



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I  
EKOLOGIJU



Goran Barać

**Evaluacija genetičke i fenotipske varijabilnosti  
i analiza strukture populacije stepske višnje  
(*Prunus fruticosa* Pall.)**

**- doktorska disertacija-**

**Novi Sad, 2016.**

*Mojoj majci...*

## **Zahvalnica**

*Prvenstveno veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Kseniji Gašić i prof. dr Mihajli Đan na izuzetnim savetima i sugestijama kojima su doprinele da ova disertacija dobije svoj konačan oblik. Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Vladislavu Ognjanovu, koji me je uveo u svet oplemenja voćaka, kao i na svim savetima i idejama koje su uticale na oblikovanje ovog rada. Takođe, zahvalnost dugujem i članovima komisije prof. dr Goranu Anačkovu i dr Nataši Kočiš-Tubić na komentarima i pomoći tokom finalne izrade disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem prof. dr Dragani Obreht-Vidaković na svim savetima, sugestijama i pomoći oko izrade ove disertacije, ali i tokom celog mog školovanja.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa Departmana za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, a posebno mojim najbližim saradnicima Dušici Dorić, Mirjani Ljubojević, Jovani Dulić i Maji Miodragović na pomoći i pozitivnoj radnoj atmosferi čime su mi olakšali i ispunili dosadašnji rad.*

*Veliku zahvalnost dugujem i svim kolegama iz Laboratorije za genetiku, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, među kojima posebno Maji Oberman na velikoj pomoći u toku eksperimentalnog dela rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr Miodragu Dimitrijeviću i prof. dr Sofiji Petrović u čijoj laboratoriji je sproveden veliki deo istraživanja.*

*Zahvalnost dugujem i Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na finansijskoj podršci izrade ove disertacije kroz finansiranje projekta TR31038 "Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje savremene tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede"*

*Na kraju, bezgraničnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na njihovoj podršci tokom čitavog školovanja.*

*Hvala.*

## Lista skraćenica korišćenih u tekstu

A - adenin

Ae - efektivni broj alela

AgNO<sub>3</sub> - srebro-nitrat

C - citozin

cM - Centimorgan (mera udaljenosti dva lokusa na hromozomu)

CTAB - Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide

dNTPs - deoxynucleotide triphosphates (deoksinukleotid trifosfati ili smeša slobodnih dinukleotida: dATP, dGTP, dCTP i dTTP)

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (etilen diamin tetra sirćetna kiselina)

EST - expressed-sequence tags (kratke DNK sekvence, od 200-500bp, dobijene sekvenciranjem klonova cDNK biblioteke)

EtBr - Ethidium bromide (etidijum-bromid)

FASTA – tekstualni format u kom su sekvence nukleotida ili peptida predstavljene jednim slovom

G - guanin

GBS - Genotyping By Sequencing (genotipizacija primenom sekvenciranja nove generacije)

GDR - Genome Database of Rosaceae (baza podataka genoma predstavnika familije *Rosaceae*)

GLM - General Linear Model (generalni linearni model za testiranje prisustva asocijacije između genotipa i fenotipa)

GPS - Global Positioning System (sistem za globalno pozicioniranje)

He - očekivana heterozigotnost

Ho - uočena heterozigotnost

IBPGR - The International Board for Plant Genetic Resources (međunarodna organizacija za očuvanje biljnih genetičkih resursa)

K - heterozigot guanin i timin

LD - Linkage Disequilibrium (pojava kada se dva alela iz različitih lokusa nalaze zajedno češće nego što je to očekivano na osnovu njihovih frekvencija)

MAB - Marker Assisted Backcrossing (povratna ukrštanja potpomognuta primenom molekularnih markera)

MAS - Marker Assisted Selection (selekcija potpomognuta primenom molekularnim markera)

MgCl<sub>2</sub> - magnezijum-hlorid

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - natrijum-karbonat

NaBH<sub>4</sub> - sodium borohydride

NaCl - Natrijum-hlorid

NaOH- natrijum-hidroksid

NGS - Next Generation Sequencing (sekvenciranje nove generacije)

No - broj alela

PAA - poliakrilamid gel elektroforeza

PCA - Principal Component Analysis (analiza glavnih komponenti)

PCR - Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)

PIC - Polymorphic Information Content (mera nivoa polimorfizma)

PVP - Polyvinyl-pyrrolidone

QTL - Quantitative Trait Loci (lokusi odgovorni za kvantitativna svojstva)

R - heterozigot guanin i adenin

RNase - Ribonukleaza (tip nukleaze koji katališe razgradnju RNK)

rpm - Revolutions per minute (obrtaja u minuti)

S - heterozigot guanin i citozin

SNP - Single Nucleotide Polymorphism (polimorfizam u jednoj bazi unutar DNK sekvence)

T - timin

TDT - transmission/disequilibrium test (test koji koristi roditeljske parove kako bi se umanjio uticaj populacione struktuiranosti na asocijativnu analizu)

TEMED - tetra-methyl-ethylene-diamine

Tris - Trizma base

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (hijerarhijska klaster metoda na osnovu srednjih vrednosti)

UPOV - International Union for the Protection of New Varieties of Plants (međunarodna organizacija za analizu novih sorti biljaka)

UTR - Untranslated region (regioni sa obe strane kodirajuće DNK sekvence koji kontrolišu proces translacije)

W - heterozigot adenin i timin

Y - heterozigot timin i citozin

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
	2.1. Karakteristike i rasprostanjenje predstavnika sekcije <i>Eurocerasus</i> roda <i>Prunus</i> .....	3
	2.2. Značaj vrste <i>Prunus fruticosa</i> u oplemenjivanju .....	7
	2.3. Primena genetičkih markera u proučavanju diverziteta i u oplemenjivanju vrsta sekcije <i>Eurocerasus</i> .....	11
	2.4. Mikrosateliti i SNP kao molekularni marke .....	12
	2.5. Inter- i intra-specijski diverzitet unutar <i>Eurocerasus</i> sekcije .....	20
	2.6. Genetička osnova autoinkompatibilnosti .....	25
	2.7. Asocijativno mapiranje .....	26
<b>3.</b>	<b>CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>RADNA HIPOTEZA</b> .....	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>32</b>
	5.1. Materijal .....	32
	5.2. Metode .....	35
	5.2.1. Analiza fenotipskih podataka .....	35
	5.2.2. Izolacija DNK .....	35
	5.2.3. Poreklo i opis prajmera korišćenih u analizi varijabilnosti SSR lokusa .....	37
	5.2.4. Amplifikacija SSR lokusa .....	37
	5.2.5. Detekcija i analiza varijabilnosti produkata PCR reakcije .....	42
	5.2.5.1. Detekcija produkata PCR reakcije .....	42
	5.2.5.2. Analiza varijabilnosti produkata PCR reakcije .....	42
	5.2.5.3. Identifikacija alela za S-RNazu .....	43
	5.2.6. Identifikacija SNP markera Genotyping by Sequencing (GBS) metodom .....	44
	5.2.7. Obrada podataka .....	44
	5.2.7.1. Procena diverziteta na osnovu fenotipskih podataka .....	44
	5.2.7.2. Procena varijabilnosti na osnovu podataka dobijenih analizom SSR markera .....	45
	5.2.7.3. Procena varijabilnosti na osnovu podataka dobijenih analizom SNP markera .....	47
<b>6.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>48</b>
	6.1. Fenotipski diverzitet .....	48
	6.2. Genetička varijabilnost populacija stepske višnje na osnovu SSR markera .....	57
	6.3. Analiza genetičke strukture populacija stepske višnje .....	60
	6.4. Genetička varijabilnost i analiza strukture populacija stepske višnje primenom SNP markera .....	68
	6.5. Asocijativna analiza genoma stepske višnje .....	75
<b>7.</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>78</b>
	7.1. Fenotipska varijabilnost populacija stepske višnje .....	78

7.2. Genetička varijabilnost i struktura populacija stepske višnje primenom SSR markera .....	81
7.3. Genetička varijabilnost i struktura populacija stepske višnje primenom SNP markera .....	88
7.4. Asocijativna analiza fenotipskih karakteristika i SNP markera .....	93
<b>8. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>95</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>97</b>
Prilog 1 .....	111
Prilog 2 .....	113
Prilog 3 .....	115
Prilog 4 .....	126



## 1. UVOD

Najveći izazovi u svetskoj proizvodnji zdrave i bezbedne hrane danas su sve veća potražnja za prehrambenim proizvodima i veliki abiotički stres sa kojim se susreću usevi svih vrsta usled naglašenih klimatskih promena. Divlji srodnici vrsta koje se intenzivno gaje u poljoprivrednoj proizvodnji mogu poslužiti kao izvor genetičkog materijala, sa potencijalnom upotrebom u stvaranju novih sorti i hibrida (Redden i sar., 20015).

Trešnja i višnja su među najvažnijim voćnim vrstama i njihova proizvodnja u svetu ima stalni trend porasta u poslednje dve decenije (Dirlewanger i sar., 2007). Povećanje proizvodnje na globalnom nivou je posledica povećanja površine pod zasadima ove dve voćne vrste, ali i upotrebe novog sortimenta u istim (Dirlewanger i sar., 2007; Kappel i sar., 2012).

Stepska višnja (*Prunus fruticosa* Pall.) je autotetraploidna vrsta (FFFF,  $2n = 4x = 32$ ) koja se prema taksonomskom položaju svrstava u familiju Rosaceae, rod *Prunus*. Ova vrsta pripada sekciji *Eurocerasus* u koju se pored nje ubrajaju još i trešnja (*P. avium* L.) i višnja (*P. cerasus* L.). Stepska višnja i trešnja su među najranijim derivatima roda *Prunus*, dok je višnja nastala kroz proces prirodne hibridizacije između ove dve vrste nekoliko puta u toku istorije (Iezzoni, 2005; Dirlewanger i sar., 2007).

Stepska višnja pokazuje određene nivoe otpornosti prema različitim tipovima biotičkog i abiotičkog stresa. Ovo je od velikog značaja i ima veliki potencijal u oplemenjivačkom radu gde se kroz međuvrsnu hibridizaciju mogu uvesti nove važne karakteristike koje su izgubljene u procesu stvaranja savremenih sorti (Olden i Nybom, 1968; Mišić, 2002).

Utvrđivanje nivoa diverziteta među biljnim materijalom koji se koristi u oplemenjivačkom radu je od izuzetne važnosti za unapređenje bilo koje biljne vrste i od velike pomoći prilikom izbora roditeljskih parova (Becelaere i sar., 2005). Jedan od prvih koraka u istraživanju nivoa diverziteta jeste morfološka karakterizacija germplazme (Rakonjac i sar., 2014). Morfološke karakteristike su u većini slučajeva veoma jednostavne za praćenje i analizu, i iako mogu poslužiti kao markeri u selekciji imaju veliki broj ograničavajućih faktora među kojima je najznačajni taj, da se nalaze pod stalnim uticajem

spoljašnje sredine (Tanklsey, 1986). Nasuprot ovom tipu markera nalaze se molekularni markeri kojima se detektuju razlike na nivou DNK i kao takvi se ne nalaze pod uticajem spoljašnje sredine u kojoj se biljka razvija i raste (Mohan i sar., 1997).

Mikrosateliti (Simple Sequence Repeats, SSR) su jedan od načešće i najšire primenjivanih molekularnih markera, a predstavljaju i marker izbora za veliki broj različitih analiza kod biljaka, usled velikog stepena varijabilnosti i ravnomerne distribucije duž celog genoma. Primenuju se u gotovo svim etapama oplemenjivačkog rada počevši od procene nivoa diverziteta početnog materijala do identifikovanja lokusa odgovornih za kvantitativna svojstva (Quantitative Trait Loci, QTL) i primene prilikom selekcije superiornog materijala kroz marker asistiranu selekciju (Marker Assisted Selection, MAS) (Kalia i sar., 2011). Napretkom tehnologije u poslednjih nekoliko decenija ostvaren je i veliki napredak na polju sekvenciranja genoma čime je omogućena identifikacija velikog broja tačkastih mutacija odnosno pozicija u genomu koji u sebi nose različite baze. Ovaj tip molekularnih markera naziva se polimorfizam u jednom nukleotidu (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), i poput mikrosatelita imaju najširu moguću primenu u genetičkim istraživanjima (Liu, 2008).

Istraživanja diverziteta u okviru sekcije *Eurocerasus* na fenotipskom i genotipskom nivou u svetu zasnovana su na istraživanjima ekonomski važnih vrsta (*Prunus avium* i *P. cerasus*) (Cantini i sar., 2001; Dirlewanger i sar., 2002; Schueler i sar., 2002; Wunsch i Hormaza, 2002; Kacar i sar., 2006; Laci i sar., 2009; Xuan i sar., 2009; Ganopoulos i sar., 2010; Antonius i sar., 2012) Istraživanja stepena različitosti unutar ovih vrsta na teritoriji Srbije pre svega su se ogledala u analizi morfoloških odlika trešnje i višnje (Rakonjac i sar., 2010; Radičević i sar., 2012; Miodragović i sar., 2014; Rakonjac i sar., 2014). Prva sveobuhvatnija istraživanja diverziteta stepske višnje, kod nas i u svetu, na bazi morfoloških karakteristika objavljena su od strane Ognjanov i saradnika (2012), dok su prva istraživanja na nivou DNK sve tri vrste sekcije *Eurocerasus* objavili Barać i saradnici (2014). Ova istraživanja su pokazala visok stepen varijabilnosti i potrebu da se detaljnije ispituju ove vrste, a pre svega stepska višnja koja do sada gotovo nije bila predmet detaljnijih istraživanja.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Karakteristike i rasprostanjenje predstavnika sekcije *Eurocerasus* roda *Prunus*

Rod *Prunus* je sačinjen od približno 200 vrsta, uključujući neke od ekonomski najvažnijih poput: trešnje, višnje, breskve, kajsije, šljive i badema koje jednim imenom nazivamo koštičave voćne vrste. Pored navedenih u ovaj rod se ubrajaju i neke ornamentalne vrste kao i one koje se gaje zbog kvaliteta drveta ili u medicinske svrhe. Predstavnici roda *Prunus* su listopadno ili zimzeleno drveće ili žbunovi. Listovi su prosti sa nazubljenim ili celim ivicama i imaju lisne zaliske koji brzo opadaju. Gotovo sve vrste imaju lisne žlezde čija morfoligija znatno varira, dok sama njihova funkcija još uvek nije razjašnjena. Cvetovi mogu biti pojedinačni ili grupisani u štitaste ili racemozne cvasti. Cvet je radijalno simetričan, a građen je od po pet čašičnih i kruničnih listića čija boja varira od bele do crvene. Reproductivni sistem je sačinjen od 15 ili više prašnika i jednog nadcvetnog plodnika građenog od jedne sredcvetne karpela. Plod je koštunica (Potter, 2011).

Vrste koje pripadaju rodu *Prunus* su rasprostranjene na severnoj hemisferi. Većina vrsta nastanjuje delimično aridna staništa, dok su vrste koje se komercijalno gaje rasprostranjene u različitim klimatskim zonama. Taksonomija roda *Prunus* je dosta komplikovana zbog visokog polimorfizma i usled visoke tolerantnosti na različite ekološke uslove (Donmez i Yildirimli, 2000). Nedostatak znanja o nivou diverziteta je posebno izražen kod divljih predstavnika roda, istovremeno dosta nepoznanica postoji i u okviru evolutivnih odnosa unutar roda. Značaj divljih srodnika je od izuzetne važnosti u oplemenjivačkim programima kao neiscrpan izvor genetičkog diverziteta. Poznavanje nivoa diverziteta može ukazati na potrebu da se neke od vrsta ili populacija zaštite u svom prirodnom okruženju (*in situ*) u okviru različitih konzervacionih projekata (Hanelt, 1997).

Opšte prihvaćen sistem taksonomije roda *Prunus*, stepsku višnju uključuje u sekciju *Eurocerasus* zajedno sa vrstama koje se gaje zbog ploda, a to su trešnja (*Prunus avium* L.) i višnja (*P. cerasus* L.). Sekcija *Eurocerasus* je deo podroda *Cerasus* koji je svrstan u rod *Prunus* i familiju Rosaceae (Iezzoni A, 2005; Dirlewanger i sar., 2007).

Stepska višnja (*Prunus fruticosa* Pall., *Cerasus fruticosa* (Pall.) Woronow) je žbunasta vrsta visine od 0,2 do 2 metra. Na kori stabla se nalaze lanticele žute boje, jednogodišnje grane su sive boje dok su višegodišnje tamno smeđe. Oblik lista je jajast, eliptičan ili široko lancetast, boja lica lista je svetlo do tamno zelena, sjajna bez prisustva malja. Naličje lista je svetlo zelene boje. Ugao vrha lista može biti oštar ili tup, a oblik osnove je klinast sa testerastim tipom nazubljenosti duž ivice lista. Listovi na dugim izdancima (dugorastima) su dužine od 3 do 6 cm, dok su na kratkim izdancima (kratkorastima) nešto kraći (1,5 do 3 cm). Pupoljci stepske višnje su jajasti ili izduženo jajasti, veličine od 2 do 4 milimetra, odstojeći, sa smeđim ljuspama. Cvetovi su bele boje i u grupama od dva do četiri grade sedeću štitastu cvast. Cveti u aprilu i maju, a sazreva u julu. Plod je koštunica, svetlo do tamno crvene boje, a veličina varira od 7 do 10 milimetara u prečniku, težine od 1 do 3 grama i kiselo-oporog su ukusa. Koštica je sitna, elipsoidna ili jajasta, zašiljena sa obe strane. Meso ploda je potpuno ili delimično sraslo za košticu (Tutin i sar., 1968; Jovanović, 1972; Mišić, 2002; Dzhangaliev i sar., 2003; Janick i Paull, 2008).

Autohtoni areal stepske višnje obuhvata: Apeninsko poluostrvo, Centralnu i Istočnu Evropu, Balkansko poluostrvo, Kavkaz, Zapadni Sibir kao i Centralnu i Severnu Aziju (Hedrick, 1915). Na teritoriji Srbije javlja kao deo žbunaste stepske klimazonalne vegetacije, kao i na obodima šuma termofilnijeg karaktera i na osunčanim padinama. Raste u vidu žive ograde ili kao mali žbun na površinama napuštenih vinograda koji se nalaze na Jelašnici, Sićevu i Fruškoj gori (Mratinić i Kojić, 1998).

Višnja (*Prunus cerasus* L., *Cerasus vulgaris* Mill.) ima stablo visine do 6 metara sa gustom krunom loptastog oblika. Listovi su jajastog, obrnuto jajastog ili eliptičnog oblika, dužine od 5 do 7cm i širine od 3 do 5 cm sa oštrim uglom vrha lista. Cvetovi su beli, od 2 do 4 grade štitastu cvast. Cveti u aprilu ili maju, pre listanja. Plod je koštunica, loptastog ili spljošteno-loptastog oblika. Pokožica ploda je crvena, a meso svetlocrveno do tamnocrveno. Sok je bezbojan ili crveno obojen, kiselog ukusa. Koštica je loptastog oblika sa izraženim šavom i teško se odvaja od mesa ploda. Plodovi sazrevaju u junu ili julu. Ova vrsta se ne nalazi u nativnoj flori već samo kao gajena biljka duž Zapadne Azije i Evrope, ali se često ova vrsta nalazi i subsponatano, odnosno kao vrsta koja se iz urbanih delova

subspontanpo uključuje u pojedie, najčešće semiurbane vegetacijske jedinice (Mišić, 2002; Milatović, 2011).

Trešnja (*Prunus avium* L., *Cearsus avium* (L.) Moench) raste kao visoko i snažno drvo koje dostiže visinu od 20 do 35 metara sa prečnikom debla od 50 do 70 cm. Kruna je piramidalnog ili široko piramidalnog oblika. Kora debla mladih biljaka je glatka sa izraženim horizontalnim lenticelama, koje sa starenjem biljke dobijaju tamno smeđu boju i ispucaju. Grančice su gole, žuto ili crvenosmeđe boje. Pupoljci su jajasti, dugi od 4 do 7 mm, prekriveni tamno smeđim ljuspama. Ugao vrha lista je oštar, dok je oblik osnove klinast ili okrugao. Listovi su eliptičnog ili jajastog oblika, dužine od 7 do 15cm i širine 4-7cm. Obod lista je dvostruko testerasto nazubljen. Štitasta cvast je građena od 2 do 6 cvetova. Cvetu u aprilu i maju. Plod je koštunica koja je kod divljih formi sitna 10-15 mm u prečniku, žute, crvene ili crne boje. Meso ploda je sočno, slatkog i ponekad pomalo gorkog ukusa. Sazreva u junu ili julu (Mišić, 2002; Milatović, 2011).

Divlja trešnja ima širok areal koje se prostire od severnih delova Španije preko klimatski umerenih delova Evrope do severoistočnih delova Rusije (Hedrick i sar., 1915). Kod nas se nalazi u šumama bukve, hrasta i graba na visini do 1300 metara nadmorske visine, na Fruškoj gori, Tari, Zlatiboru, Zlataru, Kopaoniku, Avali, Kosmaju, Rudniku, Staroj i Suvoj planini, ali i ostalim planinskim sistemima u Srbiji (Mratinić i Kojić, 1998).

Osnovni broj hromozoma kod predstavnika podroda *Cerasus* je osam ( $n=8$ ) (Hanelt, 1997). Vrsta *Prunus avium* je diploidna vrsta ( $AA, 2n = 2x = 16$ ) sa veličinom haploidnog genoma od 338Mb. Vrsta *P. fruticosa* je autotetraploidna vrsta ( $FFFF, 2n = 4x = 32$ ), a veličina genoma je još uvek nepoznata. Višnja (*P. cerasus*) je alotetraploid ( $2n = 4x = 32$ ) i nastala je prirodnom hibridizacijom između stepske višnje i trešnje sa neredukovanim brojem hromozoma u gametama ( $AAFF$ ) (Dirlewanger i sar., 2007).

Prve rezultate na potvrđivanju teorije hibridnog porekla višnje izneli su Olden i Nybom (1968) koji ističu da se ova vrsta najpre pojavila u oblasti Centralne Azije, Balkana i u donjem delu toka Dunava. Ovo područje, gde se višnja može naći u divljoj formi, se podudara sa teritorijom na kojoj se rasprostiru stepska višnja i trešnja. Isti autori su sproveli i niz test ukrštanja između *Prunus fruticosa* i sorte trešnje Bigerau de Schrecken, kao i sejanca divlje trešnje sa indukovanom poliploidijom. Hibridne jedinice nastale

ukrštanjem stepske višnje sa diploidnom sortom trešnje su imale triploidan broj hromozoma, a fenotipski su bile bliže *P. fruticosa* što je i očekivano ako se uzme u obzir da dve trećine genoma vodi poreklo od ove vrste. Ukrštanjem stepske višnje sa tetraploidnim sejancem trešnje nastale su tetraploidne jedinke čije su fenotipske karakteristike bile između dve roditeljske vrste, a veoma liče i gotovo su identične *P. cerasus*. U okviru istog istraživanja sprovedena je analiza sastava antocijanina i fenolnih jedinjenja u listu. Tom prilikom dobijeni su isti rezultati kao i za fenotipska istraživanja, odnosno međuvrsni hibridi *P. fruticosa* i tetraploidne *P. avium* dali su iste rezultate kao i uzorci *P. cerasus*.

Analiza sedam izozimskih sistema na tri prethodno navedene vrste pokazala je da trešnja i stepska višnja imaju veliki broj zajedničkih alela. Istovremeno, rezultati sprovedene analize glavnih komponenti (PCA) nisu pokazali jasniju različitost u tipu varijabilnosti analiziranih osobina kod uzoraka višnje i stepske višnje. Ovi podaci ukazuju na postojanje zajedničkog genskog seta kod ovih vrsta. Analiza međuvrsnih hibrida je podržala hipotezu o hibridnom poreklu *P. cerasus* (Beaver i sar., 1995).

Rezultati analiza markera hloroplasne DNK (cpDNK) ukazuju na postojanje dva haplotipa kod višnje čime se ukazuje na činjenicu da se spontana hibridizacija između roditeljski vrsta odigrala više puta u toku istorije. U većini slučajeva cpDNK *P. cerasus* vodi poreklo od *P. fruticosa*, te se obzirom na uniparentalni način nasleđivanja može zaključiti da je stepska višnja ženski roditelj u hibridnoj kombinaciji sa trešnjom. Sa druge strane, identifikovano je i nekoliko genotipova višnje čija cpDNK vodi poreklo od *P. avium* (Brettini i sar., 2000).

Da bi se rasvetlio odnos pomenutih vrsta stvoren je i međuvrsni hibrid *P. × gondouinii* Redh (*P. acida* Dum, *Cerasus regalis*, *P. avium* ssp. *regalis*) koji je alotetraploid nastao oprašivanjem *P. cerasus* sa neredukovanim gametima *P. avium* ( $2n = 4x = 32$ , AAAF). Ovaj hibrid je u najvećem broju slučajeva sterilan usled poremećaja u mejozi, ali se vegetativno umnožava od strane čoveka. Karakteristike vegetativnih i generativnih organa ove hibridne vrste se nalaze između karakteristika njenih roditelja (Iezzoni i sar., 1990; Tavaud i sar., 2004; Perez i sar., 2004).

Prethodno navedeni podaci ukazuju na međusobne odnose u *Eurocerasus* kladi iz kojih se može doći do zaključka da je međusobnom hibridizacijom predstavnika ove klade moguće povećati genetički diverzitet. Osim toga, obzirom na pretpostavku da je *P. fruticosa* jedan od roditelja vrste *P. cerasus*, poznavanje bioloških karakteristika i diverziteta stepske višnje može unaprediti primenu ove vrste u oplemenjivanju. Stepska višnja može biti potencijalni izvor otpornosti na različite tipove biotičkog i abiotičkog stresa. Ovo je od velikog značaja i ima veliki potencijal zbog uvođenja novih važnih karakteristika koje su izgubljene u procesu stvaranja savremenih sorti. Jedna od takvih karakteristika je i otpornost koju stepska višnja pokazuje prema suši (Mišić, 2002), što je od posebnog značaja u poslednjih nekoliko godina u kojima su sve izraženije globalne klimatske promene.

## **2.2. Značaj vrste *Prunus fruticosa* u oplemenjivanju**

Proizvodnja trešnje i višnje u svetu ima kontinuiranu uzlaznu putanju od 1993. godine, a u 2012. godini je dostigla 2.256.519 tona. Zemlje sa najvećom proizvodnjom ovih poljoprivrednih kultura su: Turska, Sjedinjene Američke Države, Iran, Italija i Španija (FAO, 2012). Najveći procenat svetske proizvodnje lociran je u Evropi i Severnoj Americi, međutim, poslednjih godina XX veka značajno je povećana proizvodnja na Južnoj hemisferi, pre svega u Čileu i Argentini gde su površine pod ovim voćnim vrstama učtvarostručene. Ovo povećanje proizvodnje dobrim delom je potpomognuto novim sortama koje su nastale u oplemenjivačkim programima širom sveta (Dirlewanger i sar., 2007; Kappel i sar., 2012).

Procenat obradivih površina u svetu je u stalnom opadanju pod pritiskom ljudske delatnosti i usled globalnih klimatskih promena. Usled ovih činjenica, kao i stalne evolucije patogena i drugih štetočina postoji stalna potreba za stvaranjem novih sorti koje će imati dobar kvalitet ploda i prinos u promenljivim uslovima spoljašnje sredine, a da istovremeno budu otporne na različite bolesti. Takođe, pored sorti neophodne su i nove podloge koje će omogućiti sadnju većeg broja jedinki po jedinici površine, a da pri tome ne dolazi do smanjenja prinosa (Radović i Kozomara, 2011).

Oplemenjivanje svih voćnih vrsta se bazira na oplemenjivanju podloga i sorti voćaka. Najvažniji ciljevi u oplemenjivanju i stvaranju novih sorti trešnje i višnje su stabilan prinos, visok kvalitet ploda, samooplodnost, produženje perioda sazrevanja, otpornost na patogene (*Pseudomonas*, *Blumeriella* i dr.) i stres izazvan promenljivim uslovima spoljašnje sredine (Dirlewanger i sar., 2007; Milatović, 2011, Kappel i sar., 2012). Kada je reč o stvaranju novih podloga može se govoriti o dve grupe svojstava na koje se mora obratiti pažnja, a to su: svojstva koja su regulisana genotipom podloge i svojstva koja nastaju kao posledica interakcije podloge i plemke. Ciljevi oplemenjivanja podloga se odnose na smanjenje stepena bujnosti, rano stupanje okalemljene sorte u rod, kompatibilnost sa različitim sortama, vegetativni način razmnožavanja, adaptiranost na različite tipove zemljišta, i otpornost na bolesti i štetočine (Perry, 1987; Kappel i sar., 2012).

Najveći stepen diverziteta višnja ispoljava na teritoriji Evrope i to u predelima oko Kaspijskog, Crnog i Jadranskog mora (Hedrick, 1915; Iezzoni, 1984). Na ovom području prirodno rasprostiranje višnje se preklapa sa područjima rasprostiranja trešnje i stepske višnje, a protok gena između ovih vrsta se smatra glavnim činiocem u kreiranju visokog nivoa raznolikosti (Hilling i Iezzoni, 1989). Ovakav nivo raznolikosti unutar višnje pruža mnogo mogućnosti oplemenjivačima da stvaraju nove sorte sa različitim vegetativnim i generativnim karakteristikama (Krahl i sar., 1991).

Primenom konvencionalnog oplemenjivanja u svetu, stvoren je veliki broj sorti višnje koje se gaje u određenoj meri i u Srbiji [*Érdi bőtermő* (Mađarska), *Újfehértói Fürtös* (Mađarska), *Montmorency* (Francuska), *Kelleriis 14* (Danska), *Schattenmorelle* (Francuska), *Meteor Korai* (Mađarska)]. Oplemenjivački program na stvaranju sorti trešnje i višnje kod nas se sprovodi pre svega na Institutu za voćarstvo u Čačku i u manjoj meri na poljoprivrednim fakultetima, Univerziteta u Beogradu i Novom Sadu. Sorte koje su stvorene u Srbiji su: *Čačanski Rubin* (*Shaze Morello* × *Köröser Weichsel*) i *Šumadinka* (*Köröser Weichsel* × *Heiman's Konservenweichsel*) (Radičević i sar., 2010). Pored sorti nastalih planskom hibridizacijom postoje i stare sorte poput *Majurke*, *Futoške* i *Fruškogorske višnje*. Selekcijom iz populacije u selu Feketić odabrano je devet genotipova sa različitim karakteristikama, a jedan od ovih genotipova *Feketičke višnje* je 2013. godine



priznat od strane Komisije za priznavanje sorti Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede i uvršten je na sortnu listu pod nazivom *Prima*.

U oplemenjivanju podloga *P. cerasus* ima značajno mesto, međutim jedan od velikih nedostataka ove vrste kao podloge je stvaranje velikog broja izdanaka i inkompatibilnost sa pojedinim sortama (Kappel i sar., 2012). Ovi problemi su prevaziđeni stvaranjem međuvrtnih hibrida. Hibridizacijom *P. cerasus* i *P. canescens* stvoreno je nekoliko podloga sa slabom do umerenom bujnošću GiSelA<sup>®</sup> 3, GiSelA<sup>®</sup> 5, GiSelA<sup>®</sup> 6, GiSelA<sup>®</sup> 7 (Gruppe, 1985).

Jedan od najvažnijih resursa u oplemenjivanju višnje u Srbiji predstavlja Oblačinska višnja koja je autohtona, heterogena i najviše se gaji (Rakonjac i sar., 2010). Oblačinska višnja je lokalna sorta ili skup lokalnih populacija koja se odlikuje visokim stepenom diverziteta koji se javlja kao posledica heterozigotnosti, autokompatibilnosti i oprašivanja od strane srodnih sorti. Nivo diverziteta se održava tako što se prilikom vegetativnog umnožavanja pojedini izdanci pomešaju sa spontanim sejancima i kao takvi distribuiraju proizvođačima (Ljubojević i sar., 2011; Ognjanov i sar., 2012). Oplemenjivačke aktivnosti kod Oblačinske višnje su se uglavnom odnosile na selekciju iz prirodnih populacija sa ciljem dobijanja kvalitetnog ploda potrebnog za prerađivačku industriju (Nikolić i sar., 1996; Ogašanić i sar., 1996; Rakonjac i sar., 2010).

Odabirom iz prirodnih populacija trešnje iz oblasti njenog porekla stvoren je određeni broj sorti koje su kasnijom međusobnom hibridizacijom i daljom selekcijom dale sadašnje sorte trešnje (Iezzoni i sar., 1991). Rad na oplemenjivanju trešnje u svetu intenziviran je od druge polovine 20. veka. Metode planske hibridizacije, inbridinga i indukovanih mutacija dovele su do stvaranja velikog broja novih sorti trešnje (Mišić, 2002). Sorte koje se gaje i široko su rasprostranjene u Srbiji su: *Bigerreau Hatif Burlat* (Francuska), *Summit* (Kanada), *Sunburst* (Kanada), *Hedelfiger Riesenkirsche* (Nemačka), a u poslednjih nekoliko godina i *Kordia* (Češka) i *Regina* (Nemačka).

U prirodnim populacijama biljnih vrsta u Srbiji postoji veliki broj ekonomski značajnih vrsta među kojim se nalazi i divlja trešnja. Najčešće se sreće u planinskim oblastima iznad 1200 metara nadmorske visine na ivicama šuma ili kao pojedinačna stabla. Veliki broj genotipova ove vrste može biti značajan resurs u oplemenjivanju pre svega sa

aspekta važnih pomoloških osobina (Rakonjac i sar., 2014). Isti autori opisuju 33 različita genotipa sakupljena na teritoriji Centralne Srbije koji su opisani pomoću 19 fenotipskih karakteristika. Analizom je utvrđen znatan diverzitet između svakog od njih čime se ističe njihov potencijalni značaj u oplemenjivanju i selekciji.

U oplemenjivanju podloga na Institutu za pomologiju u Holovusiu, Češka, putem slobodne oplodnje *P. avium* stvorena je serija kržljavih podloga pod nazivom PH-L (PH-L-A, PH-L-B, PH-L-C) (Blažková i Hlušičková, 2004). U Nemačkoj trojnim ukrštanjem *P. avium* × (*P. cerasus* × *P. tomentosa*) stvorena je podloga srednje bujnosti Piku<sup>®</sup> 1 (Wolfram, 1996).

Značaj *P. fruticosa* u oplemenjivanju sorti višnje se ogleda u stvaranju sorti otpornih na izrazito niske temperature. Rad na selekciji stepske višnje započeo je I. V. Mičurin, a kasnijom hibridizacijom sa *P. cerasus* stvorene su sorte koje se gaje u Rusiji, Zapadnom Sibiru i Južnom Uralu. U okviru oplemenjivačkih programa nastao je veliki broj sorti u okviru ove hibridne kombinacije, a neke od njih su: *Plodnorodna Mičurina*, *Polevka*, *Šedra*, *Uralska rubinova*, *Sverdlovčanka*, *Standard Urala* (Mišić 2002, Milatović i sar., 2011). Iezzoni i saradnici (1993) ističu da sorte nastale u ovoj hibridnoj kombinaciji dobro podnose vlažna zemljišta.

Vrsta *Prunus fruticosa* ima mnogo veći značaj kada se govori o oplemenjivanju podloga i koristi se u nekoliko različitih oplemenjivačkih projekata. Prednosti koje sa sobom nosi kao podloga ogledaju se u redukovanju bujnosti i podsticanju ranijeg stupanja u rod sorti trešnje i višnje koje se okaleme na ovu vrstu podloge. Nedostatak se odnosi na stvaranje velikog broja izdanaka, u nekim slučajevima loša kompatibilnost sa sortama, slabo ukorenjavanje. Kako bi se ovi problemi prevazišli pribegava se hibridizaciji sa *P. cerasus* ili *P. avium* (Mišić 2002, Milatović i sar., 2011; Lang i sar., 1998; Lankes, 2007). Deo serije podloga pod nazivom GiSelA<sup>®</sup>, stvoren u Nemačkoj, nastao je hibridizacijom *P. fruticosa* sa *P. avium* (GiSelA<sup>®</sup> 1 i GiSelA<sup>®</sup> 4) dok je hibridizacijom sa *P. cerasus* nastala GiSelA<sup>®</sup> 10. U Rusiji hibridizacijom *P. fruticosa* sa *Prunus serrulata* var. *lannesiana* nastala je podloga Krymsk<sup>®</sup> 5.

Oplemenjivački programi koji su zasnovani na klasičnim metodama iziskuju dosta vremena, pogotovo kada se govori o trešnji i višnji kojima je potrebno i do pet godina da

cvetaju i donesu prvi plod. Primena molekularnih markera u oplemenjivanju i njihovo povezivanje sa važnim fenotipskim osobinama u mnogome može olakšati i skratiti vreme potrebno za selekciju i nastanak nove sorte. Shodno prethodno navedenom, marker asistirana selekcija može biti od velike koristi u oplemenjivanju ove dve vrste (Dirlewanger i sar., 2007).

### **2.3. Primena genetičkih markera u proučavanju diverziteta i u oplemenjivanju vrsta sekcije *Eurocerasus***

Genetički markeri predstavljaju specifične lokacije na hromozomu koje možemo koristiti kao obeležja u analizi genoma. Genetički markeri se mogu podeliti na morfološke i molekularne (Tanklsey, 1986; Kumar, 1999).

Morfološki markeri su veoma jednostavni za praćenje i analizu, ali se nalaze pod stalnim uticajem spoljašnje sredine. U ovu grupu markera spadaju kvantitativne i kvalitativne karakteristike koje se jednostavno nasleđuju. Limitirajući faktor primene ovog tipa markera jeste njihov broj, ali i činjenica da se neki od njih, poput karaktera vezanih za cvet i plod, javljaju u kasnijim stupnjevima individualnog razvića jedinke, te ih nije moguće ocenjivati (Andersen, 2003). Nasleđivanje kod morfoloških markera najčešće ima dominantno-recesivni karakter čime je gotovo nemoguće identifikovati genotip kod individua dominantnog fenotipa, odnosno razlikovati homozigote od heterozigota. Takođe, plejotropno i epistatičko delovanje između samih markera-gena u ovom slučaju je često izraženo čime je otežana njihova analiza (Tanklsey, 1986).

Molekularni markeri kojima je moguće identifikovati razlike na nivou proteina se nazivaju biohemijski markeri (Kumar, 1999), ali su oni zapravo fenotipski markeri pošto predstavljaju proizvod gena i kao takvi se često nalaze pod uticajem spoljašnje sredine (Spooner i sar., 2005). DNK markeri, sa druge strane, otkrivaju razlike na nivou DNK i kao takvi se ne nalaze pod uticajem spoljašnje sredine u kojoj se biljka razvija i raste (Mohan i sar., 1997).

Do danas je razvijen veliki broj molekularnih markera, a samo neki od njih su: Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length

Polymorphisms, RFLP), Varijabilnost u broju tandemskih ponovaka (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR), Nasumično amplifikovana polimorfna DNK (Random Amplification of Polymorphic DNAs, RAPDs), Polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLPs), mikrosateliti (Simple Sequence Repeats, SSRs), i Polimorfizam u jednom nukleotidu (Single Nucleotid Polymorphism, SNP).

Razvoj genetičkih markera od morfoloških preko biohemijskih do DNK markera omogućio je njihovu široku primenu u velikom broju osnovnih naučnih disciplina koje se bave proučavanjem biljaka do genetike i oplemenjivanja gde se koriste za karakterizaciju germplazme, izolovanje i identifikaciju gena, marker asistiranu selekciju (MAS) i na kraju, za zaštitu intelektualne svojine priznatih sorti (Henry, 2001).

#### **2.4. Mikrosateliti i SNP kao molekularni markeri**

Mikrosateliti (Simple Sequence Repeats, SSR; Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP, Short Tandem Repeats, STR) su tandemski ponovci DNK sekvence veličine od 1 do 6 baznih parova (Gupta i sar., 1996; Ellegren, 2004; Wang i sar., 2009). Mikrosateliti se nalaze u kodirajućim i nekodirajućim regionima i distribuirani su duž čitavog genoma. Takođe, su zastupljeni i unutar hloroplastne i mitohondrijalne DNK (Kalia i sar., 2011). Motiv ponavljajuće sekvence je najčešće jednostavan i sastoji se od dve, tri ili četiri baze (di-, tri- i tetra- nukleotidni ponovci) koji se uzastopno ponavljaju veliki broj puta (Arif i sar., 2010).

Kod većine vrsta najzastupljeniji su mikrosateliti sa dinukleotidnim ponovcima dok se sa povećanjem dužine ponavljajućeg motiva u okviru mikrosatelita smanjuje njegova zastupljenost u genomu (Ellegren, 2004). Isti autor ističe da postoje samo četiri dinukleotidna ponovka, odnosno da je CA=AC=GT=TG, GA=AG=CT=TC, AT=TA i da je GC=CG. U genomima biljaka najzastupljeniji dinukleotidni ponovak je (AT)<sub>n</sub>, a nakon njega slede ponavljajući motivi (AC)<sub>n</sub> i (GA)<sub>n</sub>, najzastupljeniji trinukleotidni ponovci su (AAG)<sub>n</sub> i (AAT)<sub>n</sub> (Morgante i Olivieri, 1993; Gupta i sar., 1996; Gupta i Varshney, 2000). Najveći procenat dinukleotidnih mikrosatelita se nalazi u 3' ili 5' UTR regionima (42% i 39%), dok se svega 19% nalazi u kodirajućim regionima. Sa druge strane, trinukleotidni

ponovci su zastupljeniji u kodirajućim regionima (74%), 20% se nalazi u 5' UTR delovima, a samo 6% u 3'UTR krajevima. Veća zastupljenost trinukleotidnih ponovaka u kodirajućim regionima se pripisuje činjenici da prisustvo ovog vida mikrosatelita ne dovodi do promene u okvirima čitanja (Varshney i sar., 2005). Pozicija mikrosatelita u genomu određuje njihovu funkcionalnu ulogu i samim tim mogu da utiču na sve aspekte funkcionisanja gena. Mikrosateliti koji su locirani u kodirajućim delovima genoma mogu uticati na promenu aktivnosti samog gena i posledično na njegovu ekspresiju. Ukoliko su locirani u nekodirajućim regionima mogu dovesti do promene u genskoj regulaciji ili genskoj transkripciji (Wang i sar., 2009).

Zavisno od svoje lokacije u genomu mikrosateliti se mogu podeliti na: genomske (prajmeri za ovaj tip mikrosatelita su izvedeni iz genomskih biblioteka) i genske (koji vode poreklo iz gena, odnosno kodirajućeg dela genoma). Genski mikrosateliti nazivaju se još i EST – izvedeni (EST-derived) mikrosateliti. Svoje ime su dobili po proceduri njihove identifikacije u projektima parcijalnog sekvencioniranja klonova cDNK biblioteka i stvaranja takozvanih EST (expressed sequence tags) baza podataka (Kalia i sar., 2011).

Mikrosateliti se mogu podeliti prema izgledu ponavljajućeg motiva na: proste potpune (simple perfect), proste nepotpune (simple imperfect), složene potpune (compound perfect) i složene nepotpune (compound imperfect). Prosti potpuni su sačinjeni od jednog ponavljajućeg motiva  $(AAG)_n$ , a prosti nepotpuni sadrže jedan ili više ponavljajućih motiva različite dužine  $(AAC)_n(AGC)(AAC)_{n+1}$ . Složeni potpuni mikrosateliti građeni su od dva ili više različitih ponavljajućih motiva iste dužine  $(AAG)_n(AATG)_n$ , dok je kod složenih nepotpunih postoji prekid u sekvenci mikrosatelita sa jednim ili više motiva, a motivi su različite dužine  $(AATG)_n(AGC)(AATG)_{n+1}$  (Wang i sar., 2009).

Promene u vidu povećanja i smanjenja broja ponovaka u okviru SSR sekvenci i sama njihova evolucija su povezane sa stopom mutacija. Nastanak mikrosatelita je veoma složen i dinamičan evolutivni proces (Ellegren, 2004). Mogući procesi koji su doveli do nastanka i razvoja mikrosatelita su: jednostrano proklizavanje DNK polimeraze (single-stranded DNA slippage), nejednak krosingover, genske konverzije, greške u DNK reparacionim mehanizmima i retrotranspozoni (Kalia i sar., 2011).

Proklizavanje DNK polimeraze III u okviru mikrosatelitnog regiona na DNK matrici, tokom procesa replikacije, može dovesti do proširenja ili smanjenja repetitivnog segmenta ukoliko ne dođe do reparacije na mestima nepodudaranja (Wang i sar., 2009). Reparaciju DNK na mestima nepodudaranja matrice i novonastalog lanca nastalih usled proklizavanja DNK polimeraze ispravlja MMR (mismatch repair) te se stabilnost mikrosatelita ogleda u ravnoteži između ova dva procesa. Promene u MMR genu dovode do povećanja stope mutacija u SSR regionima (Kalia i sar., 2011). Greške usled nejednakog krosingovera i genske konverzije u regionima u kojima se nalaze mikrosateliti takođe mogu dovesti do povećanja ili smanjenja broja ponovaka. U toku duplikacije određenog regiona genoma nastaju greške u vidu nejednakih dužina sekvenci na nivou ponavljajućeg regiona koje ukoliko ne budu ispravljene vode ka varijabilnosti mikroastelita (Wang i sar., 2009).

Retrotranspozoni su DNK fragmenti koji sadrže ponavljajući motiv, a koji bivaju ubačeni u hromosome nakon reverzne transkripcije RNK molekula. Veliki broj mikrosatelita u genomima čoveka i pirinča prate retrotranspozoni (Wang i sar., 2009; Kalia i sar., 2011). Sa druge strane, ne postoji jasna korelacija između gustine mikrosatelitskih lokusa na hromozomu 2 *Arabidopsis thaliana* i broja retrotranspozabilnih elemenata (Schlotterer, 2000). Isti autor navodi da je najznačajniji među svim navedenim uzrocima polimorfizma i evolucije unutar mikrosatelita proklizavanje polimeraze dok su ostali mehanizmi zastupljeni u manjem procentu, ali da imaju određenu ulogu koja treba još da bude istražena.

Do danas je razvijen veliki broj modela po kojima nastaju mutacije u mikrosatelitskim lokusima. Najprihvaćeniji model, iz kog je izvedena većina ostalih, je model postepene mutacije (Stepwise Mutation Model, SMM) koji pretpostavlja postojanje ravnomernog povećanja i smanjenja broja ponavljajućih motiva koji menjaju dužinu mikrosatelita. Međutim, većina mikrosatelita pokazuje postojanje gornje granice u broju ponovaka te se u ovom slučaju favorizuje smanjenje broja ponovaka čime se narušava osnovno pravilo postepenih mutacija. Drugi model koji objašnjava mutacije u mikrosatelitim lokusima zasniva se na postojanju ravnoteže u dužini mikrosatelita koja se održava balansom između promena u dužini mikrosatelita i takčkastih mutacija. Mutacije u

dužini favorizuju povećanje broja ponovaka, dok sa druge strane tačkaste mutacije dovode do njihovog prekida na manje fragmente (Ellegren, 2004).

