

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Irena P. Radinović

**VARIJABILNOST GENOTIPOVA
CRVENE DETELINE
NA OSNOVU AGRONOMSKIH
OSOBINA, MORFOLOŠKIH I
MIKROSATELITSKIH MARKERA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Irena P. Radinović

**VARIABILITY OF RED CLOVER
GENOTYPES ON THE BASIS OF
AGRONOMIC TRAITS,
MORPHOLOGICAL AND
MICROSATELLITE MARKERS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

PRVI MENTOR:

Dr Gordana Branković, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

DRUGI MENTOR:

Dr Sanja Vasiljević, viši naučni saradnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Tomislav Živanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Slaven Prodanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Đura Karagić, viši naučni saradnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Gordani Šurlan-Momirović na savetima i moralnoj podršci koje mi je pružala tokom čitavog perioda trajanja doktorskih studija, a naročito tokom izrade doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Sanji Vasiljević, idejnom tvorcu ove doktorske disertacije, na omogućenom biljnom materijalu i savetima pri izvođenju ogleda, kao i na uvek korisnim uputstvima i svesrdnoj podršci.

Želela bih da se zahvalim dr Gordani Banković, na ukazanom poverenju, stručnim kritikama i savetima tokom pisanja doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Tomislavu Živanoviću i prof. dr Slavenu Prodanoviću, na pruženoj podršci teorijskim znanjima tokom doktorskih studija i tokom izrade doktorske disertacije.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem Draganu Peroviću, na upućenim stručnim savetima oko molekularnih analiza.

Iskreno želim da se zahvalim dr Đuri Karagiću, rukovodiocu projekta čiji sam bila učesnik, na materijalnoj podršci neophodnoj za realizaciju različitih analiza.

Veoma se zahvaljujem i dr Miroslavu Zoriću na pomoći koju mi je pružio pri statističkoj obradi podataka i tumačenju rezultata.

Od srca se zahvaljujem svojim prijateljima.

Posebnu i najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici.

Ova doktorska disertacija je rezultat istraživačkog projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije:

Projekat TR 31024: "Povećanje tržišnog značaja krmnih biljaka oplemenjivanjem i optimizacijom tehnologije proizvodnje semena"; period 2011-2014. godina; rukovodilac dr Đura Karagić.

VARIJABILNOST GENOTIPOVA CRVENE DETELINE NA OSNOVU AGRONOMSKIH OSOBINA, MORFOLOŠKIH I MIKROSATELITSKIH MARKERA

Irena Radinović, dipl. biolog

REZIME

Crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) je izrazito stranooplodna biljna vrsta koja se odlikuje gametofitskim sistemom inkompatibilnosti, a populacije su heterogene i sastoje se od heterozigotnih genotipova. Da bi biljni genetički resursi mogli biti korišćeni u programima oplemenjivanja, neophodno je izvršiti prethodnu karakterizaciju i evaluaciju uzoraka, koji se nalaze u kolekcijama germplazme. Precizan i sveobuhvatan opis germplazme crvene deteline je jedan od osnovnih preduslova u ostvarivanju uspešnog oplemenjivanja.

Cilj ove doktorske disertacije je obuhvatao evaluaciju fenotipske varijabilnosti 46 genotipova crvene deteline koji su deo kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, a na osnovu agronomski značajnih osobina i morfoloških markera po UPOV-u. Primenom odabranog seta od 15 mikrosatelitskih markera izvršena je molekularna karakterizacija 46 genotipova crvene deteline, kako bi se ustanovila genetička varijabilnost materijala i njegov značaj za oplemenjivanje na određene agronomski važne osobine. Osim toga, kod ispitivanih genotipova crvene deteline su određeni i značajni parametri kvaliteta: sadržaj sirovih proteina, vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu (ADF-acid detergent fiber) i vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu (NDF- neutral detergent fiber).

Na osnovu analize četiri morfološke osobine (forma rasta, maljavost stabljike, boja lista i intenzitet obojenosti pege na listu) i jedne fenološke osobine (vreme cvetanja), utvrđen je visok nivo diverziteta ispitivanih genotipova crvene deteline, a vreme cvetanja je određeno kao deskriptor najveće diskriminacione moći. Postignut je određeni stepen saglasnosti u grupisanju genotipova primenom analize homogenosti u odnosu na klaster analizu. Pri utvrđivanju morfološke sličnosti i određivanju osobina

koje najviše doprinose diskriminaciji genotipova crvene deteline metod analize homogenosti se pokazao kao bolji u odnosu na klaster metod.

Matrice distance morfoloških osobina parova genotipova određene su na osnovu “simple matching” koeficijenta sličnosti, matrice distanci agronomskih osobina parova genotipova, kao i matrice distanci agronomskih i hemijskih osobina predstavljene su Euklidskim odstojanjima, dok matrice distanci genotipova na osnovu SSR markera, predstavljaju genetičke distance po Dice-u. Prosečna genetička distanca genotipova crvene deteline dobijena na osnovu analize agronomskih osobina (0,380), bila je manja u odnosu na genetičke distance izračunate na osnovu morfoloških (0,587) i mikrosatelitskih markera (0,623).

Klaster analizom i analizom glavnih komponenti agronomskih osobina crvene deteline utvrđene su osnovne sličnosti i razlike ova dva modela grupisanja genotipova. Na PCA (Principal Component Analysis) biplotu 46 genotipova crvene deteline, na osnovu osam agronomskih osobina prve godine istraživanja (broj internodija, broj grana, dužina stabljike, debljina stabljike, dužina centralne liske, širina centralne liske, prinos zelene mase, prinos suve materije), izdvojilo se sedam grupa genotipova, dok su se na osnovu istih agronomskih osobina, primenom klaster analize, genotipovi grupisali u dva klastera. Analiza glavnih komponenti na osnovu četiri agronomske i tri hemijske osobine druge godine istraživanja (broj internodija, dužina stabljike, prinos zelene mase, prinos suve materije, sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) i sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF)), razdvojila je 46 genotipova crvene deteline u šest grupa, dok su se na osnovu istih osobina, klaster analizom genotipovi grupisali u četiri klastera.

Na osnovu molekularne analize proučavanih genotipova utvrđen je visok polimorfizam SSR lokusa. Prosečan broj SSR alela po lokusu u ovim istraživanjima (13) bio je pokazatelj značajnog diverziteta ispitivanih genotipova crvene deteline. Frekvencije alela SSR lokusa bile su u opsegu od 0,062 (RCS0078) do 0,391 (RCS1667). Prosečna PIC (Polymorphism Information Content) vrednost iznosila je 0,306. Najveća PIC vrednost (0,48) bila je prisutna kod markera RCS1667, a najniža (0,12) kod markera RCS0078.

Grupisanje genotipova na osnovu SSR markera nije bilo u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom. Analiza molekularne varijanse (AMOVA-Analysis of

molecular variance) 46 genotipova crvene deteline na osnovu statusa (sorta ili populacija) i ploidnosti je bila značajna ($p < 0,05$), ali je i ukazivala na slabu genetičku diferencijaciju grupa formiranih na osnovu statusa i ploidnosti ($\Phi_{ST} = 0,01236$).

Statistički značajna pozitivna korelacija je utvrđena između matrice distanci morfoloških osobina (i jedne fenološke) i matrice distanci agronomskih osobina, kao i između matrice distanci morfoloških u odnosu na matricu distanci agronomskih i hemijskih osobina. Utvrđeno je i odsustvo korelacija matrice distanci na osnovu SSR markera u odnosu na sve druge matrice udaljenosti, ukazujući na to da su odabrani SSR markeri slabo reflektovali odnose između genotipova utvrđene na osnovu fenotipskih osobina.

Značajnija i pouzdanija molekularna karakterizacija kojom bi se mogla postići veća saglasnost sa variranjem na genetičkom i fenotipskom nivou bi zahtevala korišćenje većeg broja markera koji bi bili integralni delovi gena, ili vezani za gene od interesa, i koji bi se mogli dovesti u vezu sa agronomski značajnim kvalitativnim i kvantitativnim osobinama.

Ključne reči: crvena detelina, varijabilnost, agronomske osobine, morfološki markeri, SSR markeri, sadržaj sirovih proteina, sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) i sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF).

Naučna oblast: BIOTEHNIČKE NAUKE

Uža naučna oblast: GENETIKA

UDK: 633.32:631.524(043.3)

VARIABILITY OF RED CLOVER GENOTYPES ON THE BASIS OF AGRONOMIC TRAITS, MORPHOLOGICAL AND MICROSATELLITE MARKERS

Irena Radinović, BSc

ABSTRACT

Red clover (*Trifolium pratense* L.) is cross-pollinated plant species which is characterized by gametophytic self-incompatibility, and its populations are heterogeneous with heterozygous genotypes. The prior characterization and evaluation of samples that are in the collections of germplasm are important for using plant genetic resources in breeding programs. A thorough and comprehensive description of red clover germplasm is one of the main prerequisites for achieving a successful breeding.

The aim of this doctoral thesis was to evaluate the phenotype variability of 46 genotypes of red clover as part of the collection of the Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad, on the basis of agronomically important traits and morphological markers by UPOV. Molecular characterization of 46 genotypes of red clover was performed by applying the set of 15 microsatellite markers in order to establish the genetic variability of selected materials and its importance in breeding for certain agronomically important traits. In addition, in the tested material were determined certain important quality parameters: crude protein (CP) content, acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF).

Through the analysis of four morphological traits (growth habit, density of hairs, leaf color and intensity of white marks) and one phenological trait it was determined a high level of diversity of red clover genotypes and time of flowering is defined as the descriptor of the greatest discriminatory power. There was some degree of consensus in grouping genotypes using the analysis of homogeneity in relation to cluster analysis. In determining the morphological similarities and determining the qualities that contribute most to the discrimination of genotypes of red clover, homogeneity analysis has proven to be better compared to the cluster method.

Distance matrix of morphological traits for pairs of genotypes were determined on the basis of simple matching coefficient, distance matrix of agronomic traits for pairs of genotypes, as well as distance matrix of agronomic and chemical properties are presented as Euclidean distances, while the distance matrix of genotypes based on SSR markers was determined on the basis of Dice coefficient. The average genetic distance of genotypes of red clover obtained based on analysis of agronomic traits (0,380), had a lower value, than the genetic distances calculated on the basis of morphological (0,587) and molecular traits (0,623).

Cluster analysis and principal component analysis of red clover agronomic characteristics found basic similarities and differences between these two models of grouping genotypes. PCA biplot of 46 genotypes of the red clover, based on eight agronomic traits of the first year of research (number of internodes, number of branches, stem length, stem diameter, medium lamina length, medium lamina diameter, yield of green mass, yield of dry matter), allocated genotypes into seven groups, while based on the same agronomic characteristics, cluster analysis grouped genotypes into two clusters. Principal components analysis of four agronomic and three chemical traits of the second year of research (number of internodes, stem length, yield of green mass, yield of dry matter, ADF, NDF) separated 46 genotypes of red clover in six groups, while based on the same characteristics, cluster analysis grouped genotypes in four clusters.

Based on molecular analysis of the studied genotypes, a high polymorphism of SSR loci was revealed. The average number of alleles per SSR locus in this study (13) was an indicator of the significant diversity of the red clover genotypes. Allele frequencies of the SSR loci were in the range of 0.062 (RCS0078) to 0.391 (RCS1667). The average PIC value (Polymorphism Information Content) was 0.306. The highest PIC value (0.48) was present in RCS1667 marker, and the lowest (0.12) in RCS0078 marker.

Grouping of genotypes by the use of SSR markers was not in accordance with their geographical origin. Analysis of molecular variance (AMOVA) of 46 red clover genotypes by the status (cultivar or population) and ploidy level was significant ($p < 0,05$), but it also suggested a weak genetic differentiation of groups formed on the basis of status and ploidy level ($\Phi_{ST} = 0,01236$).

A statistically significant positive correlation was found between the distance matrix of morphological traits and agronomic traits distance matrix, as well as between morphological distance matrix relative to the distance matrix of the agronomic and chemical properties, respectively. It has been found the absence of a correlation of distance matrix based on SSR markers in relation to all the other distance matrices, indicating that selected SSR markers poorly reflected relationships between genotypes determined on the basis of phenotypic traits.

Significant and reliable molecular characterization which could achieve more agreement in genetic and phenotypic variation would require the use of a larger number of markers that would be integral parts of the genes, or closely linked to the genes of interest, and which could be correlated with agronomically important qualitative and quantitative characteristics.

Key words: red clover, variability, agronomic traits, morphological markers, SSR markers, crude protein (CP) content, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF)

Scientific field: BIOTECHNICAL SCIENCES

Specific scientific field: GENETICS

UDK: 633.32:631.524(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	4
3. PREGLED LITERATURE.....	5
4. RADNA HIPOTEZA	22
5. MATERIJAL I METODE RADA.....	23
5.1. Biljni materijal.....	23
5.2. Plan ogleđa	24
5.3. Agroekološki uslovi na ispitivanim lokalitetima.....	25
5.4. Ispitivane morfološke i agronomske osobine genotipova crvene deteline.....	28
5.5. Molekularna analiza genotipova crvene deteline.....	30
5.6. Hemijske analize.....	34
5.7. Statistička analiza podataka.....	37
6. REZULTATI I DISKUSIJA.....	41
6.1. Morfološki markeri genotipova crvene deteline.....	41
6.1.1. Distribucija i diverzitet morfoloških markera.....	41
6.1.2. Diskriminaciona moć morfoloških markera.....	44
6.1.3. Grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu HOMALS analize morfoloških markera.....	46
6.1.4. Grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu klaster analize morfoloških markera.....	50
6.2. Agronomske osobine genotipova crvene deteline.....	53
6.2.1. Analiza varijanse.....	53
6.2.2. Vrednosti agronomskih osobina i deskriptivni statistički parametri.....	54
6.3. Hemijske osobine genotipova crvene deteline.....	59
6.4. Korelacije između agronomskih osobina, i između agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline.....	61
6.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline.....	65
6.6. Klaster analiza agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline.....	70

6.7. Genetička varijabilnost mikrosatelitskih (SSR) molekularnih markera za genotipove crvene deteline.....	73
6.7.1. Klaster analiza genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera.....	75
6.7.2. Analiza glavnih koordinata genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera	77
6.7.3. Analiza molekularne varijanse (AMOVA).....	78
6.8. Saglasnost rezultata dobijenih na osnovu morfoloških, agronomskih, hemijskih i SSR molekularnih podataka.....	81
7. ZAKLJUČAK	83
8. LITERATURA.....	86
9. PRILOG.....	100

1. UVOD

Crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) je važna krmna leguminoza umerenih regiona, koja se gaji kao čist usev ili u travno-leguminoznim smešama. Adaptirana je na širok opseg različitih tipova zemljišta, različitih pH vrednosti, i uslova sredine, bilo kao prirodne populacije ili selekcionisane u vidu gajenih useva (Bowley i sar., 1984; Taylor i Quesenberry, 1996). Gajenje crvene deteline ima pozitivan uticaj na zemljište, ostavlja zemljište čisto od korova, u rastresitom stanju, obogaćuje ga azotom i ostalim hranljivim elementima nakon razoravanja deteliništa (Taylor i Quesenberry, 1996). U asocijaciji sa *Rhizobium* bakterijama, crvena detelina ima sposobnost da fiksira od 125 do 220 kg/ha azota godišnje (LaRue i Paterson, 1981). Osobina fiksacije azota uz visok prinos, dobar kvalitet i pogodnost za konzervaciju, čine crvenu detelinu atraktivnim usevom za krmnu proizvodnju (Frame, 1990). Razmatrajući proizvodnju i plasman semena širom sveta, kao i broj sorti koji je na raspolaganju, među krmnim leguminozama, crvena detelina je na drugom mestu posle lucerke, koja drži primat, ali je i dalje više zastupljena nego bela detelina (Boller i sar., 2010).

Crvena detelina, je u odnosu na lucerku, biljna vrsta koja zahteva vlažnija područja, te se nastavlja na gajenje lucerke u humidnijem regionu na manje povoljnim zemljištima (Vučković, 1999). U odnosu na lucerku crvena detelina ima kraći vegetativni ciklus, ali predstavlja dobru zamenu za nju, naročito u uslovima, gde je prisutna veća vlažnost i kiselost zemljišta. Za stočnu hranu, crvena detelina se može koristiti kao zelena krma, putem ispaše (sama ili u smeši sa travama), zatim konzervisana kao seno, silaža i dehidrirano brašno. Crvena detelina se karakteriše visokim prinosima krme (10-12 t/ha) odličnog kvaliteta (Vučković, 1999). Značajno svojstvo crvene deteline je oko 90% niži nivo degradacije proteina u silaži u odnosu na lucerku (Papadopoulos i McKersie, 1983), usled prisustva enzima polifenol oksidaze, koji inhibira proteaznu aktivnost u silaži (Jones i sar., 1995), i ova važna osobina bi trebalo da se koristi za razvoj sorti crvene deteline sa povećanim nivoima polifenol oksidazne aktivnosti (Fothergill i Rees, 2005; Eickler i sar., 2008). Prema statističkim podacima (Statistički godišnjak Srbije, 2015), crvena detelina je u 2014. godini u Srbiji gajena na 116.059 ha sa ostvarenim prosečnim prinosom suve materije od 3,3 t/ha.

Dosadašnji pravci u oplemenjivanju krmnih leguminoza na bolji kvalitet su prevashodno bili usmereni na povećanje sadržaja proteina. Drugi važan parametar

kvaliteta krmnih leguminoza, naročito sa aspekta ishrane preživara je *in vitro* svarljivost suve materije. Posebno mesto u ovom domenu kvaliteta krme, sa aspekta ishrane preživara zauzima odnos strukturnih i nestrukturnih ugljenih hidrata. U strukturne spadaju vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu (NDF-neutral detergent fiber) i vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu (ADF-acid detergent fiber), dok nestrukturne pretežno čini skrob (Vasiljević i sar., 2009).

Crvena detelina je stranooplodna vrsta sa gametofitskim sistemom inkompatibilnosti (Taylor i Quesenberry, 1996). Prema tome populacije crvene deteline su heterogene i sastoje se od heterozigotnih genotipova. Usled toga su visoki nivoi genetičkih variranja unutar i između populacija (Tucak i sar., 2009).

