

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Бранислав Т. Шилер

**Фитохемијска и молекуларно-генетичка  
карактеризација популација кичице  
(*Centaurea erythraea Rafn*)  
са Балканског полуострва**

докторска дисертација

Београд, 2012.

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF BIOLOGY**

**Branislav T. Šiler**

**Phytochemical and molecular  
characterization of centaury  
(*Centaurium erythraea* Rafn) populations  
from the Balkan Peninsula**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2012**

**Ментори:**

др Данијела Мишић, научни сарадник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Универзитет у Београду

др Анета Сабовљевић, доцент  
Биолошки факултет  
Универзитет у Београду

**Чланови комисије:**

др Стеван Аврамов, научни сарадник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Универзитет у Београду

др Ана Симоновић, научни сарадник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,  
Универзитет у Београду

**Датум одбране:**

Експериментални део докторске дисертације урађен је у оквиру пројекта основних истраживања Министарства просвете и науке Републике Србије (173024), у Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду.

Захваљујем се менторима, посебно др Данијели Мишић на идејама, мудрим и корисним сугестијама и свеукупном ангажовању током израде ове докторске дисертације. Посебну захвалност дугујем професору др Драгољубу Грубишићу, на указаној шанси и поверењу, и без чије идеје, непроцењивог знања и искуства ова дисертација не би ни настала. Такође, велику захвалност дугујем и мр Маријани Скорић која је од једног биолога покушала (и надам се успела) на направи солидног молекуларца, као и др Ани Симоновић на помоћи око развијања молекуларних техника, иновативности и несебичној подели свог знања. Својим сугестијама и завидним познавањем биологије популација, др Стеван Аврамов је допринео квалитету овог рада.

Захвалност такође дугујем својим колегиницама и колегама: Тијани Бањанац, Јасмини Несторовић Живковић, Јелени Цветковић, Набилу Галавенжију и Милану Драгићевићу на позитивној енергији и свесрдној помоћи у тренуцима када сам мислио да је овако обимну анализу било немогуће завршити. Својој куми, Александри Патенковић захваљујем на сугестијама током писања текста, а др Валентини Ђорђевић и др Драгици Радојковић из Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство за уступање софистициране апаратуре и колегијалност. Такође се захваљујем свима који су на било који начин, експериментално, током писања или, једноставно, колегијалношћу помогли у изради ове дисертације.

И, наравно, посебну захвалност дугујем својим родитељима и сестри, а нарочито сину Давиду и супрузи Марини на оптимизму, мотивацији и разумевању што „тата иде у другу собу да ради и немој да сметаш!“ Потрудићу се да вам све надокнадим...

Фитохемијска и молекуларно-генетичка карактеризација  
популација кичице (*Centaureum erythraea Rafn*)  
са Балканског полуострва

**Резиме**

Кичица (*Centaureum erythraea Rafn*) је фармаколошки атрактивна биљна врста која показује читав спектар биолошких активности, а чији је биодиверзитет недовољно истражен. Основни циљ представљеног истраживања јесте анализа генетичког и фитохемијског диверзитета кичице на територији Балканског полуострва. У том смислу, формирана је колекција семена кичице пореклом из природних популација, која осликава диверзитет врсте на овом подручју. Истраживања су укључила 43 популације ове врсте, од којих је 41 пореклом са Балканског полуострва. За процену генетичког диверзитета оптимизоване су технике *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*) и *TRAP* (*Target Region Amplification Polymorphism*) молекуларних маркер система. ДНК употребљена у овим анализама је изолована из биљака гајених у условима *in vitro*, како би се обезбедила аутентичност ДНК кичице и елиминисала могућност контаминације страном ДНК. За потребе добијања што већег броја информативних јединица, употребљено је 16 десетомерних прајмера у случају *RAPD* маркера, при чему је добијено укупно 408 различитих *PCR* продуката, док су за *TRAP* маркере употребљене комбинације три специфична и три арбитрарна прајмера и добијено је 767 фрагмената ДНК. Специфични прајмери коришћени у *TRAP* анализама, конструисани су на основу секвенци РНК кичице са високим степеном хомологије са ДНК секвенцама за следеће ензиме: гераниол 10-хидроксилаза, цитохром *P450* редуктаза и секологанин синтаза, објављених у електронским базама података. Применом молекуларних маркера добијен је висок проценат полиморфизма, а информативност одабраних прајмера или комбинација прајмера је потврђена помоћу више параметара. Установљена је врло ниска унутарпопулациона генетичка варијабилност кичице, што може да се објасни великим уделом самооплодње и геитоногамије у настанку

семена код природних популација, као и снажним генетичким дрифтом. С обзиром да се кичица јавља у малим и фрагментисаним популацијама, између којих вероватно не постоји проток гена, очекивана је и висока генетичка диференцираност анализираних популација, што је потврђено и методама молекуларних маркера. Осим тога, молекуларним маркерима врло успешно су раздвојене диплоидне од тетраплоидних популација кичице. Тетраплоидне популације се прилично јасно диференцирају у посебне групе које су повезане са њиховим географским пореклом, нарочито када су примењени *RAPD* маркери. Значајна корелација показана је између генетичких сличности популација кичице са Балканског полуострва, добијених помоћу два типа молекуларних маркера и географских дистанци локалитета са којих ове популације потичу. Одређивање и квантификација основних једињења секундарног метаболизма кичице, секоиридоидних гликозида, дало је значајан допринос процени варијабилности анализираних популација кичице. Садржај сверцијамарина, доминантног секоиридоидног гликозида у надземним деловима биљака гајених у условима стакларе, показао се као најзначајнији фактор међупопулационе варијабилности кичице. Уз то, показана је значајна корелација између садржаја секоиридоидних гликозида и генетичке сличности популација, коришћењем оба типа молекуларних маркера, с тим што је снажнија корелација примењена у случају *TRAP* маркера. Представљена процена генетичког и фитохемијског диверзитета кичице дају основу за евентуалну заштиту укупног биодиверзитета ове врсте на Балканском полуострву, као и за одабир генотипова за заснивање и унапређење њене плантажне производње.

**Кључне речи:** *Centaureum erythraea*, Балканско полуострво, фрагментација станишта, популације, молекуларни маркери, *RAPD*, *TRAP*, генетичка варијабилност, секоиридоидни гликозиди

**Научна област:** Биологија

**Ужа научна област:** Физиологија биљака

**УДК број:** 582.923.1-11(497)(043.3)

Phytochemical and molecular characterization of centaury  
(*Centaurium erythraea* Rafn) populations  
from the Balkan Peninsula

**Summary**

Centaury (*Centaurium erythraea* Rafn) is a medicinal and pharmacologically attractive plant species which has a wide range of biological activity. The main objective of presented study was to estimate genetic and phytochemical diversity of centaury within the Balkan Peninsula. With that purpose, seed collection of natural centaury populations was established. The study included 43 populations of *C. erythraea*, among which 41 originated from the Balkan Peninsula. Molecular marker techniques, such as RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) and TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) were optimized to investigate the genetic diversity among these populations. DNA used in these analyses originated from *in vitro* grown plants to ensure the authenticity of centaury DNA by eliminating the possibility of its contamination by extraneous DNA. To acquire sufficient informational characters, 16 decameric primers were applied in RAPD assays, which produced 408 different PCR products, while TRAP assays included the combinations of 3 specific and 3 arbitrary primers, resulting in 767 fragments of DNA. Specific primers used for TRAP analyses were constructed according to the RNA sequences, showing high homology with DNA sequences published in electronic data bases for following enzymes: geraniol 10-hydroxylase, cytochrome P450 reductase and secologanin synthase. Molecular markers provided a high percentage of polymorphism. The informativeness of single primers (RAPD) of primer combinations (TRAP) was confirmed by various parameters. Low within-population genetic variability of natural populations of centaury could be explained by the high levels of selfing or geitonogamy in the process of fertilization and by strong genetic drift. Due to the fact that centaury grows in small, fragmented populations and that gene flow between them probably does not exist, a high genetic differentiation of analyzed populations was expected and this was confirmed by molecular markers. Moreover, molecular markers

efficiently differentiated diploid populations from tetraploids. Tetraploid populations were clearly clustered into groups related to their geographic origin, especially when RAPD markers were analyzed. Genetic similarity data between the Balkan Peninsula populations, obtained with either RAPD or TRAP markers, significantly correlated with the geographic distances between localities of their origin. Identification and quantification of secondary metabolite compounds, secoiridoid glycosides, highly contributed to the estimation of diversity of centaury populations in the analyzed region. A dominant secoiridoid glycoside in aerial parts of plants grown under greenhouse conditions was swertiamarin, which pointed to the interpopulation variability of centaury. Furthermore, a significant correlation between the secoiridoid glycosides content and genetic similarity of populations has been obtained, though a higher correlation was recorded for TRAP markers. The genetic and phytochemical diversity estimation of centaury from the Balkan Peninsula provides a basis for future biodiversity conservation efforts and also for high-productive genotype selection and field production improvement.

**Key words:** *Centaurium erythraea*, Balkan Peninsula, habitat fragmentation, populations, molecular markers, RAPD, TRAP, genetic variability, secoiridoid glycosides

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC number:** 582.923.1-11(497)(043.3)



## Садржај

1.	Увод.....	1
1.1.	Биодиверзитет биљних популација.....	1
1.2.	Дисјунктност биљних популација и њихова генетичка диференцираност.....	2
1.3.	Еволутивни механизми у изолованим популацијама.....	3
1.4.	Репродуктивни систем врста са фрагментисаним стаништима.....	4
1.5.	Начини одређивања генетичке варијабилности биљних популација.....	6
1.6.	Молекуларни маркери у популационој генетици биљака.....	7
1.6.1.	<i>RAPD</i> молекуларни маркери.....	9
1.6.2.	<i>TRAP</i> молекуларни маркери.....	12
1.7.	Анализа секундарних метаболита и њена примена у популационој генетици биљака.....	13
1.7.1.	Квантитативни фитохемијски маркери.....	13
1.7.2.	Секундарни метаболити.....	14
1.8.	Полиплоидија код биљака.....	15
1.9.	Општи подаци о проучаваној врсти.....	16
1.9.1.	Опис и распрострањење.....	16
1.9.2.	Систематика и филогенетски аспекти.....	18
1.9.3.	Секундарни метаболити кичице и њихов значај.....	21
1.9.4.	Мере заштите.....	25
2.	Циљ рада.....	27
3.	Материјал и методе.....	28
3.1.	Биљни материјал.....	28
3.1.1.	Формирање колекције гермплазме кичице.....	28
3.1.2.	Успостављање <i>in vitro</i> културе кичице.....	29
3.1.3.	Услови гајења биљака.....	32
3.2.	Анализа плоидности методом проточне цитометрије.....	32
3.2.1.	Припрема биљног материјала.....	32

3.2.2. Изолација једара.....	32
3.2.3. Проточна цитометрија.....	33
3.3. Изолација ДНК за анализу молекуларним маркерима.....	34
3.4. Анализа генетичког диверзитета популација молекуларним маркерима.....	35
3.4.1. <i>RAPD-PCR</i> анализа.....	35
3.4.1.1. Оптимизација и репродуцибилност реакција.....	35
3.4.1.2. Опсег експерименталних анализа.....	36
3.4.1.3. Поставка <i>RAPD-PCR</i> реакција.....	37
3.4.1.4. Раздвајање и визуелизација продуката <i>RAPD-PCR</i> реакција.....	37
3.4.2. <i>TRAP-PCR</i> анализа.....	38
3.4.2.1. Конструкција прајмера.....	38
3.4.2.1.1. Гераниол 10-хидроксилаза ( <i>E.C. 1.14.14.1</i> ).....	38
3.4.2.1.2. Цитохром <i>P450</i> редуктаза ( <i>E.C. 1.6.2.4</i> ).....	39
3.4.2.1.3. Секологанин синтаза ( <i>E.C. 1.3.3.9</i> ).....	39
3.4.2.1.4. Арбитрарни прајмери.....	39
3.4.2.2. Опсег експерименталних анализа.....	40
3.4.2.3. Поставка <i>TRAP-PCR</i> реакција.....	40
3.4.2.4. Раздвајање и визуелизација продуката <i>TRAP-PCR</i> реакција.....	41
3.4.3. Анализа информативности података добијених <i>RAPD</i> и <i>TRAP</i> маркерима.....	41
3.4.4. Израчунавање генетичке сличности популација.....	43
3.4.5. Мултиваријантне анализе.....	44
3.4.6. Испитивање корелације између матрица сличности добијених <i>RAPD</i> и <i>TRAP</i> техником.....	46
3.5. Испитивање корелација између географских дистанци и генетичких сличности популација.....	47
3.6. Анализа садржаја секундарних метаболита.....	47
3.6.1. Припрема биљног материјала.....	47
3.6.2. Припрема узорака и екстракција секоиридоидних гликозида.....	47

3.6.3. <i>HPLC</i> детекција и квантификација секоиридоидних гликозида.....	48
3.6.4. Статистичка обрада података.....	49
3.7. Испитивање корелације између садржаја секундарних метаболита и матрица генетичких сличности.....	49
4. Резултати.....	51
4.1. Колекција гермплазме рода <i>Centaureium</i> .....	51
4.2. Општа запажања параметара растења.....	51
4.3. Плоидност популација.....	52
4.4. Квалитет изоловане ДНК.....	53
4.5. Анализа генетичке варијабилности <i>RAPD</i> молекуларним маркерима.....	54
4.5.1. Електрофоретски профили.....	54
4.5.2. Анализа матрица генетичких сличности.....	57
4.5.3. Мултиваријантне анализе <i>RAPD</i> података.....	57
4.5.3.1. Кластер анализа <i>RAPD</i> података.....	57
4.5.3.2. Анализа основних координата ( <i>PCoA</i> ) <i>RAPD</i> података.....	63
4.6. Анализа генетичке варијабилности <i>TRAP</i> молекуларним маркерима.....	65
4.6.1. Електрофоретски профили.....	65
4.6.2. Анализа матрица генетичких сличности.....	69
4.6.3. Мултиваријантне анализе <i>TRAP</i> података.....	72
4.6.3.1. Кластер анализа <i>TRAP</i> података.....	72
4.6.3.2. Анализа основних координата ( <i>PCoA</i> ) <i>TRAP</i> података.....	75
4.7. Корелација генетичких сличности добијених различитим маркер-системима.....	75
4.8. Корелација генетичких сличности са географским дистанцама између популација.....	76
4.9. Анализа садржаја секоиридоидних гликозида.....	79

4.9.1. Корелације у концентрацијама три секоиридоидна гликозида.....	83
4.9.2. Анализа основних компоненти ( <i>PCA</i> ) садржаја секоиридоидних гликозида.....	83
4.10. Корелације између садржаја секоиридоидних гликозида и генетичких сличности популација.....	85
5. Дискусија.....	86
5.1. Биодиверзитет кичице на Балканском полуострву.....	86
5.2. Полиплоидизација као механизам одржавања биодиверзитета...87	
5.3. Начин опрашивања као фактор утицаја на расподелу генетичке варијабилности кичице.....	89
5.4. Унутарпопулациона и међупопулациона варијабилност кичице...92	
5.5. Веродостојност података добијених <i>RAPD</i> и <i>TRAP</i> молекуларним маркерима.....	95
5.6. Информативност <i>RAPD</i> и <i>TRAP</i> молекуларних маркера у анализи генетичког диверзитета кичице.....	99
5.7. Генетичка диференцираност анализираних популација кичице...100	
5.8. Допринос секоиридоидних гликозида као фитохемијских маркера у анализи диверзитета кичице.....	105
5.9. Упоредна анализа генетичког и фитохемијског диверзитета кичице на Балканском полуострву.....	108
6. Закључци.....	110
Литература.....	112
Биографија аутора.....	149

## 1. Увод

### 1.1. Биодиверзитет биљних популација

Биодиверзитет представља разноврсност екосистема, врста, њихових популација, гена и генотипова и веома се брзо редукује под директним и индиректним утицајем човека, његовом делатношћу и бројношћу. Постојање биодиверзитета је, у основи, резултат постојања генетичког диверзитета. Генетички диверзитет представља укупан број варијабилних генетичких карактеристика у геному врсте и могуће га је посматрати на различитим нивоима: између појединачних генотипова, популација или врста. У новије време, у погледу заштите светског биодиверзитета, пажња је померена са нивоа врста на заштиту укупног генетичког диверзитета, који укључује и локалне популације (*Haraštová-Sobotková* и сар., 2005). Генетичка варијабилност популација представља њихов еволуциони потенцијал. Утврђивање нивоа генетичке варијабилности биљних популација даје одлучујући допринос решавању многих проблема еволуционе биологије, конзервационе и еколошке генетике, као и оплемењивања биљака (*Coates* и *Byrne*, 2005). Овај приступ има вредност не само због одређивања заступљености и расподеле, него и због анализе процеса који учествују у формирању генетичке варијабилности у популацијама.

Генетички диверзитет се рефлектује преко разлика између јединки у многобројним карактерима, па анализа структуре генетичке варијабилности биљних популација може да се врши на разне начине и често укључује сложене интеракције између биљних карактера (животна форма, грађа цвета, начин репродукције, инкомпатибилност полена, начини опрашивања, и сл.) и срединских услова који могу да утичу на величину популација и њихову изолованост. Еволуциона историја врсте може у великој мери да допринесе сложености ових односа, јер сужавање ареала и флукуације у величини популација током времена могу значајно да утичу на актуелну генетичку варијабилност биљних популација (*Schaal*

и сар., 1998). Истраживање порекла, одрживости и расподеле генетичког диверзитета биљака знатно употпуњује разумевање начина специјације, адаптације и популационе динамике (Bussell, 1999).

Проучавање генетичког диверзитета популација угрожених биљних врста се врло интензивно спроводи у последњих неколико деценија (Possingham и сар., 1993; Martín и сар., 1999; Nybom и Bartish, 2000; Dittbrenner и сар., 2005; Chen и сар., 2006; Hofhanzlová и Fér, 2009). Управо је један од главних циљева програма заштите ретких и угрожених врста утврђивање и одржавање постојећих нивоа њихове генетичке варијабилности (Frankel и Soulé, 1981; Simberloff, 1988).

### **1.2. Дисјунктност биљних популација и њихова генетичка диференцијација**

Организација биљног света је врло комплексна услед свеопште географске структурираности врста и просторне дистрибуције организама. Већина врста је у различитом степену фрагментисана и, осим у ретким случајевима, дистрибуција врста у природи је дисконтинуирана и зависи од еколошких (фрагментација ареала), биолошких (дисперзија, компетитивно искључење) и историјских фактора (Миланков, 2007). Фрагментација станишта је процес поделе једне области на више мањих, изолованих делова. Подела настаје изградњом саобраћајница, претварањем станишта у обрадиве површине, ширењем градских површина као и другим људским активностима. Проучавања генетичког диверзитета су неопходна за разумевање и процену утицаја фрагментације станишта на динамику и генетичку структуру врста (Thompson, 1999; Young и сар., 1999). Посредним или непосредним утицајем човека, а првенствено прекомерном експлоатацијом су некадашње бројне врсте сада сведене на изузетно мали број јединки фрагментисаних у међусобно изоловане, мале популације. Дисјунктност популација и њихова међусобна изолованост заузврат доводе до исцрпљивања генетичке варијабилности. Не само да овакве популације имају редукован генетички диверзитет, смањен еволуциони потенцијал и велики ризик од ишчезавања, већ се и

еволуциони процеси у малим популацијама фундаментално разликују од оних у великим популацијама (Миланков, 2007). Одговори популација могу да се разликују у зависности од услова у самом станишту, географске удаљености између популација, њихове величине, као и од интеракција између биљака и опрашивача (Coates и Byrne, 2005). У савременим стаништима, уређеним према човековим потребама, изолација настала њиховом фрагментацијом, недостатак опрашивача и лоше временски организовање кошење и испаша, заједно имају снажан утицај на репродукцију еколошки или дистрибуционо маргиналних популација. Генетичке студије ових популација не само да могу да укажу на ниво и начин раздвајања између њих, него и да пруже битне доказе о значајности ових процеса на еволуцију појединачних врста или група врста неке области (Luijten и сар., 1999). Медитеранска флора је посебно богата врстама са дисјунктним популацијама (Thompson, 1999). Појава дисјунктних популација медитеранске флоре доводи се у везу са расејавањем, геолошком сложеношћу медитеранског басена или покретањима и изолацијом тектонских микроплоча током Терцијара (Thompson, 1999).

### **1.3. Еволутивни механизми у изолованим популацијама**

Док проток гена и мутације најчешће повећавају генетички диверзитет (представљен мером хетерозиготности), хетерозиготност се смањује усмереном селекцијом и генетичким дрифтом (Gilpin и Soulé, 1986). Код изолованих популација, генетички дрифт може да доведе до редуције генетичке варијабилности и брзе фиксације алела (Lacy, 1987; Frankham, 1996; Миланков, 2007), нарочито због тога што је ефективна величина популације најчешће много мања од броја репродуктивних јединки у популацији (Frankham, 1995). Осим тога, претпоставља се да су сви чланови малих популација сродници јер потичу од малог броја јединки иницијалне популације (Миланков, 2007). Повећан ниво укрштања у сродству (инбридинга) у популацијама у којима је смањена генетичка варијабилност може да резултује редукованом адаптивном вредношћу услед инбридинг депресије, као и у смањеном потенцијалу за

прилагођавање на промене срединских фактора (*Ellstrand* и *Elam*, 1993). Позитивна повратна спрега између генетичких и демографских фактора може постепено да умањи генетичку варијабилност, фитнес и величину популација и тако доведе до изумирања („вртлог изумирања“, *Gilpin* и *Soulé*, 1986). Такође, у малим популацијама може да дође до нарушавања биотичких интеракција, од којих је свакако најважније опрашивање (*Olesen* и *Jain*, 1994).

Ограничени проток гена може да доведе до генетичког разилажења популација дејством генетичког дрифта или диференцијалне селекције у локалним срединама. Висок ниво протока гена појачава хомогенизацију генских пулова и увећава ефективну величину популације, али недостатак протока гена између популација може да доведе и до успостављања неповољних алела ако су популације различито адаптиране на услове локалне средине (*Coates* и *Byrne*, 2005). У овом случају, сматра се да проток гена може да изазове аутбридинг депресију (енг.: *outbreeding depression*) (*Templeton*, 1986; *Waser*, 1993; *Fenster* и *Dudash*, 1994), када потомци настали од родитеља географски удаљених популација имају мањи фитнес од потомака насталих укрштањем у суседству. Друга истраживања, пак, тврде да миграције гена између популација или субпопулација могу да резултују у повећању адаптивне вредности код потомства или појави хетерозе (нпр. *Ledig*, 1986).

#### **1.4. Репродуктивни систем врста са фрагментисаним стаништима**

У одређеним случајевима, унутар популација или врста може да дође до промена у репродуктивном систему као одговор на промене у срединским условима током времена (*Eckert* и *Barett*, 1993; *Richards*, 1997, *Stöcklin*, 1999). Значај начина оплодње, као главног фактора који утиче на генетичку структуру и нивое генетичке варијабилности унутар биљних популација, наглашаван је у бројним истраживањима (*Hamrick* и *Godt*, 1989; *Schoen* и *Brown*, 1991; *Charlesworth* и *Charlesworth*, 1995; *Nybot* и *Bartish*, 2000). На начин оплодње биљака утичу бројни карактери, као што



је фенологија цветања, пре- и постзиготска инкопатибилност, грађа цвета, као и широк спектар еколошких фактора. На пример, рано сукцесивне биљне врсте имају кратак животни век и претежно су самоопходне, па су њихове популације често специфичне по ниској генетичкој варијабилности унутар популација и високој генетичкој диференцираности између њих (*Loveless* и *Hamrick*, 1984; *Nybot* и *Bartish*, 2000; *Duminil* и сар., 2007). Дакле, самоопходне врсте имају мању унутарпопулациону хетерозиготност и већи степен инетрпопулационе генетичке диференцијације у односу на аутбридинг врсте. У упоредним анализама бројних биљних врста (*Hamrick* и *Godt*, 1989; *Nybot* и *Bartish*, 2000) показано је да је расподела генетичке варијабилности између популација обично под јачим утицајем начина оплодње, него било ког другог фактора. Подаци добијени анализом алозима указују на то да је код самоопходних врста 51% њихове укупне генетичке варијабилности распоређено између популација, док је тај проценат код страноопходних врста и врста са мешовитим начином оплодње редукован на 10-22% (*Hamrick* и *Godt*, 1989). Осим тога, губитак станишта или његова фрагментација имају негативне последице за самоопходне биљне врсте, јер је њихов генетички диверзитет дистрибуиран између популација, не унутар њих.

Широко је прихваћено мишљење да човеково ремећење услова у стаништима може да има снажан утицај на присуство и разноврсност опрашивача, што заузврат, може да резултује у измењеним интеракцијама биљке и опрашивача и ограничавању количине полена, смањеним интензитетом разношења полена или његовим умањеним квалитетом (*Ashman* и сар., 2004; *Knight* и сар., 2005; *Eckert* и сар., 2010). Осим тога, с обзиром да бројност опрашивача широм света опада (*Ricketts* и сар., 2008; *Potts* и сар., 2010), претпоставља се да ће ови ефекти у блиској будућности све више расти. Очекује се да самоопходне врсте поседују нижи степен генетичке варијабилности унутар популације, а већу генетичку диференцијацију између популација, него страноопходне врсте.

### 1.5. Начини одређивања генетичке варијабилности биљних популација

Генетичка варијабилност биљних популација одређује се широким спектром различитих приступа који подразумевају: а) употребу квантитативних (континуираних) особина, као што су: број семена по плоду, брзина растења, време цветања, итд.; б) уочавање наследних полиморфизама, као што је нпр. боја цвета или рецесивни летални алели; в) уочавање хромозомских реаранжмана, као што су транслокације и инверзије; г) детекцију варијабилности у протеинима и д) детекцију варијабилности једарне ДНК или ДНК органела (*Coates и Byrne, 2005*). Избор одговарајуће генетичке анализе представља суштину успешне примене молекуларне генетике у популационој биологији (*Sunnucks, 2000*). Подаци обично укључују различите типове варијабли представљене нумерички (*Franco и сар., 2001*). Да би се проценила генетичка варијабилност популација, обично се анализирају различити типови података:

- а) континуиране фенотипске варијабле: висина, маса, фенолошке особине, итд.;
- б) дискретне фенотипске варијабле, као што су: боја и текстура плода, отпорност на болести и инсекте и сл. или
- в) дискретни молекуларно-генетички маркери, који имају бинарне вредности (присутан/одсутан).

Генетички маркер представља било коју карактеристику (фенотипска особина, протеин, ген или препознатљив део ДНК) чије се наслеђивање може лако пратити и која пружа информацију о генотипу јединке (*Симоновић, 2011*).

Приликом приступања одређивању диверзитета и примене мултиваријантних метода у анализама генетичког диверзитета, неопходно је пажљиво размотрити следеће (*Franco и сар., 1998*): 1. разумну и ефективну употребу различитих типова варијабли, као што су:

континуиране, дискретне, ординалне, биномијалне, итд., 2. примену више сетова података (морфолошких, биохемијских и молекуларних), 3. правилан избор мере генетичке дистанце и кластер метода и 4. одређивање оптималног броја кластера. Приступ решавању ових проблема зависи од генетичког материјала који се анализира, као и од циља експеримента.

### **1.6. Молекуларни маркери у популационој генетици биљака**

Највећи помак у генетици биљних популација, током последње три деценије, био је значајан напредак у технологијама које обезбеђују директну молекуларну карактеризацију гена и генских продуката. Развој и употреба различитих молекуларних техника је осавременила популациону генетику и проширила њену применљивост на многа поља у биологији (Coates и Byrne, 2005). Увођење молекуларно-биолошких техника, као што је употреба ДНК маркера, омогућило је директно упоређивање различитог генетичког материјала, независно од срединских утицаја (Weising и сар., 1995), јер се други маркери (морфолошки, фитохемијски, изозимски) у крајњој линији базирају на експресији гена, док молекуларни маркери најчешће покривају читав геном, укључујући и делове ДНК који се не експримирају (нпр. репетитивне секвенце, интрони), па је њихов полиморфизам и густина у геному неупоредиво већа.

Молекуларне и статистичке технике су се убрзано развијале последњих година и тако унапређивале генетичка истраживања, па одабир најпогодније технике и одговарајућег молекуларног маркера зависи од различитих фактора специфичног циља истраживања и његове практичне примене (Sunnucks, 2000; Nybot, 2004; Bonin и сар., 2007). Осим значајне примене у изолацији гена и њиховом мапирању на хромозомима, као и у позиционом клонирању гена од интереса, једна од најраспрострањенијих употреба молекуларних маркера је у спровођењу процена генетичког диверзитета различитих таксономских група.

Фенотипска и селективна неутралност молекуларних маркера даје основу за њихову примену у еволуционим истраживањима, проучавањима

популационе генетике биљака и конзервационе генетике. Пример су истраживања начина протока гена, система размножавања, генетичке структуре популација, хибридизације и ефективне величине популација. Као последица овог напретка, драматично је повећан број интеграционих истраживања које проучавају варијабилност унутар врсте, често комбинујући популациону генетику, филогенетику и биогеографију (*Schaal и Olsen, 2000; Avise, 2001*).

Употреба неутралних молекуларних маркера, током последњих неколико деценија, доминира у изучавањима генетичке структуре популација и приликом конструисања географских образаца генетичке варијабилности биљака. Повећањем разноврсности маркера, увећала се и могућност да истраживачи одабирају један или више типова маркера при изучавању промена просторних и временских карактеристика популација. Молекуларни маркери који дају податке на више локуса су у том погледу свакако у предности у односу на маркере са једним локусом (*Sarwat и сар., 2008*). Популарне методе изучавања генетике популација у којима се користе молекуларни маркери укључују дуги низ техника заснованих на ДНК полиморфизму, од којих се најчешће употребљавају: *RFLP* (полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената, енг.: *Restriction Fragment Length Polymorphism*), *RAPD* (насумично умножена полиморфна ДНК, енг.: *Random Amplified Polymorphic DNA*), *AFLP* (полиморфизам дужине амплификованих фрагмената, енг.: *Amplified Fragment Length Polymorphism*), *SSR* (једноставни кратки поновци, или микросателити, енг.: *Simple Sequence Repeats*) и *ISSR* (међумикросателитски поновци, енг.: *Inter-Simple Sequence Repeats*). Неки од ових маркера, као што су *RFLP* и микросателити су кододоминантни и могу да буду анализирани као маркери појединачних локуса, док су други, као што су *RAPD*, *ISSR* и *AFLP* доминантни мултилокусни маркери. *RFLP* маркери су се показали изразито информативним у анализама модела генетичке варијабилности унутар и између популација, међутим, упркос њиховој значајној раздвојној моћи (енг.: *resolving power*), у последње време се ретко користе због скувих и дуготрајних анализа, употребе радио-обележених проба и захтева

за знатном количином ДНК. Међу различитим савременим методама, које су засноване на употреби нуклеарне ДНК као матрице, молекуларни маркери добијени *PCR* техником (ланчана реакција полимеразе, енг.: *Polymerase Chain Reaction*) и применом неспецифичних прајмера, веома су популарни за процењивање генетичке варијабилности унутар врста. С обзиром да за њихову примену није потребна никаква информација о ДНК секвенцама циљне врсте, ове методе су нарочито погодне у ситуацијама када претходно нису, или су врло мало вршена молекуларно-генетичка истраживања и секвенцирање ДНК (*Nybom* и *Bartish*, 2000). Микросателити, или *SSR*, су маркери који се тренутно најшире употребљавају у проучавању генетичке варијабилности биљних популација. Они показују широку варијабилност између јединки исте популације и имају разноврсну употребу (нпр. *Jarne* и *Lagoda*, 1996). На жалост, значајна предност коју ова техника има у односу на остале ДНК маркере захваљујући хиперваријабилности и кододоминантности, умањена је временом и трудом које је потребно уложити за њено развијање (*Squirrell* и сар., 2003).

#### **1.6.1. *RAPD* молекуларни маркери**

*RAPD* (*Williams* и сар., 1990; *Welsh* и *McClelland*, 1990) су први од многобројних мултилокусних маркера који су примењивани на великом броју биљних врста (*Nybom* и *Bartish*, 2000). Ова техника, која користи само један прајмер произвољне секвенце како би се амплификовали анонимни региони генома, заснива се на идентификацији и сортирању многобројних полиморфних локуса. С обзиром да познавање секвенци ДНК није потребно, ова техника је нарочито применљива у случајевима када не постоји довољно молекуларно-генетичких информација о датој врсти. Осим тога, метода је веома једноставна и брза и открива већи број локуса, често само једном *PCR* реакцијом. Наиме, прајмер мале дужине, састављен од најчешће 10 *bp* се везује на два места на ДНК матрици, у обрнутој оријентацији, па функционише и као директан и као реверзни прајмер. У почетку, *RAPD* маркери су опсежно коришћени у студијама оплемењивања биљака, нарочито у мапирању генома при идентификацији

локуса квантитативних особина (енг.: *Quantitative Trait Loci, QTL*). Иако су рана истраживања заснована на употреби *RAPD* маркера често критикована због њихове лоше репродуцибилности, касније студије су показале да су профили трака добијени *RAPD* методом веродостојни и поновљиви у истраживањима генетичког диверзитета унутар врсте, уз пажљиву примену лабораторијских вештина (*Skroch* и *Nienhuis*, 1995; *Le Corre* и сар., 1997; *Boehm* и сар., 1999). Касније постају све више популарни у студијама генетичке варијабилности природних популација, често праћени анализама изозима (*Peakall* и сар., 1995). Међутим, и поред ниске цене и брзине извођења, *RAPD* техника има и нека ограничења и мане (*Arnold* и *Imms*, 1998; *Harris*, 1999). Репродуцибилност (поновљивост) је најчешће навођена као значајан проблем, јер недовољна специфичност, узрокована употребом прајмера кратких секвенци, може да доведе до повећане осетљивости услова *PCR* реакције, што резултује у погрешном спаривању и амплификацији. Овај проблем може да се сведе на најмању меру прецизном контролом и стандардизацијом реакционих услова. Хомологија такође представља важан проблем, јер се подразумева да комиграција продуката значи и њихову једнакост, што не мора увек да буде правило (*Rieseberg*, 1996). Међутим, овај проблем се појављује када се упоређују таксони на вишим нивоима генетичког одступања, али најчешће нема утицаја у студијама популационе генетике. Поред тога, због своје доминантности, *RAPD* локуси се генерално посматрају као два алела: присуство или одсуство траке. Информативност локуса је због тога мања од типичних мултиалелних локуса добијених нпр. микросателитима, мада њихова прилично случајна дистрибуција дуж генома надомешћује овај недостатак (*Bonin* и сар., 2007). Такође, грешке у самој *PCR* реакцији могу да настану услед: репликативног „проклизавања“ термостабилне полимеразе током процеса елонгације у *PCR* реакцији, нешаблонског додавања нуклеотида од стране полимеразе, присуства фрагмената ДНК који потичу од органела, РНК или веће количине полисахарида, фенола и других нечистоћа у ДНК узорку (*Wolfe* и *Liston*, 1998). Ако се сви ови проблеми превиде, употребљивост *RAPD* маркера се значајно умањује

(*Hadrys* и сар., 1992; *Lynch* и *Milligan*, 1994; *Smith* и сар., 1994; *Rieseberg*, 1996).

Према *Wolfe* и *Liston* (1998), најбитније предности *RAPD* технике су: а) потреба за мањом количином ДНК у поређењу са другим молекуларним методама, б) избегава се употреба радиоизотопа, в) могућа је амплификација ДНК секвенци из конзервираног ткива, г) техника је применљива у мањим лабораторијама (у смислу опреме, средстава и цене), д) претходно познавање ДНК секвенци није неопходно, ђ) добијање великог броја генетичких маркера у кратком временском периоду, и е) могућност истовремене анализе великог броја локуса.

Шаблон, по којем долази до амплификације одређених *RAPD* трака, остаје исти независно од степена развића биљке (*Swenson* и сар., 1995). Ова особина *RAPD* локуса, али и других маркер-система, учинила их је веома кориснима у идентификацији и заштити ретких и ендемичних популација, у случајевима када друге методе нису у могућности да открију варијабилност и разреше генетичке односе (*Esselman* и сар., 2000). *RAPD* маркери су сада широко прихваћени у биљној систематици, као и у популационој и еволуционој биологији и имају улогу у идентификацији врста, њиховој класификацији, као и у њиховом хијерархијском позиционирању (*Hadrys* и сар., 1992; *Wolfe* и *Liston*, 1998; *Sarwat* и сар., 2008; *Ray* и *Roy*, 2009; *Schlag* и *McIntosh*, 2012). Примена *RAPD* маркера такође укључује и истраживања међуврсне хибридизације (нпр. *Crawford* и сар., 1993) и интрогресије (нпр. *Dean* и *Arnold*, 1996), идентификације клонова (нпр. *Hsiao* и *Rieseberg*, 1994), развоја маркера везаних за експресију пола (нпр. *Hormaza* и сар., 1994) и присуства Б хромозома (нпр. *Gourmet* и *Rayburn*, 1996), проучавања система оплођења (нпр. *Fritsch* и *Rieseberg*, 1992), мерења нивоа и дистрибуције генетичког диверзитета (нпр. *Gustafsson* и *Gustafsson*, 1994) и описивања шема унутарпопулационе (нпр. *Roelofs* и *Bachmann*, 1995) и међуврсне диференцијације (нпр. *Neuffer*, 1996). *RAPD* маркери су ефикасно коришћени у проучавању генетичког диверзитета различитих лековитих врста биљака, као што су: *Digitalis obscura* (*Nebauer* и сар., 1999), *Cunila galioides* (*Fracaro* и сар.,

2005), *Ocimum basilicum* (De Masi и сар., 2006), *Gentiana pannonica* (Hofhanzlová и Fér, 2008), *Scutellaria baicalensis* (Su и сар., 2008), врсте родова *Cymborogon* (Sangwan и сар., 2001) и *Echinacea* (Kapteyn и сар., 2002), као и слабо искоришћених биљних култура: сочива (Ferguson и сар., 1998), сусама (Bhat и сар., 1999) и лана (Fu, 2005). *RAPD* маркери су чак нашли примену и у разоткривању криминалних група, где се ови маркери примењују у идентификацији узорака *Cannabis sativa* (Gillan и сар., 1995).

Обимна анализа публикованих радова у којима су коришћени *RAPD*, *ISSR*, *AFLP* маркери и микросателити, показала је да су процене генетичког диверзитета унутар врста сличне без обзира на тип примењеног маркера (Nybot, 2004).

### **1.6.2. TRAP молекуларни маркери**

*TRAP* (*Target Region Amplification Polymorphism*) маркери представљају новију методу (Hu и Vick, 2003), која се заснива на амплификацији региона ДНК између два прајмера, од којих је један арбитарни, а други специфичан, комплементаран познатој ДНК секвенци (*EST* секвенци (енг.: *Expressed Sequence Tag*) или делу неког гена). Продукти *TRAP-PCR* реакције су ампликони ДНК, бројнији и често информативнији од продуката других маркер-система. *TRAP* маркери имају две битне предности у односу на друге технике ДНК маркирања: 1) комбинују повољне особине *RAPD* (лакоћа извођења) и *AFLP* маркера (висока информативност) и 2) *TRAP* маркери користе биоинформатичке алате у конструкцији прајмера према познатим секвенцама претпостављених гена, док се *RAPD* и *AFLP* маркери заснивају на анонимним секвенцама. Тешко је експериментално показати колики проценат фрагмената је повезан са секвенцом специфичног прајмера. Претпоставља се да је већина фрагмената пореклом од погрешне хибридизације прајмера и циљне секвенце захваљујући ниској температури анилинга у првих неколико циклуса *PCR* реакције.

Постоји релативно мали број радова у којима су *TRAP* маркери коришћени у циљу проучавања генетичког диверзитета различитих



таксона (*Hu* и сар., 2005; *Alwala* и сар., 2006; *Deng* и сар., 2007; *Hu* и сар., 2007; *Palumbo* и сар., 2007; *Yue* и сар., 2009; *Xiao* и сар., 2010), међутим, у овим истраживањима *TRAP* маркери су се показали као моћан алат у детекцији генетичких веза између проучаваних генотипова.

## **1.7. Анализа секундарних метаболита и њена примена у популационој генетици биљака**

### **1.7.1. Квантитативни фитохемијски маркери**

Генетичку варијабилност популација могуће је проценити и анализом квантитативних особина. Многобројни генски локуси, као и средински утицаји на те локусе, учествују у квантитативној варијабилности особина које се истражују. На жалост, докази о постојању сагласности између два начина одређивања генетичке варијабилности: помоћу квантитативних особина и молекуларних маркера су често веома слаби (*Reed* и *Frankham*, 2001; *McKay* и *Latta*, 2002). Због тога се намеће кључно питање: колико снажно су корелисани подаци добијени молекуларним маркерима и квантитативним особинама? Дискусија о томе да ли су разлике у молекуларним маркерима корелисане са адаптивном вредношћу популација, представљена је у већем броју радова (*Lynch* и сар., 1999; *Merila* и *Crnokrak*, 2001; *Reed* и *Frankham*, 2001; *McKay* и *Latta*, 2002), у којима су наглашени релативни утицаји генетичког дрифта и природне селекције на дивергенцију популација добијену молекуларним маркерима у односу на специфичне квантитативне особине.

Локалне популације врста изграђене су од различитог броја индивидуалних генотипова, од којих неке могу бити хемијске варијанте (хемотипови), у зависности од релативне заступљености хемијских једињења у њиховом ткиву (Марин, 2003). Квантитативан садржај и однос хемијских једињења код различитих биљних таксона може да буде изузетно користан у анализи и разумевању комплексног обрасца варијабилности. Диференцијација посебних хемотипова или екотипова праћена је просторном изолацијом и еколошком адаптацијом, или

хибридизацијом која је обично изазвана дуплирањем генома, тј. алополиплоидијом (Марин, 2003).

Хемијска еволуција биљака не мора да прати и морфолошку, јер нису под једнаким селективним притиском. Продукција и акумулација неких једињења веома варира под утицајем еколошких фактора, док је синтеза других једињења у великој мери генетички детерминисана. Другим речима, постоји читав низ замки које могу да наведу истраживача на погрешне закључке о добијеним резултатима. Стога се генетички диверзитет популација најбоље процењује кроз мултидисциплинарни приступ уз примену морфолошких, биохемијских и молекуларних истраживања (*Lattoo и сар., 2008*).

### **1.7.2. Секундарни метаболити**

Код свих виших биљака нађена су различита органска једињења која не учествују у примарним процесима физиологије и развића. Таква једињења се често називају секундарним метаболитима. Једна од најупечатљивијих особина секундарних метаболита је огроман диверзитет њихових структура. Међутим, једно од „чуда еволуције“ је да, без обзира на њихову велику разноврсност, ако се угљеников скелет секундарних метаболита прати уназад у биосинтетском путу, види се да они настају од само три основна градивна блока: ацетата, мевалоната или шикимата (*Waterman, 2005*).

Присуство секундарних метаболита биљци пружа низ предности у интеракцијама са чиниоцима спољашње средине. Најчешће се та предност огледа у одбрани од напада различитих предатора или патогена; неки секундарни метаболити имају улогу привлачења опрашивача путем боје или мириса, док неки служе да подстакну хербиворе да се нпр. хране зрелим плодовима, али да избегавају семенке.

