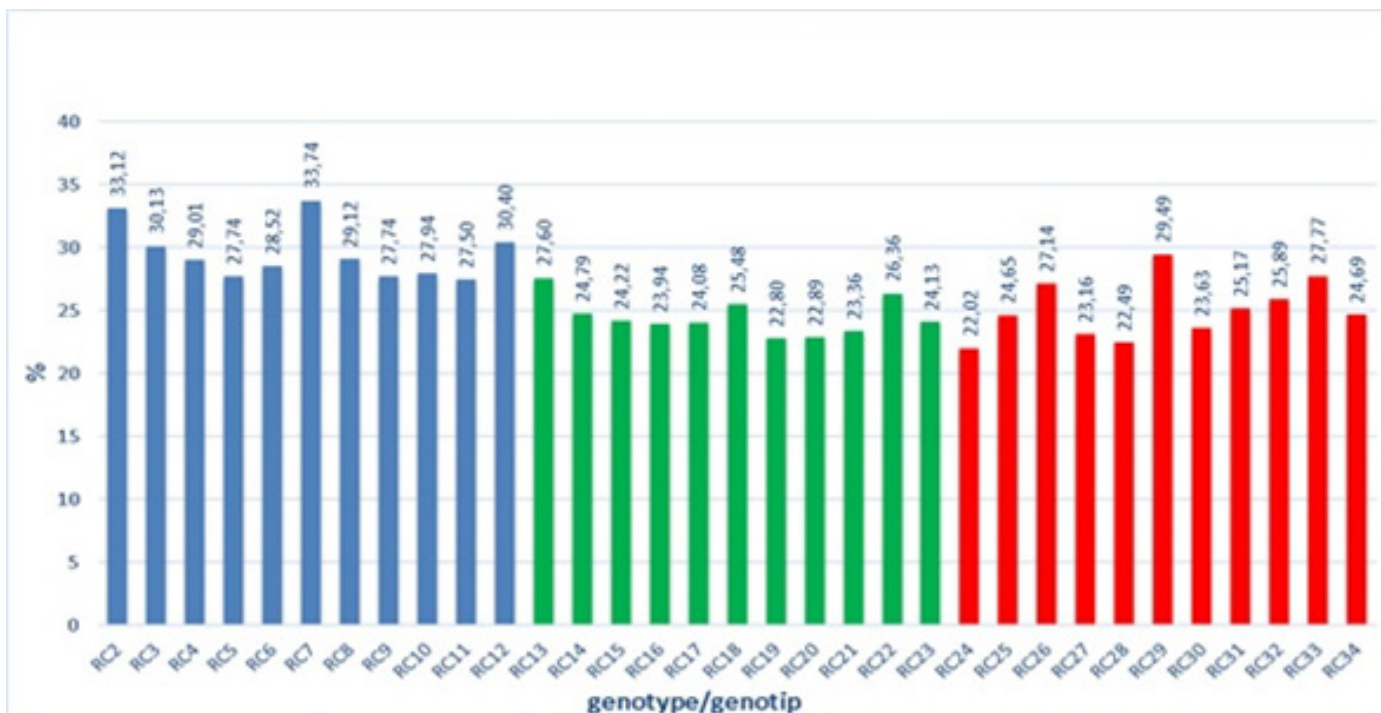
Ercişli i Eşitken (2004) u svom istraživanju *Rosa* spp. iznose prosječne vrijednosti za ukupnu suhu tvar 34,82–40,15%. Celik i sur. (2015) u istraživanju pomoloških i biokemijskih svojstava vrsta ovog roda utvrdili su sadržaj ukupne suhe tvari koji je varirao od 45,7 do 53,26%. Podaci o sadržaju ukupne suhe tvari koje su dobili Dogan i Kazankaya (2006) kretali su se u rasponu od 34,34 do 66,7%, a za vrstu *R. canina* iznosio je 49,72%. Ekincialp i Kazankaya (2012) za divlje ruže u turskoj regiji Hakkari dobili su vrijednosti ukupne suhe tvari u rasponu 43,63–59,39% dok su Ersoy i Özen (2016) dobili 32,44–56,94%, a Rosu i sur. (2011) za vrstu *R. canina* 27,53–49,9%. Vrijednosti sadržaja suhe tvari u našem istraživanju značajno su niže od turskih i rumunjskih populacija, a što vjerojatno proizlazi iz bitno različitih ekoloških uvjeta uzgoja.