Morfološka karakterizacija je deskripcija uzoraka na osnovu morfoloških markera ili deskriptora, koji mogu biti praćeni u različitim fazama životnog ciklusa biljaka. Deskriptori koji se koriste u karakterizaciji uzoraka germplazme podrazumevaju morfološke/botaničke osobine, koje su često monogene ili oligogene, koje imaju visoku heritabilnost, a čija ekspresija ne zavisi od faktora spoljašnje sredine. Agronomski deskriptori su uglavnom kvantitativne osobine, determinisane poligenima čije je dejstvo podložno modifikacijama pod uticajem ekoloških činilaca. Evaluacija ovih osobina je često zbog njihove kontinuirane varijabilnosti kompleksnija i teža u odnosu na morfološke deskriptore koji mogu omogućiti brzu klasifikaciju i diskriminaciju uzoraka. Deskriptor lista određene vrste predstavlja kolekciju svih osobina, deskriptora koji su međunarodno priznati i standardizovani, i koji se koriste u karakterizaciji i evaluaciji određene vrste.

Molekularna karakterizacija predstavlja deskripciju uzoraka na osnovu molekularnih markera. Molekularni markeri su određeni segmenti DNK koji se mogu detektovati pomoću proba ili specifičnih prajmera, na osnovu kojih se mogu ustanoviti polimorfizmi nukleotidnih sekvenci različitih individua. Molekularni markeri mogu, ali ne moraju biti u korelaciji sa fenotipskom ekspresijom neke osobine. Odlikuje ih stabilnost, a osim toga ne zavise od faktora spoljašnje sredine, i ne ispoljavaju plejotropne i epistatične efekte. Postoje različiti tipovi molekularnih markera, a mikrosateliti ili SSR markeri (SSR-Simple Sequence Repeats) su vrlo korišćeni genetički markeri u oplemenjivanju biljaka, sa velikom zastupljenošću u eukariotskim genomima. Zasnovani su na PCR tehnici (Polymerase Chain Reaction), odlikuje ih

kodominantno nasleđivanje, visoka varijabilnost i alelna divergentnost, jednostavnost procene veličine fragmenata, i dobra ponovljivost rezultata.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja su:

- fenotipska ocena sorti i populacija crvene deteline korišćenjem UPOV deskriptora, karakterizacija morfoloških osobina (i jedne fenološke) i evaluacija agronomskih osobina;
- procena parametara kvaliteta genotipova crvene deteline, sadržaja sirovih proteina, sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF), i sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF);
- molekularno-genetička analiza sorti i populacija crvene deteline primenom mikrosatelitskih markera;
- procena genetičke sličnosti i odnosa genotipova crvene deteline na osnovu alelne divergentnosti;
- identifikacija potencijalnih heterotičnih grupa sorti i populacija crvene deteline;
- klasifikacija genotipova prema rezultatima fenotipske ocene, ocene kvaliteta i molekularno-genetičke analize.

2. PREGLED LITERATURE

Crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) pripada porodici leptirnjača (fam. *Fabaceae*), rodu *Trifolium*. Ovaj rod obuhvata 250–300 vrsta (Ellison i sar., 2006), a oko 10% vrsta ovog roda (20–30) se koriste kao krmne biljke u komercijalnoj poljoprivredi (Williams i sar., 2010). Upravo najveći privredni značaj i najveće rasprostranjenje među vrstama roda *Trifolium* ima crvena detelina (*T. pratense* L.).

Smatra se da je crvena detelina poreklom iz jugoistočne Evrope i Male Azije, i to iz oblasti Mediterana (Mukhina i sar., 1993). Predstavlja autohtonu vrstu u Evropi, na Bliskom istoku, u severnoj Africi i centralnoj Aziji, dok je u ostalim delovima sveta introdukovana. Crvena detelina je uz lucerku krmna biljka sa najdužom istorijom kultivacije (Boller, 2010). Neizvesno je kada je započeto aktivno kultivisanje crvene deteline, dokazi o postojanju crvene deteline na pašnjacima Evrope datiraju iz bronzanog doba, a prvi pisani tragovi o njenoj poljoprivrednoj upotrebi i značaju gajenja potiču iz 12. veka (Riday, 2010). Prihvaćeno je da je rani centar domestikacije crvene deteline u Flandriji i Brabantu (severna Belgija) (Taylor i Quesenberry, 1996), a da je seme za kultivisanje crvene deteline u Evropu dospelo putanjom od Bliskog istoka do Španije (kojom su tada upravljali Mavri), a odatle morskim putevima do Holandije i Belgije, odakle se prenosilo u ostale delove Evrope (Zeven i deVet, 1982). Do početka 19 veka, crvena detelina je značajna sastavna komponenta plodosmene u ratarskoj proizvodnji, koristila se radi unapređenja plodnosti zemljišta, i kao izvor krmne hrane u svim umerenim regionima širom sveta. Tokom 20. veka, dolazi do značajnog pada proizvodnje crvene deteline i smanjenja njenih poljoprivrednih površina, a usled velike upotrebe veštačkih đubriva (Riday, 2010).

Osnovni broj hromozoma u rodu *Trifolium* je među najraznovrsnijim u odnosu na druge srodne rodove, u rasponu od $n = 5$ (3%) $n = 6$ (2%), do $n = 7$ (15%), $n = 8$ (80% vrsta u rodu) (Zohary i Heller, 1984). Vizintin i sar. (2006) su proučavajući veličinu i sadržaj jedarne DNK, kao i rDNA regiona kod 31 vrste roda *Trifolium*, ustanovili postojanje i vrsta sa dodatnim hromozomima, i haploidnom garniturom od $n = 11$, $n = 12$ i $n = 13$.

Ishodno, crvena detelina je diploidna vrsta, sa osnovnim brojem hromozoma 7 ($2n=14$), ali od 1939. godine kada su proizvedene prve tetraploidne biljke crvene deteline, sorte su podvrgnute autopolioidiji u cilju povećanja prinosa krme (Sjodin i Ellerstrom, 1986). Danas se komercijalno gaje i diploidne i tetraploidne sorte crvene deteline (Zuk-Golaszewska i sar., 2010). Buyukkartal (2003, 2008) navodi postojanje tetraploidnih populacija crvene deteline u Turskoj, i pored toga što se u prirodi generalno javljaju samo diploidne forme crvene deteline, i što su tetraploidi dobijeni oplemenjivanjem ove vrste. Najčešći način dobijanja tetraploida crvene deteline jeste dupliranjem broja hromozoma diploida, pomoću kolchicina, ali postoje i druge metode koje se mogu koristiti za stvaranje poliploida kod crvene deteline, kao što su N_2O tehnika (azot-suboksid tehnika) i metod spajanja neredukovanih gameta. Indukovani tetraploidi mogu biti bolji u odnosu na svoje diploidne forme po mnogim osobinama: veća otpornost na bolesti, bolja perzistentnost i otpornost na niske temperature, kao i veći prinos suve materije (Sattler i sar., 2016).

Tetraploidne sorte crvene deteline se u odnosu na diploidne odlikuju višim i stabilnijim prinosima krme, ali je njihovo šire gajenje ograničeno niskim prinosom i visokom cenom semena. Prema navodima autora Hejduk i Knot (2010), tetraploidne sorte nisu prihvaćene u proizvodnoj praksi u Americi, ali se u velikoj meri koriste u Evropi. Amdahl i sar. (2015) navode da prosečan prinos semena tetraploida iznosi 60% prinosa diploida u Norveškoj, a 75% prinosa diploida u Švedskoj. OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) sortna lista (spisak sorti koje ispunjavaju uslove za sertifikaciju semena) (OECD, 2015), kao i značajne nacionalne liste priznatih ili preporučenih sorti, razlikuju diploidne ($2n=2x=14$) i tetraploidne sorte ($2n=4x=28$) crvene deteline, kao što i VCU (Value for Cultivation and Use) testovi ispitivanja sorti radi utvrđivanja njihove poljoprivredne vrednosti, uobičajeno razlikuju ta dva nivoa ploidnosti.

Prema navodima autora Morris i Greene (2001), primarni genetički pul crvene deteline (*T. pratense* L.) može se podeliti u pet sub-pulova, u opsegu od modernih sorti do nedomestifikovanih divljih formi. Aktuelne sorte zastupljene u proizvodnji kao i zastarele sorte, stvorene oplemenjivanjem u cilju intenzivnog upravljanja pašnjacima i radi proizvodnje sena, mogu se smatrati prvom komponentom primarnog genetičkog pula. Selekcijom formirane populacije kao što su regionalni tipovi i oplemenjene

populacije predstavljaju drugu komponentu primarnog genetičkog pula. Lokalne populacije koje su poreklom od divljih populacija sa prirodnih pašnjaka, a koje su koristili i selekcijom uobličili farmeri, čine treću komponentu primarnog genetičkog pula crvene deteline. Četvrta i peta komponenta se sastoje od germplazme koju čine ili ranije kultivisane populacije koje su dospevanjem u prirodu naturalizovane ili endemične divlje populacije. S obzirom na to da su kultivisane forme u najvećem delu umerene zone verovatno kontaminirale divlje forme, teško je stvarno razdvojiti četvrtu i petu komponentu primarnog genetičkog pula crvene deteline.

U sekundarni genetički pul vrste *T. pratense* spadaju vrste *T. diffusum* i *T. pallidum*, a tercijarni genetički pul čine vrste *T. alpestre*, *T. heldreichianum*, *T. medium*, *T. noricum* i *T. rubens*. (Morris i sar., 2009). Interspecijska hibridizacija kod crvene deteline je otežana, pre svega zbog razlika u broju hromozoma *T. pratense* L. ($2n=14$) u odnosu na njoj najrodnije *Trifolium* vrste koje imaju $2n=16$ hromozoma u svom genotipu. Najviše su proučavani interspecijski hibridi crvene deteline i *T. medium* (Abberton, 2007).

Kada su u pitanju niže sistematske kategorije od vrste, *Trifolium pratense* L. je izuzetno polimorfna vrsta u okviru koje je opisano više od 40 botaničkih taksona (Mousset-Declas, 1992). S tim u vezi, postoje i različite klasifikacije koje su dali razni autori: Stebler i Volkart (1913); Julen (1959); Hess i sar. (1970); Zohary i Heller (1984). Erić i sar. (1996) navode sledeće varijetete crvene deteline:

1. divlja crvena detelina – *Trifolium pratense* var. *spontaneum*
2. obična oranična crvena detelina – *Trifolium pratense* var. *sativum* u okviru koje postoje dva tipa:
 - rani- subvar. *praecox*
 - kasni- subvar. *serotinum*
3. centralnoalpska višegodišnja crvena detelina – *Trifolium pratense* var. *perenne*
4. američka oranična crvena detelina – *Trifolium pratense* var. *expansum*

Miladinović (2001) navodi nešto drugačiju klasifikaciju, po kojoj je evropska crvena detelina (*Trifolium pratense* var. *subnudum* Witte) izjednačena sa običnom oraničnom crvenom detelinom (*Trifolium pratense* var. *sativum*), koja obuhvata ranostasni i kasnostasni podvarijetet, između kojih postoje određene biološke i

fenotipske razlike. Crvena detelina na području Balkana, a samim tim i Republike Srbije pripada evropskom ranostasnom podvarijetetu (Miladinović, 2001).

Ranostasni podvarijetet se najviše gaji u zapadnoj, srednjoj i južnoj Evropi, kao i u južnoj Rusiji i dobro uspeva u toplom i umereno hladnom podneblju. Ranostasna crvena detelina cveta već u godini setve i donosi zrelo seme. Dužina života ranostasne crvene deteline je tri godine i obično daje 2-3 otkosa godišnje. Kasnostasni podvarijetet je uglavnom rasprostranjen u baltičkim i severno-evropskim zemljama, kao i na severu Rusije. U prvoj godini formira lisnu rozetu, a tek u drugoj godini cveta i donosi zrelo seme, i to samo u prvom otkosu. Kasnostasni tip živi duže od ranostasnog tipa (3-4 godine). Često se u stranoj literaturi ranostasna crvena detelina označava kao dvootkosna (tzv. medium tip), dok se kasnostasna crvena detelina pominje kao jednootkosna (tzv. mammoth tip) (Vasiljević i sar., 2011).

Genetički resursi su osnova razvoja modernih visokoprinosa sorti širom sveta. Njihova praktična upotreba u programima oplemenjivanja je moguća tek nakon prethodne karakterizacije i evaluacije uzoraka koji se nalaze u kolekcijama germplazme. Karakterizacija i evaluacija uzoračkih osobina podrazumevaju obiman, i vremenski zahtevan rad, pa se ocene i merenja osobina često vrše na sržnoj kolekciji ("core collection") umesto na čitavoj kolekciji germplazme (Guarino i sar., 2002). Uvođenjem koncepta sržnih kolekcija ("core collection") (Frankel i Brown, 1984), proučavanje genetičkog diverziteta i varijabilnosti postaje naročito značajno, ali čak ni korišćenje sržnih kolekcija nije pomoglo da se u potpunosti okarakteriše genetički diverzitet i proceni njegova najefikasnija upotreba u oplemenjivanju biljaka (Smýkal i sar., 2015). Karakterizacija i evaluacija uzoraka u kolekcijama germplazme odnosi se na deskriptore, u koje spadaju kvalitativne i kvantitativne osobine. Kvalitativni deskriptori podrazumevaju morfološke, fiziološke, i molekularne (biohemijske i DNK) osobine, dok su kvantitativni deskriptori podložni delovanju faktora spoljašnje sredine, kao npr. prinos i komponente prinosa, tolerancija na stresne uslove sredine itd. (Ortiz Ríos, 2015).

Međunarodne liste deskriptora čine osnovu za standardizovani dokumentacioni sistem koji obezbeđuje internacionalno prihvaćen format i univerzalno razumljiv jezik podataka o biljnim genetičkim resursima, čime je omogućena brza, pouzdana i efikasna razmena informacija, u cilju očuvanja i iskorišćavanja germplazme (Gotor i sar., 2008).

Koncept deskriptor listi je evoluirao tokom godina kao odgovor na promene u korisničkim potrebama. Inicijalno, deskriptor liste su obezbeđivale minimalan set karakteristika da bi se opisao određeni usev, čime su mnoge poznate karakteristike ostale bez internacionalno priznatih standarda deskripcije. Ideja minimum liste je revidirana 1990. godine i razvijen je novi pristup, da bi se stvorile obimnije deskriptor liste, koje su uključivale sve deskriptore koji se odnose na karakterizaciju i evaluaciju uzoraka. Format deskriptor listi je dalje revidiran 1994. godine, da bi se korisnicima obezbedile još obimnije liste koje sadrže set visoko diskriminišućih deskriptora. Od 1995. godine, prikjučene su nove standardizovane sekcije *in vitro* konzervacije, krioprezervacije, podataka o zemljištu i spoljšnjoj sredini, a od 1999. godine i etno-botanički podaci.

Deskriptor liste i smernice razvijene od strane UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants) se značajno razlikuju. Dok deskriptor liste imaju za cilj da ubrzaju dokumentovanje i korišćenje biljnih genetičkih resursa, UPOV tehnički vodič je razvijen u cilju sprovođenja DUS (Distinctness, Uniformity, Stability) testova, koji imaju dvojnu ulogu. i koriste se u procesu priznavanja sorti, i u procesu zaštite prava oplemenjivača novih biljnih sorti. Procedura za DUS testiranje podrazumeva ogled u polju i laboratoriji, usklađenim sa tehničkim procedurama i preporučenim markerima postojećih UPOV vodiča. Za zemlje sa obaveznom regulativom za priznavanje sorti, osim DUS ispitivanja, postoji i ispitivanje radi utvrđivanja poljoprivredne vrednosti (Value for Cultivation and Use – VCU) (Milošević i sar., 2011).

Efikasna selekcija uzoraka sa poželjnim karakteristikama, a koji bi se mogli koristiti u programima oplemenjivanja, zahteva da podaci o genetičkim resursima, budu sveobuhvatni i lako dostupni istraživačima. Pasoški podaci, ekološki, fenotipski, pedigre i genetički podaci, kao i podaci o evaluacijama uzoraka, moraju biti dostupni i održavaju se u papirnoj i/ili elektronskoj formi, a sve veći broj podataka je digitalizovan u on line bazama podataka koje se mogu pretraživati (Thormann i sar., 2012).

Počev od 1996. godine broj uzoraka u svetskim kolekcijama germplazme je uvećan za 20%, i prema FAO podacima (FAO, 2010) u njima je ukupno sadržano oko 7,4 miliona uzoraka biljnih genetičkih resursa za hranu i poljoprivredu. Procenjuje se da je oko 25-30% tih uzoraka različito i unikatno, a najveći deo čine duplikati.

Najznačajnije svetske kolekcije biljnih genetičkih resursa, čiji fondovi se odnose na krmne leguminoze i trave, a koje poseduju preko 1 000 uzoraka su: Australian Medicago Genetic Resource (45640 uzoraka), Genetic Resource Centre for Temperate Pasture Legume (9184 uzorka), ICARDA-International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (20031 uzorak), ECPGR-European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (56444 uzorka) i USDA-National Plant Germplasm System (33142 uzorka).

Kada je u pitanju crvena detelina od posebnog su značaja dve *ex situ* baze podataka. Prva od njih je ECPGR (European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources) *T. pratense* baza (www.ecpgr.cgiar.org/databases/Crops/trif_pra.htm) za čije održavanje je zadužen Institut za agrobotaniku (Tápiószele, Mađarska), sa 2294 uzoraka, a koje se još održavaju u 19 gen-banki, u drugim institucijama petnaest evropskih zemalja. Od ukupnog broja uzoraka 43% su komercijalne sorte ili linije oplemenjivača, 21% su lokalne populacije, 25% su divlji ili poludivlji ekotipovi i 6% je materijal nepoznatog porekla. Druga značajna baza podataka ove vrste je USDA (United States Department of Agriculture) National Plant Germplasm System baza podataka (www.ars-grin.gov/npgs/), koja ima 1038 uzoraka, od čega su 35% sorte i drugi selekcionni materijal, 16% su lokalne populacije i 22% su divlji ekotipovi.