Kreiranje prajmera za umožavanje i analizu mikrosatelita zahteva nekoliko koraka. Prvi podrazumeva kreiranje biblioteka koje će sadržati genomsku DNK ili kreiranje obogaćenih biblioteka za identifikaciju određenog tipa mikrosatelita. Nakon kreiranja biblioteke vrši se njena pretraga putem hibridizacije oligonukleotidnim probama. Pozitivni klonovi se sekvenciraju i kreiraju se prajmeri na osnovu sekvenci koje uokviruju ponavljajući motiv pri čemu je potrebno obratiti pažnju na broj GC parova, odnosno na temperaturu topljenja kako bi se osigurali dobri uslovi za PCR reakciju. Istovremeno sekvenca prajmera mora biti tako dizajnirana da se izbegne njihovo međusobno spajanje, odnosno stvaranje dimera. Identifikovani i kreirani prajmeri za SSR lokus se dalje mogu koristiti za njegovo umožavanje putem PCR reakcije i dalju analizu putem elektroforeze (Gupta i sar., 1996).

Brzi razvoj novih tehnologija sekvenciranja omogućuje pretraživanje kompletnog genoma, čak i kod manje istraženih vrsta, čime se može identifikovati i razviti veliki broj molekularnih markera za primenu u različitim vidovima molekularnog mapiranja, marker asistirane selekcije itd. (Grover i sar., 2011). GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) je baza podataka koja u sebi sadrži nukleotidne sekvence za preko 260000 vrsta. Većina sekvenci koje se nalaze u ovoj bazi su nastale kroz njihovo prijavljivanje iz pojedinačnih laboratorija ili konzorcijuma za sekvenciranje genoma (Benson i sar., 2013). Pretragom ovih baza podataka za vrstu od interesa moguće je preuzeti nukleotidne sekvence u FASTA formatu koje se primenom različitih softvera mogu pretražiti i u kojima se može utvrditi prisustvo ponavljajućih sekvenci i dizajnirati prajmeri za njihovo umožavanje PCR reakcijom (Cho i sar., 2000; Tang i sar., 2010). Metode sekvenciranja nove generacije (NGS) predstavljaju odlično oruđe u identifikaciji SSR markera pošto imaju mogućnost da produkuju velike količine DNK sekvenci. Ove metode mogu poslužiti za identifikaciju SSR u okviru genoma ili transkriptoma, a izbor će zavisiti od cilja rada i mogućnosti obrade dobijenih podataka. Sledeći korak jeste slaganje sekvenci dobijenih NGS kako bi se dobili duži nukleotidni nizovi iz kojih će se primenom različitih softvera izolovati ponovljiva sekvenca i kreirati prajmeri (Zalapa i sar., 2012).

Mikrosateliti razvijeni za određenu vrstu mogu se koristiti i u analizi blisko srodnih vrsta, ali procenat uspešnog umnožavanja (Varshney, 2005; Arif i sar., 2010) i stepen raznolikosti opada sa povećanjem genetičke udaljenosti (Dirlewanger i sar., 2002; Wunsch i Hormaza, 2002; Bouhadida i sar., 2009). Wang i saradnici (2009) definišu prenosivost SSR markera kao procenat uspešnog umnožavanja u vrsti od interesa u odnosu na ukupan broj analiziranih markera.

Cipriani i saradnici (1999) prilikom identifikacije serije mikrosatelita u genomu breskve (*Prunus persica* (L) Batsch) sa oznakom UDP istovremeno su istražili i mogućnost njihove primene u srodnim vrstama iz roda *Prunus*. Dobijeni su rezultati koji ukazuju na visok procenat uspešnog umnožavanja kod ovih vrsta (71% kod višnje, 76% kod trešnje, kajsijske i Japanske šljive, 82% kod badema i Evropske šljive i 94% u genomu nektarine). Prenosivost markera razvijenih kod breskve u genom trešnje ispitivana je u više slučajeva pri čemu je procenat uspešnog umnožavanja iznosio od 71 do 90% (Dirlewanger i sar., 2002; Wunsch i Hormaza, 2002; Schueler i sar., 2003). Prenosivost markera iz genoma breskve i trešnje u genom 9 vrsta iz podroda *Cerasus* koje vode poreklo iz Istočne Azije iznosio je 69% (Ohata i sar., 2005).

Prenosivost SSR markera omogućuje njihovu primenu u filogenetskim istraživanjima i komparativnom mapiranju genoma. Ovo je veoma važno za poljoprivredne i druge biljne vrste čiji genom je manje istražen, odnosno nije sekvenciran ili ne poseduju genetičke mape. Većina filogenetskih istraživanja i studija raznolikosti koje su uglavnom bile vršene putem fenotipskih markera, primenom prenosivih mikrosatelita mogu biti značajno unapređene i poboljšane (Kalia i sar., 2011).

Prednosti SSR markera su: visoka stopa mutacija koja se kreće od  $10^{-6}$  do  $10^{-2}$ , čini mikrosatelite izrazito polimorfni u odnosu na druge tipove markera, kodominantno se nasleđuju, veoma su zastupljeni u genomu, ravnomerno su raspoređeni kroz euhromatinski deo genoma, prenosivi, ekonomični i jednostavno se umnožavaju i analiziraju uz pomoć PCR reakcije što ih sve čini veoma pogodnim za različite vidove primene u genetičkim istraživanjima (Wang i sar., 2009).

Korisnost mikrosatelita u istraživanjima se ogleda u velikom sadržaju informacija koje možemo dobiti njihovom analizom i relativno jednostavnom primenom u svrhu



genotipizacije. Mogućnost da se razlikuju dve blisko srodne jedinke je od velikog značaja kod velikog broja poljoprivrednih vrsta koje često imaju usku genetičku osnovu. Dosadašnjim istraživanjima primena mikrosatelita je dala daleko više rezultata u analizi polimorfizma u poređenju sa ostalim tipovima markera (Powel i sar., 1996).

Mikrosateliti su postali marker izbora za veliki broj različitih analiza kod biljaka usled njihove hipervarijabilne prirode i ravnomerne rasprostranjenosti duž celog genoma. Primenjuju se u: procenama stepena genetičke varijabilnosti na molekularnom nivou u kolekcijama germplazme kako bi se odabrali odgovarajući roditeljski parovi za hibridizaciju ( oplemenjivanje putem hibridizacije), u mapiranju genoma i identifikovanju gena ili lokusa koji su odgovorni za kvantitativna svojstva (Quantitative Trait Loci, QTL) poput prinosa i otpornosti na bolesti, u marker asistiranoj selekciji (Marker Assisted Selection, MAS) i marker asistiranom povratnom ukrštanju (Marker Assisted Backcrossing, MAB) u oplemenjivačkim programima, istraživanjima populacione strukture, taksonomskim i filogenetskim istraživanjima (Kalia i sar., 2011).

Poznavanje molekularne osnove biodiverziteta je jedan od najvažnijih faktora za pravilno čuvanje, upravljanje i primenu biljnih genetičkih resursa. Ovi podaci su od velikog značaja za osnovna, ali i primenjena istraživanja pogotovo kada se govori o oplemenjivanju gde stalno uvođenje germplazme divljih srodnika i tradicionalnih sorti ima veliku i značajnu ulogu (Mondini i sar., 2009). Poslednjih godina mikrosateliti su se pokazali kao značajan resurs upravo u analizi diverziteta kod velikog broja vrsta (Kalia i sar., 2011). SSR markeri su veoma korisni za identifikaciju sorti i analizu pedigreea gde do izražaja dolazi mogućnost detekcije velikog broja alela u jednom lokusu u raznolikoj germplazmi (Kalia i sar., 2011). Takođe, mikrosateliti se mogu primeniti i za determinaciju hibridnih jedinki pri čemu je od velike pomoći kodominantni način nasleđivanja ovog tipa markera (Powel i sar., 1996).

U okviru roda *Prunus* mikrosateliti su intenzivno primenjivani za procenu diverziteta i identifikaciju sorti i genotipova: trešnje (*P. avium*) (Wünsch i Hormaza 2002; Schueler i sar., 2003; Laciš i sar., 2009; Jing-Yong i sar., 2009; Ganopoulos i sar., 2010), kajsijske (*P. armeniaca*) (Sanchez-Perez i sar., 2005; Donoso i sar., 2008) i breskve (*P. persica*) (Sosinski i sar., 2000; Aranzana i sar., 2002). Raznolikost i definisanje odnosa

između podloga za vrste koje pripadaju rodu *Prunus* takođe je obavljeno uz pomoć mikrosatelita (Buohida i sar., 2009); Bianchi i sar., 2004; Turkuoglu i sar., 2010).

Mikrosateliti imaju važnu ulogu u pronalaženju specifičnih regiona genoma koji regulišu važna fiziološka i agronomska svojstva. Svoju primenu, SSR markeri, su pronašli i u analizi regiona genoma odgovornih za kvantitativna svojstva (QTL) što dalje može voditi ka identifikaciji gena kandidata koji su od velikog značaja za oplemenjivački rad (Kalia i sar., 2011). Primena EST-SSR može doprineti direktnoj selekciji na određena svojstva pošto je poznata ili se pretpostavlja njihova funkcija vezana za svojstvo od interesa (Varshney i sar., 2005).

Mapiranje genoma podrazumeva genetičko, komparativno, fizičko i asocijativno mapiranje. Značaj mikrosatelita u genetičkom mapiranju se ogleda u činjenici da se relativno lako mogu umnožiti putem PCR reakcije i da se nasleđuju po kodominantnom principu (Wang i sar., 2009). Stvaranje genetičkih mapa visoke rezolucija primenom samo SSR markera je teško ostvarivo, dok je stvaranje mapa male rezolucije koje daju podatke o pojedinim specifičnim regionima moguće (Powel i sar., 1996). Kombinovanje mikrosatelita sa drugim marker sistemima je najbolje rešenje i ovim putem se mogu dobiti genetičke mape za različite biljne vrste (Wang i sar., 2009).

Najvažniji način primene mikrosatelita jeste u obeležavanju i identifikovanju važnih karakteristika u programima oplemenjivanja (Powel i sar., 1996). Marker asistirana selekcija (MAS) može značajno unaprediti i ubrzati oplemenjivački proces. SSR markeri razvijeni u ove svrhe mogu biti blisko vezani za svojstvo od interesa ili mogu biti sastavni deo samog gena koji kontroliše željeno svojstvo. SSR markeri locirani u samom genu imaju veću efikasnost kada se koriste u svrhe MAS, ali je njihova identifikacija daleko teža od markera koji dolaze iz genomske DNK (Wang i sar., 2009). Analizom QTL regiona za veličinu ploda kod trešnje i višnje identifikovana su dva SSR markera koja su blisko vezana za ovo svojstvo (BPPCT034 i CPSCT038) (Zhang i sar., 2010; Franceschi i sar., 2013). Zhang i saradnici (2010) posebno ističu značaj alela 255 lokusa BPPCT034 kao kandidata za potencijalnu primenu MAS za veliki plod trešnje i višnje.

Polimorfizam u jednom nukleotidu (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) nastaje kao posledica tačkastih mutacija koje indukuju nastanak različitih alela koji u sebi

nose različite baze na određenoj poziciji u okviru lokusa. Ove razlike nastale usled substitucije jedne baze su identifikovane i opisane od samog početka primene metode DNK sekvenciranja 1977. godine. Sa napretkom tehnologije u poslednjoj deceniji prošlog i početkom ovog veka ostvaren je i veliki napredak na polju njihove primene u genetičkim istraživanjima (Liu, 2008).

SNP markeri poseduju mnoge prednosti u odnosu na druge tipove molekularnih markera usled činjenice da su najprisutniji u genomima svih živih organizama. Visoka frekvencija SNP u genomu ih čini pogodnim za otkrivanje gena odgovornih za važna svojstva (Schork i sar., 2000; Liu, 2008). U genomu, SNP mogu biti pozicionirani na svim mestima (egzonima, intronima, međugenskim regionima, promotorima), pa samim tim imaju i različiti uticaj zavisno od datog položaja. Ukoliko se SNP nalaze u okviru kodirajućeg regiona mogu direktno uticati na strukturu i funkciju proteina koji je produkt tog gena. Substitucija jedne baze u predelu introna može uticati na splajsing, dok one u predelu promotora utiču na gensku ekspresiju. Pojava SNP u različitim lokusima koji nastaju u različitom vremenskom periodu duž celog genoma za posledicu može imati postojanje vezanosti alela (linkage disequilibrium, LD) koji se dalje može upotrebiti u mapiranju. Ovome u prilog ide i činjenica da SNP imaju nizak stepen mutacija čime se povećava njihova stabilnost i dobija na pouzdanosti rezultata u proceni LD (Schork i sar., 2000). Velika prednost ovog tipa markera u odnosu na sve ostale jeste mogućnost automatizacije analize čime se može dobiti veliki broj podataka za kratko vreme (Schork i sar., 2000; Liu, 2008).

Za identifikaciju i otkrivanje SNP, kao i za njihovu kasniju upotrebu u genotipizaciji postoji nekoliko metoda. Za otkrivanje SNP se koristi direktno sekvenciranje DNK fragmenata, pretraga baza podataka nastalih tokom projekata sekvenciranja ili pretraga baza podataka koje sadrže podatke o EST sekvencama (Rafalski, 2002). Gut (2001) opisuje velik broj tehnika dostupnih za genotipizaciju pomoću SNP markera, a izbor metode koja će se koristiti zavisi od cene, propusne moći, potrebne opreme, potrebe za kreiranjem proba i mogućnosti multipleks analize.

Elshire i saradnici (2011) su opisali metodu SNP genotipizacije putem sekvenciranja (Genotyping By Sequencing, GBS) koja se zasniva na primeni metoda

sekvenciranja nove generacije (Next Generation Sequencing). Ova metoda je relativno jednostavna, brza, ima mogućnost velikog stepena multipleks analize i daje veliki broj informacija, a pogodna je za populaciono-genetička istraživanja, karakterizaciju germplazme, kao i mapiranje kod različitih vrsta i organizama.

Metodološki postupak se zasniva na kreiranju biblioteka kratkih fragmenata DNK, nastalih sečenjem DNK restrikcionim enzimima. Izbor restrikcionog enzima, učestalost sečenja DNK i korišćenje jednog ili dva enzima, utiče na krajnji broj fragmenata i postignutu reprezentaciju genoma. Individualno obeležavanje DNK različitih uzoraka takozvanim barkodovima omogućava grupisanje uzoraka DNK u jednu biblioteku i njihovo bioinformatičko identifikovanje nakon sekvenciranja na Illumina HiSeq instrumentima, čime se postiže niska cena genotipizacije primenom ove metode (Elshire i sar., 2011).

U okviru roda *Prunus* 9000 SNP markera breskve (Verde i sar., 2012) i 6000 SNP markera za trešnju i višnju (Peace i sar., 2012) je organizovano u takozvane SNP čipove za genotipizaciju. Ovi čipovi će u mnogome pomoći i olakšati analizu genoma ovih vrsta, a kranji cilj njihove primene jeste spajanje saznanja iz genomike i konvencionalnog oplemenjivanja (Peace i sar., 2012). Prednost GBS metode u odnosu na gore navedene čipove je što nije ograničena brojem niti SNP markerima već omogućava detekciju novih raznolikosti i novih SNP koji nisu prisutni na čipovima.

## **2.5. Inter- i intra-specijski diverzitet unutar *Eurocerasus* sekcije**

Poznavanje stepena diverziteta među biljnim materijalom koji se koristi u oplemenjivačke svrhe je od izuzetne važnosti za unapređenje bilo koje biljne vrste. Određivanje genetičke bliskosti i udaljenosti među sortama je od velike pomoći prilikom izbora roditeljskih parova (Becelaere et al. 2005).

Morfološka karakterizacija je jedan od prvih koraka u karakterizaciji i klasifikaciji germplazme (Rakonjac i sar., 2014). Na teritoriji Srbije ispitana je diverzitet sva tri pripadnika *Eurocerasus* sekcije: *P. avium*, *P. cerasus* i *P. fruticosa*.

Analizom fenotipskih karaktera ustanovljeno je veliko bogatstvo divrežiteta kod vrste *Prunus cerasus*. Raznolikost unutar Oblačinske višnje je istražena od strane Rakonjac i saradnika (2010) pri čemu je analizom 29 morfoloških karaktera utvrđen visok stepen koeficijenta varijacije za parametre poput broj i gustina cvetova, broj plodova i prinos, dok su niži stepen varijacije pokazali veličina lista, i veličina i hemijski sastav ploda. Analiza primarnih komponenti je klasifikovala sve analizirane genotipove u 4 grupe od kojih je jedna bila veoma heterogena. Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da je za potrebe stvaranja kolekcije dovoljno uzorkovati po jedan genotip iz prve tri grupe unutar kojih su genotipovi veoma slični, dok se u poslednjoj svi uzorci mogu smatrati kao zasebni klonovi i treba ih sve uvrstiti u kolekciju.

Druga ispitivana sortna populacija je Feketićka višnja koja se gaji na teritoriji sela Feketić u opštini Mali Iđoš u vidu manjih voćnjaka ili kao zasebne jedinke na okućnicama. Fenofaza cvetanja kod svih devet analiziranih genotipova nije pokazala postojanje značajnije varijabilnosti, dok se sa druge strane, vreme zrenja razlikovalo između genotipova i kretalo od 7 do 21 juna. Pomološke i biohemijske osobine ploda su varirale u umerenim granicama, a većina genotipova Feketićke višnje je pokazala bolje rezultate u odnosu na sortu *Čačanski rubin* koja je uzeta kao standard (Radičević i sar., 2012; Miodragović i sar., 2014).

Morfološka varijabilnost divljih tipova trešnje sakupljenih u prirodnim populacijama na teritoriji centralne Srbije opisana je primenom 19 karaktera izgleda stabla, ploda i lista (Rakonjac i sar., 2014). Dobijeni rezultati su pokazali visok stepen varijabilnosti ove vrste za sve ispitivane parametre, dok su najvarijabilniji bili parametri lista (Rakonjac i sar., 2014).

Komparativna analiza genotipova stepske i oblačinske višnje je pokazala značajne varijacije između, ali i unutar vrsta. Praćenjem 19 karaktera i kasnijom statističkom obradom dobijenih rezultata, Ljubojević i saradnici (2012), su bili u mogućnosti da razdvoje sve uzorke prema njihovoj taksonomskoj pripadnosti. Jedini parameter koji je identičan za obe vrste i koji nije pokazao varijabilnost jeste prisustvo i broj lisnih nektarija. Uporedna analiza standardnih sorti i genotipova sakupljenih iz prirodnih populacija vrsta *Prunus cerasus*, *P. avium*, *P. fruticosa*, *P. mahaleb* i *P. serrulata* (Barać i sar., 2014)

potvrdila je prethodno navedene rezultate svih autora. Sve vrste su mogle biti identifikovane na osnovu 27 kvalitativnih i kvantitativnih parametara, a karakteristike koje su ispoljile najviši stepen varijabilnosti bile su dužina i širina liske, ukus ploda, boja lisnih nektarija, težina ploda, nazubljenost lisne drške, dužina peteljke ploda, veličina vegetativnih pupoljaka i dužina internodija.

Varijabilnost u okviru stepske višnje nije detaljnije istraživana u svetskim razmerama pogotovo kada se u obzir uzme rad koji se sprovodi na trešnji i višnji. Sa stanovišta oplemenjivanja podloga analizirani su genotipovi iz prirodnih populacija stepske višnje i prirodni hibridi ove i srodnih vrsta sa teritorije Mađarske (Hrotko i sar., 2008). U ovom slučaju *Prunus fruticosa* je pokazala značajne varijacije u pogledu bujnosti, prinosa i veličine ploda kada je primenjena kao interpodloga za kalemljenje za trešnju i višnju.

Istraživanja morfoloških karakteristika u okviru kolekcija trešnje koje se gaje u Letoniji i Švedskoj su pokazala slab kvalitet ploda, a većina uzoraka je imala žute plodove sa bezbojnim sokom. Sa druge strane, sorte koje se gaje u ovom podneblju pokazuju značajan nivo otpornosti na bolesti i na niske temperature. Najviši stepen varijabilnosti utvrđen je za površinu lista, karaktere vezane za veličinu ploda i otpornost, ali su i ovi parametri generalno gledano ispoljili relativno nizak stepen raznolikosti (Lacis i sar., 2009). Ganopoulos i saradnici (2011) takođe ističe masu ploda kao jedan od najvarijabilnijih parametara koji se kreće u intervalu od 4,9g do 12,1g. Genotipovi sakupljeni iz prirodnih populacija Turske su ispoljili visoku varijabilnost u pogledu boje pokožice i veličine ploda (Karlidag i sar., 2009).

Varijabilnost u okviru gajenih sorti višnje je takođe značajna i kao i za trešnju najveći nivo je uočen za veličinu i masu ploda, pored ovih parametara najveće razlike postoje kod površine lista, boje soka i pokožice ploda (Kimberlz i sar., 1991; Antonius i sar., 2012). Multivariaciona analiza uzoraka starih sorti gajenih u Portugaliji jasno je razdvojila ove dve vrste u zasebne klastere, a kao najvažniji karakteri su se pokazali veličina ploda, dužina peteljke i vreme zrenja (Rodrigues i sar., 2008). Visok stepen diverziteta dobijen je analizom višnje, trešnje i stepske višnje, ali i drugih blisko srodnih vrsta poput *P. mahaleb* L., *P. incana* Pall., *P. microcarpa* Boiss., *P. brachypetala* Boiss. (Khadivi-Khub i sar., 2012).

Morfološka analiza i opisivanje genetičkih resursa vrsta iz sekcije *Eurocerasus* može značajno olakšati i definisati mere potrebne za pravilno očuvanje i upravljanje genetičkim resursima. Ovi rezultati takođe mogu predstavljati polaznu osnovu za dalju primenu genetičkih resursa u oplemenjivačkim programima, pošto opisivanje biljnog materijala olakšava identifikovanje svojstava od interesa i osigurava da ceo spektar varijabilnosti bude sačuvan (Rakonjac i sar., 2014).

Primena molekularnih markera u istraživanju diverziteta ima veliki broj prednosti (Mohan i sar., 1997; Arif i sar., 2010), a među markerima se posebno ističu mikrosateliti (Wang i sar., 2009). Najveći broj istraživanja diverziteta primenom mikrosatelita kao molekularnih markera u okviru *Eurocerasus* sekcije sproveden je na *Prunua avium* (Dirlewanger i sar., 2002; Schueler i sar., 2002; Wunsch i Hormaza, 2002; Clarke i Tobutt, 2003; Struss i sar., 2003; Vaughan i Russell, 2004; Kacar i sar., 2005; Holtken i Gregorius, 2006; Jing-Yong i sar., 2009; Laciš i sar., 2009; Xuan i sar., 2009; Ganopoulos i sar., 2010; Barac i sar., 2014). Vrsta *P. cerasus* je analizirana u znatno manjem broju radova (Cantini i sar., 2001; Kacar i sar., 2006; Xuan i sar., 2009; Antonius i sar., 2012; Barac i sar., 2014), dok je *. fruticosa* najređe bila predmet istraživanja (Cantini i sar., 2001; Barac i sar., 2013; Barac i sar., 2014).

Diverzitet unutar gajenih sorti trešnje se pokazao kao nizak (Wunsch i Hormaza, 2002; Holtken i Gregorius, 2006; Ganopoulos i sar., 2010) dok su nešto viši stepen raznolikosti pokazali genotipovi iz prirodnih populacija (Vaughan i Russell, 2004). Prosečan broj alela po lokusu za se kretao od 2,8 (Ganopoulos i sar., 2010) do 6,7 (Jing-Yong i sar., 2009) za sorte koje se komercijalno gaje, dok je za genotipove iz prirodnih populacija ovaj parameter varirao od 3,9 (Vaughan i Russell, 2004) do 5,5 (Holtken i Gregorius, 2006). Prosečne vrednosti heterozigotnosti za gajene sorte su bile u intervalu od 0,49 (Wunsch i Hormaza 2002; Ganopoulos i sar., 2010) do 0,66 (Schueler i sar., 2003), a u divljim genotipovima 0,6 (Vaughan i Russell 2004).

Sa druge strane prosečan broj alela kod višnje se kretao od 8,5 (Xuan i sar., 2009) do 12,8 (Kacar i sar., 2006). Istovremeno vrednost heterozigotnosti je varirala od 0,68 do 1,00 zavisno od analiziranog lokusa uzevši u obzir zajedno analizirane uzorke *Prunus cerasus* i *P. fruticosa* (Cantini i sar., 2001). Genetički diverzitet stepske višnje, koja je

genetički slabo istražena vrsta, analiziran je na teritoriji Vojvodine, a obuhvaćeno je šest prirodnih populacija i jedna koja je prenetna iz svog prirodnog okruženja u organizovanu kolekciju (*ex situ*) *P. fruticosa*. Ukupno je analizirano deset SSR lokusa od kojih je sedam bilo polimorfno. Indeksi genetičkog diverziteta prema Nei-u ( $H_e$ ) i Shannon-u ( $I$ ) su bili visoki, i iznosili su 0,391 i 0,689, uzimajući u obzir da je za razdvajanje produkata PCR reakcije korišćena agarozna gel elektroforeza. Najveći procenat genetičkog diverziteta (63,4-80,9%), ocenjivan na osnovu  $F_{st}$  i  $G_{st}$  vrednosti, se nalazio unutar populacija *P. fruticosa*.

Razlike u nivou diverziteta između gajenih i divljih sorti i genotipova *Prunus avium* proizilaze iz činjenice da je genetička osnova koja se koristi u oplemenjivanju ove vrste veoma uska (Wunsch i Hormaza, 2002), dok se razlike u stepenu diverziteta između trešnje i višnje mogu pripisati različitom nivou ploidnosti ove dve vrste (Xuan i sar., 2009).

Istovremena analiza diverziteta *Prunus avium*, *P. cerasus*, *P. fruticosa* i bliskih vrsta pokazala je takođe značajnu diverzitet unutar, ali i između svake od njih (Barac i sar., 2014). Analiza diverziteta je obuhvatila 77 genotipova poreklom iz 5 vrsta uz primenu 26 mikrosatelitskih lokusa. Ukupno je identifikovano 98 različitih alela u analiziranom materijalu, a prosečan broj alela po markeru je iznosio 3,78. Vrste *P. serrulata* i *P. cerasus* su pokazale najviše i najniže vrednosti efektivnog broja alela (1,55 i 1,98), dok su vrednosti očekivane heterozigotnosti iznosile od 0,34 kod *P. avium* do 0,43 kod *P. cerasus*. Klaster analiza na osnovu SSR markera je grupisala sve analizirane genotipove u četiri glavna klastera prema taksonomskoj pripadnosti, dok su *P. avium* i *P. cerasus* grupisani zajedno podržavajući predačku vezu između ove dve vrste. Rezultati istraživanja su potvrdili visok nivo diverziteta istraživanog materijala unutar i između vrsta, ali i unutar populacija kada govorimo o *P. fruticosa*, koja je nešto detaljnije istažena i samim tim čini dobru osnovu za dalji oplemenjivački rad.

Primena SNP kao molekularnih markera u okviru *Eurocerasus* sekcije sprovedena je samo na *Prunus avium* (Mati i sar., 2012). U ovom radu zajedno je istraživana diverzitet sorti, selekcija i starih genotipova iz različitih delova sveta primenom 40 SNP izvedenih iz 3' UTR regiona gena i sedam SSR markera. Dobijeni rezultati su pokazali visoke vrednosti u pogledu broja alela, prosečne uočene i očekivane heterozigotnosti, i PIC (polymorphic



information content) vrednosti. Klaster analiza za oba tipa markera je grupisala sve uzorke na sličan način. Veliki značaj SNP markera se posebno ističe kada je reč o identifikaciji mutanata i rešavanju roditeljskih odnosa za pojedine sorte. Napredak u primeni SNP kao markera kod trešnje i blisko srodnih vrsta bi u budućnosti mogao da bude značajniji pogotovo ako se uzme u obzir da je razvijen i komercijalno dostupan čip koji na sebi nosi probe za 6000 SNP pozicija (Peace i sar., 2012).

## 2.6. Genetička osnova autoinkompatibilnosti

Većina pripadnika roda *Prunus* ispoljava homomorfnu gametofitnu autoinkompatibilnost koja je kontrolisana od strane jednog multialelnog lokusa, koji se naziva i S lokus. Aktivacija sistema autoinkompatibilnosti se dešava u trenutku kada se isti aleli S lokusa nađu i u tučku i u polenu čime se onemogućuje rast polenove cevi i sama oplodnja. Razviće ploda iz neoplođene jajne ćelije u rodu *Prunus* nije moguće ili je moguće u maloj meri, te je neophodno da dođe do oplodnje i razvića semena. Ova činjenice je od velike važnosti pogotovo kada se podižu veliki komercijalni voćnjaci gde se mora voditi računa da sortiment bude odabran na osnovu grupe kompatibilnost kojoj stabla u voćnjaku pripadaju (Tao i Iezzoni, 2010).

Poslednje dve decenije otkrivena su dva gena koja kodiraju proteine odgovorne za alel specifičnu gametofitnu autoinkompatibilnost. Ribonukleaza (RNaza) i F-boks geni određuju S genotip tučka i polena (Tao i Iezzoni, 2010). RNaza kod predstavnika familije Rosaceae sadrži pet regiona koji su visoko konzervirani, dva katalitička domena, ali i jedan visoko varijabilni region koji je odgovoran za biohemijske reakcije iz kojih proizilazi autosterilnost. F-boks gen je identifikovan kod badema i blisko je vezan za RNazu, a pretpostavlja se da igra glavnu ulogu u određivanju alela za inkompatibilnost polena. Analizom strukture ovog gena utvrđeno je da sadrži dva varijabilna i dva hipervarijabilna regiona koja mogu imati presudnu ulogu u određivanju načina oplodnje u smislu auto-kompatibilnosti ili inkompatibilnosti (Yamane i Tao., 2009).

Saznanja o građi S lokusa vodila su ka konstruisanju markera za identifikaciju alela koji se nalaze unutar pomenutog lokusa. Sonneveld i saradnici (2003) su kreirali konsenzus

prajmere kojima je moguće identifikovati alele od S1 do S16. Prvi konsenzus prajmer umnožava sekvencu koja sadrži prvi intron, dok drugi konsenzus prajmer umnožava drugi intron koji u sebi sadrži i hipervarijabilni region ovog gena, a lociran je između dva visoko konzervirana segmenta. Daljim istraživanjima utvrđeno je prisustvo sinonima za neke od alela, ali su takođe identifikovani i novi aleli koji se koriste za analizu kompatibilnosti među sortama (Yamane i Tao., 2009).

Mutacije koje se dešavaju u okviru nekog od dva navedena gena mogu dovesti do autokompatibilnosti određenih sorti. Delecija u okviru F-boks gena dovodi do nastanka S<sub>3</sub>, mutiranog alela, a mutacija koja dovodi do promena okvira čitanja (frame shift mutation) za posledicu ima supstituciju aminokiselina i prevremen završetak sinteze proteina čime nastaje mutirani alel S<sub>4</sub> (Soneveld i sar., 2005). Mutacija neposredno posle hipervarijabilnog regiona S<sub>5</sub> alela u okviru S lokusa za posledicu ima pojavu stop kodona pre nego što je očekivano, te je i proteinski produkt kraći, a ovaj disfunkcionalni alel je dobio oznaku S<sub>5</sub> (Marchese i sar., 2007). Identifikacija alela u okviru S lokusa se uspešno koristi kao vid marker asistirane selekcije pri odabiru roditeljskih parova i selekcije aukokompatibilnih jedinki i potomstva u oplemenjivanju vrsta koje pripadaju rodu *Prunus* (Tao i Iezzoni, 2010).

## 2.7. Asocijativno mapiranje

Primarni cilj u oblasti biljne genetike je definisati koji deo fenotipske varijabilnosti nastaje kao posledica promene na nivou DNK sekvenci. Jedan od alata koji može pomoći u ostvarenju ovog cilja jeste asocijativno mapiranje koje ima mogućnost da identifikuje razlike na nivou gena koje su odgovorne za promenu fenotipa. Asocijativno mapiranje podrazumeva traganje za vezom između genotipa i fenotipa među jedinkama koje nisu u srodstvu, a oslanjajući se na brojne rekombinacije koje su se nakupljale tokom vremena u okviru prirodnih populacija i kolekcija lokalnih i standardnih sorti (Braulio i sar., 2012). Ukoliko se dva alela poreklom iz različitih lokusa javljaju istovremeno češće nego što je to očekivano na osnovu njihovih frekvencija, tada se smatra da postoji neslučajno sparivanje alela u okviru različitih lokusa, odnosno linkage disequilibrium (LD). Samo oni markeri

koji su blisko vezani za svojstvo od interesa, a pokazuju visok LD, će ispoljiti značajnu asocijaciju između markera i fenotipa. Ukoliko marker nije blisko vezan, rekombinacije koje se dešavaju u mejozi tokom evolutivnog razvoja vrste će ih razdvojiti (Khan i Korban, 2012). Analizom uzoraka iz prirodnih populacija obuhvata se veći diverzitet, a samim tim i stiču određene prednosti u odnosu na ostale metode mapiranja, poput: analize većeg broja alela i eliminacije potrebe za stvaranje “mapping populacija”. Kompleksne interakcije alela poreklom iz različitih lokusa i gena sa malim uticajem na svojstvo mogu biti identifikovane čime se ističu jedinke sa superiornim genotipom, a koje se dalje mogu koristiti u oplemenjivačkom programu. Veličina uzorka koji je potreban za uspešnu primenu asocijativnog pristupa je manja u odnosu na druge metode mapiranja (*linkage mapping*). Ovom metodom se, pored identifikacije i mapiranja lokusa odgovornih za kvantitativna svojstva, mogu odrediti varijacije na nivou samog gena koji je odgovoran za pojavu dva ili više različitih fenotipova. Jedna od najvećih mana ovog pristupa je visok uticaj struktuiranosti populacije (uzorka) na svojstvo koje se analizira kao i stalna evolucija prirodnih populacija koje služe za analiziranje što utiče na LD i rezoluciju mapiranja. Asocijativno mapiranje iziskuje analizu velikog broja markera što može predstavljati ograničavajući faktor. Frekvencija pojedinih alela u analiziranom uzorku je veoma često mala čime se smanjuje nivo rezolucije, a važan deo nasledne osnove ostaje neistražen. (Braulio i sar., 2012).

Vrste iz *Eurocerasus* sekcije do sada nisu istražene u smislu primene asocijativnog mapiranja u analizi genoma, dok u okviru roda *Prunus* postoje prvi koraci ka primeni ove metode kod breskve (*P. persica*) (Micheletti i sar., 2015; Aranzana i sar., 2010; Cao i sar., 2012). Aranzana i saradnici (2010) su analizirali 224 sorte breskve i utvrdili da određeni lokusi pokazuju značajne vrednosti LD na rastojanjima od 13 do 15 cM. Autori smatraju da se ovako veliki raspon pokriven LD može objasniti sistemom oplodnje breskve, koja je samooplodna vrsta i efektom genetičkog uskog grla (bottleneck effect), koji se odigrao na početku domestikacije odn. oplemenjivanja i tokom stvaranja savremenih sorti. Cao i saradnici (2012) su u svom radu dobili nešto nižu vrednost na kojoj opada vrednost LD (6,01 cM), ali su oni otišli korak dalje u analizi i istražili vezanost između markera i deset kompleksnih fenotipskih svojstava. Ovim putem je utvrđeno postojanje vezanosti između

SSR markera CPPCT018 sa karakterom boja mesa breskve oko koštice. Isti autor je pored ovog utvrdio i značajan nivo vezanosti markera i za ostala analizirana svojstva. Markeri BPPCT023 na hromozomu 4 i BPPCT028 na hromozomu 1 su pokazali vezanost za svojstvo odvajanja mesa ploda od koštice. Dva markera su bila vezana za teksturu mesa ploda, a 5 sa dužinom vremena potrebnim za period jarovizacije. Težina i čvrstina ploda, vreme cvetanja i sazrevanja, kao i vreme potrebno za razviće ploda su takođe pokazali visok nivo asocijacije sa dva ili više SSR lokusa. Prethodna primena asocijativne analize vršena je na bazi SSR markera. Micheletti i sar. (2015) koriste SNP markere dobijene kroz primenu 9K SNP čipa za analizu 1576 uzoraka breskve. Značajne vrednosti LD pokrivaju u proseku fragmente dužine od 0,8 do 1,8Mb. Uočeno je prisustvo većih blokova pokrivenih visokim vrednostima LD koji se nalaze na hromozomima 1 i 6, a pokrivaju sekvence u dužini od 8 i 6Mb. Primenom MLM (Mixed Linear Model) metoda asocijativne analize za 7 važnih fenotipskih svojstava potvrđeno je prisustvo značajne vezanosti između fenotipa i genotipa u regionima koji su identifikovani u istraživanjima gde su korišćeni drugi vidovi mapiranja. U slučajevima gde nije bilo prethodnih podataka o regionima DNK odgovornim za određena fenotipska svojstva dobijeni su prvi rezultati sa visokim novoima asocijacije što može predstavljati prvi korak ka identifikaciji gena koji su za njih odgovorni.

Do sada mapiranje genoma trešnje i višnje se svodilo na primenu različitih tipova molekularnih markera i mapping populacija. Genetička mapa višnje je dobijena pomoću RFLP markera i populacije nastale ukrštanjem Rheinische Schattenmorelle i Erdi Botermo (RS × EB) (Wang i sar., 1998), a isti autori su 2000. godine proširili analizu na fenotipske karakteristike cveta i ploda čime su dobijeni prvi podaci o QTL regionima. Sorte trešnje Regina i Lapisn (R × L) su korišćene za stvaranje mapping populacije (Dirlewanger i sar., 2004), a ista populacija je ponovo analizirana primenom SNP čipa i dobijena je mapa visoke rezolucije (Klagges i sar., 2013). Pored ove mape, kod trešnje su kreirane još dve iz ukrštanja Emporior Francis i New York 54 (EF × NY) (Olmstead i sar., 2008) i međuvrskom hibridizacijom sorte Napoleon sa *Prunus nipponica* Matsum. (Clarke i sar., 2009). Guajardo i sar. (2015) koristeći GBS metodu SNP genotipizacije su objavili prvu genetičku mapu 'Rainier' x 'Rivedel' F1 populacije trešnje. Primenom GBS metode autori

su nakon obrade podataka i prečišćavanja rezultata prema određenim kriterijumima identifikovali 8476 SNP markera. Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima koje su objavili Klagges i saradnici (2013) može se uočiti znatno veći broj SNP markera koji je dobijen GBS metodom u odnosu na 6K SNP čip. Sa druge strane broj markera koji su mapirani korišćenjem DNK čip-a je nešto viši, a razlika je najverovatnije nastala usled primene različitih statističkih metoda mapiranja kao i velikog broja markera koji su mapirani na istu lokaciju u slučaju prve metode.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Rod *Prunus* je dosta raznovrstan i u sebe uključuje veliki broj komercijalno gajenih vrsta. Sve značajne vrste sa stanovišta ljudske ishrane su detaljno istražene, ali stalne promene uslova životne sredine zahtevaju i stvaranje nove varijabilnosti koja se može naći u divljim srodnicima. *Prunus fruticosa* je divlji srodnik višnje i kao takva predstavlja dobar izvor nove varijabilnosti koja može biti upotrebljena u oplemenjivačkim programima, ali do sada nije bila detaljnije istražena i analizirana.

Ovaj rad obuhvata fenotipsku i genotipsku karakterizaciju prirodnih populacija i *ex situ* kolekcija vrste *Prunus fruticosa* upotrebom fenotipskih i molekularnih markera (SSR i SNP) sa ciljem:

- ❖ Ispitivanja inter- i intrapopulacione varijabilnosti stepske višnje (*Prunus fruticosa*) upotrebom fenotipskih, mikrosatelitskih i SNP markera;
- ❖ Određivanja genetičke diferencijacije i struktuiranosti kao i genetičke udaljenosti između populacija ove vrste;
- ❖ Ispitivanja mogućnosti primene i efikasnost asocijativnog pristupa u genetičkim istraživanjima stepske višnje;
- ❖ Sagledavanja nivoa varijabilnosti kao početnog koraka za očuvanje genofonda stepske višnje, ali i uvođenje nove germplazme u oplemenjivački proces.

Genetička karakterizacija jedinki i populacija stepske višnje daće uvid u nivo varijabilnosti germplazme čime će se olakšati i ubrzati oplemenjivački proces kod trešnje i višnje. Takođe, ova saznanja mogu u značajnoj meri doprineti u donošenju odluka o zaštiti *in* ili *ex situ* populacija *Prunus fruticosa* koja se nalazi na crvenoj listi ugroženih vrsta R. Srbije.

#### 4. RADNA HIPOTEZA

Na osnovu podataka iz literature i prethodnih saznanja o stepskoj višnji (*Prunus fruticosa*) i ostalim blisko srodnim vrstama iz roda *Prunus* postavljene su sledeće radne hipoteze ovog istraživanja:

- ❖ Shodno broju istraženih lokaliteta i različitim biotičkim i abiotičkim faktorima koji na njima imaju uticaj očekuje se da populacije stepске višnje ispolje visok nivo fenotipske varijabilnosti;
- ❖ Istraživanjima diverziteta SSR markera, razvijenih iz genoma *Prunus persica*, *P. avium* i *P. cerasus*, u bliskom srodnim vrstama otkriven je visok nivo varijabilnosti, stoga se pretpostavlja da će odabrani mikrosatelitski lokusi ispoljiti dovoljan nivo raznolikosti u populaciono-genetičkim istraživanjima vrste *P. fruticosa*
- ❖ SNP markeri kod trešnje i višnje, kao bliskih srodnika vrste *P. fruticosa*, su brojni i pokazuju značajan nivo varijabilnosti te se može očekivati i da ovaj tip molekularnih markera ispolji nivo varijabilnosti neophodan u populaciono-genetičkim istraživanjima vrste *P. fruticosa*;
- ❖ Ispitivane populacije stepске višnje pokazuju visok nivo genetičke varijabilnosti i nizak stepen intra-populacione diferencijacije i struktuiranosti;
- ❖ Asocijativno mapiranje ima široku primenu u analizi genoma velikog broja biljnih vrsta, a primenom kod pojedinih predstavnika roda *Prunus* otkrivena je jaka vezanost između genotipa i agronomski važnih fenotipskih karakteristika, te se može pretpostaviti da je primenom asocijativnog mapiranja moguće identifikovati SNP markere za pojedine fenotipske karakteristike i kod vrste *P. fruticosa*
- ❖ Analizirani genotipovi stepске višnje pokazuju visok stepen varijabilnosti što predstavlja dobru osnovu za oplemenjenjivački rad i uvođenje nekih novih karaktera koji su izgubljeni u toku dugogodišnje selekcije.

## 5. MATERIJAL I METODE

### 5.1. Materijal

Biljni materijal je sakupljen iz šest prirodnih populacija koje se nalaze na teritoriji Republike Srbije (Vojvodina), kao i tri *ex situ* kolekcije na Oglednom polju Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu na Rimskim Šančevima i Kaću, i Oglednom polju Fakulteta za hortikulturu, Univerziteta Korvinus u Budimpešti, Mađarska (Tabela 1). *Ex situ* kolekcije na Rimskim Šančevima i Kaću su nastale u toku 2007. i 2008. godine uzorkovanjem sa lokaliteta Fruška gora 2 koji je analiziran i kao prirodna populacija, dok je kolekcija Korvinus univerziteta nastala 2000. godine sakupljanjem uzoraka iz različitih populacija prirodne flore Mađarske. Ukupno je analizirano 99 jedinki, a prilikom uzorkovanja vodilo se računa o udaljenosti između svake od njih kako bi se izbegli klonovi nastali iz korenovih izdanaka.

Tabela 1. Analizirane populacije stepske višnje, njihove GPS koordinate i broj uzorkovanih jedinki

Lokalitet	Tip populacije	Broj jedinki	Geografska dužina	Geografska širina
Popovica	Prirodna populacija	11	N 45.18385	E 19.8228833
Bački Jarak	Prirodna populacija	15	N 45.35005	E 19.9088
Titelski breg	Prirodna populacija	5	N 45.2945667	E 20.1885334
Vrdnik	Prirodna populacija	9	N 45.142233	E 19.80385
Fruška Gora 1	Prirodna populacija	17	N 45.15715	E 19.9275833
Fruška Gora 2	Prirodna populacija	18	N 45.1590167	E 19.91735
Rimski Šančevi	<i>Ex situ</i> kolekcija	14	N 45.34195	E 19.8413166
Budimpešta	<i>Ex situ</i> kolekcija	7	N 47.294776	E 19.010100
Kać	<i>Ex situ</i> kolekcija	3	N 45.271632	E 19.915465



Svaka jedinka je obeležena i data joj je šifra koja je kasnije upotrebljena prilikom obrade podataka. Šifra se sastoji od prefiksa koji predstavlja skraćeni naziv vrste Pf (*Prunus fruticosa*), nakon toga slede dva broja koja predstavljaju lokalitet uzorkovanja odnosno populaciju (Tabela 2). Poslednja dva broja šifre uzorka predstavljaju svaku jedinku iz analizirane populacije. U zavisnosti od molekularnog markera postoji razlika u pojedinim jedinkama koje su analizirane koje su se javile usled razlika u kvalitetu izolovane DNK, odnosno kod fenotipskih analiza došlo je do sušenja pojedinih jedinki te ih nije bilo moguće pratiti kroz tri godine. Inicijalno uzorkovanje izvršeno je tokom 2012. godine kada su sakupljeni listovi i jednogodišnje grančice za potrebe analiza diverziteta na genotipskom i fenotipskom nivou. Istovremeno, lokacije svih jedinki u prirodnim populacijama su zabeležene pomoću GPS uređaja eTrax<sup>®</sup> 30 (Garmin Ltd.) kako bi bilo moguće sakupiti uzorke za analizu fenotipskih podataka od istih jedinki u svakoj od narednih godina istraživanja (Slika 1).

Tabela 2. Oznake populacija i uzoraka stepske višnje analiziranih primenom različitih tipova markera. Spajanjem druge, treće i četvrte kolone unutar populacija dobija se šifra pojedinačnih uzoraka

Populacija	Oznaka vrste	Oznaka populacije	Oznaka uzorka
Popovica	Pf	01	01, 03, 04, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13
Bački Jarak	Pf	02	01, 02, 03, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
Titelski breg	Pf	03	01, 05, 06, 07, 08
Vrdnik	Pf	04	01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10
Fruška gora 1	Pf	05	01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
Fruška gora 2	Pf	06	04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24
Rimski Šančevi	Pf	07	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14
Budimpešta	Pf	08	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07
Kač	Pf	09	01, 02, 03



Slika 1. Satelitski prikaz uzorkovanih *in situ* i *ex situ* populacije stepske višnje sa teritorije Republike Srbije

## 5.2. Metode

### 5.2.1. Analiza fenotipskih podataka

Merenja na fenotipovima za procenu nivoa diverziteta su sprovedena na jednogodišnjim grančicama sakupljenim tokom juna meseca nakon završetka intenzivnog vegetativnog porasta sa svih odabranih jedinki iz njihovog prirodnog staništa u periodu od 2012. do 2014. godine. Ukupno su analizirane 22 kvalitativne i kvantitativne karakteristike na osnovu deskriptora objavljenih od strane International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) i The International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Analizirane karakteristike su obuhvatale: bujnost biljke, debljinu jednogodišnje grančice, dužinu internodija, brojnost lenticela, obojenost grančica, položaj pupoljaka, veličinu pupoljaka, obojenost mladih listova, dužinu i širinu liske, oblik lista, dužinu vrha lista, ugao vrha lista, oblik osnove lista, nazubljenost lista, dužinu lisne drške, prisustvo lisnih nektarija, broj lisnih nektarija, kao i njihovu poziciju, boju i oblik. Svi parametri su mereni na pet grančica sa po pet ponavljanja. Fenotipski podaci su analizirani na ukupno 75 jedinki, pošto su neke od jedinki uništene od trenutka kada su sakupljeni uzorci za analizu varijabilnosti DNK markera ili su se osušile nakon prve godine od početka uzorkovanja.