Варијације у садржају секундарних метаболита могу да буду квантитативне и квалитативне (Марин, 2003). Ове варијације су добро

познате у случају секундарних метаболита (флавоноида, алкалоида, терпеноида...) и оне могу да буду последица:

- разлике у фази развића,
- разлике између органа и организама који се анализирају,
- разлике у еколошким условима станишта,
- генетичке разлике између јединки и популација,
- недоследности у начину прикупљања материјала,
- недоследности у техникама екстракције и анализе.

Како би се избегле евентуалне грешке које могу да доведу до неадекватних закључака, мора да се води рачуна о томе да анализирани биљке буду у истој фази онтогенетског развића, и да су, по могућству, гајене под истим еколошким условима. Подразумева се да се екстракције и анализе свих узорака врше потпуно истом методом.

Традиционалне хемотаксономске и хемосистематске студије се често употребљавају у утврђивању веза између биљних таксона, квантификовањем неколико унапред одабраних једињења (*Ge* и сар., 2008). Секундарни метаболити су, као маркери, у широкој примени нпр. у контроли квалитета и стандардизацији биљних лекова (*Joshi* и сар., 2004).

### **1.8. Полиплоидија код биљака**

Полиплоидија се сматра основним еволуционим трендом васкуларних биљака (*Thompson* и *Lumaret*, 1992; *Soltis* и *Soltis*, 1993; *Bretagnolle* и *Thompson*, 1995; *Ramsey* и *Schemske*, 1998, 2002; *Soltis* и сар., 2004). Значајно присуство полиплоидије код биљака подразумева да она поседује неку адаптивну вредност. Полиплоиди често показују неуобичајене фенотипове, који нису присутни код диплоидних предака (*Ramsey* и *Schemske*, 2002). Неке од ових карактеристика полиплоида, као што су: повећана величина ћелија и органа, увећана биомаса, пораст отпорности на сушу, апомиксис (асексуална продукција семена), отпорност на болести и штеточине, или померено време цветања, могу да омогуће полиплоидима освајање нових еколошких ниша (*Soltis* и *Soltis* 1993, 2000;

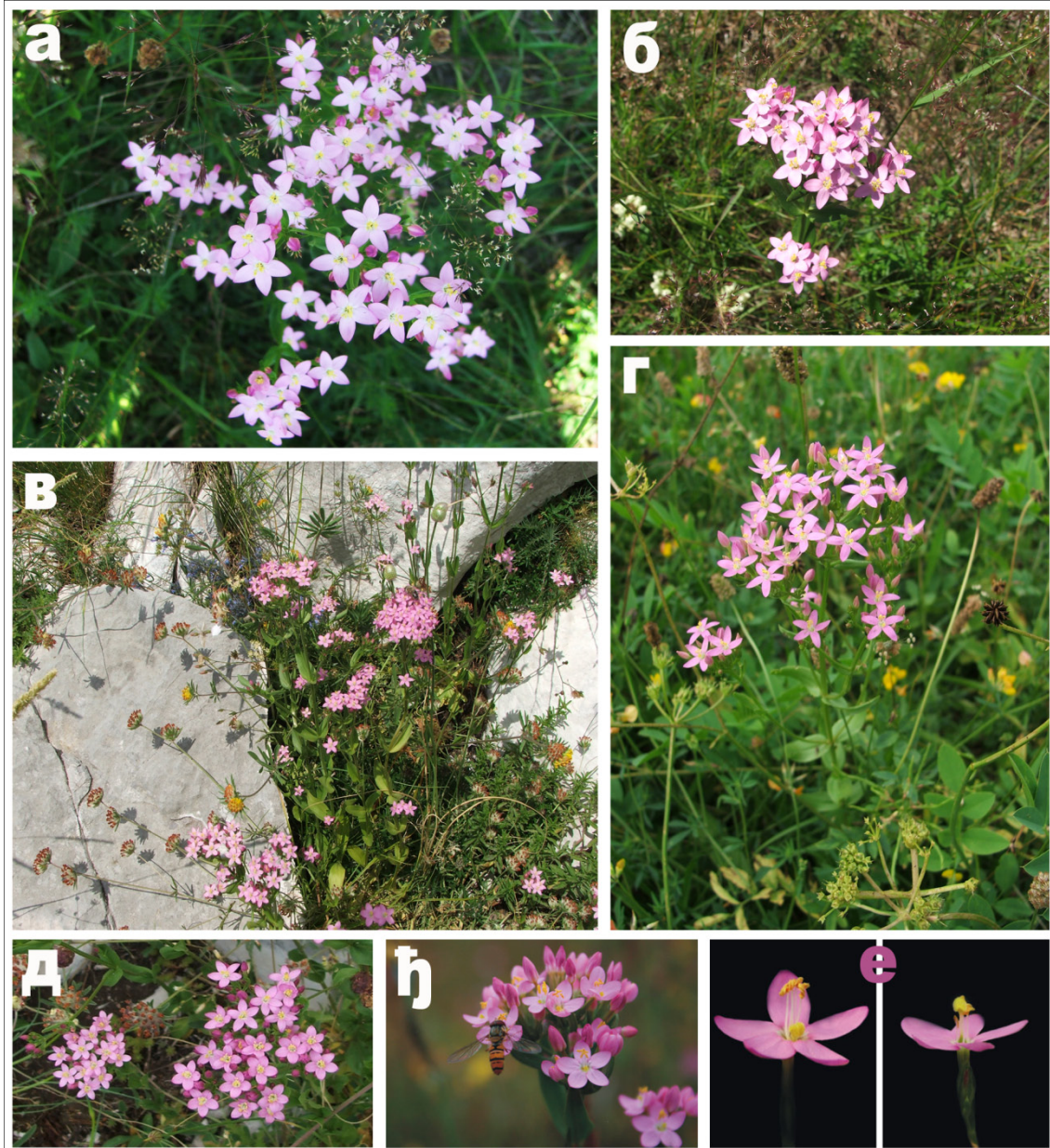
Wendel, 2000; Ramsey и Schemske, 2002). Полиплоидија укључује брзе промене у структури генома, као и интеракције између дуплицираних гена (Song и сар., 1995; Cronn и сар., 1999; Soltis и Soltis 2000; Liu и Wendel 2003; Adams и Wendel, 2004). Дуплицирани гени се тако ослобађају ограничења њихових функција и дивергирају, стварајући нове фенотипове код полиплоида (неофункционализација). Примећено је да се већина полиплоидних комплекса биљака развила за време Плеистоцена/Плиоцена и да њихова широка распрострањеност вероватно произилази из повећане способности да колонизују станишта настала после стабилизације климатских услова у Плеистоцену (Stebbins, 1985). Полиплоидија има богату историју истраживања и различити научни приступи су коришћени како би се она правилно објаснила (Osborn и сар., 2003). Неки истраживачи су се фокусирали на порекло полиплоида, дефинишући их као 1) аутополиплоиде, ако они потичу из мултипликације појединачног генома, или различитих генома исте врсте, или 2) алополиплоиде, ако су се при њиховом настанку комбиновали геноми више врста. Без обзира на разлике између полиплоида, заједничка особина им је висок ниво хетерозиготности због повећане могућности појаве мултиплих алелских локуса. Недавна употреба молекуларних техника увећала је наше знање о полиплоидији са аспекта еволутивног значаја, механизмима успостављања и стабилизације полиплоида (Levin, 1983; Felber, 1991; Bretagnolle и Thompson, 1995; Ramsey и Schemske, 1998), као и њиховој геномској еволуцији (Soltis и Soltis, 2000; Wendel, 2000; Adams и Wendel, 2004).

## **1.9. Општи подаци о проучаваној врсти**

### **1.9.1. Опис и распрострањење**

Кичица (*Centaureum erythraea* Rafn, 1800) је розетаста, двогодишња врста, чији се природни дистрибуциони опсег креће од западне Европе до кавкаског региона (*Flora Europea online database*, 2011), распростирући се на исток до Авганистана и јужно до северних делова Африке (*GRIN online database*, 2011). У Северној Америци и Аустралији је натурализована првенствено због својих лековитих особина (Mansion и Struwe, 2004).

Кичица расте на отвореним, често прелазним, привременим стаништима са огољеним површинама, као што су суви пашњаци, рано сукцесивне фазе заснивања шумске вегетације (нпр. после крчења), ивице шума,



**Слика 1:** а), б), в), г) и д) изглед биљака *C. erythraea* у цвету на различитим стаништима; ђ) опрашивач – мува лебдилица (*Episyrphus balteatus*) на цветовима кичице (преузето из: Brys и сар., 2011); е) изглед цвета *C. erythraea* (преузето из: Brys и Jacquemyn, 2012).

путеви и стазе, пропланци или отворене шуме, ободи канала, места поред новоизграђених путева, итд. (Radušienė, 1995; Van Rossum, 2009a).

Станишта са деградираним биљним покривачем су типична за кичицу (Слика **1б** и **в**) и витални капацитет популације је виши на местима где је међуврсна конкуренција смањена. Регенерација популација у густом биљном покривачу је слаба и популација тежи изумирању (*Radušienė*, 1995). Кичица најчешће расте на иловастим земљиштима или благо киселој иловачи са додатком глине.

Семе кичице клија у јесен или у пролеће, а биљке презимљују у облику мале розете (*Van Rossum*, 2009a). Само мали број (2%) јувенилних биљака достигне генеративну фазу. Многе младице угину, док друге остану у фази розете (*Radušienė*, 1995). Следеће године, у јулу, или августу појављују се једна до неколико (6) густих цимозних цвасти (*Van Rossum*, 2009a), које чини 50-70 цветова (*Brys* и *Jacquetin*, 2011) (Слика **1а-ђ**). Цветови се отварају ујутро, и то када су временски услови повољни и затварају се увече. Сазревање цветова је сукцесивно, али обично је већи број цветова отворен у исто време, а антеза траје 4-5 дана (*Brys* и *Jacquetin*, 2011). Два жига тучка најчешће сазревају 1-2 дана пре него што антере почну да ослобађају поленова зрна (протогинија, Слика **1е**). Семена су ситна и бројна (до 270 по чаури), али немају специфичан начин расејавања, већ, по отварању чауре, падају на земљиште у непосредној близини биљке (*Ubsdell*, 1979). По доношењу семена биљка угине (монокарпна врста).

### **1.9.2. Систематика и филогенетски аспекти**

Кичица (*Centaurium erythraea*) припада роду *Centaurium* Hill, 1756 и породици *Gentianaceae*. Рану класификацију фамилије *Gentianaceae* су успоставили: *Endlicher* (1838), *Grisebach* (1839), *Bentham* и *Hooker* (1876) и *Gilg* (1895). Упркос важном напретку систематике који је постигнут како традиционалним подацима (*Zeltner*, 1970; *Mészáros*, 1994; *Struwe* и сар., 1994; *Mészáros* и сар., 1996), тако и молекуларним приступима (*Yuan* и *Küpfer*, 1995; *Chassot* и сар., 2001; *Yuan* и сар., 2003), само је класификација по *Gilg* (1895), заснована на карактеристикама полена и општој морфологији, коришћена током XX века. Са развијањем

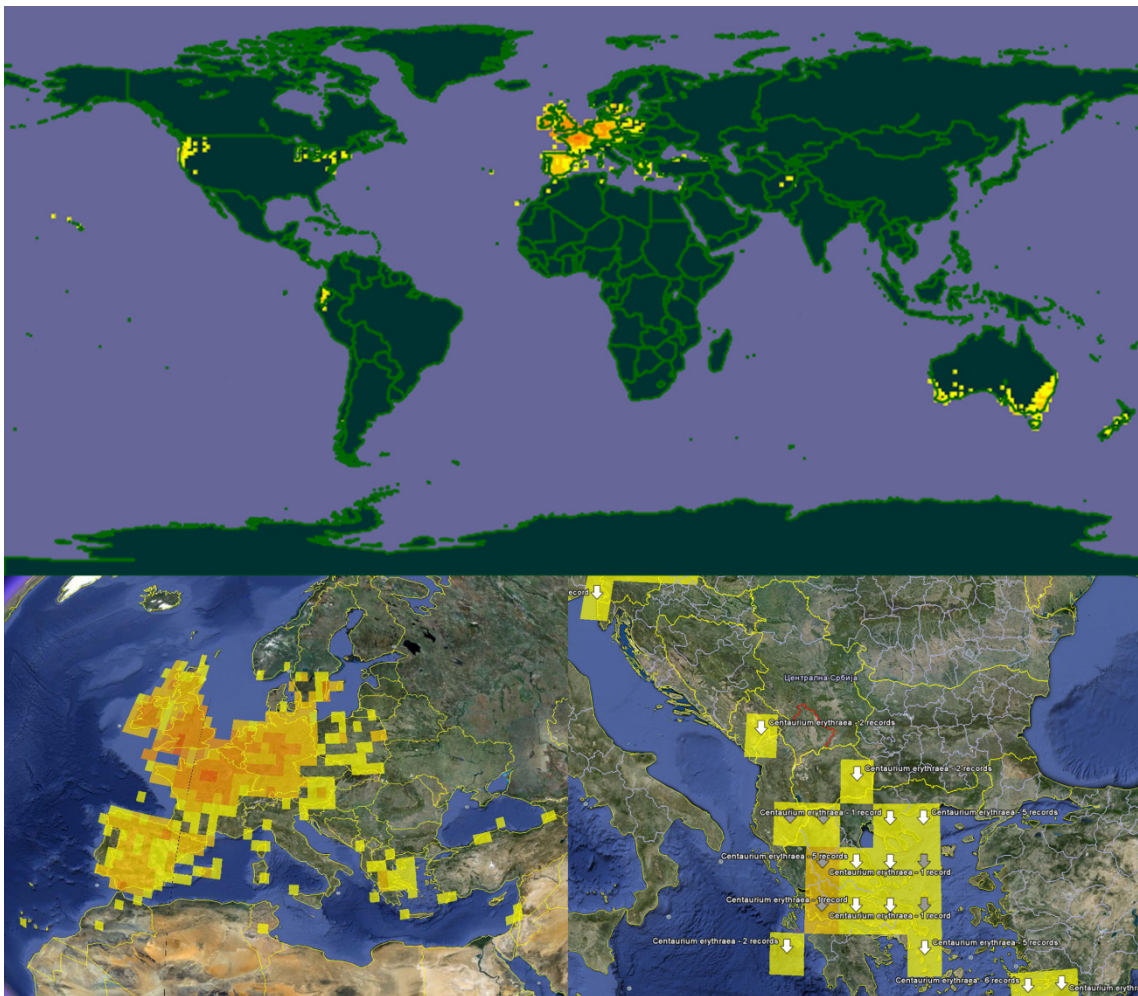
молекуларних метода предложена је нова класификација, која је настала комбиновањем филогенетског приступа и традиционалних података (Struwe и сар., 2002). Према овом приказу, фамилија *Gentianaceae* је подељена на 6 монофилетских трибуса (*Chironieae*, *Exaseae*, *Gentianeae*, *Helieae*, *Potalieae* и *Saccifolieae*). Трибус *Chironieae* је важна група од 26 родова и 160 врста (Struwe и сар., 2002; Mansion и сар., 2005). Овај трибус је даље издељен на три монофилетска подтрибуса на основу типа поленових зрна, дужине круничне тубе и спирализације антера.

У оквиру подтрибуса *Chironiinae*, род *Centaurium* садржи зељасте врсте са, најчешће, кратким животним веком (једногодишње или двогодишње, ретко вишегодишње врсте), које се карактеришу увијањем антера по ослобађању полена. У медитеранском басену расте око 25 диплоидних и полиплоидних врста овог рода (Zeltner, 1970). Детерминација врста рода *Centaurium* је тешка. Морфолошке карактеристике се слабо разликују између врста, јер на њих изразито утичу средински фактори (Melderis, 1931; Zeltner, 1970). Осим тога, различите врсте и подврсте рода *Centaurium*, радо ступају у међуврсну хибридизацију (Ubsdell 1976a, 1976b, 1979, Guggisberg и сар., 2006) и ова појава представља један од најзначајнијих узрока морфолошке варијабилности, што је често изазивало погрешну идентификацију таксона и разилажења у таксономским приступима (Zeltner, 1970; Melderis, 1972; Pringle, 1987, 2010). Присуство морфолошког полиморфизма којег показују различити таксони довела је до дефинисања превеликог броја врста рода *Centaurium* и различитих номенклатурних ставова између аутора (нпр. Grisebach, 1839; Gilg, 1895; Melderis, 1931; Robyns, 1954; Hegi, 1966; Zeltner, 1970).

Прву постојанију класификацију рода *Centaurium* дао је Melderis (1931, 1972). Он наводи три подврсте кичице: *Centaurium erythraea* ssp. *erythraea* Rafn, *C. erythraea* ssp. *rumelicum* (Velen.) Melderis и *C. erythraea* ssp. *turcicum* (Velen.) Melderis. На кариолошким студијама рода *Centaurium*, Zeltner (1970) је утврдио три нивоа плоидности: диплоидни, тетраплоидни и хексаплоидни. Према најновијим истраживањима (Mansion и сар., 2005), основна врста *C. erythraea* садржи две подврсте: *C.*

*erythraea ssp. erythraea* Rafn (тетраплоид –  $4x$ ), *C. erythraea ssp. rumelicum* (Velen.) Melderis (диплоид –  $2x$ ) и један варијетет *C. erythraea var. subcapitatum* (Corb.) R.A.E. Ubsdell (такође тетраплоид). Због свега наведеног, род *Centaureum* представља идеалну групу за истраживање нагле специјације хибридизацијом и полиплоидизацијом (Guggisberg и сар., 2006).

Род *Centaureum* се интензивно проучава већ 35 година, уз употребу цитогенетских метода (Zeltner, 1970; Ubsdell 1976b) и прелиминарних молекуларних анализа (Mansion и Struwe, 2004; Guggisberg и сар., 2006).



**Слика 2:** Порекло узорака кичице (*C. erythraea*) у колекцијама које обухвата мрежа *Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2012)*. Бројност узорака је представљена бојом – од жуте ка црвеној. Уочљиво је да се узорковање популација кичице са територије Балканског полуострва, са изузетком Грчке, није до сада спроводило.



Више од 1000 популација са диплоидним, тетраплоидним и хексаплоидним гарнитурима хромозома је сакупљено током тог времена од стране *Mansion* и сарадника (*Mansion* и сар., 2005). Међутим, Балканско полуострво је скоро потпуно неистражено у том смислу. Такође, према сервису *Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2012)*, који представља глобалну мрежу институција, чија је једна од основних делатности прикупљање података о биодиверзитету врста, од скоро 41.000 забележених уноса за врсту *Centaureum erythraea*, само стотинак потиче са територије Балканског полуострва (Слика 2) и поред тога што се ова област сматра једним од центара биодиверзитета великог броја биљних врста, а, видећемо, и кичице.

### 1.9.3. Секундарни метаболити кичице и њихов значај

Кичица је позната лековита врста и примењује се у народној медицини још од античког времена. Као биљна дрога „*Centaurii herba*“, веома је популаран састојак многих препарата (нпр. *Botion* и сар., 2005) за лечење стомачних тегоба, регулацију поремећаја варења (губитак апетита, стомачних тегоба, надимања, лошег варења) и примењује се као тоник за прочишћавање дигестивног система. Користи се и у третманима лечења: астме, екцема, жутице, напада цревних паразита, реуматизма, у редукцији хипертензије, у лечењу рана и механичких повреда, спазма гастроинтестиналне глатке мускулатуре, едема и као стимулатор активности јетре и жучне кесе (*Grieve, 1971; Capasso* и сар., 1983; *Bisset, 1994; Tyler, 1994; Beth, 1995; Schultz* и сар., 2001; *Kültür, 2007; Tahraoui* и сар., 2010). Кичица поседује пургативна, седативна, антипиретичка, антихелминтичка, антиинфламаторна, аналгестичка и диуретичка својства (*Grieve, 1971; Van Hellemont, 1986; Berkan* и сар., 1991; *Beth, 1995; Newall* и сар., 1996; *Haloui* и сар., 2000) и снажан је антиоксидативни агенс, па се препоручује у лечењу дијабетеса (*Sefi* и сар., 2011). Значај кичице може да се види и из податка да је њена употреба у традиционалној медицини описана у фармакопејама 23 различите државе (*Hatjimanoli* и *Debelmas, 1977*), као и референтним интернационалним фармакопејама (*British Herbal Pharmacopoeia, 1983; PDR for Herbal Medicines, 2000; European*

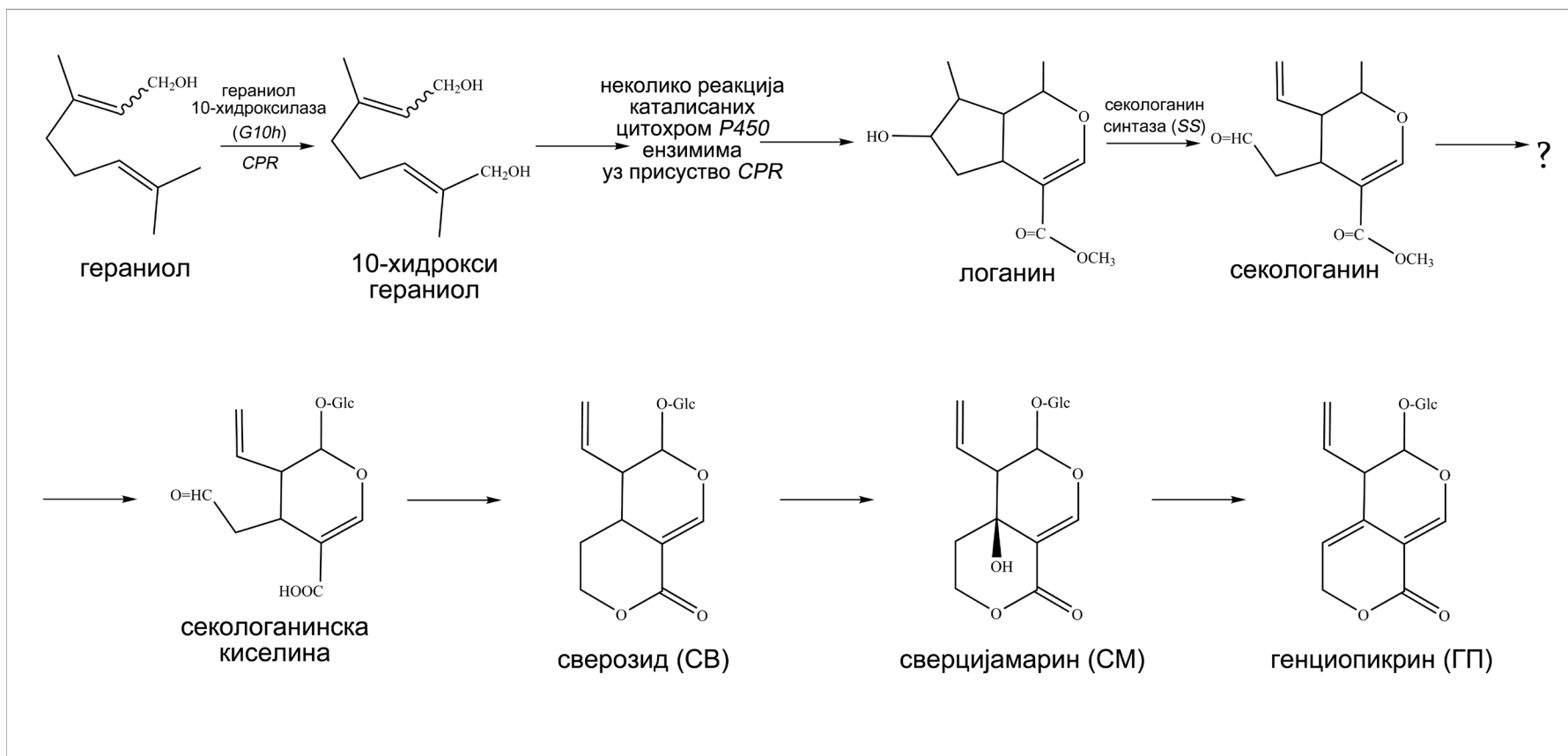
*Pharmacopoeia*, 2010) и прозвана је „медицинском биљком 2004. године“ (*Springefeld*, 2004). Као природан аромат, користи се широм света за производњу комерцијалних горких алкохолних и безалкохолних пића уз максималну дозвољену дозу између 0,0002 до 0,0008%, а према Савету Европе, кичица је сврстана у категорију N2 као природан аромат у производњи хране, који је дозвољено додавати у намирнице у малим количинама (*Newall* и сар., 1996; *European Medicines Agency*, 2009).

Као и многе врсте из фамилије *Gentianaceae*, кичица је богат извор фармаколошки активних секоиридоидних гликозида, ксантона и фенолних киселина и њихових деривата (*Jensen* и сар., 1975; *van der Sluis*, 1985; *Kaouadji* и сар., 1986; *Schimmer* и *Mauthner*, 1996; *Valentão* и сар., 2000, 2002). Секоиридоидни гликозиди имају антифунгално, антибактеријско (*van der Sluis* и *Labadie*, 1981; *Rodriguez* и сар., 1995; *Kumarasamy* и сар., 2003a, 2003b; *Šiler* и сар., 2010), хепатопротективно (*Kondo* и сар., 1994), гастропротективно (*Niiho* и сар., 2006), седативно (*Bhattacharya* и сар., 1976; *Rojas* и сар., 2000) и антитуморско (*Ishiguro* и сар., 1998) дејство. Фармаколошки најзначајнији секоиридоидни гликозиди кичице су: сверцијамарин, генциопикрин и сверозид. Због своје велике фармаколошке значајности, ова једињења представљају прилично ефикасне хемијске маркере у детерминацији врста кичице (*van der Sluis*, 1985; *Jensen* и *Schripsema*, 2002).

Секоиридоидни гликозиди спадају у секундарне иридоиде и карактеристични су по горком укусу, па је способност биљака да синтетишу оваква и слична једињења вероватно омогућила њихов опстанак и експанзију, услед негативног ефекта на хербиворе и паразите. Присутни су искључиво у групи дикотиледоних биљака, док код монокотила, као и код голосеменица, папрати и нижих биљака нису пронађени (Марин, 2003). У биљном ткиву су гликозидном везом везани за неки моносахарид, најчешће глукозу и веома су нестабилни када се одстрани шећер са основног молекула – агликона. Прекурсорско једињење за формирање иридоидног скелета обезбеђује ензим гераниол 10-хидроксилаза (Слика 3), превођењем гераниола у 10-хидроксигераниол

(Collu и сар., 2001). Даљи пут биосинтетезе укључује неколико реакција каталисаних цитохром *P450* ензимима, који у реакцијама учествују заједно са *NADPH*-цитохром *P450* редуктазама (*CPR*), као електрон-транспортерима (Schwartz и сар., 2009). Ензим секологанин синтаза (Слика 3), још једна од *P450* монооксигеназа, каталише оксидативно цепање циклопентанског прстена и тако преводи иридоиде у секоиридоиде (Inouye, 1970; Irmeler и сар., 2000; Yamamoto и сар., 2000). Ксантони изоловани из кичице су прилично разнолики (Takagi и Yamaki, 1982; Neshta и сар., 1982, 1983; Valentão и сар., 2000, 2002; Jensen и Schripsema, 2002).

У последњих неколико деценија, опсежна истраживања су вршена на идентификацији, детерминацији и побољшању продукције секундарних метаболита. Овај тренд се и данас наставља (Janković и сар., 2002; Valentão и сар., 2002; Jovanović и сар., 2009; Aberham и сар., 2011; Piątczak и сар., 2011).



**Слика 3:** Део биосинтетског пута три основна секоиридоидна гликозида кичице (*C. erythraea*). Приказана су једињења, као и ензими који каталишу реакције, битни за истраживања ове студије (према: *Irmeler* и сар., 2000; *Jensen* и *Schripseta*, 2002 и *Mahroug* и сар., 2007).

#### 1.9.4. Мере заштите

Традиционална медицина заснована на употреби биљака постала је поново веома популарна, како у развијеним земљама, тако и у земљама у развоју (*Sarwat* и сар., 2008). Процењује се да ће светско тржиште биљних лекова, које укључује биљне продукте и сирове материјале, имати годишњи пораст од 15% (*Joshi* и сар., 2004). Укупно глобално тржиште биљних лекова се процењује на 62 милијарде долара и очекује се да ће достићи вредност од 5 билиона долара до 2050. године (*IRVIPR*, 2000). Стално растућа потреба за биљним лековима проузроковала је губитак драгоценог биодиверзитета врста које се у ту сврху сакупљају, што, заузврат, изазива несташицу сировог материјала (*Sarwat* и сар., 2008). Уз то, локални фактори, као што су нпр. едафски и микроклиматски услови, конкуренција, активност хербивора (код кичице најчешће зечеви и пужеви (*Van Rossum*, 2009b)), могу значајно да утичу на демографију популација (*Husband* и *Barrett*, 1998; *Petrů*, 2005). Услед претеране експлоатације, постоји озбиљна опасност од изумирања појединих природних популација, с обзиром да плантажна производња кичице не задовољава захтеве тржишта. Уз бројне потешкоће које могу да наступе приликом производње кичице, није лако охрабрити пољопривреднике да је узгајају. За успешно узгајање кичице, највећи „камен спотицања“ је непредвидиво клијање семена (*Radušienė*, 1995). И поред свог широког распрострањења широм целе Европе, кичица је релативно ретка биљна врста и, у великом броју земаља, законом заштићена (нпр. *Piątczak* и сар., 2011). Селекција генотипова кичице са побољшаним агро-морфолошким карактеристикама и повећаним садржајем секундарних метаболита од интереса, комбинована са плантажним узгајањем, представљала би најбоље решење овог проблема. Унапређење фитохемијских карактеристика може да се постигне само ако се претходно сазна природа и обим варијабилности генотипова намењених за узгајање. За ефикасну конзервацију и управљање генетичким ресурсима, неопходно је анализирати генетички састав врста из различитих фитогеографских региона (*Sarwat* и сар., 2008). Ова истраживања би, тако, обезбедила информације о

јединствености и различитости генотипова, што је од виталног значаја за ефективно очување генетичке варијабилности врста (*Franco* и сар., 2001).

## 2. Циљ рада

Основни циљеви истраживања докторске дисертације су:

- Формирање колекције семена врсте *Centaureum erythraea Rafn* са територије Балканског полуострва, која репрезентује биодиверзитет врсте на овом подручју.
- Утврђивање нивоа плоидности одабраних популација из ове колекције како би се добила јаснија слика варијабилности кичице на овој територији.
- Развијање и оптимизација техника молекуларних маркера *RAPD* и *TRAP* у циљу добијања информација о степену унутарпопулационе и међупопулационе генетичке варијабилности кичице са Балканског полуострва.
- Одређивање варијабилности у садржају фитохемијских маркера – секоиридоидних гликозида (сверцијамарина, генциопикрина и сверозида) у биљкама гајених у контролисаним условима, а пореклом из природних популација Балканског полуострва.
- Утврђивање постојања корелација: између коефицијената генетичке сличности популација добијених помоћу *RAPD*, односно, *TRAP* молекуларним маркерима, између ових коефицијената и географских дистанци популација, као и између ових коефицијената и садржаја анализираних секундарних метаболита датих популација кичице.
- Стварање услова за евентуалну будућу заштиту биодиверзитета ове фармаколошки значајне и заштићене биљне врсте.

### 3. Материјал и методе

#### 3.1. Биљни материјал

##### 3.1.1. Формирање колекције гермплазме кичице

Као полазни биљни материјал за студије генетичког и фитохемијског дивезитета кичице (*Centaureum erythraea Rafn*) коришћена су семена сакупљена на 41 локалитету Балканског полуострва у времену од 1999. до 2010. године (Слика 4).



Слика 4: Дистрибуција анализираних популација *C. erythraea* на Балканском полуострву.

Колекција обухвата: 24 популације из Србије, седам популација из Црне Горе, четири популације из Македоније, две популације из



Републике Српске (Федерација БиХ), две популације из Бугарске, једну популацију из Хрватске и једну популацију из Грчке (Слика 4). Биљке су детерминисане на терену. Семена су сакупљана са најмање десет јединки из сваке популације, осим у случају популације Елемир, где је нађена само једна јединка. Овај начин сакупљања биљног материјала омогућио је да ова заштићена биљна врста буде поштеђена брања. Изузетак чини популација Пловдив, чије је семе добијено љубазношћу *Kew Garden, Richmond*, Велика Британија. За анализе су коришћене и биљке добијене из семена популација пореклом ван територије Балканског полуострва и које су представљале одговарајуће референтне групе (енг.: *out groups*), како би се добила шира географска слика варијабилности. То су популације кичице из Девона (добијене такође из *Kew Garden, Richmond*, Велика Британија) и Нанта (пореклом из *Jardin Botanique de Nantes*, Француска). Такође, као референтна група употребљена је врста блиска кичици, *Centaureum littorale (Turner) Gilmour*, чија су семена добијена из исте ботаничке баште у Француској. Колекција семена је депонована у стаклене посуде и похрањена на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Списак свих анализираних популација, њихове ознаке, година када су сакупљене или порекло, као и географске координате и надморска висина локалитета дати су у Табели 1.

### 3.1.2. Успостављање *in vitro* културе кичице

Семена су површински стерилисана у 20% раствору натријум-хипохлорита, током пет минута, а затим су пет пута испрана стерилном дејонизованом водом. Стерилисана семена су пребачена на *MS (Murashige и Skoog, 1962)* базалну хранљиву подлогу, која је садржала  $20\text{ g l}^{-1}$  сахарозе,  $7\text{ g l}^{-1}$  агара („Торлак“, Београд) и  $0,1\text{ g l}^{-1}$  *myo*-инозотола. *pH* вредност подлоге је подешена на 5,8 непосредно пре стерилизације на  $114^{\circ}\text{C}$  током 25 минута. Семена су исклијавана у поликарбонатним Петри кутијама, пречника  $9\text{ cm}$ , које су садржале по  $25\text{ ml}$  хранљиве подлоге.

Табела 1: Списак анализираних популација *C. erythraea* и *C. littorale*, њихови кодови и порекло

Назив популације	Код	Порекло	Година	Географска ширина	Географска дужина	Надм. висина
Елемир	<b>ЕЛМ</b>	Република Србија	2006	45°26'35,78"С	20°16'25,41"И	73
Иришки венац	<b>ИРВ</b>	Република Србија	2010	45° 9'27,65"С	19°51'43,64"И	371
Нерадин	<b>НЕР</b>	Република Србија	2005	45° 7'20,69"С	19°53'49,86"И	189
Шабац	<b>ШАБ</b>	Република Србија	2009	44°45'17,65"С	19°40'14,75"И	76
Ресник	<b>РЕС</b>	Република Србија	2010	44°42'25,11"С	20°26'36,59"И	198
Неменикуће	<b>НЕМ</b>	Република Србија	2008	44°29'11,05"С	20°34'39,77"И	339
Мачков камен	<b>МАЧ</b>	Република Србија	2009	44°19'37,13"С	19°17'40,13"И	645
Петница	<b>ПЕТ</b>	Република Србија	1999	44°14'53,12"С	19°55'45,12"И	305
Јарменовци	<b>ЈАР</b>	Република Србија	2010	44°10'44,42"С	20°32'42,43"И	406
Влакча	<b>ВЛК</b>	Република Србија	2009	44° 8'47,48"С	20°43'55,87"И	395
Вратна	<b>ВРТ</b>	Република Србија	2009	44°23'5,62"С	22°22'57,30"И	141
Велика Јасикова	<b>ВЛЈ</b>	Република Србија	2006	44° 5'17,97"С	22°21'3,43"И	241
Тара	<b>ТАР</b>	Република Србија	2006	43°55'21,45"С	19°30'19,94"И	545
Беле Воде	<b>БЛВ</b>	Република Србија	2006	43°14'13,80"С	20°15'20,98"И	956
Жељин	<b>ЖЕЉ</b>	Република Србија	2006	43°33'51,21"С	20°39'45,13"И	726
Жиљци	<b>ЖИЉ</b>	Република Србија	2008	43°22'46,78"С	21°0'41,64"И	710
Ртањ	<b>РТЊ</b>	Република Србија	2006	43°43'4,41"С	21°56'11,94"И	764
Облачинско језеро	<b>ОБЛ</b>	Република Србија	2006	43°18'16,90"С	21°40'54,39"И	306
Кална	<b>КАЛ</b>	Република Србија	2006	43°24'37,48"С	22°25'1,82"И	501
Мојинци	<b>МОЈ</b>	Република Србија	2010	43° 4'25,49"С	22°52'28,43"И	735
Врапча	<b>ВРП</b>	Република Бугарска	2010	42°51'54,51"С	22°42'11,07"И	835
Преслап	<b>ПРС</b>	Република Србија	2010	42°48'2,32"С	22°25'20,83"И	1120
Власинско језеро	<b>ВЛС</b>	Република Србија	2001	42°42'5,81"С	22°19'7,41"И	1217
Коћурац	<b>КОЋ</b>	Република Србија	2008	42°26'39,25"С	22° 5'51,45"И	1112
Вича	<b>ВИЧ</b>	Република Србија	2008	42°15'51,90"С	21° 4'46,36"И	1035
Тјентиште	<b>ТЈН</b>	Република Српска, Федерација БиХ	2007	43°21'20,08"С	18°41'14,02"И	756
Андрејевица	<b>АНД</b>	Црна Гора	2010	42°44'30,64"С	19°48'12,75"И	1066
Вратло	<b>ВРЛ</b>	Црна Гора	2009	42°33'37,09"С	18°32'43,96"И	1458

Табела 1 (наставак)

Мојдеж	<b>МЈЖ</b>	Црна Гора	2009	42°29'17,46"С	18°29'20,61"И	171
Суторина	<b>СУТ</b>	Црна Гора	2009	42°27'21,00"С	18°29'44,59"И	18
Жањице	<b>ЖАЊ</b>	Црна Гора	2009	42°23'45,28"С	18°34'44,89"И	11
Водице	<b>ВОД</b>	Црна Гора	2009	42°13'3,42"С	19°6'44,76"И	109
Улцињ	<b>УЛЦ</b>	Црна Гора	2009	41°53'21,97"С	19°18'20,61"И	1
Долно Коњско	<b>ДЛК</b>	(БЈ) Република Македонија	2008	41°3'43,23"С	20°48'4,77"И	961
Горња Бела Црква	<b>ГБЦ</b>	(БЈ) Република Македонија	2008	41°3'4,29"С	21°2'58,18"И	962
Асамати	<b>АСМ</b>	(БЈ) Република Македонија	2008	40°59'13,29"С	21°2'53,12"И	918
Фурка	<b>ФУР</b>	(БЈ) Република Македонија	2008	41°15'0,70"С	22°37'42,87"И	345
Платамонас	<b>ПЛТ</b>	Република Грчка	2009	39°59'36,81"С	22°36'19,17"И	279
Пловдив	<b>ПЛВ</b>	Република Бугарска, семе добијено љубазношћу <i>Kew Garden</i>	1970	42°8'46,63"С	24°41'4,12"И	166
Чемерница	<b>ЧЕМ</b>	Република Српска, Федерација БиХ	2006	44°39'48,69"С	17°11'34,50"И	663
Крк	<b>КРК</b>	Република Хрватска	2006	45°9'31,69"С	14°33'34,67"И	105
Девон	<b>ДЕВ</b>	Велика Британија, семе добијено љубазношћу <i>Kew Garden</i>	1989	НД	НД	НД
Нант	<b>ННТ</b>	Француска, семе добијено љубазношћу <i>Kew Garden</i>	2008	НД	НД	НД
<i>Centaurium littorale</i>	<b>ЛИТ</b>	Нант, Француска, семе добијено љубазношћу Jardin Botanique de Nantes	2004	НД	НД	НД

### 3.1.3. Услови гајења биљака

За потребе изолације ДНК, као и за одређивање количине ДНК по ћелији проточном цитометријом, клијанци стари две недеље су насумично одабрани и пребачени у стаклене тегле, запремине 760 ml, са провидним поликарбонатним затварачима. Биљке су гајене на базалној хранљивој подлози (100 ml) у условима дугог дана (циклус 16/8 сати: светло/мрак), на температури од  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  и релативној влажности ваздуха у посудама од 60-70%, током три месеца. За потребе *HPLC* анализа секундарних метаболита кичице, клијанци су аклиматизовани у стакленику, уз проценат преживљавања >90%. Биљке су гајене у стандардној мешавини тутинског тресета (60%, v/v), кварцног песка (20%) и глистењака (20%) током три месеца, при влажности ваздуха од 50-85%.

## 3.2. Анализа плоидности методом проточне цитометрије

### 3.2.1. Припрема биљног материјала

Биљке гајене три месеца у *in vitro* условима коришћене су за утврђивање количине ДНК по ћелији методом проточне цитометрије (енг.: *flow cytometry*). Узорковање биљног материјала је извршено у стерилним условима, при чему су, као материјал за анализу, узимани диференцирани листови, приближне површине око 1 cm<sup>2</sup>. Анализа је обухватила 43 популације *C. erythraea*. Најмање две јединке, појединачно, из сваке популације су коришћене за анализу плоидности. У анализу је такође укључена и једна популација познате плоидности (тетраплоид). Анализа је урађена у *Plant Cytometry Services, Schijndel*, Холандија.

### 3.2.2. Изолација једара

Узорци листова (20-50 mg) су уситњени оштрим сечивом у 0,7 ml хладног ДНК пуфера на 4° C. ДНК пуфер је припремљен по процедури коју су описали *Arumuganathan* и *Earle* (1991) и састојао се из следећих компоненти:

- 5 mM Hepes,
- 10 mM MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O,

- 50 mM KCl,
- 0,2% Triton X-100,
- 0,1% DTT (дитиотреитол),
- 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, флуоресцентна боја која лако пролази кроз ћелијску и једарну мембрану, селективно се везује за дволанчану ДНК и притом флуоресцира на 465 nm),
- pH вредност пуфера је подешена на 5,8.

Као интерни стандард, у сваки узорак је додат и мањи комад листа зелене салате (*Lactuca sativa L.*). После уситњавања, пуфером је подешена запремина узорака до 2 ml, а затим су узорци пропуштени кроз најлон филтере (пречник пора 50  $\mu\text{m}$ ), чиме су одстрањене нечистоће настале уситњавањем материјала, као што су: хлоропласти, митохондрије, делови мембрана, итд. После 15-30 минута инкубације на собној температури, током које флуоресцентна боја пролази кроз једрову опну и везује се за ДНК, раствори са обојеним једрима су анализирани проточном цитометријом.

### 3.2.3. Проточна цитометрија

Проточна цитометрија је техника бројања микроскопских честица (као што су ћелије, или хромозоми), растворених у течности, која се пропушта у млазу кроз апарат. Флуоресценција обојених једара, која пролазе кроз фокус светлосног зрака живине сијалице високог притиска, мери се фотодиодним детектором и конвертује у струјне импулсе. Када се узорци пропуштају уз примену одговарајућих подешавања филтера за ексцитацију и емисију, специјалним софтвером се добијају ДНК хистограми на којима може да се разликује сигнал пореклом од узорка и сигнал интерног стандарда.

Узорци кичице су анализирани проточним цитометром *CyFlow ML* (*Partec GmbH, Münster, Немачка*), опремљеним живином сијалицом високог притиска *OSRAM HBO 100 long life*, ексцитационим филтерима: *UG-1* и *BG-38*, емисионим филтером *GG 435*, филтером против прегревања *KG-1* и дихроичним огледалима: *TK 420* и *TK 560*. Коришћен је софтвер за

детекцију и обраду сигнала: *Flomax, ver. 2.4d (Partec GmbH, Münster, Немачка)*. Количина ДНК по ћелији је израчуната из односа средње вредности флуоресценције узорка и средње вредности флуоресценције интерног стандарда очитаних са хистограма, а ниво пloidности сваке јединке добијен је упоређивањем флуоресценција узорака и тетраплоидног стандарда.