Kao rezultat naučnih ekspedicija u prikupljanju genetičkih resursa krmnih leguminoza i trava, počev od 2000. godine, u Litvaniji i susednim zemljama, prikupljeno je 136 uzoraka crvene deteline sa različitih prirodnih staništa (Rancane i sar., 2006). Od prikupljenih 136 uzoraka, 108 uzoraka je analizirano na osnovu morfoloških i agronomskih osobina, u ogleđima postavljenim od 2003-2005. godine, radi odabira najznačajnijih uzoraka za dugoročno čuvanje u Litvanskoj gen-banci. Iako je većina uzoraka bila slabije perzistentna i osetljiva na *Sclerotinia trifoliorum* u odnosu na kontrolu, neki uzorci su pokazivali otpornost prema ovom patogenu. Izvestan broj uzoraka je bio ranijeg vremena cvetanja u odnosu na ranostasnu sortu Skriveru agrais, a neki uzorci bi se na osnovu boje cveta mogli koristiti i u dekorativne svrhe.

Tucak i sar. (2009) su proučavali kolekciju od 30 sorti i populacija crvene deteline različitog geografskog porekla, na osnovu sledećih morfo-agronomskih osobina: prinos zelene mase i suve materije, prinos semena (g/biljci), visina stabljike (cm), % suve materije, perzistentnost (%), vreme cvetanja (%), u toku dve godine.

Razlike između sorti/populacija su bile značajne za sve ispitivane osobine, a klaster analiza na osnovu 7 morfo-agronomskih osobina je pokazala grupisanje ispitivanih uzoraka u 6 grupa, na osnovu čega je i odabran najznačajniji materijal za dalje programe oplemenjivanja.

Zhang i sar. (2012) su ustanovili značajnu unutar i među-populacionu varijabilnost fenotipskih karakteristika kod 25 divljih populacija crvene deteline iz provincije Hubei. Unutar populacija broj izdanaka i broj cvasti po biljci su imali relativno visok nivo variranja, dok su statistički značajne razlike između populacija ustanovljene za visinu biljke, dužinu lista, širinu lista, masu hiljadu semena, dužinu peteljke i broj cvasti po biljci. Ispitivani uzorci su na osnovu dobijenih rezultata grupisani u tri klastera.

Asci (2011) je proučavao biodiverzitet 47 prirodnih populacija crvene deteline prikupljenih sa 20 različitih lokaliteta crnomorskog regiona, na osnovu morfo-agronomskih karakteristika u drugoj godini vegetativnog ciklusa, prema protokolu UPOV. Na osnovu ispitivanih osobina: vreme cvetanja, visina stabljike, broj stabljika po biljci, broj internodija glavne stabljike, dijametar stabljike, oblik srednje liske i maljavost stabljike, ustanovljena je značajna među-populaciona varijabilnost, a klaster analizom su ispitivani genotipovi grupisani u osam grupa.

Jednu od najvećih kolekcija germplazme crvene deteline ima National Plant Germplasm Systems (NPGS) u Americi sa 85 uzoraka koji čine sržnu kolekciju (Kouamé i Quesenberry, 1993). Klaster analizom ove sržne kolekcije, na osnovu standardizovanih vrednosti 15 morfoloških i fizioloških deskriptora, grupisano je više od 800 analiziranih uzoraka iz 41 zemlje, u tri različite grupe, koje odgovaraju ranostasnim, srednjestasnim i kasnostasnim tipovima. Uspostavljanje sržne kolekcije je značajno sa aspekta olakšanog upravljanja genetičkim resursima i identifikacije agronomski značajnih genotipova, koji bi se mogli koristiti u daljim programima oplemenjivanja.

Rosso i Pagano (2005) su analizirali fenotipski diverzitet 39 uzoraka kolekcije crvene deteline poreklom iz Gen banke Pergamino u Argentini. Istraživanjem je obuhvaćeno 16 populacija koje su sakupljene sa različitih lokaliteta u Argentini, 9 sorti i 14 populacija poreklom iz različitih zemalja sveta. Proučavanjem 14 morfoloških i agronomskih osobina (vegetativna forma rasta, reproduktivna forma rasta, vigor, dužina

liske, širina liske, broj dana do cvjetanja, visina biljke u fazi cvjetanja, prinos zimske i letnje zelene mase, proizvodnja cvasti po biljci, broj grana do cvjetanja, perzistentnost u dve godine, i prinos semena po biljci) utvrđena je značajna fenotipska varijabilnost i izvršeno je grupisanje uzoraka u dva klastera.

Muntean i Tamas (2005) su proučavali varijabilnost morfoloških i fizioloških osobina 45 diploidnih sorti crvene deteline, kao i njihov uticaj na produktivnost i kvalitet krme. U njihovim oplemenjivačkim programima unapređenja morfoloških osobina značajnih za prinos zelene materije, preporučuju se sorte iz centralne i zapadne Evrope (subvar. *intermedium*), zbog ranijeg vremena cvjetanja i dobre sposobnosti regeneracije nakon otkosa. Kasnostasne severno-evropske sorte (var. *serotinum*) su značajne radi povećanja lisne površine i perzistentnosti, dok južno-evropske sorte (subvar. *praecox*) odlikuje dobra otpornost na pepelnicu.

Muntean (2006) je objavio rezultate istraživanja varijabilnosti morfo-fizioloških osobina kod 22 tetraploidne sorte crvene deteline u ogledu postavljenom u Cluj-Napoca. Radi unapređenja morfoloških osobina značajnih za prinos zelene materije, preporučuju se među sortama iz centralne i zapadne Evrope (subvar. *intermedium*) posebno švajcarska sorta Temara, zbog ranijeg vremena cvjetanja i dobre sposobnosti regeneracije nakon otkosa. Kasnostasne severno-evropske sorte (var. *serotinum*) su značajne radi povećanja lisne površine i perzistentnosti.

Boller i sar. (2003) su morfološki i agronomski okarakterisali 20 prvobitnih lokalnih populacija Mattenkleee, koje predstavljaju perzistentnu formu crvene deteline iz Švajcarske. U odnosu na standardnu Mattenkleee sortu Milvus, populacije su bile ranijeg cvjetanja, kraćih stabljika i manjih i više zaobljenih listova, a uz nekoliko izuzetaka i nižih prinosa, slabije perzistentnosti i naročito slabije otpornosti na bolesti. Postojanje značajnih razlika između lokalnih populacija, kao i postojanje najboljih populacija u pogledu prinosa i perzistentnosti, su osnova za iskorišćavanje ovih važnih genetičkih resursa.

Tucak i sar. (2013) izvršili evaluaciju trinaest morfo-agronomskih osobina i osobina kvaliteta kod osam stvorenih oplemenjivačkih populacija i osam stranih sorti u cilju procene prinosa, kvaliteta, morfoloških osobina, i utvrđivanja odnosa proučavanih osobina. Autori su identifikovali tri populacije koje su imale veći prinos zelene mase i suve materije u odnosu na ostale proučavane genotipove, kao i poželjne morfološke

osobine i osobine kvaliteta, te ih preporučuju kao poželjnu germplazmu u daljoj selekciji i programima oplemenjivanja i/ili registrovanju sorti.

Semerikov i sar. (2002) su na osnovu izozimske analize utvrdili jasno odvajanje sedam 7 populacija sa Urala u odnosu na sedam 7 ruskih i dve sorte iz SAD. Uralske populacije su autohtonog, a ne introdukovanog porekla, a da su sve sorte bile istog porekla, verovatno iz zapadne Evrope. Boller i sar. (2010) ističu da je širenje prirodnih populacija crvene deteline bilo nezavisno od pretpostavljenih puteva introdukovanja kultivisanih formi, kao i da su razvoj i širenje kultivisanih formi bili pod slabim uticajem protoka gena iz prirodnih populacija.

Molekularni markeri se mogu grupisati u tri osnovne kategorije (Gupta i sar., 2002): (1) markeri zasnovani na hibridizacijama: RFLP-Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism) (2) PCR markeri: RAPD-Nasumično umnožena polimorfna DNK (engl. Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP-Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (engl. Amplified Fragment Length Polymorphism), Mikrosateliti ili SSR (engl. Simple Sequence Repeat), i (3) markeri zasnovani na čip tehnologiji: SNP-Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism), SFP-Polimorfizmi pojedinačnih osobina (engl. Single Feature Polymorphism), DArTs-Tehnologija diverziteta nizova (engl. Diversity Array Technology).

Molekularni markeri iz prve dve kategorije su u skorije vreme razvijeni kod većine biljnih vrsta, i odnose se na genomsku DNK, a samim tim mogu pripadati ili transkripcionim ili netranskripcionim delovima genoma bez dostupnih informacija o njihovim funkcijama. Ipak, tokom poslednjih nekoliko godina, bilo je moguće razviti markere transkripcionih regiona genoma tj. gena, a označeni su kao funkcionalni markeri (Anderson i Lubberstedt, 2003; Gupta i Rustgi, 2004), genski molekularni markeri (GMMs) (Varshney i sar., 2007) i genski ekspresivni markeri (GEMs) (West i sar., 2006). Razvoj genskih markera je trenutno ograničen na samo određeni broj vrsta, sekvencirajuće tehnologije sledeće generacije, koje su tek od skorijeg vremena dostupne omogućavaju razvoj genskih markera čak i kod vrsta kod kojih još nisu urađene genomske analize (Varshney i sar., 2009).

DNK markeri su značajno poboljšali efikasnost modernog oplemenjivanja usled široke rasprostanjenosti u genomu, pouzdanosti, stabilnosti, nezavisnosti u odnosu na

faktore spoljašnje sredine, i jednostavnosti laboratorijskih tehnika za njihovu primenu. U poređenju sa fenotipskim markerima, DNK markeri mogu biti od velike koristi za brže stvaranje sorti, jer omogućavaju veću pouzdanost, efikasnost i smanjenje troškova (Sørensen i sar., 2007).

Primena DNK markera u oplemenjivanju ima različite ciljeve: genetičku analizu distanci, identifikaciju sorti i kontrolu čistoće semena, kao i marker asistiranu selekciju (MAS), a zasniva se na iskorišćavanju genomskog polimorfizma. Genomski polimorfizam se detektuje između dva definisana genotipa uz pomoć molekularnih markera, a bez poznavanja povezanosti markera sa osobinama ili genima. Koristeći ovu definiciju, genomski polimorfizam ima samo relativnu vrednost u odnosu na rezultate primene markera kod drugih individua. Uprkos tome, takvi markeri, su primenljivi za određeni broj ciljeva usmerenih na kontrolu genomskog sastava genotipova u oplemenjivanju biljaka (Sørensen i sar., 2007).

Molekularni markeri se mogu koristiti da se bolje dokumentuje organizacija genetičkog diverziteta mogućih roditeljskih materijala novih programa oplemenjivanja, da se ubrza razvoj individua koje kombinuju poželjne alele, a markeri mogu da doprinesu predviđanju hibridnih performansi, i da omoguće utvrđivanje različitosti novih sorti pre registrovanja (Charcosset i Gallais, 2002). Neke od ovih primena, kao što su karakterizacija elitnog materijala i marker asistirano povratno ukrštanje Mendelovih osobina ili poželjnih QTL alela sa glavnim efektima, rutinski se koriste u programima oplemenjivanja. Primena marker asistirane selekcije složenih osobina je dobro dokumentovana u teorijskim studijama, a osim toga, ilustrovana je i u objavljenim eksperimentalnim istraživanjima. Većina oplemenjivača se suočava sa situacijom u kojoj mora da odluči da li da investira ili ne u genomiku, ili kako da koristi rezultate genomike, dok je još uvek skeptična oko korišćenja neutralnih markera u selekciji složenih osobina (Charcosset i Moreau, 2004). Dalji korak u razumevanju genetičke arhitekture variranja osobina proizilazi iz programa genomike, zahvaljujući identifikaciji gena i njihovih polimorfizama (Morgante i Salamini, 2003).

Marker asistirana selekcija (MAS) predstavlja pomak od tradicionalne selekcije zasnovane na fenotipu, ka genotipskoj selekciji, i koristi se u programima oplemenjivanja uglavnom radi selekcije alela koji imaju velike efekte na ispoljavanje osobina i relativno jednostavno nasleđivanje (Mohan Jain i Brar, 2010). Ovaj tip

primene molekularnih markera (MAS), obično podrazumeva ograničen broj molekularnih markera koji se koriste za skrining velikog broja uzoraka.

Fingerprinting, omogućava karakterizaciju genotipova i procenu genetičkog srodstva između genotipova. Podaci dobijeni na osnovu fingerprinting su od ključnog značaja za adekvatan odabir roditeljskih genotipova za ukrštanja, naročito pri proizvodnji hibrida, ali takođe i za efikasno iskorišćavanje germplazme kroz praćenje diverziteta genskih pulova (Kolodinska-Brantestam i sar., 2006). Fingerprinting obično podrazumeva ograničen broj uzoraka koji se proučavaju na osnovu velikog broja markera.

Analiza genetičkih distanci je dosta zastupljena i vrlo korisna u programima oplemenjivanja, jer obezbeđuje informacije koje se odnose na korišćenje raspoloživih genetičkih resursa (Vieira i sar., 2007). Mere genetičkih distanci mogu biti zasnovane na fenotipskim osobinama kao i na molekularnim markerima, a glavna statistička analiza koja se koristi u procenama genetičkih distanci je multivarijaciona analiza, koja omogućava praćenje velikog broja varijabli u okviru jedne analize. Upotreba DNK markera u proceni genetičkih distanci unutar i između biljnih vrsta ubrzano se razvija u dvadeset prvom veku, usled mogućnosti skeniranja genetičke informacije sadržane u biljnim genomima. Istraživanja genetičkih distanci, kod bilo koje biljne vrste, sastoje se od šest koraka: i) odabir genotipova koji će se analizirati, ii) dobijanje i sređivanje podataka, iii) odabir distance ili mere koja će se koristiti za procene, iv) selekcija procedure grupisanja koja će se koristiti, v) analiza stepena distorzije (odstupanja) usled korišćenja određenog tipa grupisanja, vi) interpretacija podataka. Rezultati analize će biti efikasni, ako su svi koraci strogo ispoštovani (Bertan i sar., 2007).

SSR (Simple Sequence Repeats)- jednostavni kratki ponovci, ili mikrosateliti čine kratke tandemski ponovljene sekvence od 1-6 bp (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, i heksa-nukleotidni motivi), koje mogu biti umnožene i do nekoliko stotina puta (Xu i sar., 2013). Zbog svoje ponovljive strukture, mikrosateliti su bili mnogo nestabilniji u odnosu na druge sekvence tokom evolucije, i imaju tendenciju mutiranja, naročito u pogledu njihove dužine. Mikrosateliti su veoma dobri genetički markeri, jer pokazuju polimorfizam između srodnih, a i između ne tako srodnih genotipova. Polimorfizam je zasnovan na broju ponovaka, odnosno ukupnoj dužini ponovljene sekvence (Deletić, 2009). Smatra se da se varijabilnost, tj. polimorfizam SSR sekvenci javlja usled

proklizavanja polimeraze tokom DNK replikacije ili usled nejednakog krosingovera (Elmeer i sar., 2011).

SSR markeri su zasnovani na PCR-lančanoj reakciji polimeraze, brojni su, kodominantni i visoko ponovljivi (He i sar., 2009). Broj ponovaka je visoko varijabilan, ali su bočni regioni oko SSR visoko očuvani, i primena SSR markera zahteva poznavanje sekvence koja ograničava mikrosatelit. Na osnovu navedenih konzerviranih sekvenci se dizajniraju prajmeri za PCR, kojima se dati mikrosatelit amplifikuje, da bi se kod različitih jedinki dobili amplikoni različitih dužina (Simonović, 2011). Mikrosatelitske analize zahtevaju malu količinu DNK, mogu se lako automatizovati za potrebe skrininga, a osim toga ovi markeri se mogu razmenjivati između laboratorija, i mogu se koristiti za različite populacije. SSR markeri su često pozicionirani unutar ili u blizini gena kod biljaka. Upoređujući kodirajuće i ne-kodirajuće regione različitih biljnih vrsta, uočeno je da su tri- i tetra-nukleotidni mikrosatelitski motivi češći unutar introna, dok se unutar egzona nalaze druge vrste motiva (Gonçalves-Vidigal i Rubiano, 2011).

Analiza unutar-grupne i među-grupne genetičke varijabilnosti je od fundamentalnog značaja za oplemenjivanje biljaka i konzervaciju germplazme. Navedena primena je naročito važno kod stranooplodnih vrsta kao što je crvena detelina, kod kojih se može ispoljiti inbriding depresija. Usled jako izraženog sistema gametofitske inkompatibilnosti, današnje sorte crvene deteline su uglavnom razvijene primenom masovne selekcije, rekurentne selekcije i prirodne selekcije (Taylor i Smith, 1979; Taylor, 2008). Upotrebljavaju se metode oplemenjivanja kojima se poboljšavaju specifične osobine, pri čemu se zadržava bogat unutar-populacioni genetički diverzitet (Kongkiatngam i sar., 1995; Campos-de-Quiroz i Ortega-Klose, 2001). Oplemenjivački razvoj novih sorti crvene deteline i drugih krmnih leguminoza kao što je lucerka, je veoma spor i dugotrajan proces (Tucak i sar., 2009). Prisutna je nedovoljno istražena genetička varijabilnost prirodnih i lokalnih populacija krmnih vrsta, kao što je crvena detelina, kod koje je prilično rašireno korišćenje lokalnih populacija (Kouame' i Quesenberry, 1993; Dias i sar., 2008).

Neutralni DNK markeri su se pokazali korisnim u detektovanju diverziteta genetičkih resursa, jer omogućavaju precizniju identifikaciju individua nezavisno od delovanja faktora spoljašnje sredine. Neutralnost molekularnih markera korišćenih u

genetici biljaka od kasnih 1980. godina, označava da njihov polimorfizam nije doprinio direktno varijabilnosti, tj. variranju osobina od interesa (Morgante i Salamini, 2003). Danas se koristi značajan broj tehnika zasnovanih na varijabilnosti DNK sekvenci, čime se dopunjuju istraživanja alozimskih metoda (Pagnotta i sar., 2009). Mnogi molekularni markeri su varijabilniji nego proteinski markeri, čime omogućavaju procenu genetičkih razlika između individua i populacija.

RAPD (Williams i sar., 1990, 1993) i AFLP (Vos i sar., 1995) markeri su dosta korišćeni u istraživanjima genetičkog diverziteta, jer ne zahtevaju prethodno poznavanje DNK sekvence, i zato su pogodni kod vrsta kod kojih su nedovoljno poznati molekularni podaci. Istraživanja crvene deteline su uglavnom do sada bila zasnovana na RAPD markerima (Kongkiatngam i sar., 1995, 1996; Campos-de Quiroz i Ortega-Klose, 2001; Ulloa i sar., 2003; Greene i sar., 2004), uprkos slaboj ponovljivosti rezultata primene ovih markera u odnosu na AFLP markere (Kölliker i sar., 2003; Herrmann i sar., 2005). Kongkiatngam i sar. (1995) su koristili RAPD markere u kombinaciji sa izozimima, dok su Mosjidis i Klingler (2006) koristili 10 izozima u analizi genetičke varijabilnosti 81 genotipa crvene deteline. Takođe je stvoren i korišćen određeni broj SSR markera u istraživanjima genetičke varijabilnosti crvene deteline (Kölliker i sar. 2001, 2006; Dias i sar, 2008).