### 5.2.2. Izolacija DNK

Celokupna genomska DNK, za potrebe analize primenom SSR markera, izolovana je primenom modifikovane CTAB metode (Padmalatha i Prasad, 2006). Ekstrakcija je izvršena iz mladih listova koji su sakupljeni u toku 2012. godine prilikom prvog obilaska prirodnih populacija stepske višnje.

Mlado tkivo lista (od 50 do 100mg) macerirano je pomoću avana i tučka uz dodatatak 10mg polyvinylpyrrolidone (PVP-40), nakon čega je dodato 700 $\mu$ l 2XCTAB pufera (1M Tris pH=8; 1,5M NaCl; 0,5M EDTA; 0,05M CTAB; 2%  $\beta$ -mercaptoethanol) prethodno zagrejanog u inkubatoru na 65°C. Sadržaj avana je dodatno maceriran do

potpunog razlaganja biljnog tkiva i nakon toga preliiven u kivete. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani tokom 90min na 65°C, a njihova inverzija je vršena na svakih 30 minuta. U sledećem koraku u kivete je dodato 750 µl hloroform-izoamil alkohola (24:1), nakon čega je usledila inverzija tokom 30 minuta kako bi se izvršila precipitacija proteina i polisaharida. Uzorci su potom centrifugirani na 22°C i 12000 rpm u trajanju od 15 minuta. Po završetku centrifugiranja gornja tečna faza koja u sebi sadrži DNK prebačena je u nove kivete nastavcima sa zasećenim vrhom kako bi se smanjilo mehaničko oštećenje DNK i odredila količina prebačenog supernatanta. Sledeći korak je podrazumevao dodavanje približno iste količine hladnog (-20°C) izopropanola. Uzorci su blago invertovani i inkubirani minimum 30 min na -20°C kako bi se precipitirala DNK. Po završetku inkubacije izvršeno je centrifugiranje uzoraka pri istim uslovima kao i u prethodnoj fazi. Supernatant je odliven, a dobijeni pelet na dnu kivete je ispran sa 500µl hladnog etanola koji je u sledećoj fazi odliven, a preostala količina je ostavljena da ispari u termobloku na 37°C. Dobijeni pelet je ostavljen preko noći na 4°C uz dodatak 200µl TE<sup>-1</sup> pufera kako bi se rastvorio. Sledećeg dana uzorci su zagrejani na 65°C tokom 10min, nakon čega je u svaki dodata jednaka količina (200µl) smeše fenol-hloroform-izoamilalkola u odnosu 25:24:1. Usledila je inverzija uzoraka i ponovno centrifugiranje na 22°C i 8000rpm u trajanju od 15min. Zatim je supernatant ponovo odliven u nove kivete u koje je potom dodata jednaka količina hloroform-izoamil alkohola (24:1) i novi ciklus centrifugiranja (22°C, 12000 rpm, 15min). Gornja faza je prebačena u nove kivete nakon čega je dodat hladan apsolutni etanol i 1/10 količine 3M natrijum-acetata. Posle sprovedene inkubacije od 30 min na -20°C uzorci su centrifugirani (22°C, 12000 rpm, 15min), da bi nakon završetka centrifugiranja supernatant bio odliven, a pelet koji je ostao na dnu kivete osušen u termobloku na 37°C i rastvoren u 100µl TE<sup>-1</sup> pufera.

Koncentracija i kvalitet, odnosno, čistoća izolovane genomske DNK je određena pomoću Bio-Spec Nano spektrofotometra (Shimadzu). Sve DNK su razblažene na radnu koncentraciju od 10ng/µl i čuvane na -20°C do upotrebe.

Izolacija genomske DNK za potrebe GBS analize sprovedena je iz liofilizovanih listova. Uzorci su dodati u plošicu sa 96 bunarčića zajedno sa puferom za izolaciju A koji je sadržao 100mM Tris-HCl (pH=8), 50mM EDTA (pH=8), 500mM NaCl, 2%PVP i 2%

SDS. Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su na 55°C trajanju od jednog sata nakon čega su centrifugirani na 3200rpm tokom 20 minuta. Dobijeni supernatant koji sadrži DNK prenet je u novu pločicu sa bunarčićima u koji je dodat i izolacioni pufer B u sastavu 3M kalijum acetat i 5M acetata kako bi se precipitali proteini i ostale nečistoće, nakon čega je usledila inkubacija od 20 minuta na 4°C i centrifugiranje na 3200rpm tokom 20 minuta. Supernatant je ponovo izdvojen i dodato je 60% od ukupne količine izopropanola, nakon čega su uzorci ostavljeni preko noći na -20°C. DNK je izdvojena centrifugiranjem na 4000rpm u trajanju od 30 minuta, a dobijen pelet je ispran 2 puta sa 70% etanolom, osušen u termobloku i rehidriran sa 100ml H<sub>2</sub>O. Koncentracija DNK je utvrđena pomoću pico-green boje na spektrofotometru (BioTek plate reader, Winooski, VT, USA)

### 5.2.3. Poreklo i opis prajmera korišćenih u analizi varijabilnosti SSR lokusa

Za analizu diverziteta sakupljenih uzoraka korišćeno je 45 mikrosatelitskih markera poreklom iz breskve (*Prunus persica*) iz serija BPPCT (Dirlewanger i sar., 2002), M i MA (Yamamoto i sar., 2002) i UDP (Cipriani i sar., 1999), 6 markera iz UCD-CH serije (Struss i sar., 2003) iz trešnje (*P. avium*), ali i markeri PS12 (Genome Database of Rosaceae, GDR) i Ps9f8 (Joobeur i sar., 2000). Pored ovih analiziran je i marker PceGA34 (Olmstead i sar., 2008) koji vodi poreklo iz genoma višnje (*P. cerasus*). Podaci o mikrosatelitskim markerima primenjenim na kompletnom setu uzoraka dati su u tabeli 4, dok su podaci o markerima koji su korišćeni samo tokom preliminarnog ispitivanja dati u prilogu 1.

### 5.2.4. Amplifikacija SSR lokusa

Lančane reakcije polimeraze (PCR reakcije) su sprovedene u T Personal i T Gradient PCR (Biometra®) u finalnoj zapremini reakcije od 20µl. Svaka reakcija je sadržala 1x Taq pufer (Thermo Scientific) koji u sebi sadrži 20mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,15µM oba prajmera, 1 jedinicu Dream Taq DNK polimeraze (Thermo Scientific) i 100ng DNK.

Temperaturni uslovi za svaki od analiziranih setova prajmera postavljeni su prema autorima (Cipriani i sar., 1999; Dirlewanger i sar., 2002; Yamamoto i sar., 2002; Struss i sar., 2003) koji su prvi identifikovali prajmere (Tabela 3), dok je za za lokuse PceGA, PS12, Ps9f8 i pchcms3 primenjen isti program kao za set BPPCT. Nezavisno od seta markera, ciklus koji obuhvata denaturaciju, vezivanje prajmera i ekstenziju ponovljen je 35 puta.

Tabela 3. Temperaturni profili PCR reakcije za svaki od analiziranih setova SSR markera

Korak PCR reakcije	BPPCT	UCD-CH	UDP	M i MA
Uvodna denaturacija	94°C – 60s	94°C – 300s	94°C – 300s	94°C – 240s
Denaturacija	94°C – 45s	94°C – 60s	94°C – 45s	94°C – 60s
Vezivanje prajmera	57°C – 45s	55°C – 60s	57°C – 45s	55°C – 60s
Ekstenzija	72°C – 120s	72°C – 120s	72°C – 45s	72°C – 120s
Finalna ekstenzija	72°C – 240s	72°C – 420s	72°C – 480s	72°C – 420s

Tabela 4. SSR markeri poreklom iz breskve, trešnje i višnje korišćeni na setu od 95 uzoraka iz 6 prirodnih populacija i 3 *ex situ* kolekcije stepske višnje

Marker	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Ponavljajući motiv	Vrsta	Tip SSR markera	Hromozom	Očekivana veličina
BPPCT005	F: GCTAGCAGGGCACTTGATC R: ACGCGTGTACGGTGGAT	(AG) <sub>27</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	143
BPPCT007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	(AG) <sub>22</sub> (CG) <sub>2</sub> (AG) <sub>4</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G3	149
BPPCT008	F: ATGGTGTGTATGGACATGATGA R: CCTCAACCTAAGACACCTTCACT	(GA) <sub>36</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G6	148
BPPCT010	F: AAAGCACAGCCATAATGC R: GTACTGTTACTGCTGGGAATGC	(AG) <sub>4</sub> GG(AG) <sub>10</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	131
BPPCT013	F: ACCCACAAATCAAGCATATCC R: AGCTTCAGCCACCAAGC	(AG) <sub>28</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G2	183
BPPCT022	F: TTGCGTCTCGCAGGTTATA R: CTACCCCTGCCACAAGCT	(AG) <sub>22</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	132
BPPCT024	F: GAGGAATGTGCCTCTTCTGG R: CTCCCGTACGCGTTTACC	(AG) <sub>15</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G2	96
BPPCT027	F: CTCTCAAGCATCATGGGC R: TGTTGCCCGGTTGTAATATC	(GA) <sub>11</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	249
BPPCT028	F: TCAAGTTAGCTGAGGATCGC R: GAGCTTGCCTATGAGAAGACC	(TC) <sub>15</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	164
BPPCT030	F: AATTGTTACTTGCCAATGCTATGA R: CTGCCTTCTGCTCACACC	(AG) <sub>25</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G2	175
BPPCT032	F: TTAAGCCACAACATCCATGAT R: AATGGTCTAAGGAGCACACG	(AG) <sub>10</sub> CG(AG) <sub>13</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G5	203
BPPCT034	F: CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R: CAATGGAGAATGGGGTGC	(GA) <sub>19</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G2	228
BPPCT036	F: AAGCAAAGTCCATAAAAACGC R: GGACGAAGACGCTCCATT	(AG) <sub>11</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	253
BPPCT038	F: TATATTGTTGGCTTCTTGCATG R: TGAAAGTGAAACAATGGAAGC	(GA) <sub>25</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G5	135

Tabel 3. Nastavljeno

BPPCT041	F: CAATAAGGCATTTGGAGGC R: CAGCCGAACCAAGGAGAC	(AG) <sub>21</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G5	220
BPPCT042	F: AACCCCTACTGGTTCCTCAGC R: GACCAGTCCTTTAGTTGGAGC	(CT) <sub>25</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G5	243
M3b	F: CGAGAAACTCTGCACAGAGA R: GTAGCCGATTCAAAGCCTCC	(AG) <sub>13</sub> G(GA) <sub>6</sub>	<i>P. persica</i>	cDNK	G1	224
M12a	F: AGGTGCCTCATCTTCTTCTCTTG R: GTGTGGTGAGGGGTGAGAGC	(AG) <sub>13</sub>	<i>P. persica</i>	cDNK	G4	176
MA010a	F: ACCTGTTTCTACTCACA R: CCCACACCACTACTCTACAC	(GA) <sub>20</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G7	122
MA017a	F: AAGGCATATAGCGCAGGT R: ATCTGAGGCCTTCAACACTT	(GA) <sub>7</sub> CG(GA) <sub>19</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G8	164
MA034a	F: GACCATTGCCTCGTAATCTT R: AGCGCTAGCTATCACCTACC	(AG) <sub>18</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G3	220
UCD-CH12	F: AGACAAAGGGATTGTGGGC R: TTTCTGCCACAAACCTAATGG	(CA) <sub>14</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G2	180
UCD-CH14	F: GTACACGGACCCAATCCTG R: TCTAACATCATGTAAACATCG	(CT) <sub>18</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G7	145
UCD-CH17	F: TGGACTTCACTCATTTTCAGAGA R: ACTGCAGAGAATTTCCACAACCA	(CT) <sub>11</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G4	188
UCD-CH19	F: GTACAACCGTGTTAACAGCCTG R: ACCTGCACTACATAAGCATTG	(CA) <sub>12</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G3	122
UCD-CH31	F: TCCGCTTCTCTGTGAGTGTG R: CGATAGTTTCCTTCCCAGACC	(CT) <sub>26</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G1	125
UCD-CH39	F: CACTGTCTCCCAGGTAAACTC R: CCTGAGCTTTTGACACATGC	(CT) <sub>28</sub>	<i>P. avium</i>	Genomski	G7	142
UDP-001	F: AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R: TGCCATAAGGACCGGTATGT	(CA) <sub>17</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G6	120
UDP-005	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCACCCAG	(AC) <sub>16</sub> TG(CT) <sub>2</sub> C A(CT) <sub>11</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	155
UDP-018	F: TTCTAATCTGGGCTATGGCG R: GAAGTTCACATTTACGACAGGG	(AC) <sub>21</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	253



Tabela 3. Nastavljeno

UDP-405	F: ACGTGATGAACTGACACCCA R: GAGTCTTTGCTCTGCCATCC	(AG) <sub>9</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G7	104
UDP-406	F:TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA R: ATGGGTCGTATGCACAGTCA	(AG) <sub>15</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G2	101
UDP-409	F: GCTGATGGGTTTTATGGTTTTC R: CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	(AG) <sub>19</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G8	129
UDP-412	F: AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	(AG) <sub>28</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G6	81
PceGa34	F: GAACATGTGGTGTGCTGGTT R: TCCACTAGGAGGTGCAAATG	(GA) <sub>n</sub>	<i>P. cerasus</i>	Genomski	G2	155

## 5.2.5. Detekcija i analiza varijabilnosti produkata PCR reakcije

### 5.2.5.1. Detekcija produkata PCR reakcije

PCR produkti svih reakcija su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu u prisustvu 0,5x TBE (44,5mM Tris Base, 44,5mM borna kiselina, 1mM EDTA pH=8) sa ciljem detekcije i određivanja približnih veličina dobijenih produkata. Dobijeni produkti su vizuelizovani dodatkom 0,02% EtBr (etidijum-bromida) u gel koji je zatim posmatran pod UV lampom. Veličine umnoženih sekvenci određivane su poređenjem sa veličinama fragmenata lestvice GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus i GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

### 5.2.5.2. Analiza varijabilnosti produkata PCR reakcije

Analiza alelne varijabilnosti mikrosatelita i genotipizacija jedinki izvršena je pomoću standardne 6% denaturišuće poliakrilamid gel elektroforeze (PAA) (Sambrook i Russel, 2001).

Početak rada je podrazumevao detaljnu obradu i pripremu staklenih ploča nakon čega je sproveden postupak izlivanja gela. PAA gel je pravljjen primenom gel smeše koju su činili: 10xTBE(890mM TrisBase, 890mM borna kiselina, 20mM EDTA pH=8), 4M urea i 40% A+B smeša (0,65M akrilamid i 0,01M bisakrilamid). Pre samog postupka izlivanja gela u 70ml gel smeše dodavano je 350µl 10% amonijum-persulfata i 35µl TEMED-a.

Priprema uzoraka za elektroforezu je podrazumevala mešanje 5µl PCR produkata sa 2µl formamidske boje (0,05M EDTA pH=8, dejonizovani formamid, boje xylene-cyanol i bromo-phenol blue) i denaturaciju na 95°C tokom pet minuta u Applied Biosystems Veriti® thermal cycler-u (Applied Biosystems®).

Vertikalna PAA elektroforeza je sprovedena primenom 1X TBE (89mM TrisBase, 89mM borna kiselina, 2mM EDTA pH=8) kao gornjim puferom i 1X TBE sa dodatkom natijum-acetata kao donjim puferom. Pre unošenja uzoraka na gel elektroforeza je tekla na konstantnih 50W u trajanju od 30 do 45min, a nakon unošenja uzoraka na konstantnih 80W tokom 2 sata i 15min. Nakon završetka elektroforeze gelovi rashlađeni ledom i

staklene ploče između kojih je razliven gel su razdvojene. Gelovi su fiksirani 30 min u smeši za fiksiranje (10% etanol i 5% glacijalna sirćetna kiselina) nakon čega su isprani destilovanom vodom dva puta po dva minuta. Sledeći korak je predstavljalo bojenje gelova u 0,12M rastvoru srebro-nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) tokom 20 minuta, a višak srebra je ispran destilovanom vodom dva puta po deset sekundi. Gelovi su zatim potopljeni u razvijlač (0,375M NaOH, 0,2% formalin, 0,22mM  $\text{NaBH}_4$ ), a trajanje ove faze je zavisilo od intenziteta bojenja traka na gelu. Poslednji korak je bilo potapanje gelova u stop rastvor (0,141M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) tokom 2min i ispiranje u destilovanoj vodi tokom 10sec nakon čega su gelovi sušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi.

Gelovi su skenirani CanoScan4200F (Canon Inc.) aparatom i analizirani softverskim paketom GelAnalyzer 2010a ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)). Veličina dobijenih PCR produkata je određena u odnosu na referentne vrednosti fragmenata lestvice DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich®).

### 5.2.5.3. Identifikacija alela za S-RNazu

Različiti S aleli su identifikovani PCR reakcijom pomoću dva konsenzus prajmera (Sonneveld i sar., 2003) za prvi i drugi intron gena za S-RNazu. PCR reakciju za prvi intron u zapremini od 25 $\mu\text{l}$  činili su: 1x Taq pufer (Thermo Scientific) koji u sebi sadrži 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTP, 0,2 $\mu\text{M}$  oba prajmera, 0,625 jedinica Dream Taq DNK polimeraze (Thermo Scientific) i 100ng DNK uz sledeće uslove 2min na 94°C, nakon čega je usledilo 35 ciklusa ponavljanja 1min denaturacije na 94 °C, vezivanje prajmera 1 min na 54 °C i ekstenzija na 72 °C sa finalnom ekstenzijom od 5 min na 72 °C. Drugi intron je umnožavan po istom protokolu uz povećanje koncentracije Taq polimeraze na 1,25 jedinica. Program umnožavanja je podrazumevao hot start metod sa inicijalnom denaturacijom od 2 min na 94 °C, 10 ciklusa od 10 sekundi na 94°C, 2min na 58 °C i 2 min na 68 °C nakon čega je usledilo dodatnih 25 ciklusa sa istim parametrima, ali uz povećanje vremena ekstenzije za 10 sekundi po ciklusu. Dobijeni produkti su razdvojeni na 2,0% agaroznom gelu za prvi i 1,3% za drugi intron u trajanju od 6 časova na 80V i posmatrani pod UV svetlom. Veličine alela određene su poređenjem sa veličinama fragmenata lestvice GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus i GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

### 5.2.6. Identifikacija SNP markera Genotyping by Sequencing (GBS) metodom

Genotipizacija putem sekvenciranja (GBS) je sprovedena na Clemson univerzitetu [Clemson University Genomic Center (CUGI), Clemson, SC, USA] prema protokolu koji je razvijen od strane Elshire i sar. (2011). Uzorci DNK (100 ng) sa svih lokaliteta su isečeni pomoću 5 jedinica ApeKI restriktionog enzima (75 °C, 2 sata), koji prepoznaje restriktiono mesto u dužini od pet baznih parova (GCWGC, pri čemu W odgovara A ili T). Biblioteke za GBS sekvenciranje su pripremljene ligacijom jedinstvenih nukleotidnih ApeKI adaptera (barkodova) na DNK isečenu restriktionim enzimom na 16 °C, a inkubacija je tekla preko noći. Deseti deo svakog uzorka je prečišćen pomoću Qiaquick PCR kolone za prečišćavanje i ispran sa 50 µl 10mM Tris pufera (pH=8). GBS biblioteke pripremljene na ovaj način su umnožene tokom 15 ciklusa i zajedno sekvencirane i jednoj liniji pomoću Illumina HiSeq2500.

Rezultati sekvenciranja su obrađeni pomoću osnovnih parametara u TASSEL 4.0 GBS pipeline ([www.maizegenetics.net](http://www.maizegenetics.net)). Dobijene sekvence su upoređene (aligned) sa genomom breske v1.0 (Peach v1.0, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) primenom Bowtie v2.1 (Langmead i sar., 2012; Verde i sar., 2013). Nakon poredjenja sa genomom breskve v.1.0 SNP markeri su grupisani po hromozomima u vcf i hapmap fajlove a zatim vizuelizovani u okviru TASSEL 5.0 softvera (Bradbury i sar., 2007).

### 5.2.7. Obrada podataka

Statistička analiza fenotipskih i genotipskih podataka za 95 uzoraka iz devet populacija stepske višnje sprovedena je primenom različitih progamskih paketa.

#### 5.2.7.1. Procena diverziteta na osnovu fenotipskih podataka

Statistička analiza rezultata dobijenih na osnovu fenotipskih podataka podrazumevala je primenu analize glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) i klaster analizu, a sprovedene su primenom programskog paketa Statistica 12 (StatSoft® Inc, Tulsa, OK, USA).

Analiza glavnih komponenti (PCA) sprovedena je primenom srednjih vrednosti za svaku od merenih karakteristika usled velikog broja analiziranih uzoraka čime je

omogućeno jednostavnije praćenje dobijenih rezultata. Klaster analiza je, takođe, sprovedena na osnovu srednjih vrednosti za svaku fenotipsku osobinu, a udaljenost između uzoraka je izračunata primenom Euklidovog rastojanja i UPGMA metode klasifikovanja. Takođe, u okviru klaster analize sprovedena je i analiza na osnovu K srednjih vrednosti (K Means Clustering) gde je prethodno definisani broj klastera odgovarao podacima dobijenim genotipskom analizom (K=5 i K=8). Pre klaster i PCA analize podaci su standardizovani pomoću STANDARDIZE procedure u okviru Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) čime je standardna devijacija za sve parametre svedena na 1 čineći svaki od njih jednako važnim u procesu kreiranja klastera. Klaster analiza i PCA analiza su sprovedene istovremeno i za kvantitativne i za kvalitativne fenotipske osobine.

#### **5.2.7.2. Procena varijabilnosti na osnovu podataka dobijenih analizom SSR markera**

Određivanje parametara genetičke varijabilnosti sprovedeno je pomoću programa AUTOTET (Tharl i Young, 2000). Izračunat je broj alela po lokusu ( $N_o$ ), broj različitih genotipova (genotypic richness,  $G$ ), uočena ( $H_o$ ) i očekivana heterozigotnost ( $H_e$ ). Efektivni broj alela izračunat je prema Hartl i Clark (1997).

Analiza genetičke strukture populacija stepske višnje sprovedena je Bajesovim klaster metodom implementiranim u softverski paket STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard i sar., 2000). Parametri po kojima je sprovedena obrada podataka podrazumevala je primenu „admixture ancestry“ modela zajedno sa „correlated allele frequency“ modelom. Dužina „burn-in“ perioda podešena je na  $10^5$  iteracija usled čega je usledilo  $10^6$  Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ponavljanja. Input fajl pored genotipskih podataka za svaku od analiziranih individua sadržao je i podatak o pripadnosti određenoj populaciji, dok su ostali parametri ostavljeni na osnovnim podešavanjima. Za određivanje broja klastera ( $K$ ),  $K$  vrednost je podešena na 2-10, a za svaku od ovih vrednosti sprovedeno je 5 nezavisnih ponavljanja.

Određivanje najverovatnijeg broja klastera u analiziranom setu podataka sprovedeno je primenom Structure Harvester (Earl i vonHoldt, 2012) softvera u okviru kog su upotrebljena dva *ad hoc* metoda. Prvi se zasnivao na stopi promene između dve

vrednosti za  $K - \Delta K$  metod (Evano i sar., 2005), a drugi je zasnovan na metodi vrednosti  $\ln P(D)$  (log probability of data) koji su opisali Pritchard i sar. (2000).

Rezultati dobijeni nakon analize programskim paketom STRUCTURE su upotrebljeni za dalju obradu pomoću CLUMPP 1.1.2. (Jacobsson i Rosenberg, 2007) koji izračunava srednje vrednosti iz 5 nezavisno sprovedenih replikacija za svaku od zadatih  $K$  vrednosti. Ovako dobijeni rezultati su grafički predstavljeni pomoću programa DISTRUCT (Rosenberg, 2004). Oba programska paketa pokrenuta su uz pomoć online servera CLUMPAK (Kopelman i sar., 2015).

Mikrosatelitski (SSR) markeri su koodominantni, ali za potrebe klaster analize je ocenjivano prisustvo (1) ili odsustvo (0) pojedinačnih pojedinačnih traka na gelu analiziranom lokusu za svaku od individua. Ovako dobijeni rezultati su analizirani u softverskom paketu FreeTree (Pavliček 1999), a genetička bliskost određena je primenom Nei i Li koeficijenta (Nei i Li 1979). Dendrogram je konstruisan primenom UPGMA metoda uz pomoć FigTree v1.4.2 softvera (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Analiza glavnih komponenti (Principal Coordinate Analysis, PCoA) za podatke dobijene na osnovu analize svih uzoraka uz pomoć mikrosatelitskih markera sprovedena je primenom Polysat 1.3 (Clark i Jasieniuk, 2011) paketa za analizu podataka dobijenih kod poliploidnih vrsta u okviru R softvera. Za PCoA analizu i konstruisanje grafika primenjene su Bruvo (Bruvo i sar., 2004) i Lynch (Lynch, 1990) distance. Bruvo koeficijent je pogodan za analizu parcijalnih heterozigota kod poliploidnih vrsta i vrsta sa različitim nivoom ploidnosti, a u obzir uzima i mutacije koje su dovele do različitog broja ponovaka u okviru mikrosatelitnog lokusa. Sa druge strane, Lynch koeficijent se zasniva na prostoj analizi udaljenosti između analiziranih individua, odnosno prema broju zajedničkih bendova (alela).

Matrica prostorne udaljenosti između parova populacija na osnovu GPS koordinata dobijena je primenom softvera SPAGeDi 1.4 (Hardy i Vekemans, 2002). Isti softver je upotrebljen za određivanje genetičke udaljenosti između populacija na osnovu Nei i Li koeficijenta (Nei i Li, 1979), kao i  $F_{st}$  (Weir i Cockerham, 1984) i  $G_{st}$  (Pons i Petit, 1996) vrednosti. Ovako dobijene matrice upoređene su primenom Mantel testa sa nivoom signifikantnosti 0,05 uz primenu XLSTAT (Addinsoft™).

### 5.2.7.3. Procena varijabilnosti na osnovu podataka dobijenih analizom SNP markera

Varijabilnost na nivou SNP markera procenjen je uz primenu TASSEL 5.0 softvera (Bradbury i sar., 2007). SNP markeri su filtrirani uz primenu sledećih parametara: postojanje podataka za SNP u okviru analiziranih uzoraka 75% (72 od 95), minimalna frekvencija analiziranih alela (Minor Allele Frequency, MAF) iznosila je  $>0,05$  uz opciju isključivanja alela ispod minimalne frekvencije (Remove minor SNP state). Primenom TASSEL softvera sprovedena je PCA analiza, genetička udaljenost između analiziranih uzoraka i klaster analiza primenom UPGMA metoda na osnovu podataka dobijenih za SNP markere, Dendrogram je grafički predstavljen primenom FigTree v1.4.2 softvera (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Analiza genetičke strukture populacija stepske višnje sprovedena softverskim paketom fastSTRUCTURE verzija 1.0 (Raj i sar., 2014). Isti softver je upotrebljen za određivanje najverovatnijeg broja klastera (K). Dobijeni rezultati za najverovatnije K su grafički predstavljeni pomoću programa DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

Rezultati fenotipskih merenja i SNP markera su upotrebljeni za određivanje prisustva njihove povezanosti (asocijacije). Tom prilikom je primenjen generalni linearni model (General Linear Model, GLM) koji je sastavni deo TASSEL 5.0 softvera (Bradbury i sar., 2007) i koristi podatke vezane za strukturu populacije koji su dobijeni iz analize podataka pomoću fastSTRUCTURE verzija 1.0 (Raj i sar., 2014). Hardy-Weinberg -ovog ekvilibrijum (HWE) je utvrđen za svaki SNP marker pomoću PLINK softvera (Purcell i sar. 2007). SNP markeri koji su pokazivali odstupanje od HWE ( $p < 10e-4$ ) su odbačeni (58,908) i set od 111.348 SNP markera je korišćen u asocijativnoj analizi. Ovako dobijeni rezultati su grafički predstavljeni u vidu Menhetn grafika (Manhattan plot) pomoću TASSEL 5.0 (Bradbury i sar., 2007).

Softver SPAGeDi 1.4 (Hardy i Vekemans, 2002) upotrebljen je za određivanje nivoa diverziteta unutar svake od analiziranih populacija primenom genetičkog diverziteta korigovanog na osnovu veličine populacija (Nei, 1978) za SSR markere i S allele. Ovako dobijeni rezultati su testirani na postojanje korelacije programskim paketom Statistica 12 (StatSoft® Inc, Tulsa, OK, USA).

## 6. REZULTATI

### 6.1. Fenotipski diverzitet

Podaci dobijeni merenjem i ocenjivanjem kvantitativnih i kvalitativnih fenotipskih osobina utkazali su na postojanje varijabilnosti unutar i između analiziranih populacija (Tabela 5). Najviši stepen varijabilnosti zapažen je kod kvantitativnih osobina: debljina grančica, dužina i širina lista, dužina lisne drške, dužina internodija. Analizom bujnosti ustanovljena je najmanja bujnost kod jedinki iz populacije Bački Jarak, dok je najveća zabeležena u populaciji Vrdnik. Ostale populacije su pokazale veličine koje su se kretale od srednje do umerene bujnosti zavisno od jedinke. Kvalitativni karakteri su pokazali znatno niži stepen polimorfizma. Najveća varijabilnost uočena je kod veličine pupoljka, pri čemu su najmanji pupoljci bili kod celokupne populacije Titelski breg, većeg broja jedinki iz populacije Bački Jarak, ali i kod pojedinih predstavnika ostalih populacija. Najveći pupoljci su zabeleženi u većini uzoraka iz populacija Vrdnik i Popovica, ali i u značajnom delu populacije Fruška Gora 2. Odsustvo varijabilnosti je postojalo samo za prisustvo lisnih žlezda, odnosno sve jedinke u okviru svake od analiziranih populacija su imale lisne žlezde, a njihov položaj, oblik, broj i boja su varirale u veoma malom stepenu (Tabela 5).

Klaster analiza dobijena na osnovu analiziranih fenotipskih karaktera, primenom Euklidovog rastojanja i UPGMA metode klasifikovanja, nije jasno razvrstala genotipove gledano na osnovu pripadnosti svakoj od populacija (Slika 2). Dobijeni dendrogram moguće je analizirati kroz tri manja i jedan veći klaster. Prvi klaster je sastavljen samo od dve jedinke poreklom iz *ex situ* kolekcija Kać i Rimski Šančevi, s tim da su jedinke Pf\_0902 i Pf\_0706, po jedna iz svake populacije udaljenije od ostalih. Sledeći klaster koji se nadovezuje na prethodno pomenuti sačinjen od svih uzoraka sa Titelskog brega, kao i uzoraka iz Bačkog Jarka (Pf\_0201, Pf\_0202 i Pf\_0217) i Pf\_0702 sa Rimskih Šančeva. Tri uzorka koja vode poreklo sa Popovice (Pf\_0101, Pf\_0103, Pf\_0107) zajedno sa Pf\_0616 (Fruška Gora 2) grade mali klaster koji sledi nakon prethodno navedenih, a prethodi velikom klasteru koji je sačinjen od preostalih uzoraka. U okviru ovog velikog klastera moguće je uočiti grupisanje uzoraka iz Budimpešte (Pf\_0801, Pf\_0802, Pf\_0804, Pf\_0805, Pf\_0807) u manji podklaster, kao i dela uzoraka iz Bačkog Jarka (Pf\_0201, Pf\_0202, Pf\_0203, Pf\_0207, Pf\_0208, Pf\_0209, Pf\_0210, Pf\_0211, Pf\_0212, Pf\_0213, Pf\_0214, Pf\_0215, Pf\_0216, Pf\_0217, Pf\_0218).

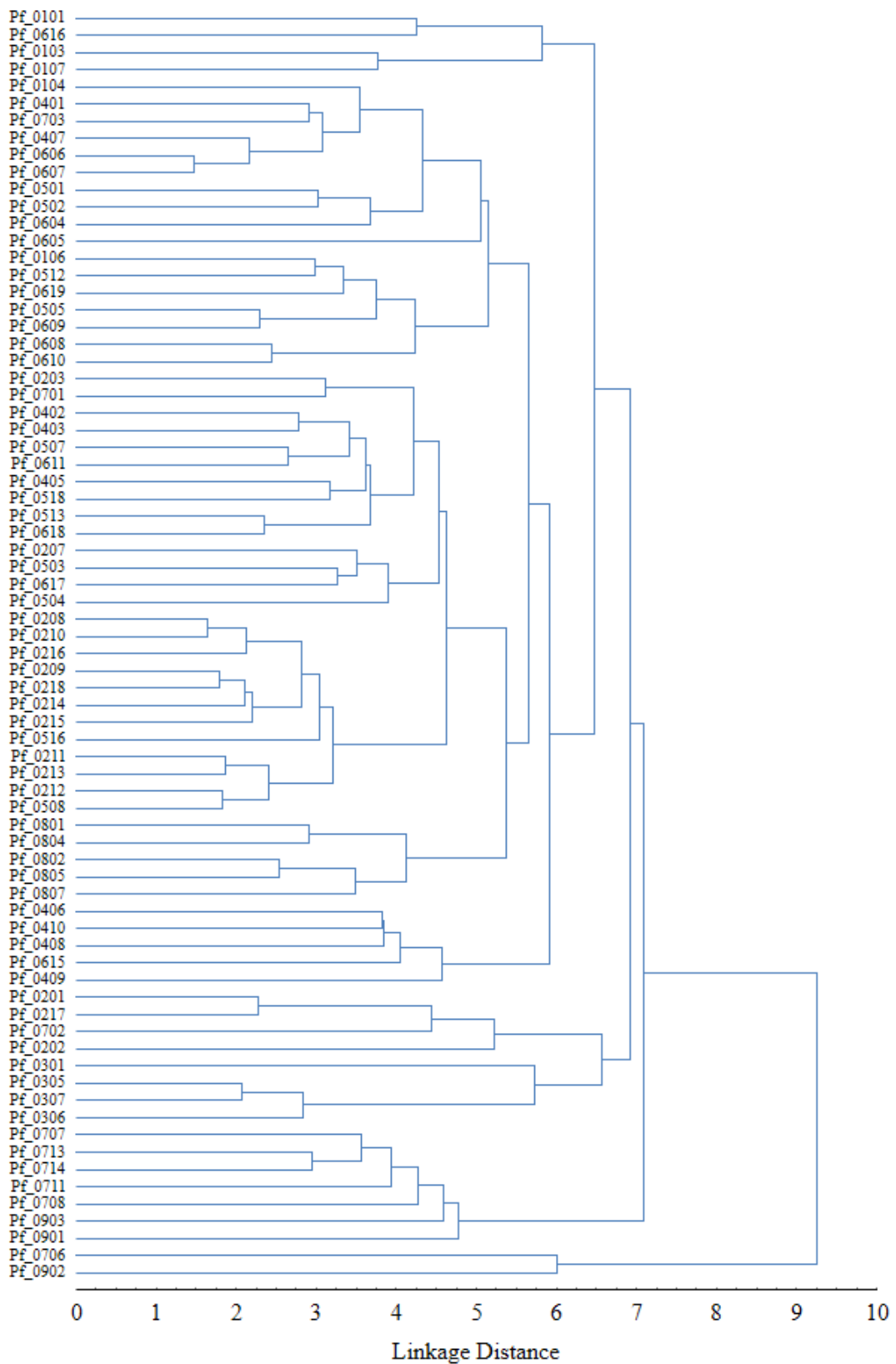


Tabela 5. Prosečne vrednosti kvantitativih i kvalitativnih parametara zabeležene tokom tri godine istraživanja (2012 – 2014)

	B	DG	DI	BL	OG	PP	VP	OML	DL	ŠL	OBL	DVL	UVL	OOL	NL	DLD	PLŽ	BRŽ	PŽ	BŽ	OŽ
Pf_0101	3	0,37	2,06	3,00	3,00	2,80	5,00	7,00	5,54	3,09	2,00	5,00	1,00	2,00	1,00	1,06	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0103	3	1,34	0,92	5,00	4,60	3,00	7,00	7,00	3,65	2,18	4,00	5,00	2,00	2,00	2,00	0,68	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0104	3	1,49	1,94	4,20	6,20	3,00	7,00	7,00	5,04	2,32	2,00	7,00	1,00	1,00	3,00	0,83	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0106	3	1,22	1,28	5,00	5,00	3,00	6,20	7,00	3,58	2,08	2,00	5,00	2,00	2,00	2,00	0,62	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0107	3	1,16	1,19	3,40	3,40	3,00	4,20	7,00	4,46	2,72	4,00	5,00	1,00	2,00	3,00	0,86	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0201	1	1,16	1,39	6,60	7,00	3,00	3,00	5,00	2,79	1,08	1,00	7,00	2,00	1,00	3,00	0,44	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0202	1	1,17	1,34	5,00	5,00	3,00	3,00	3,00	2,90	1,08	1,00	7,00	1,00	1,00	2,00	0,41	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0203	1	1,09	1,30	4,20	6,20	3,00	5,40	6,60	2,92	1,13	1,00	7,00	1,00	1,00	1,00	0,49	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0207	1	1,06	1,10	5,00	7,00	3,00	7,00	7,00	3,07	1,31	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	0,37	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0208	1	1,05	1,42	3,00	3,00	3,00	3,00	7,00	3,26	1,38	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,49	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0209	1	1,16	1,42	5,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,87	1,19	2,00	7,00	2,00	1,00	1,00	0,44	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0210	1	1,04	1,18	3,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,81	1,14	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,44	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0211	1	1,29	1,36	5,00	5,00	3,00	3,00	5,00	3,60	1,62	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,54	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0212	1	1,09	1,31	3,00	5,00	3,00	3,00	5,00	3,12	1,30	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,42	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0213	1	1,12	1,36	5,00	7,00	3,00	3,00	5,00	2,76	1,18	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,40	9,00	1,75	1,00	2,00	1,00
Pf_0214	1	1,18	1,37	7,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,78	1,12	2,00	7,00	2,00	1,00	1,00	0,42	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0215	1	1,19	1,44	5,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,92	1,22	2,00	7,00	2,00	1,00	2,00	0,43	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0216	1	1,23	1,17	3,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,77	1,14	2,00	7,00	2,00	1,00	1,00	0,44	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0217	1	0,93	1,80	6,60	7,00	3,00	3,00	5,00	3,11	1,31	1,00	7,00	1,00	1,00	3,00	0,53	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0218	1	1,13	1,25	5,00	5,00	3,00	3,00	7,00	3,22	1,34	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,41	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0301	1	1,15	1,89	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,56	1,79	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,56	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0305	1	0,96	2,00	4,60	5,00	2,20	3,00	5,80	3,64	1,78	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	0,53	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0306	1	0,92	1,49	3,00	3,00	2,00	3,00	5,00	3,43	1,54	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00	0,54	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0307	1	1,01	1,42	3,80	3,40	2,20	3,00	7,00	3,46	1,58	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	0,64	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0401	5	1,35	2,22	4,20	6,20	3,00	3,80	7,00	4,13	2,09	1,00	7,00	1,00	1,00	2,00	1,10	9,00	2,00	1,00	2,80	1,00
Pf_0402	5	1,14	1,01	4,20	6,20	3,00	5,80	7,00	3,91	1,82	2,00	7,00	1,00	1,00	2,00	0,98	9,00	1,80	1,00	3,00	1,00
Pf_0403	5	1,36	0,74	4,60	7,00	3,00	5,00	7,00	3,24	1,40	2,00	7,00	1,00	1,00	2,00	0,88	9,00	1,80	1,00	2,00	1,00
Pf_0405	5	1,19	1,37	3,40	5,40	3,00	6,60	7,00	2,31	1,34	2,00	7,00	1,00	1,00	1,00	0,49	9,00	1,60	1,00	2,20	1,00
Pf_0406	5	1,12	1,31	3,00	3,00	3,00	3,00	7,00	4,94	2,58	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	1,12	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0407	5	1,44	1,25	4,60	6,60	3,00	7,00	7,00	4,03	1,95	1,60	7,00	1,00	1,00	2,00	1,12	9,00	2,00	1,00	2,40	1,00
Pf_0408	5	1,47	1,14	3,00	4,60	2,00	3,00	5,00	4,42	2,25	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,26	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0409	5	1,22	1,60	3,00	5,00	3,00	3,00	7,00	4,63	2,31	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,14	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0410	5	1,30	1,16	3,00	7,00	3,00	5,00	7,00	4,05	2,18	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,01	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0501	3	1,58	1,82	3,80	6,60	3,00	7,00	7,00	5,72	2,31	1,00	7,00	2,00	1,00	1,00	1,36	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0502	3	1,61	1,54	3,80	6,60	3,00	7,00	7,00	5,88	2,29	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,28	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0503	3	1,61	1,09	3,40	6,60	3,00	7,00	7,00	3,76	2,12	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,06	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0504	3	1,76	0,84	6,00	7,00	3,00	6,00	6,00	2,89	1,52	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	0,75	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0505	3	1,64	1,07	5,00	7,00	3,00	7,00	7,00	3,06	1,95	2,00	5,00	1,00	2,00	2,00	0,65	9,00	1,33	1,00	2,67	1,00
Pf_0507	3	1,44	0,87	5,40	7,00	3,00	6,60	7,00	1,94	0,91	2,00	7,00	1,00	1,00	2,00	0,48	9,00	2,00	1,00	2,40	1,00
Pf_0508	3	1,28	1,40	3,00	5,00	3,00	3,00	5,00	2,58	1,28	2,00	5,00	2,00	1,00	1,00	0,43	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0512	3	1,32	1,64	5,40	6,60	3,00	6,60	7,00	3,62	1,88	2,00	5,80	1,60	2,00	1,00	0,80	9,00	1,80	1,00	2,60	1,00
Pf_0513	3	1,13	1,72	3,40	5,00	3,00	5,80	6,60	2,93	1,96	2,00	5,00	1,20	1,20	1,00	0,71	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0516	4	1,04	0,96	5,00	5,00	3,00	3,00	7,00	2,24	1,00	2,00	7,00	2,00	1,00	1,00	0,34	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0518	4	1,01	1,09	3,00	7,00	3,00	3,00	7,00	2,21	0,95	2,00	7,00	1,00	1,00	1,00	0,38	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00

Pf_0604	4	1,95	1,88	5,40	7,00	3,00	7,00	7,00	5,56	2,30	2,00	5,00	1,00	1,00	1,00	1,06	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0605	4	2,08	2,07	5,00	6,20	3,00	7,00	7,00	5,88	2,59	1,00	5,00	1,00	1,00	2,00	1,18	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0606	4	1,90	1,58	5,80	7,00	3,00	7,00	7,00	5,31	2,18	1,00	7,00	1,00	1,00	2,00	1,06	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0607	4	1,57	1,54	5,00	6,60	3,00	7,00	7,00	5,46	2,24	1,00	7,00	1,00	1,00	2,00	1,15	9,00	2,00	1,00	2,40	1,00
Pf_0608	4	1,90	2,24	7,00	7,00	3,00	7,00	6,60	4,43	2,23	2,00	6,20	1,00	2,00	2,00	1,15	9,00	1,80	1,00	2,00	1,00
Pf_0609	4	1,43	1,26	4,60	6,60	3,00	7,00	7,00	3,75	2,16	2,00	5,40	1,00	2,00	2,00	1,10	9,00	1,60	1,00	3,00	1,00
Pf_0610	5	1,75	1,71	6,60	6,60	3,00	6,60	6,60	4,58	2,28	2,00	5,00	1,00	2,00	1,00	1,10	9,00	2,00	1,00	2,20	1,00
Pf_0611	3	1,10	1,41	5,00	4,60	3,00	5,00	6,60	2,39	1,19	2,00	7,00	1,00	1,00	2,00	0,51	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0615	3	1,14	1,58	3,00	4,20	3,00	4,20	7,00	3,99	1,83	2,00	7,00	1,00	1,00	2,00	1,26	9,00	1,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0616	3	0,99	1,92	3,00	3,00	2,00	3,00	7,00	4,55	2,26	2,00	6,60	2,00	2,00	2,00	1,26	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0617	3	1,20	0,88	4,60	6,60	2,60	5,40	7,00	3,02	1,90	1,00	4,20	2,00	1,40	2,00	0,64	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0618	3	1,33	0,98	4,20	5,00	3,00	6,20	7,00	3,69	1,64	2,00	7,00	1,00	1,00	1,00	0,73	9,00	2,00	1,00	2,80	1,00
Pf_0619	3	1,17	0,82	3,40	6,20	3,00	5,00	7,00	3,23	1,87	2,00	5,00	2,00	2,00	1,00	0,71	9,00	1,40	1,00	2,00	1,00
Pf_0701	2	1,67	1,32	7,00	7,00	3,00	5,00	7,00	3,39	1,50	1,00	7,00	1,00	1,00	1,00	0,52	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0702	2	1,77	2,51	4,60	7,00	2,00	3,00	5,00	4,74	2,04	1,00	7,00	1,00	1,00	3,00	0,72	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0703	4	1,71	2,42	4,60	6,60	3,00	7,00	6,20	5,05	2,21	1,00	7,00	1,00	1,00	2,00	1,27	9,00	2,00	1,20	3,00	1,00
Pf_0706	4	2,07	3,19	7,00	5,00	2,00	5,00	5,00	4,66	2,35	1,00	3,00	2,00	1,00	2,00	0,65	9,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Pf_0706	4	2,01	2,76	5,00	4,60	2,00	5,00	5,00	6,20	3,34	2,00	7,00	1,00	2,00	2,00	0,85	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0707	4	2,40	3,18	4,60	4,20	2,40	3,80	5,00	6,44	3,59	2,20	5,40	1,80	1,00	1,40	0,90	9,00	2,00	1,00	1,00	1,00
Pf_0708	4	2,13	2,40	5,00	3,00	3,00	3,00	5,00	6,06	3,01	2,00	7,00	2,00	1,00	2,00	0,93	9,00	1,50	1,00	2,00	1,00
Pf_0711	4	2,42	3,28	5,00	5,40	2,00	2,80	4,60	6,81	3,59	2,00	5,40	1,60	2,00	2,00	1,08	9,00	2,00	1,20	2,00	1,00
Pf_0713	4	2,38	2,92	5,00	3,40	2,00	4,60	5,40	7,56	3,60	2,00	5,40	1,40	1,00	2,00	0,98	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0714	4	2,17	2,68	6,20	5,40	2,40	3,80	5,00	6,09	3,01	2,00	6,60	1,00	1,00	2,00	1,14	9,00	2,00	1,00	2,00	1,00
Pf_0801	3	1,57	2,50	3,00	4,00	2,00	3,00	7,00	3,41	1,56	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,12	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0802	3	1,71	0,86	3,00	5,50	2,00	3,50	7,00	2,68	1,33	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	0,59	9,00	2,00	1,00	2,75	1,00
Pf_0804	3	1,74	4,02	3,40	5,40	2,00	3,00	7,00	3,30	1,97	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	0,72	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0805	3	1,62	1,17	3,00	4,33	2,00	3,00	5,67	3,08	1,47	2,00	7,00	2,00	1,00	2,00	0,73	9,00	2,00	1,00	2,33	1,00
Pf_0807	3	1,33	1,64	3,00	7,00	2,00	3,00	7,00	2,14	0,94	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	0,62	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00
Pf_0901	4	2,73	2,33	5,00	5,00	2,00	3,00	5,00	6,22	3,12	2,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,08	9,00	2,00	1,00	2,00	2,00
Pf_0902	4	1,68	2,87	3,00	3,00	1,40	3,80	5,00	5,42	2,82	2,00	5,40	2,00	1,00	2,00	1,05	9,00	2,00	2,00	2,00	1,00
Pf_0903	4	2,09	2,89	4,20	4,60	2,60	5,00	5,00	5,64	2,90	2,00	5,00	1,00	1,00	2,00	1,41	9,00	2,00	1,00	3,00	1,00

B-bujnost, DG-debljina grančica, DI-dužina internodija, BL-broj lenticela, OG-obojeost grančica, PP-položaj pupoljka, VP-veličina pupoljka, OML-obojeost mladih listova, DL-dužina lista, ŠL-širina lista, OBL-oblik lista, DVL-dužina vrha lista, UVL-ugao vrha lista, OOL-oblik osnove lista, NL-nazubljenost lista, DLD-dužina lisne drške, PLŽ-prisustvo lisnih žlezda, BRŽ-broj lisnih žlezda, PŽ-pozicija žlezda, BŽ-boja žlezda, OŽ-oblik žlezda



Slika 2. Fenogram konstruisan UPGMA metodom na osnovu Euklidovog rastojanja za fenotipske karaktere

Ostali uzorci raspoređeni u nekoliko manjih podklastera u okviru glavnog klastera, a sačinjeni su od uzoraka iz populacija Fruška Gora 1 i 2, unutar kojih se nalaze i preostali pojedinačni uzorci iz ostalih populacija (Slika 2).