### 3.3. Изолација ДНК за анализу молекуларним маркерима

За изолацију ДНК коришћене су биљке гајене у условима *in vitro*, у циљу спречавања интерференције стране ДНК у даљим анализама (пореклом од гљивичне и/или бактеријске инфекције, јаја инсеката и сл., који могу да буду присутни у узорцима из природних популација), што је неопходно с обзиром на високу осетљивост коришћених молекуларних анализа. Из сваке популације су насумично одабране по три јединке из којих је изолована ДНК. Листови (0,15–0,2 g по узорку) су моментално по одвајању од биљака замрзнути у течном азоту, како би се спречила ензимска активност, првенствено ДНА-зе. Узорци су уситњени у авану до ситног праха и на леду пребачени у микротубе од 1,5 ml. За екстракцију ДНК коришћен је модификован *CTAB* метод (*Doyle и Doyle, 1990*). Спрашени биљни материјал је екстрахован у 0,6 ml *CTAB* екстракционог пуфера, који је садржао: 20 mM Na-EDTA, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl и 2% (w/v) *CTAB* (цетил триметиламонијум бромид). Након 20 минута екстракције на 56°C, у сваки узорак је додато по 0,6 ml смеше хлороформ-изоамил алкохол (24:1 v/v). Узорци су центрифугирани на 12.000 g током десет минута, након чега су супернатанти одливани у нови сет микротуба. Поступак екстракције смешом хлороформ-изоамил алкохол је поновљен, а затим је у супернатанте (око 0,5 ml) додато по 0,25 ml 4 M NaCl и 0,75 ml изопропанола ради таложења ДНК. Након пола сата инкубације на 4°C, узорци су центрифугирани пет минута на 8.000 g. Сталожена ДНК је, после одливања раствора, испрана 70% етанолом и центрифугирана још једном на 8.000 g током пет минута. Алкохол је затим одстрањен, а узорци су осушени у стерилним условима. ДНК је растворена у 0,2 ml *TE* пуфера (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Елиминација РНК је извршена

третирањем узорака са по 5  $\mu\text{g}$  РНАзе (тип А, *Fermentas, Vilnius*, Литванија) и инкубацијом на 37°C током сат времена. Поновљено је пречишћавање узорака смешом хлороформ-изоамил алкохол, како би се одстранила РНАза. Квалитет и евентуална фрагментисаност ДНК су проверавани електрофорезом на 1% агарозним геловима, а потврда квалитета и квантификација ДНК у сваком узорку је одређена спектрофотометријски (спектрофотометар: *Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn*, Немачка), после разблажења 1:100 у дејонизованој води. На основу односа апсорбанци (А) узорака на 260  $\text{nm}$ /230  $\text{nm}$  и 260  $\text{nm}$ /280  $\text{nm}$  потврђен је квалитет изоловане ДНК. Прихватљиве вредности су биле:  $A_{260/230}$  – не мање од 1,6 и  $A_{260/280}$  – не мање од 1,8. Квантификација ДНК је одређена апсорбанцом на 260  $\text{nm}$  формулом:

ДНК концентрација [ $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ] =  $A_{260} \cdot 50 \cdot$  фактор разблажења

Прихватљива вредност је била – не мање од 0,2  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ . Узорци ДНК су чувани на -20°C до тренутка коришћења.

### **3.4. Анализа генетичког диверзитета популација молекуларним маркерима**

#### **3.4.1. *RAPD-PCR* анализа**

##### **3.4.1.1. Оптимизација и репродуцибилност реакција**

Оптимизација услова за *RAPD-PCR* методу је урађена према *Skorić* и сар., (2012) са малим модификацијама и састојала се из оптимизације састава реакционе смеше и оптимизације температурног програма *PCR* протокола. Тестирани су утицаји концентрације ДНК матрице, прајмера,  $\text{MgCl}_2$  и *Taq* полимеразе на добијене профиле. Након оптимизације, утврђене су концентрације компоненти за поставку *PCR* реакција. Финална запремина од 25  $\mu\text{l}$  садржала је следеће компоненте:

- 100  $\text{ng}$  ДНК узорка,
- 1 x  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  реакциони пуфер (*Fermentas, Vilnius*, Литванија),
- 2,5  $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,

- 200  $\mu\text{M}$  од сваког *dNTP* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* и *dTTP*),
- 2 јединице (*U*) *Taq* полимеразе (*Fermentas*, *Vilnius*, Литванија),
- 5 *pmol* прајмера (*Metabion*, *Martinsried*, Немачка).

### 3.4.1.2. Опсег експерименталних анализа

Експериментална анализа је подразумевала утврђивање *RAPD* профила 43 популације кичице, укључујући и једну популацију врсте *C. littorale*. За сваку испитану популацију, коришћене су ДНК изоловане из три насумично одабране индивидуе, како би се проценила унутарпопулациона варијабилност. *RAPD* анализе су урађене на укупно 132 јединке.

**Табела 2:** Списак коришћених прајмера за *RAPD-PCR* реакције и њихове секвенце.

Назив	Секвенца прајмера
<i>OPA 04</i>	5'-AATCGGGCTG-3'
<i>OPB 04</i>	5'-GGACTGGAGT-3'
<i>OPB 11</i>	5'-GTAGACCCGT-3'
<i>OPB 15</i>	5'-GGAGGGTGTT-3'
<i>OPB 17</i>	5'-AGGGAACGAG-3'
<i>OPB 18</i>	5'-CCACAGCAGT-3'
<i>OPC 19</i>	5'-GTTGCCAGCC-3'
<i>OPF 05</i>	5'-CCGAATTCCC-3'
<i>OPF 14</i>	5'-TGCTGCAGGT-3'
<i>OPH 01</i>	5'-GGTCGGAGAA-3'
<i>OPH 14</i>	5'-ACCAGGTTGG-3'
<i>OPO 02</i>	5'-ACGTAGCGTC-3'
<i>OPO 03</i>	5'-CTGTTGCTAC-3'
<i>OPO 07</i>	5'-CAGCACTGAC-3'
<i>OPO 15</i>	5'-TGGCGTCCTT-3'
<i>OPT 14</i>	5'-AATGCCGCAG-3'

За амплификацију *RAPD* маркера коришћено је 16 одабраних десетомерних прајмера. Прајмери су одабрани на основу квалитета профила и репродуцибилности трака. Одбачени су прајмери који су



продуковали бледе, непоуздане или сувише комплексне профиле. Списак коришћених прајмера и њихових секвенци налази се у Табели 2.

### 3.4.1.3. Поставка *RAPD-PCR* реакција

Поставка *PCR* реакција је рађена у стерилним условима, на леду. Реакционе смеше су припремљене по оптимизованој рецептури приказаној у поглављу 3.4.1.1. Као негативне контроле, припремљене су реакционе смеше без ДНК. Амплификације су вршене у *PCR*-машини *peqSTAR 96 Universal Gradient (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Немачка)* према следећем програму:

- иницијална денатурација: 5 минута на 95°C;
- 45 циклуса:
  - денатурација: 1 минут на 94°C,
  - хибридизација: 1 минут на 36°C,
  - елонгација: 2 минута на 72°C;
- финална екстензија: 10 минута на 72°C.

Поставка *PCR* реакција за одабране узорке је урађена два пута како би се тестирала репродукцибилност метода.

### 3.4.1.4. Раздвајање и визуелизација продуката *RAPD-PCR* реакција

Раздвајање продуката *PCR* реакција вршено је хоризонталном електрофорезом (кадица: *Compact L, Whatman, Biometra GmbH, Goettingen*, Немачка; извор напајања: *Standard Power Pack P25, Biometra®*, *Goettingen*, Немачка) на 1% агарозним геловима у 1 x *TBE* пуферу (89 mM *Tris*, 89 mM борна киселина, 2 mM *EDTA*), при 5,5 V cm<sup>-1</sup> током 1,5 сата. ДНК је обојена етидијум бромидом (0,5 μg ml<sup>-1</sup>), а гелови су визуелизовани на УВ трансилуминатору (*ST4 3026-WL/26M, Vilber Lourmat, Torcy, Француска*). Као материјал за даље анализе коришћене су фотографије гелова документоване истим апаратом. ДНК маркер (100 bp, *DNA Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Литванија*) је коришћен за утврђивање величине фрагмената и као репер при упоређивању трака између популација.

### 3.4.2. *TRAP-PCR* анализа

За добијање *TRAP* маркера коришћена су три специфична прајмера синтетисана на основу дела ДНК који кодира ензиме у биосинтетском путу секоиридоидних гликозида (гераниол 10-хидроксилаза, цитохром *P450* редуктаза и секологанин синтаза), као и три арбитрарна прајмера.

#### 3.4.2.1. Конструкција прајмера

За конструкцију специфичних *TRAP* прајмера коришћене су секвенце кичице добијене *Illumina Pired-End* секвенцирањем транскриптома и насумичном (*shotgun*) реконструкцијом транскриптома програмом *Sequinoia* (Малков и Симоновић, необјављени подаци). Као полазни материјал за секвенцирање је коришћена РНК из листова, односно коренова пет биљака уведених у културу, пореклом из популације ЖАЊ. И специфични и арбитрарни прајмери су дизајнирани тако да се састоје од по 18 *nt*. *BLAST* претрагом локалне базе секвенци је проверено да ли су изабрани специфични прајмери заиста специфични за транскрипте гена гераниол 10-хидроксилазе, цитохром *P450* редуктазе и секологанин синтазе. У недостатку геномских секвенци кичице није било могуће проверити да ли се прајмери налазе у појединачним егзонима или евентуално на спојевима егзона.

##### 3.4.2.1.1. Гераниол 10-хидроксилаза (*E.C. 1.14.14.1*)

У нуклеотидној бази секвенци (*GenBank*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) постоје три секвенце за гераниол 10-хидроксилазу (*G10h*): *GU168041* (из *Swertia mussotii*), *AJ251269* (из *Catharanthus roseus*) и *HM187585* (из *Picrorhiza kurroa*). На основу ових секвенци су помоћу *Local BLAST* тражене сличне секвенце у сету реконструисаних *cDNA* секвенци транскриптома кичице. Нађен је велики број хомологих секвенци, а прајмер *Ce-G10h* је конструисан у најдужој од њих (*smsa|29833655|f|38|c|o|dc|o*).

### 3.4.2.1.2. Цитохром P450 редуктаза (E.C. 1.6.2.4)

У *GenBank* се налази велики број секвенци за овај ензим из различитих врста, па и за кичицу (AY596976). Ова секвенца је скоро идентична са секвенцом AV086169 (из *Ophiorrhiza pumila*). Прајмер *Ce-OpCPR* је конструисан из секвенце кичице *smsa|27943122|f|30|c|o|dc|o* хомологе са AY596976.

### 3.4.2.1.3. Секологанин синтаза (E.C. 1.3.3.9)

У *GenBank* се налази само једна секвенца, L10081 (из *Catharanthus roseus*), која је коришћена за претрагу локалне базе секвенци кичице. Идентификована је секвенца од 1813 bp: *smsa|53632813|f|86|c|o|dc|o*, према којој је конструисан прајмер *Ce-SS*.

### 3.4.2.1.4. Арбитрарни прајмери

Арбитрарни прајмери су конструисани тако да се избегне самокомпатибилност и да GC садржај буде 40-60%. Такође, прајмери су конструисани из три дела (према *Li* и *Quiros*, 2001): 1) 3 до 4 селективна нуклеотида на 3' крају, 2) „језгро“, сачињено од 4 до 6 нуклеотида са AT или GC богатим регионима и 3) секвенца за попуњавање, која чини 5' крај прајмера.

**Табела 3:** Списак специфичних и арбитрарних прајмера коришћених у TRAP-PCR реакцијама и њихове секвенце.

	Назив прајмера	Секвенца прајмера	Референца
Специф.	<i>Ce-G10h</i>	5'-GACATGCGTGGCAGAGAC-3'	/
	<i>Ce-OpCPR</i>	5'-GAGGGGCCACAGAAGGAA-3'	/
	<i>Ce-SS</i>	5'-GCCAAGAAACCACCGGAG-3'	/
Арбитр.	<i>Arb1</i>	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'	<i>Li</i> и <i>Quiros</i> , 2001
	<i>Arb2</i>	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'	<i>Li</i> и <i>Quiros</i> , 2001
	<i>Arb4</i>	5'-GGAACCAAACACATGAAGA-3'	<i>Hu</i> и <i>Vick</i> , 2003

### 3.4.2.2. Опсег експерименталних анализа

Експериментална анализа је подразумевала утврђивање *TRAP* профила 43 популације *C. erythraea*, укључујући и једну популацију врсте *C. littorale*. За сваку анализирану популацију коришћене су ДНК изоловане из две јединке, како би се проверила репродуцибилност података и испитало евентуално постојање унутарпопулационе варијабилности, тако да су *TRAP* анализе урађене на укупно 88 јединки. Комбиновање прајмера (сваки специфични са сваким арбитрарним прајмером, Табела 3), дало је укупно девет комбинација, који су употребљени за *PCR* амплификацију ДНК фрагмената.

### 3.4.2.3. Поставка *TRAP-PCR* реакција

Свака реакциона *PCR* смеша била је финалне запремине 10  $\mu$ l и садржала је:

- 60 ng ДНК узорка
- 1 x  $(NH_4)_2SO_4$  реакциони пуфер (*Fermentas, Vilnius, Литванија*),
- 2,5 mM  $MgCl_2$ ,
- 200  $\mu$ M од сваког *dNTP* (*dATP, dCTP, dGTP* и *dTTP*),
- 1,5 јединицу (*U*) *Taq* полимеразе (*Fermentas, Vilnius, Литванија*),
- 1 pmol специфичног прајмера (*Invitrogen, Carlsbad, СА, САД*)
- 0,3 pmol арбитрарног прајмера (*Invitrogen, Carlsbad, СА, САД*)

Поставка *PCR* реакција је рађена на леду, у стерилним условима. Као негативне контроле, припремљене су реакционе смеше без ДНК. Амплификације су вршене у *PCR*-машини *peqSTAR 96 Universal Gradient* (*Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Немачка*) према следећем програму:

- иницијална денатурација: 5 минута на 94°C;
- 5 циклуса:
  - денатурација: 1 минут на 94°C,
  - хибридизација: 1 минут на 35°C,

- елонгација: 1 минут на 72°C;
- 35 циклуса:
  - денатурација: 1 минут на 94°C,
  - хибридизација: 1 минут на 50°C,
  - елонгација: 1 минут на 72°C;
- финална екстензија: 7 минута на 72°C.

Првих пет циклуса, у којима је температура хибридизације прајмера са ДНК матрицом свега 35°C, обезбеђују везивање оба прајмера за места на матрици са којима се делимично поклапају, како би се повећала варијабилност амплификованих продуката, али је у следећих 35 циклуса температура хибридизације повећана на 50°C, што је обезбедило ефикасну и доследну амплификацију продуката добијених у првих пет циклуса.

#### **3.4.2.4. Раздвајање и визуелизација продуката *TRAP-PCR* реакција**

Раздвајање и комплетна анализа *TRAP-PCR* продуката обављена је капиларном електрофорезом на *Agilent DNA 7500 Kit* чиповима помоћу *Agilent 2100 Bioanalyzer* система (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, САД*), према упутствима произвођача. У ту сврху је коришћен софтвер *Agilent 2100 Expert, V.02.08 (SR1)* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, САД*). Овим софтвером је такође вршена идентификација продуката путем електроферограма и њихово упоређивање између јединки истих или различитих популација. Као материјал за даље анализе коришћене су синтетичке слике гелова.

#### **3.4.3. Анализа информативности података добијених *RAPD* и *TRAP* маркерима**

Анализа фотографија добијених УВ трансилуминацијом *RAPD* фрагмената на агарозним геловима, као и синтетичких слика *TRAP* продуката, урађена је софтвером *TotalLab TL120 1D v2009 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, Велика Британија)*. Детекција трака на геловима вршена је аутоматским подешавањем софтвера, док је ревизија вршена

мануелно. Због немогућности да се сазна порекло разлика у интензитету ДНК фрагмената (*Harris*, 1995), присуство продукта је бележено без обзира на интензитет. Упоређивање и спаривање трака са истом молекулском тежином (ко-мигрирајуће траке), извршено је аутоматски истим софтвером, док је ревизија извршена ручно секвенцијалним поређењем упарених трака. Такве траке су сматране да су пореклом са истог генског локуса и да су хомологе. Присуство или одсуство амплификованог продукта дате величине у сваком узорку означавањем је са „1“, односно „0“. Ове информације су, тако, претворене у бинарни матрикс за сваки прајмер појединачно. Како су *RAPD* и *TRAP* маркери обично доминантни, усвојено је да свака трака представља фенотип на појединачном двоалелском локусу (*Williams* и сар., 1990).

На основу добијених матрица, израчунати су следећи параметри за сваки локус:

- $p$  – пропорција узорака који садрже дату траку и
- $Ib$  – информативност траке (мера вероватноће да је трака присутна у 50% испитаних генотипова) по формули:  $Ib = (1 - (2 \cdot |0,5 - p|))$ .

За сваки употребљени прајмер (*RAPD*), односно комбинацију прајмера (*TRAP*) израчунати су:

- укупан број трака,
- број полиморфних трака,
- опсег броја амплификованих продуката по популацији, као и просечан број трака по популацији,
- опсег величина амплификованих продуката (само за *RAPD* маркере),
- просечна информативност трака,  $AuIb$  по формули:  $AuIb = \frac{\sum^n Ib}{n}$ , где  $n$  представља укупан број трака по прајмеру или комбинацији прајмера,
- раздвојна моћ прајмера, тј. комбинације прајмера,  $Rp$ , (*resolving power*, према *Prevost* и *Wilkinson*, 1999), по формули:  $Rp = \sum Ib$ , која

представља квалитативни податак и пружа могућност директног поређења прајмера, па је од велике помоћи при њиховој селекцији и

- просечан садржај полиморфних информација (према *Roldán-Ruiz* и сар., 2000), *PIC* (енг.: *Polymorphic Information Content*), по формули:  $PIC = 2f_i(1 - f_i)$ , где  $f_i$  представља учесталост амплификованог алела, а  $1-f_i$  учесталост алела о. *PIC* вредност представља дискриминаторну способност прајмера или комбинације прајмера и узима у обзир не само број алела по локусу, него и њихову фреквенцију (*Lübberstedt* и сар., 2000).

За обе класе маркера анализиран је:

- укупан број трака,
- укупан број полиморфних трака,
- опсег величина амплификованих продуката (само за *RAPD* маркере, видети резултате у поглављу 4.6.1.),
- просечна информативност трака,  $AvIb$ ,
- просечна раздвојна моћ прајмера или комбинације прајмера,
- просечна хетерозиготност,  $H_{av}$ , по формули:  $H_{av} = \sum[2f_i(1 - f_i)] / N$ , што представља просечну *PIC* вредност за дати маркер,
- мултиплекс однос,  $MR$ , по формули:  $MR = m + p/n$ , према *Powell* и сар. (1996) и *Sarwat* и сар. (2008), где  $n$  представља број коришћених прајмера, односно комбинација прајмера, а  $m$  и  $p$  укупан број амплификованих мономорфних, односно полиморфних трака,
- маркер индекс,  $MI$ , мера опште ефикасности маркера по формули:  $MI = H_{av} \times MR$ , према *Powell* и сар. (1996).

#### 3.4.4. Израчунавање генетичке сличности популација

Обједињавањем матрица добијених помоћу свих 16 прајмера *RAPD* маркера или 9 комбинација прајмера *TRAP* маркера, добијене су универзалне бинарне матрице које су служиле за израчунавање генетичких сличности између јединки и популација и њихово графичко

представљање. Мономорфне траке нису узимане у даље статистичке анализе.

За израчунавање генетичке сличности ( $GS$ ) популација, коришћен је Жакардов (*Jaccard*, 1908) коефицијент, према формули:  $GS_{ij} = \frac{a}{a+b+c}$ , где  $GS_{ij}$  представља меру генетичке сличности између популација  $i$  и  $j$ , број полиморфних трака присутан код обе популације представљен је са  $a$ , док су  $b$  и  $c$  бројеви трака присутних код популација  $i$ , односно  $j$ , али не код обе. За ово израчунавање употребљена је *SIMQUAL* процедура *NTSYSpc* софтвера (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, ver. 2.11Q, Exeter Software, Setauket, NY, САД, Rohlf, 2003*).

Ефикасност Жакардовог коефицијента за оба типа молекуларних маркера упоређена је са коефицијентом једноставног упоређивања (енг. *simple matching coefficient*, *Sneath* и *Sokal*, 1963), односно са Дајсовим коефицијентом генетичке сличности (*Dice*, 1945; *Nei* и *Li*, 1979) употребом Мантеловог теста (*Mantel*, 1967) са 5000 пермутација.

У оквиру анализа *TRAP* методе, испитана је и међусобна корелација матрица генетичких сличности добијених помоћу три специфична прајмера комбинованих са истим арбитрарним прајмерима. Корелациони коефицијент је тестиран такође на Жакардовим дистанцама уз употребу *MXCOMP* модула *NTSYSpc* софтвера са 5000 пермутација.

#### **3.4.5. Мултиваријантне анализе**

Мултиваријантне статистичке методе, које се широко користе у анализи генетичког диверзитета, примењене су у овом раду за анализу података добијених молекуларним маркерима. Коришћене су следеће технике: анализа кластера (енг.: *cluster analysis*) и анализа основних координата (енг.: *Principal Coordinate Analysis - PCoA*).

Анализа кластера је мултиваријантна техника, чија је првенствена улога да групише јединке или објекте на основу карактеристика које они поседују, тако да се јединке са сличним описима математички окупе у



заједнички кластер (*Hair* и сар., 1995). Кластер методе засноване на дистанцама могу да буду нехијерархијске или хијерархијске, од којих се ове друге знатно чешће користе у анализама генетичког диверзитета. Међу агломеративним хијерархијским методама, *UPGMA* (*Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages*) је најчешће прихваћен кластер алгоритам (*Sneath* и *Sokal* 1973; *Panchen*, 1992). Кластер анализе за оба типа маркера извршене су софтверским пакетом *NTSYSpc*, уз употребу *UPGMA* алгоритма, помоћу *SAHN* (*Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested*) процедуре (*Sneath* и *Sokal*, 1973).

Један од најбољих начина евалуације ефикасности различитих кластер алгоритама је преко одређивања коефицијента кофенетичке корелације, који мери сагласност између група добијених кластер анализом и матрица генетичких дистанци базираних на међусобној сличности јединки, путем Мантеловог теста (*Romesburg*, 1984). За проверу колико верно кластер анализа представља сличности између популација употребљен је Мантелов тест и израчуната је кофенетичка корелација опцијама *COPH* и *MXCOMP*, *NTSYSpc* софтвера.

Бутстреп (енг.: *bootstrap*) техника је процедура општег поновног узорковања, у циљу прерачунавања дистрибуције статистичких података на основу независних посматрања (*Efron*, 1979). Бутстреп приступ може ефективно да се примени у процени статистичке подршке гранања у дендрограму (*Felsenstein*, 1985). Наиме, ако се одређено гранање у дендрограму појављује у 80% случајева поновног узорковања, каже се да та тачка гранања има 80% бутстреп подршке. У циљу одређивања поузданости гранања унутар фенограма, урађена је бутстреп анализа са 2000 пермутација софтвером *PAST* (*PA*laeontological *ST*atistics, ver. 1.89, *Hammer* и сар., 2009).

*PCoA* је скаларна мултиваријантна техника која омогућава проналажење и приказивање образаца у скупу података са више променљивих. *PCoA* се користи како би се помоћу дво- или тродимензионалног графичког приказа представиле јединке, тако да

геометријске дистанце између јединки представљају заправо њихове генетичке дистанце са минималном дисторзијом. Скупови јединки на таквом графичком приказу указују на групе са великом генетичком сличношћу. Додатна потврда кластер анализе генетичких удаљености популација кичице, урађена је *PCoA* дијаграмима (модули *NTSYSpc* софтвера: *DCENTER* - трансформација матрица и *EIGEN* за израчунавање својствених вектора трансформисаног матрикса), како би се обезбедио нехијерархијски аспект њихове генетичке повезаности.

Анализа молекуларне варијансе (*AMOVA*) се заснива на класичној анализи варијансе и прерачунава компоненте молекуларне варијансе на различитим хијерархијским нивоима. Израчуната је расподела укупне молекуларне варијансе на унутарпопулациону и међупопулациону варијабилност, добијену *RAPD* маркерима. *AMOVA* је изведена уз употребу еуклидских дистанци софтвером *Arlequin* (*ver. 3.11, Excoffier и сар., 2005*). Тест значајности је обављен употребом 1023 пермутације.

#### **3.4.6. Испитивање корелације између матрица сличности добијених *RAPD* и *TRAP* техником**

Корелација матрица добијених *TRAP* и *RAPD* маркерима проверена је Мантеловим тестом (*Mantel, 1967; Smouse и сар., 1986*), где корелациони коефицијенти између парова матрица сличности представљају Пирсонове корелационе коефицијенте израчунате за сваки пар јединки, користећи све фрагменте које њима припадају (*Franco и сар., 2001*). Корелациони коефицијент је тестиран на Жакардовим дистанцама оба типа маркера уз употребу модула *MXCOMP NTSYSpc* софтвера са 5000 пермутација. Степен сагласности може субјективно да се представи као:  $0,9 \leq r$  – врло добра сагласност,  $0,8 \leq r < 0,9$  – добра сагласност,  $0,7 \leq r < 0,8$  – слаба сагласност и  $r < 0,7$  – веома слаба сагласност (*Rohlf, 2003*).

### **3.5. Испитивање корелација између географских дистанци и генетичких сличности популација**

Географске дистанце између популација су добијене директним мерењем њихових удаљености на мапи. Израчунавање корелације између генетичких сличности добијених применом Жакардовога индекса и логаритмованих вредности географских дистанци извршена је помоћу веб сервиса *IBD (Isolation By Distance, version 3.22, Jensen и сар., 2005)*. У ове анализе нису укључене популације ДЕВ и ННТ, с обзиром да не припадају територији Балканског полуострва, као и ЛИТ, која представља засебну врсту и употребљена је само у мултиваријантним анализама молекуларних маркера као референтна група.

### **3.6. Анализа садржаја секундарних метаболита**

#### **3.6.1. Припрема биљног материјала**

После три месеца гајења у стакленику, при наведеним условима (поглавље 3.1.3.), девет јединки из сваке популације је искоришћено за екстракцију секундарних метаболита. Свака популација је, тако, репрезентована са по 3 узорка од којих сваки садржи надземне делове или коренове пореклом од 3 јединке. Биљни материјал је механички, а затим и текућом водом очишћен од супстрата и осушен до константне масе у сушници са сталним струјањем ваздуха, на собној температури, током три дана. Узорци су затим пребачени у папирне кесе и чувани на собној температури до даљег коришћења.

#### **3.6.2. Припрема узорака и екстракција секоиридоидних гликозида**

Сваки узорак је уситњен у авану до ситног праха помоћу течног азота и екстрахован у 99,8% метанола (*AppliChem, Cheshire, CT, САД*) у односу 1:50 (*w/v*). Екстракција секоиридоидних гликозида је извршена на собној температури, у мраку, током 24 сата. Узорци су, затим, прочишћени кроз филтер-папир, а додавањем метанола је подешена запремина екстраката у нормалним судовима. Сваки узорак је профилтриран кроз целулозни

филтер (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*), са пречником пора  $0,2 \mu\text{m}$ . Узорци су чувани у мраку на  $4^\circ\text{C}$  до тренутка коришћења.

### 3.6.3. HPLC детекција и квантификација секоиридоидних гликозида

Идентификација и квантификација секоиридоидних гликозида у метанолним екстрактима надземних делова и коренова кичице су извршене на *HPLC-DAD* систему (течна хроматографија под високим притиском са УВ детекцијом), модел *HP1100* (*Hewlett Packard, Santa Clara, CA, САД*). Коришћена је *Hypersil BDS-C18* ( $5 \mu\text{m}$ ) колона (*Phenomenex, Torrance, CA, САД*) унутрашњег пречника  $2 \text{mm}$ , а као мобилна фаза ацетонитрил (*HPLC* чистоће, *J. T. Baker, Deventer, Холандија*) и  $0,2\%$  фосфорна киселина. Ацетонитрил (А) и фосфорна киселина (Б) су елуирани градијентом према следећој шеми:  $100\%$  до  $98\%$  Б током два минута,  $98\%$  до  $90\%$  Б током следећа три минута,  $90\%$  до  $80\%$  Б за следећих пет минута и  $80\%$  до  $0\%$  Б за последњих 10 минута. Проток је подешен на  $0,5 \text{ml min}^{-1}$ , температура на  $25^\circ\text{C}$ , а таласна дужина *DA* детектора на  $260 \text{nm}$ . Идентификација пикова је извршена софтвером *Agilent ChemStation for LC 3D systems (Rev.B.04.01[481], 2008)* (*Agilent Technologies, Wilmington, DE, САД*). Стандардни раствори појединачних секоиридоидних гликозида су припремљени растварањем по  $10 \text{mg}$  сваког референтног једињења (генциопикрин, ГП,  $>90\%$  чистоће, *Roth, Karlsruhe, Немачка*; сверцијамарин, СМ и сверозид, СВ, оба  $98\%$  чистоће, *Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Немачка*) у  $10 \text{ml}$  метанола. Даљи калибрациони нивои су припремљени разблаживањем ових раствора у метанолу.

Концентрација секоиридоидних гликозида: СМ, ГП и СВ квантификована је у три узорка надземног дела и корена из сваке од 43 популације *S. erythraea*. Изузетак су чиниле популације: ШАБ, ЈАР и ГБЦ, код којих је због изненадне гљивичне инфекције у стакленику и пропадања јединки било могуће припремити само по један узорак надземног дела и корена. Такође, код популација РЕС, МОЈ, ПРС, ВОД и

АСМ, услед слабог пораста масе корена није било могуће припремити више од једног узорка.

#### **3.6.4. Статистичка обрада података**

Како би се испитала варијабилност у садржају секоиридоидних гликозида у контексту порекла биљног материјала (део биљке или популација), употребљена је факторијална анализа варијансе са утнежђењем где су популације одређене као фиксни фактор, а део биљке утнежђен унутар популација. За анализу варијансе коришћена је процедура *GLM* програмског пакета *SAS* (*SAS Institute Inc.*, 2002). Процедура *CORR* из *SAS* софтвера је коришћена за процену фенотипских корелација између парова различитих особина надземног дела или корена биљака као и између парова истих особина у различитим деловима биљке. Фенотипске корелације парова особина су процењене као Пирсонове продукт-момент корелације појединачних јединки.

Мултиваријантне методе могу да се примењују и на фитохемијске податке. Један од таквих метода је и анализа основних компоненти (енг.: *Principal Component Analysis, PCA*). *PCA* се дефинише као „метод смањивања обима података који разјашњује везе између два или више карактера и дели укупну варијансу почетних карактера на ограничен број нових, некорелисаних, ортогоналних варијабли, названих 'основне компоненте'“ (*Wiley*, 1981). *PCA* анализа популација је изведена директно из концентрација сва три секоиридоидна једињења из надземног дела и корена.

#### **3.7. Испитивање корелације између садржаја секундарних метаболита и матрица генетичких сличности**

Корелације између квадратних еуклидских дистанци између популација кичице, добијених нормализацијом свих 6 варијабли (СМ, ГП и СВ у надземном делу или корену) и генетичких сличности популација добијених Жакардовим коефицијентом, израчунате су независно, како за

*RAPD* тако и за *TRAP* маркере, употребом *PAST* софтвера уз 5000 пермутација.

## 4. Резултати

### 4.1. Колекција гермплазме рода *Centaurium*

Колекција гермплазме рода *Centaurium* формирана је захваљујући теренским истраживањима током последњих 10 година и прикупљањем семена различитих природних популација са Балканског полуострва. Ова колекција садржи 63 диплоидних и тетраплоидних популација врсте *Centaurium erythraea*, али, најчешће услед техничких проблема, нису све популације из колекције могле да буду укључене у анализу молекуларне и фитохемијске карактеризације. Поред проучаване врсте, у колекцији се налази и 42 узорка семена из природних популација других врста кичица: *C. tenuiflorum*, *C. pulchellum*, *C. littorale ssp. littorale*, *C. littorale ssp. uliginosum*, *C. maritimum*, као и популација потенцијалних међуврсних хибрида.

### 4.2. Општа запажања параметара растења

Стерилисана семена све 44 анализиране популације кичице су успешно клијала у условима *in vitro* (> 80%), чиме је обезбеђен полазни материјал за даља истраживања (Слика **5а**). Биљке гајене у стакленим посудама су задржавале розетасту форму и нису показивале абнормалности у расту (витрификација, формирање калуса и сл.). Изузетак је популација АСМ, код које је уочено издуживање цветног стабла већ после првог месеца гајења. Иста појава је примећена код јединки ове популације приликом гајења у стакленику (Слика **5ђ**). Јединке осталих популација, као и у условима *in vitro*, остајале су у розетастој форми, без битних знакова међусобних морфолошких разлика (Слика **5б-д**).

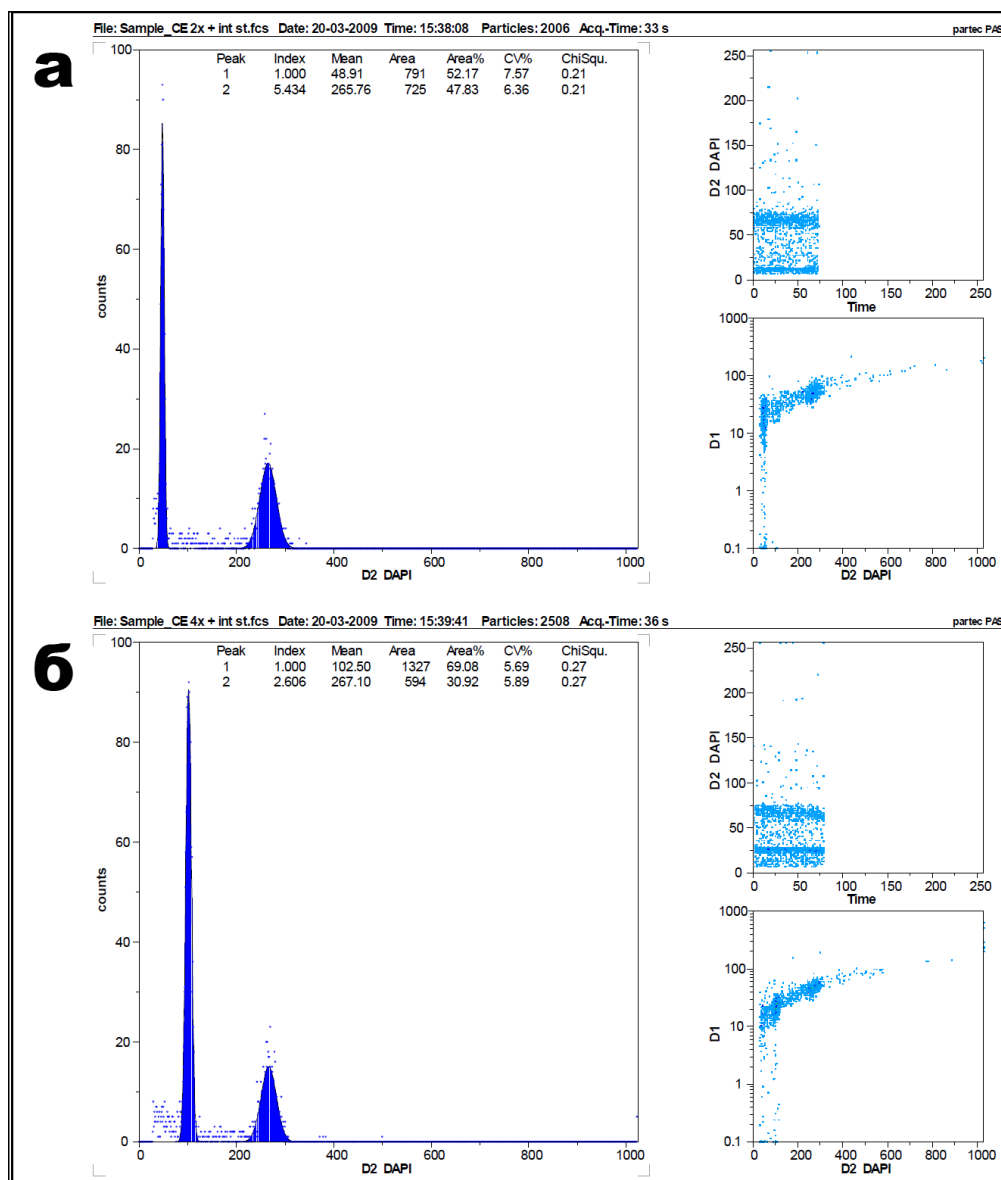


**Слика 5:** а) клијанци *C. erythraea* на MS хранљивој подлози у култури *in vitro*; б) и в) аклиматизоване младе биљке *C. erythraea* током гајења у стакленику; г) изглед јединке из тетраплоидне популације РТЊ и д) диплоидне популације ТЈН, након двомесечног узгајања у стакленику; њ) изглед јединке из популације АСМ након двомесечног узгајања у стакленику.

#### 4.3. Плоидност популација

Већина популација је показала постојање тетраплоидног хромозомског сета, осим у случају популација ТЈН и ГБЦ, код којих је детектован диплоидни геном. Слабо одступање од стриктне тетраплоидности уочено је још само код популације ФУР, где је примећено повећање количине ДНК од 5% у односу на тетраплоидни геном контролног узорка. На Слици 6 представљени су хистограми добијени проточном цитометријом једног диплоидног (а) и једног тетраплоидног (б) генома кичице. Битно је напоменути да се јединке из диплоидних популација нису морфолошки разликовале од јединки тетраплоидних популација (Слика 5г и д). Јединке пореклом из истих популација нису показале међусобне разлике у количини ДНК по ћелији.





**Слика 6:** Хистограми флуоресценције једара **а)** диплоидне и **б)** тетраплоидне јединке из популација ТЈН, односно, НЕР методом проточне цитометрије. Пик 1 представља узорак, док је интерни стандард (*Lactuca sativa*) представљен пиком 2, на обе слике.

#### 4.4. Квалитет изоловане ДНК

Иолована ДНК није показала знаке фрагментације на агарозним геловима. Принос ДНК у узорцима је био на задовољавајућем нивоу, а квалитет ДНК мерен односом апсорбанце 260/280 *nm* био је увек већи од 1,8 (осим у случају једне јединке из популације ВЛК, са незнатно мањом вредношћу), као и односом апсорбанце 260/230 *nm*, који је био већи од 1,6

(осим у случајевима популација НЕМ и ДЕВ, где је по једна јединка имала незнатно нижу вредност). Овим проверама искључена је могућност да квалитет ДНК утиче на добијање и тумачење резултата.

#### 4.5. Анализа генетичке варијабилности *RAPD* молекуларним маркерима

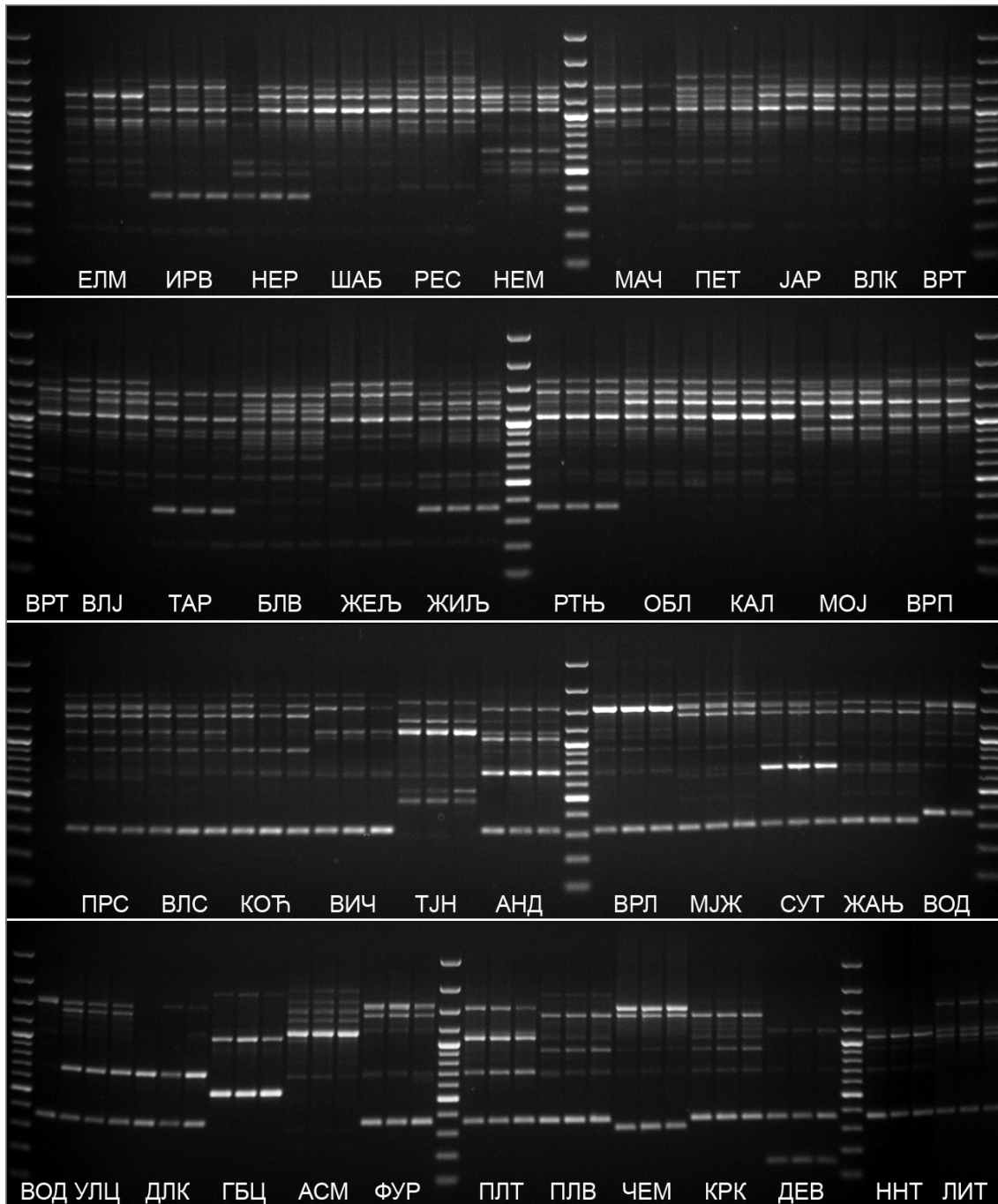
##### 4.5.1. Електрофоретски профили

Иzolована ДНК из лисног ткива 132 јединке пореклом из 44 популације кичице, анализирана је техником *RAPD-PCR*. Слика 7 приказује *PCR* продукте свих анализираних јединки репрезентативним прајмером *OPB 15*.