Dosadašnji značaj molekularnih markera, kada je u pitanju vrsta *Trifolium pratense* L., ogleda se i u QTL analizama i dobijanju genetičkih mapa, a sledeći korak bi bila marker asistirana selekcija (MAS), koja bi se zasnivala na dosadašnjim genetičkim mapama. Prva genetička mapa crvene deteline koju su konstruisali Isobe i sar. (2003) sadržavala je 158 RFLP lokusa. Potom je dobijena mapa velike gustine sa 1399 markera, koja je uglavnom bila zasnovana na SSR i RFLP markerima. Takođe je objavljeno preko 26000 EST sekvenci, koje su grupisane u 9339 gena, čime je omogućena dobra osnova za dalja genetička istraživanja crvene deteline. Herrmann i sar. (2006) su opisali gensku mapu zasnovanu na AFLP i SSR markerima. Zainol (2008) je konstruisao mapu sa 72 SSR i 67 AFLP markera, a koja je korišćena za identifikovanje 17 QTL lokusa koji se mogu dovesti u vezu sa vremenom cvetanja, i morfološkim i agronomskim osobinama. Genetička mapa koju su objavili Herrmann i sar. (2006) je korišćena za proučavanje komponenti prinosa semena, i identifikovano je 38 QTL lokusa. Genetičke mape koje su dobili Isobe i sar. (2003), Sato i sar. (2005) i

Herrmann i sar. (2006) su kombinovane sa još tri različite mape i stvorena je integrisana mapa ukupne dužine 836 cM, koja se sastoji od 1804 markera duž sedam hromozoma.

Grljušić i sar. (2008) su evaluirali efikasnost morfoloških i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markera u proceni promena na sortama crvene deteline, koje nastaju usled dejstva prirodne selekcije. Analiza morfoloških osobina je rađena prema protokolu UPOV i US (United States) protokolu o zaštiti i deskripciji sorti, a ispitivane su tri sorte kao i tri grupe vijabilanih klonova tih sorti nakon tri godine prirodne selekcije u brdskom regionu. Razlike između sorti i sortnog materijala, nakon delovanja prirodne selekcije, su uočene na osnovu oba tipa markera (i morfoloških i RAPD), uz zaključak da svaki pristup ima svoje prednosti i ograničenja, i da su oba značajna u procenama genetičke varijabilnosti.

Greene i sar. (2004) su izvršili evaluaciju 15 morfoloških osobina, kao i analizu RAPD varijabilnosti, kod 33 populacije crvene deteline sakupljene sa Kavkaskih planina Rusije, u cilju preporuka o efikasnom sakupljanju, konzervaciji u upotrebi genetičkih resursa. Ovi autori su ustanovili postojanje značajnih razlika za 14 od ukupno 15 morfoloških osobina, kao i grupisanje populacija u tri klastera, što je bilo u saglasnosti sa tri klimatska režima 33 lokaliteta kolekcionisanja crvene deteline.

Pagnotta i sar. (2011) su proučavali genetičku strukturu i diverzitet 16 prirodnih populacija, četirilokalne populacije i dve sorte crvene deteline, na osnovu osam morfo-fizioloških osobina (forma rasta, vreme cvetanja, osustvo pege na listu, dužina stabljike, broj stabljika po biljci, dužina \times širina centralne liske, učestalost belih i svetlo roze cvetova, broj cvetova po cvasti), kao i na osnovu dve AFLP prajmer kombinacije. Rezultati dobijeni na osnovu morfo-fizioloških markera bili su u saglasnosti sa tipom germplazme (lokalne ili prirodne populacije) i njihovim geografskim poreklom, za razliku od rezultata dobijenih na osnovu molekularnih markera.

Herrmann i sar. (2005), kao i Semerikov i sar. (2002) bavili su se proučavanjem porekla i odnosa između različitih kultivisanih formi u odnosu na divlje forme crvene deteline. Na osnovu AFLP molekularnih markera, Herrmann i sar. (2005) su ustanovili jasno razdvajanje između lokalnih populacija i prirodnih, divljih populacija crvene deteline, poreklom iz Švajcarske. Razdvajanje istih lokalnih populacija u odnosu na tradicionalne i unapređene sorte evropskog porekla je bilo teško uočljivo. Ovim radom autori su pokazali da se poreklo švajcarskih Mattenklee lokalnih populacija pre može

dovesti u vezu sa introdukovanim sortama, nego sa prirodnim, divljim populacijama. Naučna očekivanja su da će markeri sve više biti značajni i u procesu registracije sorti i zaštiti prava oplemenjivača (Roldán-Ruiz i sar., 2001). Agronomske osobine, mada pod uticajem ekoloških faktora i sa manje ili više izraženom interakcijom genotip \times sredina, veoma su korisne za procenu genetičkog diverziteta, zato što se u odnosu na molekularne markere mnogo bolje mogu dovesti u vezu sa adaptivnim osobinama, procesima adaptacija i kombinacijama osobina koje definišu ideotip biljke. (Annicchiarico i sar., 2009). Osim toga, karakterizacija i evaluacija germplazme još uvek je zasnovana na morfološko-biološkim i agronomskim osobinama (Andersen and Davies, 1984). Podaci dobijeni primenom molekularnih i morfoloških markera se međusobno nadopunjuju, i zajedno daju jasniju sliku biodiverziteta, koji je na raspolaganju u oplemenjivanju biljaka (Pagnotta i sar., 2005; Crinò i sar., 2008; Dias i sar., 2008).

Oplemenjivanje crvene deteline osim što je usmereno na poboljšanje produktivnih osobina kao što su prinos krme i perzistentnost, otpornosti na biotičke i abiotičke faktore, takođe je orijentisano i na parametre kvaliteta, kao što su sadržaj i stabilnost proteina, sadržaj razgradljivih ugljenih hidrata i svarljivost ćelijskog zida. Sadržaj proteina u brzo osušenom senu crvene deteline je visok (18-24%). Posebno mesto u domenu kvaliteta krme, s aspekta ishrane preživara, zauzima odnos strukturnih i nestrukturnih ugljenih hidrata, i proporcija vlakana je najvažnija odrednica dostupnosti energije stočne hrane.

Preživari imaju sposobnost da konvertuju fibrozni biljni materijal u hranljive materije. Krmne vrste učestvuju velikim delom u ukupnoj suvoj materiji koja se koristi za ishranu u proizvodnim sistemima preživara, i njihova hranljiva vrednost je varijabilnija nego kod koncentrovane hrane. Varijacije u ponudi hranljivih materija preživara su uglavnom vezane za karakteristike krmnih vrsta i potencijal dobrovoljnog unosa (Krizsan i sar., 2012). U aktuelnim problemima ishrane preživara naglašava se korišćenje analiza hranljive vrednosti krme, a neophodna su i nova znanja iz oblasti fiziologije varenja i iskorišćavanja hrane, proizvodnje i pripremanja hrane i tehnika ishrane, uz znatno bolje poznavanje specifičnih osobina i hranljive vrednosti svakog hraniva ponaosob, kao i interakcija koje nastaju među hranivima u obroku (Cilev i sar., 2016). Krmne leguminoze imaju neke jedinstvene prednosti kada je u pitanju

produkcija preživara. U poređenju sa travama ili žitaricama njihove osnovne prednosti su: i) manja upotreba azotnih đubriva ii) visok dobrovoljni unos i produkcija životinja u uslovima kada snadbevanje hranom nije ograničeno, i iii) visok sadržaj proteina (Phelan i sar., 2015).

Svarljivost je jedna od najznačajnijih osobina koja determiniše kvalitet krmnih vrsta. Predstavlja parameter koji označava deo krme koji će biti svaren, odnosno u kojoj meri će se apsorbovati u digestivnom traktu životinja, i obično se izražava i meri kao svarljivost suve materije (Thulin i sar., 2014). Brojni faktori mogu uticati na kompoziciju i hranljivu vrednost krme, a najvažniji činilac jeste faza rasta, tj. stadijum razvika u momentu košenja za ishranu ili konzervisanje. Sa povećanjem starosti biljaka sadržaj proteina i rastvorljivih ugljenih hidrata opada, dok sadržaj vlakana i lignina raste. Lignin ne samo što je nerastvorljiv sam po sebi, već i redukuje svarljivost drugih svarljivih komponenti biljnih ćelija. Prisustvo lignina značajno ograničava biljnu svarljivost (Tich, 2005).

Opadanje hranljive vrednosti trava i leguminoza sa zrelošću nastupa usled smanjenja udela lista, kao svarljivijeg dela biljke (sa većim udelom proteina), i povećanja udela stabljike kao manje svarljivog dela (sa većim udelom vlakana, posebno lignina). Usled toga se smanjuje energetska vrednost hraniva. Sa zrenjem biljke raste ukupan prinos suve materije po jedinici površine, ali njena hranljiva vrednost veoma brzo opada. Najveća hranljiva vrednost suve materije (SM) je u vegetativnoj fazi razvoja biljaka, ali je u toj fazi mali prinos suve materije (Makević i sar., 2004). Nastupanjem reproduktivne faze i početka cvetanja, ukupan prinos SM raste, ali njena svarljivost i iskoristljivost opada. Usled toga se maksimalni prinos svarljive suve materije postiže ranije nego maksimalni prinos ukupne SM. Kod leguminoza se maksimalni prinos svarljive SM ostvaruje u fazi butonizacije (stvaranja pupoljaka).

Ugljeni hidrati su neophodni u ishrani životinja, jer predstavljaju glavni izvor energije i obično čine 70-80% obroka za preživare (Mertens, 1997). Glavne frakcije ugljenih hidrata su smeštene u ćelijskim zidovima biljaka i imaju strukturnu i zaštitnu funkciju. Životinje ne proizvode enzime za varenje ćelijskih zidova, ali su razvile uzajamno korisne odnose sa mikroorganizmima koji su u stanju da to obave. Preživari imaju jedinstven sistem organa za varenje koji im omogućava da maksimalno iskoriste ćelijske zidove biljaka (Marković, 2014). Frakcija ugljenih hidrata u ishrani je

definisana na osnovu hemijskih i enzimskih metoda korišćenih u njihovoj analizi, i dostupnosti za preživare. U širem smislu, ugljeni hidrati su klasifikovani kao nestrukturani, koji se nalaze u unutrašnjosti biljnih ćelija, ili strukturani koji se nalaze u ćelijskim zidovima biljaka, ali ove frakcije nisu hemijski uniformne (Niwińska, 2012).

Nestrukturani ugljeni hidrati se sastoje od šećera i skroba, i nalaze se u protoplastu ćelija (Van Soest, 1968). Glavni deo strukturalnih ugljenih hidrata koji se nalaze u ćelijskim zidovima biljaka, definisan je pomoću koncepta vlakana (Tamminga, 1993). Fibrozna frakcija, tj. frakcija ćelijskih zidova biljaka se sastoji od celuloze, hemiceluloze, lignina i kutina i 98% njenog sadržaja je nesvarljivo (Van Soest, 1985). Vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu (NDF) su materije zidova biljnih ćelija koje čine celuloza, hemiceluloza, lignin, lignifikovani azot, i nerastvorljivi pepeo. Ova frakcija vlakana je samo delimično dostupna životinjama, i ukoliko je njeno prisustvo u nekom hranivu manje, utoliko će životinje isto moći da konzumiraju u većoj količini. Vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu (ADF) su visoko nesvarljive biljne materije koje čine celuloza, lignin i nerastvorljivi pepeo. Ukoliko ih u nekom hranivu ima više, njegova svarljivost će biti niža. Poznavanjem vrednosti za NDF u nekom hranivu postiže se bolja ocena konzumiranja suve materije, dok se sa vrednostima ADF-a dobija realnija ocena *in vivo* svarljivosti (Đorđević i sar., 2003).

4. RADNA HIPOTEZA

Materijal koji je odabran za analizu u ovoj doktorskoj disertaciji, čini 46 sorti i populacija crvene deteline iz regiona i sveta, i očekuje se da će informacije dobijene fenotipskom evaluacijom, pomoću morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog), i analizom agronomski značajnih osobina, poslužiti za sagledavanje divergentnosti genotipova na fenotipskom nivou.

U radu se takođe polazi od pretpostavke da je odabrani materijal crvene deteline dovoljno divergentan u pogledu broja alela na većem broju lokusa. Pretpostavlja se da su morfološki i mikrosatelitski markeri dovoljno polimorfni za diskriminaciju odabranog biljnog materijala po izabranim osobinama. Očekuje se visoki nivo polimorfnosti u analiziranim lokusima, kao i da će grupisanje genotipova crvene deteline biti u saglasnosti sa njihovim poreklom.

Pretpostavka je da će rezultati istraživanja ukazati na efikasnost primene morfoloških i mikrosatelitskih markera u deskripciji i diferencijaciji proučavanih genotipova crvene deteline, proceni diverziteta, i u izboru najperspektivnijih genotipova radi daljeg oplemenjivanja.

5. MATERIJAL I METODE RADA

5.1. Biljni materijal

Biljni materijal koji je korišćen za istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji je činilo 46 sorti i populacija crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) (tabela 1). Celokupni biljni materijal je deo kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Analizirani genotipovi crvene deteline izabrani su tako da budu genetički divergentni, a čine ih diploidni i tetraploidni genotipovi koji potiču iz 17 različitih zemalja sveta, kao i domaće sorte i populacije.

Tabela 1. Nazivi (oznake), poreklo, tip i nivo ploidnosti ispitivanih genotipova crvene deteline (*Trifolium pratense* L)

Oznaka	Genotip	Poreklo	Tip	Nivo ploidnosti
M2	NCPGRU2	Ukrajina	populacija	2n
M3	NCPGRU3	Ukrajina	populacija	2n
M4	NCPGRU4	Ukrajina	populacija	2n
M5	NCPGRU5	Ukrajina	populacija	2n
M23	Violeta	Bolivija	sorta	2n
M24	Nessonas	Grčka	sorta	2n
M44	Mercury	Belgija	sorta	2n
M45	Lemmon	Belgija	sorta	2n
M46	SA1	Australija	populacija	2n
M48	SA3	Australija	populacija	2n
M49	SA4	Australija	populacija	2n
M52	BGR1	Rumunija	populacija	2n
M54	BGR2	Rumunija	populacija	2n
M54	BGR3	Rumunija	populacija	2n
M58	Diana	Hrvatska+Mađarska	sorta	2n
M97	Dicar	Francuska	sorta	4n
M101	Nemaro	Nemačka	sorta	4n
N32	Una	Srbija	sorta	2n
N33	Avala	Srbija	sorta	2n
N23	Marina	Srbija	sorta	2n
N25	Amos	Danska ili Nemačka	sorta	4n
N34	NS-Mlava	Srbija	sorta	2n
N47	Italia centrale	Italija	populacija	2n
N49	Bolognino	Italija	populacija	2n
U1	Marino	Nemačka	sorta	2n
U2	Renova	Švajcarska	sorta	2n
U3	Titus	Nemačka	sorta	4n
U5	Rotra	Belgija	sorta	4n
U7	Kora	Švedska	sorta	2n
U9	Vivi	Švedska	sorta	4n
U10	Lucrum	Nemačka	sorta	2n
U11	Noe	Francuska	sorta	2n

U13	Violetta	Belgija	sorta	2n
U15	Britta	Švedska	sorta	2n
U16	Krano	Danska	sorta	2n
U18	Triton	Nemačka	sorta	4n
U19	Lutea	Nemačka	sorta	2n
U20	Bjorn	Švedska	sorta	2n
E1	Bradlo	Slovačka	populacija	2n
E5	Čortanovci	Srbija	populacija	2n
E16	89 E-0	Bugarska	populacija	2n
E17	91 E-44	Bugarska	populacija	2n
E18	91 E-63	Bugarska	populacija	2n
E25	Sofia52	Bugarska	populacija	2n
E39	Fertody	Mađarska	sorta	2n
E40	Quinekel	Čile	sorta	2n

5.2. Plan ogleđa

Fenotipska karakterizacija odabranog materijala je izvršena na osnovu ogleđa koji je postavljen početkom aprila 2011. godine po potpuno slučajnom blok sistemu u tri ponavljanja (10 biljaka po ponavljanju). Setva odabrane kolekcije crvene deteline je obavljena u kućice na međuredno rastojanje 80×80 cm, i na dubinu od 2,5 cm. Nakon setve, u fazi bokorenja biljaka izvršeno je proređivanje kućice na jednu biljku, nakon čega je tokom jula i avgusta izvršena detaljna evaluacija i karakterizacija 13 ispitivanih osobina (broj internodija, broj grana, dužina stabljike, debljina stabljike, dužina centralne liske, širina centralne liske, prinos zelene mase, prinos suve materije, vreme cvetanja, forma rasta, maljavost stabljike, boja lista i intenzitet obojenosti pege na listu). U toku 2012. godine, na preživelim biljkama matičnjaka iz 2011. godine, nastavljeno je praćenje i merenje 4 agronomske osobine (broj internodija, dužina stabljike, prinos zelene mase i prinos suve materije) i priprema uzoraka za hemijske analize.