Klaster analiza primenom metode K srednjih vrednosti, pri čemu su vrednosti 5 i 8 za K zadate na osnovu podataka dobijenih za genotipske podatke (vidi podpoglavlje 6.3) grupisala je u prvom slučaju većinu predstavnika populacija Fruška Gora 1 i 2 zajedno sa pet predstavnika iz populacije Vrdnik i po jednim predstavnikom iz populacija Popovica (Pf\_0104) i Rimski Šančevi (Pf\_0703) u klaster broj 1 (Tabela 6). Klaster 2 sadrži sve jedinke iz populacija Titelski breg i Budimpešta i jedniku Pf\_0702 iz *ex situ* populacije Rimski Šančevi. Najveći klaster (3) sačinjen je od celokupne populacije Bački Jarak zajedno sa pojedinim predstavnicima populacija Fruška Gora 1 i 2 kao i populacije Rimski Šančevi. U klaster 4 ubraja se veći deo jedinki iz *ex situ* kolekcije Rimski Šančevi i sva tri predstavnika iz druge *ex situ* kolekcije Kać. Preostale negrupisane jedinke iz populacija Popovica (4), Vrdnik (4) i Fruška Gora 2 (3) grade poslednji klaster. Ukoliko se za broj klastera odredi vrednost 8 dobijaju se slični rezultati (Tabela 6). Klasteri 4 i 1 u oba slučaja su identični, dok je većina ostalih klastera podeljena sa manjim brojem preraspodela između nekih od klastera. Kada je  $K=8$  zajedno jedinke sa lokaliteta Bački Jarak su podeljene u klastere 2 i 7, ali u klasteru 2 se nalaze i Pf\_0508, Pf\_0516 i Pf\_0518 sa lokaliteta Fruška gora 1. Klaster 3 izgrađuju samo uzorci sa lokaliteta Titelski breg (Tabela 6).

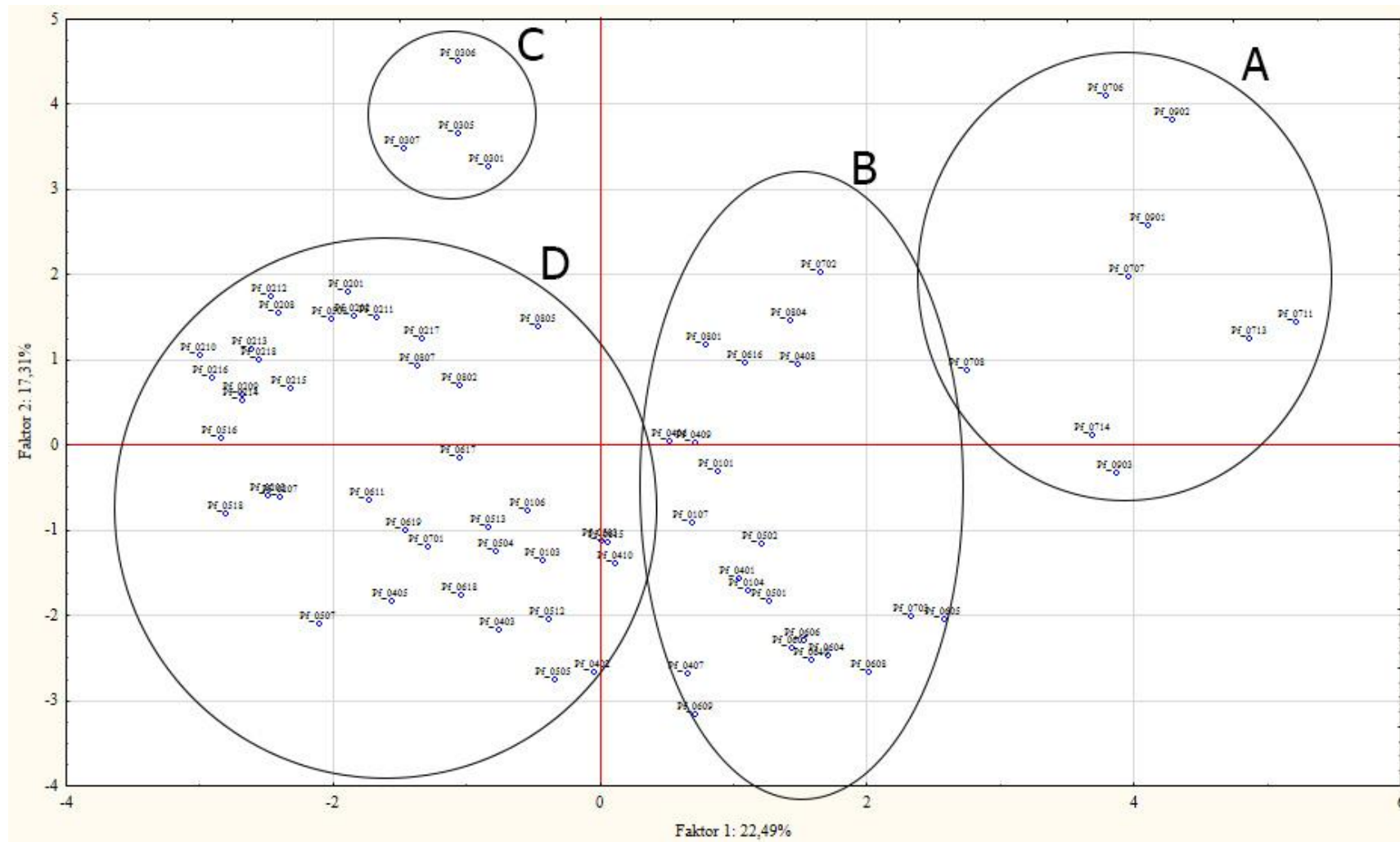
Analiza glavnih komponenti objašnjava preko 50% diverziteta na nivou fenotipa primenom prve tri komponente. Prva glavna komponenta (principal component, PC) objašnjava 22,49% ukupne fenotipske varijabilnosti, druga 17,31% (ukupno 39,80%), dok treća komponenta doprinosi sa 11,54% (ukupno 51,34%). Najvažnije karakteristike na PC1 su: dužina i širina lista, dužina lisne drške i internodija i debljina grančice, odnosno sva kvantitativa obeležja. Najznačajnije obeležje na PC2 je veličina pupoljka, dok je na PC3 to brojnost lenticela.

Formiranjem grafičkog prikaza za prve dve komponente PC analize dobijaju se četiri grupe (Slika 3). Grupu A čine genotipovi iz *ex situ* kolekcija u Kaću i na Rimskim Šančevima i ova grupa odgovara klasteru broj 1 kada je  $K=8$  u klaster analizi na osnovu K srednjih vrednosti (Tabela 6). Takođe, istu matricu grupisanja genotipova sa ova dva lokaliteta možemo uočiti i u UPGMA dendrogramu konstruisanom na osnovu Euklidovog

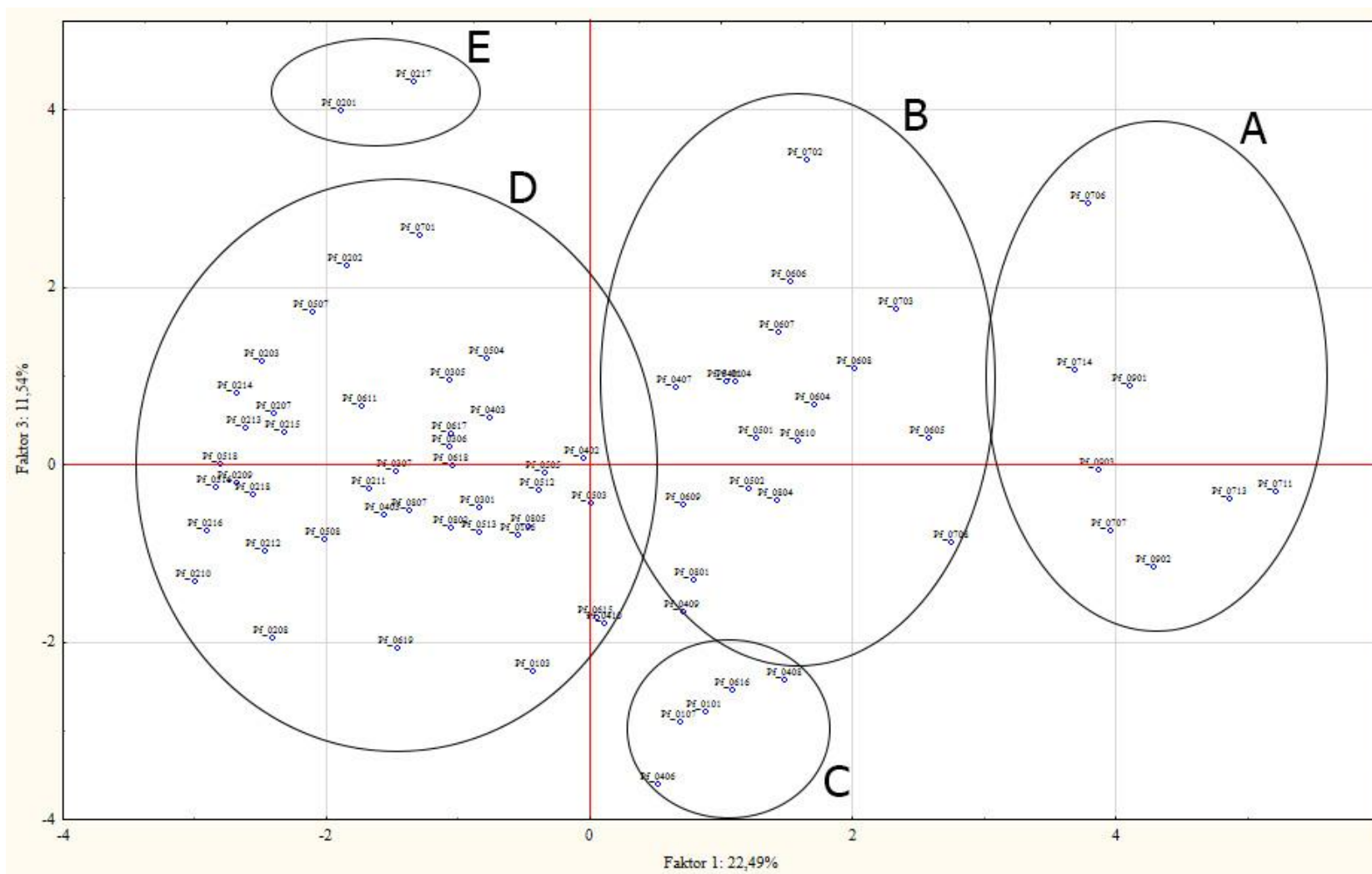
rastojanja (Slika 2). Grupa C je sačinjena od predstavnika populacije Titelski breg, dok se svi preostali uzorci nalaze u grupama B i D.

Tabela 6. Pripadnost individual klasterima na osnovu K metode srednjih vrednosti za fenotipske karaktere

K=5					K=8							
Klaster 1	Klaster 2	Klaster 3	Klaster 4	Klaster 5	Klaster 1	Klaster2	Klaster 3	Klaster 4	Klaster 5	Klaster 6	Klaster 7	Klaster 8
Pf_0104	Pf_0301	Pf_0201	Pf_0706	Pf_0101	Pf_0706	Pf_0203	Pf_0101	Pf_0103	Pf_0104	Pf_0406	Pf_0201	Pf_0301
Pf_0401	Pf_0305	Pf_0202	Pf_0707	Pf_0103	Pf_0707	Pf_0208	Pf_0107	Pf_0106	Pf_0401	Pf_0408	Pf_0202	Pf_0305
Pf_0402	Pf_0306	Pf_0203	Pf_0708	Pf_0106	Pf_0708	Pf_0209	Pf_0409	Pf_0207	Pf_0402	Pf_0410	Pf_0217	Pf_0306
Pf_0403	Pf_0307	Pf_0207	Pf_0711	Pf_0107	Pf_0711	Pf_0210	Pf_0616	Pf_0403	Pf_0407	Pf_0605	Pf_0702	Pf_0307
Pf_0405	Pf_0702	Pf_0208	Pf_0713	Pf_0406	Pf_0713	Pf_0211	Pf_0801	Pf_0405	Pf_0501	Pf_0615		
Pf_0407	Pf_0801	Pf_0209	Pf_0714	Pf_0408	Pf_0714	Pf_0212	Pf_0802	Pf_0503	Pf_0502			
Pf_0501	Pf_0802	Pf_0210	Pf_0901	Pf_0409	Pf_0901	Pf_0213	Pf_0804	Pf_0504	Pf_0604			
Pf_0502	Pf_0804	Pf_0211	Pf_0902	Pf_0410	Pf_0902	Pf_0214	Pf_0805	Pf_0505	Pf_0606			
Pf_0503	Pf_0805	Pf_0212	Pf_0903	Pf_0615	Pf_0903	Pf_0215	Pf_0807	Pf_0507	Pf_0607			
Pf_0504	Pf_0807	Pf_0213		Pf_0616		Pf_0216		Pf_0512	Pf_0608			
Pf_0505		Pf_0214		Pf_0619		Pf_0218		Pf_0513	Pf_0609			
Pf_0507		Pf_0215				Pf_0508		Pf_0611	Pf_0610			
Pf_0512		Pf_0216				Pf_0516		Pf_0617	Pf_0703			
Pf_0513		Pf_0217				Pf_0518		Pf_0618				
Pf_0604		Pf_0218						Pf_0619				
Pf_0605		Pf_0508						Pf_0701				
Pf_0606		Pf_0516										
Pf_0607		Pf_0518										
Pf_0608		Pf_0611										
Pf_0609		Pf_0617										
Pf_0610		Pf_0701										
Pf_0618												
Pf_0703												



Slika 3. Analiza glavnih komponenti za prva dva faktora koji objašnjavaju 39,80% ukupne fenotipske varijabilnosti



Slika 4. Analiza glavnih komponenti za prvi i treći faktor kojima je moguće objasniti 34,03% ukupne fenotipske varijabilnosti



Grafikon formiran na osnovu prve i treće komponente klasifikuje analizirane jedinke u 5 grupa (Slika 4). Grupa A je gotovo identična prvom grafikonu konstruisanom za PC1 i PC2, ali je Pf\_0708 ovde grupisan u B grupu. B, C i D grupe su dosta heterogene i sadrže uzorke iz svih preostalih populacija, dok su dva uzorka Pf\_0201 i Pf\_0217 sa lokaliteta Bački Jarak izdvojeni od ostalih u zasebnu E grupu (Slika 4).

## 6.2. Genetička varijabilnost populacija stepske višnje na osnovu SSR markera

Genetička karakterizacija *in situ* i *ex situ* populacija stepske višnje sprovedena je analizom varijabilnosti 52 mikrosatelitska lokusa. Ukupan broj uspešno sprovedenih PCR reakcija za analizirane prajmere, koji su razvijeni u genomima breskve, višnje i trešnje, u genomu *P. fruticosa* je iznosio 45 (86,54%). Od ukupnog broja uspešno umnoženih lokusa njih 9 (20%) je dalo kompleksan obrazac nakon elektroforeze, odnosno pokazali su prisustvo više od 4 alela i smatrano je da daju produkte sa više mesta u genomu stepske višnje i iz tog razloga su isključeni iz dalje analize.

Polimorfni obrazac, odnosno prisustvo minimum dva alela uočeno je za 35 lokusa, dok je lokus UDP-003 pokazao monomorfni profil. U okviru 35 polimorfnih lokusa ukupno je identifikovano 227 alela, odnosno 6,49 po lokusu. Najveći ukupan broj alela ustanovljen je kod populacije Fruška Gora 1 i iznosio je 182, prosečno 5,2 po lokusu. Najmanji broj alela identifikovan je kod *ex situ* populacije Kać (91) i populacije Titelski breg (92). Prosečan broj različitih genotipova po lokusu (G) za sve analizirane populacije iznosio je 14. Najveću vrednost za G posedovala je populacija Fruška Gora 2 sa 4,54 različita genotipa po lokusu dok je najniža vrednost uočena kod populacije Kać (1,03). Vrednosti uočene heterozigotnosti ( $H_o$ ) su se kretale od 0,567 do 0,995 (BPPCT024 i UCD-CH19), sa prosečnom vrednošću od 0,885. Najniža uočena heterozigotnost je konstatovana kod populacije Titelski breg (0,850) dok je najviša bila za populaciju Vrdnik (0,910). Očekivana heterozigotnost ( $H_e$ ) se kretala u intervalu od 0,255 (BPPCT022) do 0,905 (BPPCT034) sa prosekom od 0,778 kod svih analiziranih populacija. Jedinke sa lokaliteta Titelski breg su pokazale najnižu vrednost očekivane heterozigotnosti (0,531) dok je najviša iznosila 0,715 kod jedinki sa lokaliteta Fruška Gora 1. Efektivni broj alela ( $A_e$ ) se kretao od 1,833 do 10,488 sa prosekom od 5,262 po lokusu. Najniža vrednost ovog parametra dobijena je za populaciju Kać (2,592) dok je najviša dobijena za populaciju Fruška Gora 1 (4,150) (Tabela 7).

Tabela 7. Parametri genetičke varijabilnosti za sve analizirane mikrosatelitske markere i populacije

Marker	Sve opulacije					Popovica					Bački Jarak					Titelski breg					Vrdnik				
	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae
BPPCT005	9	21	0,970	0,838	6,160	3	2	0,985	0,666	2,994	4	1	1,000	0,750	4,000	4	1	1,000	0,750	4,000	4	2	1,000	0,749	3,990
BPPCT007	8	21	0,981	0,854	6,839	3	1	1,000	0,667	3,000	4	1	1,000	0,750	4,000	3	1	1,000	0,667	3,000	5	4	0,981	0,762	4,196
BPPCT008	9	21	0,977	0,834	6,030	4	3	1,000	0,749	3,991	3	1	1,000	0,667	3,000	3	1	1,000	0,667	3,000	4	2	1,000	0,731	3,719
BPPCT010	6	13	0,963	0,806	5,165	4	2	1,000	0,750	3,994	3	1	1,000	0,667	3,000	3	1	1,000	0,667	3,000	3	2	0,981	0,666	2,991
BPPCT013	8	14	0,993	0,846	6,489	4	2	1,000	0,713	3,484	4	1	1,000	0,750	4,000	4	1	1,000	0,750	4,000	6	3	1,000	0,798	4,947
BPPCT022	2	2	0,584	0,455	1,833	2	2	0,530	0,405	1,681	2	2	0,544	0,208	1,262	2	2	0,567	0,486	1,946	2	2	0,648	0,483	1,936
BPPCT024	3	4	0,567	0,652	2,875	1	1	0,500	0,000	1,000	2	1	0,833	0,500	2,000	1	1	0,500	0,000	1,000	2	2	0,537	0,499	1,994
BPPCT027	5	14	0,856	0,793	4,821	4	3	0,970	0,749	3,980	4	3	0,922	0,719	3,558	2	1	0,833	0,500	2,000	4	2	0,852	0,686	3,189
BPPCT028	8	21	0,939	0,855	6,893	3	2	0,985	0,666	2,994	2	1	0,833	0,500	2,000	3	2	0,933	0,651	2,864	3	2	0,944	0,666	2,990
BPPCT030	10	26	0,986	0,872	7,838	4	1	1,000	0,750	4,000	6	3	0,978	0,707	3,408	4	2	0,867	0,659	2,935	5	2	1,000	0,762	4,208
BPPCT032	8	18	0,975	0,838	6,185	4	2	0,985	0,749	3,991	4	1	1,000	0,750	4,000	2	1	0,833	0,500	2,000	5	2	1,000	0,747	3,955
BPPCT034	11	26	0,918	0,905	10,488	4	3	0,909	0,749	3,989	4	1	1,000	0,750	4,000	1	1	0,500	0,000	1,000	4	2	1,000	0,730	3,710
BPPCT036	4	5	0,777	0,746	3,934	2	2	0,803	0,499	1,995	2	1	0,833	0,500	2,000	2	2	0,700	0,459	1,849	2	1	0,833	0,500	2,000
BPPCT038	6	12	0,902	0,785	4,643	4	2	0,955	0,750	3,993	4	1	1,000	0,750	4,000	2	1	0,833	0,500	2,000	4	2	1,000	0,731	3,719
BPPCT041	8	18	0,944	0,824	5,692	3	2	0,985	0,666	2,994	4	1	1,000	0,750	4,000	4	1	1,000	0,750	4,000	6	5	0,889	0,749	3,984
BPPCT042	3	2	0,933	0,651	2,864	3	1	1,000	0,667	3,000	3	2	0,878	0,597	2,481	3	1	1,000	0,667	3,000	3	2	0,981	0,666	2,991
M3b	4	6	0,532	0,645	2,820	2	2	0,530	0,464	1,867	1	1	0,500	0,000	1,000	1	1	0,500	0,000	1,000	2	2	0,537	0,499	1,994
M12a	8	17	0,949	0,849	6,626	5	2	0,985	0,761	4,180	4	1	1,000	0,750	4,000	1	1	0,500	0,000	1,000	5	3	1,000	0,762	4,208
MA010a	8	17	0,733	0,839	6,230	2	2	0,530	0,387	1,630	6	3	1,000	0,806	5,143	2	1	0,833	0,500	2,000	4	2	0,833	0,691	3,236
MA017a	6	13	0,954	0,793	4,834	4	3	1,000	0,749	3,991	4	1	1,000	0,750	4,000	4	2	1,000	0,741	3,857	5	2	1,000	0,762	4,208
MA034a	6	21	0,977	0,806	5,143	4	1	1,000	0,750	4,000	4	2	1,000	0,703	3,368	4	4	0,900	0,698	3,314	6	3	1,000	0,790	4,765
UCD-CH12	6	11	0,963	0,799	4,978	4	2	0,985	0,749	3,991	3	1	1,000	0,667	3,000	3	1	1,000	0,667	3,000	3	1	1,000	0,667	3,000
UCD-CH14	8	18	0,921	0,840	6,245	4	2	1,000	0,750	3,994	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	5	2	1,000	0,749	3,982
UCD-CH17	10	29	0,954	0,885	8,696	4	2	1,000	0,750	3,994	4	1	1,000	0,750	4,000	3	1	1,000	0,667	3,003	5	3	1,000	0,774	4,422
UCD-CH19	6	20	0,995	0,801	5,034	5	3	1,000	0,770	4,341	4	2	1,000	0,744	3,903	4	1	1,000	0,750	4,000	4	2	1,000	0,730	3,710
UCD-CH31	10	24	0,891	0,872	7,836	5	2	1,000	0,760	4,174	5	2	1,000	0,749	3,982	3	1	1,000	0,667	3,000	5	2	1,000	0,747	3,955
UCD-CH39	4	9	0,756	0,680	3,121	2	2	0,803	0,499	1,995	1	1	0,500	0,000	1,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	2	0,537	0,499	1,994
UDP-001	5	4	0,870	0,690	3,225	4	1	1,000	0,750	4,000	2	1	0,833	0,500	2,000	3	1	1,000	0,667	3,003	3	2	0,852	0,667	3,000
UDP-005	5	12	0,821	0,743	3,895	4	3	0,985	0,743	3,890	1	1	0,500	0,000	1,000	1	1	0,500	0,000	1,000	3	2	0,981	0,666	2,991
UDP-018	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-405	8	7	0,968	0,819	5,516	3	1	1,000	0,667	3,000	4	1	1,000	0,750	4,000	3	2	0,900	0,664	2,977	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-406	6	7	0,911	0,726	3,645	3	1	1,000	0,667	3,000	4	1	1,000	0,750	4,000	2	1	0,833	0,500	2,000	3	1	1,000	0,667	3,000
UDP-409	5	10	0,868	0,777	4,478	2	2	0,803	0,499	1,995	3	2	0,956	0,660	2,944	3	2	0,900	0,648	2,842	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-412	4	5	0,842	0,742	3,883	1	1	0,500	0,000	1,000	3	2	0,933	0,651	2,864	2	1	0,833	0,500	2,000	3	1	1,000	0,667	3,000
PccGA34	8	21	0,986	0,861	7,203	4	1	1,000	0,750	4,000	4	1	1,000	0,750	4,000	4	2	1,000	0,750	4,000	5	3	0,981	0,773	4,412
Prosek	6,49	14	0,885	0,778	5,262	3,31	1,86	0,902	0,633	3,203	3,31	1,37	0,906	0,608	3,112	2,63	1,31	0,850	0,531	2,560	3,74	2,09	0,910	0,672	3,326

No- broj alela, G- broj različitih genotipova, Ho- uočena heterozigotnost, He- očekivana heterozigotnost, Ae- efektivni broj alela

Tabela 7. Nastavljeno

Marker	Fruska Gora 1					Fruska Gora 2					Rimski Šančevi					Budimpešta					Kač				
	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae	No	G	Ho	He	Ae
BPPCT005	8	6	0,978	0,834	6,008	8	6	0,907	0,808	5,217	5	5	0,964	0,762	4,199	8	5	0,967	0,825	5,730	4	1	1,000	0,750	4,000
BPPCT007	8	6	0,989	0,839	6,198	6	3	1,000	0,806	5,153	7	5	1,000	0,834	6,007	3	2	0,700	0,593	2,455	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT008	8	6	0,956	0,811	5,283	6	6	0,954	0,806	5,154	6	6	0,988	0,752	4,033	7	4	1,000	0,827	5,786	2	1	0,833	0,500	2,000
BPPCT010	5	4	0,911	0,769	4,331	4	3	0,963	0,732	3,737	4	5	0,964	0,709	3,438	3	3	0,833	0,663	2,970	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT013	5	4	1,000	0,768	4,310	6	5	1,000	0,807	5,184	4	4	0,964	0,739	3,827	6	3	0,967	0,820	5,556	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT022	2	2	0,589	0,434	1,766	2	2	0,630	0,487	1,949	1	1	0,500	0,000	1,000	2	2	0,633	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000
BPPCT024	1	1	0,500	0,000	1,000	2	2	0,500	0,330	1,492	2	2	0,500	0,180	1,220	2	2	0,700	0,459	1,849	1	1	0,500	0,000	1,000
BPPCT027	4	4	0,944	0,732	3,725	5	6	0,833	0,753	4,054	5	5	0,714	0,737	3,798	4	3	0,567	0,645	2,814	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT028	8	7	0,989	0,821	5,592	7	8	0,944	0,819	5,533	6	7	0,988	0,803	5,087	6	4	0,800	0,758	4,129	4	1	1,000	0,750	4,000
BPPCT030	9	6	1,000	0,851	6,730	9	8	0,981	0,841	6,291	7	5	1,000	0,772	4,386	9	4	1,000	0,865	7,407	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT032	6	5	0,978	0,806	5,165	6	6	0,972	0,814	5,369	7	5	1,000	0,791	4,789	5	4	0,900	0,773	4,412	4	1	1,000	0,750	4,000
BPPCT034	8	5	1,000	0,822	5,612	8	5	0,917	0,844	6,429	9	7	0,940	0,864	7,347	9	5	0,900	0,859	7,078	1	1	0,500	0,000	1,000
BPPCT036	3	3	0,811	0,643	2,800	2	3	0,667	0,466	1,874	2	2	0,810	0,499	1,997	2	2	0,700	0,459	1,849	2	1	0,833	0,500	2,000
BPPCT038	5	3	1,000	0,777	4,481	4	5	0,787	0,680	3,128	3	4	0,798	0,584	2,405	3	2	0,833	0,602	2,513	2	1	0,833	0,500	2,000
BPPCT041	8	5	0,867	0,756	4,090	7	6	0,917	0,781	4,576	6	5	0,988	0,789	4,737	3	2	0,900	0,625	2,667	3	1	1,000	0,667	3,000
BPPCT042	3	2	0,856	0,664	2,977	3	2	0,926	0,647	2,829	3	2	0,940	0,663	2,965	3	1	1,000	0,667	3,000	3	1	1,000	0,667	3,000
M3b	4	4	0,633	0,661	2,953	2	2	0,500	0,231	1,301	3	3	0,524	0,560	2,274	2	2	0,500	0,397	1,658	1	1	0,500	0,000	1,000
M12a	5	3	0,989	0,776	4,461	5	3	1,000	0,781	4,566	6	7	0,940	0,800	4,991	5	4	0,767	0,764	4,235	4	1	1,000	0,750	4,000
MA010a	5	6	0,844	0,785	4,661	5	4	0,611	0,658	2,921	4	4	0,500	0,734	3,756	4	1	1,000	0,750	4,000	1	1	0,500	0,000	1,000
MA017a	4	4	0,900	0,707	3,410	5	5	0,972	0,774	4,431	4	4	0,893	0,728	3,675	4	2	0,933	0,734	3,765	2	1	0,833	0,500	2,000
MA034a	6	3	1,000	0,792	4,813	6	12	0,935	0,816	5,448	6	5	1,000	0,798	4,954	6	3	1,000	0,790	4,765	2	1	0,833	0,500	2,000
UCD-CH12	4	4	0,922	0,674	3,065	5	6	1,000	0,772	4,395	4	4	0,940	0,730	3,703	4	4	0,833	0,720	3,568	2	1	0,833	0,500	2,000
UCD-CH14	6	6	0,989	0,807	5,192	4	4	0,870	0,718	3,543	5	4	0,988	0,769	4,336	4	3	0,933	0,738	3,814	2	2	0,611	0,420	1,724
UCD-CH17	8	7	0,967	0,831	5,910	8	6	0,954	0,815	5,391	8	9	0,857	0,830	5,873	5	4	0,800	0,756	4,091	4	1	1,000	0,750	4,000
UCD-CH19	6	5	1,000	0,783	4,612	6	6	1,000	0,816	5,422	6	7	0,964	0,752	4,038	6	4	1,000	0,815	5,405	3	1	1,000	0,667	3,000
UCD-CH31	8	5	0,744	0,831	5,919	7	9	0,824	0,799	4,984	5	7	0,869	0,734	3,753	5	5	0,700	0,671	3,042	3	1	1,000	0,667	3,000
UCD-CH39	4	3	0,867	0,635	2,740	3	2	0,843	0,664	2,979	3	2	0,833	0,584	2,406	4	4	0,833	0,708	3,429	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-001	3	2	0,856	0,625	2,667	3	2	0,843	0,658	2,923	2	1	0,833	0,500	2,000	3	2	0,867	0,651	2,864	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-005	4	3	0,733	0,700	3,332	5	6	0,963	0,788	4,722	5	5	0,940	0,727	3,660	5	4	0,733	0,734	3,756	4	1	1,000	0,750	4,000
UDP-018	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-405	3	1	1,000	0,667	3,000	4	3	0,972	0,750	3,997	4	3	0,964	0,750	3,995	8	3	1,000	0,870	7,692	4	1	1,000	0,750	4,000
UDP-406	3	2	0,856	0,557	2,256	2	1	0,833	0,500	2,000	2	1	0,833	0,500	2,000	5	5	0,967	0,772	4,378	3	1	1,000	0,667	3,000
UDP-409	5	5	0,933	0,786	4,662	2	2	0,815	0,500	1,998	3	2	0,833	0,643	2,798	4	3	0,900	0,711	3,459	2	1	0,833	0,500	2,000
UDP-412	4	1	1,000	0,750	4,000	4	5	0,824	0,593	2,456	4	4	0,810	0,701	3,349	4	3	0,733	0,698	3,306	2	1	0,833	0,500	2,000
PeeGA34	7	7	0,989	0,819	5,519	6	4	0,963	0,815	5,391	4	3	0,976	0,735	3,776	7	4	1,000	0,820	5,554	3	1	1,000	0,667	3,000
Prosek	5,20	4,03	0,898	0,715	4,150	4,83	4,54	0,870	0,696	3,967	4,49	4,17	0,868	0,673	3,673	4,63	3,11	0,849	0,701	3,914	2,6	1,03	0,876	0,543	2,592

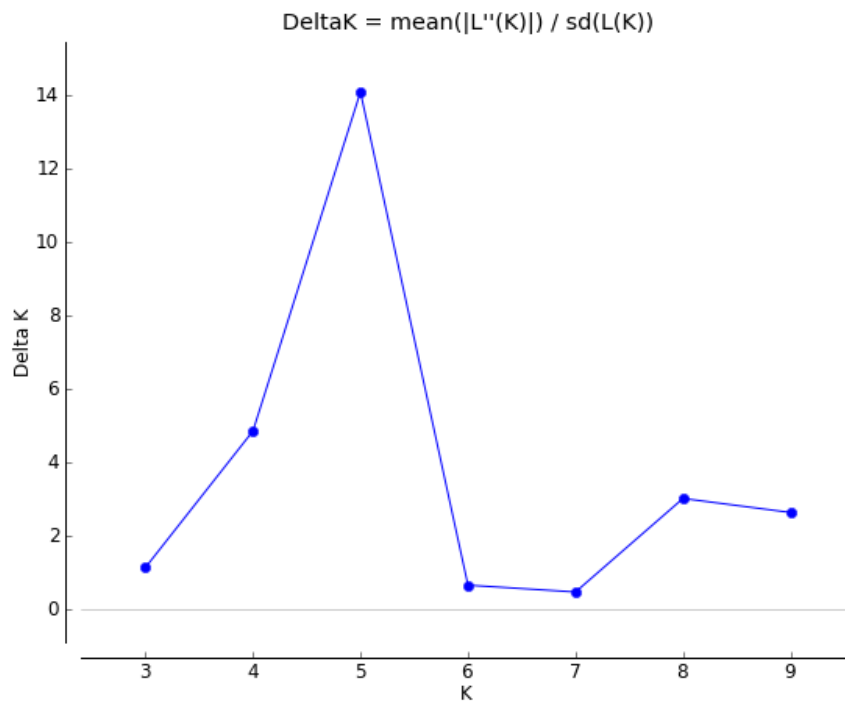
No- broj alela, G- broj različitih genotipova, Ho- uočena heterozigotnost, He- očekivana heterozigotnost, Ae- efektivni broj alela

### 6.3. Analiza genetičke strukture populacija stepske višnje

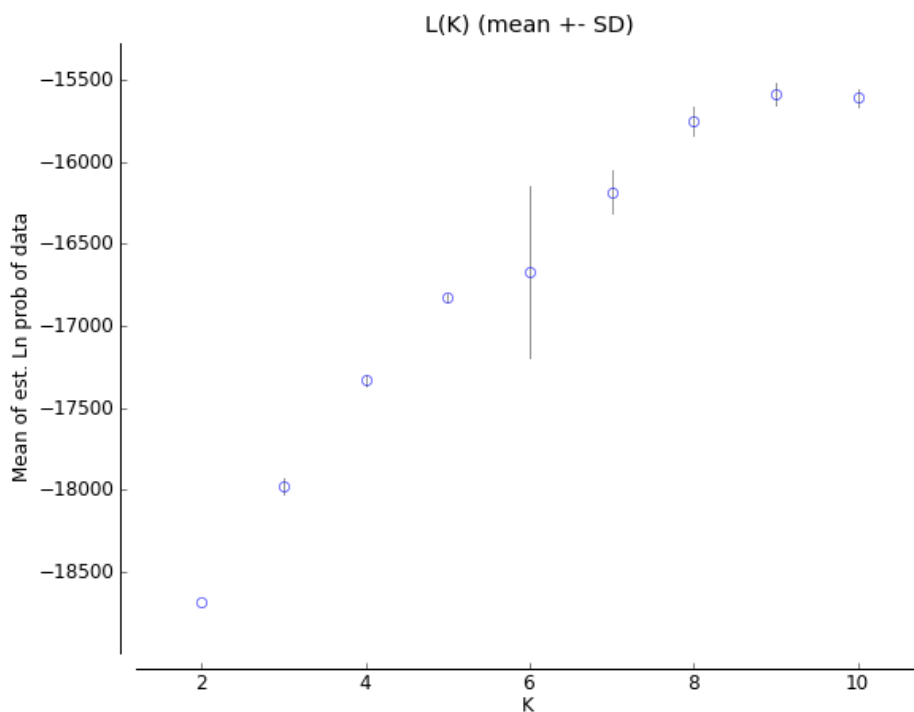
Analiza genetičke strukture populacija stepske višnje sa devet ispitivanih lokaliteta pruža mogućnost da se sagleda struktuiranost populacija i pripadnost populacija i individua određenom klasteru.

Broj klastera koji najbolje reprezentuje strukturu populacije određen je na osnovu  $\ln D(P)$  i  $\Delta K$  vrednosti. Tom prilikom je uočen konstantan rast  $\ln D(P)$  sa povećanjem broja klastera uključenih u analizu (Slika 5). Na vrednostima  $K$  koje su se nalazile iznad vrednosti sekundarnih pikova nije bilo moguće uočiti prisustvo dodatne struktuiranosti, te u dalju analizu nisu uključene vrednosti veće od 8. Analizom struktuiranosti na stopi promene između dve vrednosti za  $K$  ( $\Delta K$ ) utvrđeno je da je najverovatniji broj klastera 5, dok se sekundarni pik javlja na vrednosti  $\Delta K$  od 8 (Slika 6).

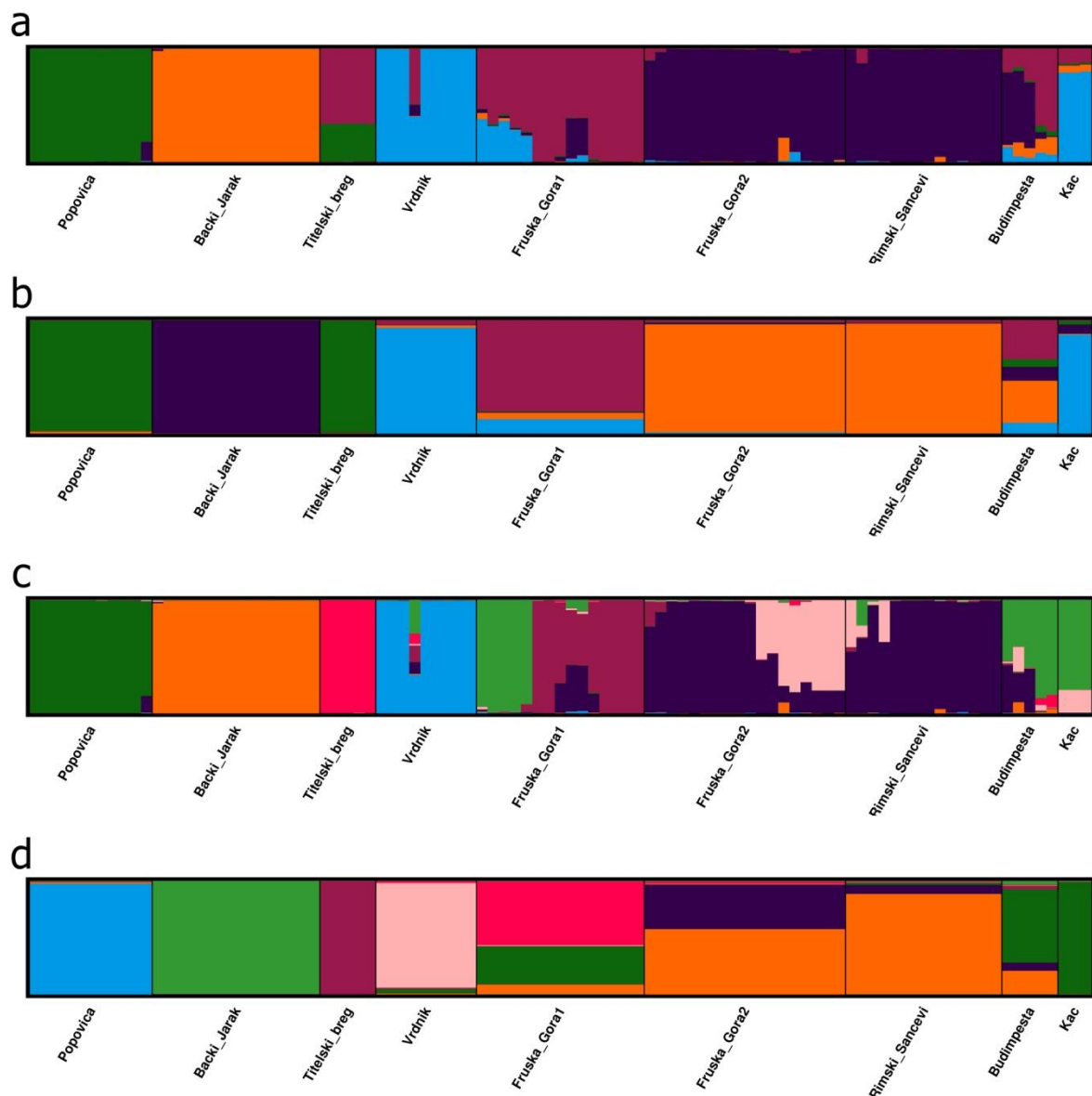
Većina jedinki iz analiziranih populacija na vrednosti  $K=5$  pokazuju jasnu pripadnost određenom klasteru, dok bi se manji deo jedinki mogao označiti kao pripadnik dva odnosno tri klastera (Slika 7a). Kada se za istu vrednost  $K$  sprovede analiza pripadnosti populacija određenim klasterima uočava se da populacije Bački Jarak i većim delom populacija Fruška Gora 1 pripadaju zasebnim klasterima. Istovremeno populacije Popovica i Titelski breg, populacije Vrdnik i Kać, kao i populacije Fruška Gora 2 potpuno ili većim delom grade tri klastera. Sa druge strane populacija Budimpešta ne pokazuje tako jasnu pripadnost određenom klasteru i prisustvo jedinki iz ove populacije se može uočiti u svakom od 5 klastera (Slika 7b). Ukoliko se za broj klastera odredi vrednost 8 pripadnost jedinki određenom klasteru se menja pre svega kod predstavnika populacija Fruška Gora 1 i 2 i Rimski Šančevi. Ova promena se ogleda u prisustvu većeg broja klastera u svakoj od navedene tri populacije. Isti rezultati su dobijeni i kada se pripadnost određenom klasteru sprovede kroz analizu celokupnih populacija (Slika 7c, Slika 7d).



Slika 5.  $\Delta K$  metod (Evano i sar., 2005) određivanja najverovatnijeg broja klaster baziran na veličini (stopi) promene između dve K vrednosti

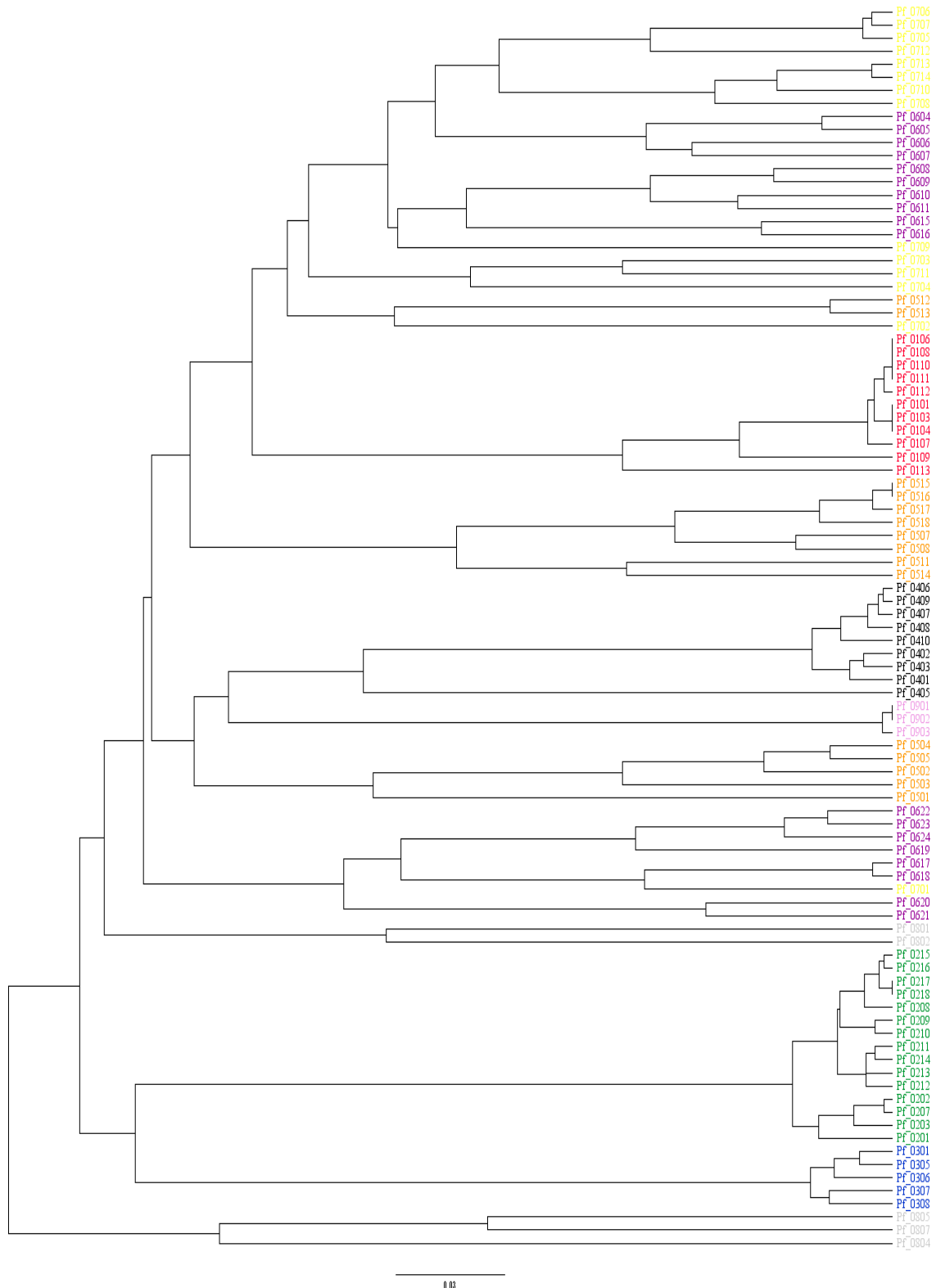


Slika 6. Metod po Pritchardu i sar. (2000) za određivanje najverovatnijeg broja klastera zasnovan na određivanju K vrednosti prema  $\ln P(D)$  vrednostima (log probability of data)



Slika 7. Bajesova klaster analiza izvedena u STRUCTURE programskom paketu za populacije stepske višnje; udeo različitih boja predstavlja pripadnost jedinki (a, c) ili populacija (b, d) različitim klasterima (K); K=5 (a, b) K=8 (c, d). Slike su formirane pomoću programa DISTRUCT pokrenutog su uz pomoć online servera CLUMPAK

Klaster analiza na osnovu Nei i Li koeficijenta sličnosti grupisala je jedinke u tri klastera (Slika 8). Prvi klaster, koji je najudaljeniji od ostalih sačinjen je od dela jedinki poreklom iz *ex situ* kolekcije Univerziteta u Budimpešti, Mađarska (Pf\_0805, Pf\_0807 i Pf\_0804). Sledeći klaster najbliži ovom čine jedinke sa lokaliteta Bački Jarak i Titelski breg, a svaka od njih čini jedan zaseban podklaster.