Укупан број амплификованих фрагмената био је 408, 12-37 трака по прајмеру (просечно 25,5), са опсегом дужине 150-4000 *bp* (Табела 4). Од тога 405 трака су биле полиморфне, а проценат полиморфизма се кретао од 83,33% до 100%, зависно од прајмера, са просеком од 98,23%. Међутим, ако се из анализе изоставе популације: ТЈН, ГБЦ (диплоиди), АСМ (вероватно међуврсни хибрид) и ЛИТ (референтна врста), које, како ћемо касније видети, по плоидности и/или профилима молекуларних маркера прилично одступају од осталих тетраплоидних популација, проценат полиморфних трака се смањује – 66,67-100%, са просеком од 82,6%. Прајмери су амплификовали 1 (популација ВРП са прајмером *OPT 14*) до 17 фрагмената (популација ПРС са прајмером *OPO 15*), а произвели су просечно 3,32 (*OPB 17*) до 11,68 (*OPO 15*) трака по популацији. Просек свих прајмера је износио 7,75 трака по популацији. Просечна информативност трака по прајмеру (*AuIb*) је имала опсег од 0,1894 (прајмер *OPB 17*) до 0,4338 (*OPB 15*) са просеком од 0,3347. Раздвојна моћ прајмера (*Rp*) се кретала од 0,2727 (*OPB 17*) до 15,1818 (*OPB 15*) и просечно је износила 8,8693. Просечан полиморфни информациони садржај (*AuPIC*) је износио од 0,1569 (прајмер *OPB 17*) до 0,2873 (*OPB 15*). На основу просека *AuPIC* свих прајмера, добијена је просечна хетерозиготност ( $H_{av}$ ) од  $0,2354 \pm 0,04$ . Уз мултиплекс однос (*MR*) са вредношћу од 25,5, добијен је макер индекс (*MI*) за *RAPD* маркер-систем од 6,0037.

**Табела 4:** Полиморфност и статистички параметри информативности прајмера, коришћених у *RAPD-PCR* реакцијама у процени генетичке варијабилности анализираних популација кичице.

Код прајмера	Укупан број трака	Број полиморфних трака	Полиморфизам (%)	Полиморфизам (%) без популација: ТЈН, ГБЦ, АСМ, ЛИТ	Број трака по популацији (опсег)	Просечан број трака по популацији (опсег)	Просечна информативност трака ( <i>AvIb</i> )	Раздвојна моћ прајмера ( <i>Rp</i> )	Просечан полиморфни садржај ( <i>AvPIC</i> )	Величина амплификованих фрагмената (бп)
<i>OPA 04</i>	27	27	100	85,19	3-11	6,05	0,3367	9,0909	0,2353	200-2200
<i>OPB 04</i>	30	29	96,67	73,33	5-11	7,68	0,3576	10,7273	0,2406	350-4000
<i>OPB 11</i>	33	33	100	100	3-12	8,48	0,4063	13,4091	0,2774	430-3000
<i>OPB 15</i>	35	35	100	88,57	4-14	9,32	0,4338	15,1818	0,2873	150-3200
<i>OPB 17</i>	12	12	100	66,67	2-7	3,32	0,1894	2,2727	0,1569	280-3500
<i>OPB 18</i>	24	22	91,67	66,67	7-15	11,09	0,2538	6,0909	0,1952	230-2600
<i>OPC 19</i>	20	20	100	85	6-11	8,39	0,2023	4,0455	0,1715	550-3200
<i>OPF 05</i>	15	15	100	86,67	2-7	4,14	0,3333	5,0000	0,2424	340-2500
<i>OPF 14</i>	12	10	83,33	66,67	5-10	7,48	0,3447	4,1364	0,2146	530-2300
<i>OPH 01</i>	28	28	100	92,86	2-11	6,93	0,3977	11,1364	0,2694	400-3300
<i>OPH 14</i>	28	28	100	89,29	5-13	8,95	0,3312	9,2727	0,2471	380-3300
<i>OPO 02</i>	37	37	100	86,49	4-11	7,70	0,3354	12,4091	0,2377	300-3200
<i>OPO 03</i>	29	29	100	89,66	5-12	7,75	0,3903	11,3182	0,2641	300-3700
<i>OPO 07</i>	23	23	100	78,26	4-10	7,00	0,3953	9,0909	0,2738	250-3200
<i>OPO 15</i>	34	34	100	85,29	8-17	11,68	0,3957	13,4546	0,2700	340-2500
<i>OPT 14</i>	21	21	100	80,95	1-11	8,04	0,2511	5,2727	0,1838	330-2700
укупно/ просечно	408	403	98,23	82,60	1-17	7,75	0,3347	8,8693	0,2354	150-4000



**Слика 7:** Електрофоретски профили *RAPD-PCR* продуката различитих популација кичице добијени употребом прајмера *OPB 15*. Свака популација је представљена са три профила пореклом из различитих јединки.

#### 4.5.2.      **Анализа матрица генетичких сличности**

На основу анализираних профила ДНК добијених методом *RAPD-PCR*, конструисан је матрикс генетичких сличности уз примену Жакардовог коефицијента. У Табели 5 приказане су вредности међусобних коефицијената сличности свих анализираних популација. Минималан коефицијент (који представља највећу генетичку дистанцу) од 0,17 запажен је између популација ВРТ и ЛИТ, односно, популација ОБЛ и АСМ, док је највећа сличност примећена између популација ЈАР и ВЛК са коефицијентом 1. Просечан коефицијент сличности свих популација је износио 0,44.

Коефицијенти корелације између матрица сличности добијених Жакардовим коефицијентом и коефицијента једноставног упоређивања или Дајсовог коефицијента су високи и износе 0,97341\*\*\*\*, односно 0,99605\*\*\*\*, према Мантеловом тесту са 5000 пермутација.

#### 4.5.3.      **Мултиваријантне анализе *RAPD* података**

##### 4.5.3.1. **Кластер анализа *RAPD* података**

На Слици 8 представљен је фенограм свих анализираних јединки, добијен методом *UPGMA*. С обзиром на веома ниску унутарпопулациону варијабилност (*AMOVA* је утврдила удео унутарпопулационе варијабилности у укупној молекуларној варијабилности од свега 0,48%\*\*\*\*) и ради лакшег тумачења и праћења резултата, овај фенограм је апроксимиран фенограмом на коме је представљена само једна јединка по популацији (Слика 9). Коефицијент кофенетичке корелације представљеног фенограма износи 0,9286, што указује на снажну сагласност између вредности добијених кластер анализом и матрица Жакардовог коефицијента сличности између популација.

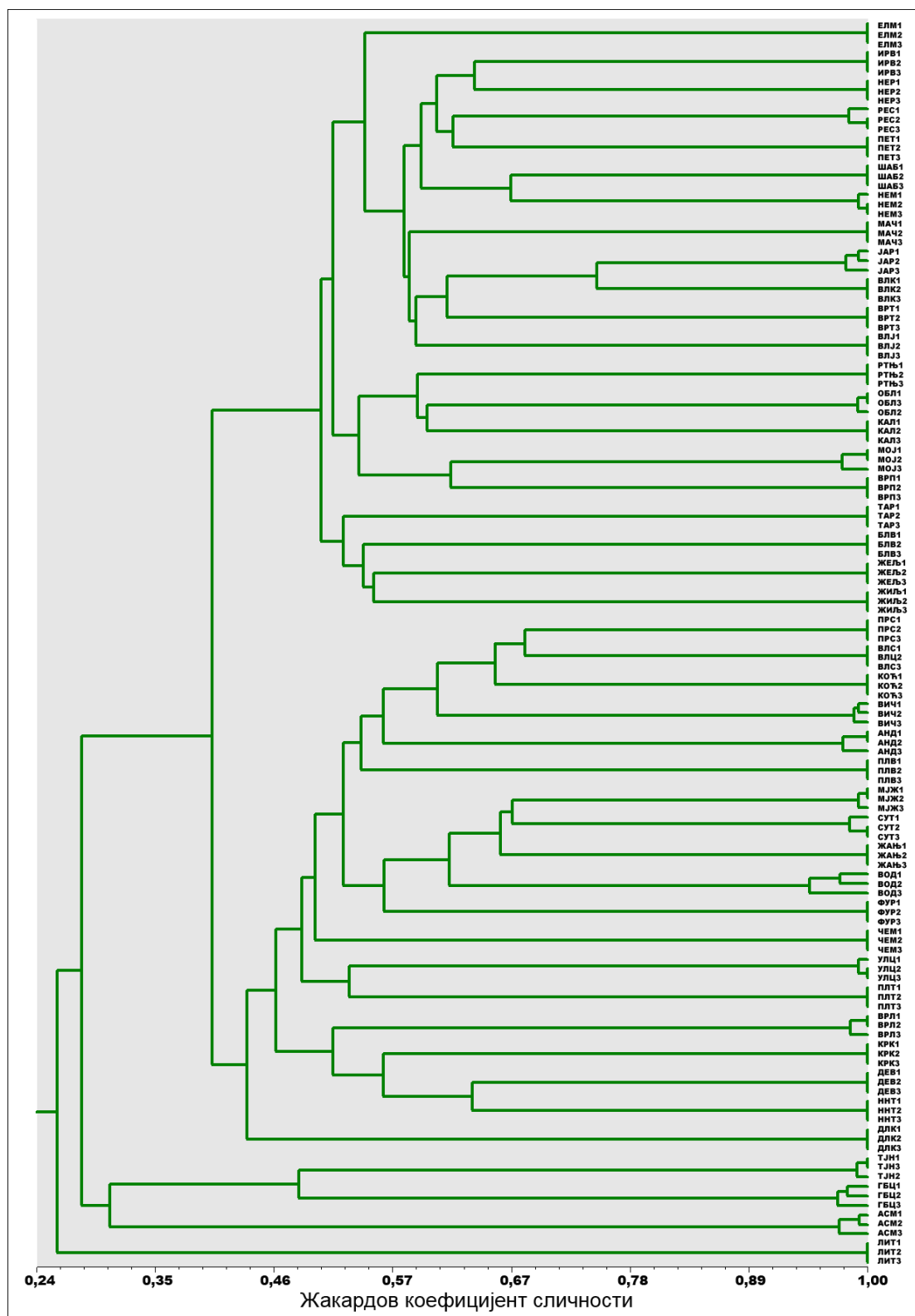
Како би се лакше уочили резултати *UPGMA* анализе, пет високо диференцираних кластера је обележено словима. Два од наведених 5 кластера могу да се раздвоје и окарактеришу на основу географских области којима припадају популације. Међутим, остали кластери (А, Б и В)

Табела 5: Вредности Жакардовог коефицијента генетичких сличности између анализираних популација кичице, заснованих на анализама *RAPD* маркера.

	ЕЛМ	ИРВ	НЕР	ШАБ	РЕС	НЕМ	МАЧ	ПЕТ	ЈАР	ВЛК	ВРТ	ВЛЈ	ТАР	БЛВ	ЖЕЉ	ЖИЉ	РТЊ	ОБЛ	КАЛ	МОЈ	ВРП	ПРС	ВЛС		
ЕЛМ	1,00																								
ИРВ	0,55	1,00																							
НЕР	0,49	0,63	1,00																						
ШАБ	0,51	0,58	0,54	1,00																					
РЕС	0,49	0,61	0,61	0,60	1,00																				
НЕМ	0,53	0,62	0,58	0,66	0,59	1,00																			
МАЧ	0,56	0,55	0,55	0,57	0,55	0,59	1,00																		
ПЕТ	0,53	0,58	0,58	0,56	0,61	0,59	0,60	1,00																	
ЈАР	0,56	0,65	0,60	0,58	0,54	0,61	0,58	0,59	1,00																
ВЛК	0,57	0,59	0,56	0,60	0,53	0,58	0,58	0,56	0,75	1,00															
ВРТ	0,53	0,52	0,53	0,56	0,51	0,54	0,54	0,50	0,59	0,62	1,00														
ВЛЈ	0,51	0,57	0,57	0,54	0,54	0,58	0,57	0,58	0,61	0,58	0,53	1,00													
ТАР	0,44	0,46	0,47	0,40	0,44	0,44	0,47	0,44	0,51	0,49	0,53	0,47	1,00												
БЛВ	0,50	0,53	0,53	0,50	0,51	0,52	0,52	0,49	0,58	0,56	0,52	0,53	0,52	1,00											
ЖЕЉ	0,46	0,51	0,48	0,49	0,48	0,54	0,51	0,50	0,53	0,52	0,51	0,53	0,49	0,53	1,00										
ЖИЉ	0,42	0,51	0,50	0,45	0,46	0,50	0,45	0,46	0,51	0,50	0,49	0,51	0,52	0,52	0,54	1,00									
РТЊ	0,48	0,56	0,52	0,50	0,46	0,54	0,46	0,48	0,54	0,54	0,51	0,55	0,45	0,47	0,52	0,54	1,00								
ОБЛ	0,47	0,48	0,53	0,49	0,45	0,52	0,46	0,51	0,55	0,50	0,51	0,54	0,45	0,43	0,52	0,50	0,58	1,00							
КАЛ	0,49	0,51	0,51	0,48	0,43	0,54	0,49	0,50	0,54	0,52	0,54	0,52	0,50	0,50	0,53	0,51	0,57	0,59	1,00						
МОЈ	0,50	0,51	0,45	0,49	0,46	0,52	0,54	0,47	0,52	0,50	0,51	0,54	0,45	0,50	0,46	0,46	0,50	0,54	0,58	1,00					
ВРП	0,48	0,52	0,41	0,47	0,45	0,47	0,47	0,46	0,51	0,50	0,47	0,45	0,39	0,44	0,42	0,43	0,48	0,46	0,60	0,61	1,00				
ПРС	0,38	0,48	0,41	0,37	0,37	0,43	0,39	0,39	0,47	0,42	0,40	0,41	0,37	0,46	0,41	0,38	0,43	0,46	0,50	0,51	0,50	1,00			
ВЛС	0,38	0,45	0,42	0,39	0,41	0,46	0,41	0,41	0,45	0,41	0,42	0,43	0,40	0,44	0,44	0,42	0,42	0,46	0,52	0,51	0,49	0,68	1,00		
КОЉ	0,35	0,44	0,38	0,39	0,38	0,40	0,41	0,40	0,42	0,42	0,40	0,39	0,36	0,40	0,41	0,37	0,41	0,44	0,49	0,49	0,46	0,68	0,63		
ВИЧ	0,39	0,42	0,40	0,42	0,39	0,44	0,39	0,38	0,42	0,40	0,41	0,42	0,37	0,41	0,41	0,40	0,39	0,40	0,50	0,45	0,46	0,59	0,63		
ТЈН	0,28	0,31	0,32	0,30	0,27	0,31	0,27	0,27	0,27	0,27	0,25	0,27	0,23	0,24	0,28	0,26	0,30	0,25	0,30	0,29	0,29	0,31	0,31		
АНД	0,36	0,41	0,42	0,39	0,36	0,41	0,45	0,39	0,42	0,44	0,42	0,40	0,39	0,40	0,42	0,34	0,40	0,39	0,49	0,44	0,43	0,53	0,57		
ВРЛ	0,40	0,41	0,37	0,37	0,40	0,42	0,40	0,39	0,40	0,38	0,36	0,38	0,35	0,37	0,39	0,32	0,34	0,34	0,45	0,40	0,42	0,51	0,53		
МЈЖ	0,40	0,43	0,42	0,38	0,41	0,44	0,46	0,43	0,45	0,44	0,45	0,45	0,44	0,49	0,40	0,37	0,40	0,42	0,44	0,47	0,43	0,60	0,58		
СУТ	0,35	0,43	0,39	0,35	0,38	0,40	0,42	0,41	0,41	0,42	0,40	0,42	0,41	0,40	0,42	0,36	0,38	0,37	0,44	0,43	0,40	0,57	0,57		
ЖАНЉ	0,38	0,41	0,43	0,36	0,39	0,42	0,44	0,45	0,42	0,42	0,36	0,40	0,41	0,42	0,38	0,38	0,37	0,37	0,42	0,40	0,37	0,53	0,50		
ВОД	0,37	0,42	0,39	0,39	0,42	0,44	0,43	0,42	0,39	0,42	0,39	0,42	0,40	0,43	0,42	0,40	0,41	0,38	0,43	0,41	0,39	0,49	0,53		
УЛЦ	0,36	0,39	0,38	0,38	0,36	0,39	0,37	0,38	0,36	0,37	0,38	0,38	0,35	0,39	0,42	0,38	0,40	0,40	0,43	0,38	0,37	0,47	0,52		
ДЈК	0,31	0,35	0,34	0,33	0,32	0,36	0,32	0,30	0,33	0,29	0,32	0,31	0,35	0,37	0,31	0,38	0,32	0,28	0,37	0,32	0,31	0,40	0,44		
ГБЦ	0,27	0,28	0,29	0,29	0,26	0,27	0,24	0,23	0,29	0,26	0,25	0,25	0,22	0,26	0,27	0,27	0,25	0,30	0,28	0,32	0,32	0,32	0,33		
АСМ	0,23	0,26	0,24	0,24	0,22	0,22	0,22	0,21	0,24	0,24	0,24	0,22	0,22	0,20	0,20	0,22	0,24	0,17	0,25	0,27	0,27	0,25	0,24		
ФУР	0,32	0,36	0,34	0,31	0,36	0,37	0,34	0,37	0,32	0,34	0,35	0,36	0,36	0,36	0,38	0,37	0,35	0,32	0,38	0,34	0,35	0,47	0,51		
ПЈТ	0,32	0,36	0,29	0,32	0,32	0,35	0,34	0,32	0,35	0,36	0,34	0,32	0,34	0,36	0,38	0,35	0,34	0,31	0,35	0,35	0,34	0,46	0,46		
ПЛВ	0,33	0,40	0,39	0,35	0,33	0,37	0,37	0,34	0,36	0,38	0,39	0,35	0,36	0,39	0,40	0,38	0,38	0,36	0,44	0,39	0,40	0,54	0,56		
ЧЕМ	0,32	0,38	0,38	0,36	0,33	0,39	0,39	0,36	0,39	0,39	0,38	0,35	0,36	0,41	0,36	0,36	0,36	0,33	0,42	0,40	0,34	0,48	0,50		
КРК	0,34	0,42	0,34	0,34	0,38	0,40	0,39	0,37	0,40	0,38	0,35	0,36	0,38	0,37	0,37	0,34	0,37	0,36	0,46	0,43	0,41	0,44	0,51		
ДЕВ	0,35	0,38	0,37	0,35	0,38	0,38	0,35	0,39	0,35	0,36	0,32	0,35	0,32	0,32	0,33	0,35	0,31	0,34	0,40	0,38	0,35	0,41	0,48		
ННТ	0,33	0,37	0,35	0,36	0,33	0,39	0,38	0,37	0,36	0,33	0,35	0,34	0,33	0,34	0,37	0,35	0,33	0,33	0,40	0,38	0,37	0,44	0,50		
ЛИТ	0,24	0,26	0,25	0,23	0,24	0,24	0,23	0,25	0,25	0,22	0,17	0,21	0,19	0,21	0,21	0,20	0,20	0,19	0,24	0,24	0,24	0,28	0,31		

Табела 5 (наставак)

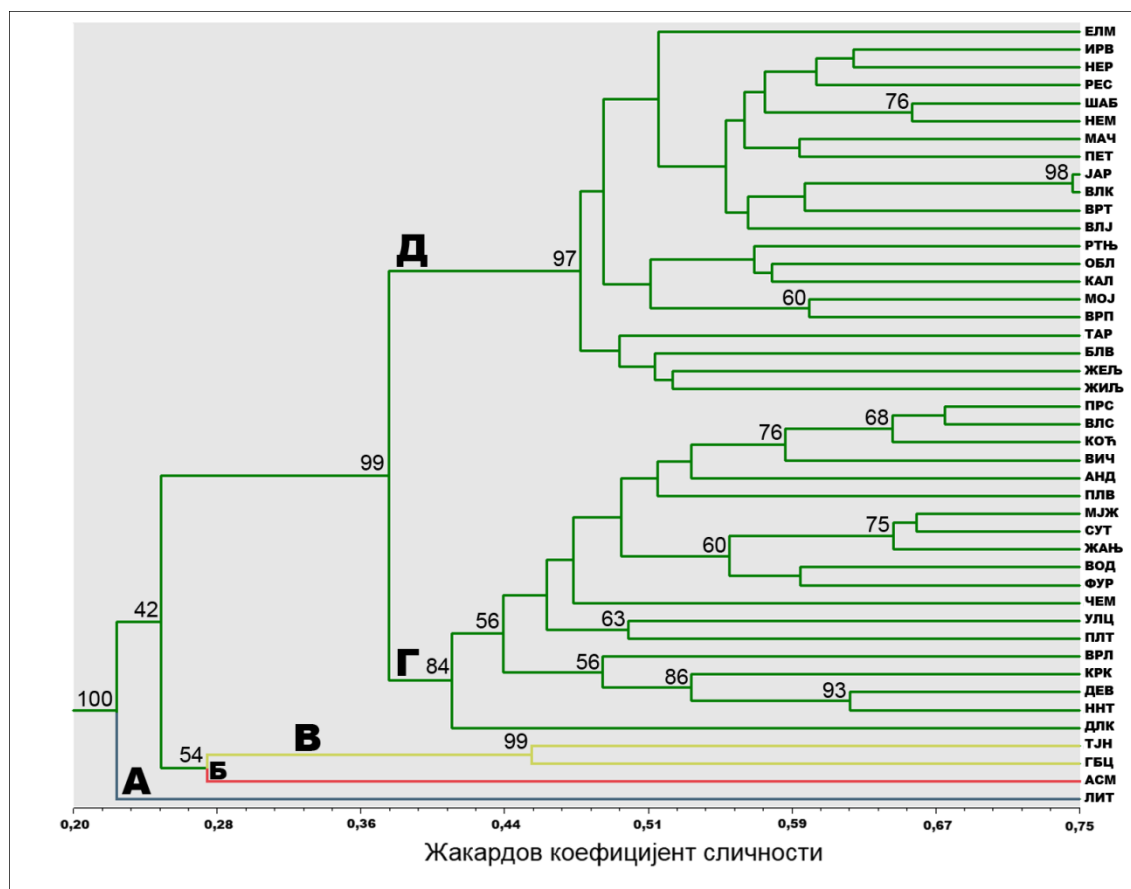
	КОЂ	ВИЧ	ТЈН	АНД	ВРЛ	МЈЖ	СУТ	ЖАЊ	ВОД	УЛЦ	ДЛК	ГБЦ	АСМ	ФУР	ПЛТ	ПЛВ	ЧЕМ	КРК	ДЕВ	ННТ	ЛИТ	
ЕЛМ																						
ИРВ																						
НЕР																						
ШАБ																						
РЕС																						
НЕМ																						
МАЧ																						
ПЕТ																						
ЈАР																						
ВЛК																						
ВРТ																						
ВЛЈ																						
ТАР																						
БЛВ																						
ЖЕЉ																						
ЖИЉ																						
РТЊ																						
ОБЛ																						
КАЛ																						
МОЈ																						
ВРП																						
ПРС																						
ВЛС																						
КОЂ	1,00																					
ВИЧ	0,57	1,00																				
ТЈН	0,32	0,32	1,00																			
АНД	0,54	0,54	0,27	1,00																		
ВРЛ	0,49	0,52	0,38	0,49	1,00																	
МЈЖ	0,56	0,55	0,28	0,51	0,50	1,00																
СУТ	0,54	0,53	0,23	0,49	0,47	0,66	1,00															
ЖАЊ	0,52	0,51	0,28	0,49	0,45	0,66	0,64	1,00														
ВОД	0,49	0,49	0,26	0,49	0,47	0,60	0,62	0,58	1,00													
УЛЦ	0,47	0,51	0,30	0,47	0,43	0,49	0,48	0,48	0,53	1,00												
ДЛК	0,40	0,45	0,26	0,42	0,42	0,44	0,45	0,40	0,48	0,43	1,00											
ГБЦ	0,30	0,33	0,46	0,31	0,33	0,30	0,24	0,26	0,28	0,33	0,29	1,00										
АСМ	0,27	0,27	0,28	0,28	0,25	0,22	0,24	0,23	0,24	0,23	0,22	0,30	1,00									
ФУР	0,48	0,51	0,28	0,45	0,48	0,52	0,57	0,51	0,60	0,49	0,50	0,27	0,22	1,00								
ПЛТ	0,46	0,45	0,24	0,45	0,42	0,42	0,47	0,43	0,52	0,51	0,41	0,26	0,21	0,48	1,00							
ПЛВ	0,54	0,53	0,32	0,47	0,45	0,45	0,45	0,45	0,46	0,45	0,37	0,36	0,26	0,49	0,46	1,00						
ЧЕМ	0,52	0,47	0,28	0,51	0,44	0,50	0,47	0,50	0,47	0,42	0,42	0,25	0,23	0,43	0,42	0,46	1,00					
КРК	0,47	0,47	0,29	0,44	0,49	0,43	0,46	0,42	0,44	0,42	0,36	0,28	0,26	0,43	0,40	0,43	0,44	1,00				
ДЕВ	0,45	0,46	0,31	0,39	0,48	0,45	0,45	0,43	0,41	0,41	0,39	0,30	0,23	0,44	0,37	0,41	0,46	0,55	1,00			
ННТ	0,44	0,47	0,28	0,43	0,53	0,40	0,40	0,41	0,41	0,43	0,39	0,29	0,23	0,45	0,44	0,49	0,43	0,54	0,63	1,00		
ЛИТ	0,29	0,26	0,22	0,28	0,29	0,27	0,25	0,28	0,26	0,21	0,23	0,31	0,25	0,23	0,22	0,25	0,26	0,24	0,28	0,27	1,00	



**Слика 8:** *UPGMA* фенотрам генетичких сличности између 132 јединке кичице, пореклом из 44 популације, добијен употребом *RAPD* маркера. Уочљива је висока генетичка сличност између јединки са заједничким пореклом.



пре имају везе са референтном врстом (А), хибридизацијом између врста (Б) или нивоом плоидије (В).



**Слика 9:** Редукован *UPGMA* фенограм генетичких сличности популација кичице добијених применом *RAPD* маркера. Кластер А представљен је врстом *C. littorale* (ЛИТ), кластер Б хибридном популацијом АСМ, кластер В диплоидним популацијама *C. erythraea*, док кластере Д и Г сачињавају тетраплоидне популације *C. erythraea*.

Први кластер (кластер А) је представљен референтном врстом *Centaureum littorale* (ЛИТ) и од осталих популација се одваја већ при коефицијенту генетичке сличности од 0,225 са бутстреп подршком од 100%. При коефицијенту од 0,25 са прилично слабом бутстреп вредношћу раздвајају се кластери Б и В од кластера Г и Д. Кластери Б и В се међусобно одвајају при коефицијенту од 0,275 са бутстреп подршком од 54%. Кластер Б је представљен популацијом АСМ за коју се претпоставља да је алотетраплоидни хибрид две врсте кичице (видети дискусију у поглављу 6.5.). Кластер В садржи две диплоидне популације, ТЈН и ГБЦ, са

прилично малом међусобном генетичком сличношћу (0,445). Остатак „чистих“, тетраполидних популација је сврстан у два велика кластера: Г и Д, који се диференцирају при коефицијенту сличности од 0,38 уз бутстреп подршку од 99%.

Кластер Г садржи 19 популација кичице прилично хетерогеног географског порекла. Најмању сличност са осталима има македонска популација ДЛК и од њих се одваја при коефицијенту од 0,41 са прилично јаком бутстреп подршком од 84%. Поткластер у коме се налазе две западноевропске популације ДЕВ и ННТ, као и хрватска КРК и једна од црногорских популација, ВРЛ, раздваја се од осталих популација кластера Г при коефицијенту 0,44 са бутстреп вредношћу од 56%. У оквиру овог поткластера, популација ВРЛ се рано одваја од остале три, при вредности од 0,49, док се популација КРК раздваја од западноевропских популација при коефицијенту од 0,53 уз бутстреп вредност 86%. Међусобно раздвајање популација ДЕВ и ННТ је значајно (93%), уз прилично велику генетичку сличност. Остатак популација кластера Г се раздваја у три мања поткластера при коефицијентима 0,46 и 0,475, без значајне бутстреп подршке. Прву групу чине две приморске популације: једна пореклом из Црне Горе (УЛЦ) и једна из Грчке (ПЛТ), које се међусобно раздвајају при коефицијенту од 0,5 и бутстреп вредношћу од 63%. Другу групу чини само популација ЧЕМ из Републике Српске. Трећа група је састављена од две мање подгрупе које се, без бутстреп подршке, диференцирају при коефицијенту од 0,495. Прва подгрупа је састављена претежно од црногорских популација, којима је придружена и једна македонска. Три црногорске популације (МЈЖ, СУТ и ЖАНЊ) из околине планине Орјен имају значајно (75%) високу међусобну генетичку сличност, док се од њих одвајају популација ВОД са Скадарског језера и македонска популација ФУР са Дојранског језера. Другу подгрупу чине три популације из Србије јужно од Суве планине, једна популација са Косова и Метохије (ВИЧ), једна црногорска популација са Проклетија (АНД) и бугарска популација из околине Пловдива (ПЛВ). Три популације из југоисточне Србије чине

заједничку групу од којих популација КОЋ највише одступа и од друге две се раздваја при коефицијенту 0,59 и бутстреп подршком од 76%.

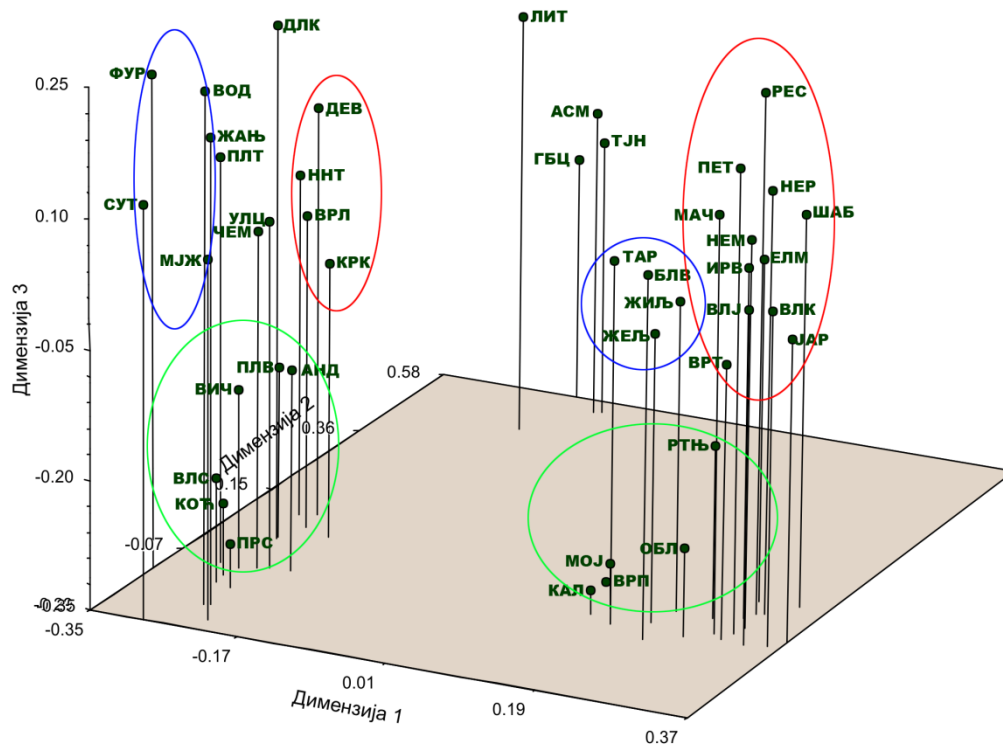
Кластер Д, за разлику од кластера Г, је много хомогеније структуре. Њега чине три поткластера. Први поткластер се одваја од осталих при коефицијенту генетичке сличности од 0,48 и високом бутстреп подршком од 97%. Њега чине четири популације из западне и јужне Србије. Други и трећи поткластер се раздвајају при вредности од 0,49 без статистичке значајности. Други поткластер је сачињен од пет популација са пореклом северно и источно од Суве планине, четири од њих са територије Србије и једне са територије Бугарске. Међу њима се, при коефицијенту 0,51 одвајају две популације са Старе планине, ВРП и МОЈ. Трећи поткластер чини 12 популација из Војводине и централне и источне Србије. Од њих се рано, али без статистичке значајности одваја популација ЕЛМ, при коефицијенту од 0,515. Остале популације, уз мању или већу генетичку сличност и само у два случаја статистички значајну, чине групу у којој су међусобни коефицијенти сличности већи од 0,5.

#### **4.5.3.2. Анализа основних координата (PCoA) RAPD података**

На основу трансформисаних матрица генетичких сличности конструисан је дијаграм расипања популација (Слика 10). Прва основна координата (димензија) учествује у описивању 11,68% укупне варијабилности, друга са 6,25%, док трећа учествује са 4,38% укупне варијабилности. Њихова кумулативна вредност је, стога, 22,31%. Битно је напоменути да прве четири основне координате имају својствене јединице (*eigenvalues*) веће од 1, што их чини погодним за описивање укупне варијабилности између популација (*Iezzoni* и *Pritts*, 1991).

На графикону (Слика 10) се јасно издвајају три групе. Распоред популација по групама је сличан као на фенограму (Слика 9). У првој групи се налази референтна врста, ЛИТ, затим хибридна популација АСМ и две диплоидне популације, ТЈН и ГБЦ. Друга група, која одговара кластеру Д, обухвата тетраполидне популације из Војводине, западне,

централне и источне Србије, док трећа група, сагласна са кластером Г, садржи тетраплоидне популације из југоисточне Србије, Црне Горе, Македоније, Бугарске, Хрватске, Републике Српске, као и две популације из западне Европе.



**Слика 10:** PCoA дијаграм расипања популација кичице на основу међусобних коефицијената генетичких сличности, добијених *RAPD* молекуларним маркерима. Прве три димензије описују 22,31% укупне варијабилности. Елипсама различитих боја је обележено груписање популација, уочљиво и на фенограму (Слика 9).

Група популација, која се по првој димензији одваја позитивно (десно на графикону, Слика 10), садржи три подгрупе (означене елипсама различитих боја), које су такође примећене на фенограмима. На њихову међусобну диференцијацију највише утичу димензије 3 и 1.

Група која се и по првој и по другој димензији одваја негативно (доле, лево, Слика 10) садржи такође три подгрупе, међутим само се група

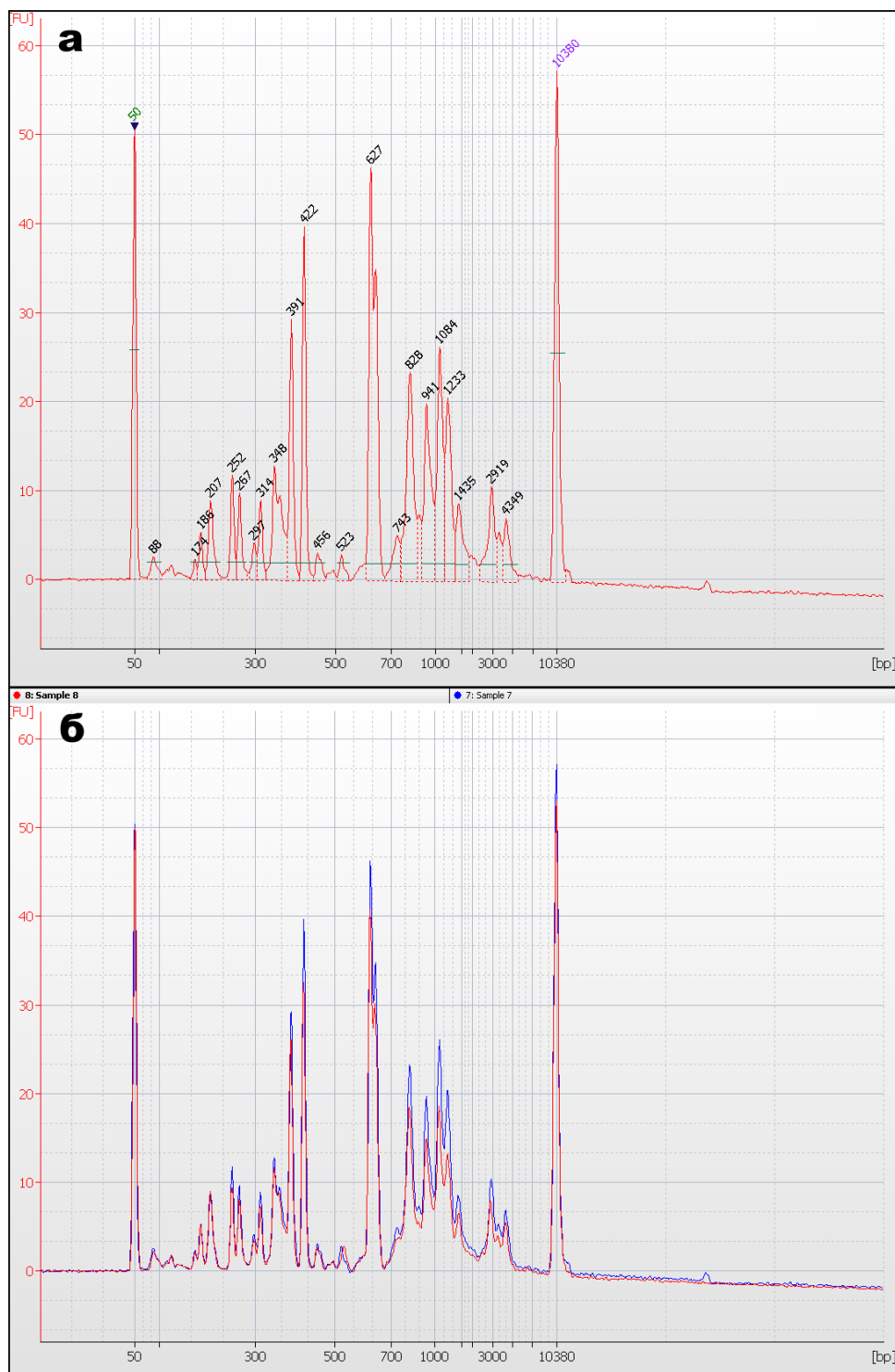
означена зеленом елипсом, која садржи популације из југоисточне Србије јасно одваја од осталих и то по димензији 3. Остале популације су прилично расуте и само условно могу да се сврстају у поткластере виђене у фенограму. На варијабилност у овој групи, димензија 1 утиче минимално. Интересантно је да се популације из источне и југоисточне Србије, нарочито из околине Старе и Суве планине, означене зеленим елипсама и које у фенограму припадају различитим кластерима битно раздвајају између група само по димензији 1.

#### **4.6. Анализа генетичке варијабилности *TRAP* молекуларним маркерима**

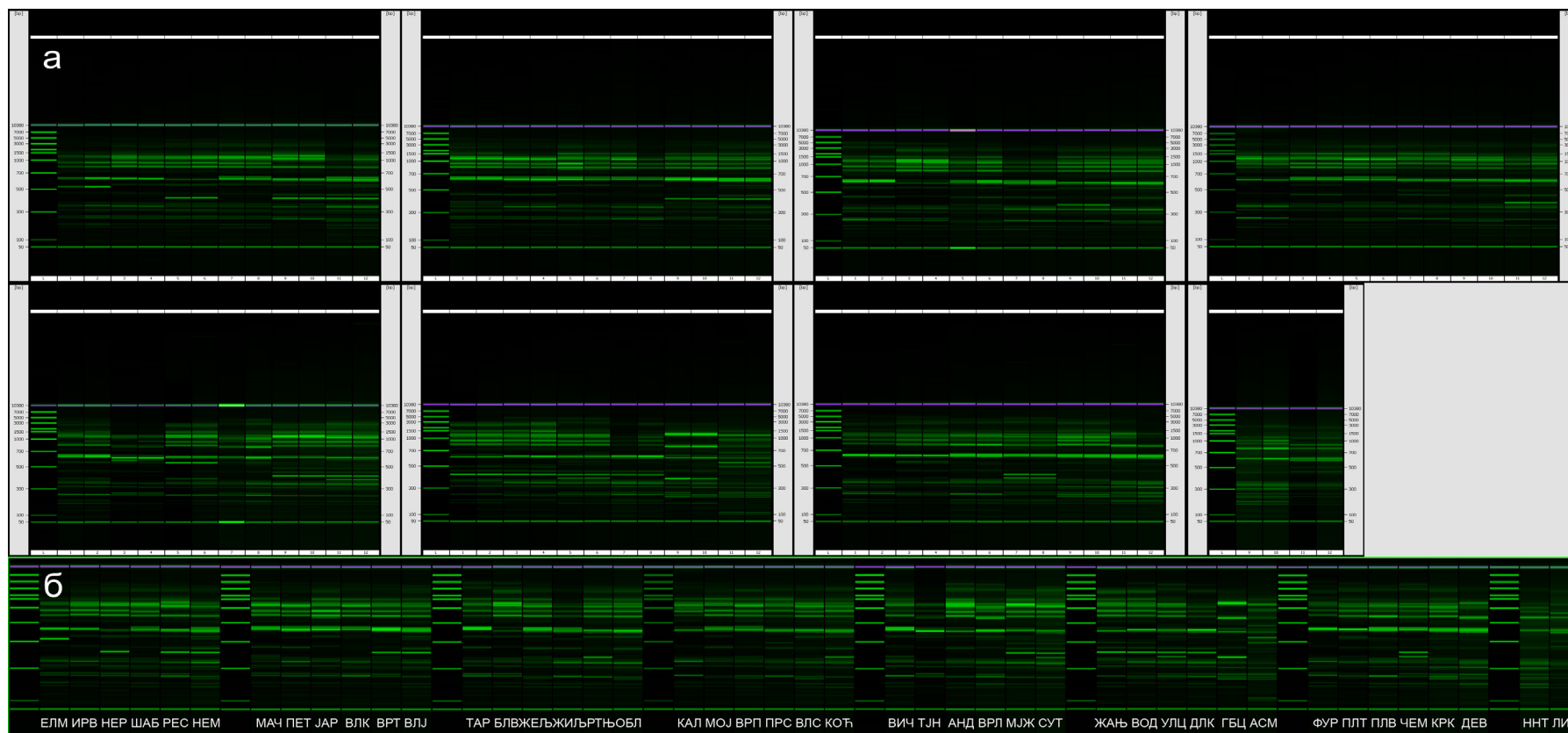
##### **4.6.1. Електрофоретски профили**

Као и у случају *RAPD* анализа, ДНК све 44 популације је анализирана *TRAP-PCR* методом, са том разликом што је анализа укључила по две јединке из сваке популације. С обзиром на ниску унутарпопулациону варијабилност добијену *RAPD* маркерима, две јединке по популацији су у овом случају представљале алат за проверу репродукцибилности метода, пре него за утврђивање генетичке варијабилности унутар популација. Слика **11а** представља типичан електроферограм са детекцијом референтних пикова пореклом од амплификованих фрагмената ДНК, док се на Слици **11б** може видети преклапање два сигнала који потичу од две јединке исте популације. Осим разлика у њиховој релативној висини, која одговара релативној концентрацији *PCR* продукта, очигледно је да разлика у идентитету пикова не постоји. Сличан случај је и са јединкама других популација.

На Слици **12а** су представљене појединачне синтетичке фотографије чипова са *TRAP-PCR* продуктима свих 88 узорака, добијених комбинацијом прајмера *Ce-OpCPR* и *Arb4*. Испод, на Слици **12б**, издвојен је по један узорак из сваке популације, како би се добила свеобухватна слика намењена даљим анализама.