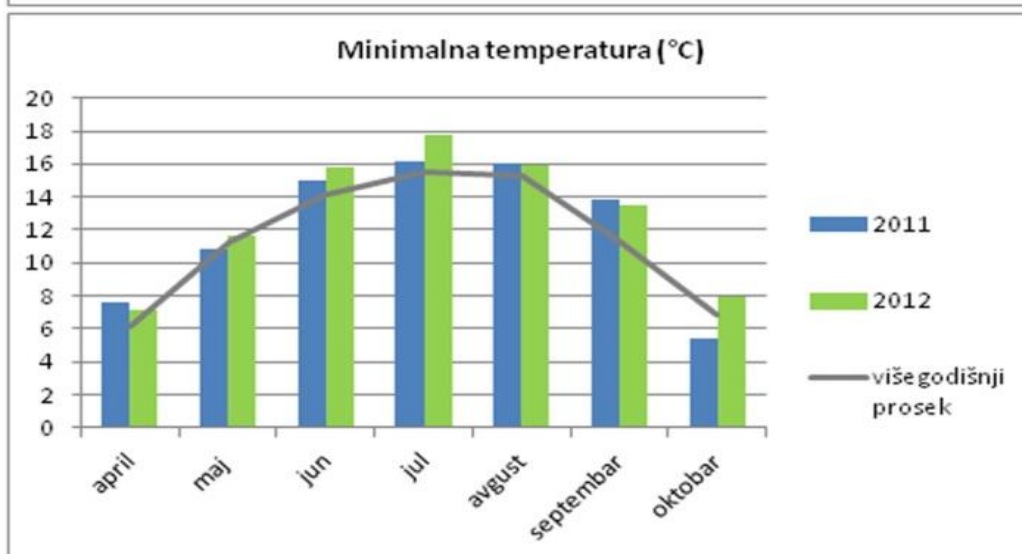
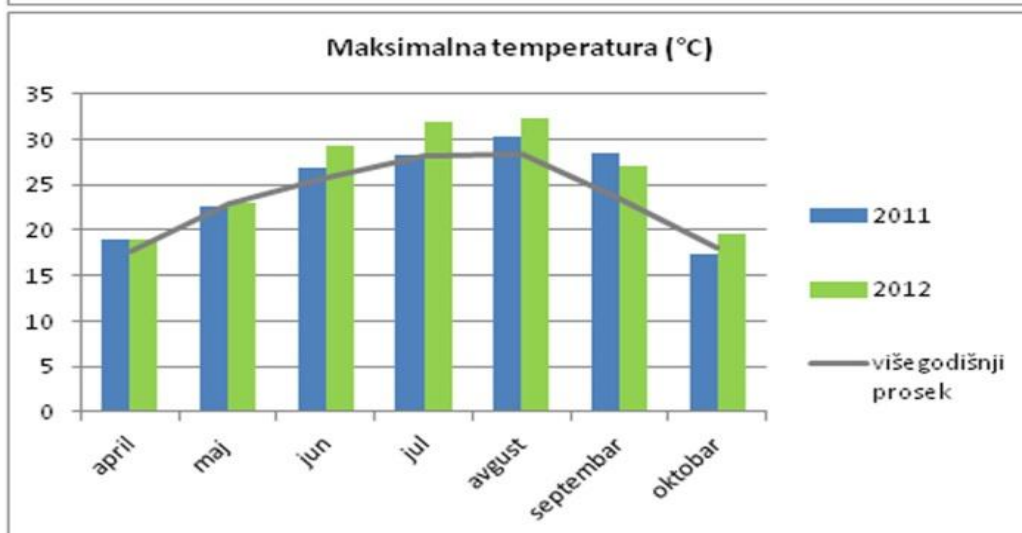
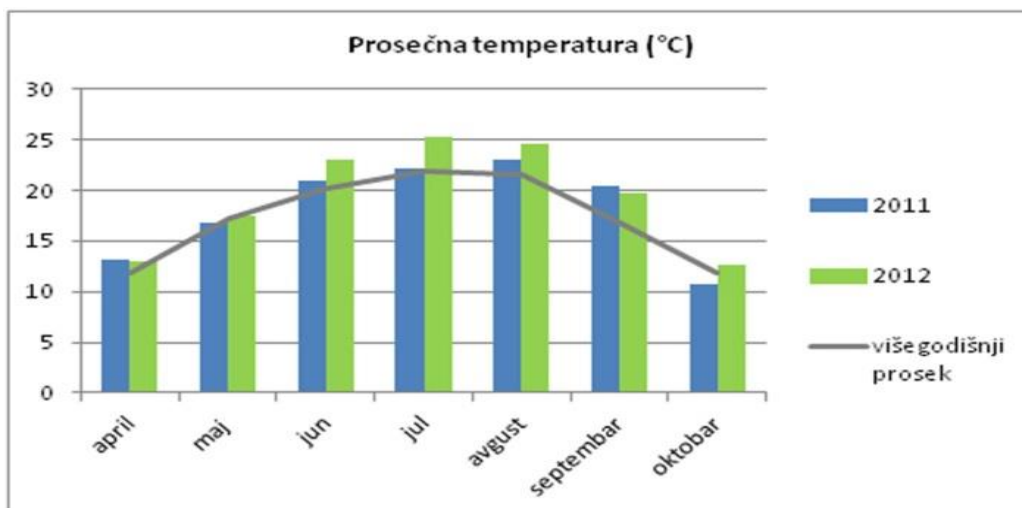
Slika 1. Matičnjak genotipova crvene deteline zasnovan u toku 2011. godine na lokalitetu Rimski Šančevi

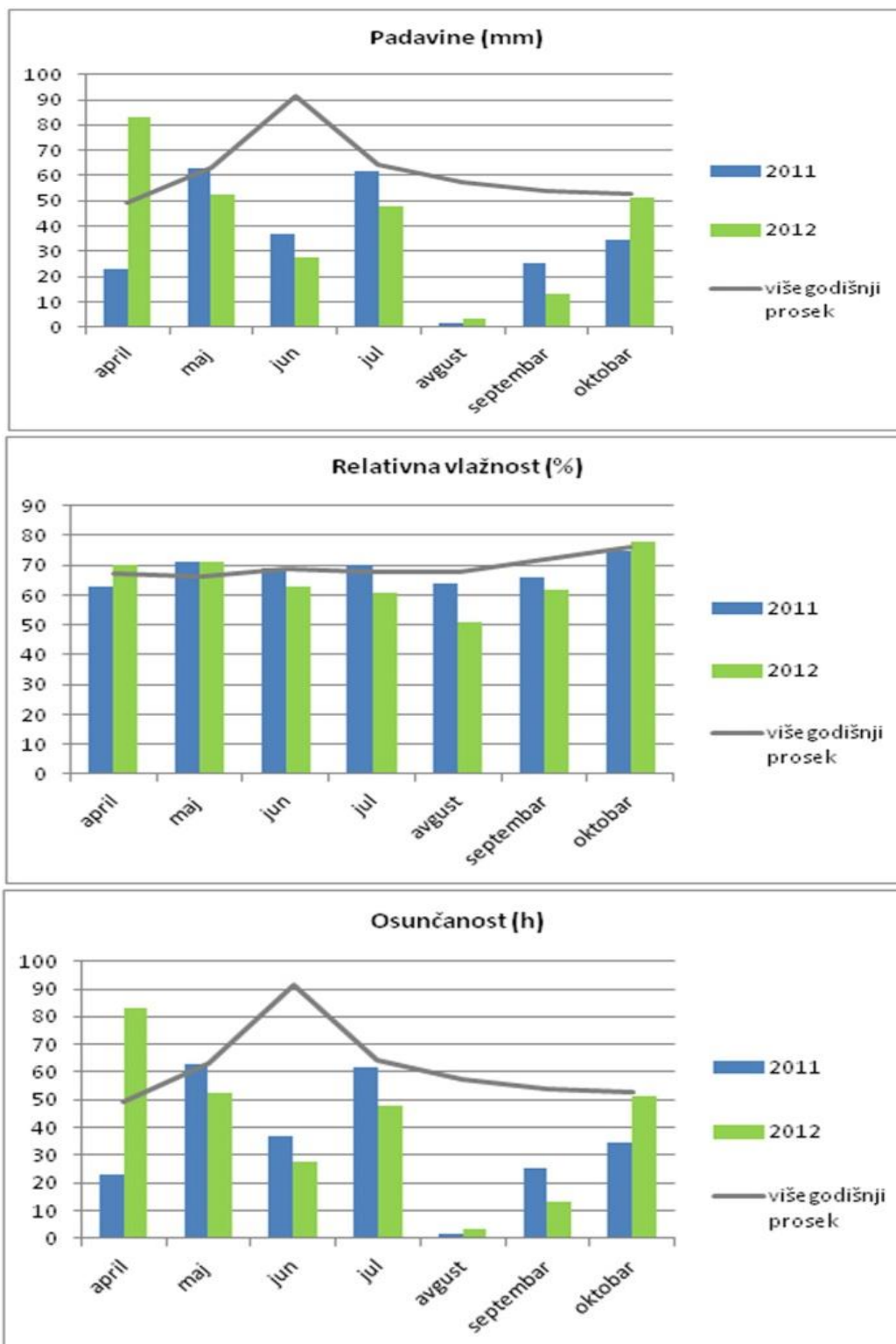


Slika 2. Pojedinačna biljka crvene deteline (levo), rad na grupisanju biljaka prema genotipu (sredina), sušenje i priprema uzoraka za hemijske analize (desno)

5.3. Agroekološki uslovi na ispitivanim lokalitetima

Prema podacima Republičkog Hidrometeorološkog zavoda Srbije, na lokalitetu Rimski Šančevi ($45^{\circ} 20' N$, $19^{\circ} 51' E$, 84 m), u toku vegetacionog perioda od aprila do oktobra 2011. i 2012. godine, zabeležene su prosečne mesečne temperature koje su bile više od višegodišnjeg proseka (osim u oktobru 2011. godine). Maksimalne i minimalne temperature vazduha bile su više od višegodišnjeg proseka, tokom obe godine (osim u oktobru 2011. godine). Ukupna suma količine padavina u vegetacionom periodu 2011. godine bila je manja u odnosu na višegodišnji prosek, a isto važi i za vegetacioni period 2012. godine u odnosu na višegodišnji prosek (osim aprilu 2012. godine). Izraženi deficit padavina bio je u periodu od juna do septembra u obe istraživačke godine, pri čemu u augustu obe istraživačke godine su padavine su bile blizu 0 mm. Relativna vlažnost vazduha bila je generalno niža u odnosu na višegodišnji prosek tokom obe godine, što važi i za osunčanost (osim u aprilu 2012. godine) (grafikon 1). Uočava se da između istraživačkih godina nije postojala značajnija razlika po meteorološkim uslovima, što ima određene prednosti za komparaciju materijala, ali i nedostatke za ocenu interakcije ispitivanog materijala na različite uslove i uočavanje njegove pune varijabilnosti.





Grafikon 1. Prosečne, maksimalne, minimalne vrednosti mesečnih temperatura, količina padavina, relativna vlažnost vazduha i osunčanost, u vegetacionim periodima 2011. i 2012. godine u odnosu na višegodišnji prosek (1981–2010) na lokalitetu Rimski Šančevi

Zemljište na lokalitetu Rimski Šančevi je po tipu černoze sa izuzetno povoljnim pedološkim karakteristikama, koje obezbeđuju optimalne zemljišne uslove za izvođenje ogleđa. U tabeli 2 je dat prikaz hemijskih osobina zemljišta na lokalitetu Rimski Šančevi, na osnovu podataka Laboratorije za zemljište i agroekologiju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Uzorci zemljišta su bili blago alkalne reakcije, sa srednjim sadržajem CaCO₃, slabo humozni, bogati u ukupnom azotu, sa visokim sadržajem lakopristupačnog fosfora i kalijuma.

Tabela 2. Hemijske osobine zemljišta na lokalitetu Rimski Šančevi

Dubina (cm)	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	N (%)	P ₂ O ₅ (mg 100 ⁻¹ g ⁻¹)	K ₂ O (mg 100 ⁻¹ g ⁻¹)	CaCO ₃ (%)	Humus (%)
30	8,25	7,28	0,19	32,4	30,6	2,52	2,58

5.4. Ispitivane morfološke i agronomске osobine genotipova crvene deteline

Morfološka karakterizacija po protokolu UPOV-a (2001) je izvršena za sledeće morfološke osobine:

- forma rasta (FR),
- maljavost stabljike (MS),
- boja lista (BL),
- intenzitet obojenosti pege na listu (IOP),
uključujući i jednu fenološku:
- vreme cvetanja (VC),

Forma rasta je određivana na osnovu vizuelne procene ugla koji formiraju spoljašnji izdanci (grane) i horizontalna podloga, a prema UPOV deskriptoru (2001), pri čemu su mogući sledeći oblici ove osobine:

Forma rasta: - uspravna (erectum)	1
- polu-uspravna (semi-erectum)	3
- srednje uspravna (intermediate)	5
- delimično polegla (semi-prostratum)	7
- polegla (prostratum)	9

Maljavost stabla je posmatrana na trećoj internodiji u odnosu na potpuno razvijeni cvet, na istoj grani na kojoj je merena i dužina stabljike. Ocena maljavosti stabla prema UPOV deskriptoru (2001) vršena je pomoću sledeće skale:

Maljavost stabla:	- veoma slaba	1
	- slaba	3
	- srednja	5
	- velika	7
	- veoma velika	9

Ocena osobine boje lista prema UPOV deskriptoru (2001) vršena je pomoću sledeće skale:

Boja lista:	- svetlo zelena	3
	- srednje zelena	5
	- tamno zelena	7

Osobina intenzitet obojenosti pege na listu ocenjivana je prema UPOV deskriptoru (2001) na gornjoj trećini biljke i to pomoću sledeće skale:

Intenzitet obojenosti pege na listu:	- odsutne ili vrlo slabe	1
	- slabe	3
	- srednje	5
	- jake	7
	- veoma jake	9

Osobina vreme cvetanja određivana je prema UPOV deskriptoru (2001) na sledeći način:

Vreme cvetanja:	- veoma rano	1
	- rano	3
	- srednje	5
	- kasno	7
	-veoma kasno	9

Osim toga merene su i sledeće agronomski značajne osobine osobine:

- broj internodija (BI)
- broj grana (BG)
- dužina stabljike (DUS) (cm)
- debljina stabljike (DES) (cm)
- dužina centralne liske (DCL) (cm)
- širina centralne liske (ŠCL) (cm)
- prinos zelene mase (PZM) (g)
- prinos suve materije (PSM) (g)

Kada su u pitanju agronomske osobine, one su određivane merenjem po 30 pojedinačnih biljaka (10 biljaka po ponavljanju).

5.5. Molekularna analiza genotipova crvene deteline

Ekstrakcija DNK

Procedura ekstrakcije biljne DNK generalno mora obuhvatati korake u kojima se vrši: (i) digestija ćelijskog zida, i oslobađanje ćelijskog sastava mlevenjem tkiva na ledu; (ii) raskidanje ćelijske membrane da bi se DNK oslobodila u ekstrakcionu pufer, pomoću SDS (Sodium dodecyl sulfate) ili (CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) deterdženta; (iii) zaštita DNK od dejstva endogenih nukleaza pomoću EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), koji vezuje Mg^{2+} jone koji su neophodni kofaktori za većinu nukleaza; i (iv) denaturacija i separacija proteina od DNK što se vrši emulgovanjem mešavine tkiva i pufera hloroformom.

Prilikom izolovanja DNK viših biljaka, često su u "prečišćenju" DNK prisutni enzim-inhibirajući polisaharidi. Većina ekstrakcionih metoda koristi skupe i vremenski zahtevne tehnike zasnovane na gradijentu gustine cezijum-hlorida, da bi se eliminisali polisaharidi. Metod za ekstrakciju DNK koji je korišćen u ovom protokolu (Rogers i Bendrich, 1988) je zasnovan na CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) ekstrakcionoj proceduri, a koja omogućava da se izoluje prečišćena DNK visoke molekulske mase (>50 kb), bez korišćenja skupe opreme i/ili dugotrajnih procedura. Osnova separacije polisaharida od nukleinskih kiselina je njihova diferencijalna rastvorljivost u prisustvu CTAB.

Ukupna genomska DNK je izolovana iz listova prema protokolu Rogers i Bendrich (1988).

Rastvori:

2 × CTAB pufer:

- 2% CTAB (w/v)
- 100 mM Tris (pH 8.0)
- 20 mM EDTA (pH 8.0)
- 1.4 M NaCl
- 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) M_r 40 000
- 10% CTAB rastvor:

10% CTAB

- 10% CTAB
- 0.7 M NaCl

CTAB taložni pufer:

- 1 % CTAB
- 50 mM TRIS (pH 8.0)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)

TE pufer:

- 10 mM TRIS (pH 8.0)
- 1 mM EDTA (pH 8.0)
- 1 M NaCl

0.1× TE pufer:

- 1.0 mM Tris (pH 8.0)
- 0.1mM EDTA (pH 8.0)

RNA-aza osnovni rastvor:

1mg/ml RNAze A

100 U/ml RNAze T1 (Rastvor RNA-aza je zagrevan u vodenom kupatilu, najmanje 10 min i da bi se eliminisalo prisustvo DNA-za. Čuvan je u zamrznutom stanju do upotrebe).

Postupak izolovanja DNK:

1. Usitnjen je suvi led u avanu sa tučkom.
2. Usitnjeno je tkivo sa suvim ledom.
3. Tkivo i suvi led su preneti u epruvetu za centrifugu.
4. Dodat je topao (65°C) 2× CTAB pufer u trenutku kada je suvi led sublimirao, tj. prešao iz čvrstog u gasovito stanje,.
5. Dodato je 10-25 µg RNK (tj. tRNK kvasca) koja je imala ulogu nosača u kasnijim koracima taloženja.
6. Dodata je jedna zapremina chloroform/isoamyl alkohol-a (24:1). Sadržaj je potpuno izmešan da bi se dobila emulzija.
7. Centrifugiranje se vršilo u mikrotubi 30 s (na 11000 rpm).
8. Rastvor supernatanta sa vršne (vodene) faze je prebačen u novu mikrotubu, a odbačena je donja (chloroformska) faza.
9. Dodata je 1/10 zapremine 10% CTAB rastvora uz mešanje.
10. Uradjena je ekstrakcija pomoću chloroform/isoamyl alkohol-a (kao u koracima 6-8).
11. Dodata je ista zapremina CTAB taložnog pufera uz pažljivo mešanje.
12. Centrifugiranje je trajalo 10-60 s na 11000 rpm. Odbačen je rastvor supernatanta.
13. Talog je rehidriran u TE puferu.
14. Dodate su dve zapremine hladnog 95% etanola u rastvor uz pažljivo mešanje.
15. Centrifugiranje je vršeno 5-15 min na 11000 rpm. Odbačen je rastvor supernatanta.
16. Dodat je (do prvobitne zapremine) hladni 80% etanol uz centrifugiranje tokom 5 min. Odbačen je rastvor supernatanta.
17. Sušenje je rađeno u desikatoru 20-30 min.
18. Korak rehidratacije vršen je u 0.1×TE.
19. Tretiranje uzorka je vršeno RNA-zom.