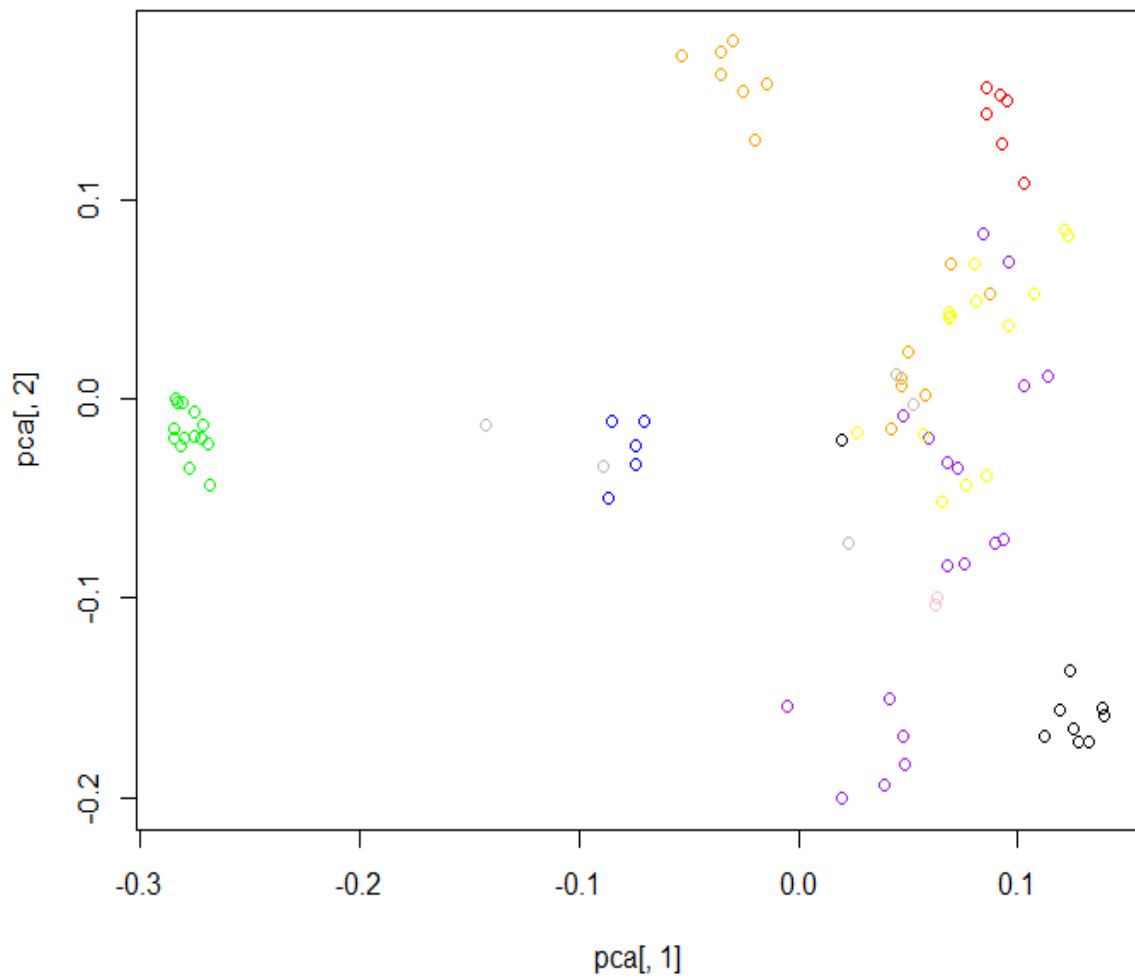
Slika 8. Dendrogram konstruisan UPGMA metodom na osnovu Nei i Li koeficijenta sličnosti. Jedinke koje pripadaju istoj populaciji obojene su istom bojom (Popovica- crveno; Bački Jarak- zeleno; Titelski breg- plavo; Vrdnik- crno; Fruška Gora 1- narandžasto; Fruška gora 2- ljubičasto; Rimski Šančevi- žuto; Budimpešta- sivo; Kać- roze)

Treći klaster čine jedinke iz svih preostalih populacija, a i ovde se mogu uočiti grupisanja u manje podklaster. Svi uzorci sakupljeni na lokalitetu Popovica grade zasebni podklaster, kao i jedinke sa lokaliteta Vrdnik. *Ex situ* populacija Kać takođe gradi zaseban podklaster koji je najbliži populaciji Vrdnik. Jedinke sa lokaliteta Fruška Gora 1 i 2, Rimski Šančevi i preostale dve jedinke (Pf\_0801 i PF0802) sa lokaliteta Budimpešta su u izvesnoj meri izmešane u dva podklastera, ali u okviru njih pokazuju određeni stepen grupisanja shodno pripadnosti određenoj populaciji (Slika 8).

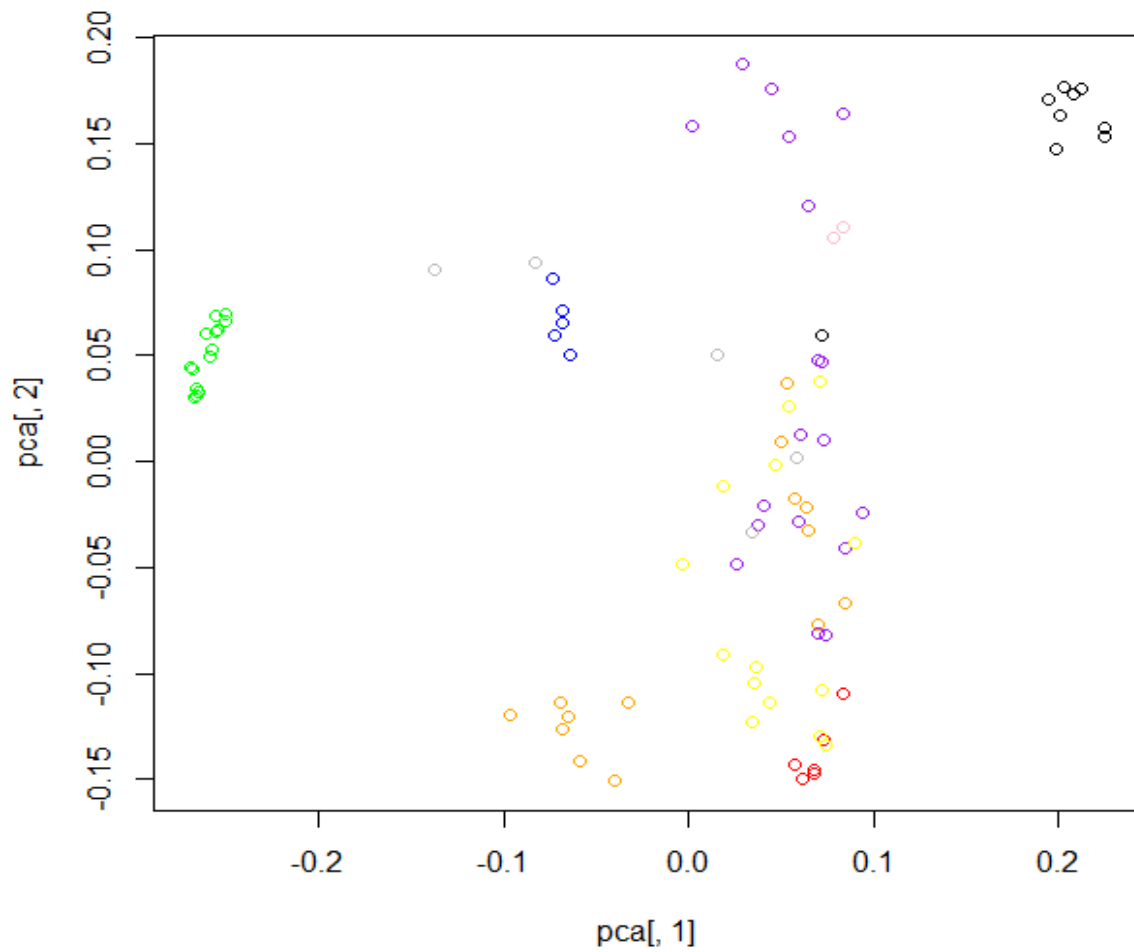
Analiza glavnih komponenti na osnovu Bruvo koeficijenta genetičke udaljenosti razvrstava sve analizirane jedinke u šest grupa (Slika 9). Klasteri A, C i G su sačinjeni od jedinki koje pripadaju populacijama Bački Jarak, Popovica i Vrdnik, dok klaster B i F čine deo jedinki iz populacije Fruška Gora 1 odnosno Fruška Gora 2. Klaster D je izgrađen od jedinki uzorkovanih na lokalitetu Titelski breg i dva pripadnika populacije Budimpešta. Najkompleksniji klaster je E, a čine ga jedinke iz *ex situ* populacija Kać i Rimski Šančevi, kao i preostali uzorci iz populacija FG1, FG2, Budimpešta i jedan sa lokaliteta Vrdnik (Slika 9).

Konstruisanjem PCA grafikona na osnovu genetičke udaljenosti prema Lynch-u dobijaju se slični rezultati (Slika 10). Jedinke sa lokaliteta Bački Jarak su grupisane u zaseban klaster, a populacija sa Titelskog brega je i u ovom slučaju grupisana zajedno sa dva genotipa poreklom iz Budimpešte. Populacija Vrdnik je ponovo izdvojena u zaseban klaster kao i delovi populacija Fruška Gora 1 i 2. Razlika se ogleda pre svega u tome što su klasteru C, koji čine pojedine jedinke iz populacije Fruška Gora 2, priključene i dve jedinke iz kolekcije Kać. Takođe, u ovom slučaju celokupna populacija Popovica je priključena klasteru F koji kod PCA analize na osnovu Bruvo genetičke udaljenosti odgovara klasteru E (Slika 10).





Slika 9. PCA analiza dobijena na osnovu Bruvo koeficijenta genetičke udaljenosti. Jedinke koje pripadaju istoj populaciji obojene su istom bojom (Popovica- crveno; Bački Jarak- zeleno; Titelski breg- plavo; Vrdnik- crno; Fruška Gora 1- narandžasto; Fruška gora 2- ljubičasto; Rimski Šančevi- žuto; Budimpešta- sivo; Kać- roze)



Slika 10. PCA analiza dobijena na osnovu Lynch koeficijenta genetičke udaljenosti. Jedinke koje pripadaju istoj populaciji obojene su istom bojom (Popovica- crveno; Bački Jarak- zeleno; Titelski breg- plavo; Vrdnik- crno; Fruška Gora 1- narandžasto; Fruška gora 2- ljubičasto; Rimski Šančevi- žuto; Budimpešta- sivo; Kać- roze)

Genetička udaljenost na osnovu Nei i Li koeficijenta između populacija stepske višnje pokazala je najvišu vrednost između populacija Bački Jarak i Vrdnik (0,6007), dok je najniža vrednost iznosila 0,0441 za populaciju Fruška gora 2 i *ex situ* populaciju Rimski Šančevi. (Tabela 8).

Tabela 8. Genetička udaljenost između populacija na osnovu Nei i Li koeficijenta

	Popovica	B. Jarak	T. breg	Vrdnik	F. Gora 1	F. Gora 2	R. Šančevi	Budimpešta	Kać
Popovica	0								
B. Jarak	0,3983	0							
T. breg	0,3624	0,3535	0						
Vrdnik	0,3924	0,6007	0,4225	0					
F. Gora 1	0,2296	0,2514	0,2665	0,2659	0				
F. Gora 2	0,2249	0,2824	0,2936	0,2563	0,1629	0			
R. Šančevi	0,2035	0,2805	0,2613	0,3113	0,1193	0,0441	0		
Budimpešta	0,2349	0,2581	0,2687	0,3054	0,1639	0,1494	0,177	0	
Kać	0,4369	0,4976	0,495	0,2598	0,3294	0,3054	0,3331	0,3559	0

Određivanjem struktuiranosti populacije na osnovu  $F_{st}$  (Weir i Cockerham, 1984) i  $G_{st}$  (Pons i Petit, 1996) koeficijenta ustanovljena je najmanja vrednost između populacija Rimski Šančevi i Fruška Gora 2 (0,0331 i 0,0222). Istovremeno najviša vrednost je dobijena između populacija Kać i Titelski breg, a iznosila je 0,2911 odnosno 0,2151. Većina vrednosti za oba parametra se nalazi u granicama umerene genetičke diferenciranosti između populacija (Tabela 9).

Tabela 9.  $F_{st}$  i  $G_{st}$  vrednosti između parova analiziranih populacija

	Popovica	B. Jarak	T. breg	Vrdnik	F. Gora 1	F. Gora 2	R. Šančevi	Budimpešta	Kać
Popovica		0,1702	0,1773	0,1617	0,0974	0,0971	0,095	0,0981	0,1778
B. Jarak	0,19		0,1746	0,2139	0,109	0,1164	0,1233	0,1052	0,1951
T. breg	0,2074	0,2006		0,1909	0,1293	0,1417	0,137	0,1279	0,2151
Vrdnik	0,1891	0,2343	0,2261		0,1104	0,1029	0,1292	0,1158	0,1184
F. Gora 1	0,1155	0,1219	0,1425	0,1239		0,0617	0,0506	0,0636	0,1309
F. Gora 2	0,1117	0,1296	0,1483	0,1189	0,0737		0,0222	0,0547	0,1192
R. Šančevi	0,1112	0,1373	0,1491	0,1449	0,0632	0,0301		0,0719	0,14
Budimpešta	0,1321	0,1417	0,1594	0,1493	0,0816	0,0741	0,0917		0,1307
Kać	0,2264	0,2406	0,2911	0,1769	0,1554	0,1449	0,1673	0,1668	

$F_{st}$ - donja polovina tabela,  $G_{st}$ - gornja polovina tabele

Rezultati Mantel testa, kojim su upoređene matrice genetičke udaljenosti populacija na osnovu Nei i Li koeficijenta, Fst i Gst parametara genetičke diferencijacije sa matricom koeficijenta prostorne udaljenosti, ukazuju na odsustvo statistički značajne korelacije između analiziranih parametara pri vrednosti p od 0,05 (Tabela 10).

Tabela 10. Poređenje matrica genetičke udaljenosti, Fst i Gst parametara sa prostornom udaljenošću između populacija promenom Mantel testa

Upoređene matrice	P vrednost	Alfa vrednost
Genetička udaljenost/Prostorna udaljenost	0,146	0,05
Fst/ Prostorna udaljenost	0,220	0,05
Gst/ Prostorna udaljenost	0,074	0,05

#### 6.4. Genetička varijabilnost i analiza strukture populacija stepske višnje primenom SNP markera

Poređenjem sekvenci dobijenih GBS metodom sa genomom breskve (peach genome 1.0, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) i njihovim filtriranjem na 75% prisutnih podataka za svaku poziciju sa frekvencijom manje zastupljenog alela (Minor Allele Frequency, MAF)  $\geq 0,05$  dobijeno je 170.256 SNP markera. Procentualni udeo heterozigota je iznosio 0,43562. Najveći procentualni udeo i frekvenciju imali su homozigoti za C i G (0,1318 i 0,13135), a nakon njih heterozigoti purinskih baza A:G (0,12337) i pirimidinskih C:T (0,12308). Rezultati za svaku od kombinacija dva alela dati su u tabeli 11.

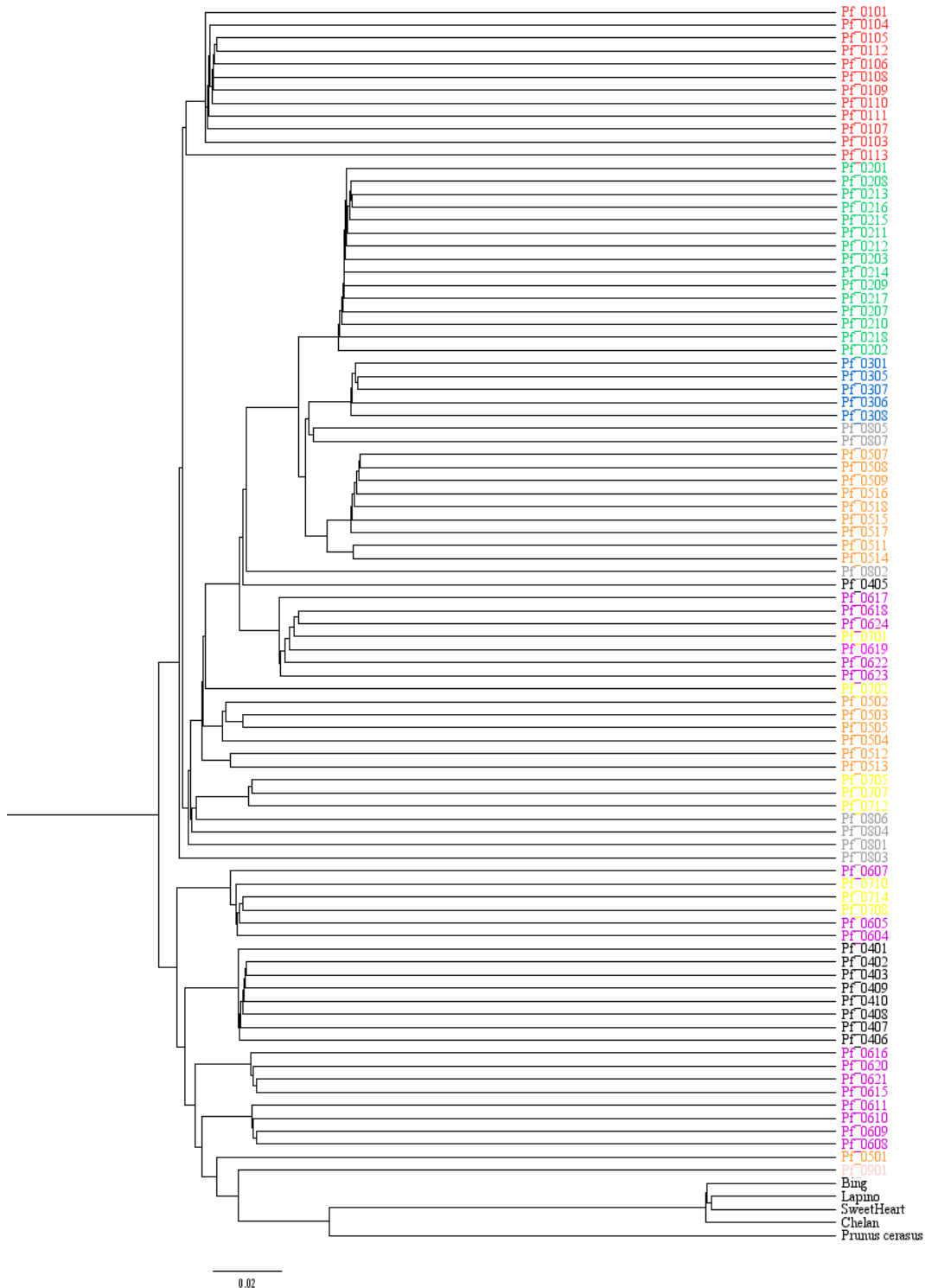
Tabela 11. Procentualni udeo svakog genotipa i njihova frekvencija u okviru 170256 identifikovanih SNP markera

Aleli	Proporcija	Frekvencija
C	0,1318	0,14065
G	0,13135	0,14017
R	0,12337	0,13165
Y	0,12308	0,13134
A	0,11969	0,12772
T	0,119	0,12699
N	0,06289	0,06711
W	0,05553	0,05925
K	0,4826	0,0515
M	0,4751	0,0507
S	0,3752	0,04003

R- G ili A, Y- T ili C, N- nedostaje podatak, W- A ili T, K- G ili T, M- A ili C, S- G ili C

Klaster analiza na osnovu podataka dobijenih SNP markerima grupisala je sve analizirane uzorke u dva glavna klastera (Slika 11). U okviru prvog klastera jasno se izdvajaju uzorci vrste *Prunus avium* ('Bing', 'Lapino', 'SweetHeart', 'Chilean'), a njima najbliži je uzorak vrste *Prunus cerasus* koji su prilikom genotipizacije primenom sekvenciranja upotrebljeni kao kontrolna grupa. Uzorci Pf\_0901 i Pf\_0501 sa lokaliteta Kać i Fruška Gora 1 su najbliži uzorcima iz outgrupe. Ostatak klastera moguće je podeliti na tri podklastera. Prvi je sačinjen od dela uzoraka populacije Fruška Gora 2, drugi čine uzorci populacije Vrdnik (osim Pf\_0405). Treći podklaster grade uzorci populacija Fruška Gora 2 (Pf\_0607, Pf\_0605, Pf\_0604) i Rimski Šančevi (Pf\_0708, Pf\_0710, Pf\_0714).

Drugi glavni klaster je takođe organizovan u podklastera. Tri velika zasebna podklastera u sebe uključuju populacije Popovica, Bački Jarak i Titelski breg (Slika 11). Preostali uzorci iz populacija Fruška Gora 1 i 2, Rimski Šančevi, Budimpešta i uzorak Pf\_0405 (Vrdnik) čine nekoliko manjih podklastera koji su građeni od uzoraka iz samo jedne ili dve populacije.

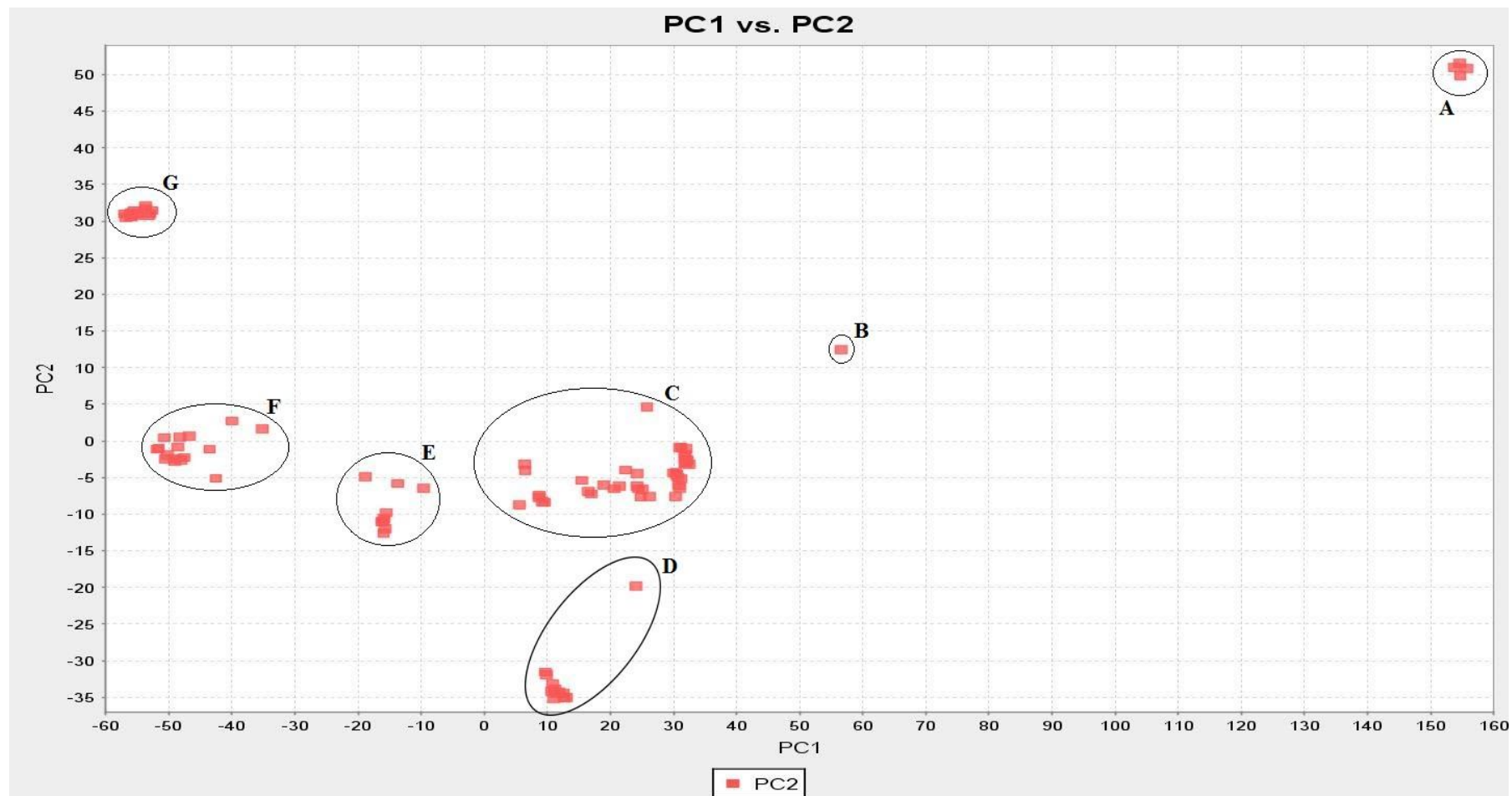


Slika 11. Dendrogram konstruisam UPGMA metodom na osnovu podata dobijenih za 170256 SNP markera. Jedinke koje pripadaju istoj populaciji obojene su istom bojom (Popovica- crveno; Bački Jarak- zeleno; Titelski breg- plavo; Vrdnik- crno; Fruška Gora 1- narandžasto; Fruška gora 2- ljubičasto; Rimski Šančevi- žuto; Budimpešta- sivo; Kać- roze)

Analiza glavnih komponenti sprovedena na osnovu podataka za varijabilnost pojedinačnih baza DNK objašnjava preko 25% varijabilnosti primenom prve tri komponente. Prva glavna komponenta (principal component, PC) objašnjava 19,17% ukupne varijabilnosti ovog tipa molekularnih markera, druga 3,69%, dok treća komponenta doprinosi sa 3,09%.

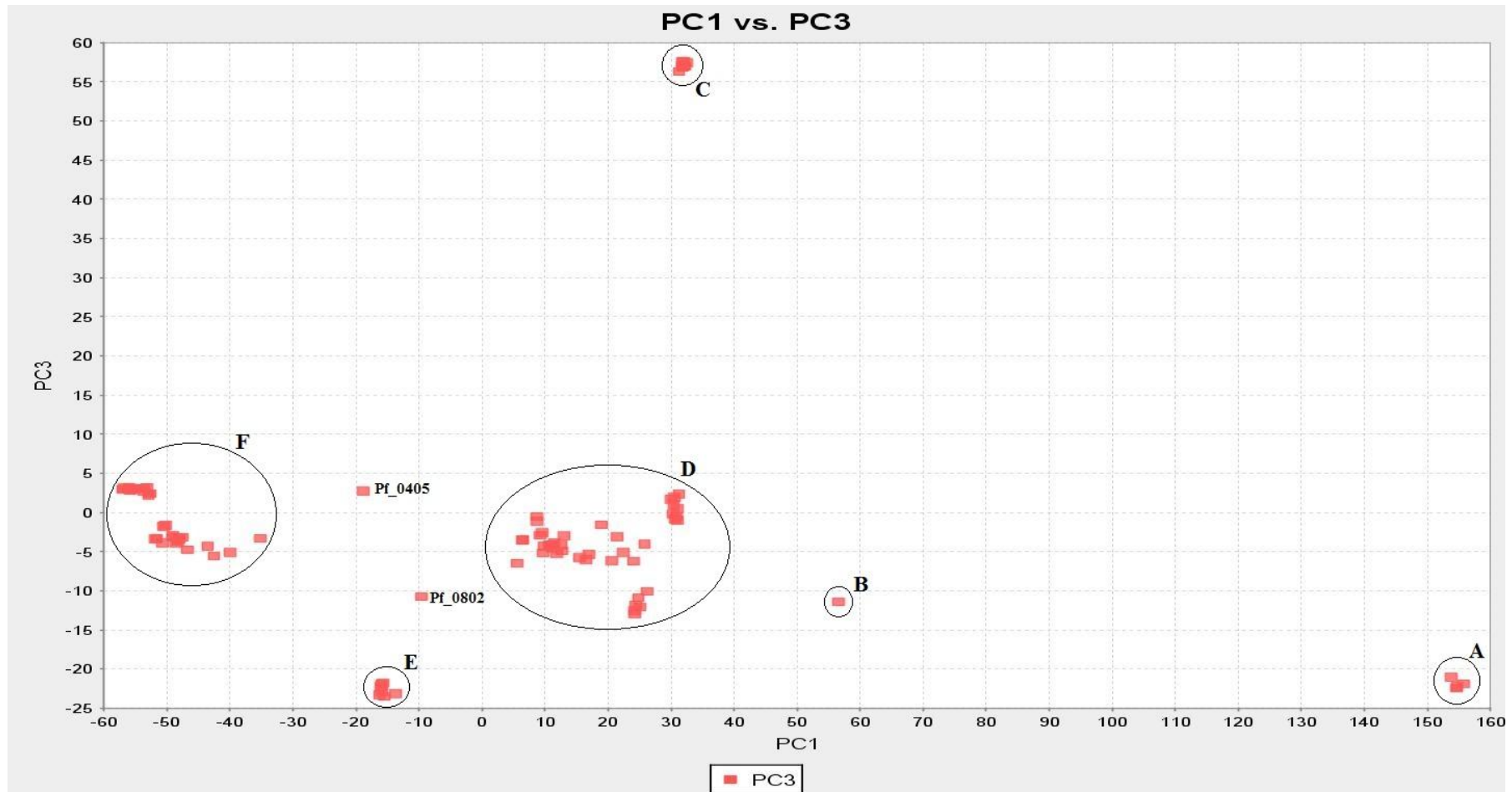
Konstruisanjem grafikona za prve dve glavne komponente sve jedinke su razmeštene u sedam grupa (Slika 12). Prvu grupu koja je najudaljenija od svih ostalih čine uzorci trešnje (*Prunus avium*). Uzorak višnje (*P. cerasus*), koja pored trešnje čini kontrolnu grupu se nalazi odvojeno od ostalih uzoraka stepske višnje (*P. fruticosa*). Klasteri D i G su sačinjeni od jedinki iz populacije Popovica, odnosno Bački Jarak. Preostala tri klastera su izgrađena od jedinki koji pripadaju svim preostalim populacijama. Celokupna populacija Titelski breg je locirana u klasteru F sa pojedinim predstavnicima iz Budimpešte i Fruške Gore 1. Populacija Vrdnik (osim Pf\_0405), Rimski Šančevi (osim Pf\_0701) i Kać su smeštene u klaster C zajedno sa pojedinim predstavnicima sa lokaliteta Fruška Gora 1 i 2 i Budimpešta. Klaster E čine Pf\_0617, Pf\_0618, Pf\_0619, Pf\_0622, Pf\_0623, Pf\_0624 (Fruška Gora 2), Pf\_0701 (Rimski Šančevi), Pf\_0802 (Budimpešta) i Pf\_0405 (Vrdnik) (Slika 12).

Grafički prikaz analize glavnih komponenti za PC1 i PC3 (Slika 13) izdvaja uzorke trešnje i višnje kao i u prvom slučaju u dva odvojen klastera (A i B). Predstavnicima sa lokaliteta Vrdnik u ovom slučaju su izdvojeni u jedan zasebni klaster (C), dok je populacija Popovica priključena klasteru D zajedno sa jedinkama iz Budimpešte, Fruške gore 1 i 2 i sa Rimskih Šančeva. Klasteri F i G u kombinaciji PC1 i PC2 su na grafikonu PC1 i PC3 spojeni u klaster F. Iz klastera E su izdvojene jedinke Pf\_0405 (Vrdnik) i Pf\_0802 koje se nalaze na jednakoj udaljenosti od klastera E, D i F pa ih nije moguće svrstati niti u jedan od njih (Slika 13). Položaji tačaka na PCA grafikonima za SNP markere (Slika 12 i 13) date su u prilogu 2.



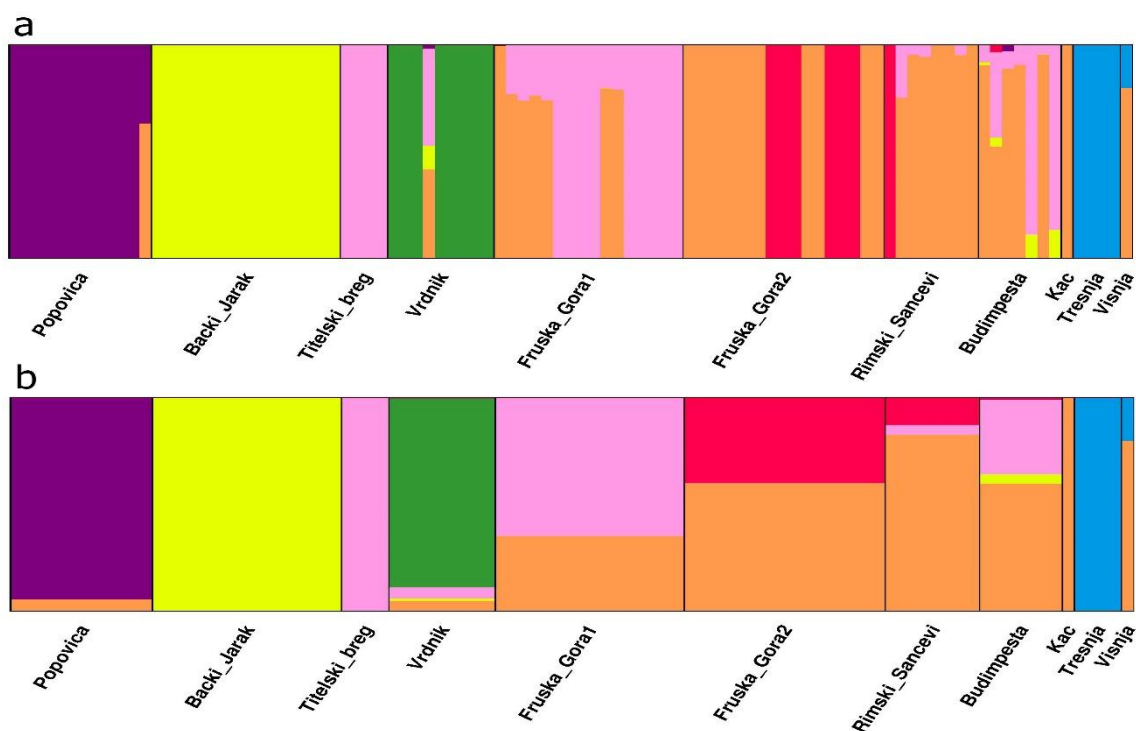
Slika 12. PCA analiza za podatke dobijene genotipizacijom putem sekvenciranja. Grafički prikaz predstavlja prve dve komponente koje zajedno opisuju 22,86% varijabilnosti





Slika 13. PCA analiza za podatke dobijene genotipizacijom putem sekvenciranja. Grafički prikaz predstavlja prvu i treću komponentu koje zajedno opisuju 22,26% varijabilnosti

Najverovatniji broj klastera u Bajesovom klaster metodu za SNP markere je  $K=7$ . Sagledavanjem genetičke strukture populacija stepske višnje na ovom nivou utvrđeno je da sve jedinke sa lokaliteta Bački Jarak i Titeski breg, kao i outgrupa koju čine sorte trešnje pripadaju različitim klasterima. Populacija Fruška Gora 2 pokazuje sekundarnu strukturu i jedinke u njoj su podeljene u dva klastera. Genotipovi sa lokaliteta Popovica i Vrdnik takođe pokazuju visoku pripadnost različitim klasterima, ali Pf\_0103 iz prve i Pf\_0405 iz druge populacije nemaju jasnu pripadnost određenom klasteru. Ista situacija uočava se kod populacije Fruška Gora 1 i kod *ex situ* kolekcije na Rimskim Šančevima. Najsloženija struktura je zapažena u populaciji Budimpešta koja je sačinjena od pet različitih klastera izraženih u manjoj ili većoj meri. Višnja, kao jedan od kontrolnih uzoraka, pokazala je pripadnost u većoj meri klasteru kom pripadaju jedinike sa Rimskih Šančeva i deo populacije Fruška Gora 2, a manjim delom pripada klasteru koji čini trešnja kao druga kontrolna grupa. Ukoliko populacije posmatramo kao celine može se utvrditi da Popovica, Bački Jarak, Titelski breg i uzorci trešnje grade četiri zasebna klastera. Sve ostale populacije mogu se svrstati u dva ili više klastera, odnosno sve se nalaze u admiksiji (Slika 14).



Slika 14. Bajesova klaster analiza izvedena u fastSTRUCTURE programskom paketu za populacije stepske višnje; udeo različitih boja predstavlja pripadnost individua (a) ili populacija (b) različitim klasterima. Slika je napravljena u program DISTRUCT

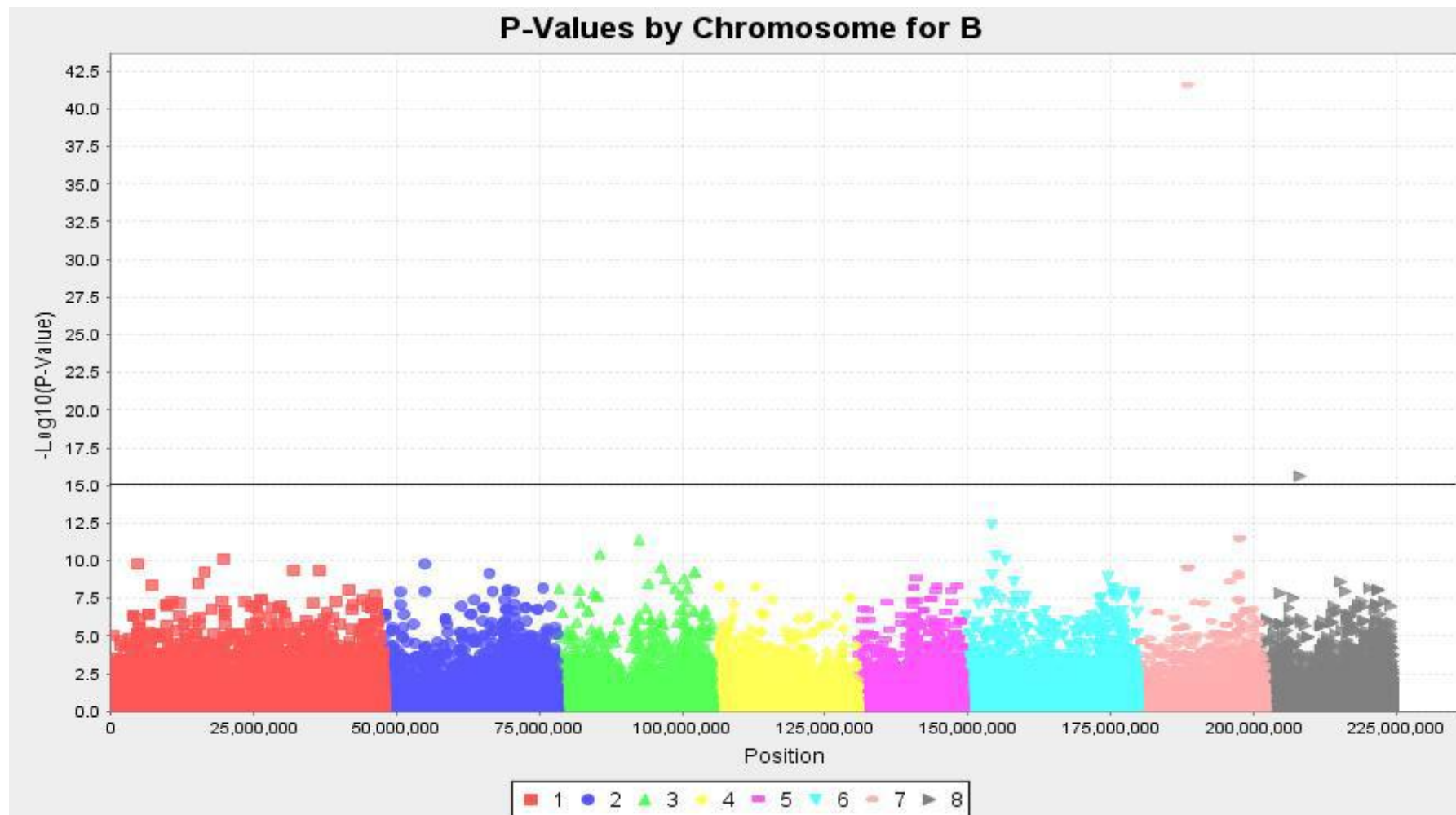
Varijabilnost populacija stepske višnje istražena je i na nivou gena za S-Rnazu koji je kod predstavnika roda *Prunus* odgovoran za autoinkompatibilnost. Primenom prajmera za intron 1 i 2 (PaConsI i PaConsII) (Sonneveld i sar., 2003) moguće je identifikovati određeni broj S alela, dok je identifikacija alela koji omogućavaju autokompatibilnost moguća jedino sa alel specifičnim prajmerima koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje. U analiziranim populacijama identifikovano je ukupno 14 različitih S alela, najveći broj (7) je uočen u populaciji Fruška Gora 1, a najmanji (1) u populaciji Titelski breg (Tabela 11). Sve populacije i svi uzorci su imali S19 kao zajednički alel. Poređenjem genetičke varijabilnosti u okviru svake populacije (Nei, 1978) na nivou SSR markera i S-RNase dobijena je jaka korelacija ovih vrednosti (0,87) za nivo značajnosti  $p=0,01$ , što sugerise da stepen diverziteta u okviru populacije zavisi od stepena različitosti na nivou S alela.

Tabela 11. Broj različitih alela identifikovanih u okviru analiziranih populacija.

Populacija	Identifikovani S aleli
Popovica	S14, S19
Bački Jarak	S9, S19
Titelski breg	S19
Vrdnik	S9, S14, S19
Fruška Gora 1	S1, S3, S4, S6, S10, S19, S30
Fruška Gora 2	S3, S6, S10, S18, S19, S20
Rimski Šančevi	S3, S6, S18, S19, S27, S32
Budimpešta	S10, S16, S19, S23, S27
Kač	S19, S32

### 6.5. Asocijativna analiza genoma stepske višnje

Primenom generalnog linearnog modela (General Linear Model, GLM) u asocijativnom mapiranju genoma stepske višnje otkriven je značajan nivo vezanosti između pojedinih SNP markera i ispitivanih fenotipskih karakteristika (Slika 15). Jedna od najvažnijih karakteristika u oplemenjivačkom radu jeste bujnost stabla, jer će od nje zavisiti broj jedinki po jedinici površine, a samim tim i ukupni prinos. Stepsku višnju odlikuje niska bujnost te je ona jedan od često korišćenih roditelja u hibridizaciji kada je cilj dobijanje podloga sa malom bujnošću. Bujnost kao fenotipska karakteristika pokazala je značajan nivo vezanosti za dva SNP markera, za nivo  $-\text{Log}_{10}(p) = 15$ , na hromozomu 7 (S7\_8740459) i na hromozomu 8 (S8\_6142814) (Slika 15). SNP na hromozomu 7 ima pozitivan uticaj na svojstvo bujnosti kada se nalazi u heterozigotnom stanju (GC).



Slika 15. Grafički prikaz distribucije  $-\text{Log}_{10}(p)$  vrednosti za SNP markere i bujnost kao fenotipsku karakteristiku. Prag značajnosti (Bonferoni significance) iznosio je  $4 \times 10^{-7}$  ( $0.05/111,348$ )

U homozigotnom stanju za guanin ovaj SNP ima negativan uticaj u odnosu na homozigot citozin. Marker na hromozomu 8 ima negativan uticaj na isto svojstvo u homozigotnom stanju (G), a u heterozigotnom (G, A) pozitivan uticaj u odnosu na homozigot adenin (Prilog 4).

Jasna asocijacija između fenotipa javlja se i za debljinu grančica, položaj pupoljaka, dužinu lista, oblik osnove lista, dužinu lisne drške, broj, boju i oblik lisnih žlezda. Svi ostali fenotipski karakteri nisu pokazali statistički značajnu asocijaciju sa molekularnim markerima, odnosno nivo asocijacije između genotipa i fenotipa kod njih je bio nizak. Položaj markera sa najvećim p vrednostima za svako od fenotipskih obeležja dat je u tabeli 12, grafički prikazi u vidu Menhetn tipa grafikona (Manhattan plot) dati su u prilogu 3, a uticaj markera na fenotip koji je pokazao značajan nivo vezanosti dat je u prilogu 4.

Tabela 12. Rezultati asocijativne analize primenom GLM modela. **Bold** - visok nivo vezanosti, Podvučeno – hromozomi na kojima markeri pokazuju najviši nivo asocijacije ali ispod statistički značajne p vrednosti

Fenotipska karakteristika	Hromozom
Bujnost	<b>7, 8</b>
Debljina grančica	<b>6, 7</b>
Dužina internodija	<u>2</u>
Broj lenticela	<u>4</u>
Obojenost grančica	<u>1, 6</u>
Položaj pupoljka	<b>1, 7</b>
Veličina pupoljka	<u>1</u>
Obojenost mladih listova	<u>1, 4</u>
Dužina lista	<b>1, 8</b>
Širina lista	<u>6, 8</u>
Oblik lista	<u>1, 4</u>
Dužina vrha lista	<u>4</u>
Ugao vrha lista	<u>1</u>
Oblik osnove lista	<b>3, 6</b>
Nazubljenost lista	<u>5</u>
Dužina lisne drške	<b>3, 8</b>
Prisustvo lisnih žlezda	Nema fenotipske varijabilnosti
Broj lisnih žlezda	<b>3</b>
Pozicija žlezda	Niska fenotipska varijabilnost
Boja žlezda	<b>1</b>
Oblik žlezda	<b>2, 4</b>

## 7. DISKUSIJA

### 7.1. Fenotipska varijabilnost populacija stepske višnje

Poznavanje genetičkog diverziteta i odnosa između gajenih i divljih vrsta u okviru podroda *Cerasus* je od velikog značaja za identifikaciju različitih genofondova, uočavanje nedostataka u okviru *ex situ* kolekcija i razvijanje efikasnih strategija za njihovo očuvanje i menadžment. Morfološka karakterizacija je prvi korak u opisivanju i klasifikaciji jediniki iz lokalnih populacija i sorti čime se izbegava mogućnost gubitka dela germplazme koja može biti od izuzetnog značaja (Rodrigues i sar., 2008, Cantini i sar., 1999). Identifikacija razlika u fenotipskim osobinama u oplemenjivačkim programima može dovesti do stvaranja novih sorti i podloga za kalemljenje (Balmer i Blanke, 2005; Hrotko i sar., 2008; Iezzoni 2008; Khadivi-Khub i sar., 2012). Do sada je sprovedeno nekoliko studija u okviru kojih su analizirana morfološka svojstva pripadnika podroda *Cerasus*: trešnja (Ducci i Santi, 1977; Rodrigues i sar., 2008; Karlidag i sar., 2009; Lacis i sar., 2009; Mratinić i sar., 2012; Ognjanov i sar., 2012; Petruccelli i sar., 2013, Barać i sar., 2014), višnja (Krahl i sar., 1991; Rodrigues i sar., 2008; Antonius i sar., 2012; Ognjanov i sar., 2012; Radičević i sar., 2012; Rakonjac i sar., 2012; Barać i sar., 2014; Khadivi-Khub 2014) i stepska višnja (Wojcicki 1991; Hrotko i sar., 2008; Ognjanov i sar., 2012; Barać i sar., 2014).