Zaključno, populacija P3 pokazala je najveće variranje u većini pomoloških svojstava, a najbolje jedinke iz ove populacije imale su najviše vrijednosti agronomski važnih svojstava. Populacija P2 ukupno najmanje varira i posebno se ističe u visokim vrijednostima randmana mesa. Populacija P1 pokazuje općenito najniže vrijednosti analiziranih svojstava, sa izuzetkom najviše ukupne suhe tvari. Ukupno gledano, genotip RC29 (P3) u većini svojstava pokazuje najviše vrijednosti i mogao bi biti perspektivan kao početni materijal za vegetativno razmnožavanje i uzgoj te kao roditelj u postupku hibridizacije i daljnjeg oplemenjivanja.



**Figure 5.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations fruit flesh/mass ratio (%) from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

**Slika 5.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo randmana mesa (%), različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.



**Figure 6.** Average values of genotypes of P1 – P3 populations total dry matter (%) from ex situ field trial with three populations of different geographical origin: blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

**Slika 6.** Prosječne vrijednosti genotipova populacija P1 - P3 iz ex situ pokusa za svojstvo ukupne suhe tvari (%), različitog geografskog porijekla: plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.

Očekivano, prema UPGMA dendrogramu sačinjenom na temelju  $M_D$  udaljenosti izračunatih iz pomoloških svojstava (Slika 7), genotipovi RC2-RC12 iz populacije P1 (F1 potomstvo porijeklom s Korčule, grane plave boje) pokazuju najmanje međusobne razlike i formiraju zaseban klaster te se vizualno odvajaju od druge dvije populacije. Populacija P2 (Zagreb - Malešnica) s genotipovima RC13-23 (grane zelene boje) i populacija P3 (Prigorje Brdovečko) s genotipovima RC24-RC34 (grane crvene boje) pokazuju veću heterogenost te jedinke jedne populacije ulaze u subklaster druge.

#### Polimorfizam SSR markera i mogućnost razdvajanja jedinki i populacija

Izolacija DNA i lančana reakcija polimerazom (PCR) uzoraka divlje ruže pokazali su se zahtjevnim i nakon

nekoliko ponavljanja i više pokušaja optimizacije reakcija. I dok je u konačnici izolacija DNA bila uspješna, samo 6 od ukupno 23 testiranih SSR primera dalo je zadovoljavajuću reproducibilnost i kvalitetu fragmenata za potrebe analize polimorfizma ispitivanih populacija. Kod svih šest mikrosatelitskih lokusa detektirano je više od dva različita alela po lokusu, kod većine uzoraka. Najveći broj alela po lokusu jednog genotipa uočen je kod lokusa RhEO506, i to pet različitih alela kod svih analiziranih uzoraka. S obzirom na heterogamnu mejozu prisutnu unutar ove vrste, detektirana poliploidnost SSR markerima bila je očekivana.

Genetičkom karakterizacijom 33 jedinke divlje ruže ukupno je amplificirano 47 alela ili 7,8 alela po lokusu (Tablica 3). Detektirani broj alela je malo veći od 6,45 alela po lokusu koliko su u svom istraživanju utvrdili Esselink i