**Слика 11:** Примери *TRAP* електроферограма добијених капиларном електрофорезом помоћу система *Agilent 2100 Bioanalyzer*; **а)** електроферограм продукта *TRAP-PCR* реакције ДНК јединке из популације ЧЕМ добијен комбинацијом прајмера *Ce-OpCPR* и *Arb4* (вредности изнад пикова представљају дужину у *bp*); **б)** упоређени електроферограми две јединке исте популације добијени наведеном комбинацијом прајмера.



**Слика 12:** Електрофоретски профили *TRAP-PCR* продуката различитих популација кичице добијени комбинацијом прајмера *Ce-OpCPR* и *Arb4*; **а)** синтетичке слике гелова на којима су представљене по две јединке из сваке популације (приметно је да суштинске разлике у ДНК профилима између јединки које припадају истим популацијама не постоје); **б)** обједињен синтетички гел свих популација кичице добијен истом комбинацијом прајмера, где је свака популација представљена по једном јединком.

**Табела 6:** Полиморфност и статистички параметри информативности комбинација прајмера, коришћених у *TRAP-PCR* реакцијама у процени генетичке варијабилности анализираних популација кичице.

Комбинација прајмера	Укупан број трака	Број полиморфних трака	Полиморфизам (%)	Полиморфизам (%) без популација: ТЈН, ГБЦ, АСМ и ЛИТ	Број трака по популацији (опсег)	Просечан број трака по популацији (опсег)	Просечна информативност трака ( <i>AuIb</i> )	Раздвојна моћ комбинације прајмера ( <i>Rp</i> )	Просечан полиморфни информациони садржај ( <i>AuPIC</i> )
<i>Ce-G10h</i> × <i>Arb1</i>	78	72	92,31	80,77	29-41	35,25	0,3106	24,2273	0,2208
<i>Ce-G10h</i> × <i>Arb2</i>	87	82	94,25	81,61	26-42	33,89	0,3704	32,2273	0,2525
<i>Ce-G10h</i> × <i>Arb4</i>	85	82	96,47	88,24	24-41	31,93	0,3588	30,5000	0,2507
<i>Ce-OpCPR</i> × <i>Arb1</i>	92	90	97,83	80,43	32-45	37,16	0,4066	37,4091	0,2710
<i>Ce-OpCPR</i> × <i>Arb2</i>	116	111	95,69	86,21	40-56	49,50	0,3754	43,5455	0,2596
<i>Ce-OpCPR</i> × <i>Arb4</i>	107	106	99,07	87,85	35-47	40,09	0,4231	45,2727	0,2881
<i>Ce-SS</i> × <i>ARB1</i>	56	55	98,21	83,93	16-30	21,91	0,3604	20,1818	0,2446
<i>Ce-SS</i> × <i>Arb2</i>	57	55	96,49	82,46	13-26	18,95	0,3062	17,4545	0,2303
<i>Ce-SS</i> × <i>Arb4</i>	89	88	98,88	80,90	21-35	25,73	0,3616	32,1818	0,2465
укупно/ просечно	767	741	96,58	83,60	13-56	32,71	0,3637	31,4444	0,2516



Укупно је амплификовано 767 фрагмената са 56-116 трака по комбинацији прајмера, просечно 85,22 (Табела 6). Опсег величина добијених фрагмената није дат, с обзиром да неке комбинације прајмера дају велике ампликоне чији се пикови стапају, па их је немогуће идентификовати и стога се анализирање неких од комбинација прајмера завршавало већ на 1000 *bp*. Укупно 741 трака је показивала полиморфизам између популација. Процент полиморфних трака по прајмеру се кретао од 92,31% до 99,07%, са просеком од 96,58%. Без популација: ТЈН, ГБЦ, АСМ и ЛИТ, полиморфизам се кретао од 80,43% до 88,24%, просечно 83,6%. Различите комбинације прајмера су амплификовале прилично велики број фрагмената по популацији. Тако је најмањи број трака (13) забележен код популације ГБЦ комбинацијом прајмера *Ce-SS* и *Arb2*, док је највећи број трака (56) дала популација ДЛК уз комбинацију прајмера *Ce-OpCPR* и *Arb2*. Комбинације прајмера су давале просечно од 18,95 (*Ce-SS* × *Arb2*) до 49,5 (*Ce-OpCPR* × *Arb2*) трака по популацији, просечно 32,71. Просечна информативност трака по комбинацији прајмера (*AuIb*) износила је од 0,3062 (*Ce-SS* × *Arb2*) до 0,4231 (*Ce-OpCPR* × *Arb4*), са просеком свих комбинација од 0,3637. Раздвојна моћ комбинације прајмера (*Rp*) кретала се од 17,4545 (*Ce-SS* × *Arb2*) до 45,2727 (*Ce-OpCPR* × *Arb4*), просечно 31,4444. Просечан полиморфни информациони садржај (*AuPIC*) износио је од 0,2208 (*Ce-G10h* × *Arb1*) до 0,2881 (*Ce-OpCPR* × *Arb4*). На основу просечне *AuPIC* вредности за све комбинације прајмера израчуната је просечна хетерозиготност ( $H_{av}$ ) од  $0,2516 \pm 0,02$ . Производ  $H_{av}$  и мултиплекс односа (*MR*) од 85,22, дао је вредност маркер индекса (*MI*) *TRAP* метода од 21,4399.

#### 4.6.2.      **Анализа матрица генетичких сличности**

ДНК профили свих популација, амплификовани *TRAP-PCR* реакцијама, дали су матрикс генетичких сличности на основу Жакардовог коефицијента (Табела 7). Најнижи међусобни коефицијент од 0,24 имале су популације ИРВ и АСМ, МАЧ и АСМ, АНД и АСМ, ПЛТ и АСМ, и ВРП и ЛИТ, док је највећа сличност забележена између популација ВРП и ПРС, и

Табела 7: Вредности Жакардовог коефицијента генетичких сличности између анализираних популација кичице, заснованих на анализама *TRAP* маркера.

	ЕЛМ	ИРВ	НЕР	ШАБ	РЕС	НЕМ	МАЧ	ПЕТ	ЈАР	ВЛК	ВРТ	ВЛЈ	ТАР	БЛВ	ЖЕЉ	ЖИЉ	РТЊ	ОБЛ	КАЛ	МОЈ	ВРП	ПРС	ВЛС	
ЕЛМ	1,00																							
ИРВ	0,51	1,00																						
НЕР	0,50	0,65	1,00																					
ШАБ	0,53	0,55	0,60	1,00																				
РЕС	0,47	0,57	0,65	0,59	1,00																			
НЕМ	0,47	0,50	0,56	0,56	0,59	1,00																		
МАЧ	0,56	0,52	0,54	0,53	0,54	0,47	1,00																	
ПЕТ	0,50	0,56	0,58	0,55	0,58	0,52	0,54	1,00																
ЈАР	0,47	0,52	0,60	0,59	0,56	0,52	0,56	0,63	1,00															
ВЛК	0,46	0,55	0,60	0,55	0,56	0,50	0,53	0,56	0,55	1,00														
ВРТ	0,47	0,48	0,56	0,52	0,54	0,50	0,51	0,53	0,53	0,55	1,00													
ВЛЈ	0,49	0,49	0,51	0,53	0,55	0,55	0,52	0,51	0,51	0,55	0,61	1,00												
ТАР	0,57	0,52	0,55	0,51	0,50	0,47	0,55	0,54	0,51	0,52	0,51	0,50	1,00											
БЛВ	0,49	0,49	0,54	0,53	0,53	0,46	0,51	0,57	0,58	0,54	0,50	0,51	0,57	1,00										
ЖЕЉ	0,48	0,50	0,54	0,54	0,49	0,50	0,52	0,52	0,55	0,54	0,51	0,53	0,56	0,53	1,00									
ЖИЉ	0,48	0,46	0,50	0,51	0,48	0,53	0,47	0,51	0,49	0,51	0,48	0,51	0,49	0,49	0,56	1,00								
РТЊ	0,49	0,47	0,51	0,50	0,50	0,52	0,49	0,52	0,54	0,51	0,55	0,56	0,51	0,55	0,55	0,56	1,00							
ОБЛ	0,45	0,46	0,52	0,53	0,53	0,55	0,49	0,51	0,52	0,49	0,49	0,55	0,51	0,53	0,57	0,54	0,61	1,00						
КАЛ	0,54	0,51	0,53	0,55	0,48	0,48	0,51	0,51	0,50	0,56	0,51	0,51	0,57	0,52	0,53	0,53	0,51	0,51	1,00					
МОЈ	0,53	0,52	0,54	0,50	0,51	0,45	0,53	0,50	0,52	0,54	0,51	0,49	0,54	0,52	0,50	0,51	0,54	0,50	0,56	1,00				
ВРП	0,47	0,51	0,55	0,52	0,51	0,49	0,50	0,50	0,52	0,52	0,54	0,52	0,50	0,49	0,52	0,52	0,55	0,55	0,56	0,58	1,00			
ПРС	0,49	0,50	0,55	0,52	0,54	0,50	0,50	0,55	0,51	0,51	0,55	0,56	0,50	0,53	0,52	0,53	0,58	0,56	0,56	0,54	0,66	1,00		
ВЛС	0,48	0,49	0,54	0,52	0,51	0,54	0,50	0,48	0,48	0,48	0,49	0,51	0,50	0,49	0,54	0,50	0,59	0,57	0,53	0,54	0,57	0,59	1,00	
КОЋ	0,50	0,45	0,46	0,52	0,48	0,49	0,49	0,46	0,48	0,45	0,50	0,53	0,49	0,49	0,49	0,48	0,53	0,57	0,52	0,52	0,53	0,51	0,55	
ВИЧ	0,47	0,50	0,52	0,51	0,49	0,47	0,49	0,50	0,49	0,49	0,49	0,46	0,49	0,53	0,52	0,53	0,46	0,53	0,49	0,53	0,54	0,52	0,50	0,52
ТЈН	0,35	0,30	0,31	0,34	0,31	0,34	0,32	0,31	0,30	0,31	0,31	0,34	0,32	0,29	0,31	0,29	0,32	0,30	0,32	0,33	0,31	0,35	0,31	
АНД	0,48	0,46	0,50	0,47	0,50	0,46	0,54	0,51	0,48	0,52	0,49	0,53	0,47	0,48	0,47	0,50	0,47	0,53	0,54	0,53	0,55	0,50	0,50	
ВРЛ	0,47	0,46	0,51	0,49	0,48	0,49	0,50	0,49	0,50	0,48	0,50	0,46	0,49	0,47	0,48	0,44	0,48	0,46	0,47	0,48	0,50	0,50	0,50	
МЈЖ	0,45	0,44	0,49	0,46	0,47	0,44	0,48	0,49	0,45	0,50	0,49	0,50	0,47	0,47	0,52	0,48	0,53	0,51	0,48	0,48	0,49	0,52	0,50	
СУТ	0,43	0,42	0,47	0,47	0,45	0,44	0,45	0,48	0,47	0,49	0,48	0,50	0,45	0,48	0,50	0,46	0,54	0,54	0,48	0,46	0,48	0,50	0,48	
ЖАЊ	0,48	0,47	0,49	0,50	0,46	0,45	0,51	0,52	0,51	0,47	0,48	0,46	0,52	0,49	0,52	0,46	0,52	0,48	0,50	0,47	0,48	0,50	0,48	
ВОД	0,46	0,42	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,50	0,47	0,45	0,48	0,48	0,47	0,50	0,52	0,51	0,53	0,51	0,49	0,48	0,50	0,51	0,50	
УЛЦ	0,43	0,39	0,43	0,46	0,43	0,43	0,42	0,45	0,43	0,46	0,43	0,45	0,44	0,45	0,48	0,45	0,48	0,45	0,44	0,44	0,46	0,49	0,44	
ДЛК	0,45	0,46	0,50	0,50	0,47	0,52	0,44	0,50	0,48	0,49	0,50	0,48	0,47	0,50	0,51	0,52	0,53	0,53	0,51	0,49	0,52	0,54	0,52	
ГБЦ	0,31	0,31	0,33	0,34	0,34	0,34	0,32	0,31	0,33	0,32	0,35	0,34	0,30	0,32	0,31	0,30	0,34	0,32	0,33	0,33	0,34	0,35	0,31	
АСМ	0,27	0,24	0,28	0,29	0,29	0,33	0,24	0,26	0,28	0,27	0,28	0,29	0,26	0,26	0,26	0,25	0,27	0,26	0,27	0,27	0,26	0,29	0,27	
ФУР	0,52	0,48	0,49	0,53	0,47	0,46	0,50	0,48	0,47	0,51	0,48	0,49	0,48	0,49	0,47	0,45	0,48	0,48	0,49	0,48	0,48	0,49	0,46	
ПЛТ	0,48	0,44	0,44	0,48	0,45	0,44	0,42	0,47	0,44	0,47	0,45	0,48	0,48	0,45	0,48	0,43	0,49	0,46	0,50	0,49	0,48	0,49	0,48	
ЦЛВ	0,53	0,51	0,52	0,52	0,52	0,50	0,51	0,51	0,49	0,52	0,54	0,51	0,50	0,49	0,52	0,50	0,56	0,51	0,51	0,50	0,50	0,54	0,52	
ЧЕМ	0,46	0,52	0,52	0,50	0,51	0,46	0,48	0,52	0,46	0,46	0,51	0,47	0,45	0,47	0,45	0,43	0,50	0,43	0,44	0,47	0,46	0,49	0,49	
КРК	0,52	0,50	0,51	0,56	0,52	0,52	0,50	0,53	0,49	0,50	0,50	0,52	0,50	0,50	0,50	0,46	0,51	0,52	0,48	0,46	0,47	0,49	0,52	
ДЕВ	0,48	0,45	0,48	0,48	0,49	0,49	0,44	0,47	0,42	0,46	0,48	0,47	0,43	0,46	0,43	0,42	0,43	0,43	0,44	0,44	0,42	0,43	0,46	
ННТ	0,47	0,45	0,47	0,45	0,47	0,46	0,45	0,44	0,41	0,44	0,46	0,46	0,43	0,40	0,40	0,38	0,42	0,40	0,42	0,40	0,41	0,41	0,44	
ЛИТ	0,30	0,27	0,33	0,29	0,30	0,29	0,27	0,29	0,30	0,29	0,29	0,29	0,28	0,31	0,26	0,27	0,31	0,28	0,26	0,26	0,24	0,28	0,28	

Табела 7 (наставак)

	КОЂ	ВИЧ	ТЈН	АНД	ВРЛ	МЈЖ	СУТ	ЖАЊ	ВОД	УЛЦ	ДЛК	ГБЦ	АСМ	ФУР	ПЛТ	ПЛВ	ЧЕМ	КРК	ДЕВ	ННТ	ЛИТ	
ЕЛМ																						
ИРВ																						
НЕР																						
ШАБ																						
РЕС																						
НЕМ																						
МАЧ																						
ПЕТ																						
ЈАР																						
ВЛК																						
ВРТ																						
ВЛЈ																						
ТАР																						
БЛВ																						
ЖЕЉ																						
ЖИЉ																						
РТЊ																						
ОБЛ																						
КАЛ																						
МОЈ																						
ВРП																						
ПРС																						
ВЛС																						
КОЂ	1,00																					
ВИЧ	0,50	1,00																				
ТЈН	0,35	0,36	1,00																			
АНД	0,49	0,53	0,34	1,00																		
ВРЛ	0,46	0,49	0,35	0,54	1,00																	
МЈЖ	0,47	0,45	0,32	0,53	0,48	1,00																
СУТ	0,47	0,47	0,33	0,49	0,48	0,66	1,00															
ЖАЊ	0,47	0,50	0,31	0,47	0,43	0,51	0,52	1,00														
ВОД	0,47	0,52	0,31	0,48	0,46	0,50	0,52	0,55	1,00													
УЛЦ	0,47	0,45	0,34	0,46	0,45	0,49	0,46	0,47	0,51	1,00												
ДЛК	0,47	0,49	0,31	0,48	0,48	0,51	0,51	0,52	0,56	0,51	1,00											
ГБЦ	0,34	0,33	0,42	0,32	0,36	0,31	0,29	0,29	0,30	0,36	0,35	1,00										
АСМ	0,28	0,27	0,30	0,24	0,29	0,25	0,25	0,25	0,27	0,27	0,30	0,36	1,00									
ФУР	0,44	0,50	0,33	0,49	0,46	0,48	0,47	0,48	0,51	0,47	0,50	0,32	0,29	1,00								
ПЛТ	0,46	0,47	0,35	0,48	0,43	0,48	0,46	0,47	0,49	0,47	0,49	0,27	0,24	0,51	1,00							
ПЛВ	0,50	0,48	0,37	0,53	0,48	0,48	0,50	0,49	0,46	0,49	0,50	0,34	0,28	0,50	0,48	1,00						
ЧЕМ	0,43	0,45	0,34	0,48	0,56	0,45	0,43	0,47	0,44	0,43	0,46	0,33	0,28	0,46	0,43	0,50	1,00					
КРК	0,51	0,48	0,34	0,46	0,46	0,49	0,46	0,50	0,44	0,44	0,48	0,34	0,28	0,46	0,47	0,53	0,49	1,00				
ДЕВ	0,45	0,43	0,33	0,46	0,52	0,44	0,43	0,41	0,39	0,43	0,44	0,34	0,31	0,48	0,44	0,49	0,53	0,54	1,00			
ННТ	0,43	0,43	0,32	0,42	0,49	0,40	0,39	0,42	0,38	0,40	0,43	0,32	0,29	0,41	0,44	0,45	0,50	0,47	0,52	1,00		
ЛИТ	0,28	0,29	0,26	0,26	0,30	0,29	0,29	0,27	0,27	0,30	0,28	0,26	0,25	0,29	0,26	0,28	0,33	0,31	0,31	0,32	1,00	

МЈЖ и СУТ уз коефицијент 1. У просеку, коефицијент сличности између свих анализираних популација износио је 0,48.

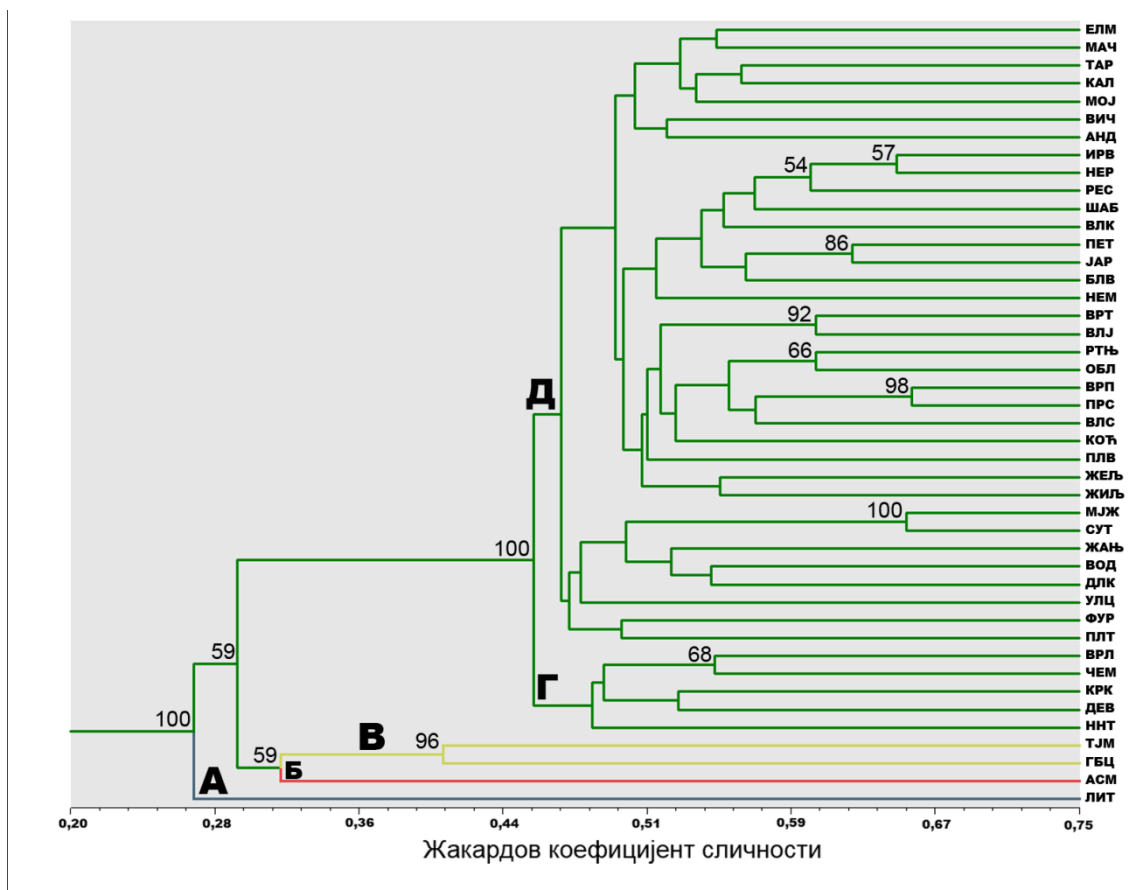
Корелација, забележена Мантеловим тестом са 5000 пермутација, између матрица добијених Жакардовим коефицијентом сличности и матрица коефицијента једноставног упоређивања била је врло висока и износила је 0,98371\*\*\*\*, док је корелација између Жакардовога и Дајсовог коефицијента била још израженија (0,99797\*\*\*\*).

Корелације матрица добијених различитим специфичним прајмерима имале су следеће вредности: *Ce-G10h:Ce-SS*  $r=0,8354$ \*\*\*\*, *Ce-G10h:Ce-OpCPR*  $r=0,7427$ \*\*\*\* и *Ce-OpCPR:Ce-SS*  $r=0,7341$ \*\*\*\*, што указује на значајну, али и прилично слабу подударност матрица добијених помоћу три фиксна прајмера, узевши у обзир да су сва три сета података добијена истом методом и уз употребу потпуно једнаких арбитрарних прајмера.

#### 4.6.3. Мултиваријантне анализе *TRAP* података

##### 4.6.3.1. Кластер анализа *TRAP* података

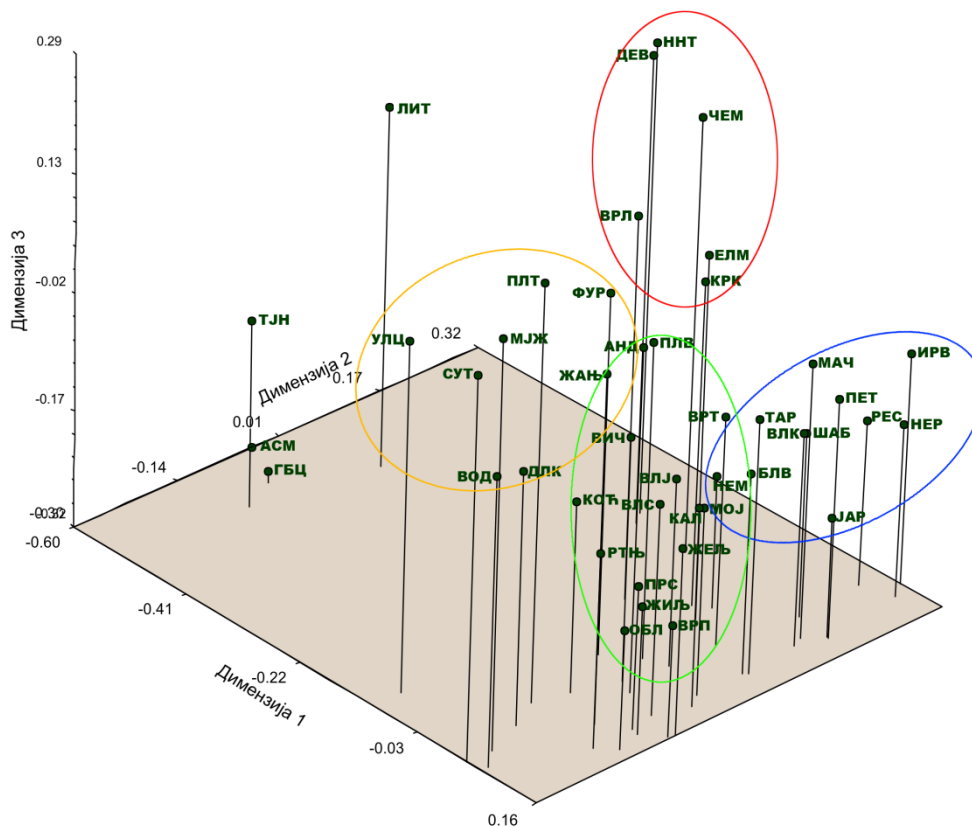
Према матриксу генетичких сличности добијеног Жакардовим коефицијентом, конструисан је фенограм (Слика 13) на коме се уочава пет значајно диференцираних кластера. Коефицијент кофенетичке корелације представљеног фенограма је висок (0,9419). Као и код фенограма конструисаног на основу *RAPD* маркера, у прва три кластера (А, Б и В) одвајају се: кластер А - референтна врста, *C. littorale*, при коефицијенту генетичке сличности од 0,27 и бутстреп подршком од 100%; кластер Б – хибридна популација АСМ, заједно са кластером В, који садржи диплоидне популације ТЈН и ГБЦ, одваја се од осталих, тетраплоидних популација при коефицијенту 0,295 и бутстреп вредношћу од 59%, док се међусобно раздвајање кластера Б и В одвија при коефицијенту 0,32 са бутстреп подршком од 59%. Диплоидне популације кластера В међусобно се прилично рано раздвајају, при коефицијенту 0,405 и бутспреп значајношћу од 96%.



**Слика 13:** UPGMA фенограм генетичких сличности популација кичице добијених применом *TRAP* маркера. Кластер А представљен је врстом *C. littorale* (ЛИТ), кластер Б хибридном популацијом АСМ, кластер В диплоидним популацијама *C. erythraea*, док кластере Д и Г сачињавају тетраплоидне популације *C. erythraea*.

Тетраплоидне популације кичице сачињавају кластере Г и Д, који се диференцирају при коефицијенту генетичке сличности од 0,45 и бутстреп подршком од 100%. Кластер Г садржи само пет популација у које спадају две западноевропске ДЕВ и ННТ, хрватска КРК, популација ЧЕМ из Републике Српске и популација ВРЛ из Црне Горе, док се кластер Д без статистичке значајности диференцира на три мања поткластера. Први поткластер садржи 8 популација из црногорског приморја, Македоније и Грчке и диференцира се од друга два при коефицијенту 0,45. Други и трећи поткластер се раздвајају при коефицијенту генетичке сличности од 0,49, а већ на вредности коефицијента од 0,495 други поткластер се дели на две групе. Прва група садржи две популације из централне Србије, две

популације из Бугарске, као и 7 популација из источне и југоисточне Србије, док је друга група сачињена од популација махом из Војводине, Шумадије и Мачве и једне популације из југозападне Србије. Трећи поткластер је прилично хетероген и садржи две групе популација које се диференцирају на коефицијенту сличности од 0,5. Прва група садржи једну популацију са Косова и Метохије (ВИЧ) и једну популацију са Проклетија из Црне Горе (АНД), док се друга група састоји из две популације са Старе планине (КАЛ и МОЈ), две популације из западне Србије (ТАР и МАЧ) и једне популације из Војводине (ЕЛМ). У овом поткластеру ни једно гранање не поседује бутстреп подршку.



**Слика 14:** PCoA дијаграм расипања популација кичице на основу међусобних коефицијената генетичких сличности, добијених *TRAP* молекуларним маркерима. Прве три димензије описују 15,55% укупне варијабилности. Елипсама различитих боја је обележено груписање популација уочљиво и на фенограму (Слика 13).

#### 4.6.3.2. Анализа основних координата (PCoA) TRAP података

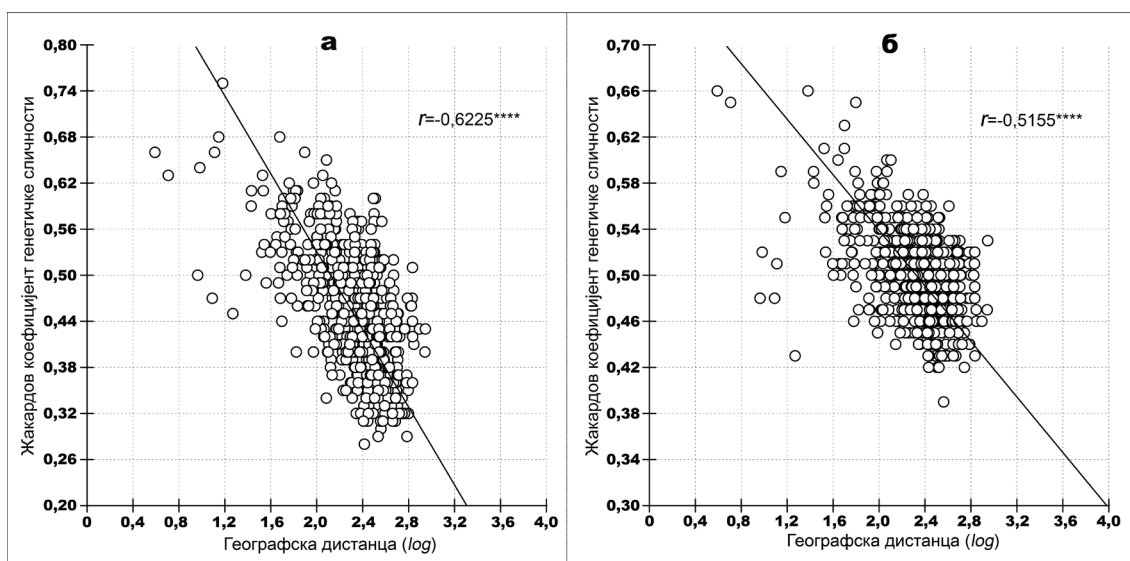
Дијаграм конструисан на основу трансформисаних матрица двоструко центрираних вредности генетичких сличности популација (Слика 14) показује значајно раздвајање четири популације виђене у кластерима А, Б и В представљеног фенограма од осталих популација и то првенствено по димензији 1, која учествује са 6,65% у описивању укупне варијабилности. Друга основна координата описује 4,94%, док трећа учествује са 3,96% укупне варијабилности, а кумулативно, прве три осе дају 15,55%. Прве две основне јединице имају својствене вредности веће од 1, док је вредност треће нешто слабија и износи 0,9197. Тетраплоидне популације кичице се налазе углавном у позитивном делу димензије 1. Ту могу да се разликују четири групе означене елипсама различитих боја. Црвеном бојом је означена група популација која у фенограму представља кластер Г, с тим што се њима придружује и популација ЕЛМ и оне се од осталих популација раздвајају највише по димензији 3 и, нешто мање, по димензијама 1 и 2. Група популација означена жутом елипсом, пореклом из приморског дела Црне Горе, Македоније и Грчке, која у фенограму представља посебан поткластер кластера Д, овде је прилично расута и на њено расипање највише утичу димензије 2 и 1. Димензија 2 у највећој мери утиче на раздвајање зелене и плаве групе, које мање-више одговарају другом и трећем поткластеру кластера Д.

#### 4.7. Корелација генетичких сличности добијених различитим маркер-системима

На основу матрица генетичких сличности добијених Жакардовим коефицијентом, израчуната је корелација између података добијених *RAPD* и *TRAP* маркер-системима. Мантелов тест са 5000 пермутација је дао значајну вредност корелације од 0,7705\*\*\*\*, што према *Rohlf* (2003) спада у групу слабе сагласности.

#### 4.8. Корелација генетичких сличности са географским дистанцама између популација

Матрице генетичких сличности између популација добијене применом Жакардовог коефицијента су значајно корелисане са географским дистанцама између њих (Табела 8) у случају оба маркер-система (Слика 15). Корелација *RAPD* маркера са географским дистанцама износи  $-0,6225^{****}$ , док је корелација *TRAP* маркера и географских дистанци популација нешто мања и износи  $-0,5155^{****}$ . Негативан предзнак у корелацијама је последица употребе изворних генетичких сличности, а не дистанци (вредност корелације би свакако остала иста, уз супротан предзнак).



Слика 15: Корелациони дијаграми географских дистанци и вредности генетичких сличности између популација кичица са Балканског полуострва добијених а) *RAPD* и б) *TRAP* молекуларним маркерима.



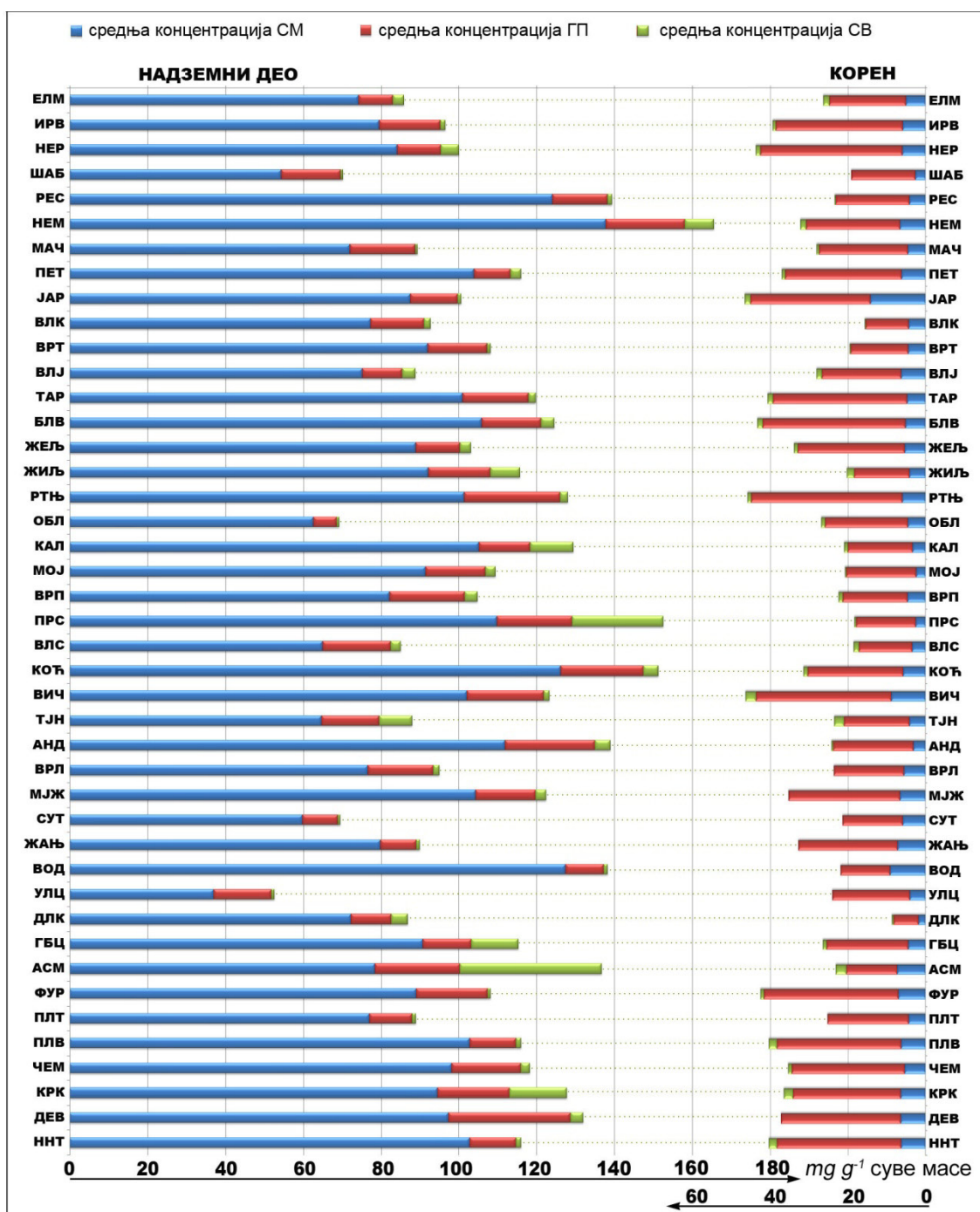
Табела 8: Географске дистанце (km) између природних популација кичице са Балканског полуострва

	ЕЛМ	ИРВ	НЕР	ШАБ	РЕС	НЕМ	МАЧ	ПЕТ	ЈАР	ВЛК	ВРТ	ВЛЈ	ТАР	БЛВ	ЖЕЉ	ЖИЉ	РТЊ	ОБЛ	КАЛ	МОЈ	
ЕЛМ	0,0																				
ИРВ	45,0	0,0																			
НЕР	46,4	5,1	0,0																		
ШАБ	89,8	47,4	44,0	0,0																	
РЕС	83,1	67,9	62,7	61,8	0,0																
НЕМ	108,9	93,6	88,6	78,5	26,9	0,0															
МАЧ	146,0	101,8	100,0	56,3	100,9	104,2	0,0														
ПЕТ	135,7	101,0	96,9	60,0	65,7	58,3	51,5	0,0													
ЈАР	142,7	121,5	116,6	94,6	59,0	34,3	101,1	50,1	0,0												
ВЛК	148,7	132,1	127,0	108,3	66,6	40,1	116,7	65,0	15,2	0,0											
ВРТ	203,6	217,9	213,2	219,3	158,3	144,0	246,4	196,5	148,7	134,6	0,0										
ВЛЈ	223,6	231,2	226,1	225,7	166,8	148,7	245,8	194,4	144,8	129,6	33,2	0,0									
ТАР	179,5	139,2	136,5	93,6	115,5	106,0	48,2	49,8	88,2	101,7	236,0	228,9	0,0								
БЛВ	244,6	214,8	211,0	175,1	164,0	140,9	143,9	115,6	107,6	108,1	213,2	193,6	97,2	0,0							
ЖЕЉ	210,9	187,5	183,0	154,6	128,2	102,4	139,0	96,1	68,7	64,5	165,2	148,1	101,3	49,6	0,0						
ЖИЉ	236,3	217,4	212,7	186,7	154,3	127,4	173,6	130,0	96,4	87,7	156,6	133,8	135,5	63,0	34,9	0,0					
РТЊ	233,3	230,3	224,9	215,1	162,4	138,3	222,6	171,8	123,0	107,8	82,1	52,8	197,0	146,3	104,4	83,7	0,0				
ОБЛ	262,7	252,1	246,9	227,8	185,0	158,1	223,1	175,6	133,1	120,5	132,3	102,0	188,5	115,8	87,2	55,1	49,9	0,0			
КАЛ	283,8	281,7	276,7	266,1	214,1	189,7	270,7	220,4	173,1	158,3	108,2	75,6	241,9	176,4	143,6	114,3	51,6	60,9	0,0		
МОЈ	335,0	334,1	329,3	317,9	266,5	242,8	320,2	271,2	224,4	209,9	151,1	120,5	288,4	213,8	187,9	154,8	104,6	100,2	52,7	0,0	
ВРП	346,4	341,3	336,7	322,0	274,2	249,1	319,6	271,9	227,7	213,9	170,7	138,8	284,8	203,9	183,3	149,0	113,6	96,5	64,8	27,1	
ПРС	340,6	332,7	327,7	309,9	265,2	239,2	304,0	257,5	215,6	202,4	175,9	142,9	267,2	183,3	166,2	131,7	109,3	82,5	67,6	47,8	
ВЛС	345,6	336,9	331,5	312,5	269,2	243,3	303,9	258,6	217,7	206,2	187,1	153,9	266,0	178,3	165,1	130,5	117,1	84,8	79,1	61,5	
КОЋ	363,4	350,5	345,9	322,6	284,5	257,7	308,7	266,2	229,9	219,0	216,5	183,9	267,4	174,2	170,8	136,2	141,7	101,3	110,3	94,5	
ВИЧ	358,8	336,3	331,3	299,8	276,7	250,6	271,3	239,8	217,3	211,1	258,3	228,0	224,5	127,5	148,6	124,0	176,2	125,6	167,7	172,4	
ТЈН	263,3	220,7	218,2	174,0	205,7	196,8	118,2	141,0	175,6	186,7	317,8	306,3	91,0	128,3	161,9	188,3	265,8	242,8	302,6	342,0	
АНД	302,3	268,4	263,8	224,0	224,6	203,9	181,0	167,7	170,6	173,2	277,1	255,0	133,4	66,3	115,1	121,4	204,3	165,3	225,6	253,3	
ВРЛ	348,8	306,7	304,1	260,3	283,5	270,0	205,2	218,5	242,3	249,8	370,5	352,2	170,1	158,5	205,1	220,8	304,2	268,9	329,6	359,0	
МЛЖ	356,9	316,0	313,3	269,3	292,6	278,8	214,2	227,4	251,0	258,8	379,3	360,4	179,3	166,3	213,4	228,0	312,0	275,8	336,5	364,4	
СУТ	361,5	319,4	316,6	272,4	295,9	281,6	218,0	230,4	253,7	261,4	380,8	361,4	182,6	168,1	215,4	229,7	313,5	276,8	337,4	365,1	
ЖАЊ	364,9	322,6	320,3	276,6	297,8	283,1	222,3	233,3	254,4	261,4	379,1	359,2	185,6	166,3	213,7	226,9	310,4	272,6	333,1	359,3	
ВОД	368,5	331,7	328,1	285,5	297,4	278,6	235,0	235,1	247,2	251,5	358,1	335,6	192,5	146,9	196,1	202,0	284,3	242,6	301,0	322,8	
УЛЦ	400,8	365,2	362,0	319,4	326,0	306,5	270,5	266,7	273,3	276,1	373,4	348,2	226,2	168,8	216,5	216,6	296,1	250,5	306,0	321,5	
ДЛК	482,4	461,1	456,5	421,1	406,4	381,2	383,2	361,8	347,3	343,0	391,4	359,3	335,2	245,9	278,0	258,0	310,0	259,8	292,9	281,6	
ГБЦ	484,9	466,0	461,6	426,8	409,4	383,9	391,1	367,3	350,4	344,8	386,5	354,1	343,5	251,5	281,2	258,8	305,3	256,1	285,7	271,1	
АСМ	492,6	472,7	468,7	433,5	416,4	391,1	398,1	373,9	357,1	352,0	393,4	360,8	350,6	358,9	287,9	266,0	312,0	262,7	292,1	276,9	
ФУР	498,0	488,6	483,6	457,8	423,4	396,7	437,0	399,6	367,3	357,3	349,3	316,3	391,9	295,0	303,7	271,7	280,0	241,2	240,4	203,5	
ПЛТ	629,5	615,6	611,2	581,9	553,4	526,7	553,9	522,7	495,3	487,0	488,4	455,8	507,0	410,5	428,4	399,2	417,9	376,4	380,4	343,3	
ПЛВ	504,8	513,0	508,2	498,1	445,4	422,5	500,0	451,0	405,0	390,6	311,1	287,4	465,5	382,3	364,1	330,0	283,9	277,2	232,6	180,2	
ЧЕМ	256,7	217,7	219,1	196,6	257,4	269,1	170,7	221,8	271,7	287,2	413,3	416,2	201,5	292,0	303,1	337,3	393,1	389,9	440,9	488,9	
КРК	452,8	417,0	419,6	405,6	467,1	481,9	386,5	437,5	486,9	502,1	625,1	629,6	416,0	502,6	517,3	552,1	608,7	605,1	656,3	704,2	

Табела 8 (наставак)

	ВРП	ПРС	ВЛС	КОЋ	ВИЧ	ТЈН	АНД	ВРЛ	МЈЖ	СУТ	ЖАЊ	ВОД	УЛЦ	ДЛК	ГБЦ	АСМ	ФУР	ПЛТ	ПЛВ	ЧЕМ	КРК	
ЕЛМ																						
ИРВ																						
НЕР																						
ШАБ																						
РЕС																						
НЕМ																						
МАЧ																						
ПЕТ																						
ЈАР																						
ВЛК																						
ВРТ																						
ВЛЈ																						
ТАР																						
БЛВ																						
ЖЕЉ																						
ЖИЉ																						
РТЊ																						
ОБЛ																						
КАЛ																						
МОЈ																						
ВРП	0,0																					
ПРС	24,1	0,0																				
ВЛС	36,3	14,0	0,0																			
КОЋ	68,0	47,6	33,7	0,0																		
ВИЧ	148,9	125,4	112,9	86,1	0,0																	
ТЈН	331,4	310,6	304,9	296,3	230,2	0,0																
АНД	237,7	214,4	206,1	191,2	117,4	114,0	0,0															
ВРЛ	342,6	318,8	309,9	292,5	211,2	89,0	105,1	0,0														
МЈЖ	347,6	324,2	315,1	296,7	214,7	97,6	111,1	9,2	0,0													
СУТ	348,2	324,4	315,0	296,2	213,8	101,3	112,3	12,3	3,9	0,0												
ЖАЊ	342,1	318,7	309,1	289,2	206,2	107,2	107,7	18,6	12,9	9,6	0,0											
ВОД	303,5	279,5	268,9	247,6	162,3	131,2	81,5	60,2	59,4	57,5	48,2	0,0										
УЛЦ	300,0	276,3	264,2	239,0	152,7	170,4	103,1	97,2	94,3	91,4	81,7	39,5	0,0									
ДЛК	254,9	235,2	221,2	187,4	135,7	308,9	204,3	250,5	248,8	246,2	236,9	190,3	155,3	0,0								
ГБЦ	244,4	225,1	212,0	177,8	134,9	322,8	214,7	267,1	266,5	263,4	253,9	207,0	173,1	20,5	0,0							
АСМ	249,5	231,4	217,3	184,0	141,8	327,4	220,6	272,0	270,6	268,0	258,5	211,4	177,0	22,2	6,8	0,0						
ФУР	179,7	172,6	163,1	139,6	171,3	400,7	286,6	368,8	370,5	368,3	359,8	311,6	285,6	154,6	137,7	135,5	0,0					
ПЛТ	318,9	312,4	302,0	275,7	283,2	496,9	385,1	444,0	443,0	440,3	430,9	384,1	348,8	193,8	176,9	172,1	139,9	0,0				
ПЛВ	181,0	199,3	203,8	215,5	297,9	508,8	406,6	507,7	511,9	511,1	504,1	460,2	446,1	345,4	326,3	329,1	198,0	296,1	0,0			
ЧЕМ	485,7	468,8	467,0	466,1	412,0	187,8	298,9	257,5	263,2	266,7	275,3	312,4	352,3	496,6	509,6	515,7	582,6	683,3	667,1	0,0		
КРК	700,7	682,9	680,2	676,9	615,7	385,6	499,1	431,3	433,3	437,0	446,0	491,3	528,5	681,9	697,8	702,9	786,1	874,3	882,0	210,0	0,0	

## 4.9. Анализа садржаја секоиридоидних гликозида



Слика 16: Концентрација ( $mg\ g^{-1}$  суве масе) три секоиридоидна гликозида (СМ=сверцијамарин, ГП=генциопикрин, СВ=сверозид) у надземним деловима и кореновима биљака *C. erythraea* гајених три месеца у стаклинику. Представљене вредности су просек три појединачне екстракције по популацији.