Varijabilnost na fenotipskom nivou unutar i između populacija stepske višnje analizirana je primenom 21-og kvantitativnog i kvalitativnog karaktera. Kao što je i očekivano, najveći diverzitet je uočen kod kvantitativnih osobina za čiju ocenu je primenjeno merenje u odnosu na ostale osobine koje su ocenjivane na skali prema UPOV-om deskriptoru. Ognjanov i saradnici (2012) i Barać i saradnici (2014) analizom fenotipskih karakteristika različitog broja genotipova stepske višnje dolaze do istog zaključka, odnosno ističu prisustvo višeg stepena varijabilnosti za svojstva dužina i širina lista, dužina lisne drške i debljina grančica. Morfološka istraživanja lokalnih populacija Oblačinske višnje, koja je autohtona na teritoriji R. Srbije, takođe su potvrdila visoku varijabilnost za parametre veličine lista, ali i drugih osobina koje su okarakterisane merenjem (dimenzije ploda i prinos) (Rakonjac i sar., 2010). Tendencija visoke

varijabilnosti u pogledu veličine lista potvrđena je i analizom 28 eksperimentalnih full-sib populacija višnje stvorenih hibridizacijom lokalnih sorti višnje sa teritorije Evrope i standardnih sorti *Montmorency*, *Wolynska*, *English Morello* i *Rheinische Schattenmorelle* (Krahl i sar., 1991). Trešnja, kao drugi najbliži srodnik stepske višnje, ispoljava visoku varijabilnost parametara lista, ali i drugih kvantitativnih karaktera poput veličine ploda koja je i najznačajnija s' obzirom da je trešnja jedna od ekonomski najvažnijih vrsta voća (Lacis i sar., 2009; Mratinić i sar., 2012; Petrucelli i sar., 2013). Khadivi-Khub i saradnici (2012) analizirajući deset divljih vrsta iz podroda *Cerasus* ponovo ističu dimenzije lista kao najvarijabilnije, ali i bujnost biljke koja je i kod populacija stepske višnje pokazala relativno visok stepen varijabilnosti. Varijabilnost kvalitativnih parametara je očekivano mala što se može objasniti činjenicom da pojedini karakteri imaju samo dve ocene. Tako, na primer, za prisustvo lisnih žlezda možemo konstatovati prisustvo (9) ili odsustvo (1), te samim tim nije moguće očekivati veliku raznolikost. Činjenica da je analizirana jedna biljna vrsta čija je klasifikacija sprovedena na osnovu morfoloških karakteristika, takođe, ide u prilog niskom nivou varijabilnosti.

Klaster analiza na osnovu fenotipskih podataka sprovedena je primenom UPGMA metode na osnovu Euklidovog rastojanja i metodom K srednjih vrednosti kod koje su za broj klastera uzete vrednosti dobijene analizom SSR markera (K=5 i K=8). Oba metoda su pokazala određen nivo grupisanja jedinki iz iste populacija u manje podklasterne, ali nema jasnog izdvajanja jedinki iz jedne od populacije u zaseban klaster. U oba slučaja većinu članova čine pripadnici jedne od analiziranih populacija dok su njima priključeni i pojedinačni uzorci sa nekog drugog lokaliteta. Klaster broj 3 dobijen metodom K srednjih vrednosti za K=5 čine sve jedinice populacije Bački Jarak, ali su njima pridodate i jedinice iz populacije Fruška gora 1 i 2 i Rimski Šančevi. Upravo ove tri populacije (Fruška Gora 1, Fruška gora 2 i Rimski Šančevi) pokazuju najveću heterogenost kada se u obzir uzme pripadnost jedinki koje potiču sa ovih lokaliteta različitim klasterima. Dobijene rezultate moguće je objasniti činjenicom da populacije Fruška gora 1 i 2 pokrivaju najveću površinu koja se proteže duž dva puta, te su i spoljašnji uslovi različiti u odnosu na ostale populacije. Deo jedinki se nalazi na otvorenom prostoru, a jedan na ivici šumskih zajednica. Varijabilnost i sličnost pojedinih predstavnika populacije Fruška gora 2 sa

jedinkama iz kolekcije na Rimskim Šančevima leži u činjenici da je upravo ova prirodna populacija poslužila kao osnova za stvaranje *ex situ* kolekcije na ogleđnom dobru Poljoprivrednog fakulteta.

Morfološki opis jedinki, odnosno genotipova je početni korak u sagledavanju nivoa diverziteta u okviru vrste ili lokalnih populacija što zajedno sa analizom glavnih komponenti predstavlja moćno oružje u očuvanju genetičkih resursa (Badenes i sar., 2000, Rakonjac i sar., 2010; Khadivi-Khub i sar., 2012). Primenom ove metode na analiziranim populacijama stepske višnje moguće je objasniti 51,34% ukupne fenotipske varijabilnosti na osnovu prve tri glavne komponente.

Najznačajnije osobine koje su se izdvojile na prvoj osi su: širina i dužina lista, dužina lisne drške, debljina grančica i dužina internodija. Posmatrajući grafikon može se uočiti da se svaki od navedenih parametara povećava gledajući sa leva na desno. Najveći listovi su zabeleženi u grupi A (Slika 3 i 4) koju čine jedinke iz *ex situ* kolekcija Rimski Šančevi i Kać, što se potencijalno može objasniti činjenicom da se, zbog uslova gajenja u *ex situ* uslovima, nalaze u manjoj kompeticiji sa okolnom florom u odnosu na jedinke koje se nalaze u prirodnim populacijama. Najznačajnija komponenta na PC2 je veličina pupoljaka, koja je najmanja u populaciji Titelski breg, a njihova veličina raste sa smanjenjem vrednosti na Y osi, a najmanja je u njenom negativnom delu (Slika 3). Sanz-Perez i Catro-Diez (2010) objašnjavaju smanjenje veličine pupoljaka kod tri vrste iz roda *Quercus* u slučajevima kada se oni nalaze u hladovini i usled nedostatka vode. Jedinke sa lokaliteta Titelski breg se nalaze na izuzetno strmoj (vertikalnoj) padini te se većim delom dana nalaze u hladovini što može imati uticaj na smanjenje veličine pupoljaka. Brojnost lenticela kao najznačajniji faktor treće glavne komponente opada sa prelaskom iz pozitivnog u negativni deo Y ose (Slika 4).

Sve statističke metode su pokazale prisustvo fenotipske varijabilnosti unutar i između analiziranih populacija *Prunus fruticosa*. Najviša varijabilnost je zabeležena kod kvantitativnih karaktera, dok je nešto niža uočena kod kvalitativnih karaktera. Visok stepen varijabilnost na fenotipskom nivou omogućio je selekciju početnog materijala iz prirodnih populacija koja može poslužiti u procesu oplemenjivanja prilikom stvaranja novih sorti i podloga. Najvažnija fenotipska karakteristika u oplemenjivačkom programu podloga je



bujnost biljke, a sve jedinke su pokazale znatan nivo varijabilnosti ove osobine. Samim tim u procesu stvaranja novih podloga na koje će se kalemiti plemenite (savremene) sorte trešnje i višnje imamo dobar i raznovrstan početni materijal iz kog se samo selekcijom mogu odabrati genotipovi sa povoljnim karakteristikama. Daljim radom uz primenu hibridizacije sa blisko srodnim vrstama moguće je i dodatno popraviti njihove karakteristike što će na kraju dovesti do stvaranja nove podloge ili sorte.

## **7.2. Genetička varijabilnost i struktura populacija stepske višnje primenom SSR markera**

Genetička varijabilnost stepske višnje do sada je sprovedena samo u nekoliko istraživanja (Barac i sar., 2013, Barac i sar., 2014). Trešnja i višnja kao bliski srodinci i značajne vrste sa ekonomske tačke gledišta su često bili predmet istraživanja, kako divlji genotipovi i populacije, tako i gajene sorte (Schieler i sar., 2003; Holtken i Gregorius, 2006; Kacar i sar., 2006; Guarino i sar., 2009; Xuan i sar., 2009; Mariette i sar., 2010; Ganopoulos i sar., 2010). Sva istraživanja su pokazala relativno visoke vrednosti svih parametare genetičke varijabilnosti u germplazmi i populacijama ova dva najznačajnija predstavnika podroda *Cerasus*.

Od 52 mikrosatelitska lokusa poreklom iz genoma breskve (28), trešnje (6) i višnje (1) uspešno je amplifikovano 86,54% (45). Deo analiziranih lokusa (9) su dali produkte kompleksnog obrazca, odnosno imali su veći broj alela od nivoa ploidnosti stepske višnje ( $2n=4X=32$ ), te su isključeni iz dalje analize. Prisustvo većeg broja proizvoda amplifikacije u odnosu na ploidnost analiziranog uzorka je uočio i Khadivi-Khub (2014) gde je lokus BPPCT007 davao veći broj alela od očekivanog kod trešnje koja je diploid i više od četiri alela kod tetraploidne višnje i *Prunus x gondouinii*. Prisustvo većeg broja alela od očekivanog za lokus BPPCT007 i lokus BPPCT038 potvrdili su Antonius i sar., (2012) kod analiziranih genotipova *P. cerasus*. U okviru ovog istraživanja oba prethodno navedena lokusa su dala maksimalno 4 alela.

Visok nivo transferabilnosti SSR markera, razvijenih u genomima breskve, višnje i trešnje, koji je dobijen u ovom istraživanju je očekivan ukoliko se u obzir uzmu rezultati

koje su objavili drugi autori. Dirlevanger i sar., (2002) navodi da je ukupna transferabilnost mikrosatelita iz genoma breskve u genom kajsije iznosila 93%, dok je kod trešnje ovaj procenat bio nešto niži i iznosio je 80,05 %. Ova grupa je istražila i mogućnost primene seta SSR markera i u druge predstavnike familije *Rosaceae*, rodove *Malus* i *Fragaria*, pri čemu je procenat uspešne amplifikacije iznosio oko 50%. Cipriani i sar., (1999) su dobili neznatno niži procenat uspešnih amplifikacija kod trešnje i višnje (76%) u odnosu na rezultate dobijene u ovom radu za stepsku višnju. Istraživanjem transferabilnosti 145 parova prajmera za SSR markere Mnejja i sar. (2010) navode da je stopa transferabilnosti u okviru roda *Prunus* iznosila 63,9%, dok je kod drugih rodova iz familije *Rosaceae* iznosila samo 16,3%. Visoka stopa uspešne amplifikacije SSR markera razvijenih u genomu breskve između različitih vrsta se može objasniti visokim stepenom konzerviranosti nukleotidnih sekvenci gena koji imaju svoju ekspresiju u okviru roda *Prunus*. Drugi razlog potencijalno može biti u građi prajmera, odnosno da njihova nukleotidna sekvenca čini deo strukturnih gena (Yamamoto i sar., 2002). Sve ovo omogućuje upotrebu istih SSR prajmera u različitim vrstama za analizu intra- i interspecijes varijabilnosti kod blisko srodnih vrsta (Mnejja i sar., 2010).

Populacije stepske višnje iz prirodnih populacija sa teritorije Vojvodine, Srbije i iz *ex situ* kolekcija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i Corvinus univerziteta u Budimpešti, pokazale su visok nivo diverziteta kada su u pitanju mikrosatelitski markeri. Posmatrajući celu populaciju ukupno je identifikovano 6,49 alela po analiziranom lokusu što je znatno više u odnosu na prethodno objavljene rezultate kod ove vrste (Barac i sar., 2013, Barac i sar., 2014). Ovaj rezultat je očekivan kada se u obzir uzme broj analiziranih jedinki i markera. Povećanje prosečnog broja alela u odnosu na prethodna istraživanja se može objasniti različitim metodološkim pristupom, odnosno upotrebom poliakrilamidnog gela za razdvajanje produkata PCR reakcije koji ima znatno veću moć rezolucije u odnosu na agarozne gelove koji su korišteni u radovima Barac i sar. (2013, 2014). Razlike u broju alela na nivou različitih populacija se ogledaju i u veličini analiziranih populacija, pa tako najmanja populacija Kać, sa tri jedinke, ima i najmanji broj alela. Analizirajući divlje populacije trešnje i kolekciju sorti trešnje koje se gaje u celom svetu Guarino i saradnici (2009) za prosečan broj alela po lokusu kod svih analiziranih jedinki su dobili istu vrednost

kao i u ovde analiziranim populacijama stepske višnje (6,5). Ukoliko se analiziraju odvojeno sorte i prirodne populacije, isti autor navodi izraženo smanjenje broja alela po lokusu kod jedinki iz divljih populacija (2,78), dok je ovaj parametar kod jedinki iz kolekcije neznatno povećan (7,14). Suprotne rezultate objavila je grupa autora (Mariette i sar., 2010). gde je broj alela u divljim populacijama trešnje (9) veći u odnosu na savremene sorte (4,29). Smanjen broj alela trešnje u prvom slučaju u odnosu na stepsku višnju je očekivan ukoliko se u obzir uzme razlika u ploidnosti dve vrste, odnosno maksimalni broj različitih alela koji se može identifikovati po analiziranoj jedinki i genotipu. Pored toga, analizirani broj populacija i uzoraka po populaciji u ovom istraživanju je bio niži. Povećanje broja alela kod divljih genotipova trešnje u rezultatima Mariette i sar. (2010) u odnosu na broj alela dobijen kod stepske višnje je činjenica da analizirani materijal vodi poreko iz 9 različitih zemalja Evrope i Azije. Ostala istraživanja su pokazala velike razlike u pogledu prosečnog broja alela kada se analiziraju kolekcije koje sadrže sorte trešnje koje se gaje u voćnjacima širom sveta: 2,8 (Dirlewanger i sar., 2002; Ganopoulos i sar., 2010), 4,1 (Kacar i sar., 2005), 5,2 (Jing-Yong i sar., 2009), 6,6 (Xuan i sar., 2009), 8,23 (Stanys i sar., 2012). Antonius i sar., (2012) i Xuan i sar., (2009) su analizirajući diverzitet višnje došli do približno istog broja alela po analiziranom lokusu, 8 i 8,5. Tetraploidne vrste iz podroda *Cerasus* (*Prunus cerasus* i *P. fruticosa*) su u proseku zajedno imale 10,7 alela po lokusu (Cantini i sar., 2001). Višnja je tetraploidna vrsta, pa samim tim očekivano ima i veći broj različitih alela u odnosu na diploidnu trešnju. Istovremeno, ona je i hibridna vrsta nastala iz hibridizacije trešnje i stepske višnje, pa i pored istog nivoa ploidnosti kao i stepska višnja, očekivano ima veći broj alela usled prisustva alela iz oba roditelja.

Vrednosti uočene ( $H_o$ ) i očekivane ( $H_e$ ) heterozigotnosti su bile dosta visoke, posmatrano za total, ali i za svaku analiziranu populaciju pojedinačno. Kao i u slučaju broja alela po lokusu i ovi parametri su bili znato viši u odnosu na prethodna istraživanja (Barac i sar., 2013; Baraci sar., 2014), a javljaju se iz istih razloga kao i prethodni (veličina populacija i rezolucija gela). Diploidne vrste iz roda *Prunus* pokazuju visok nivo varijabilnosti ovih parametara, ali donja i gornja granica intervala za uočenu i očekivanu heterozigotnost je manja u odnosu na dobijene vrednosti za ispitane populacije stepske višnje, što je u skladu sa očekivanjima uzimajući u obzir tetraploidnu prirodu genoma ove

vrste (Testolin i sar., 2000; Dirlevwanger i sar., 2002; Hormaza i sar., 2002; Yamamoto i sar., 2002; Maghuly i sar., 2005; Ganopoulos i sar., 2010). Sa druge strane, višnja i stepska višnja kao tetraploidni predstavnici podroda *Cerasus* su pokazali visoke vrednosti navedenih parametara genetičkog diverziteta koje su se kretale u granicama dobijenih i za analizirane *in situ* i *ex situ* populacije stepske višnje.

Iz prethodno navedenog se jasno uočava prisustvo visoke varijabilnosti kod populacija stepske višnje. U većini literaturnih podataka podržana je visoka varijabilnost prirodnih populacija trešnje i višnje koja se javlja kao posledica uske genetičke osnove iz koje su nastale sve savremene sorte (Wunch i Hormaza, 2002). Povećanju stepena diverziteta u korist prirodnih populacija, naspram gajenih sorti, može se naći u osnovi nasleđivanja koja je karakteristična za tri navedene vrste, odnosno u njihovoj izraženoj stranooplodnji.

Populacije stepske višnje su pokazale izraženu struktuiranost, a najverovatniji broj klastera je 5, dok se kao sekundarna vrednost za broj klastera može uzeti da je  $K=8$ . Povećanjem veličine populacija, odnosno broja analiziranih jedinki, i primarni i sekundarni pik za  $K$  vrednost su imali višu vrednost (Barać i sar., 2015). Struktuiranost populacija blisko srodnih vrsta iz podroda *Cerasus* je veoma slabo istražena kod divljih populacija trešnje (Guarino i sar., 2008; Mariette i sar., 2010), dok populacije višnje nisu bile predmet istraživanja. Divlje populacije i *ex situ* kolekcije stepske višnje za većinu analiziranih jedinki i populacija su pokazale jasnu pripadnost određenom klasteru dok se samo manji broj njih nalazio u admiksiji. Najviši nivo admiksije, kao i u slučaju parametara genetičkog diverziteta su pokazale populacije Fruška gora 1 i Fruška gora 2 za obe vrednosti  $K$  što je nastalo kao posledica velike fizičke udaljenosti između jedinki čime je smanjen protok gena između manjih subpopulacija. Populacije koje su pokazale izraženu pripadnost jednom klsteru (Popovica, Bački Jarak i Vrdnik) su zauzimale malu površinu čime je omogućeno oprašivanje, odnosno razmena genetičkog materijala, između svih jedinki na tom lokalitetu. Suprotno ovim rezultatima, jedinke iz divljih populacije trešnje su uglavnom ispoljavale pripadnost u dva ili više genofondova, dok je manji procentualni udeo imao jasnu pripadnost samo jednom od klastera (Guarino i sar., 2008; Mariette i sar., 2010). Slično trešnji, sorte populacije i savremene sorte breskve pokazuju viši nivo

admiksije u odnosu na stepsku višnju što se pripisuje njihovoj kompleksnoj istoriji oplemenjivanja (Aranzana i sar., 2010; Cao i sar., 2012). Razlika nastala u struktuiranosti kod populacija stepske višnje u odnosu na trešnju i breskvu može nastati iz razlika u ekonomskoj važnosti ovih vrsta. Bez obzira na to što su sve analizirane populacije divlje, privlačnost plodova za čoveka i životinje je znatno veća kod trešnje i breskve. Ovim je omogućen transport semena na veće razdaljine čime se brišu geografske barijere i gubi se jasna pripadnost jednom klasteru, a populacije se dovode u stanje admiksije.

Ispitivanjem genetičke udaljenosti između ispitivanih jedinki stepske višnje na osnovu Nei i Li koeficijenta, te konstruisanjem dendrograma kako bi se ovi podaci jasnije prikazali, može se videti prisustvo određenog grupisanja jedinki sa pojedinih lokaliteta u klasteru ili manje podklasteru u okviru jednog velikog klastera. Jedinke sa lokaliteta Popovica, Bački Jarak, Titelski breg, Vrdnik i Kać su shodno pripadnosti jednoj od populacija klasifikovane zajedno. Imajući u vidu veliku geografsku udaljenost ili postojanje fizičkih prepreka usled čega nema ni protoka gena između ovih populacija ovakva jasna diferencijacija, kao i u analizi primenom STRUCTURE softera, je očekivana. *Ex situ* populacija na Rimskim šančevima je sačinjena od jedinki koje su umnožene kalemljenjem, a biljni materijal je uzet iz populacije Fruška gora 2 što je dovelo da njihovog svrstavanje u zajednički klaster. Pojedini predstavnici populacija Fruška gora 1 i 2 se nalaze zajedno u manjim klasterima ili su priključeni nekom od klastera koje čine druge populacije. Ovakva distribucija jedinki iz prethodno pomenutih populacija u različitim klasterima se objašnjava visokim diverzitetom ovih populacija nastalim usled njihove veličine. Istovremeno, sličnosti su moguće obzirom da su geografski najbliže jedna drugoj. Slično je zabeleženo u tri divlje populacije kajsije Ily doline na zapadu Kine kao i kod populacije stepske višnje (Tian-Ming i sar., 2007). Jedinke sa lokaliteta Daxigou su činile jedan klaster, dok su jedinke sa lokaliteta Xinyuan i Gongliu formirale dva klastera, a u svakom od njih su se nalazile jedinke koje pripadaju obema populacijama. Klaster analiza populacija vrste *Malus sieversii* je grupisala dve geografski bliske populacije u jedan klaster dok su jedinke iz geografski udaljenijih populacija činile zasebne klasteru (Zhang i sar., 2007). Oba navedena istraživanja su pokazala da su geografski bliske populacije i genetički sličnije jedna drugoj, a da se sa povećanjem udaljenosti smanjuje

stepen protoka gena čime su one i genetički udaljenije, odnosno u klaster analizi grade zasebne klade.

Primenom Bruvo koeficijenta genetičke sličnosti (Bruvo i sar., 2004) dobijeni su podaci slični kao i kod analize podataka primenom klaster metode. Jasno se izdvajaju jedinke sa lokaliteta koji su prostorno udaljeni dok, se dve populacije sa Fruške gore jednim delom preklapaju u pogledu pripadnosti grupi E. Ovoj grupi pridaju i jedinke iz *ex situ* kolekcije Rimski šančevi što je uzrokovano njenim poreklom od populacije Fruška Gora 2. Posmatranjem rezultata za Lynch koeficijent genetičke udaljenosti (Lynch, 1990) uočava se pripajanje jedinki sa lokaliteta Popovica velikom klasteru koji je sačinjen od kompletnih ili dela uzoraka iz 7 populacija. Razlika u dobijenim rezultatima je nastala usled različitog načina računanja genetičke udaljenosti. Lynch koeficijent genetičke udaljenosti koristi prosti obrazac zasnovan na broju zajedničkih alela, dok Bruvo koeficijent uzima obzir i potencijalno prisustvo mutacija. Odnosno, Bruvo distanca se dobija na osnovu tipa ponavljajuće sekvence (dinukleotidna, trinukleotidna...) i veličine produkata PCR reakcije, što zajedno sa brojem deljenih alela između jedinki ulazi u jednačinu prilikom njegovog izračunavanja.

Ukoliko se posmatraju populacije kao celina najveća vrednost Nei i Li koeficijenta genetičke udaljenosti je bila između populacija Bački Jarak i Vrdnik, a najniža između populacije Fruška gora 2 i Rimski Šančevi. Kao i u slučaju kada populacije posmatramo kroz svaku pojedinačnu jedinku i u ovom slučaju postoji određen nivo sličnosti između genetičke i geografske udaljenosti. Međutim, ukoliko se primenom Mantel testa porede matrice za ove dve vrednosti dobija se odsustvo korelacije ovih parametara. Prostorna udaljenost *ex situ* kolekcije na Rimskim Šančevima i lokaliteta Fruška gora 2 u odnosu na njihovu genetičku udaljenost koja je veoma mala iz prethodno navedenih razloga najverovatnije za posledicu ima ovakav rezultat. Takođe, lokacija oglednog polja Rimski šančevi na kojima je smeštena *ex situ* populacija izvedena od jedinki sa lokaliteta Fruška gora 2, je prostorno znatno bliža populaciji Bački Jarak, a na osnovu genetičke udaljenosti se nalazi na gotovo istom rastojanju kao i matična populacija.

Diferencijacija između populacija stepske višnje izražena kroz  $F_{st}$  i  $G_{st}$  parametre je pokazala umerene vrednosti za najveći broj parova populacija. Ovi rezultati ukazuju na

to da se veći udeo diverziteta nalazi unutar populacija dok znatno malji leži u razlikama između populacija. Nešto više vrednosti su zabeležene na manjem broju populacija u okviru kojih je analiziran manji broj jedinki stepske višnje (Barać i sar., 2015). Divlje populacije kajsije su takođe imale vrednosti  $F_{st}$  i  $G_{st}$  u umerenim granicama (Tian-Ming i sar., 2007). Slične vrednosti koje su se kretale od niskih do umerenih vrednosti diferencijacije kod divljih populacija *Prunus avium* otkrili su pojedini drugi autori (Frascaria i sar., 1993; Mariette i sar., 2010). Nešto više vrednosti su uočene kod populacija *Prunus spinosa*, ali primenom hloroplasnih DNK markera (Mohanty i sar., 2002), dok je snažno izražena diferenciranost zabeležena između populacija *Prunus pseudocerasus* (Li i sar., 2009). Fragmentisanost područja rasprostiranja *P. fruticosa* u Vojvodini može nastati kao rezultat postojanja geografskih barijera (Fruška gora) ali i prisustva antropogenog uticaja što za posledicu ima nakupljanje varijabilnosti na nivou populacije koja im pomaže da se prilagode različitim lokalnim uslovima sredine i da se razlikuju od ostalih (Li i sar., 2009). Nasuprot ovom efektu, pojedine vrste ptica mogu prenositi seme na velike udaljenosti i time potencijalno smanjiti razlike između populacija. Ovakav način disperzije semena kod vrsta iz roda *Prunus* uočen je kod magrvice (*Prunus mahaleb*) (Jordano i Godoy 2000). Balans između ova dva uticaja je najverovatnije doveo do umerenog nivoa diferencijacije među populacijama stepske višnje. Rezultat Mantelovog testa poređenja  $F_{st}$  i  $G_{st}$  parametara sa prostornom udaljenošću između populacija ukazuje na nepostojanje korelacije između ova dva parametra, što bi moglo podržati raznošenje semena na velike distance pomoću ptica.

Analiza mikrosatelitskih lokusa pokazala je prisustvo visokog nivoa varijabilnosti unutar i između populacija stepske višnje. Svaka od primenjenih metoda procene nivoa diverziteta ukazala je na postojanje najveće varijabilnosti kod jedinki sa lokaliteta Fruška gora 1, Fruška gora 2 i Rimski šančevi. Takođe, uočen je visok stepen diverziteta i slični obrasci varijabilnosti unutar i između populacija na fenotipskom i genotipskom nivou. Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost primene analiziranog biljnog materijala u procesu oplemenjivanja u kom bi se ciljanom selekcijom i planskom hibridizacijom mogao stvoriti novi, još viši nivo varijabilnosti, a na samom kraju i nove sorte i podloge.

### 7.3. Genetička varijabilnost i struktura populacija stepske višnje primenom SNP markera

Veliki napredak na polju tehnologija nove generacije doveo je do trenutka kada je moguće primeniti sekvenciranje delova genoma različitih vrsta u svrhu procene nivoa diverziteta u okviru jedne ili više vrsta. Na osnovu ovoga razvijena je metoda koja koristi sekvenciranje nove generacije kako bi se identifikovale razlike na nivou nukleotida nazvana genotipizacija putem sekvenciranja (Genotyping by Sequencing, GBS), a podaci dobijeni ovim putem predstavljaju reprezentativni uzorak sekvence celog genomomogu se koristiti u populaciono genetičkim istraživanjima, karakterizaciji gemplazme, oplemenjivanju i mapiranju različitih svojstava (Elshire i sar., 2011).

Primenom ove metode kod jedinki koje pripadaju populacijama vrste *Prunus fruticosa* otkriven je veliki broj razlika na nivou DNK sekvence, odnosno razlika na nivo pojedinačnih baza. Ovim putem je identifikovano 170256 SNP markera, a ukupan procentualni udeo heterozigota je iznosio 0,436. Za poređenje sekvenci dobijenih sekvenciranjem uzoraka stepske višnje, u odsustvu postojanje sekvence genoma trešnje ili višnje kao najbližih srodnika, upotrebljen je genom breskve (peach genom v1.0, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) čime je deo sekvenci koje se ne podudaraju odbačen, a time i određeni procenat SNP lokusa. Heterozigotnost SNP markera kod sorti breskve iznosi 0,28 (Aranzana i sar., 2012) što je znatno niže u odnosu na vrednost dobijenu kod populacija *P. fruticosa*. Dobijena razlika između dve vrste je očekivana ukoliko se uzme u obzir uska genetička osnova sorti u odnosu na divlje populacije.

Razlika u heterozigotnosti između SSR i SNP markera je duplo viša u korist mikrosatelita, 0,885 u odnosu na 0,436. Isti odnos razlika u nivou heterozigotnosti između ova dva tipa markera otkriven je i kod vinove loze (Emanuelli i sar., 2013). Autori ovu činjenicu objašnjavaju kroz prirodu mutacija oba tipa molekularnih markera, odnosno, manji procenat retkih alela u distribuciji frekvencija unutar SNP markera u odnosu na SSR. Pored alela sa veoma niskom frekvencijom za razlike u nivou heterozigotnosti takođe mogu biti odgovorni i aleli koji imaju umerenu frekvenciju, a oni posebno dolaze do izražaja kada se analizira mali uzorak koji ne predstavlja celokupni nivo varijabilnosti u

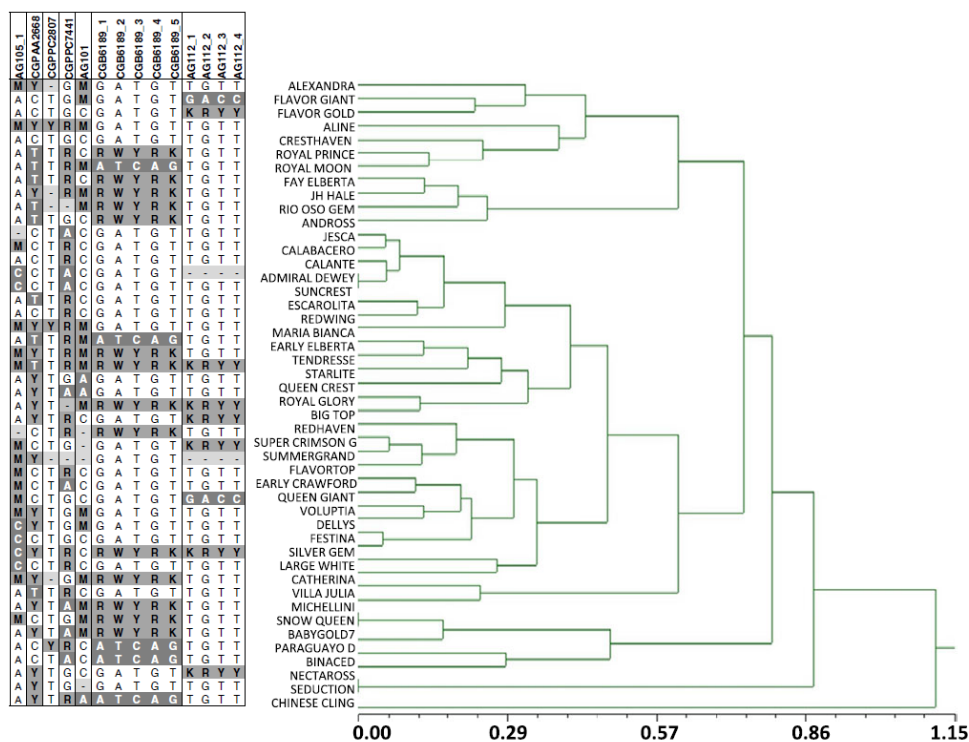


okviru roda ili vste. Takođe, Emanuelli i sar. (2013) ističu da se savremene metode sekvenciranja koje imaju visoku propusnu moć zasnivanju na merenju relativnog signala, odnosno na jačini signala za dva očekivana alela. Ovo za posledicu ima ometanje signala ukoliko se nađe nulti alel ili alel koji je drugačiji od očekivanog, što je veoma moguće, a ovo vodi ka pogrešnoj genotipizaciji uzorka.

Klaster analiza na osnovu SNP markera razvrstala je većinu uzoraka prema njihovoj populacionoj pripadnosti. Outgrupa koja je priključena uzorcima stepske višnje prilikom GBS analize, a čine je četiri genotipa trešnje i jedan genotip višnje, izdvojila se u zaseban klaster sa najvećom genetičkom udaljenošću u odnosu na uzorke stepske višnje. Ovaj rezultat je u skladu sa taksonomskom pripadnošću uzoraka različitim, ali blisko srodnim vrstama. Struktura samog klastera koji čine jedinke iz outgrupe je takva da je uzorak višnje najbliži uzorcima stepske višnje u odnosu na uzorke trešnje. Shodno predloženom hibridnom poreklu višnje od stepske višnje i trešnje (Olden i Nybom, 1968) ovakav raspored grana u okviru klade je očekivan. Dendrogram konstruisan na osnovu genetičke udaljenosti pokazuje klasifikovanje većeg dela jedinki stepske višnje u klastere i podklastere shodno lokalitetu sa kojih su uzorkovani. Populacije Fruška gora 1, Fruška gora 2 i Rimski šančevi su pokazale najviši nivo diverziteta i svrstane su u nekoliko podklastera. Kao i u slučaju SSR markera grupisanje u nekoliko klastera se može pripisati veličini ovih populacija i postojanju subpopulacione struktuiranosti. Klasifikovanje jedinki iz tri prethodno navedene populacije u zajedničke klade posledica je male prostorne udaljenosti lokaliteta i osnivačkih odnosa između populacije Fruška gora 2 i *ex situ* populacije Rimski šančevi. Istraživanje sorti trešnje gde je kao outgrupa upotrebljen po jedan genotip višnje (NY 54) i *Prunus x gondouinii* (Balaton) pokazalo je isto jasno izdvajanje ove outgrupe (Marti i sar., 2012) što takođe podržava hibridno poreklo *Prunus x gondouinii* od trešnje i višnje.

Poređenjem klastera konstruisanih na osnovu genetičke udaljenosti izračunate za mikrosatelitske markere i SNP markere uočavaju se sličnosti u smislu jasnog izdvajanja u zasebne klastere jedinki iz pojedinih populacija. Razlike na nivou populacija se odnose na bliže ili dalje klasifikovanje pojedinih lokaliteta zavisno od tipa markera, koje nastaje kao posledica različitog broja markera, a samim tim i ukupnog broja alela koji su analizirani.

Ovakve razlike u rezultatima klaster analize između SSR i SNP primećene su i kod sorti trešnje (Marti i sar., 2012). Primera radi, autori navode dve sorte Stella i Compact Stela koje se jasno razlikuju u određenim fenotipskim parametrima i vremenu zrenja koje primenom SSR markera nije bilo moguće razlikovati, sok su SNP markeri imali tu moć. Najslikovitiji prikaz rezolucije i razlike u rezultatima klaster analize primenom ova dva tipa markera dali su Aranzana i sar (2012) (Slika 16). Postavljanjem sekvenci dobijenih unutar mikrosatelitskog lokusa naspram klaster analize na osnovu SSR markera ovi autori su pokazali da pojedini genotipovi iako veoma bliski na dendrogramu pokazuju visoku varjabilnost u DNK sekvenci i obrnuto. Ovim se može objasniti da su pojedini uzorci i populacije stepske višnje bliži ili dalji zavisno od tipa markera, npr. odnosi između jedinki unutar populacija Popovica i Bački Jarak. Gde su pojedine jedinke iz ovih populacija na osnovu SSR rezultata identične dok SNP markeri pokazuju postojanje manje ili veće udaljenosti između njih.



Slika 16. Aranzana i sar (2012) poređenje sekvenci dobijenih unutar mikrosatelitskog lokusa naspram klaster analize na osnovu SSR markera

Analiza glavnih komponenti za SNP markere u mnogome prati rezultate klaster analize i rezultate dobijene za SSR markere. Jedinke sa lokaliteta Popovica, Bački Jarak i Titelski breg su svrstane u zasebne grupe, dok su jedinke iz ostalih populacije grupisane u jedan veliki klaster. Pripadnici outgrupe su kao i kod klaster analize u potpunosti odvojeni od uzoraka *P. fruticosa*. Razlike u odnosu na PCA analizu kod SSR markera za Bruvo koeficijent se pre svega ogleda u izdvajanju pojedinih genotipova sa lokaliteta Fruška gora 1 i Fruška gora 2 u manje zasebne grupe i izdvajanje populacije Vrdnik, dok su tri prethodno navedene populacije i dalje nezavisne od ostalih. Poređenjem sa PCA grafikonom za udaljenost na osnovu Lynch koeficijenta, populacija Popovica se ne izdvaja jasno kao kod analize SNP markera. Gupisanje jedinki sa pojedinih lokaliteta u zasebne klaster nastaje kao i kod prethodne analize SNP markerima tako kod svih statističkih analiza za mikrosatelitske lokuse usled izostanka protoka gena, a veći diverzitet pojedinih populacija je posledica veličine površine koju zauzimaju, odnosno broja analiziranih uzoraka. Razlika između rezultata oba koeficijenta genetičke udaljenosti za SSR markere i rezultata SNP markera je u redu veličina na X i Y osi PCA grafika. Vrednosti na kordinatama za SNP su znatno veće, a nastaju kao posledica razlika u broju analiziranih markera, koji takođe idu u korist ovog tipa molekularnih markera. Jasnije odvajanje pojedinih grupa i istovremeno povećanje vrednosti na obe ose je pokazano i kod vinove loze (Emanulli i sar., 2013), a izraženije povećanje vrednosti u slučaju stepske višnje je posledica i analize znatno većeg broja SNP markera (170256 u odnosu na 384).

Populaciona struktura primenom Bajesovog klaster metoda implementiranog u fastSTRUCTURE pokazala je razliku u najverovatnijem broju klastera (K) i on je u ovom slučaju iznosio 7, nasuprot 5 sa sekundarnim pikom na vrednosti 8 dobijenih za SSR markere. Daljim poređenjem ove metode analize populacione strukture, između dva tipa molekularnih, može se primetiti isti nivo visoke pripadnosti određenom klasteru za jednike u populacijama Popovica, Bački Jarak, Titelski breg i Vrdnik. U oba slučaja jednike Pf\_0113 (lokalite Popovica) i Pf\_0405 (lokalitet Vrdnik) pokazuju da se nalaze i manje ili više izraženoj admiksiji. Populacije Fruška gora 1 kada se porede SNP rezultati sa SSR za K=5 uočava se sličnost gde se deo jedinki može svrstati u dva klastera, a pojedine jedinke imaju visoku pripadnost tačno određenom klasteru. Sličnost postoji i kod kolekcije sa

Corvinus univerziteta u Budimpešti gde su sve jedinke u admiksiji, pri čemu mogu pripadati i većem broju klastera od dva. Ova *ex situ* populacija vodi poreklo sa većeg broja lokaliteta u Mađarskoj te poseduje i veliki diverzitet. Poređenja radi, kolekcija na Rimskim šančevima vodi poreklo sa jdnog lokaliteta (Fruška gora 2) čime je redukovana njen diverzitet u odnosu na prethodno pomenutu *ex situ* kolekciju. Velika razlika je vidljiva kod populacije Fruška Gora 2 koja je za SNP markere izdvojena na dve subpopulacije, dok kod SSR za  $K=5$  pokazuje visoku pripadnost jednom klasteru za gotovo sve uzorke, a za  $K=8$  pokazuje visok nivo admiksije. Kada se posmatra svaka populacija kao celina tada se za  $K=8$  ne postoje velike razlike u odnosu na SSR kada se govori o visokoj pripadnosti određenom klasteru odnosno prisustva admiksije, a za  $K=5$  jedina razlika je odsustvo admiksije populacije Fruška gora 2. Ovakav rezultata je posledica visokog diverziteta unutar populacije Fruška gora 2, koji u kombinaciji sa malim brojem SSR markera (35) i malom vrednošću  $K$  (5) nije supeo da ukaže na postojanje struktuiranosti. Emanuelli i sar. (2013) analizom različitih uzoraka vinove loze pokazuje da je znatno bolji uvid u populacionu strukturu omogućen primenom SNP u odnosu na SSR markere. Što u slučaju stepske višnje pre svega znači otkrivanje prisustva subpopulacione struktuiranosti u odnosu na prisustvo admiksije otkriveno SSR markerima za  $K=8$  ili jasnu diferenciranost u odnosu na ostale klastera za  $K=5$ .

Shodno tipu oplodnje kod većina pripadnika roda *Prunus*, koje se zasniva na stranooplodnji, do odgovora na poreklo visokog diverziteta unutar populacija se može doći i analizom S lokusa koji je odgovoran za ovo svojstvo. Analizom prvog i drugog introna gena za S-Rnazu primenom konsenzus prajmera (Sonneveld i sar., 2003) identifikovan je različiti broj S alela u okviru svake od analiziranih populacija. Iako, ovim markerima nije moguće identifikovati sve S alele kao i alele koji su degenerisani što ih čini odgovornim za autokompatibilnost, ustanovljen je visok nivo korelacije između broja različitih S alela i nivoa diverziteta unutar svake od populacija na osnovu Nei-evog koeficijenta (Nei, 1978). Najveći broj različitih S alela identifikovan je kod populacije Fruška gora 1, nakon koje slede populacije Fruška gora 2 i Rimski šančevi sa 6. Ovim je, pored broja analiziranih jedinki po populaciji i površine koju populacije zauzimaju moguće objasniti i nivo diverziteta koji raste sa povećanjem broja različitih S alela. Takođe, sve populacije imaju

jedan ili više zajedničkih alela čime bi i bez prisustva geografske udaljenosti i fizičkih barijera, bila onemogućena razmena genetičkog materijala između njih, odnosno ne bi bilo protoka gena.

Najniži nivo analize varijabilnosti populacija stepske višnje jeste otkrivanje razlika u samoj sekvenci DNK molekula. SNP su potvrdili postojanje ovih razlika i potvrdili rezultate koji su dobijeni analizom fenotipskih podataka i genotipskih podataka na nivou mikrosatelitskih lokusa. Sva tri nivoa istraživanja varijabilnosti pokazala su postojanje određenog nivoa varijabilnosti unutar i između analiziranih populacija stepske višnje na osnovu kojih se može doneti odluka o tome koje jedinke iz koje od analiziranih populacija treba preneti i gajiti u *ex situ* kolekciji. Takođe, ovi podaci će pomoći i u samom oplemenjivačkom procesu prilikom izbora roditeljskih parova kako bi se izabrale jedinke koje nose samo poželjne karakteristike i kako bi se dobilo najbolje potomstvo.

#### **7.4. Asocijativna analiza fenotipskih karakteristika i SNP markera**

Asocijativnom analizom moguće je identifikovati prisustvo vezanosti između fenotipskog svojstva od interesa sa genotipom. Na ovaj način je moguće ubrzati oplemenjivački procesk kroz primenu marker asistiranе selekcije.

Jedna od najvažnijih odlika stepske višnje kao podloge jeste redukcija bujnosti, te je u ovom radu izvršena analiza vezanosti između ovog svojstva i SNP markera dobijenih pomoću genotipizacije putem sekvenciranja. Prag koji je uzet kao pokazatelj prisustva vezanosti između genotipa i fenotipa iznosio je  $4 \times 10^{-7}$  za vrednost p. Najviši nivo asocijacije ( $p < 10e-15$ ) između bujnosti i genotipa pokazali su po jedan SNP marker na hromozomima 7 i 8 . Ovaj rezultat bi mogao da se iskoristi u fenotipskoj oceni jedinki u predviđanju nivoa njihove bujnosti bez potrebe da se one gaje duži vremenski period. Sa druge strane, prisustvo nivoa vezanosti iznad praga značajnosti koji se najčešće uzima kao referentna vrednost ( $p < 10e-7$ ) za svojstvo bujnosti pokazao je i veliki broj drugih markera. Ovim se dovodi u pitanje postojanje stvarnog prisustva postojanja veze između genotipa i fenotipa, a najverovatnija posledica ovako velikog broja pozitivnih asocijacije je prisustvo populacione struktuiranosti (Pritchard i sar., 2000). Da bi se ovo prevazišlo

Spelman i saradnici (1993) predlažu transmission/disequilibrium test (TDT) koji podrazumeva upotrebu roditeljskih genotipova u analizi kako bi se umanjilo ili u potpunosti izbegao uticaj populacione struktuiranosti. Ovo bi zahtevalo dodatno vreme za uzorkovanje i identifikaciju roditelja što je veoma teško u prirodnim populacijama, a potencijalno rešenje bi moglo biti u povećanju broja populacija i jedinki. Ostala analizirana fenotipska svojstva takođe pokazuju viši ili niži nivo asocijacije sa genotipom dobijenim sa osnovu SNP markera. Do sada je u okviru roda *Prunus* sprovedeno jedno istraživanje vezano za primenu asocijativnog mapiranja kako bi se utvrdilo postojanje vezanosti fenotipa i mikrosatelitskih lokusa (Cao i sar., 2012). U ovom istraživanju analizirane su fenotipske karakteristike ploda jedinki iz lokalnih populacija breskve u Kini i tom prilikom je takođe utvrđen različit nivo asocijacije i broj SSR lokusa vezanih za ova svojstva. Isti autori navode da bi za potvrdu njihovih rezultata trebalo sprovesti ukrštanje dva roditelja i na dobijenoj populaciji ponoviti analizu kako bi se izbegle eventualne pogrešne asocijacije. Ovo je potencijalno i rešenje u slučaju stepske višnje gde bi se ukrštanjem dve jedinke sa malom i velikom bujnošću mogla dobiti populacija na kojoj bi se ponovila asocijativna analiza i dobio bolji uvid u položaj markera koji utiču na ovo fenotipsko svojstvo.

Oplemenjivanje zasnovano na fenotipskim karakteristikama se prevashodno oslanja na iskustvo oplemenjivača. Neke od osobina nije lako proučiti, poput veličine korenovog sistema koji može uticati na bujnos biljke, oplemenjivači se se sreću sa velikim poteškoćama. Ove probleme moguće je prevazići upotrebom metoda genotipizacije koje mogu da generišu veliku količinu podataka, poput GBS metode, koji će dalje kroz primenu marker asistiranu selekciju znatno olakšati i obezbediti veću efikasnost oplemenjivačkog rada. Rezultati asocijativne analize genoma stepske višnje su dali prvi uvid o mogućnost primene ovog metoda kod ove vrste. Takođe, ovi rezultati mogu usmeriti dalji tok identifikacije markera ka hromozomima na kojima postoji visok nivo povezanosti na relaciji genotip/fenotip sa krajnjim ciljem primene u oplemenjivanju kroz marker asistiranu selekciju i oplemenjivanje.

## 8. ZAKLJUČAK

Analiza prirodnih populacija stepske višnje (*Prunus fruticosa*) primenom fenotipskih, mikrosatelitskih i SNP markera je potvrdila sve postavljene hipoteze.

Fenotipske karakteristike su ispoljile značajan nivo varijabilnosti što se posebno ističe za kvantitativne markere, dok je nešto niži stepen varijacija uočen kod kvalitativnih karaktera, a potpuno odsustvo varijabilnosti je uočeno samo u svojstvu prisustva lisnih žlezda.

Mikrosatelitski markeri poreklom iz *Prunus persica*, *P. avium* i *P. cerasus* su pokazali visok nivo transferabilnosti i uspešno se mogu koristiti u istraživanjima genoma *P. fruticosa*.

Populacije stepske višnje su pokazale visok nivo polimorfizma unutar i između populacija primenom mikrosatelitskih markera, a broj detektovanih alela u okviru lokusa se kretao od 2 (BPPCT022, UDP-018) do 11 (BPPCT034).

Varijabilnost u sekvenci DNK u okviru populacija vrste *Prunus fruticosa* je visoka, ovo je potvrđeno prisustvom velikog broja identifikovanih SNP markera koji je iznosio 170256.