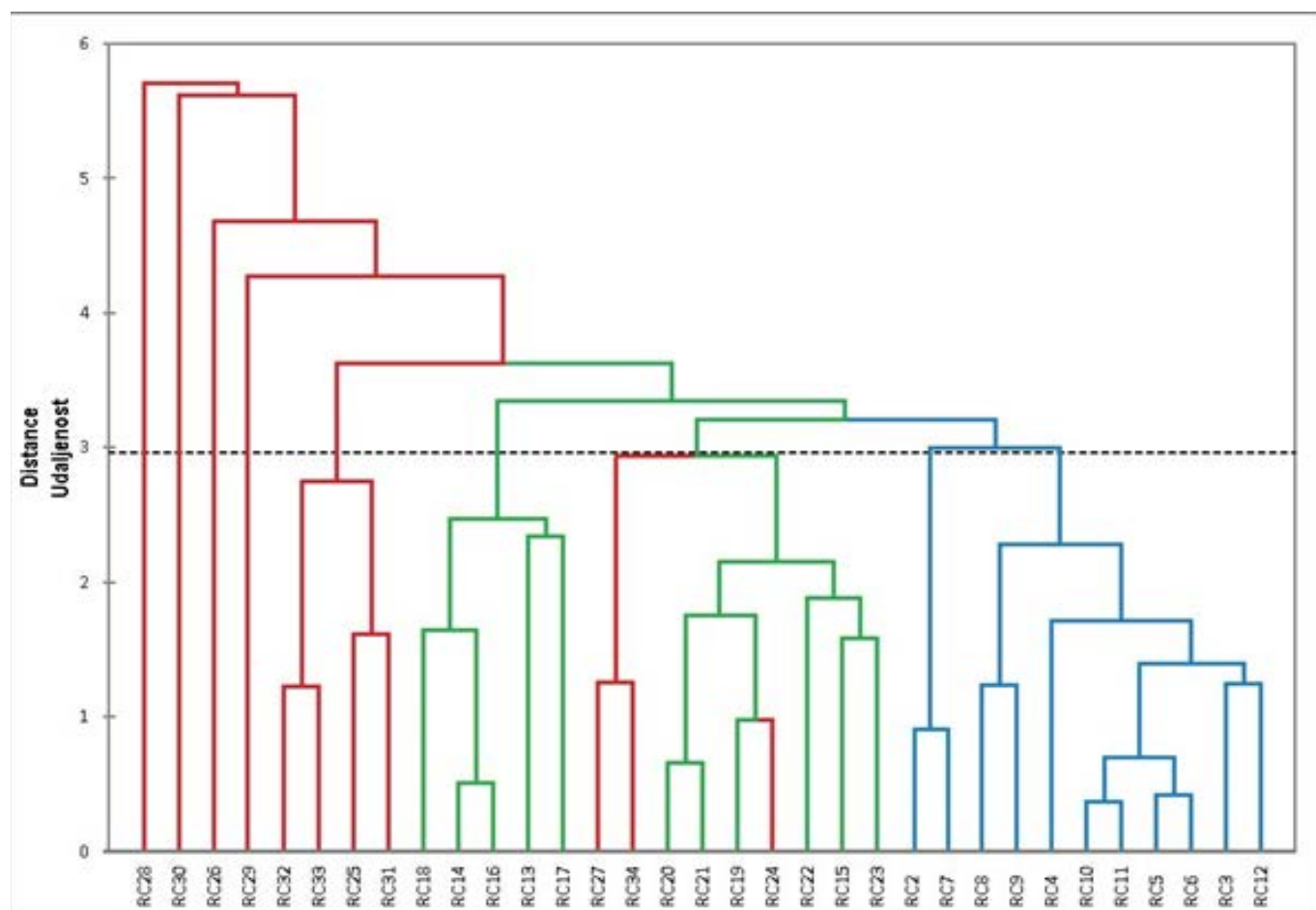


Figure 7. UPGMA dendrogram based on Mahalanobis distance in pomological traits among analyzed F1 genotypes belonging to three different populations (P1, P2, P3) of dogrose (*Rosa* sp.): blue – P1; green – P2 and red – P3 (see Table 1). Jazbina, 2010 and 2012.

Slika 7. UPGMA dendrogram na temelju Mahalanobisove udaljenosti pomoloških svojstava F1 potomaka iz tri ispitivane populacije (P1, P2, P3) divlje ruže (*Rosa* sp.): plava – P1; zelena – P2 i crvena – P3 (vidi Tablicu 1). Jazbina, 2010. i 2012.

**Table 3.** Genetic variation estimates at six SSR loci for total set of 33 analyzed genotypes and for particular offsprings (P1, P2 and P3) of dog rose (*Rosa* spp.) from Croatia**Tablica 3.** Pokazatelji genetske varijabilnosti na šest SSR lokusa za ukupni set analiziranih genotipova (n=33) i pojedine skupine generativnih potomaka tri populacije (P1, P2 i P3) divlje ruže (*Rosa* spp.) iz Hrvatske

SSR locus	No. of alleles	Range	Gene diversity			
SSR lokus	Broj alela	Raspon (bp)	Genski diverzitet			
			Total / Ukupno	P1	P2	P3
RhO517	3	274/280	0,65	0,52	0,69	0,69
RhAB15	8	118/217	0,8	0,74	0,76	0,69
RhD201	13	160/260	0,84	0,79	0,69	0,77
RhEO506	11	111/260	0,85	0,85	0,82	0,82
RhP507	9	111/228	0,79	0,81	0,66	0,77
Rh1402	3	215/228	0,6	0,69	0,55	0,53
Average / Prosjek	7,8		0,76	0,74	0,69	0,71