Концентрација сва три анализирана једињења: сверцијамарина (СМ), генциопикрина (ГП) и сверозида (СВ) знатно је варијала у надземним деловима зависно од популације (Слика **16**), док је у корену то био случај само са ГП. Међутим, унутар популације, између узорака, варијабилност у концентрацији ових једињења није била изражена, што се може закључити из релативно ниских стандардних грешака (Табела **9**). *F* статистика (Табела **10**) је показала да је варијабилност у садржају сваког од ова три једињења, како између популација, тако и између делова биљке, имала високу значајност.

Доминантно једињење у надземним деловима свих популација кичице је СМ. Концентрација овог једињења је најчешће неколико пута већа од концентрације друга два анализирана секоиридоидна гликозида (Слика **16**, Табела **9**). Типичан хроматограм узорака код којих СМ највише доминира у односу на друга два једињења представљен је на Слици **17а**. Међутим, у неким популацијама констатована је знатна количина ГП (Слика **17б**) или СВ (Слика **17в**). Генерално, ГП је други најзаступљенији секоиридоидни гликозид у надземном делу већине популација, док је СВ само у популацијама: КАЛ, ПРС, ГБЦ, АСМ и КРК реда величине ГП.

У корену је доминантно једињење ГП (Слика **17г**) и присутно је у већим количинама него у надземном делу (Слика **16**, Табела **9**). Насупрот томе, СМ и СВ су присутни само у малим количинама у корену, с том разликом што је СМ доминантнији у односу на СВ.

**Табела 9:** Концентрација ( $mg\ g^{-1}$  суве масе) три секоиридоидна гликозида у надземним деловима и кореновима *S. erythraea*. Дате вредности представљају просек три појединачне екстракције  $\pm$  стандардна грешка за сваку популацију (СМ=сверцијамарин; ГП=генциопикрин; СВ=сверозид).

	Надземни део (мг/г суве масе)				Корен (мг/г суве масе)			
	СМ	ГП	СВ	Укупни	СМ	ГП	СВ	Укупни
ЕЛМ	74,30 $\pm$ 3,56	8,78 $\pm$ 0,86	2,90 $\pm$ 0,78	85,97 $\pm$ 4,79	5,18 $\pm$ 0,46	19,76 $\pm$ 2,41	1,54 $\pm$ 0,29	26,47 $\pm$ 2,56
ИРВ	79,60 $\pm$ 7,99	15,71 $\pm$ 2,95	1,20 $\pm$ 0,09	96,52 $\pm$ 5,98	6,02 $\pm$ 1,24	32,78 $\pm$ 7,44	0,73 $\pm$ 0,32	39,53 $\pm$ 9,00
НЕР	84,19 $\pm$ 5,44	11,32 $\pm$ 0,19	4,62 $\pm$ 1,19	100,13 $\pm$ 4,45	6,09 $\pm$ 0,50	36,72 $\pm$ 2,90	1,13 $\pm$ 0,57	43,94 $\pm$ 2,80
ШАБ	54,39 $\pm$ 0,00	15,30 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,00	70,23 $\pm$ 0,00	2,77 $\pm$ 0,00	16,45 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	19,22 $\pm$ 0,00
РЕС	124,09 $\pm$ 1,34	14,24 $\pm$ 1,37	1,07 $\pm$ 0,19	139,40 $\pm$ 0,22	4,25 $\pm$ 0,00	19,03 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,00	23,55 $\pm$ 0,00
НЕМ	137,82 $\pm$ 6,22	20,34 $\pm$ 0,50	7,35 $\pm$ 0,36	165,51 $\pm$ 5,93	6,66 $\pm$ 0,91	24,30 $\pm$ 2,61	1,44 $\pm$ 0,32	32,40 $\pm$ 3,14
МАЧ	72,12 $\pm$ 4,65	16,76 $\pm$ 0,83	0,52 $\pm$ 0,08	89,40 $\pm$ 5,40	4,63 $\pm$ 0,27	22,99 $\pm$ 1,34	0,57 $\pm$ 0,29	28,19 $\pm$ 1,91
ПЕТ	104,01 $\pm$ 5,20	9,31 $\pm$ 1,02	2,71 $\pm$ 0,56	116,03 $\pm$ 5,99	6,31 $\pm$ 1,22	30,07 $\pm$ 3,97	0,74 $\pm$ 0,30	37,12 $\pm$ 5,44
ЈАР	87,65 $\pm$ 0,00	12,07 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 0,00	100,65 $\pm$ 0,00	14,35 $\pm$ 0,00	30,92 $\pm$ 0,00	1,47 $\pm$ 0,00	46,74 $\pm$ 0,00
ВЛК	77,34 $\pm$ 3,25	13,82 $\pm$ 0,87	1,62 $\pm$ 0,31	92,79 $\pm$ 3,27	4,40 $\pm$ 1,11	11,16 $\pm$ 3,42	0,20 $\pm$ 0,20	15,76 $\pm$ 2,50
ВРТ	92,07 $\pm$ 0,60	15,30 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,11	108,15 $\pm$ 0,36	4,55 $\pm$ 0,25	14,84 $\pm$ 2,13	0,28 $\pm$ 0,28	19,67 $\pm$ 2,66
ВЛЈ	75,23 $\pm$ 4,66	10,29 $\pm$ 1,03	3,31 $\pm$ 0,89	88,83 $\pm$ 5,93	6,42 $\pm$ 0,75	20,40 $\pm$ 2,63	1,34 $\pm$ 0,33	28,16 $\pm$ 3,19
ТАР	101,01 $\pm$ 3,29	16,96 $\pm$ 0,80	1,86 $\pm$ 0,57	119,83 $\pm$ 2,65	4,84 $\pm$ 0,38	34,63 $\pm$ 0,71	1,35 $\pm$ 0,10	40,82 $\pm$ 0,43
БЛВ	105,93 $\pm$ 12,55	15,30 $\pm$ 0,90	3,33 $\pm$ 0,99	124,56 $\pm$ 14,05	5,23 $\pm$ 0,25	36,95 $\pm$ 4,30	1,34 $\pm$ 0,20	43,51 $\pm$ 4,75
ЖЕЉ	88,98 $\pm$ 5,43	11,34 $\pm$ 0,77	2,76 $\pm$ 1,73	103,08 $\pm$ 6,64	5,45 $\pm$ 0,84	27,62 $\pm$ 2,91	0,91 $\pm$ 0,12	33,99 $\pm$ 3,86
ЖИЉ	92,23 $\pm$ 6,68	15,94 $\pm$ 1,66	7,52 $\pm$ 3,98	115,69 $\pm$ 9,22	4,26 $\pm$ 0,55	14,28 $\pm$ 1,78	1,86 $\pm$ 0,34	20,40 $\pm$ 2,10
РТЊ	101,45 $\pm$ 6,71	24,65 $\pm$ 0,42	2,01 $\pm$ 0,31	128,11 $\pm$ 7,14	6,05 $\pm$ 0,33	39,06 $\pm$ 7,69	0,87 $\pm$ 0,31	45,98 $\pm$ 7,71
ОБЛ	62,74 $\pm$ 2,94	5,93 $\pm$ 0,12	0,67 $\pm$ 0,03	69,33 $\pm$ 3,07	4,63 $\pm$ 0,25	21,41 $\pm$ 0,83	0,96 $\pm$ 0,02	27,00 $\pm$ 1,07
КАЛ	105,18 $\pm$ 6,41	13,26 $\pm$ 0,64	11,05 $\pm$ 2,72	129,49 $\pm$ 8,61	3,43 $\pm$ 0,51	16,75 $\pm$ 1,65	0,87 $\pm$ 0,17	21,05 $\pm$ 2,29
МОЈ	91,55 $\pm$ 7,18	15,39 $\pm$ 0,95	2,47 $\pm$ 0,32	109,42 $\pm$ 5,91	2,48 $\pm$ 0,00	18,07 $\pm$ 0,00	0,29 $\pm$ 0,00	20,83 $\pm$ 0,00
ВРП	82,26 $\pm$ 14,86	19,32 $\pm$ 1,62	3,27 $\pm$ 0,96	104,85 $\pm$ 13,97	4,72 $\pm$ 0,84	16,78 $\pm$ 3,38	1,03 $\pm$ 0,38	22,53 $\pm$ 2,16
ПРС	109,88 $\pm$ 23,85	19,25 $\pm$ 7,35	23,36 $\pm$ 3,67	152,49 $\pm$ 12,83	2,66 $\pm$ 0,00	15,33 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,00	18,39 $\pm$ 0,00
ВЛС	65,13 $\pm$ 4,96	17,46 $\pm$ 2,80	2,53 $\pm$ 0,63	85,13 $\pm$ 6,84	3,57 $\pm$ 0,32	13,73 $\pm$ 1,38	1,30 $\pm$ 0,13	18,60 $\pm$ 1,73
КОЋ	126,27 $\pm$ 7,43	21,26 $\pm$ 1,38	3,81 $\pm$ 0,58	151,34 $\pm$ 7,37	5,91 $\pm$ 0,77	24,59 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,11	31,53 $\pm$ 0,73
ВИЧ	102,18 $\pm$ 5,30	19,68 $\pm$ 0,90	1,45 $\pm$ 0,21	123,31 $\pm$ 5,15	8,93 $\pm$ 0,53	35,00 $\pm$ 0,45	2,62 $\pm$ 0,15	46,55 $\pm$ 0,90
ТЈН	64,77 $\pm$ 5,93	14,85 $\pm$ 2,37	8,38 $\pm$ 2,44	88,01 $\pm$ 10,45	4,26 $\pm$ 0,42	16,85 $\pm$ 1,11	2,54 $\pm$ 0,35	23,66 $\pm$ 1,46
АНД	112,01 $\pm$ 15,80	23,04 $\pm$ 0,84	3,94 $\pm$ 2,11	138,99 $\pm$ 17,07	3,19 $\pm$ 0,00	20,69 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,00	24,28 $\pm$ 0,00
ВРЛ	76,73 $\pm$ 7,47	16,76 $\pm$ 0,88	1,50 $\pm$ 0,09	94,99 $\pm$ 8,23	5,65 $\pm$ 0,42	18,09 $\pm$ 1,88	0,00 $\pm$ 0,00	23,74 $\pm$ 2,29
МЈЖ	104,35 $\pm$ 5,91	15,44 $\pm$ 1,29	2,70 $\pm$ 0,74	122,49 $\pm$ 7,88	6,65 $\pm$ 0,43	28,77 $\pm$ 1,98	0,00 $\pm$ 0,00	35,42 $\pm$ 1,59
СУТ	59,87 $\pm$ 3,00	9,11 $\pm$ 0,45	0,60 $\pm$ 0,07	69,59 $\pm$ 3,47	5,93 $\pm$ 0,41	15,59 $\pm$ 1,21	0,00 $\pm$ 0,00	21,52 $\pm$ 1,62
ЖАЊ	79,96 $\pm$ 2,10	9,16 $\pm$ 0,40	0,87 $\pm$ 0,04	89,99 $\pm$ 2,02	7,32 $\pm$ 0,95	25,54 $\pm$ 2,15	0,00 $\pm$ 0,00	32,86 $\pm$ 1,20
ВОД	127,52 $\pm$ 2,80	9,83 $\pm$ 1,60	0,95 $\pm$ 0,03	138,30 $\pm$ 4,36	9,29 $\pm$ 0,00	12,68 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	21,97 $\pm$ 0,00
УЛЦ	37,06 $\pm$ 10,04	14,84 $\pm$ 2,93	0,73 $\pm$ 0,09	52,63 $\pm$ 13,05	4,10 $\pm$ 0,22	19,99 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	24,09 $\pm$ 0,43
ДЛК	72,37 $\pm$ 5,93	10,30 $\pm$ 0,77	4,21 $\pm$ 0,74	86,87 $\pm$ 5,63	1,91 $\pm$ 0,28	6,45 $\pm$ 1,47	0,39 $\pm$ 0,05	8,74 $\pm$ 1,70
ГБЦ	90,86 $\pm$ 0,00	12,49 $\pm$ 0,00	12,02 $\pm$ 0,00	115,37 $\pm$ 0,00	4,58 $\pm$ 0,00	21,06 $\pm$ 0,00	0,87 $\pm$ 0,00	26,52 $\pm$ 0,00
АСМ	78,50 $\pm$ 2,90	21,89 $\pm$ 1,42	36,31 $\pm$ 3,56	136,69 $\pm$ 0,76	7,42 $\pm$ 0,00	13,12 $\pm$ 0,00	2,71 $\pm$ 0,00	23,25 $\pm$ 0,00
ФУР	89,19 $\pm$ 4,48	18,24 $\pm$ 1,67	0,73 $\pm$ 0,02	108,16 $\pm$ 6,15	7,06 $\pm$ 0,88	34,83 $\pm$ 1,23	0,82 $\pm$ 0,04	42,70 $\pm$ 2,01
ПЛТ	77,08 $\pm$ 3,79	11,00 $\pm$ 0,41	0,86 $\pm$ 0,10	88,94 $\pm$ 4,21	4,44 $\pm$ 0,69	20,95 $\pm$ 1,47	0,00 $\pm$ 0,00	25,39 $\pm$ 2,15
ПЛВ	102,83 $\pm$ 6,38	11,95 $\pm$ 0,32	1,29 $\pm$ 0,27	116,06 $\pm$ 6,17	6,40 $\pm$ 1,72	32,10 $\pm$ 7,94	2,05 $\pm$ 0,05	40,55 $\pm$ 6,36
ЧЕМ	98,24 $\pm$ 6,75	17,71 $\pm$ 2,95	2,31 $\pm$ 1,16	118,27 $\pm$ 8,03	5,45 $\pm$ 0,90	29,21 $\pm$ 2,29	0,83 $\pm$ 0,17	35,49 $\pm$ 3,23
КРК	94,64 $\pm$ 4,37	18,42 $\pm$ 1,49	14,78 $\pm$ 1,73	127,84 $\pm$ 7,55	6,53 $\pm$ 0,20	27,82 $\pm$ 1,03	2,29 $\pm$ 0,14	36,64 $\pm$ 1,14
ДЕВ	97,34 $\pm$ 2,88	31,39 $\pm$ 2,08	3,19 $\pm$ 1,36	131,92 $\pm$ 4,11	6,51 $\pm$ 0,76	30,90 $\pm$ 2,29	0,00 $\pm$ 0,00	37,41 $\pm$ 3,06
ННТ	102,83 $\pm$ 6,38	11,95 $\pm$ 0,32	1,29 $\pm$ 0,27	116,06 $\pm$ 6,17	6,40 $\pm$ 1,72	32,10 $\pm$ 7,94	2,05 $\pm$ 0,05	40,55 $\pm$ 6,36



**Табела 10:** Анализа варијансе садржаја три секоиридоидна гликозида у надземним деловима и кореновима *C. erythraea* пореклом из 43 природне популације.

	Популација			Део биљке		
	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
СМ	42	8,65	<0.0001	43	304	<0.0001
ГП	42	11,37	<0.0001	43	13,6	<0.0001
СВ	42	23,12	<0.0001	43	20,81	<0.0001

#### 4.9.1. Корелације у концентрацијама три секоиридоидна гликозида

Интересантно је да су корелације између концентрација сва три секоиридоидна гликозида у надземном делу и корену најчешће позитивне (Табела 11). Значајна корелација ( $r=0,2063$ ,  $P<0,05$ ) је примећена између концентрација ГП и СВ у надземном делу. Такође, значајна корелација ( $r=0,4635$ ,  $P<0,01$ ) постоји и у концентрацији СВ између надземног дела и корена. Највећа вредност корелације ( $r=0,5065$ ,  $P<0,0001$ ) је између концентрација СМ и ГП корена, док између садржаја СМ и СВ у корену постоји такође значајна корелација ( $r=0,2137$ ,  $P<0,01$ ).

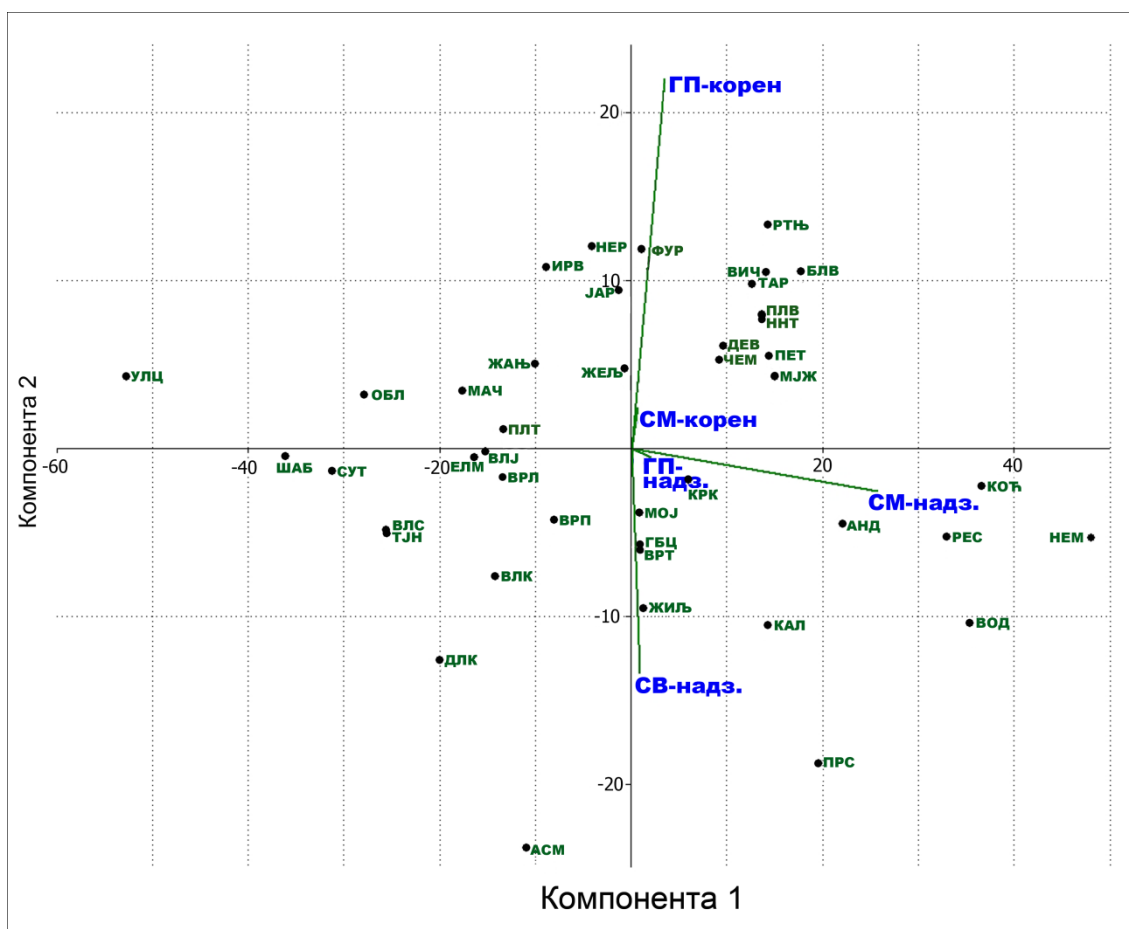
**Табела 11:** Фенотипска корелација између концентрација три секоиридоидна једињења у различитим деловима биљке.

	СМ надз.	ГП надз.	СВ надз.	СМ корен	ГП корен
ГП надз.	+0,0971				
СВ надз.	+0,1074	+0,2063*			
СМ корен	+0,2220	-0,1104	-0,1031		
ГП корен	+0,2348	+0,1488	-0,2240	+0,5065****	
СВ корен	+0,1407	+0,1280	+0,4635**	+0,2137*	+0,1263

#### 4.9.2. Анализа основних компоненти (PCA) садржаја секоиридоидних гликозида

Са графикона добијеног анализом основних компоненти (Слика 18) садржаја секоиридоидних гликозида не могу се уочити групе популација,

које се раздвајају по степену плоидности или географском пореклу. Међутим, основна компонента 2, која описује 39,71% укупне варијабилности и на коју највише утичу концентрација ГП у корену и садржај СВ у надземном делу, јасно издваја хибридную популацију АСМ. Димензија 1 описује 44,51% укупне варијабилности (заједно са првом: 84,22%) и њом доминира концентрација СМ у надземном делу.



**Слика 18:** PCA дијаграм садржаја секоиридоидних гликозида у надземним деловима и кореновима 43 анализираних популација *C. erythraea*. Прве две основне компоненте описују 84,22% укупне варијабилности.



#### 4.10. Корелације између садржаја секоиридоидних гликозида и генетичких сличности популација

Квадратне еуклидске дистанце између популација, добијене на основу садржаја три секоиридоидна једињења у надземном делу и корену биљака показале су статистички значајну, умерену корелацију са матрицама генетичких сличности добијених молекуларним маркерима. Тако је корелација између нормализованих података фитохемијских маркера и *RAPD* маркера била 0,3266,  $P=0,0058$ , док је у случају *TRAP* маркера корелација била виша и износила је 0,4504,  $P=0,006$ .

## 5. Дискусија

### 5.1. Биодиверзитет кичице на Балканском полуострву

Недостатак литературе везане за анализу генетичког диверзитета кичице, диспропорционалан је њеној изузетној терапеутској вредности и дужини традиционалне употребе у народној медицини. Ово се посебно односи на територију Балканског полуострва, које представља један од глацијалних рефугијума и центара адаптивне радијације великог броја врста (*Ferris* и сар., 1999).

Садашња распрострањеност биљних врста није условљена само актуелним климатским и биотичким факторима, него и историјским догађајима (*Vogel* и сар., 1999). Велики делови Европе су били под директним утицајем последње Вајксел глацијације и садашња дистрибуција организама још показује знаке колонизације тих подручја после повлачења глечера. Опсежна палинолошка, палеоботаничка и филогеографска истраживања су показала да су подручја око Медитерана (Пиринејско, Апенинско и Балканско полуострво) служила као рефугијуми врста за време топлих и хладних периода глацијације (*Huntley* и *Birks*, 1983; *Taberlet* и сар., 1998). Ови рефугијуми су увек укључивали планинске области, где је постојала могућност висинских миграција. Ако се узме у обзир просечан пад температуре од 1°C на сваких 200 метара надморске висине (*Rind* и *Peteet*, 1985), јасно је да су биљни таксони лакше преживљавали топле и хладне циклусе глацијација у подручјима где су се те разлике најмање осетиле (*Tzedakis*, 1993). На основу садашњих климатских услова и топографије, падавине и температура тла имају веће градијенте на Балкану, него игде у Европи (*Bennet* и сар., 1991).

О појави високог генетичког диверзитета у јужним деловима Европе (углавном у ширем подручју медитеранског басена, *Myers* и сар., 2000) и релативно ниског генетичког диверзитета северније у Европи, често је дискутовано (*Hewitt*, 1993, 1996). Ово раздвајање генетичког диверзитета је објашњено хипотезом да се колонизација после глацијације одвијала само

са северне ивице рефугијалних подручја; јужније популације у таквим рефугијумима су биле спречене да учествују у колонизацији, јер су биле задржане севернијим популацијама које су се шириле. Овакав сценарио довео би до тога да је само мала фракција укупног генетичког диверзитета, који је постојао у рефугијумима, колонизовала подручја ослобођена повлачењем глечера, док је главни део генетичке варијабилности остао *in situ* у рефугијалним подручјима. Овај модел је уочљив код тетраплоидних популација кичице. Уочљиво је да је генетичка сличност између популација из севернијих делова Балканског полуострва израженија, нарочито када су примењени *RAPD* маркери (Слике **9** и **10**).

## **5.2. Полиплоидизација као механизам одржавања биодиверзитета**

На основу распрострањености папрати *Asplenium ceterach*, *Trewick* и сар. (2002) су указали на то да је Балкан, посебно панонско-балкански регион и Грчка, био један од рефугијума диплоидних популација, а да су тетраполоиди после последње глацијације колонизовали према северу и западу како би настанили новонастала станишта. Код кичице је примећен сличан тренд. Диплоидна подврста *Centaureum erythraea* ssp. *rumelicum* се јавља искључиво у медитеранском басену, док се тетраплоидна подврста *erythraea* шири далеко на север (*Zeltner*, 1970). Међутим, диплоидна подврста морфолошки личи на тетраплоидну (Слика **5 г** и **д**), па на основу појаве очигледних хомопластичних морфолошких особина није могуће јасно раздвојити ове две подврсте. Уз то, слаба дивергенција анализираних генотипова помоћу молекуларних маркера, и то рибозомалних *ITS* и хлоропластних *trnLF* ДНК секвенци, нису успеле да разреше подсекцију *Centaureum*, у којој се налазе диплоидна и тетраплоидна подврста *C. erythraea* (*Mansion* и сар., 2005). Молекуларни маркери *RAPD* и *TRAP*, примењени у овој студији, врло јасно су раздвојили (Слике **9** и **13**) једине две диплоидне популације ТЈН и ГБЦ, а по *Mansion* и сар. (2005) подврсту *rumelicum*, од велике групе тетраплоидних популација, односно подврсте *erythraea*. У овом погледу *RAPD* и *TRAP* маркери су се свакако показали успешнијима од *ITS* и *trnLF* секвенци. Такође, две наведене диплоидне

популације међусобно су показале већу генетичку разлику него било које две тетраплоидне популације међусобом, и то применом оба типа маркера. Истраживања генетичког диверзитета врста рода *Asplenium* показала су да диплоидне популације у претпостављеним рефугијумима имају високу генетичку варијабилност унутар и између популација, док су њихови, много шире распрострањени тетраплоидни потомци, међусобно генетички слабије диференцирани (*Vogel* и сар., 1999). Поређењем стопе редукције генетичког диверзитета и броја хромозомског сета у геномима организама утврђено је да се код диплоида генетичка варијабилност брже смањује од тетраплоида (*Frankham* и сар., 2003), јер полиплоиди имају виши полиморфизам и алелни диверзитет од диплоида и већу хетерозиготност за исте фреквенције алела у односу на своје диплоидне еквиваленте. Другим речима, равнотежна фреквенција рецесивних алела виша је код тетраплоида у односу на еквивалентне диплоидне локусе. Стога, постоје веће могућности да код полиплоида штетни рецесивни алели не буду под утицајем природне селекције. Дистрибуција међупопулационе варијабилности кичице, у зависности од броја хромозомских гарнитура, одличан је пример који потврђује ово правило. Уз то, представљени резултати указују на то да рефугијуми високо варијабилних диплоидних популација кичице и данас постоје на Балканском полуострву.

У својим моделима настанка полиплоидних популација, *Fowler* и *Levin* (1984) су показали да већа конкуритивна способност полиплоида не мора да обезбеди њихов опстанак *per se*. Међутим, ако се повећана конкуритивна способност комбинује са повишеним фекундитетом, појавом самооплодње, или раздвајањем станишта два цитотипа, изгледи за опстанак полиплоида се знатно увећавају. Експериментални подаци указују на то да полиплоидизација може да повећа еколошку флексибилност или способност колонизације и тако увећа шансе полиплоида да избегну „искључивање мањинских цитотипова“ (*Thompson* и *Lumaret*, 1992; *Soltis* и *Soltis*, 1993). На овај начин може да се објасни знатно шира распрострањеност тетраплоидних у односу на диплоидне популације кичице на Балканском полуострву.

### 5.3. Начин опрашивања као фактор утицаја на расподелу генетичке варијабилности кичице

Еволуција размножавања где учествује само један родитељ (асексуално размножавање или самооплодња) може да буде важан саставни део, како успостављања, тако и коегзистенције диплоида и тетраплоида (Levin, 1983; Thompson и Lumaret, 1992; Rodriguez, 1996). Развој асексуалног размножавања, као директна последица полиплоидизације, је интензиван процес који може да изолује полиплоиде од диплоида. Штетне мутације не могу да се акумулирају у виду хетерозигота код самооплодних таксона, јер ће се у генерацијама које долазе, оне раздвајати као хомозиготи и тиме повећати ниво генетичког оптерећења популације. Ниво генетичког оптерећења изазван нагомилавањем штетних мутација је повезан са начином оплодње (Hendrick, 1987): врсте са високим генетичким оптерећењем теже да буду странооплодне, док врсте са ниским генетичким оптерећењем теже самооплодни. Међутим, сегрегационо генетичко оптерећење је веома смањено код полиплоида и тако промена у начину оплодње из странооплодног у самооплодни може да се преклопи са нагом процесом полиплоидизације, без битног повећања генетичког оптерећења.

Начин опрашивања и оплодње врсте често игра најзначајнију улогу у одређивању дистрибуције укупне генетичке варијабилности на унутарпопулациону и варијабилност између популација (Hamrick и Godt, 1989, 1996). У студији генетичког диверзитета популација рода *Plantago*, искључиво странооплодна *P. lanceolata*, показала је високу варијабилност унутар и умерену диференцијацију између популација. За разлику од ње, у великој мери самооплодна *P. major*, показала је релативно ниску варијабилност унутар, али врло изражену диференцијацију између популација (Wolff и сар., 1994). Такође, релативно низак ниво унутарпопулационог генетичког полиморфизма је примећен код самооплодне врсте *Saxifraga cespitosa* (Tollefsrud и сар., 1998). Цветови кичице показују одложено самооплодњу путем система протогиније, којим жиг тучка постаје рецептабилан током првог дана цветања, док антере

увртањем испуштају полен тек на крају цветања (*Brys и Jacquemyn, 2011*). Установљено је да овај начин самооплодње учествује у оплодњи до 55% семених заметака у случају потпуног одсуства опрашивача (*Brys и Jacquemyn, 2011*). Проучавајући гарнитуре семена неколико енглеских популација, *Ubsdell (1979)* је такође утврдио да је кичица у стању да продукује знатну количину семена (86%) посредством самооплодње. Врста сродна кичици, *Gentianella germanica* је високо аутокомпатибилна и око 70% семена настаје као резултат самооплодње (*Fischer и Matthies, 1997; Luijten и сар., 1999*). Појава аутокомпатибилности полена и самооплодње код кичице у директној је вези са ниском унутарпопулационом варијабилношћу јединки у анализираним популацијама.

Научне претпоставке сугеришу да варијабилна доступност опрашивача може да створи различите селективне притиске на систем оплодње (*Lloyd, 1992; Morgan и Wilson, 2005; Eckert и сар., 2010*). У проучавању холандских популација *Gentianella germanica, Luijten и сар. (1999)* тврде да под утицајем селекције само јединке склоне самооплодњи опстају у условима екстремног недостатка опрашивача. У случају сталне ограничености у количини полена, очекивано је да се карактеристике цветова измене (нпр. смањењем нивоа херкогамије и дихогамије), са циљем повећања потенцијала за самоопрашивањем, и тако обезбеде репродуктивну сигурност (*Lloyd, 1992; Morgan и Wilson, 2005; Porcher и Lande, 2005*). Такође, биљка може да уштеди енергију, смањењем улагања у особине које служе за повећање атрактивности цветова опрашивачима, као што су дужина цветања, величина цвета или производња нектара (*Ornduff, 1969; Elle и Carney, 2003*). Јединке кичице које расту у срединама где је количина опрашивача мала, имају значајно малобројније и ситније цветове, као и мање полена по цвету. Такође, цветови не производе нектар, а време цветања је прилично кратко и траје 4 до 5 дана (*Brys и сар., 2011*).

Поред независне самооплодње, геитоногамна самооплодња (опрашивање цвета поленом другог цвета исте биљке) може да буде процес којим настаје одређени проценат укупне гарнитуре семена (*Lloyd, 1992; Eckert, 2000*), нарочито у популацијама где је присутан велики број

опрашивача. Цветови кичице (њих 52-71 (*Brys* и *Jacquetyn*, 2011)) правилно су распоређени у штит, где долази до истовременог цветања барем дела ових цветова (Слика **1a-ђ**). Узастопно слетање опрашивача на различите цветове исте јединке води до фактичког самоопрашивања – геитоногамија (*Duan* и сар., 2005) и може да повећа учесталост самоопрашивања до близу 100% (*Handel*, 1983). Код сродне врсте *Gentiana straminea*, активност опрашивача на нивоу једне јединке често резултује у геитоногамном опрашивању (*Duan* и сар., 2005; *He* и сар., 2005).

Разношење полена кичице показује дистрибуцију експоненцијалног опадања, где се највећа количина разнесе у кругу од 15 метара, а само мала количина на удаљеније дестинације (до 743 метра) (*Van Rossum*, 2009a). Кичицу најчешће посећују муве-лебдилице из фамилије *Syrphidae* (91,6%), од којих су најчешће: *Episyrphus balteatus* (34,6%, Слика **1ђ**), *Sphaerophoria* spp., *Scaeva* spp., *Syrphus* spp. и *Melanostoma* spp., ређе бумбари и солитарне пчеле (*Brys* и *Jacquetyn*, 2011). Интересантно је да наведене муве лебдилице не прелећу растојања већа од 200 метара и то уколико не постоје препреке на путањи лета (*Wratten* и сар., 2003), док бумбари прелећу до 2 km, а солитарне пчеле до 600 m (*Kwak* и сар., 1998; *Lovei* и сар., 1998; *Gathmann* и *Tscharntke*, 2002; *Chapman* и сар., 2003). Уз то, муве лебдилице могу да понесу веома малу количину полена (*Talavera* и сар., 2001).

Код врсте *Gentianella germanica* дистанце између популација су прилично велике, па простор између популација вероватно није погодан за активност опрашивача (*Fischer* и *Matthies*, 1998). Ова појава је типична за врсте које настањују земљишта са ниским садржајем хранљивих материја и чија су станишта представљена малим острвима у интензивно коришћеном пољопривредном пејзажу (*Jennersten* и сар., 1992), или су њихове суседне популације раздвојене шумском вегетацијом. Овим врстама припада и кичица. Дугорочне миграционе препреке узрокују диференцијацију популација захваљујући генетичком дрефту, мутацијама, селекцији, ефекту уског грла или ефекту оснивача, нарочито у малим и ограниченим популацијама (*Slatkin*, 1987; *Barrett* и *Kohn*, 1991). Генетичка

диференцијација између популација је примећена код великог броја ретких врста и сматра се да је настала као резултат спречавања протока гена између популација (Raijmann и сар., 1994; Travis и сар., 1996). Због свега наведеног, лако је објаснити веома скромну унутарпопулациону варијабилност (0,48%\*\*\*\* укупне варијабилности) детектовану *RAPD* маркерима (Слике 7 и 8). Претпоставља се да популације које губе на бројности садрже низак ниво генетичког диверзитета због повећане вероватноће укрштања у сродству и случајног генетичког дрифта који делује у малим и изолованим популацијама (Ellstrand и Elam, 1993). Ниски нивои генетичке варијабилности, нађени унутар малих популација врста: *Gentiana pneumonanthe* (Raijmann и сар., 1994), *Gentianella germanica* (Fischer и Matthies, 1998), *Salvia pratensis*, *Scabiosa columbaria* (Van Treuren и сар., 1991), *Angelica palustris* (Dittbrenner и сар., 2005), *Pulsatilla vulgaris* (Hensen и сар., 2005), *Dictamnus albus* (Hensen и Oberprieler, 2005), *Eulophia sinensis* и *Zeuxine strateumatica* (Sun и Wong 2001), вероватно су резултат ефекта оснивача, ефекта уског грла на популације, снажног генетичког дрифта, као и комбинације било којих од наведених механизма (Van Treuren и сар., 1991).

#### **5.4. Унутарпопулациона и међупопулациона варијабилност кичице**

Анализа молекуларне варијансе, *AMOVA*, показала је веома изражену генетичку диференцијацију између популација кичице (99,52%\*\*\*\* укупне генетичке варијабилности, тј. индекс фиксације -  $F_{ST}=0,9952$ ). Ове резултате би требало узети са опрезом јер су процене популационо-генетичких параметара путем варијабилности *RAPD* маркера пристрасне захваљујући њиховој претежно доминантној природи (Lynch и Milligan, 1994). Међутим, нивои значајности ове анализе су веома високи, што указује на поузданост резултата. Као и код кичице, висока генетичка диференцираност популација *Gentiana straminea* може бити проузрокована комбинованим дејством геитоногамног самоопрашивања, сложене географије терена и климатским осцилацијама током дужег временског периода (Li и сар., 2008). У проучавањима две симпатричке



врсте рода *Delphinium*, Williams и сар. (2001) су показали да многоцветна врста *D. barbeyi* има нижи степен унакрсне оплодње услед повећаног геитоногамног самоопрашивања и десетоструко већу диференцираност популација у поређењу са врстом *D. nuttallianum*, која производи само неколико цветова и у великој мери је странооплодна.

Van Rossum (2009a) је на основу података добијених алозимским маркерима показао да се анализирани популације кичице у овом истраживању значајно разликују, упркос кратким географским дистанцама између њих (23 до 7060 метара), показујући ниску унутарпопулациону генетичку варијабилност, најчешће високе коефицијенте инбридинга ( $F_{IS}$ ), што може да доведе до генетичке ерозије и повећа осетљивост на срединске селективне притиске (Vucetich и Waite, 1999; Henle и сар., 2004). Мала бројност неких популација кичице (6-2132 јединке (Van Rossum, 2009a; Brys и сар., 2011)) је добар показатељ да генетички дрифт вероватно игра важну улогу у одржавању унутарпопулационе варијабилности на ниском нивоу. Ефекат оснивача би могао да буде још једно од објашњења, али како не постоје сазнања о историји популација, тешко је одредити која од стохастичких сила има највећи утицај на унутарпопулациону варијабилност кичице, што, опет, може да се разликује од популације до популације. Природна селекција у изолованим популацијама, која води ка одабиру оптималних генотипова према локалним условима станишта, може такође да буде разлог ниске унутарпопулационе варијабилности кичице. Популације врсте *Gentianella germanica*, које су сачињене од највише 1000 јединки поседују ниске нивое генетичке варијабилности, а адаптивна вредност биљака из малих популација је умањена у односу на оне из великих популација, не само у природи, него и у експериментално контролираним условима гајења (Fischer и Matthies, 1998). Ниска унутар- и висока међупопулациона варијабилност у секундарно насталим стаништима може такође да буде резултат историјских процеса, као што је изолација и смањење густине популација, које су пролазиле кроз ефекат уског грла током Квартара (Hofhanzlová и Fér, 2009). Шансе за преживљавање врсте прилагођене

светлим и осунчаним стаништима, као што је кичица, значајно су смањене развојем шумске вегетације током климатског оптимума у Холоцену. На великој територији Балкана, чије мале надморске висине најчешће нису онемогућавале развој шума, кичица је могла да опстане само на појединачним, изолованим местима, где земљиште или геоморфолошки услови нису били погодни за формирање компактних шума. Почев од Средњег века, крчење шума на висинама је омогућило ширење кичице у потрази за светлошћу, на секундарно формиране планинске ливаде. Улога људских активности у ширењу ове лековите биљке такође не сме бити искључена.

Генетичке последице редукције у величини популација и повећане изолације услед фрагментације станишта често су разматране (*Van Treuren* и сар., 1991; *Jennersten* и сар., 1992). Кичица је краткоживећа, делимично самооплодна врста (*Ubsdell*, 1979; *Brys* и *Jacquemyn*, 2011), па генетичка диференцијација између популација може и да се очекује (*Hamrick* и *Godt*, 1996). Тако, уочена висока генетичка диференцијација између анализираних популација кичице на Балканском полуострву (Слике **9** и **13**) указује на то да је проток гена између њих вероватно онемогућен или на веома ниском нивоу. На основу истраживања које су *Nybot* и *Bartish* (2000) спровели, анализирајући 108 студија генетичког диверзитета различитих биљних врста добијеног *RAPD* маркерима, закључено је да једногодишње, самооплодне, рано сукцесивне врсте, са широком распрострањеношћу, које продукују семена са ниским капацитетом расејавања (нпр. гравитацијом), имају највећи потенцијал за високу генетичку диференцијацију између популација. Кичица, као двогодишња, рано сукцесивна врста (*Van Rossum*, 2009a, 2009b) са широким распрострањењем (*Flora Europea online database*, 2011) и семенима која немају специфичан систем расејавања (*Ubsdell*, 1979), испуњава све услове за високу диференцираност њених популација.