Populacije stepske višnje na nivou sva tri tipa markera su pokazale visok nivo varijabilnosti. Ova varijabilnost je bila na visokom nivou kada se govori o svim analiziranim lokalitetima kao jednoj populaciji, dok je ona bila nešto niža između jedinki na jednom lokalitetu. Viši stepen diverziteta i postojanje subpopulacione struktuiranosti pokazala je samo populacija Fruška gora 2 uz statističke analize SNP tipa molekularnih markera.

Asocijativna analiza je pokazala prisustvo visokog nivoa vezanosti između fenotipa i SNP markera za pojedina svojstva, dok za neka od svojstava nije bilo moguće potvrditi prisustvo vezanosti iznad zadanog nivoa značajnosti. Bujnost kao najvažnije fenotipsko svojstvo pokazalo je značajan nivo vezanosti između fenotipa i dva SNP markera.

Svi analizirani genotipovi stepske višnje poseduju visok nivo fenotipskog diverziteta koji je potvrđen primenom SSR i SNP molekularnih markera. Ovako visok

diverzitet između ispitanih jedinki predstavlja dobru osnovu za selekciju koja za cilj ima iznalaženje podloga koje će nakon kalemljenja redukovati bujnost plemenitog dela.

Kroz detaljniju analizu i dalju primenu asocijativnog mapiranja moguće je doći do podataka koji mogu biti upotrebljeni u oplemenjivačkim programima kako bi se kroz primenu marker asistiranu selekciju ubrzalo i olakšalo stvaranje novih sorti i podloga.

Stepska višnja kao divlji srodnik vrsta od velikog ekonomskog značaja kao što su trešnja i višnja može imati značajnu ulogu u njihovom unapređenju, a u ovom radu je potvrđeno da poseduje veliki diverzitet što je čini još značajnijom i potencijalnim izvorom nove varijabilnosti koja je izgubljena duž oplemenjivačkog puta trešnje i višnje.

Takođe, ova biljna vrsta se nalazi i u crvenoj knjizi ugroženih vrsta flore Srbije te se ovim putem može ukazati na delove, pre svega Fruške gore kao nacionalnog parka, ali i u okviru drugi istraženih lokaliteta, koje treba zaštititi.



## 9. LITERATURA

- Andersen JR i Lubberstedt (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8:554–560.
- Antonius K, Aaltonen M, Uosukainen M, Hurme T (2012) Genotypic and phenotypic diversity in Finnish cultivated sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Genet Resour Crop Evol* 59: 375–388.
- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arus P (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121:87–92.
- Aranzana MJ, Abbasi EK, Howard W, Arus P (2010) Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genet* 11:69.
- Arif IA, Bakir MA, Khan HA, Al Farhan AH, Al Homaidan AA, Bahkali AH, Sadoon MA, Shobrak M (2010) A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Int J Mol Sci* 11:2007–2096.
- Badenes ML, Martinez-Calvo J, Llacer G (2000) Analysis of germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Euphytica* 114:187-194.
- Balmer M, Blanke M (2005) Developments in high density cherries in Germany. *Acta Hort* 667: 273-278.
- Barac G, Ognjanov V, Obreht D, Bosnjakovic D, Ljubojevic M, Gasic K (2013) Genetic diversity in population of European ground cherry (*Prunus fruticosa* Pall.) assessed by SSR markers. VII International Cherry Symposium. Book of abstract: 39.
- Barac G, Ognjanov V, Obreht D, Ljubojevic M, Bosnjakovic D, Pejic I, Gasic K. (2014) Genotypic and phenotypic diversity of cherry species collected in Serbia. *Plant Mol Biol Rep* 32: 92–108.
- Barać G, Ognjanov V, Dorić D, Ljubojević M, Dulić J, Miodragović M (2015) Primena molekularnih markera u očuvanju roda *Prunus*. Vek tehnologije molekularne genetike. Srpska akademija nauka i umetnosti, Ogranak SANU u Novom Sadu. 103-114.
- Beaver JA, Iezzoni AF, Ramm CW (1995) Isozyme diversity in sour, sweet and ground cherry. *Theor Appl Genet* 90:847 852.
- Becelaere GV, Lubbers EL, Paterson AH, Chee PW (2005) Pedigree- vs. DNA Marker-Based Genetic Similarity Estimates in Cotton. *Crop Sci* 45:2281-2287.

- Bianchi VJ, Sansavini S, Fachinello JC (2004) Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. Rootstock. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)* 61:303–306.
- Blažková J i Hlušíčková I (2004) First results of an orchard trial with new clonal sweet cherry rootstocks at Holovousy. *Hort Sci (Prague)* 31:47–57.
- Bouhadida M, Casas AM, Gonzalo MJ, Arus P, Moreno MA, Gogorcena Y (2009) Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Sci Hortic* 120:237–245.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.
- Brettin TS, Karle R, Crowe EL, Iezzoni AF (2000) Chloroplast inheritance and DNA variation in sweet, sour, and ground cherry. *J Hered* 91:75–79.
- Bruvo R, Michiels NK, D'Souza TG, Schulen-Burg H (2004) A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol Ecol* 13:2101-2106.
- Cantini C, Cimato A, Sani G (1999) Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica* 109:173-181.
- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D (2001) DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J Amer Soc Hort Sci* 126(2):205–209.
- Cao K, Wang L, Zhu G, Fang W, Chen C, Luo J (2012) Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. *Tree Genet Genomes* 8:975–990.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N, Cartinhour S (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100:713-722.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99:65–72.
- Clark LV, Jasieniuk M (2011) Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol Ecol Resour* 11:562–566.

- Clarke JB, Sargent DJ, Bošković RI, Baleaj A, Toburr KR (2009) A cherry map from the inter-specific cross *Prunus avium* 'Napoleon' × *P. nipponica* based on microsatellite, gene-specific and isoenzyme markers. *Tree Gene Genomes* 5:41–51.
- Clarke JB, Tobutt KR (2003) Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. *Mol Ecol Notes* 3:578–580.
- De Franceschi P, Stegmeir T, Cabrera A, van der Knapp E, Rosyara UR, selbot AM, Dondini I, Dirlewanger E, Quero-Garcia J, Campoy JA, Iezzoni AF (2013) Cell number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. *Mol Breeding* 32:311–326.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arus, P, Laigret F (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* 105:127–138.
- Dirlewanger E, Graziano, Joobeur, Garriga-Caldere F, Cosson P, Howard W, Arus P (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. *P Natl Acad Sci USA* 101:9891–9896.
- Dirlewanger E, Claverie J, Wunsch A, Iezzoni AF. Cherry. U Kole C. Genome mapping and molecular breeding in plants, Fruits and nuts. Berlin, Springer-Verlag. 2007. 103-118
- Donmez AA i Yildirimli S (2000) Taxonomy of genus *Prunus* L. (Rosaceae) in Turkey. *Turk J Bot* 24:187-202.
- Donoso JM, Aros, D, Meneses C, Navaez C, Infante R (2008) Genetic relationships in apricot (*Prunus armenica* L.) Using SSR markers and their implications for breeding. *J Food Agric Environ* 6:378–382.
- Ducci F, Santi F (1997) The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Can J For Res* 27:1998-2004.
- Dzhangaliev A, Salova T, Turekhanova P. The wild fruit and nut of Kazakhstan. U: Janick J. Horticultural reviews, wild apple and fruit of central Asia. John Wiley & Sons, 2003. 305-372.
- Earl D, von Holdt B (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359-361.
- Ellergren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5:435–445.

- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011) A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* 6(5): e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379.
- Emanuelli F, Lorenzi S, Grzeskowiak L, catalano V, Stefanini M, Troglio M, Myles S, Martinez-Zapater JM, Zyprian E, Moreira FM, Grando MS (2013) Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in large germplasm collection of grape. *BMC Plant Biol* 13:39.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620.
- FAO (2012) FAOSTAT database 2014 <http://faostat3.fao.org/>
- Fernandez i Marti A, Athonson B, koepke T, Font i Forcada C, Dhingra A, Oraguzie N (2012) genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers. *Front Plant Sci* 3:116.
- Frascaria N, Santi F, Gouyon PH (1993) genetic differentiation within and among populations of chesnut (*Castanea sativa* Mill.) and wild cherry (*Prunus avium* L.). *Heredity* 70:634-641.
- Ganopoulos IV, Avramidou E, Fasoula DA, Diamantidis G, Aravanopoulos FA (2010) Assessing inter- and intra-cultivar variation in Greek *Prunus avium* by SSR markers. *Plant Genet Resour-C* 8:242–248.
- Ganopoulos IV, Kazantis K, Chatzicharisis I, Karayiannis I, Tsaftaris AS (2011) Genetic diversity, structure and trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. *Euphytica* 118:237–251.
- Genome Database of Rosaceae (GDR) <http://rosaceae.org/node/1536038> Genome Database of Rosaceae (GDR) [http://rosaceae.org/species/prunus\\_persica/genome\\_v1.0](http://rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v1.0)
- Grover A, Aishwarya V, Sharma PC (2012) Searching microsatellites in DNA sequences: approaches used and tools developed. *Physiol Mol Biol Plants* 18(1):11-19.
- Gruppe W (1985) An overview of the cherry rootstock breeding program at Giessen. *Acta Hort* 169:189–198.
- Guarino C, Santoro S, De Simone L, Cipriani G (2009) *Prunus avium*: DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome* 52:320-337.

- Gupta PK, Balzan HS, Sharma PC, Ramesh B (1996) Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. *Curr Sci India* 70:45-54.
- Gupta PK i Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163–185.
- Gut IG (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 17:475–492.
- Hanelt P (1997) European wild relatives of *Prunus* fruit crops. *Bocconea* 7:401-408.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2:618-620.
- Hartl D, Clark A (1997) Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, MA
- Hedrick, U.P. The history of cultivated cherries. U.Hedrick, U.P., The cherries of New York. JB Lyoncompany, Albany. 1915 p.39-64.
- Henry RJ. Plant Genotyping. CABI Publishing (2001)
- Hilling KW i Iezzoni AF (1988) Multivariate analysis of a sour cherry germplasm collection. *J Am Soc Hortic Sci* 113:928–934.
- Holtken AM i Gregorius HR (2006) Detecting local establishment strategies of wild cherry (*Prunus avium* L.). *BMC Ecology* 6:13.
- Hormaza JI (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot genotypes using simple sequence repeats. *Theor Appl Genet* 104:321–328.
- Hrotko K, Magyar L, Gyeviki M (2008) Evaluation of native hybrids of *Prunus fruticosa* Pall. as cherry interstocks. *Acta Agriculturae Serbica* 25: 41-45.
- Iezzoni AF (1984) Sour cherry breeding in Eastern Europe. *Fruit Var J* 38(3):121-125.
- Iezzoni AF, Schmidt H, Albertini A Cherries (*Prunus*). U: Moore JN, Ballington JR Jr. (eds) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops, Vol 1. I.S.H.S., Wageningen, Holandija. 1991. pp 111–173.
- Iezzoni AF. (2005) Acquiring cherry germplasm from Central and Eastern Europe. *Hort Sci* 40(2): 304-308.
- Iezzoni AF (2008) Cherries. U: Hancock JF Temperate fruit crop breeding. Springer, Berlin, pp 151-175.

- Jakobsson M i Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801-1806.
- Janick J i Paull RE. The encyclopedia of fruit and nuts. CABI publishing, 2008.
- Jing-Yong Z, Xiu-Lan L, Ren-Dao L, Hong-Qiang C (2009) Genetic relationship of sweet cherry (*Prunus avium*) based on SSR markers. *Plant Sci Res* 2:6–10.
- Joobeur, T, Periam, N, Vicente, MC, King, GJ, Arus, P (2000) Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome* 43(4): 649-655.
- Jordano P i Godoy JA (2000) RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Mol Ecol* 9:1293-1305.
- Jovanović B. Roasles-Amigdalaceae. U Josifović M. Flora SR Srbije. Srpska akademija nauka i umetnosti. Beograd, 1972. pp195-196
- Kacar YA, Iezzoni A, Centiner S (2005) Sweet cherry identification by using SSR markers. *J Biol Sci* 5:616–619.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334.
- Kappel F, Andrew G, Hrotko K, Schuster M. Cherry. U: Badenes ML i Byrne DH. Fruit breeding, Handbook of Plant breeding 8. Springer Science+Business Media. 2012. pp 459-495.
- Kardigal H, Ercisli S, Sengul M, Tosun M (2009) Physico-chemical diversity in fruits of wild-growing sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Biotechnol Biotec Eq* 23: 1325–1329.
- Khadivi-KhubA, Zamani Z, Fatahi MR (2012) Multivariate analysis of *Prunus* subgen. *Cerasus* germplasm in Iran using morphological variables. *Genet Resour Crop Evol* 59: 909–926.
- Khadivi-Khub A (2014) Assessment of cultivate cherry germplasm in Iran by multivariate analysis. *Trees* 28:669-685.
- Khan MA i Korban SS (2012) Association mapping in forest trees and fruit crops. *J Exp Bot* 63:4045–4060.

- Klagges C, Campoy JA, Quero-García J, Guzman A, Mansur L, et al. (2013) Construction and Comparative Analyses of Highly Dense Linkage Maps of Two Sweet Cherry Intra-Specific Progenies of Commercial Cultivars. *PLoS ONE* 8(1): e54743. doi:10.1371/journal.pone.0054743
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I (2015) CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. *Mol Ecol Resour* doi: 10.1111/1755-0998.12387.
- Krahl KH, Lansari A, Iezzoni AF (1991) Morphological variation within sour cherry collection. *Euphytica* 52: 47-55.
- Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnol Adv* 17:143–182.
- Lacis G, Kaufmane E, Trajkovski V, Rashal I (2009) Morphological variability and genetic diversity within Latvian and Swedish sweet cherry collections. *Acta Universitatis Latviensis* 753: 19–32.
- Lacis G, Rashal I, Ruisa S, Trajkovski V, Iezzoni AF (2009) Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collections by using SSR (microsatellite) markers. *Sci Hortic* 121:451–457.
- Lang G, Howell W, Ophardt D (1998) Sweet cherry rootstock/virus interactions. *Acta Hortic* 468:307-314.
- Lankes C (2007) Testing of Prunus Rootstock Clones for Virus Tolerance. *Acta Hortic* 732:351-354.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.
- Li MM, Cai YL, Qian ZQ, Zhao GF (2009) Genetic diversity and differentiation in Chinese sour cherry *Prunus pseudocerasus* Lindl., and its implications for conservation. *Genet Resour Crop Evol* 56:455-464.
- Liu ZJ. Single nucleotide polymorphism (SNP) u Liu ZJ. Aquaculture genome technologies. John Willey and Sons. 2008. pp 59–72.
- Ljubojevic M, Ognjanov V, Cukanovic J, Mladenovic E (2011) Selection of dwarfing cherry rootstock. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conference "Inovations in Fruit production". ISHS, Belgrade, Serbia. 205–216.
- Lynch M (1990) The similarity index and DNA finger-printing. *Mol Biol Evol* 7: 478-484.

- Maghuly F, Fernandez EB, Ruthner S, Pedryc A, Laimer M (2005) Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genet Genomes* 1:151-165.
- Maohanty A, Martin JP, Aguinagalde I (2002) Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* (*Rosaceae*) using chloroplast DNA markers. *Am J Bot* 89(8):1223-1228.
- Marchese A, Bošković RI, Caruso T, Raimondo A, Cutuli M, Tobutt KR (2007) A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry 'Kronio', S59, attributable to a pollen-part mutation in the SFB gene. *J Exp Bot* 58:4347-4356.
- Mariette S, Tavaud M, Arunyawat U, capdeville G, Millan M, Salin F (2010) Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics* 11:77.
- Mati AF, Athanson B, Koepke T, Forcada CF, Dhingra A, Oraguzie Nnadozie (2012) Genetic diversity and relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars based on single nucleotide polymorphic markers. *Front Plant Sci* 3: 116. doi: 10.3389/fpls.2012.00116
- Milatović D, Nikolić M, Miletić N. Trešnja i višnja. Nučno voćarsko društvo Srbije. Čačak. 2011.
- Miodragovic M, Barac G, Ognjanov V, Apostol J, Dulic J, Ljubojevic M, Doric D (2014) Selection of Feketicka sour cherry based on pomological characteristics. Scientific conference "Challenges in modern agricultural production" Book of abstracts 42.
- Mišić DP. Specijalno oplemenjivanje voćaka. Partenon, 2002.
- Mnejja M, Garcia-Mas J, Audergon JM, Arus P (2010) *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genet Genomes* 6:689-700.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T (1997) Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breeding* 3:87-103.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009) Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1:19-35.
- Morgante M i Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant J* 3:175-182.
- Mratinic, E. i Kojic, M. Wild fruit species of Serbia. Institute for agronomical research „Serbia“, Belgrade, 1998.



- Mratinić E, Fotirić Akšić M, Jovković R (2012) Analysis of wild sweet cherry (*Prunus avium* L.) germplasm diversity in South-East Serbia. *Genetika* 44(2):259-268.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance for small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nei M i Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5269–5273.
- Nikolic D, Rakonjac V, Milutinovic M (1996) Evaluation of newly selected Oblacinska cherry clones. *Journal of Pomology* 30:343–437.
- Ogasanovic D, Mitrovic M, Nikolic M, Plazinic R, Papic V (1996) The possibility of using 'oblacinska' sour cherry as a rootstock or interstock in high-density sweet cherry plantings. *Acta Horti* 410:537–542.
- Ognjanov V, Ljubojević M, Ninić-Todorović J, Bošnjaković D, Barać G, Čukanović J, Mladenović E (2012) Morphometric diversity of dwarf sour cherry germplasm in Serbia. *J Horti Sci Biotech* 87:11 –122.
- Ohta S, Katuski T, Tanaka T, Hayashi T, Sato YI, Yamamoto T (2005) Genetic variation in flowering cherries (*Prunus* subgenus *cerasus*) characterised by SSR markers. *Breeding Sci* 55: 415–424.
- Olden EJ i Nybom N (1968) On the origin of *Prunus cerasus* L. *Hereditas* 70:3321-3323.
- Olmstead JW, Sebolt AM, Cabrera A, sooriyapathirana SS, Hammar S, Iriarte G, Wang D, Chen CY, van der Knaap E, Iezzoni AF (2008) Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the reference map. *Tree Genet Genomes* 4:897–910.
- Padmalatha K, Prasad MNV (2006) Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *Afr J Biotechnol* 5(3):230-234.
- Pavlicek A, Hrda S, Flegr J (1999) Free-Tree freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frankelia*. *Folia Biol* 45:97–99.
- Peace C, Bassil N, Main D, Ficklin S, Rosyara UR, et al. (2012) Development and evaluation of a genome-wide 6K SNP array for diploid sweet cherry and tetraploid sour cherry. *PLoS ONE* 7(12): e48305. doi:10.1371/journal.pone.0048305

- Perez R, Navarro F, Angeles Sanchez M, Ortiz JM, Morales R (2010) Analysis of agromorphological descriptors to differentiate between duke cherry (*Prunus x gondouinii* (Poit. & Turpin) Rehd.) and its progenitors: sweet cherry (*Prunus avium* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.) *Chil J Agr Res* 70(1):34-49.
- Perry RL. Cherry rootstocks. U: Rom RC, Carlson RF. Rootstocks for Fruit crops. John Wiley & Sons, New York. 1987. 217–264.
- Petrucelli R, Ganino T, Ciaccheri L, Maselli F, Mariotti P (2013) Phenotypic diversity of traditional cherry accessions in the Tuscan region. *Sci Hort* 150:334-347.
- Pons O i Petit RJ (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144:1237-1245.
- Potter D. Prunus. U Kole C. Wild crop relatives: Genomic and breeding resources, temperate fruits. Berlin, Springer-Verlag. 2011. 129-145.
- Powell W, Machraz GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215–222.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67:170-181.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 81: 559-575.
- Radičević S, Cerović R, Glišić I, Karakljajić - Stajić Ž (2010) Promising sour cherry hybrids (*Prunus cerasus* L.) developed at Fruit Research Institute Čačak. *Genetika* 42(2):299-306.
- Radičević S, Cerović R, Lukić M, Paunović S, Jevremović D, Milenković S, Mitrović M (2012) Selection of autochthonous sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes in Feketić region. *Genetika* 44:285–297.
- Radović i Kozomara M. Strategija biološke raznovrsnosti Republike Srbije za period od 2011. do 2018. godine, Ministarstvo životne sredine i prostornog planiranja, Beograd, 2011.
- Rafalski A (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5:94–100.

- Raj A, Stephens M, Pritchard JK (2014) fastSTRUCTURE: Variational Inference of Population Structure in Large SNP Data Sets. *Genetics* 197:573-589.
- Rakonjac V, Fotiric-Aksic M, Nikolic D, Milatovic D, Colic S (2010) Morphological characterization of 'Oblačinska' sour cherry by multivariate analysis. *Sci Horti* 125:679–684.
- Rakonjac V, Mratinić E, Jovković R, Fotirić Akšić M (2014) Analzsis of morphological variability in wild cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources from central Serbia. *J Agr Sci Tech* 16:151–162.
- Redden R, Yadav SS, Maxted N, Dullo ME, Guarino L, Smith P. Crop wild relatives and climate change. Wiley-Blackwell (2015).
- Rodrigues LC, Morales MR, Baartolo Fernandes AJ, Ortiz JM (2008) Morphological characterization of sweet and sour cherrz cultivars in germplasm bank at Portugal. *Genet Resour Crop Evol* 55:593–601.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137-138.
- Sambrook JF, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition. Cold Laboratory Press, USA.
- Sanchez-Perez R, Ruiz D, Dicenta F, Egea J, Martinez-Gomez P (2005) Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Sci Horti* 103:305–315.
- Sanz-Perez V i Castro-Diez P (2010) Summer water stress and shade alter bud size and budburst date in three Mediterranean *Quercus* species. *Trees* 24:89-97.
- Schlotterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371.
- Schlotterer C (2004) The evolution of molecular markers--just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5:63-69.
- Schork NJ, Fallin D, Lanchburrz S (2000) Single nucleotide polymorphism and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* 58:250–264.
- Schueler S, Tusch A, Schuster M, Ziegenhagen B (2003) Characterisation of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) – markers for individual identification and reproductive processes. *Genome* 43:95–102.

- Sonneveld T, Tobbut KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet* 107:1059–1070.
- Sonneveld T, Tobbut KR, Vaughan SP, Robbins TP (2005) Loss of pollen-S function in two Self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-Box gene. *The Plant Cell* 17: 37–51.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck E, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott AG (2000) Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet* 101:421–428.
- Soto-Cereda BJ i Cloutier S. Association mapping in plant genomes. U Caliskan M. Genetic diversity in plants. InTech. 2012. doi: 10.5772/33005.<http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-plants/association-mapping-in-plant-genomes>
- Spelman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506-513.
- Spooner D, van Treuren, R, de Vicente MC. Molecular Markers for Genebank Management. Bioersivity International: Rome, Italy, 2005.
- Stanys V, Frercks B, Šikšnianiene JB, Stepulaitiene I, Gelvonauskiene D, Staniene G, Bobinas Č (2012) Identification of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using AFLP and SSR markers. *Žemdirbyste=Agriculture* 99(4):437-444.
- Struss D, Ahmad R, Southwick SM, Boritzki M (2003) Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP marker. *J Am Soc Hortic Sci* 128:904–909.
- Tang DQ, Lu JJ, Fang W, Zhang S, Zhou MB (2010) Development, characterization and utilization of GenBank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species. *Mol Breeding* 25:299-311.
- Tanksley SD (1983) Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1:3–8.
- Tao R i Iezzoni AF (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci Hortic* 124:423–433.
- Tavaud M, Zanetto A, David JL, Laigret F, Dirlewanger E (2004) Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus* × *gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity* 93:631–638

- Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, Pancaldi M, Sansavini S (2000) Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43:512-520.
- Tharl PH i Young A (2000) AUTOTET: A program for analysis of autotetraploid genotypic data. *J Hered* 91(4):348-349.
- Thian-Ming H, Xue-sen C, Zheng X, Jiang-Sheng G, Pei-Jun L, Wen L, Qing L, Yan W (2007) Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genet Resour Crop Evol* 54: 563-572.
- Turkuoglu Z, Bilgener S, ercisi S, Bakir M, Koc A, Akbulut M, Gercekcioglu R, Gunes M, Esitken A (2010) Simple sequence repeat - based assessment of genetic relationships among *Prunus* rootstocks. *Genet Mol Res* 9:2156–2165.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Weeb DA. *Flora Europaea*, Volume 2-Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge Universit Press 1968.
- Varshney RK, Sigmund R, Borner A, Korzun V, Stein N, Sorrells ME, Langridge P, Graner A (2005) Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Sci* 168:195-202.
- Varshney RK, Graner A, Sorrels ME (2005) Genetic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48–55.
- Vaughan SP i Russell K (2004) Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. *Mol Ecol Notes* 4:429–431.
- Verde I, Bassil N, Scalabrin S, Gilmore B, Lawley CT, et al. (2012) Development and evaluation of a 9K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germplasm. *PLoS ONE* 7(4): e35668. doi:10.1371/journal.pone.0035668
- Wang D, Karle R, Brettini TS, Iezzoni AF (1998) Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theor Appl Genet* 97:217–1224.
- Wang D, Karle R, Iezzoni AF (2000) QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. *Theor Appl Genet* 100:535–544.
- Wang ML, Barkley NA, Jenkins TM (2009) Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. *Genes Genomes Genom* 3(1): [http://www.ent.uga.edu/pubs/jenkins\\_microsatellitei.pdf](http://www.ent.uga.edu/pubs/jenkins_microsatellitei.pdf)

- Weir BS i Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wojcicki JJ (1991) Variability of “*Prunus fruticosa*” Pall. and the problem of an anthropohybridisation. *Band (Jahr)* 106: 266-272. <http://dx.doi.org/10.5169/seals-308931>
- Wolfram B (1996) Advantages and Problems of Some Selected Cherry Rootstocks in Dresden- Pillnitz. *Acta Horti* 410:233–237.
- Wünsch A i Hormaza J (2002) Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125:59–67.
- Xuan H, Wang R, Buchele M (2009) Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist in identification of sweet (*Prunus avium*) and sour cherry (*Prunus cerasus*). *Acta Horti* 839: 507–514.
- Yamamoto T, Mochida K, Imai T, Shi Z, Ogiwara I, Hayashi T (2002) Microsatellite markers in peach [*Prunus persica*(L.)Batch] derived from an enriched genomic cDNA libraries. *Mol Ecol Notes* 2:298-301.
- Yamane H i Tao R (2009) Molecular Basis of Self-(in)compatibility and Current Status of S-genotyping in Rosaceous Fruit Trees. *J Japan Soc Hort Sci* 78: 137–157.
- Zalapa JE, Cuevas H, Zhu H, Steffan S, Senalik D, Zeldin E, McCrown B, Harbut R, Simon P (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am J Bot* 99(2):193-208.
- Zhang C, Chen X, He T, Liu X, Feng T, Yuan Z (2007) Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *J Genet Genomes* 34(10):947-955.
- Zhang G, Sebolt AM, Sooriyapathirana SS, Wang D, Bink M, Olmstead JW, Iezzoni AF (2010) Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from cross between a domesticated sweet cherry cultivar and wild forest sweet cherry. *Tree Genet Genomes* 6:25–36.

## **Prilog 1.**

Prilog 1. SSR markeri poreklom iz breskve i trešnje i višnje korišćeni u prelimonarnom istraživanju varijabilnosti populacija stepske višnje

Marker	Sekvenca prajmera (5' - 3')	Ponavljajući motiv	Vrsta	Tip SSR markera	Hromozom	Očekivana veličina
BPPCT006	F: GCTTGTGGCATGGAAGC R: CCCTGTTTTCATAGAACTCACAT	(AG) <sub>19</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G8	117
BPPCT015	F: ATGGAAGGGAAGAGAAATCG R: GTCATCTCAGTCAACTTTTCCG	(AG) <sub>13</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	150
BPPCT029	F: GGACGGACAGAAATGAAGGT R: CCTTAACCCACGCAACTCC	(GA) <sub>12</sub> (CAGA) <sub>4</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G7	159
BPPCT035	F: TGAAGGATGGCTCTGATACC R: AATTCATCTACTTCTTCTCAAGC	(GA) <sub>33</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	113
M15a	F: GAGGGTCCTTAGCTCTCTCT R: ATGAGAAACGACTGGAAAAG	CT	<i>P. persica</i>	Genomski	G1	135
PS12	F: GCCACCAATGGTTCTTCC R: AGCACCAGATGCACCTGA		<i>P. avium</i>	Genomski	G3	164
Ps9f8	F: GGTTCTTGGTTATTATGA R: ACATTTCTATGCAGAGTA	GA	<i>P. avium</i>	Genomski	G1	156
UDP-003	F: TTGCTCAAAGTGTCGTTGC R: ACACGTAGTGCAACTGGC	(CT) <sub>11</sub> (CA) <sub>28</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	143
UDP-022	F: CTAGTTGTGCACACTCACGC R: GTCGCAGGAACAGTAAGCCT	(TG) <sub>12</sub> (AG) <sub>24</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski		139
UDP-402	F: TCCATAACCAAAAAAACACC R: TGGAGAAGGGTGGGTACTTG	(AG) <sub>17</sub>	<i>P. persica</i>	Genomski	G4	136



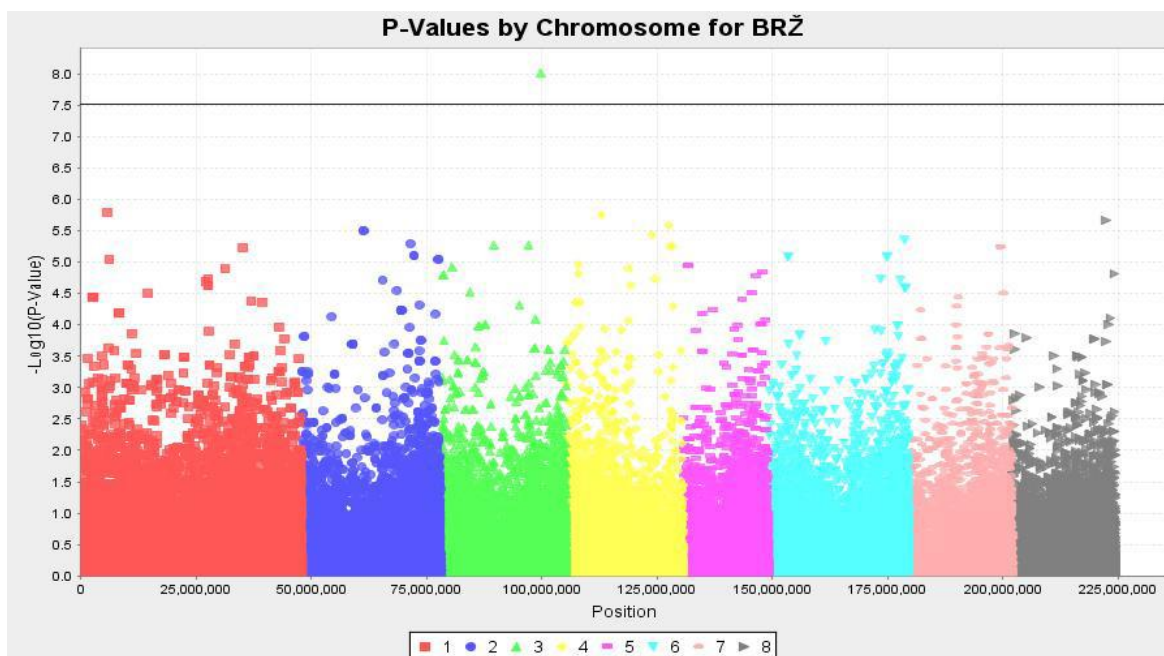
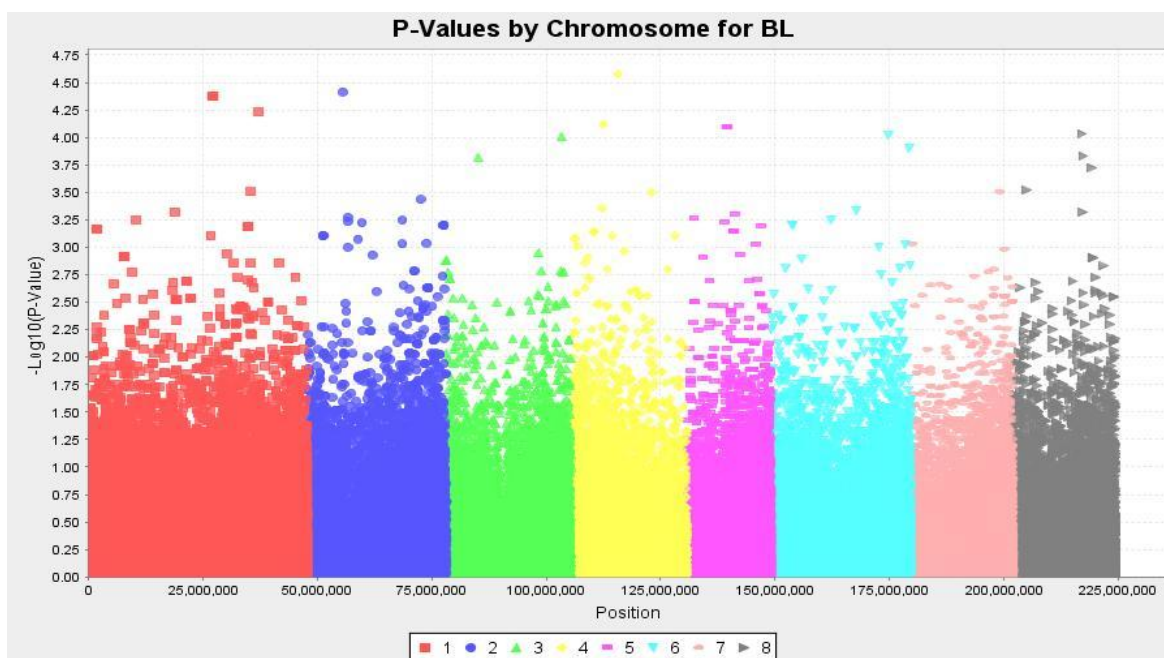
## **Prilog 2.**

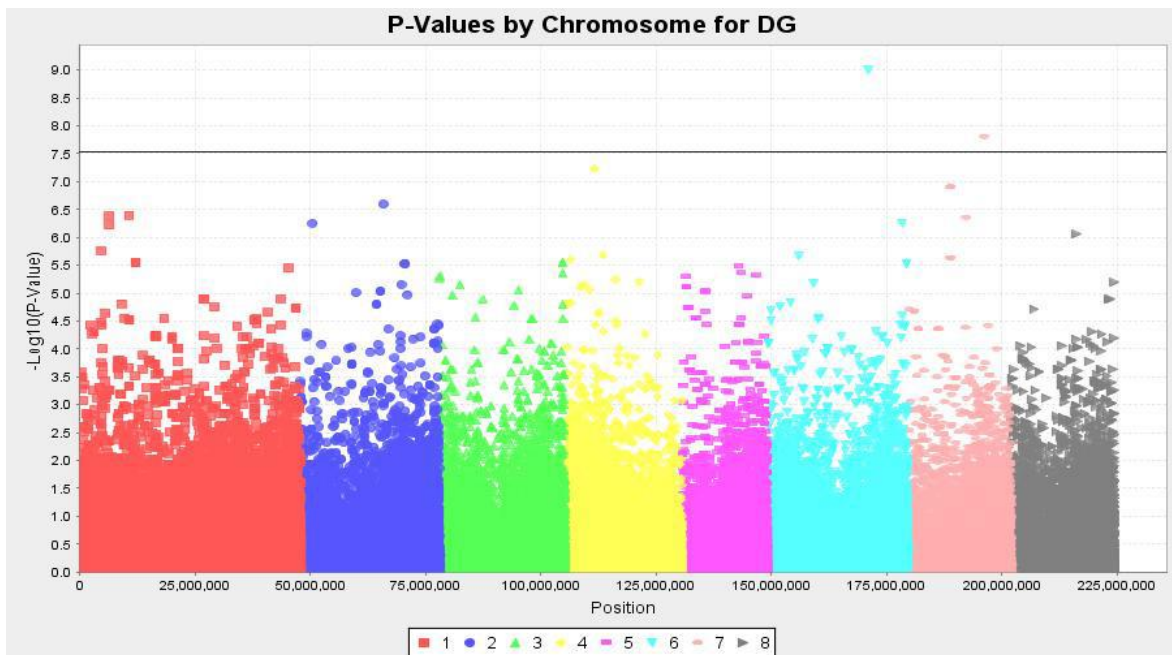
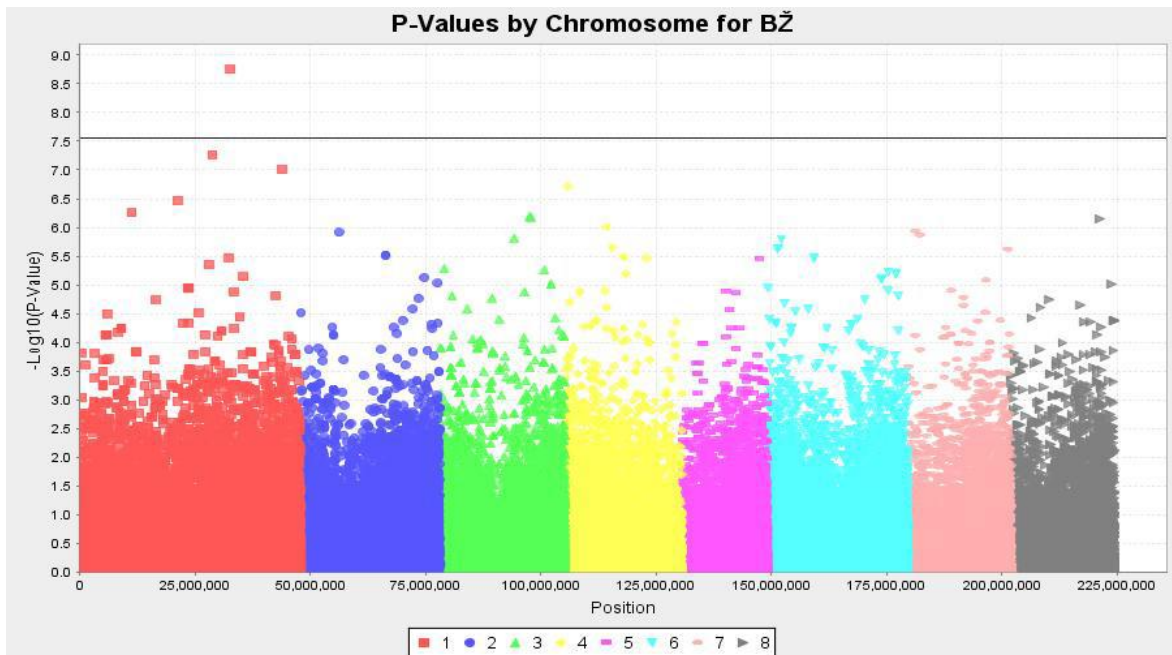
Prilog 2. Položaj uzoraka na PCA grafiku konstruisanom pomoću analize SNP markera

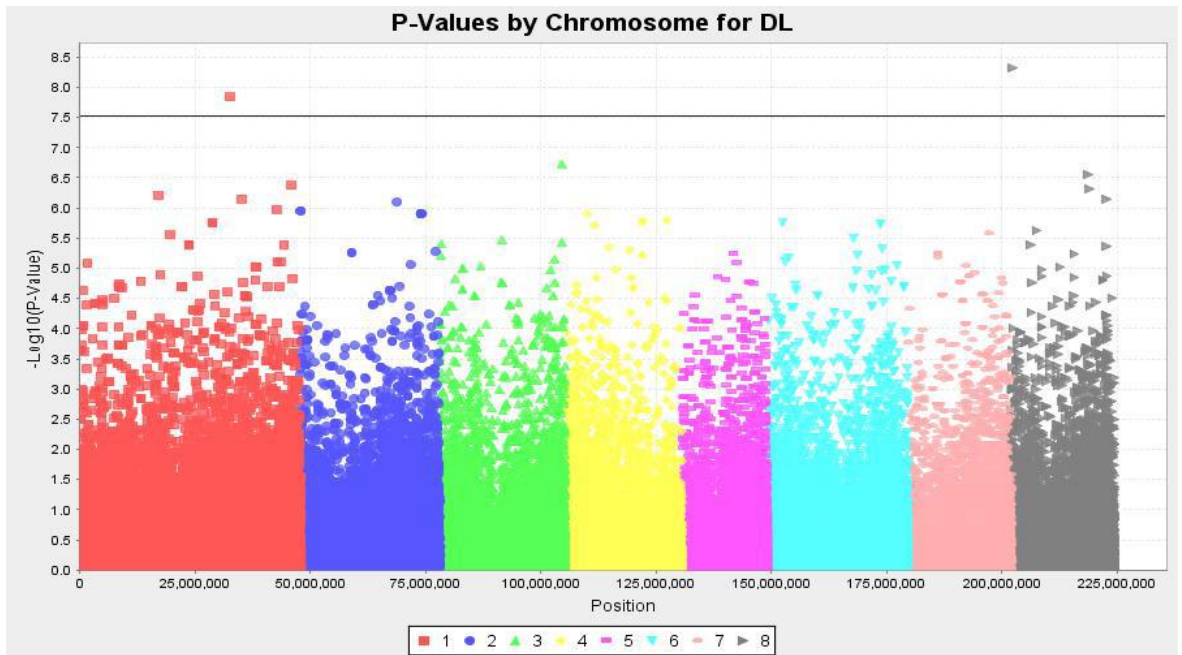
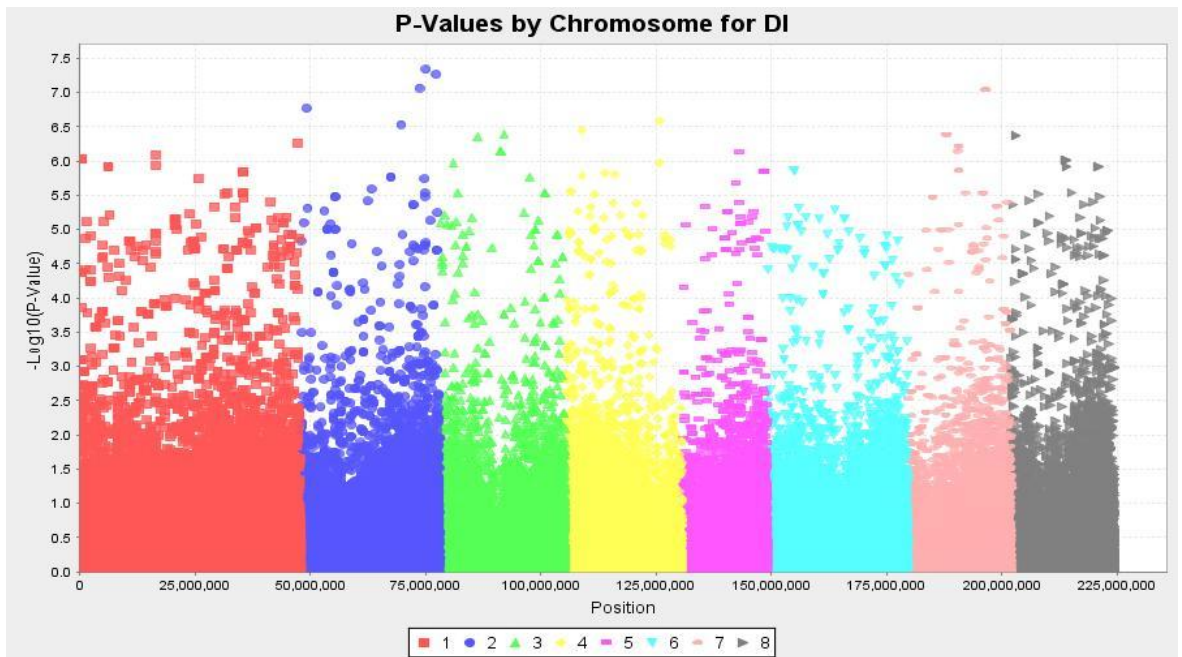
	PC1	PC2	PC3		PC1	PC2	PC3
Pf_0101	13,056	-35,035	-3,010	Pf_0513	9,179	-8,293	-2,902
Pf_0103	12,651	-35,024	-4,917	Pf_0514	-50,265	-1,918	-1,655
Pf_0104	11,430	-34,532	-3,874	Pf_0515	-51,637	-0,992	-3,320
Pf_0105	9,835	-31,928	-4,282	Pf_0516	-48,308	0,509	-3,666
Pf_0106	10,809	-33,155	-4,243	Pf_0517	-51,818	-1,108	-3,404
Pf_0107	12,595	-34,447	-4,197	Pf_0518	-50,704	0,453	-3,896
Pf_0108	11,031	-35,144	-4,113	Pf_0604	24,802	-7,688	-10,895
Pf_0109	11,141	-33,905	-4,556	Pf_0605	24,416	-6,511	-11,818
Pf_0110	10,646	-34,204	-4,195	Pf_0607	26,178	-7,618	-10,092
Pf_0111	11,834	-34,316	-5,252	Pf_0608	30,806	-6,106	-0,543
Pf_0112	9,637	-31,568	-5,191	Pf_0609	30,664	-4,960	-0,876
Pf_0113	23,998	-19,803	-6,216	Pf_0610	30,979	-6,438	0,455
Pf_0201	-55,594	31,457	2,987	Pf_0611	30,306	-7,630	-0,176
Pf_0202	-56,815	30,499	3,127	Pf_0615	30,424	-4,291	0,983
Pf_0203	-55,133	30,809	3,031	Pf_0616	31,225	-5,183	2,338
Pf_0207	-55,970	30,605	2,933	Pf_0617	-15,979	-12,573	-21,894
Pf_0208	-52,940	31,017	2,214	Pf_0618	-13,691	-5,792	-23,127
Pf_0209	-55,792	30,976	2,805	Pf_0619	-16,300	-11,024	-23,286
Pf_0210	-55,990	30,648	3,115	Pf_0620	30,529	-4,639	1,931
Pf_0211	-54,990	31,095	3,063	Pf_0621	30,039	-4,367	1,710
Pf_0212	-53,655	32,066	2,696	Pf_0622	-16,000	-11,044	-22,244
Pf_0213	-53,741	31,737	3,044	Pf_0623	-15,755	-11,993	-21,782
Pf_0214	-56,091	31,068	2,935	Pf_0624	-15,515	-9,813	-23,521
Pf_0215	-53,199	30,700	3,224	Pf_0701	-15,870	-10,620	-22,912
Pf_0216	-52,659	31,440	2,378	Pf_0702	5,559	-8,768	-6,480
Pf_0217	-56,083	30,871	3,219	Pf_0705	16,520	-6,924	-6,004
Pf_0218	-57,043	31,009	2,952	Pf_0707	15,426	-5,395	-5,793
Pf_0301	-48,095	-2,605	-3,348	Pf_0708	24,263	-6,145	-12,549
Pf_0305	-47,568	-2,270	-3,161	Pf_0710	25,011	-6,619	-12,059
Pf_0306	-49,089	-2,747	-2,892	Pf_0712	16,956	-7,221	-5,363
Pf_0307	-43,539	-1,147	-4,338	Pf_0714	24,281	-4,463	-12,967
Pf_0308	-49,035	-2,404	-3,199	Pf_0801	18,976	-6,005	-1,592
Pf_0401	31,784	-3,041	57,093	Pf_0802	-9,636	-6,492	-10,768
Pf_0402	31,241	-0,896	56,323	Pf_0803	21,472	-6,185	-3,116
Pf_0403	31,806	-1,841	56,832	Pf_0804	20,593	-6,533	-6,159
Pf_0405	-18,850	-4,880	2,716	Pf_0805	-35,141	1,636	-3,309
Pf_0406	32,427	-3,191	57,419	Pf_0806	22,398	-3,971	-5,113
Pf_0407	31,980	-3,042	57,571	Pf_0807	-42,547	-5,127	-5,551
Pf_0408	31,824	-2,107	57,574	Pf_0901	25,772	4,601	-4,068
Pf_0409	32,213	-2,585	56,970	Bing	153,811	50,959	-21,071
Pf_0410	31,976	-1,079	57,142	Chelan	154,694	49,846	-22,223
Pf_0501	30,981	-0,875	-0,999	Lapino	154,645	51,536	-22,448
Pf_0502	8,739	-7,700	-1,110	Višnja	56,552	12,439	-11,419
Pf_0503	6,424	-3,143	-3,532	Sweetheart	155,776	50,840	-21,885
Pf_0504	8,643	-7,412	-0,504				
Pf_0505	6,483	-4,025	-3,515				
Pf_0507	-40,037	2,731	-5,121				
Pf_0508	-46,788	0,641	-4,761				
Pf_0509	-48,581	-0,832	-3,918				
Pf_0511	-50,558	-2,459	-1,774				
Pf_0512	9,567	-8,402	-2,616				