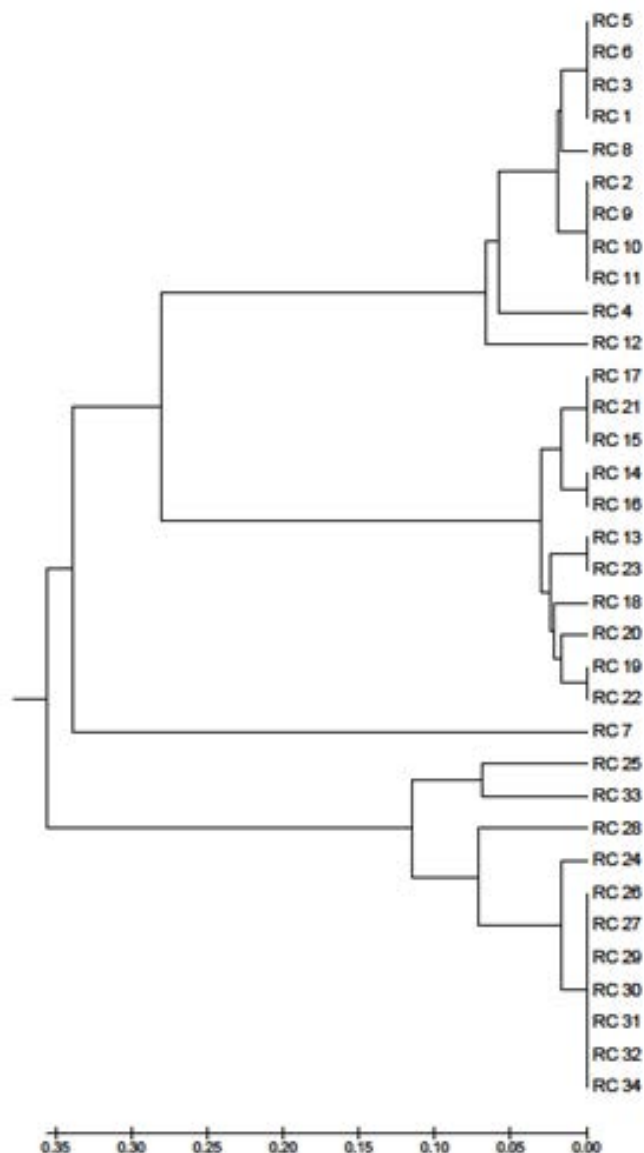
sur. (2003), u studiji gdje je genotipizirano 14 jedinki *R. canina* iz Nizozemske analizom 24 SSR lokusa.

Nešto veće vrijednosti (10,7 alela) su utvrdili Samiei i sur. (2010) analizom 33 genotipa *R. canina* iz Irana upotrebom 10 SSR markera. U pogledu broja alela po lokusu, najveći stupanj polimorfizma uočen je kod SSR lokusa RhD201 (13 različitih alelnih varijanti), a najmanji kod lokusa RhO517 i Rh1402 (dvije alelne varijante). Genski diverzitet, izračunat za sve 33 jedinke, iznosio je 0,76. Navedeni parametar pokazao je najveću vrijednost za populaciju P1 (0,74), a najmanju za P2 (0,69). Vrijednosti za dati parametar dosta su slične (0,8) utvrđenima od strane Samiei i sur. (2010). Općenito govoreći, genski diverzitet izračunat za jedinke uključene u ovu studiju može se smatrati relativno visokim, posebno kada se uzme u obzir da potomci *R. canina* često pokazuju identičan SSR profil majčinskim biljkama, kao rezultat apomiksisa (Nybom i sur., 2004).

Ipak, uvidom u varijabilnost pomoloških svojstava jedinki sa identičnim genotipom na 6 SSR lokusa unutar pojedinih populacija, evidentno je postojanje velikog variranja pomoloških svojstava takvih jedinki. Kako se u slučaju apomiksisa očekuje identičan genotip, pa time

i slične vrijednosti pomoloških svojstava (apomiksisa je ekvivalentan vegetativnom razmnožavanju), očito je da bar neki genotipovi ovih subklastera proizlaze iz dvostruke oplodnje. Uniforman genotip na 6 SSR lokusa mogao bi u tom slučaju biti posljedica nedovoljnog broja polimorfničkih SSR lokusa kao posljedica heterogamne (matroklinalne) mejoze koja je već ranije uočena kod divlje ruže, a za posljedicu ima različite generativne potomke koji više sličje majci (Fedorova i sur., 2010), ali su ipak različitog genotipa.