Mikrosatelitski markeri

Za molekularnu karakterizaciju 46 genotipova crvene deteline izabran je set od 15 mikrosatelitskih markera, pri čemu se vodilo računa da se odabru markeri prisutni na različitim hromozomima radi pokrivenosti čitavog genoma. Spisak ispitivanih mikrosatelitskih lokusa, njihove pozicije na hromozomima, prajmer sekvence, kao i ponavljajući motivi, navedeni su u tabeli 3. Svi odabrani SSR markeri korišćeni u

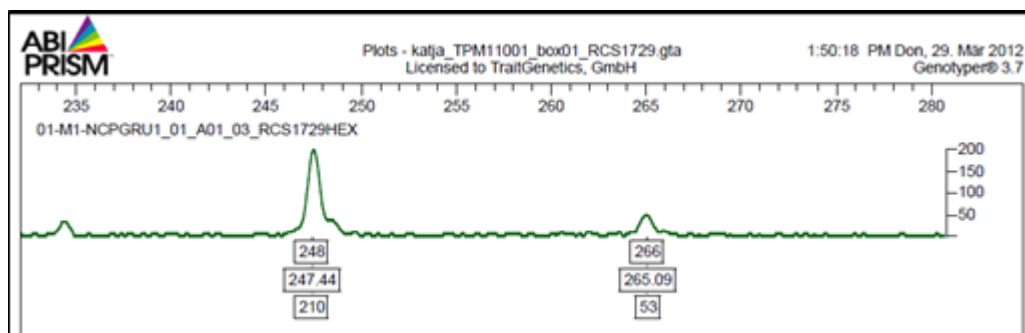
molekulrnoj karakterizaciji 46 genotipova crvene deteline u ovoj disertaciji, kreirani su od strane jedne grupe istraživača (Sato i sar., 2005).

Tabela 3. SSR markeri crvene deteline, hromozomi na kojima se nalaze, sekvence njihovih prajmera i ponovci markera

Marker	Hromozom	Sekvenca levog i desnog prajmera (5'-3' smer)	Motiv
RCS0035	1	CATTGTAGGTTATGTTTATCAGG CCCAAAGCCTACAAGGAAAG	(AC) ₁₈
RCS0453	2	TCGCCACAAGGTCTCTTTTT CGCTCTCTCTCTGCTTCA	(AAG) ₁₅
RCS2860	2	GAAGCAAAGCTGTGAAAGGG GAGAATCTTGAGTGTGTGAAGGTT	(AAT) ₂₁
RCS0078	2	ATTCCCCAATTTCCATCTC TGCCCTGAAACCAAAAATGT	(AG) ₃₂
RCS0894	3	CCTCATCATCAAATTCATTCTCA AGCCAGAACCAGAACCTGAA	(AAG) ₇₀
RCS1667	3	CAGCAATCCAACGTTTCTGA ATCATCACCAGCTTCAGCAC	(AAC) ₁₅
RCS1729	4	ATGGCTTCCTTCTTCACCCT TCGACTGGGAAATCGATAGG	(AAG) ₁₉
RCS2728	4	GTCCATGAAGGCCGAAAATA CAGAGGACCAGGAGGTGAAG	(AAC) ₂₄
RCS1225	5	TGCAAACCTCCGCTTTATGC CTCGCTGAAGGAGGAAACAG	(ATC) ₁₅
RCS3681	5	AAAGCACGTGAAGAAAATGGA CCCTTCATCAATGGCTTTCT	(ATC) ₁₅
RCS0252	6	GGTAGTTTCTGACTTTCCCGTGT TACAAAAGGGACCTGCTGCT	(ATC) ₁₅
RCS0031	6	CCTCCTTGCATCATCTTTTC AAAACCTCGTTCGAGAGAGTG	(AAAG) ₁₉
RCS0428	6	GAATGCCAAGACACCTGTGA TCTCATCAAGGGAGGTGGTC	(ATC) ₁₉
RCS0685	7	TGTTGCTACAAGGCCAAAGA AGCACTTTCGAACACAGCAA	(GGT) ₂₁
RCS0793	7	CGCAATCTTTCTTCTCATTTC TTCAACATGCAGGCTAAGAAAA	(AAG) ₂₀

PCR reakcija i detekcija alela

PCR je izvedena u zapreminama od 10 μ l, koje su sadržavale približno 25-50 ng DNK uzorka, 1 \times PCR pufer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.15 mM svakog prajmera, 0.25 mM dNTPs i 0.3U Taq polimeraze (Applied Biosystems). PCR program je započet denaturacijom od 3 minuta na 94°C, nakon čega je sledilo 45 ciklusa od po 1 minut na 94°C, 1 minut na 55°C, 2 minuta na 72°C i finalni korak ekstenzije je bio na 72°C tokom 7 minuta. Analiza fragmenata je izvršena kao multi-test, analizirajući po dva markera, koji su bili obeleženi različitim ABI-bojama istovremeno. Uzorci koji su sadržavali 0.5-1 μ l PCR produkata svakog markera, 1 μ l standarda i 9 μ l Hi-Di formamida su razdvojeni kapilarnom elektroforezom. Aleli su detektovani pomoću GeneScan/Genotyper® softverskog paketa (Applied Biosystems).



Slika 3. Signali kapilarne elektroforeze na osnovu RSC1729 markera za genotip NCPGR1

5.6. Hemijske analize

Urađene su sledeće hemijske analize:

- sadržaj sirovih proteina (SP);
- vlakna nerastvorljiva u kiselom deterdžentu (ADF-Acid Detergent Fibres) tj. kisela sirova celuloza;
- vlakna nerastvorljiva u neutralnom deterdžentu (NDF - Neutral Detergent Fibres) tj. neutralna sirova celuloza.

Određivanje ukupnog azota

Određivanje ukupnog azota, na osnovu kojeg se određuje koncentracija proteina, vršeno je semimicro-Kjeldahl metodom (Bremner, 1996). Metoda je zasnovana na

razlaganju organske materije sa konc. H_2SO_4 uz katalizator (Se) i destilaciju po Kjeldahl-u sa titracijom nastalog amonijaka sa rastvorom H_2SO_4 (Pantović i sar. 1989). Hemikalije koje su korišćene u postupku analize su: konc. H_2SO_4 , selen u prahu ili tableta za razaranje, 40% NaOH, 5% H_3BO_3 sa mešanim indikatorom i 0,005M H_2SO_4 poznatog faktora. Postupak analize je obuhvatao prelivanje 0,5 g uzorka u epruveti za razaranje sa 6 ml koncentrovane H_2SO_4 i dodavanje 1 tablete za razaranje (katalizator) ili selena. U prethodno zagrejan blok digestora (temp. preko $350^{\circ}C$) ubačena je epruveta sa uzorkom uz dalju inkubaciju od 4h.

Nakon hlađenja, rastvor je preliven u normalni sud, uz temeljno ispiranje kivete sa destilovanom vodom i nakon hlađenja dopunjen je do crte sa destilovanom vodom. Od ovog rastvora odpipetirano je 10 ml u balon za destilaciju, priključena je aparatura, uliveno je 40 ml 40% NaOH i započeta je destilacija. Pre puštanja vodene pare, ispod kondenzatora postavljen je erlenmajer sa 5ml rastvora borne kiseline i mešanog indikatora u koji se hvatao destilat. Nakon predestilovanja oko 50 ml tečnosti, prekinuta je destilacija. Rastvor nastalog amonijum-borata je titriran sa 0.005M H_2SO_4 poznatog faktora, do promene boje iz zelene u ružičastu. Zabeležena je zapremina utrošene kiseline (V). Svaki uzorak je urađen u dva ponavljanja.

$$\text{Izračunavanje: \% sirovih proteina} = \frac{V \times F \times 0,1401 \times 6,25}{\text{odvaga (g)}}$$

Određivanje sadržaja vlakna nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF)

Određivanje sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) je urađeno prema Van Soest P. J. (1963). Hemikalije koje su korišćene u postupku analize su: rastvor kiselog detergenta – ADS (u 1 litar (1N) H_2SO_4 dodato je 20 g cetil-trimetil amonijum bromida), aceton ili etanol i sumporna kiselina, 72%, spec. težine 1,634.

Izmereno je u dva ponavljanja po 2 g vazdušno suvog uzorka samlevenog na promeru sita od 1 mm u balon sa okruglim dnom od 500 ml. Dodato je 100 ml ADS (sobne temperature). Sastavljena je aparatura za refluktovanje i stavljena su oba balona na istu ploču. Zagrevano je 5-10 minuta do ključanja. Smanjena je temperatura grejanja odmah nakon početka ključanja da bi se izbeglo penušanje. Podešeno je da ključanje bude vrlo blago da ne bi došlo do penušanja. Refluktovanje je vršeno 60 minuta od početka ključanja. Nameštena je aparatura za ceđenje pod vakuumom. Uklonjen je

balon sa grejnog tela, promućkan je i napunjen je nuč koji je prethodno tariran. Podešavanje je vršeno tako da vakuum u početku bude nizak, a zatim je po potrebi povećan. Ispiranje uzorka je vršeno u lončiću sa minimumom vrele vode (80-90°C). Nakon isključenja vakuuma, razbijena je pogača uzorka i lončić je napunjen vrelom vodom. Nakon ceđenja, ponovljen je prethodno navedeni postupak. Ispiranje je rađeno dvaput acetonom, a potom cedjenje do suvog stanja. Isto je ponovljeno i sa drugim ponavljanjem. Nakon sušenja lončića na 100°C, vršeno je hlađenje i merenje.

Sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu se izračunava po sledećoj formuli:

$$\text{ADF (\%)} = (A - B) \times 100 / S$$

gde je

A – težina lončića sa talogom

B – težina praznog lončića

S – odvaga (2 g)

Odredjivanje sadržaja vlakna nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF)

Odredjivanje sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF) u biljnom materijalu urađeno je prema Van Soest P.J. i Wine R.H. (1967).

Metoda odredjivanja sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF), predstavlja brzu metodu za određivanje konstituenata ćelijskog zida u biljnom materijalu. Sastoji se u određivanju vlakana nerastvornih u neutralnom deterdžentu i primenljiva je za sva hraniva. Standardizacija metode je bazirana na nutritivnom konceptu, koji definiše celulozu kao nerastvorni deo biljke, nesvarljivog pod uticajem proteolitičkih enzima i neiskoristivog, osim pomoću mikrobiološke fermentacije u digestivnom traktu životinja.

Hemikalije koje su korišćene u postupku analize su: (NDS) rastvor neutralnog detergenta (u 1 l destilovane vode dodato je 30 g Na-lauril sulfata (SDS), 18,61 g dinatrijum dihidrogen etilendiaminotetraacetat dihidrata, p.a., 6,81 g natrijum borat dekahidrata, p.a, 4,56 g dinatrijum hidrogen fosfata, anhidrovanog, p.a., 10 ml etilen glikola, p.a. uz mešanje do rastvaranja, a potom je utvrđeno da se pH nalazi u opsegu 6,9-7,1), aceton ili etanol, p.a. i anhidrovan natrijum sulfit.

Izmereno je u dva ponavljanja po 0,5 g vazdušno suvog uzorka samlevenog na promeru sita od 1 mm u balon sa okruglim dnom od 500 ml. Dodato je po redu: 100 ml NDS (sobne temperature) i 0,5 g natrijum-sulfita. Sastavljena je aparatura za refluktovanje i oba balona su stavljena na istu ploču. Zagrevanje je vršeno 5 do 10 minuta do ključanja. Nakon ključanja smanjeno je zagrevanje da bi se izbeglo penušanje. Podešeno je da ključanje bude vrlo blago da ne bi došlo do penušanja. Od početka ključanja vršeno je refluktovanje 60 minuta. Nameštena je aparatura za cedjenje pod vakuumom. Skinut je balon sa grejnog tela, promućkan i napunjen je nuč-om koji je prethodno tariran. Vakuum je podešen da u početku bude nizak, a zatim je po potrebi povećan. Ispiranje uzorka u lončiću rađeno je sa minimumom vrele vode (80-90°C). Nakon isključenja vakuuma, razbijena je pogača uzorka i lončić je napunjen vrelom vodom. Nakon ceđenja, ponovljen je prethodno navedeni postupak. Ispiranje je rađeno dvaput acetonom, a potom cedjenje do suvog stanja. Isto je ponovljeno i sa drugim ponavljanjem. Nakon sušenja lončića na 100°C, vršeno je hlađenje i merenje.

Sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu je određen primenom formule:

$$\text{NDF (\%)} = 200 \times (A - B)$$

gde je

A = težina lončića sa talogom

B = težina praznog lončića

5.7. Statistička analiza podataka

Analiza morfoloških osobina

Shannonov indeks diverziteta (Shannon i Weaver, 1949) je određen na osnovu vizuelne procene morfoloških osobina (i jedne fenološke) i to na osnovu sledeće formule:

$$H' = -\sum_{i=1}^n -P_i \log_2 P_i$$

gde je n - broj nominalnih kategorija osobine i , P_i - proporcija genotipova u i -toj nominalnoj kategoriji osobine, pri čemu se P_i proporcija određuje na osnovu izraza $P_i = n_i/N_t$. Normalizacijom H' vrednosti, deljenjem sa maksimalnom vrednošću (\bar{X}), dobijene su vrednosti indeksa ekvitabilnosti u intervalu od 0-1 (Perry i McIntosh, 1991), pri čemu veća vrednost indeksa označava i veću raznolikost.

Da bi se utvrdili genetički odnosi između genotipova crvene dateline, morfološke osobine (i jedna fenološka) su obrađene pomoću analize homogenosti (Homogeneity analysis-HOMALS), koja je takođe poznata i kao višestruka korespondentna analiza (Multiple correspondence analysis-MCA). Putem ove analize određen je položaj genotipova crvene deteline u dvodimenzionalnom prostoru, u cilju vizuelizacije različitosti i diskriminacije genotipova na osnovu njihovih merenih morfoloških osobina (i jedne fenološke).

Utvrđivanje udaljenosti genotipova na osnovu morfoloških osobina (i jedne fenološke) je izvršeno na osnovu matrice distanci parova genotipova, koja je konstruisana na osnovu *simple matching* koeficijenta sličnosti (Sokal i Michener, 1958). Dalje je na osnovu matrice morfološke udaljenosti primenom UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic method) metode konstruisan dendrogram.

Analiza agronomskih osobina

U radu su izračunati deskriptivni statistički parametri za sve merene agronomske osobine: prosečna vrednost (\bar{X}), standardna devijacija (σ), minimalna vrednost (Min), maksimalna vrednost (Max), koeficijent fenotipske varijacije CV_f (%). Uz pomoć navedenih parametara sagledana je fenotipska varijabilnost germplazme crvene deteline za proučavane osobine.

Primenjena je jednofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) po potpuno slučajnom blok sistemu, ponaosob za svaku ispitvanu godinu. Model je prikazan kao:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}; \begin{matrix} i = 1, 2, \dots, k \\ j = 1, 2, \dots, n \end{matrix}$$

gde je $i \times j$ broj osnovnih skupova, svaki sa normalnom raspodelom X_{ij} : $N(\mu_{ij}, \sigma^2)$; $i = 1, 2, \dots, k$; $j = 1, 2, \dots, n$. Sa μ je označena opšta sredina, sa μ_i sredina i -tog tretmana i , sa μ_j efekat j -tog bloka, i efekat i -tog tretmana je $\alpha_i = \mu_i - \mu$, a efekat j -tog bloka je $\beta_j = \mu_j - \mu$. Pretpostavka je da je $\sum \alpha_i = 0$ i da je $\sum \beta_j = 0$. Kod ovog modela se pretpostavlja da su uticaji genotipova na posmatrano obeležje nezavisni od uticaja blokova, tj. ne postoji interakcija genotipova i blokova. Ovako definisan model je aditivan.

Testiranje razlika za proseke osobina ispitivanih genotipova izvršeno je Tukey-evim testom. Deskriptivni statistički parametri i Tukey test su urađeni u Excel programu (Microsoft Office 2007 paket).

Dobijene vrednosti agronomskih osobina genotipova poslužile su za izračunavanje Spearman-ovog koeficijenta korelacije rangova (Spearman's rank correlation coefficient). Ovaj tip korelacije predstavlja neparametrijsku meru statističke jačine povezanosti dve varijable i nezavisan je od tipa raspodele promenljivih.

Na osnovu prosečnih vrednosti ispitivanih agronomskih osobina crvene deteline urađena je klaster analiza. U cilju konstrukcije dendrograma, korišćen je UPGMA metod grupisanja zasnovan na Euklidskoj matrici udaljenosti.

Grupisanje genotipova crvene deteline, na osnovu ispitivanih agronomskih osobina je urađeno pomoću analize glavnih komponenata (PCA - Principal Component Analysis). PCA metodom je izvršena redukcija većeg broja promenljivih, na manji broj novih promenljivih (glavne komponente), čime je olakšano razumevanje informacija sadržanih u izmerenim podacima agronomskih osobina. Grafički prikaz rezultata PCA je izvršen pomoću dvodimenzionalnog biplot prikaza (R Core Team, 2015).

Analiza rezultata primene SSR markera

Analiza mikrosatelitskih SSR podataka poslužila je za izračunavanje Dice matrice genetičkih distanci, koja je dalje poslužila kao osnova za analizu glavnih koordinata (PCoA- Principal Coordinate Analysis; sinonim je MDS- Multidimensional Scaling), i grupisanje analiziranih genotipova crvene deteline, na osnovu seta odabranih SSR markera.

Analiza molekularne varijanse (AMOVA)

Primenom analize molekularne varijanse (AMOVA) procenjen je unutupopulacioni i međupopulacioni diverzitet genotipova crvene deteline koji su grupisani na više različitih načina. Testirani su klasteri koji su dobijeni na osnovu analize morfoloških osobina (i jedne fenološke), potom grupe koje su dobijene na osnovu analize agronomskih osobina, klasteri koji su dobijeni na osnovu agronomskih i hemijskih osobina i klasteri formirani na osnovu statusa (sorta ili populacija) i ploidnosti ($2n$ ili $4n$) genotipova crvene deteline.

Saglasnost matrica udaljenosti dobijenih na osnovu morfoloških, agronomskih i molekularnih podataka

Saglasnost matrica udaljenosti dobijenih na osnovu morfoloških (i jednog fenološkog), agronomskih i SSR molekularnih markera testirana je pomoću Mantel testa (Mantel, 1967). Mantel-ovim testom analizirane su korelacije između tri tipa matrica udaljenosti i to konkretno između matrica udaljenosti na osnovu SSR markera i morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog), potom između matrica udaljenosti na osnovu SSR markera i agronomskih osobina, kao i između matrica udaljenosti na osnovu morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog) i agronomskih osobina.