У циљу испитивања географских варијација што већих размера, а узевши у обзир претпостављену ниску унутарпопулациону варијабилност кичице, представљено истраживање је обухватило велики број популација,

са три јединке по популацији. Овакве експерименталне поставке су честе, ако се тежи да се испита постојање генетичке варијабилности врсте *per se* (нпр. *Tollefsrud* и сар., 1998; *Mehrnia* и сар., 2005; *Guggisberg* и сар., 2006). Стога, добијена вредност унутарпопулационе варијабилности у овом раду може бити потцењена, јер је анализирано само неколико биљака из сваке популације. Међутим, анализиран је велики број молекуларних маркера и коришћен је исти број јединки из великог броја популација. Осим тога, анализиран је чист, неконтаминиран биљни материјал пореклом из *in vitro* услова, а јединке за изолацију ДНК су биране потуно насумично од пула од неколико стотина исклијалих семена из сваке популације (колекције семена различитих врста биљака су врло често коришћене као полазни материјал за анализе генетичког диверзитета (*Lattoo* и сар., 2008; *Pandey* и сар., 2008; *Khan* и сар., 2009; *Baghalian* и сар., 2010; *Mujaju* и сар., 2010)). На основу свега наведеног, закључци засновани на релативној расподели генетичке варијабилности унутар и између анализираних популација кичице могу бити веродостојно донешени. Такође, како би се избегла сложеност и преопширност, подаци којима је, уз употребу *RAPD* и *TRAP* маркера, анализирана генетичка варијабилност између популација кичице мултиваријантним методама (дискусија у поглављу 5.7.), сведени су на само једну јединку по популацији (*Ray* и *Roy*, 2009).

#### **5.5. Веродостојност података добијених *RAPD* и *TRAP* молекуларним маркерима**

Током изолације и пречишћавања ДНК, нарочито из лековитих и ароматичних биљака, може да дође до деградације ДНК ендонуклеазама, ко-изолације вискозних полисахарида, полифенола, или других секундарних метаболита који директно или индиректно ометају *PCR* реакцију (*Skorić* и сар., 2012). Ко-изолација секоиридоидних и ксантонских гликозида, који доминирају у секундарном метаболизму кичице, спречена је додавањем селективног средства за таложење нуклеинских киселина – цетилтриметиламонијум бромида (*СТАВ*).

Слаба амплификација продуката у *PCR* реакцији може да буде изазвана великим количинама РНК у узорку. Због тога је након изолације нуклеинских киселина извршена деградација РНК до кратких ланаца нуклеозида, који не ометају *PCR* реакцију.

Према *Wolfe* и *Liston* (1998) посебну пажњу приликом извођења *PCR* реакције треба обратити на то да контаминантна ДНК не буде амплификована. Стандардне мере опреза обухватају употребу стерилисаних реагенаса и других потрештина, пипетних наставка са филтерима и укључивање негативних контрола (тј. *PCR* компоненти без ДНК) за све реакције. Чак и уз све строге контроле, „погрешна“ ДНК пореклом из, на пример, ендосимбионтних организама или патогена, може бити амплификована (*Liston* и сар., 1996). Због тога су за изолацију ДНК коришћене искључиво биљке добијене из семена и гајене у стерилним *in vitro* условима. Тиме је избегнута могућност амплификације стране ДНК, која би пружила погрешне закључке и неадекватну интерпретацију генетичког диверзитета кичице.

Прецизна анализа *RAPD* маркера зависи од поуздане *PCR* амплификације фрагмената, на коју може да утиче чистоћа ДНК, концентрација магнезијум хлорида, однос прајмер:ДНК, различите температуре хибридизације прајмера са матрицом, као и квалитет термостабилне полимеразе (*Ellsworth* и сар., 1993; *Williams* и сар., 1993). Стога је стандардизација *RAPD* протокола неопходна како би се избегле експерименталне варијације (*Dowling* и сар., 1996). Због свега наведеног, извршена је пажљива и опширна оптимизација услова *PCR* реакција, како *RAPD* (*Skorić* и сар., 2012), тако и *TRAP* маркера, чиме су се стекли услови за непристрасну анализу популационог генетичког диверзитета кичице.

Неколико фактора може да утиче на процену генетичке удаљености јединки: број употребљених маркера, дистрибуција маркера у геному (покривеност генома), као и природа еволуционих механизма који стоје у основи варијабилности (*Powell* и сар., 1996). Оптималан број локуса зависи од саме биљне врсте, њене репродуктивне биологије, нивоа протока гена

између популација, итд. У случају *AFLP* маркера, сматра се да је најмање 200 локуса прихватљиво за анализу генетичке варијабилности или диференцијације популација (*Mariette* и сар., 2002; *Hollingsworth* и *Ennos*, 2004; *Cavers* и сар., 2005; *Singh* и сар., 2006). Применом 16 прајмера *RAPD* методе у нашој експерименталној анализи амплификовано је 408 полиморфних трака, док је са 9 комбинација прајмера *TRAP* методом добијено 767 фрагмената ДНК. За филогенетске анализе *RAPD* маркерима *Landry* и *Lapointe* (1996) препоручују употребу најмање 12 прајмера, док погрешни исходи мултиваријантних анализа, према њиховој студији, практично да не постоје употребом 16 прајмера.

Неки од проблема са којима се *RAPD* као техника суочава и који су раније образложени (поглавље 1.6.1.), у овој студији су правилно окарактерисани и у највећој мери решени. Слаба репродуцибилност *RAPD* анализа је знатно превазиђена усавршавањем лабораторијских техника и начина детекције трака. Још један од већих потенцијалних проблема је питање хомологије између трака исте дужине и добијених истим прајмером. Међутим, бројне студије су потврдиле да су овакви фрагменти идентични по пореклу, барем када су у питању анализе унутар врсте (*Lannér-Herrera* и сар., 1996; *Rieseberg*, 1996; *Wu* и сар., 2000). Као основни извор грешака у *RAPD* анализама наводи се конкуренција између фрагмената, која се огледа у томе да ће ретке секвенце ДНК имати мању шансу да се амплификују него поновљене секвенце (*Halldén* и сар., 1996). Ова појава може да се појача у групним узорцима (*Yu* и *Pauls*, 1993; *Brummer* и сар., 1995). Због тога је за поставку *RAPD-PCR* реакција, за три одвојене реакције по популацији коришћена ДНК појединачних јединки кичице.

*TRAP* маркери су до сада налазили примену само у пољопривреди (*Hu* и *Vick*, 2003; *Hu* и сар., 2005; *Alwala* и сар., 2006; *Hu* и сар., 2007; *Yue* и сар., 2009), хортикултури (*Deng* и сар., 2007), алгологији (*Qiao* и сар., 2007) и микологији (*Xiao* и сар., 2010). Један од битних проблема ових маркера је у томе што је тешко доказати колики је проценат продуката добијених *TRAP-PCR* реакцијом повезан са секвенцом специфичног

прајмера. Претпоставља се да је већина фрагмената пореклом од погрешног спаривања прајмера и циљне секвенце ДНК, захваљујући ниској температури хибридизације у првих неколико циклуса *PCR* реакције. Међутим, разлике у профилима, добијених једнаким арбитрарним прајмерима, уз употребу различитих специфичних прајмера указују на то да у амплификацији одређеног броја трака у одређеној мери учествују и специфични прајмери. Слабије корелације између података добијених употребом три специфична прајмера (0,7341\*\*\*\*, 0,7427\*\*\*\* и 0,8354\*\*\*\*) говоре у прилог овој претпоставци.

Упркос негативним расправама у погледу употребе *RAPD* маркера у популационо-генетичким студијама, спроведено је неколико упоредних истраживања између алозима, *RAPD* и *AFLP* маркера, као и других врста молекуларних маркера. Ове студије су показале да *RAPD* маркери имају сличну аналитичку ефикасност као и друге технике (*Sun* и *Wong*, 2001; *Kjølner* и сар., 2004). Тако су, при анализирању генетичке структуре на нижим таксономским нивоима, *RAPD* маркери осетљивији од алозима (*Nybot* и *Bartish*, 2000), а подаци добијени алозимима и *RAPD* техником слабо су корелисани (*Heun* и сар., 1994; *Le Corre* и сар., 1997). Међутим, подаци добијени *RFLP* и *RAPD* маркерима најчешће су високо корелисани (*dos Santos* и сар., 1994; *Thormann* и сар., 1994). *Rus-Kortekaas* и сар. (1994) и *Powell* и сар. (1996) препоручују употребу *RAPD* маркера, пре него микросателита, за студије генетичке сродности унутар врста, услед превелике полиморфности микросателита. Подаци добијени *RAPD* маркерима су често добро корелисани са подацима добијеним употребом микросателита, али информативнији од њих (*Mujaji* и сар., 2010), или је њихова међусобна ефикасност у проучавању генетичког диверзитета, слична (*Zahuang* и сар., 2004). *ISSR* маркери показују сличну информативност као *RAPD* маркери (*Martins* и сар., 2003; *Chen* и сар., 2006), па чак и слабији мултиплекс однос од *RAPD* маркера (*Sarwat* и сар., 2008), док њихова међусобна корелација може да буде слаба (*Gupta* и сар., 2008) или израженија (*Yildiz* и сар., 2011). У новије време широко коришћени *AFLP* маркери, у великом броју истраживања показују сличну

информативност и умерену корелацију са *RAPD* маркерима (*Albert* и сар., 2003; *Ipek* и сар., 2003; *Kjølner* и сар., 2004; *Wen* и сар., 2004; *Shasany* и сар., 2005; *Kong* и сар., 2011). Упоредна испитивања ефикасности *TRAP* маркера и других молекуларних маркера не постоје у литератури, па ово истраживање представља први рад који упоређује *TRAP* молекуларне маркере са другим типовима маркера, и то молекуларним (*RAPD*) и фитохемијским.

#### **5.6. Информативност *RAPD* и *TRAP* молекуларних маркера у анализи генетичког диверзитета кичице**

Полиморфизам *RAPD* маркера (98,23%), добијен у анализи генетичког диверзитета анализираних популација кичице, показао се изванредним, чак вишим у односу на велики број студија (нпр. *Haraštová-Sobotková* и сар., 2005; *Gupta* и сар., 2008; *Li* и сар., 2008; *Ray* и *Roy*, 2009), што такође важи и за просечну ефикасност употребљених прајмера од 25,5 трака по прајмеру (*Debnath*, 2007; *Ray* и *Roy*, 2009; *Mujaju* и сар., 2010).

Слична ситуација је показана и у случају *TRAP* маркера. Полиморфност добијених ДНК фрагмената (96,58%) је већа, или на нивоу полиморфности показане у досадашњим студијама (*Alwala* и сар., 2006; *Xiao* и сар., 2010), док је ефикасност прајмер-комбинација била знатно већа (*Alwala* и сар., 2006; *Deng* и сар., 2007; *Hu* и сар., 2007; *Yue* и сар., 2009) или на нивоу ефикасности прајмер-комбинација коришћених у ранијим студијама (*Xiao* и сар., 2010). Ако се узме у обзир да је у овој студији први пут коришћен систем капиларне електрофорезе у детекцији *TRAP-PCR* продуката, док су досадашње студије користиле секвенцере са инфрацрвено-обележеним прајмерима или стандардну електрофорезу уз бојење сребром, може се закључити да је систем *Agilent Bioanalyzer 2100* показао одличну моћ детекције амплификованих ДНК фрагмената. У односу на класичну, агарозну електрофорезу *TRAP-PCR* продуката (резултати нису приказани), капиларном електрофорезом је постигнуто знатно боље раздвајање и детекција ових продуката, па би овај систем

требало примењивати и у будућим анализама, нарочито када је број амплификованих ДНК продуката по реакцији висок. Уштеда на времену, хемикалијама и другим ресурсима, као и информативност која се добија овим системом надомешћују значајна почетна финансијска улагања.

Један од показатеља ефикасности прајмера, или прајмер-комбинација, полиморфни информациони садржај (*PIC*), показао је да оба коришћена маркер-система, у просеку, имају добру дискриминациону моћ (*RAPD*: 0,2354, *TRAP*: 0,2516), у поређењу са ранијим студијама (*Lübberstedt* и сар., 2000; *Alwala* и сар., 2006; *Deng* и сар., 2007). Раздвојна моћ прајмера (*Rp*), у случају *RAPD* маркера (просечно 8,8693) показала се већом у односу на досадашње студије (*Virk* и сар., 1995; *Prevost* и *Wilkinson*, 1999; *Teklewold* и *Becker*, 2006; *Gupta* и сар., 2008; *Venkatachalam* и сар., 2008), док ова вредност за комбинације *TRAP* прајмера није до сада израчунавана. Интересантно је напоменути да је прајмер *OPB 15*, који је, од 16 употребљених *RAPD* прајмера, показао највећу вредност *Rp*, такође био најефикаснији од 20 анализираних прајмера у студији генетичког диверзитета врсте *Jatropha curcas* (*Gupta* и сар., 2008).

### **5.7. Генетичка диференцираност анализираних популација кичице**

Најчешће коришћени начини процене генетичке дистанце или генетичке сличности из бинарних података су: Дајсов коефицијент (*Dice*, 1945; *Nei* и *Li*, 1979), Жакардов коефицијент (*Jaccard*, 1908), коефицијент једноставног упоређивања (*Sneath* и *Sokal*, 1963) и модификовани Роџерсов коефицијент. Жакардов коефицијент узима у обзир само поклапања између трака које су присутне, а изоставља парове где се су траке одсутне. Многи истраживачи избегавају да користе Дајсову процену генетичке дистанце, јер даје једнаку значајност 0-0 и 1-1 поклапањима код бинарних података. Међутим, 1-1 поклапање, у реалности, указује на већу сличност него 0-0, јер постоји много разлога за изостанак амплификације и резултујуће траке, па 0-0 поклапање не представља јединственост засновану на пореклу, већ засновану на случају (*Mohammadi* и *Prasanna*,



2003). Високе вредности корелационих коефицијената између матрица генетичких сличности, добијених применом коефицијента једноставног упоређивања, Жакардовог и Дајсовог коефицијента, за оба типа молекуларних маркера, указују на то да су подаци добијени овим коефицијентима високо сагласни, па су мултиваријантне анализе извршене само уз употребу Жакардовог коефицијента генетичке сличности. У литератури је често могуће наћи поређења различитих коефицијената генетичке сличности (нпр. *Johns* и сар., 1997; *Sarwat* и сар., 2008), али је Жакардов коефицијент најчешће препоручиван код употребе доминантних молекуларних маркера (*Duarte* и сар., 1999; *Shan* и сар., 2005; *Alwala* и сар., 2006; *Chen* и сар., 2006; *Debnath*, 2007; *Deng* и сар., 2007; *Khan* и сар., 2009). Вредности овог коефицијента могу да варирају у зависности од тога колико су филогенетски удаљени таксони који се тестирају, па нема пуно смисла упоређивати добијене податке са литературним. Битно је приметити да сличности између анализираних популација кичице, добијене *RAPD* маркерима, имају нешто већи распон Жакардовог коефицијента у односу на *TRAP* маркере (Слике **9** и **13**). То се може уочити и из вредности корелације између ова два типа маркера. Корелација од  $0,7705^{****}$  (Дајсовим коефицијентом  $0,7985^{****}$ ) представља, по *Rohlf* (2003) слабу подударност, међутим, када се узме у обзир број анализираних популација и локуса, ова вредност представља прилично снажну корелацију матрица генетичких сличности анализираних популација између *RAPD* и *TRAP* маркера. Представљени подаци су први случај да је у процени генетичког диверзитета једне врсте коришћена комбинација *RAPD* и *TRAP* маркера.

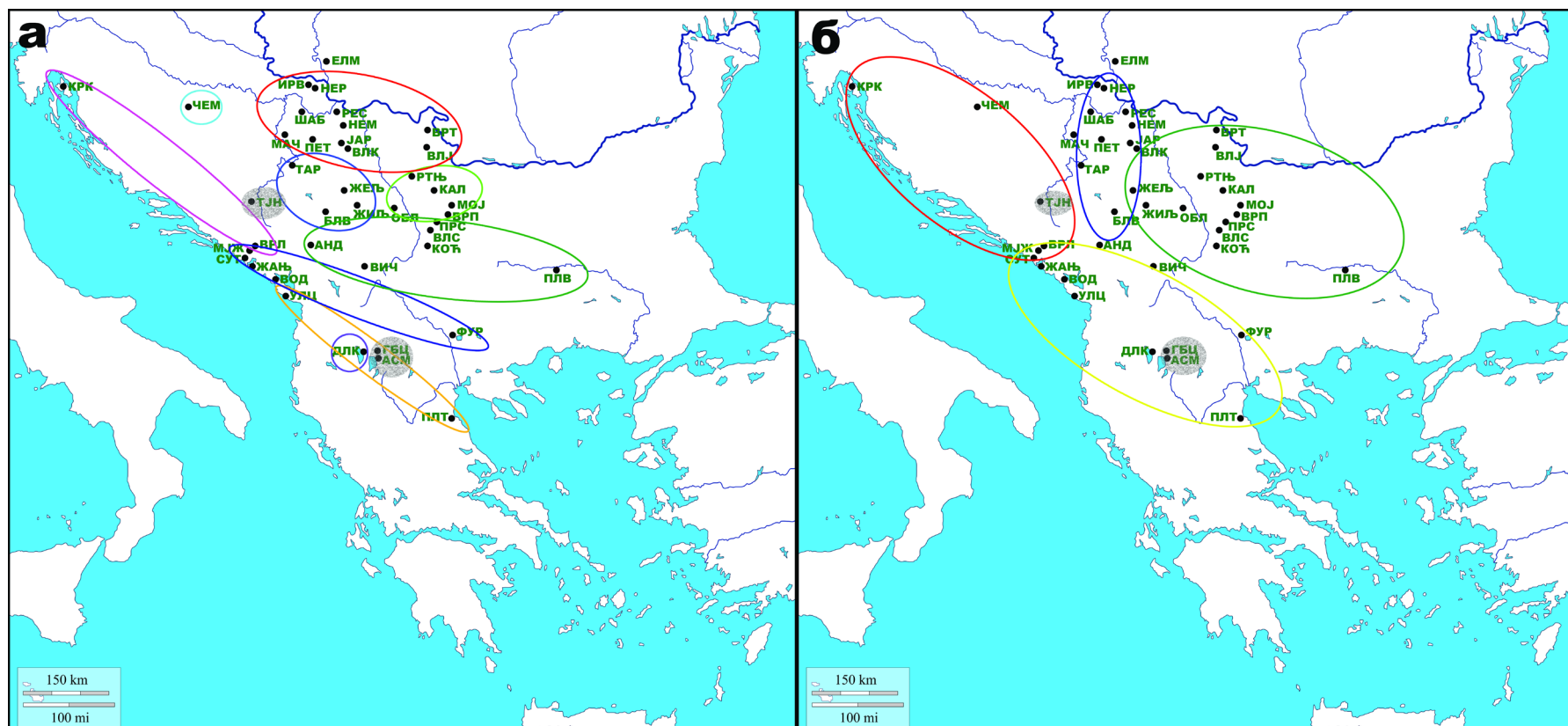
У начелу, и Дајсов и Жакардов начин израчунавања генетичких дистанци имају недостатак који се огледа у изостављању статистичке дистрибуције алела, што је последица природе имениоца формуле (видети поглавље 3.4.4.), који представља случајну променљиву. Да би се превазишао овај проблем ефикасно се примењује техника бутстрепа (енг: *bootstrap*), како би се емпиријски одредила варијанса узорковања (*Brown*, 1994).

Кластер анализа 44 популације кичице *UPGMA* методом дала је, на нижим коефицијентима сличности, два прилично кохерента фенограма (Слике 7 и 11). Оба типа молекуларних маркера врло рано су раздвојили кластере А, Б и В од осталих популација. Поред кластера А, који је садржао само референтну врсту *C. littorale* и диплоидних популација кластера В, кластер Б је садржао само једну популацију – АСМ. На основу хабитуса јединки ове популације, као и других морфолошких особина, на терену није било могуће демантовати њену припадност проучаваној врсти *C. erythraea*. Међутим, разлике јувенилних биљака уочене приликом гајења *in vitro*, као и у стакленику, у односу на биљке из осталих популација, указивале су на то да ова популација не представља дату врсту. С обзиром да је на терену пронађена на истом станишту са врстом *C. tenuiflorum*, претпоставља се да она представља хибридни таксон *C. ×tenuiflorum*. Таксон *Centaurium ×tenuiflorum* представља вероватни алополиплоид између *C. erythraea ssp. erythraea* и *C. tenuiflorum ssp. acutiflorum* (Mansion и сар., 2005) и широко је распрострањен широм медитеранског басена, али и других области са медитеранском климом, као што је западна Аустралија, Чиле (Zeltner и Mansion, 2003), или западни део Северне Америке (Mansion и Zeltner, 2004).

Раздвајање кластера Д и Г код фенограма добијеног *RAPD* маркерима наступило је на нижем коефицијенту генетичке сличности, него код *TRAP* фенограма, али су у оба случаја места гранања ова два кластера била подржана снажним бутстреп вредностима. Треба приметити, међутим, да састав кластера В и Г код два типа молекуларних маркера није исти. Кластер Г у оба случаја обједињује референтне популације из западне Европе, популацију са хрватског острва Крк, популацију из Републике Српске, као и популацију ВРЛ из Црне Горе. Одвајање географски удаљених популација се логично намеће, али случај популације ВРЛ веома је интересантан. Наиме, ова популација се налази на свега 10-12 *km* удаљена од две суседне популације, МЈЖ и СУТ (Табела 8), које се на оба фенограма налазе у посебном кластеру (*TRAP*, Слика 13) или подкластеру (*RAPD*, Слика 9). Међутим, разлика у надморској висини

између ове и друге две популације износи више од један километар (Табела 1). Дуготрајна репродуктивна изолација изазвана недостатком протока гена и усмерена природна селекција и генетички дрифт, уз фаворизовање генотипова прилагођених врло специфичним условима станишта, вероватно су утицали на то да се ова популација снажно генетички диференцира од других, географски блиских популација. С обзиром да се кичица најчешће јавља у веома малим и изолованим популацијама, између којих не постоји проток гена, ови механизми могу да буду објашњење диференцираности већине анализираних популација.

На оба фенограма (Слике 9 и 13) је уочљиво груписање популација пореклом са подручја са медитеранском климом: Македоније и Грчке, као и дела Црне Горе. Груписање осталих популација, претежно са територије Србије, показује мању или већу повезаност са географским областима из које потичу (Слика 19), као и са географским удаљеностима између њих, вероватно услед дугорочних интеракција генома са различитим локалним срединским факторима, с обзиром да географски изоловане популације биљних врста теже да акумулирају генетичке промене за време развијања адаптација на животне услове (Sarwat и сар., 2008). Слично географско структурирање *RAPD* и *TRAP* варијабилности кичице дале су и *UPGMA* и *PCoA* (Слике 9, 10, 13 и 14).



Слика 19: Упоредни приказ груписања анализираних тетраплоидних популација кичице (*Centaurea erythraea*) на територији Балканског полуострва, добијеног на основу коефицијената међусобних сличности помоћу а) *RAPD* и б) *TRAP* молекуларних маркера. Групе популација уочене на фенограмима (Слике 9 и 13) обележене су елипсама различитих боја, док су две диплоидне и једна хибридна популација засенчене.

Значајна корелација између генетичких сличности и географских дистанци ( $r=-0,6225^{****}$ , Слика **13а**), добијена подацима *RAPD* маркера указује на то да варијабилност *RAPD* маркера није издељена на посебне јединице унутар врсте, него је непрекидна, а диференцијација популација је корелисана са географским дистанцама. Слична је ситуација и са генетичким сличностима добијеним *TRAP* маркерима, уз нешто слабију корелацију ( $r=-0,5155^{****}$ ), што може да се објасни тиме да покривеност генома прајмерима у случају *TRAP* маркера, није толико изражена као када су примењени *RAPD* прајмери, па се недостатак детекције случајних мутација *TRAP* метода огледа у смањеној корелацији са географским дистанцама. Изражена корелација између генетичке сличности популација са њиховим географским дистанцама често је присутна код врста са претежном самооплодњом (*Tollefsrud* и сар., 1998). Овакве корелације нису забележене код сродних врста *Gentianella germanica* (*Fischer* и *Matthies*, 1998) и *Gentiana pannonica* (*Hofhanzlová* и *Fér*, 2009).

Важно је приметити да су популације кичице Балканског полуострва међусобно значајно генетички диференциране (Слике **9** и **13**), што се може закључити по малој разлици у међусобним генетичким сличностима ових популација с једне стране и њиховим генетичким сличностима са референтним популацијама из западне Европе. На основу овога, може да се закључи да Балканско полуострво представља једну од области биодиверзитета кичице.

#### **5.8. Допринос секоиридоидних гликозида као фитохемијских маркера у анализи диверзитета кичице**

Релативна количина сваког хемијског једињења у биљном материјалу, поред генетичких фактора, значајно варира и у зависности од услова гајења, времена брања, начина обраде биљног материјала после брања, као и услова складиштења (*Sheorey* и *Tiwari*, 2011). С обзиром да средински фактори код великог броја медицинских биљака значајно утичу на садржај секундарних метаболита (нпр. *Dong* и сар., 2011; *Schlag* и *McIntosh*, 2012), анализиране биљке су гајене у идентичним условима у

стакленику, како би се испитала варијабилност популација у садржају секоиридоидних гликозида, независно од срединских услова. Предност анализе садржаја секундарних метаболита из биљака гајених у контролисаним условима стакленика у односу на биљке пореклом из услова *in vitro* огледа се у томе да се у условима стакленика инсистира на ауотрофном начину исхране биљке, чиме се постиже функционалност примарног и секундарног метаболизма биљке аналоган оном у природним стаништима. Насупрот томе, биљке гајене у *in vitro* условима под вештачким осветљењем, на подлози која садржи извор угљеника (најчешће сахарозу), срећу се са измењеним начином исхране (делимична хетеротрофија), што, свакако, директно утиче како на примарни, тако и на секундарни метаболизам биљака.

Секундарни метаболити кичице, а нарочито секоиридоидни гликозиди и ксантони коришћени су у више наврата као таксономски маркери рода *Centaureum* (*van der Sluis*, 1985; *Jensen* и *Schripsema*, 2002). Ова истраживања су показала да је доминантно једињење врсте *C. erythraea* сверцијамарин (СМ) са концентрацијом до 8% суве материје надземног дела биљке. У другим радовима наводи се да је СМ такође основни конституент у надземним деловима кичице и да је његова концентрација од 3,1% до 11,1% суве масе (*Nikolova-Damyanova* и *Handijeva*, 1996; *Aberham* и сар., 2011; *Piątczak* и сар., 2011). У истраживању фитохемијског диверзитета популација кичице са Балканског полуострва (*Šiler* и сар., 2012), код биљака гајених у *in vitro* условима, СМ се такође показао као доминантно једињење. У Табели 9, као и на Слици 16, може да се види да садржај овог једињења изразито варира и то од 3,7% до 13,7% суве масе надземног дела биљке. Једињења ГП (до 2,5%) и СВ (до 2,3%) у надземном делу незнатно варирају између популација (осим у случају хибридне популације АСМ, код које концентрација СВ у надземном делу износи 3,6%), па би фитохемијску варијабилност кичице требало тражити у садржају СМ у надземном делу. Треба напоменути да се садржај ова три једињења није битно разликовао између диплоидних и тетраплоидних популација, па је на основу анализе

садржаја секоиридоидних једињења немогуће посредно закључити колики је степен плоидности популације. Код врсте *Phragmites australis* садржај флавоноида у листу није корелисан са бројем гарнитура хромозома (Gorenflot и сар., 1984), међутим, ниво садржаја протеина у листу, јасно раздваја популације ове врсте према нивоу плоидности (Bahrman и Gorenflot, 1983). Због тога би повезаност секундарног метаболизма и степена плоидности кичице вероватно требало тражити у садржају неких других једињења, на пример ксантона, који су такође у знатној мери присутни код кичице (Valentão и сар., 2000, 2002; Jensen и Schripsema, 2002). Компонента секундарног метаболизма, која знатно утиче на диверзитет популација кичице је и садржај ГП у корену, који знатно варира (0,6-3,9% суве масе) између популација (Слика 18). Варијабилност ових компоненти указује на могућност побољшања квалитета биљне дроге *Centaurii herba* укрштањем и селекцијом. Није примећено груписање популација по географским областима према садржају секоиридоидних гликозида.

Интересантна је појава да је садржај три секоиридоидна једињења, како у надземном делу, тако и у корену најчешће позитивно корелисан (у четири случаја значајно корелисан, Табела 11). Ово се може објаснити тиме да се ова једињења синтетишу истим биосинтетским путем (Coscia и сар., 1969; Inouye, 1970), па повећан садржај заједничког прекурсора вероватно условљава повећање концентрације сва три једињења (Büter и сар., 1998). Осим тога, квантификација само једног секоиридоидног гликозида, нпр. СМ (како предлаже европска фармакопеја – *European Pharmacopoeia*, 2010), може да укаже на садржај друга два једињења.

Оптimalан састав секундарних метаболита може да буде селективна предност, уз претпоставку да природна селекција води ка акумулацији различитих једињења са значајним фармаколошким и биолошким активностима, која учествују у систему одбране биљке од различитих штетних организама, фаворизујући појаву хемотипова у одређеном екосистему (Fracaro и сар., 2005; Berkov и сар., 2011).

### 5.9. Упоредна анализа генетичког и фитохемијског диверзитета кичице на Балканском полуострву

Постојање корелације између садржаја секундарних метаболита и генетичких сличности генотипова није често публикувано (*Vieira* и сар., 2001; *Fico* и сар., 2003). Међутим, значајна корелација примећена је између генетичких сличности добијених применом *RAPD*, односно *TRAP* молекуларних маркера и садржаја секоиридоидних гликозида кичице. Познато је да неке мутације и генетске промене, фенотипски лако препознатљиве, као што је нпр. боја и облик плода, величина стабла, облик гранања, итд. не морају да буду препознате од стране молекуларних маркера (*Garcia* и сар., 2002). Као и морфолошке особине, и секундарни метаболизам биљака је контролисан од стране већег броја гена, док је варијабилност *RAPD* маркера заснована директно на варијабилности ДНК секвенци случајно распоређених по целом геному (*Johns* и сар., 1997; *Pandey* и сар., 2008). Уз то, *RAPD* маркерски локуси могу да буду смештени у некодирајуће регионе генома где промене у секвенцама нису ограничене потребом да се одржи функционисање гена. С обзиром да се највећи део генома биљке (око 90%) не експримира на фенотипском нивоу (*Williams* и сар., 1990; *Yang* и *Quiros*, 1995; *Joyee* и сар., 1999) *RAPD* локуси могу да постоје како у јединственим, тако и у поновљеним секвенцама ДНК (*Williams* и сар., 1990, 1993; *Thormann* и сар., 1994). Дакле у поређењу са генима који се експримирају, некодирајуће и поновљене ДНК могу да толеришу већу количину мутација, што доводи до бржих еволутивних промена (*Lapitan*, 1992; *Charlesworth* и сар., 1994).

Корелација између матрица генетичких сличности добијених *TRAP* маркерима и садржаја секундарних метаболита кичице је виша (0,4504\*\*) у односу на *RAPD* маркере (0,3266\*\*), што указује на могућност да су приликом амплификације *TRAP-PCR* продуката помоћу комбинација специфичних и арбитрарних прајмера, значајну улогу имали баш специфични прајмери, конструисани на основу секвенци делова гена који кодирају ензиме биосинтетског пута секоиридоидних гликозида. Ензими: гераниол 10-хидроксилаза, цитохром *P450* редуктаза и секологанин



синтаза, који каталишу најмање три корака синтезе логанина, прекурсора секоиридоидних гликозида, одабрани су због тога што ензими који каталишу реакције низводно у биосинтетском путу СМ, ГП и СВ још нису идентификовани. Детекција ових ензима и примена прајмера, конструисаних на основу њихових секвенци, могла би још ближе да на молекуларном нивоу разјасни постојање хемијског диверзитета и евентуално постојање хемотипова кичице.

Будући експериментални приступ представљеног истраживања подразумева секвенцирање одређених фрагмената добијених *TRAP-PCR* анализама и поређење добијених секвенци са секвенцама гена за ензиме укључене у биосинтетски пут секоиридоида кичице, али и са доступним секвенцама гена сродних врста. Добијени подаци би могли ближе да дефинишу релативно високу корелисаност матрица генетичких сличности добијених употребом *TRAP* маркера и садржаја секоиридоидних гликозида. Овакви резултати могу такође значајно да допринесу разумевању генетичког диверзитета кичице и пруже битне информације о молекуларним основама хемијског диверзитета ове фармаколошки значајне врсте.

## 6. Закључци

- \* Анализа плоидности кичице (*Centaureum erythraea Rafn*) са Балканског полуострва показала је да је већина (39 од 41) анализираних популација тетраплоидна, док су само две диплоидне.
- \* Обе технике молекуларних маркера (*RAPD* и *TRAP*), примењених у процени генетичког диверзитета кичице са Балканског полуострва дале су високу резолуцију и информативност у смислу детекције сличности/разлика између анализираних популација, уз међусобно значајну корелацију.
- \* Помоћу оба типа молекуларних маркера добијено је јасно раздвајање група са хибридним, диплоидним, и тетраплоидним популацијама, и показан је значајан ефекат географске дистанце на генетичку сличност тетраплоидних популација кичице са Балканског полуострва.
- \* Унутарпопулациона варијабилност проучаваних популација кичице је веома ниска, услед великог удела самооплодње и геитоногамије у настанку семена, као и снажног генетичког дрифта. Насупрот томе, врло висока диференцираност популација кичице на Балканском полуострву резултат је фрагментисаности станишта, малих популација, вероватно занемарљивог протока гена (врсте опрашивача, слаба дисперзија семена) између њих, усмерене природне селекције и, такође, снажног генетичког дрифта који делује у малим и изолованим популацијама.
- \* Најзаступљенија једињења из групе секундарних метаболита кичице, секоиридоидни гликозиди, представљају значајан фактор варијабилности популација кичице, од којих садржај сверцијамарина у надземном делу има најјачи ефекат.
- \* Постојање корелације између генетичке структуре популација и садржаја секоиридоидних гликозида кичице на Балканском полуострву може да допринесе евентуалном комерцијалном одабиру високопродуктивних генотипова за потребе плантажне производње.

- \* Формирана колекција семена природних популација кичице са Балканског полуострва представља базу за евентуалну *ex situ* заштиту биодиверзитета ове заштићене врсте, с обзиром на обимност колекције гермплазме и специфично висок ниво генетичке варијабилности између анализираних популација.
- \* На основу свих добијених података о тренутном биодиверзитету кичице на Балканском полуострву, може се закључити да његову основу представља управо генетички и фитохемијски диверзитет **између** анализираних популација. С обзиром на то да кичица расте у малим и, услед репродуктивне стратегије рањивим популацијама, чији опстанак у највећој мери зависи од људских активности (нарушавања станишта, прекомерног брања), заштита локалних популација, а тиме и генетичког диверзитета, представља примаран задатак будуће заштите ове врсте.

## Литература

- Aberham, A., Pieri, V., Croom Jr., E.M., Ellmerer, E., Stuppner, H. (2011). Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthones in *Centaureum erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54**: 517-525.
- Adams, K.L., Wendel, J.F. (2004). Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton. *Biological Journal of the Linnean Society*, **82**: 573–581.
- Albert, T., Raspé, O., Jacquemart, A.L. (2003). Clonal structure in *Vaccinium myrtillus* L. revealed by RAPD and AFLP markers. *International Journal of Plant Sciences*, **164**: 649-655.
- Alwala, S., Suman, A., Arro, J.A., Veremis, J.C., Kimbeng, C.A. (2006). Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Science*, **46**: 448-455.
- Arnold, M.L., Imms, S.K. (1998). Molecular markers, gene flow, and natural selection. In: *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing* (Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts, USA, pp: 442-458.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. (1991). Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9(3)**: 229-241.
- Ashman, T.L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T., Wilson, W.G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, **85**: 2408-2421.
- Avise, J. (2001). *Phylogeography*. Harvard University Press, Harvard, Massachusetts, USA.
- Baghalian, K., Maghsodi, M., Naghavi, M.R. (2010). Genetic diversity of Iranian madder (*Rubia tinctorum*) populations based on agro-morphological traits,

- phytochemical content and RAPD markers. *Industrial Crops and Products*, **31(3)**: 557-562.
- Bahrman, N., Gorenflot, R. (1983). Apports des protéines foliaires solubles dans l'interprétation du complexe polyploïde du *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Revue Générale de Botanique*, **90**: 177-184.
- Barrett, S.C.H., Kohn, J.R. (1991). Genetics and evolutionary cosequences of small population size in plants: implication for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Falk, D.A., Holsinger, K.E., Eds.). Oxford University Press, New York, USA, pp. 3-30.
- Bennet, K.D., Tzedakis, P.C., Willis, K.J. (1991). Quarternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography*, **18**: 103-115.
- Bentham, G., Hooker, J.D. (1876). Gentianeae. In: *Genera Plantarum* (Williams, Norgates, Eds.). Lovell & Reeve, London, UK, pp. 799–820.
- Berkan, T., Ustünes, L., Lermioglu, F., Özer, A. (1991). Antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*. *Planta Medica*, **57**: 34-37.
- Berkov, S., Bastilda, J., Sidjimova, B., Viladomat, F., Codina, C. (2011). Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry & Biodiversity*, **8**: 115-130.
- Beth, M. (1995). *Healing threads: tradicional medicines of the highlands and islands*. Polygon, Edinburgh University Press, UK., pp: 1-304
- Bhat, K.V., Babrekar, P.P., Lakhanpaul, S. (1999). Study of genetic diversity in Indian and exotic sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, **110**: 21-34.
- Bhattacharya, S.K., Reddy, P.K.S.P., Ghosal, S., Singh, A.K., Sharma, P.V. (1976). Chemical constituents of Gentianeaceae XIX: CNS depressant effects of swertiamarin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1547-1549.

- Bisset, N.G. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. CRC Press, New Yourk, USA, p: 556.
- Boehm, C.L., Harrison, H.C., Jung, G., Nienhuis, J. (1999). Organization of American and Asian ginseng germplasm using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **124(3)**: 252-256.
- Bonin, A., Ehrich, D., Manel, S. (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, **16(18)**: 3737-3758.
- Botion, L.M. Ferreira, A.V.M., Côrtes, S.F. Lemos, V.S., Braga, F.C. (2005). Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 137-142.
- Bretagnolle, F., Thompson, J.D. (1995). Gametes with somatic chromosome number: their mechanisms of formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, **129**: 1-22.
- British Herbal Pharmacopoeia (1983). Centaurium. British Herbal Medicine Association, pp: 55-56.
- Brown, J.K.M. (1994). Bootstrap hypothesis tests for evolutionary trees and other dendrograms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**: 12293-12297.
- Brummer, E.C., Bouton, J.H., Kochert, G. (1995). Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*, **38**: 362-367.
- Brys, R., de Crop, E., Hoffmann, M., Jacquemyn, H. (2011). Importance of autonomous selfing is inversely related to population size and pollinator availability in a monocarpic plant. *American Journal of Botany*, **98(11)**: 1834-1840.

Brys, R., Jacquemyn, H. (2011). Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaureum* species. *Annals of Botany*, **107**: 917-925.

Brys, R., Jacquemyn, H. (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach, *Functional Ecology*, **26**: 189-197.

Bussell, J.D. (1999). The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, **8**: 775-789.

Büter, B., Orlacchio, C., Soldati, A., Berger, K. (1998). Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, **64**: 431-437.

Capasso, F., Mascolo, N., Morrica, P., Ramundo, E. (1983). Phytotherapeutic profile of some plants used in folk medicine. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, **59**: 1398-1404.

Cavers, S., Degen, B., Caron, H., Lemes, M.R., Margis, R., Salgueiro, F., Lowe, A.J. (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations, *Heredity*, **95**: 281-289.

Chapman, R.E., Wang, J., Bourke, A.F.G. (2003). Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. *Molecular Ecology*, **12**: 2801-2808.

Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, **371**: 215-220.

Charlesworth, D., Charlesworth, B. (1995). Quantitative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution*, **48**: 911-920.

Chassot, P., Nemomissa, S., Yuan, Y.-M., Küpfer, P. (2001). High paraphyly of *Swertia* L. (Gentianaceae) in the *Gentianella*-lineage as revealed by nuclear and

- chloroplast DNA sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*, **229**: 1–21.
- Chen, J.-M., Gituru, W.R., Wang, Y.-H., Wang, Q.-F. (2006). The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): Comparative results for RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany*, **84**: 301-307.
- Coates, J.C., Byrne, M. (2005). Genetic variation in plant populations: assessing cause and pattern. In: *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plant* (Henry, R.J., Ed.). CAB International, Wallingford, UK, pp: 139-164.
- Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A.M., van der Heijden, R., Verpoorte, R., Memelink, J. (2001). Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters*, **508**: 215-220.
- Coscia, C.J., Guarnaccia, R., Botta, L. (1969). Monoterpene biosynthesis. I. Occurrence and mevalonic origin of gentiopicric acid and loganic acid in *Swertia caroliensis*. *Biochemistry*, **8**: 5036-5043.
- Crawford, D.J., Brauner, S., Cosner, M.B., Stuessy, T.F. (1993). Use of RAPD markers to document the origin of the intergeneric hybrid  $\times$  *Margyraciaena skottsbergii* (Rosaceae) on the Juan Fernandez islands. *American Journal of Botany*, **80**: 89-92.
- Cronn, R.C., Small, R.L., Wendel, J.F. (1999). Duplicated genes evolve independently after polyploid formation in cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**: 14406–14411.
- De Masi, L., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F., Laratta, B. (2006). Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *European Food Research and Technology*, **223**: 273–281.
- Dean, R., Arnold, J. (1996). Cytonuclear disequilibria in hybrid zones using RAPD markers. *Evolution*, **50**: 1702-1705.



- Debnath, S.C. (2007). An assessment of the genetic diversity within a collection of wild cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) clones with RAPD-PCR. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**: 509-517.
- Deng, Z., Goktepe, F., Harbaugh, B.K., Hu, J. (2007). Assessment of genetic diversity and relationships among caladium cultivars and species using molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **132(2)**: 219-229.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, **26(3)**: 297-302.
- Dittbrenner, A., Hensen, I., Wesche, K. (2005). Genetic structure and RAPD diversity of the rapidly declining *Angelica palustris* (Apiaceae) in Eastern Germany in relation to population size and seed production. *Plant Species Biology*, **20**: 191-200.
- Dong, J., Ma, X., Wei, Q., Peng, S., Zhang, S. (2011). Effects of growing locations on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucomia ulmoides*. *Industrial Crops and Products*, **34**: 1607-1614.
- dos Santos, J.B., Nienhuis, J., Skroch, P., Tivang, J., Slocum, M.K. (1994). Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 909-915.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., Rieseberg, L.H. (1996). Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites. In: *Molecular Systematics* (Hillis, D.M., Mable, B.K., Moritz, C., Eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp: 249-320.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from leaf tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- Duan, Y.W., He, Y.P., Liu, J.Q. (2005). Reproductive ecology of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae), a hermaphrodite

- perennial characterized by herkogamy and dichogamy. *Acta Oecologica*, **27**: 225-232.
- Duarte, J.M., dos Santos, J.B., Melo, L.C. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genetics and Molecular Biology*, **22**: 297-302.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Savini, D., Vendramin, G.G., Petit, R.J. (2007). Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *The American Naturalist*, **169**: 662-672.
- Eckert, C.G. (2000). Contribution of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology*, **81**: 532-542.
- Eckert, C.G., Barrett, S.C.H. (1993). Clonal reproduction and patterns of genetic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, **80**: 1175-1182.
- Eckert, C.G., Kalisz, S., Geber, M.A., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P.O., Goodwillie, C., Johnston, M.O., Kelly, J.K., Moeller, D.A., Porcher, E., Ree, R.H., Vallejo-Marin, M., Winn, A. (2010). Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**: 35-43.
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *Annals of Statistics*, **7**: 1-26.
- Elle, E., Carney, R. (2003). Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **90**: 888-896.
- Ellstrand, N.C., Elam, D.R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**: 217-243.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, R.L. (1993). Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, **14**: 214-217.