UPGMA klaster analiza, provedena na osnovu Jaccard-ovog koeficijenta sličnosti, jasno je razdvojila tri skupine generativnih potomaka (Slika 8), te je unutar svake uočen veći broj jedinki sa identičnim SSR profilom. Iznimka je genotip RC7 (P1) koji je izdvojen iz svoje populacije, ali nije uključen ni u jednu drugu. Ovo je vjerojatno posljedica nedovoljne kvalitete DNA uzorka zbog čega su kod ovog genotipa uspješno amplificirani i očitani fragmenti za samo tri SSR lokusa. Od 11 jedinki iz svake skupine potomaka, kod potomstva matičnih biljaka sa Korčule (P1) i Prigorja Brdovečkog (P3) utvrđeno je po pet jedinstvenih SSR profila, dok je kod potomaka matične biljke iz Zagreb-Malešnice (P2) utvrđeno šest različitih



**Figure 8.** Cluster analyses (UPGMA) of dogrose F1 seedlings (P1, P2, P3) (*Rosa* spp.) based on polymorphisms of SSR data using Jaccard's similarity coefficient

**Slika 8.** UPGMA dendrogram F1 generativnih potomstava (P1, P2, P3) divlje ruže (*Rosa* spp.) prema Jaccardovom koeficijentu sličnosti na temelju SSR markera

SSR profila iako je genski diverzitet kod ove skupine bio najmanji. Visok udio jedinki sa identičnim SSR profilom, unutar skupina generativnih potomaka, ukazuje da su isti vjerojatno nastali kroz apomiksis, inače prisutan kod divlje ruže (Wisseman i Hellwig, 1997; Werlemark, 2000).

Koeficijent  $F_{st}$  (Weir i Cockerham, 1984), kao mjera genetičke diferencijacije između analiziranih skupina genotipova, za svih šest lokusa bio je izražen i statistički značajan ( $F_{st}=0,1051$ ;  $P<0,0001$ ). Stupanj diferencijacije između svake pojedinačne skupine potomaka ispitan

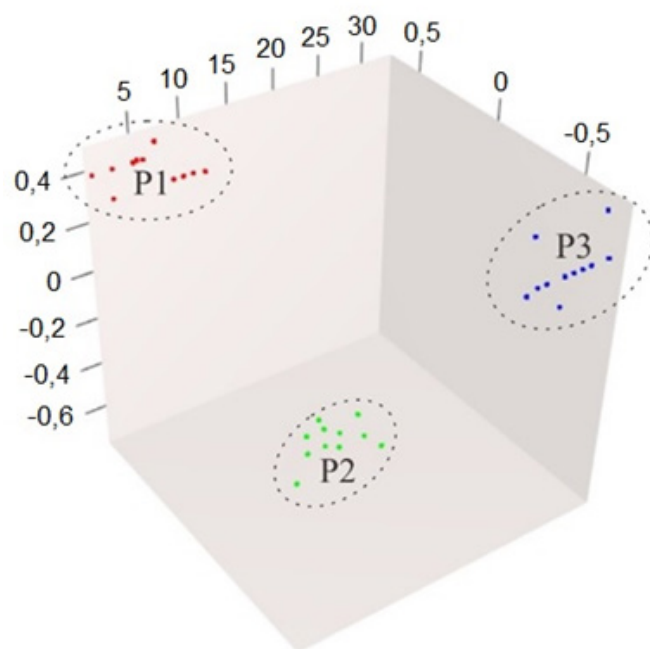
je upotrebom analize molekularne varijance (AMOVA) (Tablica 4). Rezultati ove analize ukazuju na sličan stupanj genetičke diferencijacije, kao i kod  $F_{st}$ -a, te da je ova diferencijacija ravnomjerno raspoređena između sve tri analizirane skupine. Slično visoke vrijednosti  $F_{st}$ -a uočene su između uzgojenih hibrida ruže i divljih vrsta ruže, koje se koriste kao podloge ( $F_{st}=0,081-0,132$ ) (Vukosavljev i sur., 2013). U navedenoj studiji analizirano je 138 različitih vrsta ruža upotrebom 24 SSR markera. Visok stupanj genetičke diferencijacije između tri skupine

**Table 4.** Analysis of molecular variance (AMOVA) based on six SSR loci for three groups of dog rose (*Rosa* spp.) generative offspring**Tablica 4.** Analiza molekularne varijance (AMOVA), provedena na osnovu šest SSR lokusa, za tri skupine generativnih potomaka divlje ruže (*Rosa* spp.)