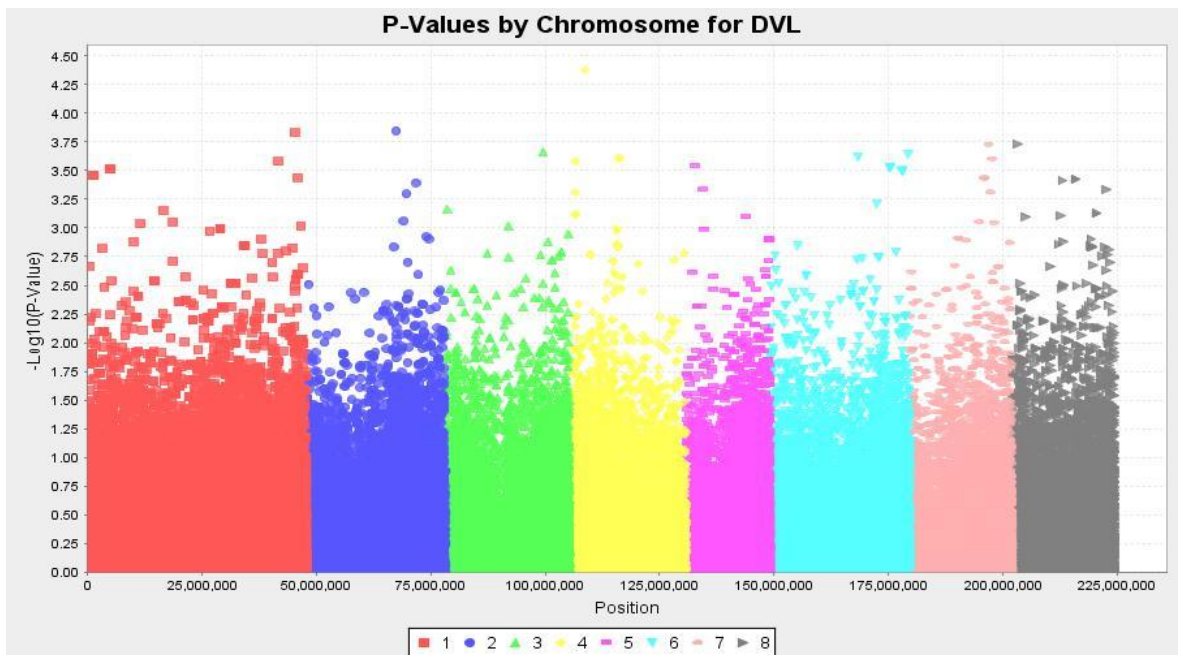
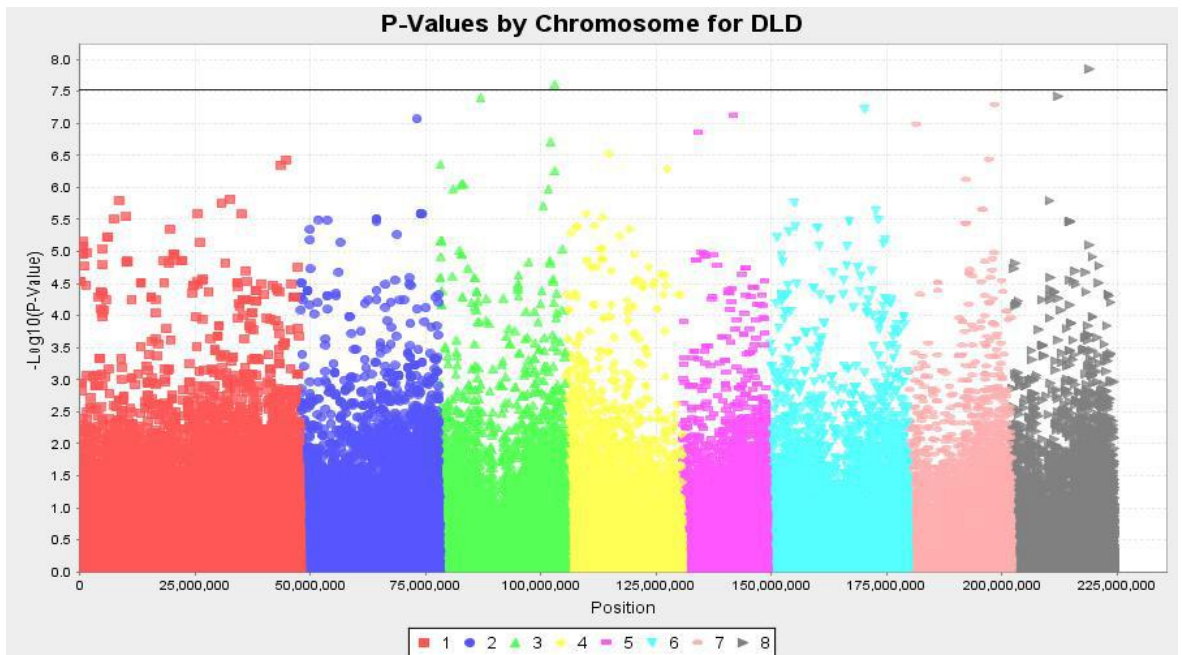
## **Prilog 3.**

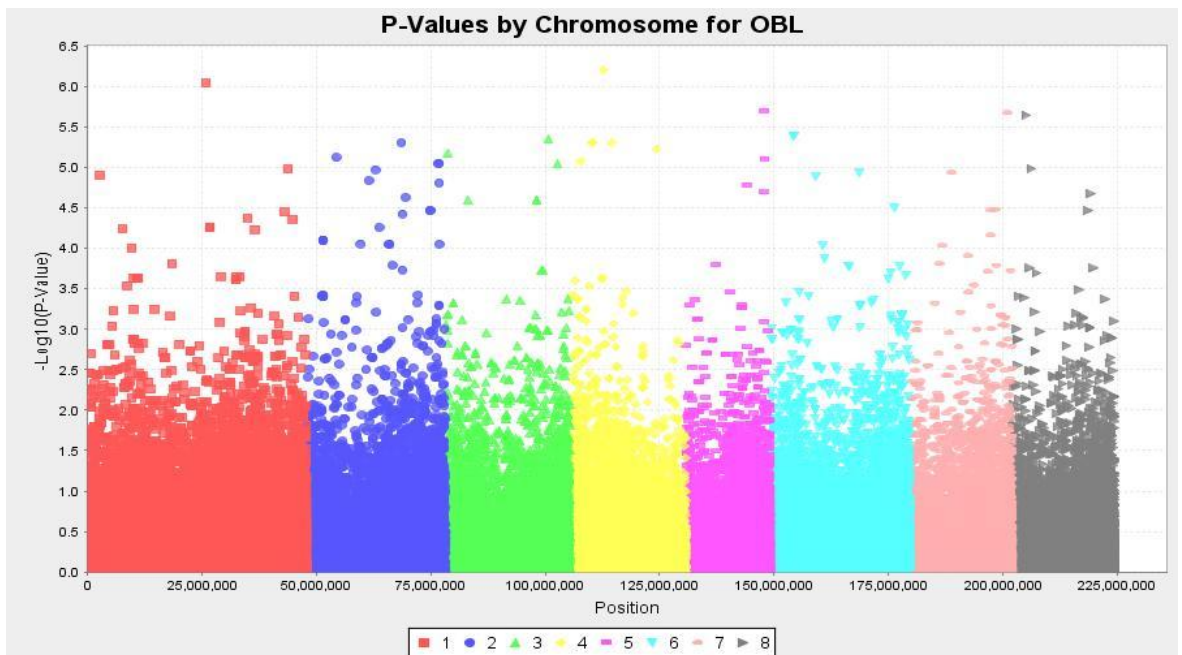
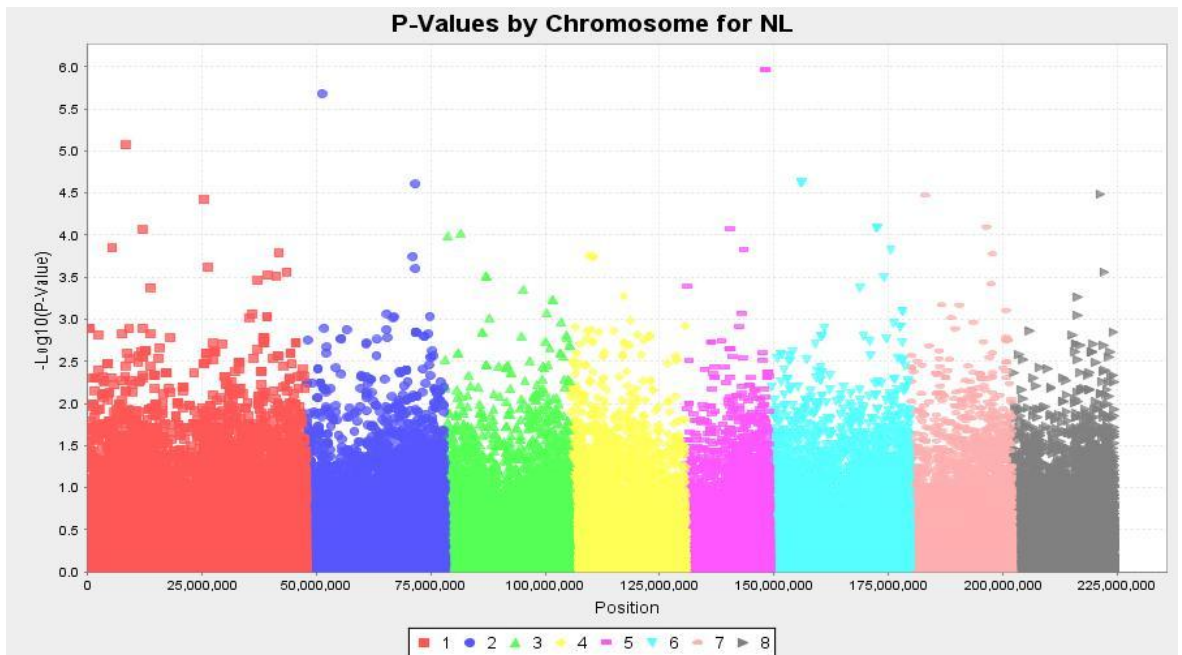
Prilog 3. Grafički prikazi distribucija  $-\text{Log}_{10}(p)$  vrednosti za SNP markere i analizirane fenotipske osobine (Manhattan plot)



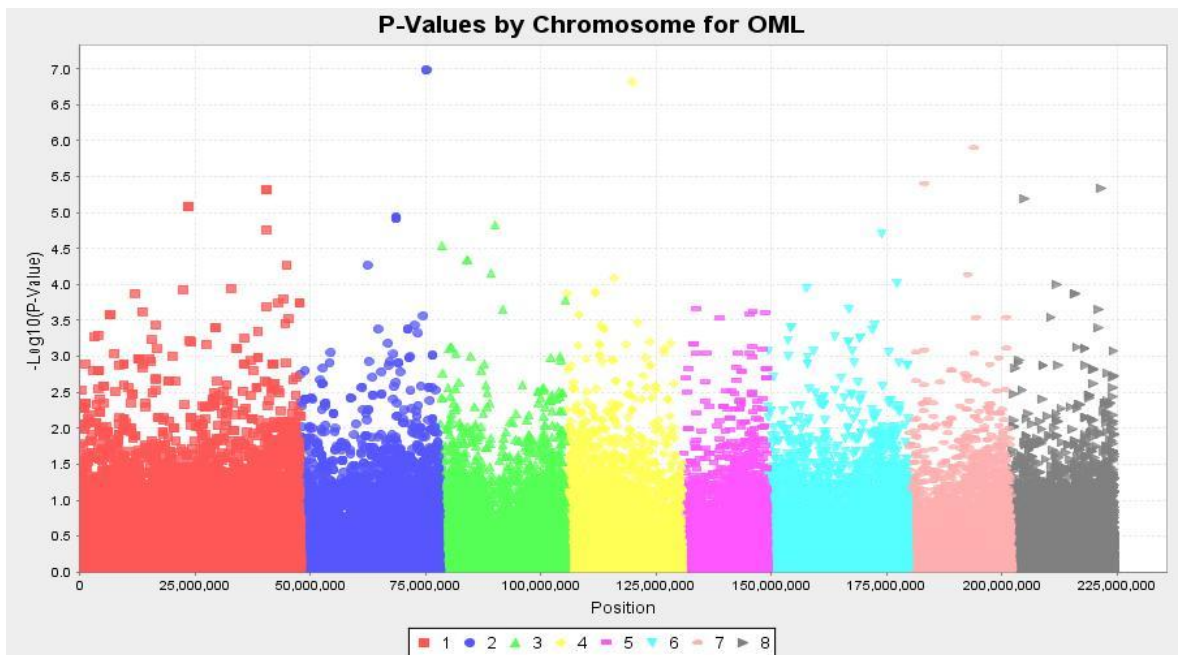
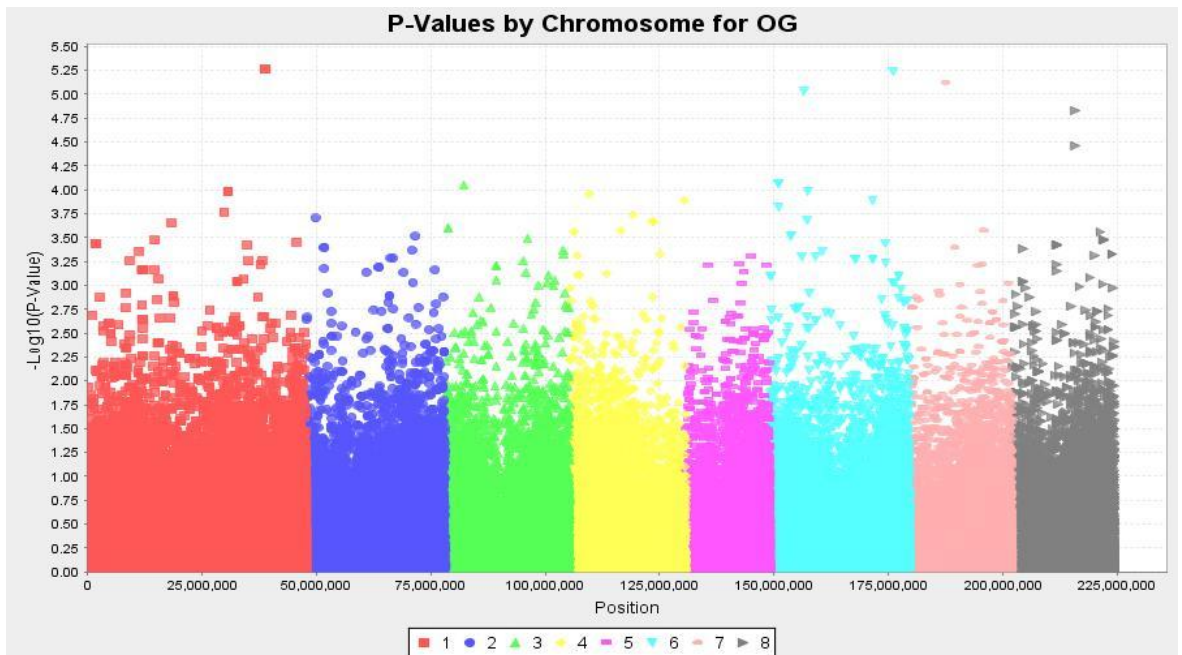


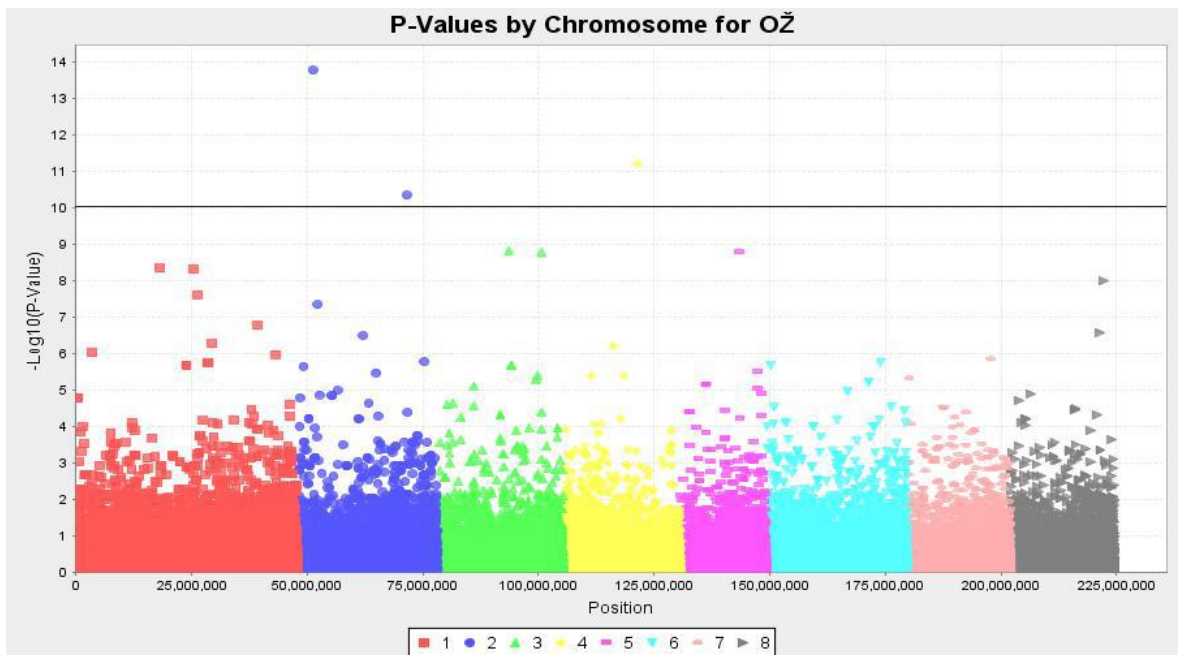
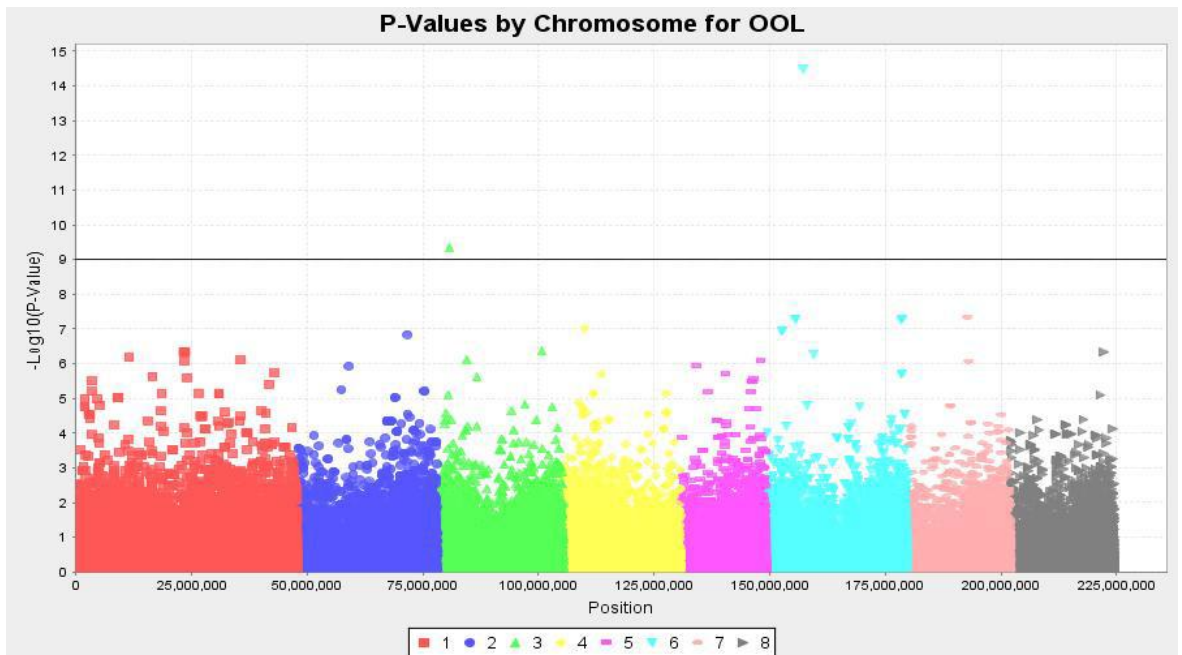


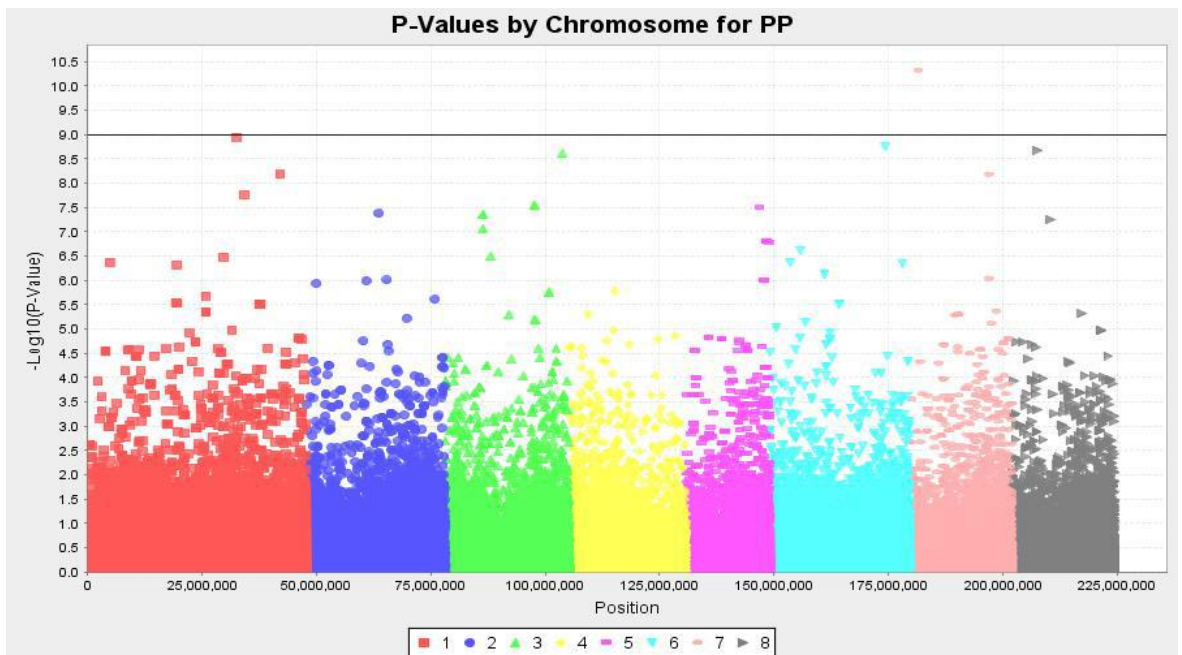
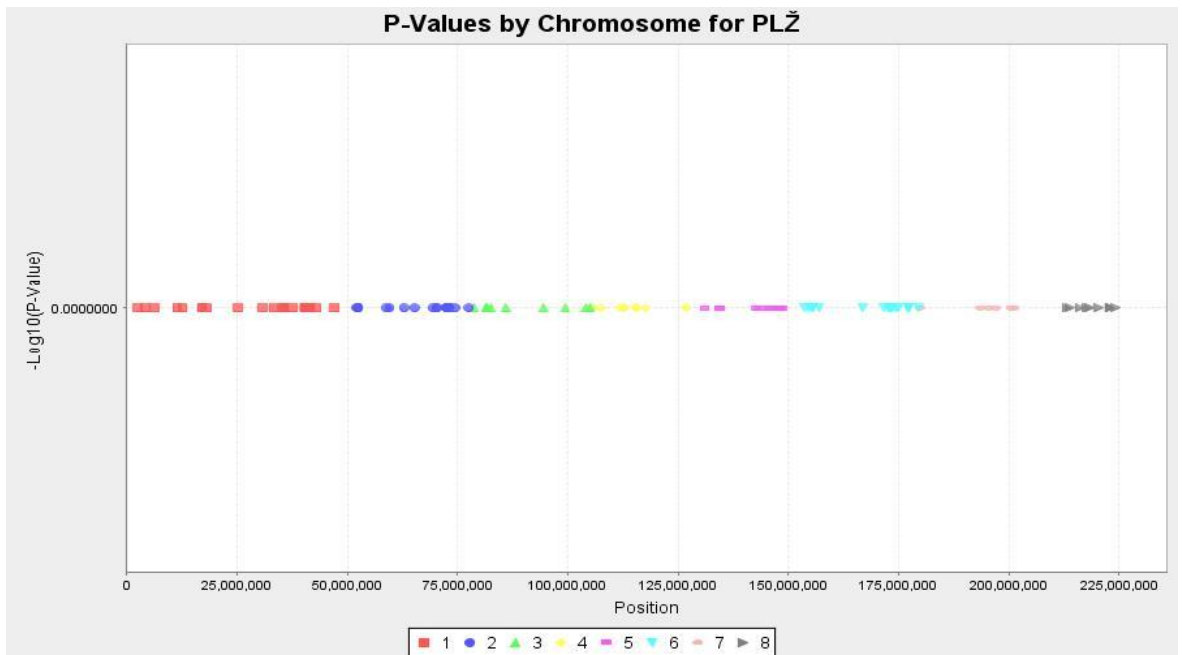


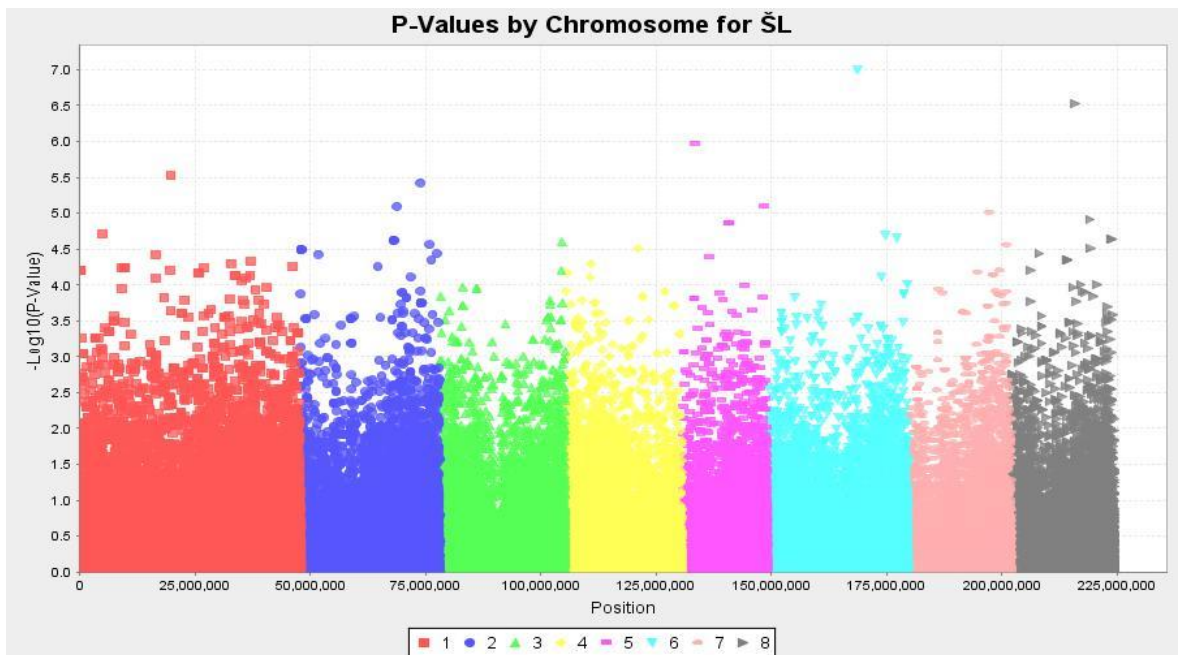
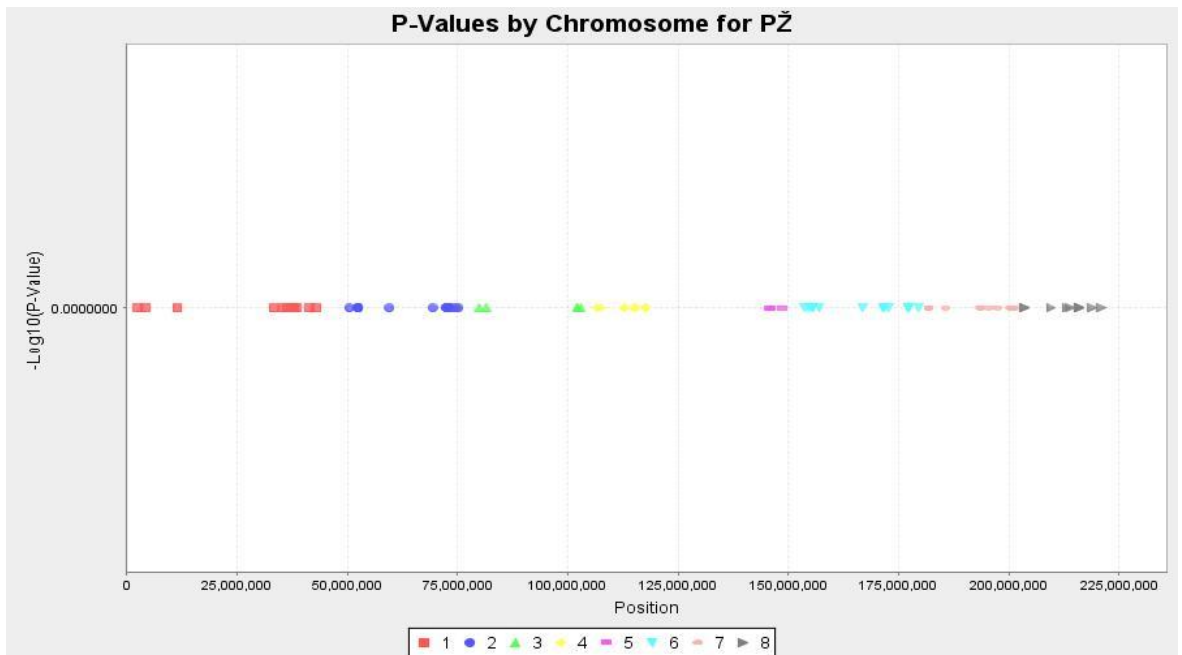


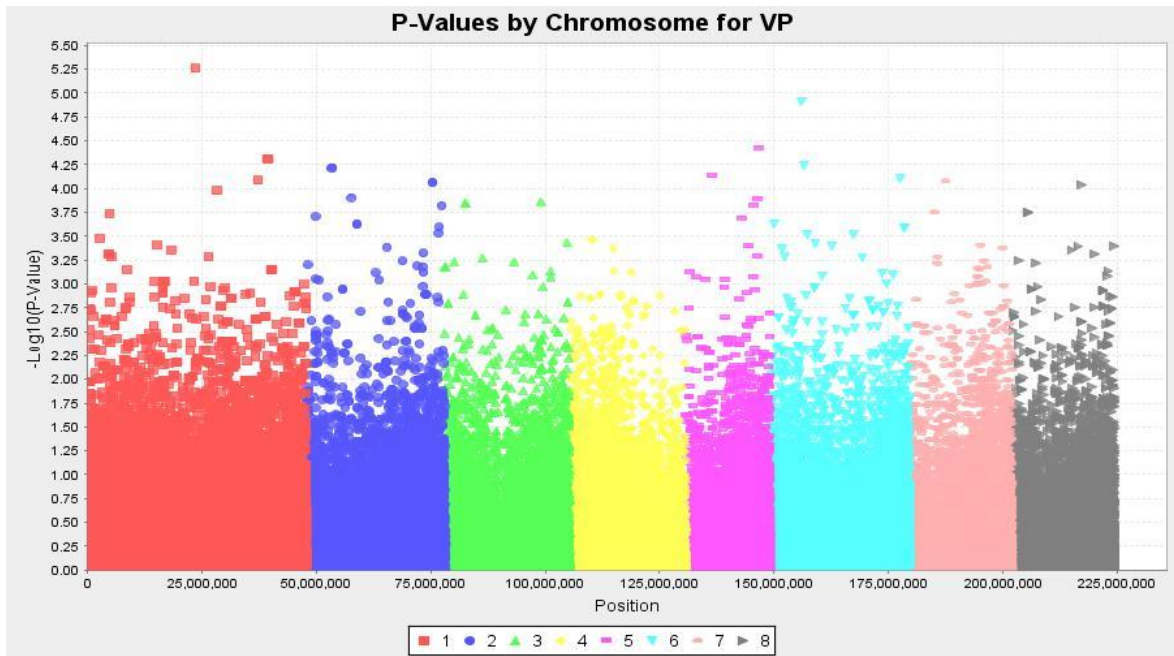
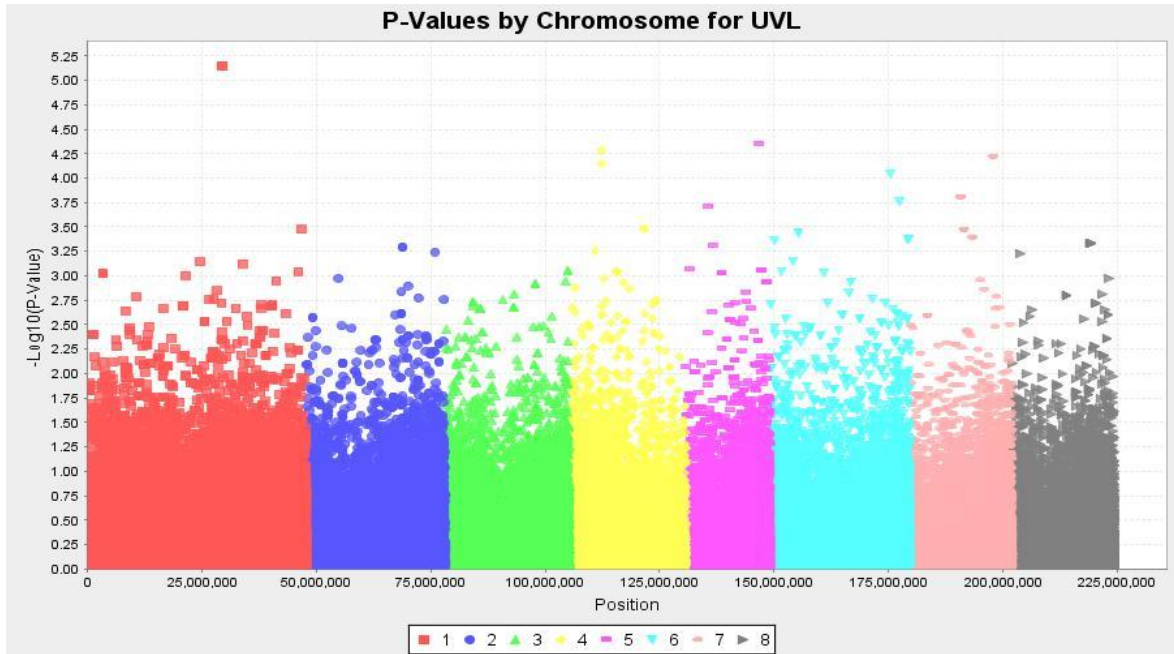












## **Prilog 4.**

Prilog 4. Uticaj SNP markera na fenotipska svojstva koja pokazuju nivo asocijacije iznad praga značajnosti

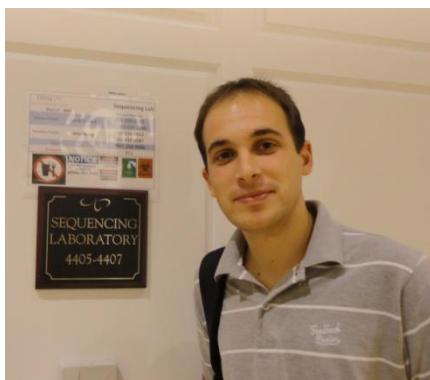
Svojstvo	SNP	P vrednost	Alel	Uticaj
Bujnost	S7_8740459	2,71E-39	S	9.8668E-1
			G	-1,0105E0
			C	0
	S8_6142814	2,27E-12	G	-4,2521E-1
			R	0,96911
			A	0
Debljina grančica	S6_22063007	1,01E-5	W	-8,6092E-1
			A	-4,0117E-2
			T	0
	S7_16500055	1,54E-4	G	-7.5822E-1
			K	0.04313
			T	0
Položaj pupoljaka	S1_32603065	1,13E-5	C	-9.7736E-2
			Y	-1.4527E-1
			T	0
	S7_1865419	4,82E-7	C	-2.5218E-2
			Y	-1.0148E0
			T	0
Dužina lista	S1_32537162	1,45E-4	T	-1.88E0
			W	-3.2576E0
			A	0
	S8_366433	4,85E-5	S	2.0834E0
			C	-2.2664E0
			G	0
Oblik osnove lista	S3_2707675	4.42E-10	T	0.71391
			Y	0
			R	0.99878
	S6_8244005	3.34E-15	G	-1.2227E-3
			A	0
			T	0.70887
Dužina lisne drške	S3_24998392	2.47E-8	Y	0.43215
			C	0
			C	1.03434
	S8_17117021	1.44E-8	S	0.72143
			G	0
			W	1.09181
Broj lisnih žlezda	S3_21738346	9.89E-9	T	0.82383
			A	0
			K	-8.6489E-1
Boja lisnih žlezda	S1_32682045	1.78E-9	T	-1.5165E0
			G	0

Oblik lisnih žlezda	S2_3549060	1.70E-14	Y	-1.0123E0
			T	-9.6571E-1
			C	0
	S2_23850483	4.59E-11	T	-1.1173E0
			K	-9.7867E-1
			G	0
	S4_16097717	6.05E-12	G	0.05873
			A	1.04271
			R	0

---



## BIOGRAFIJA



Goran Barać je rođen 20.07.1985 godine u Sremskoj Mitrovici, gde je završio osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani biolog upisao je 2004. godine. Osnovne studije je završio 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,11 i odbranjenim diplomskim radom ocenom 10. U toku studija kao stipendista u okviru projekta HERBS boravio je u poseti Complutens Univerzitetu u Madridu.

Nakon završenih osnovnih studija, 2009. godine upisuje Master akademske studije, modul Botanika na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Ovaj stepen studija završava 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,73 i odbranjenim završnim radom ocenom 10. Doktorske studije, studijski program Doktor bioloških nauka, na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu upisuje 2010. godine. Naredne 2011. godine zasniva radni odnos na određeno vreme na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, Departmanu za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu radi realizacije projekta "Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje intenzivne tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede" finansiranom od strane Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja u zvanju istraživač - saradnik. Od 2014. godine angažovan je na izvođenju vezbi iz oplemenjivanja voćaka za studente smeru Voćarstvo i vinogradarstvo.

Oblast naučne delatnosti je genetika i oplemenjivanje voćaka – proučavanje genetičke varijabilnosti voćnih vrsta primenom molekularnih markera. Autor je i koautor 11 naučnih radova štampanih u međunarodnim časopisima, jednog poglavlja u knjizi, 5 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini i 14 štampanih u izvodu. Takođe, je autor i koautor 9 radova štampanih u domaćim naučnim časopisima i osam saopštenja sa nacionalnih skupova štampanih u izvodu.

Goran je u toku 2011. godine proveo tri meseca na stručnom usavršavanju na Clemson Univerzitetu u Južnoj Karolini, SAD, dok je u toku 2013. godine proveo dve nedelje na usavršavanju na Univerzitetu u Udinama i Institutu za primenjenu genomiku (IGA), Italija. U dosadašnjoj karijeri bio je učesnik na jednom projektu finansiranom od strane Ministarstva za obrazovanje, nauku i tehnološki razvoj, dva naučna projekta finansirana od strane pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj i jedne međunarodne COST akcije.

Služi se engleskim jezikom.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Goran Barać
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Mihajla Đan, vanredni profesor dr Ksenija Gašić, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Evaluacija genetičke i fenotipske varijabilnosti i analiza strukture populacije stepske višnje ( <i>Prunus fruticosa</i> Pall.)
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 9; stranica 110; slika 16; tabela 12; referenci 176; priloga 4
Naučna oblast: NO	Biologija

Naučna disciplina: ND	Genetika
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Prunus fruticosa</i> , populaciona struktura, mikrosatelitski markeri, SNP, selekcija, oplemenjivanje
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
<p>Izvod:</p> <p>IZ</p> <p>Stepska višnja (<i>Prunus fruticosa</i> Pall.) je autotetraploidna vrsta (FFFF, <math>2n = 4x = 32</math>) koja se prema taksonomskom položaju svrstava u familiju <i>Rosaceae</i>, rod <i>Prunus</i>. Ova vrsta pripada sekciji <i>Eurocerasus</i> u koju se pored nje ubrajaju još i trešnja (<i>Prunus avium</i> L.) i višnja (<i>Prunus cerasus</i> L.). Stepska višnja i trešnja su među najranijim derivatima roda <i>Prunus</i>, dok je višnja nastala kroz proces prirodne hibridizacije između ove dve vrste nekoliko puta u toku istorije. Utvrđivanje nivoa diverziteta među biljnim materijalom koji se koristi u oplemenjivačkom radu je od izuzetne važnosti za unapređenje agronomskih svojstava bilo koje biljne vrste. Jedan od prvih koraka u istraživanju nivoa diverziteta jeste morfološka karakterizacija germplazme. Nasuprot ovom tipu markera nalaze se molekularni markeri kojima se detektuju razlike na nivou DNK. Cilj ovog rada je bio ispitivanje inter- i intrapopulacione varijabilnosti stepske višnje (<i>P. fruticosa</i>) upotrebom fenotipskih, mikrosatelitskih i SNP markera, a dobijeni rezultati će olakšati i ubrzati oplemenjivački proces trešnje i višnje. Fenotipska svojstva su ispoljila visok nivo varijabilnosti prevashodno za kvantitativne markere, dok je nešto niži stepen varijacija uočen kod kvalitativnih karaktera, a potpuno odsustvo varijabilnosti je uočeno samo u svojstvu prisustva lisnih žlezda. Populacije stepske višnje su pokazale visok nivo polimorfizma unutar i između populacija primenom mikrosatelitskih markera, a broj detektovanih alela u okviru lokusa se kretao od 2 (BPPCT022, UDP-018) do 11 (BPPCT034). Varijabilnost na nivou sekvenci DNK u okviru populacija vrste <i>P. fruticosa</i> je visoka, ovo je potvrđeno analizom 170256 SNP markera. Populacije stepske višnje na nivou sva tri tipa markera su pokazale visok stepen varijabilnosti kada se govori o svim analiziranim lokalitetima kao jednoj populaciji, dok je ona bila nešto niža između jedinki na jednom lokalitetu. Bujnost kao fenotipska karakteristika pokazala je značajan nivo vezanosti za dva SNP markera. Primenom generalnog linearnog modela (General Linear Model, GLM) u asocijativnom mapiranju genoma stepske višnje otkriven je značajan nivo vezanosti između pojedinih SNP markera i ispitivanih fenotipskih karakteristika na hromozomu 7 (S7_8740459) i na hromozomu 8 (S8_6142814). Stepska višnja kao divlji srodnik vrsta od velikog ekonomskog značaja kao što su trešnja i višnja može imati značajnu ulogu u njihovom unapređenju, a u ovom radu je potvrđeno da poseduje veliki diverzitet što je čini još značajnijom i potencijalnim izvorom nove varijabilnosti.</p>	

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	26.10.2013.
Datum odbrane: DO	2016.
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Goran Anačkov, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Mihajla Đan, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, mentor</p> <p>član: dr Ksenija Gašić, vanredni profesor, Clemson University, Clemson, SC, USA, mentor</p> <p>član: dr Vladislav Ognjanov, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, član</p> <p>član: dr Nataša Kočiš Tubić, naučni saradnik, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Goran Barać
Mentor: MN	dr Mihajla Đan, Associate Professor dr Ksenija Gašić, Associate Professor
Title: TI	Genotypic and phenotypic diversity and population structure of European ground cherry ( <i>Prunus fruticosa</i> Pall.)
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad
Physical description: PD	chapters 9, pages 110, references 176, figures 16, tables 12, supplement 4

Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Genetics
Subject, Key words SKW	<i>Prunus fruticosa</i> , population structure, microsatellite markers, SNP, selection, breeding
UC	
Holding data: HD	Department of Biology and Ecology, library, Faculty of Sciences, Novi Sad
Note: N	No
<p>Abstract: AB</p> <p>European ground cherry (<i>Prunus fruticosa</i> Pall.) is autotetraploid species (FFFF, <math>2n = 4x = 32</math>) and belongs to <i>Prunus</i> genus and <i>Rosaceae</i> family. It is a part of <i>Eurocerasus</i> section that also includes sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.) and sour cherry (<i>Prunus cerasus</i> L.). Sweet cherry and ground cherry are presumably early derivatives of ancestral <i>Prunus</i> while sour cherry arose from natural hybridization between these two species several times trough history. Determination of diversity is of great importance in every breeding program, and morphological characterization continues to be the first step for the description and classification of that diversity. Other available tolls for measuring diversity among germplasm are molecular markers. Aim of this research was to determine level of inter- and intrapopulation variability in European ground cherry (<i>P. fruticosa</i> Pall.) using phenotypic, SSR and SNP markers to facilitate cherry breeding. Phenotype characteristics exhibited high level of variability especially for quantitative traits, while qualitative traits had shown lower level of variability. Only presence of leaf nectaries had absence of variability; all analyzed accessions had nectaries on their leaves. Microsatellite markers confirmed high variability between and within all analyzed populations of ground cherry. Number of alleles per markers ranged from 2 (BPPCT002 and UDP-018) to 11 (BPPCT034). Analysis of 170,256 SNP markers confirmed high level of variability in DNA sequences of <i>P. fruticosa</i>. All analyzed populations of ground cherry showed overall high level of variability using all types of markers, while variability was relatively lower within each population. Association study revealed significant level of association between several traits and SNP markers. Vigor as a trait of interest showed significant association with SNP on chromosome 7 (S7_8740459) and chromosome 8 (S8_6142814). European ground cherry as one of wild relatives of economically important fruit species, such as sweet and sour cherry, holds great potential in their improvement. Its high level of diversity, revealed in this research, provides additional source of variability and makes it valuable for breeding programs.</p>	
Accepted on Scientific Board on: AS	26.10.2013.

Defended: DE	2016.
Thesis Defend Board: DB	<p>president: dr Goran Anačkov, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>member: dr Mihajla Đan, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, mentor</p> <p>member: dr Ksenija Gašić, Associate Professor, Clemson University, Clemsom, SC, USA, mentor</p> <p>member: dr Vladislav Ognjanov, Full Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>member: dr Nataša Kočiš Tubić, Research Associate, Faculty of Sciences, Novi Sad</p>