Statistički programi korišćeni za analizu agronomskih osobina, morfoloških i mikrosatelitskih markera

Statistička analiza morfoloških osobina (i jedne fenološke) (određivanje Shannon-ovog indeksa diverziteta, grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu HOMALS analize morfoloških osobina, konstruisanje matrice distanci parova genotipova na osnovu *simple matching* koeficijenta sličnosti, UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic method) hijerarhijski metod klaster analize i konstruisanje dendrograma) i agronomskih osobina (određivanje Spearman-ovog koeficijenta korelacije rangova, konstruisanje matrice distanci parova genotipova na osnovu Euklidskih udaljenosti, UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic method) hijerarhijski metod klaster analize i konstruisanje dendrograma, analiza glavnih komponenata (PCA - Principal Component Analysis)) 46 genotipova crvene deteline je izvršena primenom programa R (R Core Team, 2015). Za statističku analizu SSR molekularnih markera 46 genotipa crvene deteline upotrebljeni su statistički programi za populaciono-genetičke analize: NTSYS (Rohlf, 2009), MEGA (Tamura i sar., 2007), i ARLEQUIN (Excoffier i Lischer, 2010).

REZULTATI I DISKUSIJA

6.1. Morfološki markeri genotipova crvene deteline

6.1.1. Distribucija i diverzitet morfoloških markera

Indeksi diverziteta su matematičke funkcije koje kombinuju bogatstvo ("richness") i ujednačenost ("evenness") uzoračkih podataka. Iako postoje različiti indeksi diverziteta, jedan od najčešće korišćenih je Shannon-ov indeks (H'), takođe označen kao Shannon-Wiener indeks (Colwell, 2009). S obzirom na to da su ovim indeksom objedinjeni bogatstvo, tj. raznovrsnost u broju kategorija ispitivanog uzorka i ujednačenost, tj. relativna učestalost jedinki po kategorijama, vrednosti indeksa će se povećavati sa povećanjem svake od ove dve komponente. Na visoke vrednosti ovog indeksa, dakle, uticaće i broj prisutnih kategorija i ujednačena distribucija uzoraka po kategorijama. Nizak H' indeks ukazuje na neuravnotežene učestalosti kategorija neke osobine i odsustvo genetičkog diverziteta po toj osobini. Vizuelna karakterizacija 46 genotipova crvene deteline na osnovu četiri morfološke i jedne fenološke osobine data je u prilogu 1, a broj, tj. udeo genotipova (%) po kategorijama morfoloških markera (i jednog fenološkog) i vrednosti Shannon-ov indeksa diverziteta (H') za svaki od markera u tabeli 4.

Tabela 4. Deskriptori, kategorije deskriptora i distribucija genotipova po kategorijama deskriptora

Deskriptor	Oznaka deskriptora	Kategorije	Broj genotipova	Udeo genotipova (%)	H'
Vreme cvetanja	VC	1-veoma rano	12	26	0,721
		3-rano	24	52	
		5-srednje	8	17	
		7-kasno	1	2	
		9-veoma kasno	1	2	
	FR	1-uspravna (erectum)	1	2	0,752

Forma rasta		3-polu-uspravna (semi-erectum)	10	22	
		5-srednje uspravna (intermediate)	25	54	
		7-delimično polegla (semi-prostratum)	7	15	
		9-polegla (prostratum)	3	7	
		1-veoma slaba	12	26	
		3-slaba	30	65	
Maljavost stabljike	MS	5-srednja	3	7	0,642
		7-velika	1	2	
		9-veoma velika	0	0	
		3-svetlo zelena	1	2	
Boja lista	BL	5-srednje zelena	23	50	0,712
		7- tamno zelena	22	48	
		1-odsutnost ili vrlo slaba obojenost	15	33	
Intenzitet obojenosti pege na listu	IOP	3-slaba obojenost	23	50	
		5-srednja obojenost	7	15	0,728
		7-jaka obojenost	0	0	
		9-veoma jaka obojenost	1	2	
<i>Prosek</i>					0,711

Među ispitivanim genotipovima crvene deteline, najveći broj genotipova je imao rano cvetanje (52%). Veoma rano cvetanje je bilo prisutno kod 26% genotipova, a srednje rano kod 17%. Najmanja je zastupljenost genotipova sa kasnim (2%) i veoma kasnim cvetanjem (2%). Vrednost Shannon-ovog indeksa diverziteta iznosila je 0,721.

Prema osobini forma rasta, genotipovi su se razdvojili u 5 kategorija pri čemu je dominirala srednje uspravna forma rasta (54%), dok su genotipovi bili neravnomerno raspoređeni po preostalim klasama ovog deskriptora pa je vrednost Shannon-ovog indeksa diverziteta iznosila 0,752.

U pogledu osobine maljavosti stabljike, dominirali su genotipovi sa slabo izraženom (65%) i veoma slabo izraženom osobinom (26%). Srednja i velika maljavost stabljike su bile zastupljene sa po 7% i 2%, dok osobina veoma velike maljavosti nije bila prisutna kod ispitivanih genotipova, što se odrazilo i na vrednost indeksa diverziteta od 0,642.

U ispitivanom setu genotipova crvene deteline samo 2% genotipova je imalo svetlo zelenu boju lista, dok su ostali genotipovi imali srednje zelenu (50%) i tamno zelenu boju lista (48%). Vrednost Shannon-ovog indeksa diverziteta iznosila je 0,712.

Prema intenzitetu obojenosti pege na listu, genotipovi su se svrstali u četiri od ukupno pet mogućih kategorija ovog deskriptora, a jaka obojenost pege na listu nije bila među zastupljenim klasama. Najveća je bila proporcija genotipova sa slabo obojenom pegom na listu 50%, dok je manji broj genotipova imao vrlo slabu obojenost pege (33%), srednju obojenost (15%) i veoma jaku obojenost pege (2%). Vrednost Shannon-ovog indeksa diverziteta iznosila je 0,728.

Indeksi diverziteta za posmatrane deskriptore imali su visoke vrednosti, uglavnom zbog postojanja većeg broja kategorija svake osobine i pored neravnomerne distribucije genotipova kroz te kategorije. Prosečan Shannon-ov indeks diverziteta za četiri posmatrane morfološke osobine i jednu fenološku iznosio je 0,711 i ukazao je na visok nivo varijabilnosti ovih osobina kod ispitivanih genotipova crvene deteline. Osim toga, visok indeks diverziteta navodi na zaključak da su posmatrani deskriptori (vreme cvetanja, forma rasta, maljavost stabljike, boja lista, intenzitet obojenosti pege na listu) korisni markeri, na osnovu kojih se može izvršiti uspešna identifikacija, diferencijacija i razvrstavanje genotipova crvene deteline.

Pagnotta i sar. (2011) su takođe utvrdili značajno ($P < 0,05$) genetičko variranje morfoloških osobina-forme rasta, vremena cvetanja, kao i učestalost biljaka bez pege na listu kod 22 uzorka crvene deteline (16 italijanskih prirodnih populacija, četiri komercijalna ekotipa i dve sorte). Osim toga ustanovili su da je uspravna forma rasta bila prisutna kod ekotipova, sorti i nekoliko prirodnih populacija tipičnih za srednje i

niže nadmorske visina severne Italije, dok je polegla (prostratum) forma rasta i odsustvo pege na listu bilo prisutno kod nekoliko populacija poreklom iz Sardinije. Sve prirodne populacije sakupljene sa pašnjaka su se odlikovale kasnim cvetanjem.

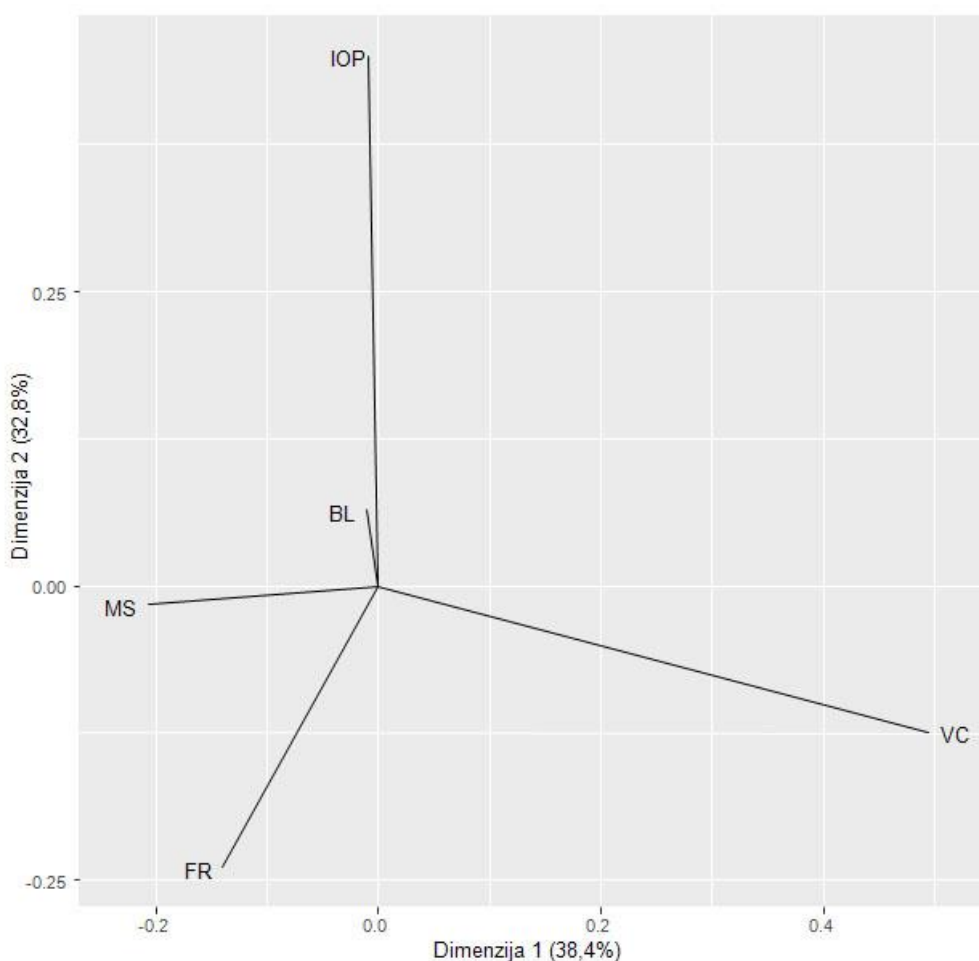
Za razliku od rezultata Pagnotta i sar. (2011), u ovom istraživanju je ustanovljeno da je među sortama dominantno bilo zastupljeno rano vreme cvetanja (68%), a među populacijama veoma rano vreme cvetanja (50%), dok je kasno i veoma kasno vreme cvetanja bilo najmanje zastupljeno, sa po 4% kod sorti, a odsutno kod populacija. Srednje uspravna forma rasta je bila najčešća forma rasta i kod sorti i kod populacija (61% kod sorti i 44% kod populacija), s tom razlikom što se kod sorti uočava trend veće brojnosti genotipova ka uspravnoj formi rasta (29% polu-uspravna i 4% uspravna forma rasta, a svega 7% delimično polegla forma rasta uz odsustvo polegla forme), a kod populacija trend veće brojnosti genotipova ka polegloj formi rasta (28% delimično polegla i 17% polegla forma rasta, a svega 11% polu-uspravna forma, uz odsustvo uspravne forme rasta). Veoma slaba i slaba maljavost stabla je dominirala i kod sorti i kod populacija (kod sorti 86%, a kod populacija 100%), a svetlo zelena boja lista je bila slabo zastupljena i kod sorti i kod populacija (odsustvo kod sorti, a 6% kod populacija). Odsustvo pege lista i slaba obojenost pege lista su bile najčešće prisutne kategorije osobina i kod sorti (78%) i kod populacija (89%), dok jaka obojenost pege lista nije zabeležena ni kod sorti ni kod populacija. Tetraploidi u ovim istraživanjima su se odlikovali odsustvom srednjeg i veoma kasnog vremena cvetanja, odsustvom uspravne i polegla forme rasta, prisustvom slabe i srednje maljavosti stabla, odsustvom svetlo zelene boje lista i odsustvom jako i veoma jako obojene pege lista.

6.1.2. Diskriminaciona moć morfoloških markera

Ukupna vernost prikaza varijabilnosti kategoričkih podataka u obe dimenzije iznosila je 71,2%. Prva dimenzija objasnila je 38,4%, a druga 32,8% ukupne varijabilnosti (grafikon 2). Morfološka osobina maljavost stabljike (MS) i fenološka osobina vreme cvetanja (VC) su osobine sa većom projekcijom vektora na prvu, a manjom projekcijom vektora na drugu osu. Morfološke osobine intenzitet obojenosti pege na listu (IOP) i boja lista (BL), imale su veću projekciju svog vektora na drugu, u odnosu na prvu osu. Prema navodima Malik i sar. (2014) osobine koje najbolje

diferenciraju genotipove i koje su od najvećeg značaja za diverzifikaciju su osobine sa najvećim pozitivnim i negativnim učešćem na osama (Malik i sar., 2014).

Dalje, na osnovu grafikona 2 HOMALS analize, može se uočiti da je vektor morfološke osobine (deskriptora) boja lista (BL), lociran u blizini koordinatnog početka, kratak vektor koji ukazuje na manje variranje ove osobine kod ispitivanih genotipova, pa je to vektor slabe diskriminacione moći. Veća dužina vektora znači i veće variranje određenog deskriptora (morfološke osobine) kod ispitivanih genotipova, a ujedno i njegovu veću diskriminacionu moć. Za osobine maljavost stabljike (MS), vreme cvetanja (VC) i intenzitet obojenosti pege na listu (IOP), koje imaju duže vektore i značajno pozitivno i negativno učešće na osama, možemo reći da otkrivaju veliku varijabilnost i imaju diskriminacionu moć, koje ih stoga čine dobrim morfološkim (fenološkim) markerima.



Grafikon 2. Diskriminaciona moć morfoloških osobina (IOP-intenzitet obojenosti pege na listu; FR-forma rasta; MS-maljavost stabljike; BL-boja lista) i jedne fenološke (VC-vreme cvetanja)

6.1.3. Grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu HOMALS analize morfoloških markera

Analiza homogenosti ("Homogeneity analysis-HOMALS"), poznata i kao višestruka korespodentna analiza ("Multiple correspondence analysis-MCA"), omogućava proučavanje povezanosti većeg broja kvalitativnih varijabli, tj. kategoričkih, nominalnih podataka. Slična je analizi glavnih komponenti PCA ("Principal Component Analysis") koja se koristi za proučavanje kvantitativnih, numeričkih varijabli (Pollet, 2005). U odnosu na korespodentnu analizu ("Correspondence Analysis-CA"), koja se odnosi na dve kategoričke varijable, višestruka korespodentna analiza (MCA) se može posmatrati kao ekstenzija korespodentne analize (CA), koja se primenjuje kada se radi sa većim brojem kategoričkih varijabli (Sourial i sar., 2010). Osnovni ciljevi višestruke korespodentne analize jesu utvrđivanje povezanosti između kategorija varijabli i grupisanje genotipova sa sličnim profilima.

Kada je u pitanju grafički prikaz analize homogenosti, prema Michailidis i De Leeuw (1998), svojstva grafičkog prikaza HOMALS analize su sledeća: kategorije osobina i vrednosti genotipova se mogu prikazati u zajedničkom prostoru; koordinatna tačka neke kategorije je centroid genotipova koji pripadaju toj kategoriji; genotipovi identičnih profila će imati identične vrednosti, a distanca između dva genotipa biće odraz sličnosti njihovih profila; diskriminaciona moć neke osobine biće veća kada je i veća međusobna udaljenost tačaka kategorija te varijable; ako je neka kategorija osobine jedinstvena i javlja se kod samo jednog genotipa, onda će se tačka genotipa i tačka te kategorije osobine podudarati; genotipovi sa jedinstvenim profilima biće udaljeni u odnosu na centar zajedničkog prostora, dok će genotipovi sa profilima koji su slični proseku biti locirani u blizini centra.

Na osnovu HOMALS analize četiri morfološke osobine (i jedne fenološke), prisutne kod 46 genotipova crvene deteline konstruisan je HOMALS grafikon, pri čemu je prvom osom objašnjeno 38,4%, a drugom osom 32,8% ukupne varijabilnosti podataka morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog). Distanca između dva genotipa na grafikonu je odraz sličnosti njihovih profila (Hsieh, 2007). Analizirani genotipovi crvene deteline su na osnovu sličnosti njihovih morfološko-fenoloških profila grupisani u 7 homogenih grupa.

I grupa-genotipovi veoma ranog vremena cvetanja/sa odsutnom do vrlo slabo obojenom pegom lista/ sa slabo maljavim stabljikama i srednje zelenom bojom lista: 91 E-63, 91 E-44, Bradlo, Čortanovci. U pogledu forme rasta genotipovi 91 E-63 i 91 E-44 su bili sa delimično poleglom formom rasta, a genotipovi Bradlo i Čortanovci sa poleglom formom rasta.

II grupa-genotipovi veoma ranog vremena cvetanja/sa slabo obojenom pegom lista (Amos, Fertody, Quinekel, BGR1, SA3, Italia centrale, Sofia52) ili vrlo slabo obojenom pegom lista (Bolognino). Prema boji lista u grupi II su bili zastupljeni genotipovi srednje zelene boje lista (SA3, BGR1 i Quinekel), kao i genotipovi tamno zelene boje lista (Amos, Italia centrale, Sofia52 i Fertody). Među genotipovima druge grupe su na osnovu forme rasta dominirali genotipovi srednje uspravne forme rasta (BGR1, Quinekel, Italia centrale i Fertody), dok su SA3 i Sofia52 bili sa delimično poleglom formom rasta, a Amos sa polu-uspravnom formom rasta.

III grupa-genotipovi ranog vremena cvetanja/sa odsutnom do vrlo slabo obojenom pegom lista (Renova, Nemaro, Noe, SA1, Dicar) ili slabo obojenom pegom lista (89 E-0). Među genotipovima treće grupe bila je prisutna ili srednje zelena boja lista (SA1, Nemaro, Renova, Noe i Quinekel) ili tamno zelena boja lista (Dicar, Sofia52 i Fertody). Kod najvećeg broja genotipova dominirala je srednje uspravna forma rasta (SA1, Nemaro, Noe, Quinekel, Dicar, Fertody), dok je genotip Renova bio sa polu-uspravnom, a genotip Sofia52 sa delimično poleglom formom rasta.