Source of variation	SS	Variance components	Total variance (%)	F	P
Izvor varijacije		Komponente varijance	Ukupna varijanca (%)		
Within groups Unutar skupina	1	10,16	99,6	0,996	>0,001
P1/P2					
Between groups Između skupina	20	0,04	0,4		
Within groups Unutar skupina	1	11,14	99	0,99	>0,001
P1/P3					
Between groups Između skupina	20	0,11	1		
Within groups Unutar skupina	1	10,43	98,6	0,986	>0,001
P2/P3					
Between groups Između skupina	20	0,15	1,4		

generativnih potomaka divlje ruže ukazuje na izraženu genetičku divergentnost matičnih biljaka.

Faktorijalnom korespondentnom analizom, provedenom na molekularnim podacima, utvrđeno je jasno razdvajanje između pojedinih skupina generativnih potomaka (Slika 9), a što je u skladu sa dobivenim rezultatima UPGMA klaster analize, Fst-a i AMOVA-e. Interesantno je uočiti da iako je populacija P1 podrijetlom od matične biljke uzorkovane sa otoka Korčule, potomci iste se podjednako diferenciraju od druge dvije populacije s područja kontinentalne Hrvatske. U cjelini, molekularni rezultati ukazuju na značajnu divergentnost germplazme divlje ruže s područja Hrvatske.

**Figure 9.** Factorial multivariate analysis (FCA) based on SSR data for three groups of dog rose (*Rosa* spp.) generative offspring

**Slika 9.** Multivarijatna analiza FCA (faktorijalna korespondentna analiza) na temelju SSR podataka za tri skupine generativnih potomaka divlje ruže (*Rosa* spp.)

## ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje obuhvatilo je analizu pomoloških svojstava i polimorfizma SSR markera tri F1 populacije porijeklom od matičnih biljaka uzetih sa tri lokacije iz dvije različite geografske regije, a koje su analizirane kroz dvije godine u *ex situ* uvjetima na eksperimentalnoj stanici Jazbina (Zagreb). Pomoću SSR markera uspješno su razdvojene sve tri populacije generativnih potomaka, ali upotrijebljeni set markera nije bio dostatan za razdvajanje svih jedinki unutar pojedinih populacija. Analiza pomoloških svojstava omogućila je potpuno razdvajanje samo P1 populacije mediteranskog podrijetla. Najveća varijabilnost, kao i najpoželjnija agronomska svojstva utvrđeni su unutar populacije P3, iz koje potječe i genotip RC29 koji za većinu agronomski važnih svojstava pokazuje najviše vrijednosti. Usporedbom dobivenih rezultata sa vrijednostima agronomskih svojstava populacija istraživanih u drugim zemljama u kojima je divlja ruža gospodarski značajna vrsta zaključujemo da bi selekcijom i hibridizacijom perspektivnih genotipova divljih ruža iz Hrvatske bilo moguće kreirati vegetativno razmnožene populacije i sorte prikladne za komercijalni uzgoj.

## ZAHVALE

Ovaj rad proistekao je iz istraživanja za doktorsku disertaciju unutar projekta „Genetička identifikacija i genetska varijabilnost sorti vinove loze i voćaka” (MZOS: 178-1781844-1925).

Zahvaljujemo profesorici Eddi Lattanzi (La Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Biologia Ambientale, Italia) koja je izvršila i nadzirala taksonomsko određivanje primki divljih ruža prikupljenih za ovu studiju (nisu sve prikazane u ovom radu).

Posebno se zahvaljujemo zakladi Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) - the research institute Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International (PPO/PRI), Plant Breeding, Wageningen, The Netherlands, koja je osigurala sekvence početnica za ovo istraživanje.