- Endlicher, S.L. (1838). *Genera plantarum secundum ordines naturales disposita*. Vienna, Austria.
- Esselman, E.J., Crawford, D.J., Brauner, S., Stuessy, T.F., Anderson, G.J., Mario, S.O. (2000). RAPD marker diversity within and divergence among species of *Dendroderis* (Asteraceae: Lactuceae). *American Journal of Botany*, **87**: 591-596.
- European Medicines Agency (EMA) (2009). Assessment report of *Centaureum erythraea* Rafn s.l. including *C. majus* (H. et L.) Zeltner and *C. suffruticosum* (Griseb.) Ronn. herba, for development of a community herbal monograph, Doc. Ref.: EMA/HMPC/105535/2008.
- European Pharmacopoeia (2010). *Centaurii herba*, 7th ed., Main Volume 7.0, DEQS, Strasbourg, France, pp: 1095-1096.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**: 47-50.
- Felber, F. (1991). Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of relative fitness of the cytotype. *Journal of Evolutionary Biology*, **4**: 195-207.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 972-980.
- Fenster, C.B., Dudash, M.R. (1994). Genetic consideration for plant population restoration and conservation. In: *Restoration of Endangered Species* (Bowles, M.L., Whelan, C.J., Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 34-62.
- Ferguson, M.A., Robertson, L.D., Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J., Maxted, N. (1998). Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographic origins. *Euphytica*, **102**: 265-273.

Ferris, C., King, R.A., Hewitt, G.M. (1999). Isolation within species and the history of glacial refugia. In: *Molecular Systematics and Plant Evolution* (Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J., Eds.). Taylor & Francis, London, UK, pp: 211-228.

Fico, G., Spada, A., Braca, A., Agradi, E., Morelli, I., Tomé, F. (2003). RAPD analysis and flavonoid composition of *Aconitum* as an aid for taxonomic discrimination. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 293-301.

Fischer, M., Matthies D. (1997). Mating structure, and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, **84**: 1685-1692.

Fischer, M., Matthies, D. (1998). RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, **85(6)**: 811-819.

Flora Europea (2011). Royal Botanical Garden, Edinburg, available online at: [http://rbg-web2.rbge.org.uk/cgi-bin/nph-readbtree.pl/feout?FAMILY\\_XREF=&GENUS\\_XREF=Centaurium&SPECIES\\_XREF=erythraea&TAXON\\_NAME\\_XREF=&RANK=.](http://rbg-web2.rbge.org.uk/cgi-bin/nph-readbtree.pl/feout?FAMILY_XREF=&GENUS_XREF=Centaurium&SPECIES_XREF=erythraea&TAXON_NAME_XREF=&RANK=)

Fowler, N.L., Levin, D.A. (1984). Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. *American Naturalist*, **124**: 703-711.

Fracaro, F., Zacaria, J., Echeverrigaray, S. (2005). RAPD-based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 409-417.

Franco, J., Crossa, J., Villaseñor, J., Taba, S., Eberhart, S.E. (1998). Plant genetic resources: classifying genetic resources by categorical and continuous variables. *Crop Science*, **38**: 1688-1696.

Franco, J., Crossa, J., Ribaut, J.M., Betran, J., Warburton, W.L., Khairallah, M. (2001). A method for combining molecular markers and phenotypic attributes

- for classifying plant genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 944-952.
- Frankel, O.H., Soulé, M.E. (1981). *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetic Research*, **66**: 95-107.
- Frankham, R. (1996). Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, **66**: 1500-1508.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2003). *Introduction to conservation genetics, 3<sup>rd</sup> ed.* Cambridge University Press, UK.
- Fritsch, P., Rieseberg, L.H. (1992). High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature*, **359**: 633-636.
- Fu, Y.B. (2005). Geographic patterns of RAPD variation in cultivated flax. *Crop Science*, **45**: 1084-1091.
- Garcia, M.G., Ontivero, M., Diaz Ricci, J.C., Castagnaro, A. (2002). Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivate in Argentina. *Plant Breeding*, **121**: 76-80.
- Gathmann, A., Tscharntke, T. (2002). Foraging ranges of solitary bees. *Journal of Animal Ecology*, **71**: 757-764.
- GBIF, Global Biodiversity Information Facility (2012). <http://data.gbif.org/species/5414457/commonName/common%20centaury>.
- Ge, G.-B., Zhang, Y.-Y., Hao, D.-C., Hu, Y., Luan, H.-W., Liu, X.-B., He, Y.-Q., Wang, Z.-T., Yang, L. (2008). Chemotaxonomic study of medicinal *Taxus* species with fingerprinting and multivariate analysis. *Planta Medica*, **74**: 773-779.

- Gilg, E. (1895). Gentianaceae. In: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* (Engler, A., Prantls, K., Eds.). Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany, pp: 50–108.
- Gillan, R., Cole, M.D., Linacre, A., Thorpe, J.W., Watson, N.D. (1995). Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study. *Science & Justice*, **35(3)**: 169-177.
- Gilpin, M.E., Soulé, M.E. (1986). Minimum viable populations: Processes of species extinction. In: *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity* (Soulé, M.E., Ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp: 19-34.
- Gorenflot, R., Hubac, J.M., Jay, M. (1984). Le complexe polyploïde du *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. dans la région méditerranéenne. *Webbia*, **38**: 715-721.
- Gourmet, C., Rayburn, A.L. (1996). Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes. *Heredity*, **77**: 240-244.
- Grieve, M. (1971). *A Modern herbal, vol. 1*. Dover Publications, New York, USA, p: 443.
- GRIN online database (2011). <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?320036>.
- Grisebach, A.H.R. (1839). *Genera et species Gentianearum adjectis observationibus quibusdam phytogeographicis*. J.G. Cotta, Stuttgart and Tubingen, Germany.
- Guggisberg, A., Bretagnolle, F., Mansion, G. (2006). Allopolyploid origin of the Mediterranean endemic, *Centaureum bianoris* (Gentianaceae), inferred by molecular markers. *Systematic Botany*, **31(2)**: 368-379.
- Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G.P., Naik, P.K., Chauhan, R.S., Tiwari, S.K., Kumar, M., Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for

comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology*, **7(23)**: 4230-4243.

Gustafsson, L., Gustafsson, P. (1994). Low genetic variation in Swedish populations of the rare species *Vicia pisiformis* (Fabaceae) revealed with RFLP (rDNA) and RAPD. *Plant Systematics and Evolution*, **189**: 133-148.

Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, **1**: 55-63.

Hair, J.R., Anderson, R.E., Tatham, R.L., Black, W.C. (1995). *Multivariate Data Analysis with Readings. 4th Edition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NY, USA.

Haldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.O., Hjerdin, A., Sall, T. (1996). Competition as a force of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **93** 1185-1192.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B., Lyoussi, B. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**: 465-472.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2009). PAST - PAleontological STatistics, ver. 1.89.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. (1989). Allozyme diversity in plant species. In: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S., Eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp: 43-63.

Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **351**: 1291-1298.

Handel, S.N. (1983). Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In: *Pollination Biology* (Real, L., Ed.). Academic Press, New York, USA, pp. 163-211.

- Haraštová-Sobotková, M., Jersáková, J., Kindlmann, P., Čurn, L. (2005). Morphometric and genetic divergence among populations of *Neotinea ustulata* (Orchidaceae) with different flowering phenologies. *Folia Geobotanica*, **40**: 385-405.
- Harris, S.A. (1995). Systematic and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Systematics and Evolution*, **197**: 197-208.
- Harris, S.A. (1999). RAPDs in systematics – a useful methodology? In: *Molecular Systematics and Plant Evolution* (Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J., Eds.). Taylor & Francis, London, UK, pp: 211-228.
- Hatjimanoli, M., Debelmas, A.M. (1977). Etude de *Centaureum umbellatum* Gil. Identification des acides phénols. *Annales Pharmaceutique Française*, **35**: 107-111.
- He, Y.P., Duan, Y.W., Liu, J.Q., Smith, W.K. (2005). Floral closure in response to temperature and pollination in *Gentiana straminea* Maxim. (Gentianaceae), an alpine perennial in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Plant Systematics and Evolution*, **256**: 17-33.
- Hegi, G. (1966). Gentianaceae. In: *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. Carl Hanser Verlag, Munich, Germany, pp. 1953–2047.
- Hendrick, P.W. (1987). Genetic load and the mating system in homosporous ferns. *Evolution*, **41**: 1282-1289.
- Henle, K., Davies, K.F., Kleyer, M., Margules, C., Settele, J. (2004). Predictors of species sensitivity to fragmentation. *Biodiversity and Conservation*, **13**: 207-251.
- Hensen, I., Oberprieler, C. (2005). Effects of population size on genetic diversity and seed production in the rare *Dictamnus albus* (Rutaceae) in central Germany. *Conservation Genetics*, **6**: 63-73.



- Hensen, I., Oberprieler, C., Wesche, K. (2005). Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora*, **200**: 3-14.
- Heun, M., Murphy, J.P., Phillips, T.D. (1994). A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationship among *Avena sterilis* L. accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 689-696.
- Hewitt, G.M. (1993). Postglacial distribution and species substructure: lessons from pollen, insects and hybrid zones. In: *Evolutionary Patterns and Processes* (Lees, D.R., Edwards, D., Eds.). Academic Press, London, UK, pp: 97-123.
- Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **59**: 247-276.
- Hofhanzlová, E., Fér, T. (2009). Genetic variation and reproduction strategy of *Gentiana pannonica* in different habitats. *Flora*, **204**: 99-110.
- Hollingsworth, P.M., Ennos, R.A. (2004). Neighbour-joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity*, **92**: 490-498.
- Hormaza, J.I., Dollo, L., Polito, V.S. (1994). Identification of RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulk segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**: 9-13.
- Hsiao, J.Y., Rieseberg, L.H. (1994). Population genetic structure of *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, **3**: 201-208.
- Hu, J., Vick, B.A. (2003). Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, **21**: 289-294.
- Hu, J., Ochoa, O.E., Truco, M.J., Vick, B.A. (2005). Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica*, **144**: 225-235.

- Hu, J., Mou, B., Vick, B.A. (2007). Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**: 1667-1674.
- Huntley, B., Birks, H.J.B. (1983). *An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Husband, B.C., Barrett, S.C.H. (1998). Spatial and temporal variation in population size of *Eichhornia paniculata* in ephemeral habitats: implications for metapopulation dynamics. *Journal of Ecology*, **86**: 1021-1031.
- Iezzoni, A.F., Pritts, M.P. (1991). Applications of principal component analysis to horticultural research. *HortScience*, **26**: 334-338.
- Inouye, H. (1970). Biosynthesis of iridorid-secoiridoid glucosides, In: *Pharmacognosy and Phytochemistry, 1st Int Congr Munich*. (Wagner, H., Horhammer, L., Eds.), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp: 290-313.
- Ipek, M., Ipek, A., Simon, P.W. (2003). Comparison of AFLPs, RAPD markers and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collection. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**: 246-252.
- Irmeler, S., Schröder, G., St-Pierre, B., Crouch, N.P., Hotze, M., Schmidt, J., Strack, D., Matern, U., Schröder, J. (2000). Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P459CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant Journal*, **28**: 201-208.
- IRVIPR (2000). *Report of the Inter Regional Workshop on Intellectual Property Rights in the Context of Traditional Medicine*, Bangkok, Thailand.
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Takagi, S., Ikeda, Y., Kawakami, K., Ito, K., Nose, T. (1998). Studies on iridoid-related compounds. V. Antitumor activity of iridoid derivatives-periodate oxidation products. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **11**: 131-136.

- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, **44**: 223–270.
- Janković, T., Krstić, D., Šavikin-Fodulović, K., Menković, N., Grubišić, D. (2002). Xanthones and secoiridoids from hairy root cultures of *Centaureum erythraea* and *C. pulchellum*, *Planta Medica*, **68(10)**: 944-946.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**: 424-429.
- Jennersten, O., Loman, J., Møller, A.P., Robertson, J., Widén, B. (1992). Conservation biology in agricultural habitats islands. In: *Conservation Biology by Ecological Principles* (Hansson, L., Ed.). Elsevier, London, UK, pp. 396-425.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., Kelley, S.T. (2005). Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, **6**: 13. v.3.22. <http://ibdws.sdsu.edu/>.
- Jensen, S.R., Nielsen, B.J., Dahlgren, R. (1975). Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in the Angiosperms. *Botaniska Notiser*, **128**: 148-180.
- Jensen, S.R., Schripsema, J. (2002). Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: *Gentianaceae – Systematics and Natural History* (Struwe, L., Albert, V., Eds.). Cambridge University Press, London, UK, pp: 573-631.
- Johns, M.A., Skroch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G., Muñoz-Schick, C. (1997). Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science*, **37**: 605-613.
- Joshi, K., Chavan, P., Warude, D., Patwardhan, B. (2004). Molecular markers in herbal drug technology. *Current Science*, **87**: 159-165.
- Jovanović, O., Radulović, N., Stojanović, G., Palić, R., Zlatković, B., Gudžić, B. (2009). Chemical composition of the essential oil of *Centaureum erythraea* Rafn (Gentianaceae) from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, **21**: 317-322.

- Joyee, T.A., Abberton, M.T., Michaelson-Yeates, T.P.T., Forster, J.W. (1999). Relationships between genetic distance measured by RAPD-PCR and heterosis in inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica*, **107**: 159-165.
- Kaouadji, M., Vaillant, I., Mariotte, A.-M. (1986). Polyoxygenated xanthenes from *Centaureum erythraea* roots. *Journal of Natural Products*, **49**: 359.
- Kapteyn, J., Goldsbrough, P.B., Simon, J.E. (2002). Genetic relationships and diversity of commercially relevant *Echinacea* species. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**: 369–376.
- Khan, M.A., von Witzke-Ehbrecht, S., Maass, B.L., Becker, H.C. (2009). Relationships among different geographical groups, agro-morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in safflower (*Carthamus tinctorius*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56**: 19-30.
- Kjølner, S., Såstad, S.M., Taberlet, P., Brochmann, C. (2004). Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology*, **13**: 81-86.
- Knight, T.M., Steets, J.A., Vamosi, J.C., Mazer, S.J., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mitchell, R.J., W.G., Ashman, T.L. (2005). Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**: 467-497.
- Kondo, Y., Takano, F., Hojo, H. (1994). Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice. *Planta Medica*, **60**: 414-416.
- Kong, Q., Li, X., Xiang, C., Wang, H., Song, J., Zhi, H. (2011). Genetic diversity of radish (*Raphanus sativus* L.) germplasm resources revealed by AFLP and RAPD markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, **29**: 217-223.
- Kültür, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **111**: 341-264.

- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Jaspars, M., Sarker, S.D. (2003a). Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine*, **10**: 344-347.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Sarker, S.D. (2003b). Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*, **74**: 151-154.
- Kwak, M.M., Velterop, O., Andel, J. (1998). Pollen and gene flow in fragmented habitats. *Applied Vegetation Science*, **1**: 37-54.
- Lacy, R.C. (1987). Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effect of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, **1**: 143-158.
- Landry, P.-A., Lapointe, F.-J. (1996). RAPD problems in phylogenetics. *Zoologica Scripta*, **25(4)**: 283-290.
- Lannér-Herrera, C., Gustafsson, M., Fält, A.-S., Bryngelsson, T. (1996). Diversity in natural populations of wild *Brassica oleracea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **43**: 13-23.
- Lapitan, N.L.V. (1992). Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome*, **35**: 171-181.
- Lattoo, S.K., Dhar, R.S., Khan, S., Bamora, S., Bhan, M.K., Dhar, A.K., Gupta, K.K. (2008). Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **55**: 33-43.
- Le Corre, V., Dumolin-Lapègue, S., Kremer, A. (1997). Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology*, **6**: 519-529.
- Ledig, F.T. (1986). Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. In: *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity* (Soulé, M.E., Ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp: 77-104.

- Levin, D.A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist* **122**: 1–25.
- Li, G., Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 455-461.
- Li, X., Yang, H., Liu, J. (2008). Genetic variation within and between populations of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae) revealed by RAPD markers. *Belgian Journal of Botany*, **141(1)**: 95-102.
- Liston, A., Robinson, W.A., Oliphant, J., Alvarez-Buylla, E.R. (1996). Length variation in the nuclear ribosomal internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. *Systematic Botany*, **21**: 109-120.
- Liu, B., Wendel, J.F. (2003). Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**: 365–379.
- Lloyd, D.G. (1992). Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, **153**: 370-380.
- Lovei, G.L., Macleod, A., Hickman, J.M. (1998). Dispersal and effects of barriers on the movement of the New Zealand hover fly *Melanostoma fasciatum* (Dipt., Syrphidae) on cultivated land. *Journal of Applied Entomology*, **122**: 115-120.
- Loveless, M.D., Hamrick, J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**: 65-95.
- Lübberstedt, T., Melchinger, A.E., Dußle, C., Vuylsteke, M., Kuiper, M. (2000). Relationships among early European maize inbreds: IV. genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD, and pedigree data. *Crop Science*, **40**: 783-791.

- Luijten, S.H., Oostermeijer, J.G.B., Ellis-Edam, A.C., den Nijs, J.(H.)C.M. (1999). Variable herkogamy and autofertility in marginal populations of *Gentianella germanica* in the Netherlands. *Folia Geobotanica*, **34**: 483-496.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**: 91-99.
- Lynch, M., Pfrender, M., Spitze, K., Lehman, N., Hicks, J., Allen, D., Latta, L., Ottene, M., Bogue, F., Colbourne, J. (1999). The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution*, **53**: 100-110.
- Mahroug, S., Burlat, V., St-Pierre, B. (2007). Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry Reviews*, **6**: 363-381.
- Mansion, G., Struwe, L. (2004). Generic delimitation and phylogenetic relationships within the subtribe Chironiinae (Chironieae: Gentianaceae), with special reference to *Centaurium*: evidence from nrDNA and cpDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**: 951-977.
- Mansion, G., Zeltner, L., Bretagnolle, F. (2005). Phylogenetic patterns and polyploid evolution within the Mediterranean genus *Centaurium* (Gentianaceae – Chironieae). *Taxon*, **54(4)**: 931-950.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27(2)**: 209-220.
- Mariette, S., Le Corre, V., Austerlitz, F., Kremer, A. (2002). Sampling within the genome form measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology*, **11**: 1145-1156.
- Марин, П. Д. (2003). Биохемијска и молекуларна систематика биљака. ННК Интернационал, Београд.
- Martín, C., González-Benito, M.E., Iriondo, J.M. (1999). The use of genetic markers in the identification and characterization of three recently discovered populations of a threatened plant species. *Molecular Ecology*, **8**: S31-S40.

- Martins, M., Enreiro, R.T., Oliveira, T. (2003). Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Plant Cell Reports*, **22**: 71-78.
- McKay, J.K., Latta, R.G. (2002). Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**: 285-291.
- Mehrnia, M., Zarre, S., Sokhan-Sanj, A. (2005). Intra- and inter-specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**: 149-158.
- Melderis, A. (1931). Genetical and taxonomical studies in the genus *Erythraea* Rich. *Acta Horti. Bot. Univ. Latviensis*, **6**: 123-256.
- Melderis, A. (1972). Taxonomic studies on the European species of the genus *Centaureum* Hill. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **65**: 224-250.
- Merila, J., Crnokrak, P. (2001). Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**: 892-903.
- Mészáros, S. (1994). Evolutionary significance of xanthones in Gentianaceae: a reappraisal. *Biochemical Systematics and Ecology*, **22**: 85-94.
- Mészáros, S., de Laet, J., Smets, E. (1996). Phylogeny of temperate Gentianaceae: a morphological approach. *Systematic Botany*, **21**, 153-168.
- Миланков, В. (2007). *Основе конзервационе биологије I*, ПМФ, Департман за биологију и екологију, Нови Сад
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, **43**: 1235-1248.
- Morgan, M.T., Wilson, G.M. (2005). Self-fertilization and the escape from pollen limitation in variable pollination environments. *Evolution*, **59**: 1143-1148.



- Mujaju, C., Sehic, J., Werlemark, G., Garkava-Gustavsson, L., Fatih, M., Nybom, H. (2010). Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. *Hereditas*, **147**: 142-153.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature*, **403**: 853-858.
- Nebauer, S.G., Del Castillo-Agudo, L., Segura, J. (1999). RAPD variation within and among natural population of outcrossing willow-leaved Foxglove (*Digitalis obscura* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **105**: 985-994.
- Nei, M., Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **76**: 5269-5273.
- Neshta, G.A., Nikolaeva, G.G., Sheichenko, V.I., Patoedin, A.V. (1982). A new xanthone compound from *Centaurium erythraea* III. *Himija Prirodnih Soedinenij*, **258**.
- Neshta, G.A., Savina, A.A., Patoedin, A.V. (1983). A new xanthone compound from *Centaurium erythraea* III. *Himija Prirodnih Soedinenij*, **787**.
- Neuffer, B. (1996). RAPD analyses in colonial and ancestral populations of *Capsella bursa-pastoris* (L.) Med. (Brassicaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**: 393-403.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (1996). *Herbal Medicines. A Guide For Health-Care Professionals*, The Pharmaceutical Press, London, UK, p: 67.
- Niiho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, Y., Yamamoto, T., Ando, H., Hirai, Y., Toriizuka, K., Ida, Y. (2006). Gastroprotective effects of bitter principles

isolated from gentian root and *Swertia* herb on experimentally-induced gastric lesions in rats. *Journal of Natural Medicines*, **60**: 82-88.

Nikolova-Damyanova, B., Handjieva, N. (1996). Quantitative determination of swertiamarin and gentiopicroside in *Centaureum erythrea* and *C. turcicum* by densitometry. *Phytochemical Analysis*, **7**: 140-142.

Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, **13(5)**: 1143-1155.

Nybom, H., Bartish, I.V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **3(2)**: 93-114.

Olesen, J.M., Jain, S.K. (1994). Fragmented plant populations and their lost interactions. In: *Conservation Genetics* (Loeschcke, V., Tomiuk, J., Jain, S.K., Eds.). Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp: 417-426.

Ornduff, R. (1969). Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon*, **18**: 121.

Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.-S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V., Martienssen, R.A. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, **19(3)**: 141-147.

Palumbo, R., Hong, W.-F., Wang, G.-L. (2007). Target region amplification polymorphism (TRAP) as a tool for detecting genetic variation in the genus *Pelargonium*, *HortScience*, **42(5)**: 1118-1123.

Panchen, A.L. (1992). *Classification, evolution and the nature of biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Pandey, S., Kumar, S., Mishra, U., Rai, A., Singh, M., Rai, M. (2008). Genetic diversity in Indian ash gourd (*Benincasa hispida*) accessions as revealed by quantitative traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, **118**: 80-86.

- PDR for Herbal Medicines (2000). Medical Economics Company, Inc. at Montvale, NJ, USA, pp: 174-175.
- Peakall, R., Smouse, P.E., Huff, D.R. (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactiloides*. *Molecular Ecology*, **4**: 135-147.
- Petrů, M. (2005). Year-to-year oscillations in demography of the strictly biennial *Pedicularis sylvatica* and effects of experimental disturbances. *Plant Ecology*, **181**: 289-298.
- Piątczak, E., Królicka, A., Wysokińska, H. (2011). Morphology, secoiridoid content and RAPD analysis of plants regenerated from callus of *Centaureum erythraea* Rafn. *Acta Biologica Cracoviensia*, **52(3)**: 79-86.
- Porcher, E., Lande, R. (2005). The evolution of self-fertilization and inbreeding under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 497-508.
- Possingham, H.P., Lindemayer, D.B., Norton, T.W. (1993). A framework for the improved management of threatened species based on Population Viability Analysis (PVA). *Pacific Conservation Biology*, **1**: 39-45.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, **25**: 345-353.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.
- Prevost, A., Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 107-112.
- Pringle, J. S. (1987). Proposal to reject the name *Centaureum minus* Moench (Gentianaceae). *Taxon*, **36**: 482-483.

- Pringle, J. S. (2010). The identity and nomenclature of the Pacific North American species *Zeltnera muhlenbergii* (Gentianaceae) and its distinction from *Centaurium tenuiflorum* and other species with which it has been confused, *Madroño*, **57(3)**: 184–202.
- Qiao, L., Liu, H., Sun, J., Zhao, F., Guo, B., Weng, M., Liu, T., Dai, J., Wang, B. (2007). Application of target region amplification polymorphism (TRAP) technique to *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) fingerprinting. *Phycologia*, **46(4)**: 450-455.
- Radušienė, J. (1995). Biological peculiarities and possibilities of introduction of *Centaurium erythraea* Rafn. *Biologija*, **3-4**: 55-57.
- Raijmann, L.E.L., Leeuwen, N., Kersten, R., Oostermeijer, J.G.B., Den Nijs, H.C.M., Menken, S.B.J. (1994). Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*, **8**: 1014-1026.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998). Pathways, mechanisms, and the rate of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **29**: 467–501.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**: 589–639.
- Ray, T., Roy, S.C. (2009). Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *Journal of Heredity*, **100(3)**: 338-347.
- Reed, D.H., Frankham, R. (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution*, **55**: 1095-1103.
- Richards, A.J. (1997). *Plant Breeding Systems*, 2<sup>nd</sup> edition. Chapman & Hall, London, UK.

- Ricketts, T.H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Bogdanski, A., Gemmill-Herren, B., Greenleaf, S.S., Klein, A.M., Mayfield, M.M., Morandin, L.A., Ochieng, A., Viana, B.F. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters*, **11**: 499-515.
- Rieseberg, L.H. (1996). Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, **5**: 99-105.
- Rind, D., Peteet, D. (1985). Terrestrial conditions at the last glacial maximum and CLIMAP sea-surface temperature estimates: are they consistent? *Quaternary Research*, **24**: 1-22.
- Robyns, A. (1954). Essai d'étude systématique et écologique des Centaurium de Belgique. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat a Bruxelles*, **24**: 349-398.
- Rodriguez, D.J. (1996). A model for the establishment of polyploidy in plants. *American Naturalist*, **147**: 33-46.
- Rodriguez, S., Wolfender, J.L., Hakizamungu, E., Hostettmann, K. (1995). An antifungal naphthoquinone, xanthenes and secoiridoids from *Swertia calycina*. *Planta Medica*, **61**: 362-364.
- Roelofs, D., Bachmann, K. (1995). Chloroplast and nuclear DNA variation among homozygous plants in a population of the autogamous annual *Microseris douglasii* (Asteraceae, Lactuceae), *Plant Systematics and Evolution*, **196**: 185-194.
- Rohlf, F.J. (2003). NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.11Q. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY, USA.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J.I., Gutiérrez, D.M. (2000). Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta Medica*, **66**: 765-767.

- Roldán-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J, Coll, R., van Eijk, M.J.T., De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, **6**: 593–602.
- Romesburg, H.C. (1984). *Cluster Analysis for Researchers*. Lifetime Learning Publications, Belmont, CA, USA.
- Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P., Vosman, B. (1994). Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, **37**: 375-381.
- Sangwan, N.S., Yadav, U., Sangwan, R.S. (2001). Molecular analysis of genetic diversity in elite Indian cultivars of essential oil trade types of aromatic grasses (*Cymbopogon* species). *Plant Cell Reports*, **20**: 437–444.
- Sarwat, M., Das, S., Srivastava, P.S. (2008). Comparison of AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers and analysis of genetic diversity in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant Cell Reports*, **27(3)**: 519-528.
- SAS Institute (2002). SAS/STAT, ver.9.00. SAS Institute Inc., Cary N.C.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T., Smith, W.A. (1998). Phylogenetic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, **7**: 465-475.
- Schaal, B.A., Olsen, K.M. (2000). Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 7024-7029.
- Schimmer, O., Mauthner, H. (1996). Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaureum erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. *Planta Medica*, **62**: 561-564.
- Schlag, E.M., McIntosh, M.S. (2012, in press). RAPD-based assessment of genetic relationships among and within American ginseng (*Panax quinquefolius*

L.) populations and their implications for a future conservation strategy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, DOI 10.1007/s10722-011-9784-4.

Schoen, D.J., Brown, A.H.D. (1991). Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating systems in plants. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, **88**: 4494-4497.

Schultz, V., Hänsel, R., Tyler, V.E. (2001). *Rational Phytotherapy – A Physician's Guide to Herbal Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Schwartz, H., Liu, B., Peters, S., Barillas, W., Beerhues, L. (2009). Purification, cDNA cloning and functional expression of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Centaureum erythraea* cell cultures. *Plant Biology*, **11(3)**: 300-306.

Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., Tahraoui, A., Lyoussi, B., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011). *Cenaturium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Journal of Ethnopharmacology*, **135**: 243-250.

Shan, F., Clarke, H.C., Plummer, J.A., Yan, G., Siddique, K.H.M. (2005). Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* characterized by amplified fragment length polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**: 381-391.

Shasany, A.K., Darokar, M.P., Dhawan, S., Gupta, A.K., Gupta, S., Shukla, A.K., Patra, N.K., Khanuja, S.P.S. (2005). Use of RAPD and AFLP markers to identify inter- and intraspecific hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*, **96(5)**: 542-549.

Sheorey, R.R., Tiwari, A. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of herbal materials and medicines – A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **70**: 319-326.

Simberloff, D. (1988). The contribution of population and community biology to conservation science. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **19**: 473-512.

Симоновић, А. (2011). Биотехнологија и генетичко инжењерство биљака. ННК Интернационал, Београд.

Singh, M., Chabane, K., Valkoun, J., Blake, T. (2006). Optimum sample size for estimating gene diversity in wild wheat using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 23-33.

Skorić, M., Šiler, B., Banjanac, T., Nestorović Živković, J., Dmitrović, S., Mišić, D., Grubišić, D. (2012). The reproducibility of RAPD profiles: Effects of PCR components on RAPD analysis of four *Centaureum* species. *Archives of Biological Sciences*, **64(1)**: 191-199.

Skroch, P., Nienhuis, J. (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic-distance. *Theoretical and Applied Genetics*, **91(6-7)**: 1086-1091.

Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographical structure of natural population. *Science*, **236**: 787-792.

Smith, J.J., Scott-Craig, J.S., Leadbetter, J.R., Bush, G.L., Roberts, D.L., Fulbright, D.W. (1994). Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**: 135-145.

Smouse, P.E., Long, J.C., Sokal, R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, **35**: 627-632.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1963). *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman & Co., San Francisco, CA, USA.

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973). *Numerical taxonomy*. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA.

Soltis, D.E., Soltis, P.S. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **12**: 243-273.



- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**: 7051–7057.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Tate, J.A. (2004). Advances in the study of polyploidy since *Plant Speciation*. *New Phytologist*, **161**: 173–191.
- Song, K., Lu, P., Tang, K., Osborn, T.C. (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**: 7719–7723.
- Springefeld, K. (2004). *Centaurium erythraea* – the medicinal plant of the year 2004. *Pharmaceutische Zeitung*, **149**: 30.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A.J., Gibby, M., Powell, W. (2003). How much effort is required to isolate microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, **12**: 1339–1348.
- Stebbins, G.L. (1985). Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, **72**: 824–832.
- Stöcklin, J. (1999). Differences in life history traits of related *Epilobium* species: clonality, seed size and seed number. *Folia Geobotanica and Phytotaxonomica*, **34**: 7–18.
- Struwe, L., Albert, V.A., Bremer, B. (1994). Cladistics and family level classification of the Gentianales. *Cladistics*, **10**: 175–206.
- Struwe, L., Kadereit, J.W., Klackenberg, J., Nilsson, S., Thiv, M., von Hagen, K.B., Albert, V.A. (2002). Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. In: *Gentianaceae— Systematics and Natural History* (Struwe, L., Albert, V.A., Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 21–309.
- Su, S., He, C.-M., Li, L.-C., Chen, J.-K., Zhou, T.-S. (2008). Genetic characterization and phytochemical analysis of wild and cultivated populations of *Scutellaria baicalensis*. *Chemistry & Biodiversity*, **5**: 1353–1363.

- Sun, M., Wong, K.C. (2001). Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany*, **88**(2): 2180-2188.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**: 199-203.
- Swenson, S.M., Allen, G.J., Howe, M., Elisens, W.J., Junak, S., Rieseberg, L.H. (1995). Genetic analysis of the endangered island endemic *Malacothamnus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *nesioticus* (Rob.) Kern. (Malvaceae). *Conservation Biology*, **9**: 404-415.
- Šiler, B., Mišić, D., Nestorović, J., Banjanac, T., Glamočlija, J., Soković, M., Ćirić, A. (2010). Antibacterial and antifungal screening of *Centaurium pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Natural Product Communications*, **5**: 1525–1530.
- Šiler, B., Avramov, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Patenković, A., Mišić, D., (2012). Seoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaurium erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. *Industrial Crops and Products*, **40c**: 336-344.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G., Cosson, J.-F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonisation routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**: 453-464.
- Tahraoui, A., Israili, Z.H., Lyoussi, B. (2010). Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **132**: 48-55.
- Takagi, S., Yamaki, M. (1982). Studies on the constituents of *Erythraea centaurium* (L.) Persoon, III. Isolation and structure of xanthones. *Yakugaku Zasshi*, **102**: 546-548.

- Talavera, S., Bastida, F., Ortiz, P.L., Arista, M. (2001). Pollinator attendance and reproductive success in *Cistus libanotis* L. (Cistaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **162**: 343-352.
- Teklewold, A., Becker, H.C. (2006). Geographic pattern of genetic diversity among 43 Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun) accessions as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 1173-1185.
- Templeton, A.R. (1986). Coadaptation and outbreeding depression. In: *Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity* (Soulé, M.E., Ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, pp: 105-116.
- Thompson, J. (1999). Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, **82**: 229-236.
- Thompson, J.D., Lumaret, R. (1992). The evolutionary dynamics of polyploid plants: origin, establishment, and persistence. *Trends in Ecology and Evolution*, **7**: 302-307.
- Thormann, C.E., Ferreira, M.E., Camargo, L.E.A., Tivang, J.G., Osborn, T.C. (1994). Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**: 973-980.
- Tollefsrud, M.M., Bachmann, K., Jakobsen, K.S., Brochmann, C. (1998). Glacial survival does not matter – II: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga cespitosa*. *Molecular Ecology*, **7**: 1217-1232.
- Travis, S.E., Maschinski, J., Keim, P. (1996). An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology*, **5**: 735-745.
- Trewick, S.A., Morgan-Richards, M., Russell, S.J., Henderson, S., Rumsey, F.J., Pintér, I., Barrett, J.A., Gibby, M., Vogel, J.C. (2002). Polyploidy,

phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, **11(10)**: 2003-2012.

Tyler, V.E. (1994). *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*. Howarth Press, New York/London/Norwood.

Tzedakis, P.C. (1993). Long-term tree populations in northwest Greece through multiple Quarternary climatic cycles. *Nature*, **364**: 437-440.

Ubsdell, R.A.E. (1976a). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles, 1. Taxonomy and biometrical studies. *Watsonia*, **11**: 7–31.

Ubsdell, R.A.E. (1976b). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn. and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles, 2. Cytology. *Watsonia*, **11**: 33–43.

Ubsdell, R.A.E. (1979). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles, 3. Breeding systems, floral biology and general discussion. *Watsonia*, **12**: 225-232.

Valentão, P., Areias, F., Amaral, J., Andrade, P., Seabra, R. (2000). Tetraoxygenated xanthenes from *Centaureum erythraea*. *Natural Product Letters*, **14**: 319-323.

Valentão, P., Andrade, P.B, Silva, E., Vicente, A., Santos, H., Bastos, M.L., Seabra, R.M. (2002). Metoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaureum erythraea*) flowering tops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 460-463.

van der Sluis, W.G., Labadie, R.P. (1981). Secoiridoids and xanthenes in the genus *Centaureum*. *Planta Medica*, **41**: 221-231.

van der Sluis, W.G. (1985). Chemotaxonomical investigations of the genera *Blackstonia* and *Centaureum* (*Gentianaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, **149**: 253-286.

- Van Hellemont, J. (1986). *Compendium de Phytothérapie*. Service Scientifique de l'APB, Bruxelles, Belgium, pp. 150-152.
- Van Rossum, F. (2009a). Pollen dispersal and genetic variation in an early-successional forest herb in a peri-urban forest. *Plant Biology*, **11**: 725-737.
- Van Rossum, F. (2009b). Succession stage variation in population size in an early-successional herb in a peri-urban forest. *Acta Oecologica*, **35**: 261-268.
- Van Treuren, R., Bijlsma, R., Van Delden, R.W., Ouborg, N.J. (1991). The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity*, **66**: 181-189.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R.V., Bhagyalakshmi, N. (2008). The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **47**: 974-985.
- Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A., Simon, J.E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 287-304.
- Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Newbury, H.J. (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, **74**: 170-179.
- Vogel, J.C., Rumsey, F.J., Schneller, J.J., Barrett, J.A., Gibby, M. (1999). Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society*, **66**: 23-37.
- Vucetich, J.A., Waite, T.A. (1999). Erosion of heterozygosity in fluctuating populations. *Conservation Biology*, **13**: 860-868.
- Waser, N.M. (1993). Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: *The Natural History of Inbreeding and*

- Outbreeding* (Thornhill, N.W., Ed.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, pp: 173-199.
- Waterman, P.G. (2005). Diversity in secondary metabolism in plants. In: *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plant* (Henry, R.J., Ed.), CAB International, Wallingford, UK, pp: 229-247.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1995). *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 7213-7218.
- Wen, X.P., Pang, X.M., Deng, X.X. (2004). Characterization of genetic relationships of *Rosa roxburghii* Tratt and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **79**: 189-196.
- Wendel, J.F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, **42**: 225-249.
- Wiley, E.O. (1981). *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetics and systematics*. John Wiley, New York, USA.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18(22)**: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, **218**: 704-740.
- Williams, C.F., Ruvinsky, J., Scott, P.E., Hews, D.K. (2001). Pollination, breeding system, and genetic structure in two sympatric *Delphinium* (Ranunculaceae) species. *American Journal of Botany*, **88**: 1623-1633.
- Wolfe, A.D., Liston, A. (1998). Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Molecular Systematics of Plants II*.

- DNA Sequencing* (Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts, USA, pp: 43-86.
- Wolff, K., Rogstad, S.H., Schaal, B.A. (1994). Population and species variation of minisatellite DNA in *Plantago*. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**: 733-740.
- Wratten, S.D., Bowie, M.H., Hickman, J.M., Evans, A.M., Sedcole, J.R., Tylianakis, J.M. (2003). Field boundaries as barriers to movement of hover flies (Diptera; Syrphidae) in cultivated land. *Oecologia*, **134**: 605-611.
- Wu, J., Krutovskii, K.V., Strauss, S.H. (2000). Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California closed-cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome*, **42**: 893-908.
- Xiao, Y., Liu, W., Lu, Y.-Y., Gong, W.-B., Bian, Y.-B. (2010). Applying target region amplification polymorphism markers for analyzing genetic diversity of *Lentinula edodes* in China. *Journal of Basic Microbiology*, **50**: 475-483.
- Yamamoto H., Katano, N., Ooi, A., Inoue, K. (2000). Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry*, **53**: 7-12.
- Yang, X., Quiros, C.F. (1995). Characterizing the celery genome with DNA-based genetic markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **120**: 747-751.
- Yildiz, M., Ekbic, E., Keles, D., Sensoy, S., Abak, K. (2011). Use of ISSR, SRAP, and RAPD markers to assess genetic diversity in Turkish melons. *Scientia Horticulturae*, **130**: 349-353.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A. (1999). Genetic structure of fragmented populations of the endangered daisy *Ruditosis leptorrhynchoides*. *Conservation Biology*, **13**: 256-265.

- Yu, K., Pauls, K.P. (1993). Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**: 788-794.
- Yuan, Y.-M., Küpfer, P. (1995). Molecular phylogenetics of the subtribe Gentianinae (Gentianaceae) inferred from the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution*, **196**: 206–226.
- Yuan, Y.-M., Wolhauser, S., Möller, M., Chassot, P., Mansion, G., Grant, J., Küpfer, P., Klackenberg, J. (2003). Monophyly and relationships of the tribe Exaceae (Gentianaceae) inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28**: 500–517.
- Yue, B., Cai, X., Vick, B.A., Hu, J. (2009). Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. *Crop Science*, **49**: 1242-1249.
- Zahuang, F.Y., Chen, J.F., Staub, J.E., Qian, T. (2004). Assessment of genetic relationships among *Cucumis* spp. by SSR and RAPD marker analysis. *Plant Breeding*, **123**: 167-172.
- Zeltner, L. (1970). Recherches de biosystématique sur les genres *Blackstonia* Huds. et *Centaurium* Hill (Gentianaceae). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Neuchâtel*, **93**: 1–164.



## Биографија аутора

Бранислав Т. Шилер рођен је 11. фебруара 1977. године у Земуну, а основну и средњу школу завршио је у Старој Пазови. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписао је школске 1995/1996. године на студијској групи Биологија. Факултет је завршио 2002. године са просечном оценом 8,72. Последипломске студије на смеру Физиологија биљака Биолошког факултета Универзитета у Београду уписао је 2004. године. Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у оквиру студијског програма Експериментална и примењена ботаника, уписао је школске 2006/2007. године.

Од новембра 2003. до фебруара 2005. године Бранислав Шилер је запослен као професор биологије у основној школи „Вера Мишчевић“ у Белегишу. Од фебруара 2005. године ради као истраживач приправник у Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“. У звање истраживач сарадник изабран је маја 2009. године. Бранислав Шилер је током истраживачког рада у периоду од 2005. до 2010. године учествовао у реализацији два национална пројекта Министарства за науку и технолошки развој Државне заједнице Србије и Црне Горе, односно, Републике Србије, као и једног пројекта Министарства заштите животне средине и једног пројекта Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије. Од 2011. године па до данас ангажован је на реализацији задатака два национална пројекта Министарства просвете и науке Републике Србије, као и једног међународног пројекта Европске комисије из групе FP7.

Добитник је награде за најбољи постер на међународном симпозијуму „*New Research in Biotechnology*“, 2009.

Бранислав Шилер је члан Европског друштва за биљну биологију (*FESPB*), Друштва за физиологију биљака Србије и Српског биолошког друштва.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Бранислав Шилер

број индекса ЕАобооюо

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фитохемијска и молекуларно-генетичка карактеризација популација

---

кочице (*Centaureum erythraea Rafn*) са Балканског полуострва

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 20.04.2012.

Бранислав Шилер

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранислав Шилер

Број индекса ЕАобоою

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада Фитохемијска и молекуларно-генетичка карактеризација  
популација кичице (*Centaurium erythraea Rafn*) са Балканског полуострва

Ментор Др Данијела Мишић

Потписани/а Бранислав Шилер

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 20.04.2012.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фитохемијска и молекуларно-генетичка карактеризација популација

кичице (*Centaurium erythraea Rafn*) са Балканског полуострва

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, \_\_\_\_\_ 20.04.2012. \_\_\_\_\_

*Братислав Шопер*

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.