## LITERATURA

- Adler, D., Murdoch, D. (2013) Rgl: 3D visualization device system (Open GL) (RPackage Version 0.93.945) Available at: <http://rgl.neoscientists.org>
- Allkin, B., Lughadha, E. N., Paton, A., Magill, B., Miller, C. (2013) The plant list. [Online] Available at: [www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)
- Celik, F., Kazankaya, A., Ercisli, S. (2009) Fruit characteristics of some selected promising rose hip (*Rosa* spp.) genotypes from Van region of Turkey. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (3), 236-240.
- Celik, F., Kazankaya, A., Dogan, A., Gundogdu, M., Cangı, R. (2015) Some pomological and biochemical properties of rose hip (*Rosa* spp.) Germplasm. *Acta Horticulturae*, 1089, ISHS, 287-293.
- De Cock, K., Vander Mijnsbrugge, K., Breynne, P., Van Bockstaele, E., Van Slycken, J. (2008) Morphological and AFLP-based differentiation within the taxonomical complex section *Caninae* (subgenus *Rosa*). *Annals of Botany*, 102 (5), 685-697.
- Dogan, A., Kazankaya, A. (2006) Fruit properties of rose hip species grown in lake Van basin (Eastern Anatolia region). *Asian Journal of Plant Sciences*, 5 (1), 120-122.
- Ekinçalp, A., Kazankaya, A. (2012) Determination of some physical and chemical properties in rosehip (*Rosa* spp.). Genotypes in Hakkari Region. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü*, Van, 22 (1), 7-11.
- Ercisli, S., Eşitken, A. (2004) Fruit characteristics of native rose hip (*Rosa* spp.) selections from the Erzurum province of Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32, 51-53.
- Ercisli, S. (2005) Rose (*Rosa* spp.) germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 787-795.
- Ersoy, N., Özen, M. S. (2016) Some physico-chemical characteristics in fruits of rose hip (*Rosa* spp.) Genotypes from Bolu Province in Western Part of Turkey. *Agro-knowledge Journal*, 17, (2), 191-201.
- Esselink, G. D., Smulders, M. J. M., Vosman, B. (2003) Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics*, (106), 277-286.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2), 479-491.
- Fedorova, A. V., Schanzer, I. A., Kagalo, A. A. (2010) Local differentiation and hybridization in wild rose populations in Western Ukraine. *Wulfenia*, (17), 99-115.
- Ghiorghiță, G., Maftai, D. E., Nicuță, D., Rați, I. V. (2012a) Study of several parameters in *Rosa canina* L. genotypes from native habitats in Romania and the in vitro response of this species. *Academy of Romanian Scientists, Annals Series on Biological Sciences*, 1 (1), 91-109, 2285-4177.
- Ghiorghiță, G., Antohe, N., Rați, I. V., Maftai, D. E. (2012b) The study of some parameters of *Rosa canina* L. genotypes from different native populations and from the same population. *Analele Științifice ale Universității „Al. I. Cuza” Iași s. II a. Biologie vegetală*, 58 (1) 19-27.
- Güneş, M. (2010) Pomological and phenological characteristics of promising rose hip (*Rosa*) genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 9 (38), 6301-6306.
- Halapija Kazija, D., Jelačić, T., Vujević, P., Milinović, B., Čiček, D., Biško, A., Pejić, I., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M., Pecina, M., Nikolić, D., Grahić, J., Drkenda, P., Gaši, F. (2014) Plum germplasm in Croatia and neighbouring countries assessed by microsatellites and DUS descriptors. *Tree Genetics & Genomes*, 10 (3), 761-778. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11295-014-0721-5>



- Hardy, O. J., Vekemans, X. (2002) A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population level. *Molecular Ecology Notes*, 2 (4), 618-620.
- Joublan, J. P., Rios, D. (2005) Rose culture and industry in Chile. *Acta Horticulturae* 690, 65-69.
- Kovács, S., Tóth, M. G., Facsar, G. (2000) Fruit quality of some rose species native in Hungary. *Acta Horticulturae*, 538, 103-109.
- Kovács, S., Facsar, G., Udvardy, L., Tóth, M. (2005) Phenological, morphological and pomological characteristics of some rose species found in Hungary. *Acta Horticulturae*, 690, 71-76.
- Meirmans, P., Van Tienderen, P. (2004) Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4 (4), 792-794.
- Muller, L. A. H., McCusker, J. H. (2009) Microsatellite analysis of genetic diversity among clinical and nonclinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates suggests heterozygote advantage in clinical environments. *Molecular Ecology*, 18 (13), 2779-2786.
- Najda, A., Buczkowska, H. (2013) Morphological and chemical characteristics of fruits of selected *Rosa* sp. In: Tasenkevich, L. O., *Modern Phytomorphology*, 99-103.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 (3), 583-590.
- Nikolić, T. (2018) Flora Croatica baza podataka. [Online] Zagreb: Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Available at: <http://hirc.botanic.hr/fcd>
- Nybom, H., Esselink, G. D., Werlemark, G., Vosman, B. (2004) Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. Sect. *Caninae* DC. *Heredity*, 92, 139-150.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org/>
- Rehder, A. (1940) *Manual of cultivated trees and shrubs*. New York: The MacMillan Company, 426-451.
- Riaz, A., Younis, A., Hameed, M., Khan, M. A., Ahmed, R., Raza, A. (2007) Assessment of biodiversity based on morphological characteristics among wild rose genotypes. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 44 (2), 295-299.
- Rohlf, F. J. (1993) *NTSysPC*. New York: Applied Biostatistics.
- Rosu, C. M., Manzu, C., Olteanu, Z., Oprica, L., Oprea, A., Ciornea, E., Zamfrache, M. M. (2011) Several fruit characteristics of *Rosa* sp. genotypes from the Northeastern Region of Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 39 (2), 203-208.
- Samiei, L., Naderi, R., Khalighi, A., Shahnejat-Bushehri, A. A., Mozafarian, V., Esselink G. D., Kazempour Osaloo, S., Smulders, M. J. M. (2010) Genetic diversity and genetic similarities between Iranian rose species. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85 (3), 231-237.
- SAS Institute Inc. (2004) *SAS 9.1.3 Help and documentation*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sehic, J., Nybom, H., Hjeltnes, S. H., Gaši, F. (2015) Genetic diversity and structure of Nordic plum germplasm preserved ex situ and on-farm. *Scientia Horticulturae*, 190, 195-202.
- Soare, R., Bonea, D., Iancu, P., Niculescu, M. (2015) Biochemical and technological properties of *Rosa canina* L. fruits from spontaneous flora of Oltenia, Romania. *Bulletin UASVM Horticulture*, 72 (1), 182-186.
- Šindrak, Z., Jemrić, T., Baričević, L., Han Dovedan, I. (2012) Fruit quality of dog rose seedlings (*Rosa canina* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 13 (2), 321-330.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2731-2739.
- Tomljenović, N., Ševar, M., Jemrić, T., Pejić, I. (2016) Perspective of dog rose (*Rosa canina* L.) cultivation in Croatia. In: Matotan, Z., 9<sup>th</sup> international meeting on plant breeding, seed and nursery production. Sv. Martin na Muri, 9-11 November 2016, Croatian society of agronomists, 123-124.
- Tomljenović, N., Pejić, I. (2018) Taxonomic review of the genus *Rosa*. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 83 (2), 139-147.
- Türkben, C., Barat, E., Çopur, Ö. U., Durgut, E., Himelrick, D. G. (2005) Evaluation of rose hips (*Rosa* spp.) selections. *International Journal of Fruit Science*, 5 (2), 113-121.
- Uggla, M., Gao, X., Werlemark, G. (2003) Variation among and within dogrose taxa (*Rosa* sect. *Caninae*) in fruit weight, percentages of fruit flesh and dry matter, and vitamin C content. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 53 (3), 147-155.
- Uggla, M. (2004) *Domestication of wild roses for fruit production*. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences. Doctoral thesis.
- Vukosavljev, M., Zhang, J., Esselink, G. D., van't Westende, W. P. C., Cox, P., Visser, R. G. F., Arens, P., Smulders, M. J. M. (2013) Genetic diversity and differentiation in roses. A garden rose perspective. *Scientia Horticulturae*, 162, 320-332.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6), 1358-1370.
- Werlemark, G. (2000) Evidence of apomixis in hemisexual dogrose species. *Rosa* sect. *Caninae*. *Sexual Plant Reproduction*, 12 (6), 353-359.
- Wissemann, V., Hellwig, F. H. (1997) Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa*, Section *Caninae* (Ser.) Rehd. *Botanica Acta*, 110 (3), 251-256.
- Wrońska-Pilarek, D., Jagodziński, A. M. (2009) Pollen morphological variability of Polish native species of *Rosa* L. (Rosaceae). *Dendrobiology*, 62, 71-82.