IV grupa-genotipovi srednje ranog vremena cvetanja/sa slabo obojenom pegom lista: NCPGRU3, Rotra, Violetta, Marino, Avala, NS-Mlava, Triton, Lucrum, Una, Violeta. U pogledu forme rasta genotipovi IV grupe su imali srednje uspravnu formu rasta (Violeta, Una, Avala, NS-Mlava, Lucrumi Triton) ili polu-uspravnu formu rasta (NCPGRU3, Marino, Rotra i Violetta). Srednje zelena boja lista bila je prisutna kod genotipova Violetta, Avala, NS-Mlava, Violeta i Triton, dok su tamno zelenu boju lista imali genotipovi NCPGRU3, Marino, Rotra, Una i Lucrum.

V grupa-genotipovi ranog vremena cvetanja/sa srednje obojenom pegom lista/sa srednje maljavim stabljikama i tamno zelenom bojom lista (Diana, Titus, Marina, Nessonas, Mercury, BGR3, Britta). Među genotipovima V grupe dominirala je srednje uspravna forma rasta (Nessonas, Mercury, BGR3, Marina i Britta), dok su genotipovi Diana i Titus bili sa polu-uspravnom formom rasta.

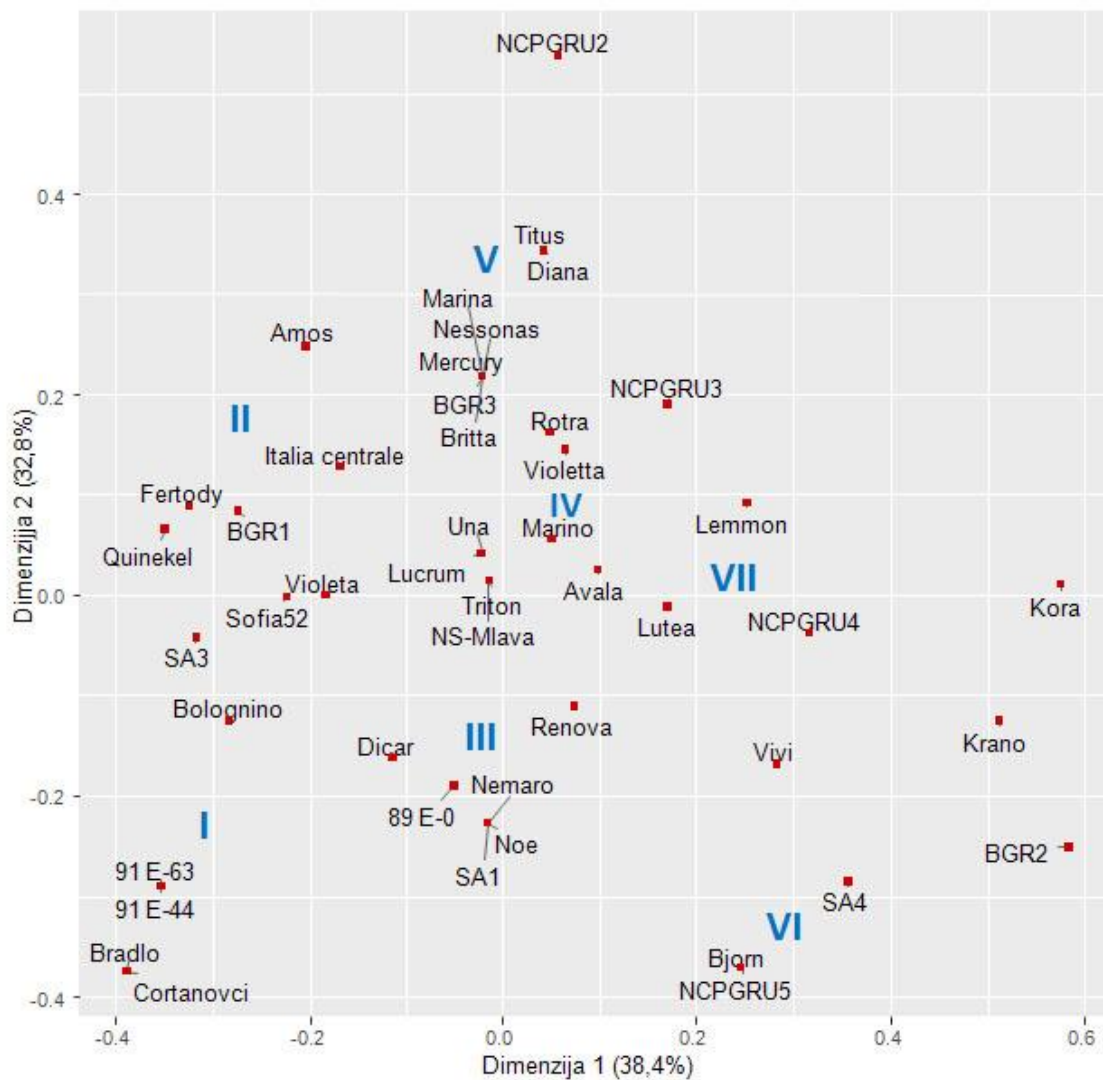
VI grupa-genotipovi veoma kasnog vremena cvetanja/sa srednje obojenom pegom lista/sa veoma slabo maljavim stabljikama i srednje zelenom bojom lista (SA4, NCPGRU5, Bjorn). Genotipovi NCPGRU5 i Bjorn su imali delimično poleglu, a SA4 srednje uspravnu formu rasta.

VII grupa-genotipovi srednje ranog vremena cvetanja/ sa slabo obojenom pegom lista (NCPGRU4, Lemmon, Lutea). NCPGRU4 i Lutea su bili srednje uspravne forme rasta za razliku od genotipa Lemmon koji je imao polu-uspravnu formu rasta. U pogledu boje lista Lemmon i Lutea su se odlikovali tamno zelenom bojom lista, za razliku od genotipa NCPGRU4 koji je imao srednje zelenu boju lista.

Genotipovi sa “jedinstvenim” profilima su oni čije su tačke na grafiku udaljene u odnosu na koordinatni početak (Michailidis i De Leeuw, 1998), a to su genotipovi kod kojih je prisutna određena kategorija morfološke osobine, koja se odnosi isključivo na dati genotip (grafikon 3 i prilog 1). Genotipovi sa “jedinstvenim” profilima su: NCPGRU2 (veoma jako obojena pega lista), Kora (uspravna forma rasta-*erectum* tip), BGR2 (svetlo zelena boja lista), Vivi (kasno vreme cvetanja), Krano (veoma kasno vreme cvetanja). Genotip Violeta iako je jedini sa osobinom velike maljavosti stabljike (prilog 1), nije se vizuelno odvojio od ostalih genotipova, već je svrstan sa genotipovima IV grupe.

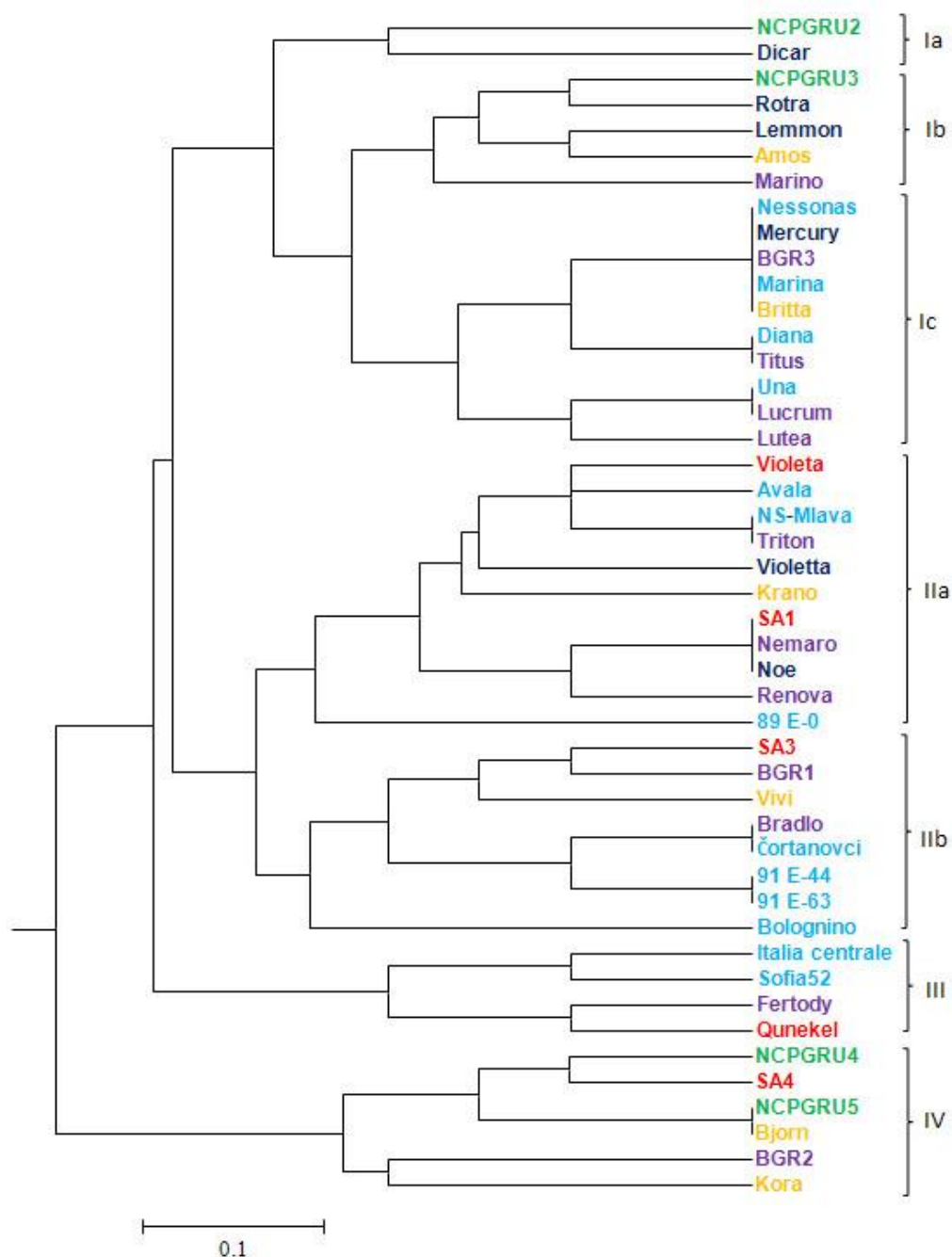
Genotipovi sa profilima sličnim “prosečnom” profilu biće locirani blizu koordinatnog početka (Hsieh, 2007), a to su genotipovi koji imaju veći broj kategorija osobina najučestalijih kategorija. Na grafikonu 3 se u tom smislu uočavaju genotipovi Triton i NS-Mlava, a njihove karakteristike su: rano vreme cvetanja, srednje uspravna (intermediate) forma rasta, slaba maljavost stabljike, srednje zelena boja lista i slaba obojenost pege lista.

Genotipovi identičnih profila će imati identične genotipske ocene (Michailidis i De Leeuw, 1998). Genotipovi sa međusobno identičnim profilima za svih 5 osobina (4 morfološke i jedna fenološka) su: 91 E-44 i 91 E-63, Bradlo i Čortanovci, Una i Lucrum, Triton i NS Mlava, Diana i Titus, NCPGRU5 i Bjorn, potom grupa genotipova Nessonas, Mercury, BGR3, Marina i Britta, i grupa genotipova SA1, Nemaro i Noe (prilog 1).



Grafikon 3. Grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu HOMALS analize morfoloških osobina (i jedne fenološke)

6.1.4. Grupisanje genotipova crvene deteline na osnovu klaster analize morfoloških markera



Grafikon 4. Dendrogram genotipova crvene deteline dobijen klaster analizom četiri morfološke i jedne fenološke osobine primenom UPGMA (oznake genotipova prema geografskom poreklu: crvena-Australija i Južna Amerika; zelena-Istočna Evropa; svetlo plava-Južna Evropa; ljubičasta-Srednja Evropa; žuta-Severna Evropa; tamno plava-Zapadna Evropa)

Metod multivarijacione analize koji se koristi za grupisanje genotipova u grupe, tako da su genotipovi unutar grupe sličniji među sobom, a između grupa znatno različiti, naziva se analiza grupisanja ili klaster analiza (Kovačić, 1998).

U prilogu 2 su date matrice distanci između parova genotipova, izračunate na osnovu "simple matching" koeficijenta sličnosti (Sokal i Michener, 1958) za merene četiri morfološke osobine i jednu fenološku. Najmanja genetička distanca je iznosila 0 i bila je prisutna kod većeg broja parova genotipova, dok je najveća utvrđena vrednost distance iznosila 1,000 i takođe je bila prisutna kod većeg broja parova genotipova. Prosečna genetička udaljenost svih parova genotipova iznosila je 0,587.

Na osnovu klaster analize, primenom UPGMA ("Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic Method") metode grupisanja, svi genotipovi crvene deteline svrstani su u četiri grupe (grafikon 4), prevashodno na osnovu kombinacija kategorija dve osobine (vreme cvetanja i boja lista).

U I klasteru bili su zastupljeni genotipovi tamno zelene boje lista i srednje ranog vremena cvetanja (NCPGRU2, Dicar, NCPGRU3, Rotra, Marino, Nessonas, Mercury, BGR3, Marina, Britta, Diana, Titus, Una, Lucrum). Ovom klasteru pripadaju još tri genotipa koji iako su imali tamno zelenu boju lista, su bili srednje ranog vremena cvetanja (Lemmon i Lutea) i veoma ranog vremena cvetanja (Amos). Genotipovi I klastera su se još razdvojili na osnovu forme rasta na dva jasno uočljiva sub-klastera: Ib sa polu-uspravnim formom rasta (NCPGRU3, Rotra, Lemmon, Amos, Marino), i Ic sa srednje uspravnim formom rasta (Nessonas, Mercury, BGR3, Marina, Britta, Una, Lucrum, Lutea sa izuzetkom Diana i Titus koji su imali polu-uspravnu formu rasta), dok se treći sub-klaster Ia, sa samo dva genotipa (NCPGRU2, Dicar), izdvojio na osnovu osobine obojenosti pege lista.

U II klasteru su se grupisali genotipovi srednje zelene boje lista, a koji su po vremenu cvetanja bili podeljeni na sub-klaster: IIa ranog vremena cvetanja (Violeta, Avala, NS-Mlava, Triton, Violetta, SA1, Nemaro, Noe, Renova, 89 E-0, sa izuzetkom Krano koji je imao veoma kasno vreme cvetanja) i IIb veoma ranog vremena cvetanja (SA3, BGR1, Bradlo, Čortanovci, 91 E-44, 91 E-63, Bolognino, sa izuzetkom genotipa Vivi koji je imao kasno vreme cvetanja).

III klasteru pripadaju genotipovi tamno zelene boje lista i veoma ranog vremena cvetanja (Italia centrale, Sofia52, Fertody, sa izuzetkom Quinekel, koji iako je imao

veoma rano cvetanje, imao je srednje zelenu boju lista). Svi genotipovi ovog klastera su bili sa slabo obojenom pegom lista.

U IV klasteru su se grupisali genotipovi srednje zelene boje lista i srednje ranog vremena cvetanja (NCPGRU4, SA4, NCPGRU5, Bjorn, sa izuzetkom BGR2 i Kora, koji iako su imali srednje rano vreme cvetanja, odstupali su po boji lista i to BGR2- svetlo zelena boja lista i Kora- tamno zelena boja lista) Svi genotipovi ovog klastera bili su sa veoma slabo maljavom stabljikom.

Na osnovu klaster analize morfoloških osobina (i jedne fenološke) 46 genotipova crvene deteline, može se uočiti da grupisanje genotipova crvene deteline nije bilo u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom. Većina genotipova se nije jasno grupisala u sub-klaster prema regionu porekla. Analizom homogenosti se takođe grupisanje genotipova na osnovu morfološke varijabilnosti nije moglo dovesti u vezu sa njihovim geografskim poreklom.

Uočava se da je grupisanje genotipova pomoću HOMALS analize bilo različito u odnosu na grupisanje genotipova crvene deteline primenom hijerarhijske UPGMA klaster analize. Dobijena neusaglašenost grupisanja je posledica različitosti samih metoda, koje su primenjene pri analizi istih podataka o vrednostima morfoloških osobina (i jedne fenotipske) proučavanih genotipova crvene deteline.

Analizom homogenosti izvršeno je grupisanje genotipova na sedam umereno homogenih grupa i to na osnovu osobina vremena cvetanja, intenziteta obojenosti pege lista i donekle na osnovu osobine maljavosti stabljike. UPGMA klaster analizom je izvršeno grupisanje genotipova na osnovu vremena cvetanja i boje lista (uz izvestan doprinos i ostalih osobina), na četiri klastera, pri čemu su prvi i drugi klaster imali po dva sub-klastera. Ono što je zajedničko je da je kod oba primenjena metoda vreme cvetanja bilo osnovna diskriminaciona osobina. Kod analize homogenosti jasno je istaknut značaj diskriminacionih osobina koje u najvećoj meri doprinose razlikovanju genotipova, dok kod UPGMA klaster analize, to nije slučaj. Na UPGMA dendrogramu postoje izuzeci, tj. genotipovi koji su se svrstavali u određene klastera, iako su se kod njih javila odstupanja u odnosu na osnovne diskriminacione osobine (vreme cvetanja i boja lista), jer je u njihovom grupisanju bio značajan doprinos drugih osobina. Dalje, HOMALS analiza je omogućila da se jasno izdvoje oni genotipovi koji su bili sa jedinstvenim profilima u odnosu na homogene grupe, dok su se takvi genotipovi

svrstavali u klastere sa drugim genotipovima i nisu bili jasno uočljivi pri primeni UPGMA klaster metode. Zbog svega navedenog moglo bi se tvrditi da je HOMALS metoda informativnija i da je jasnije prikazala morfološku varijabilnost ispitivanog materijala.

Proučavajući vreme cvetanja, visinu biljke, broj internodija glavnog stabla, debljinu stabljike, oblik centralne liske i maljavost stabla prema UPOV deskriptoru (2001), Ascii (2011) je na osnovu toga izvršio grupisanje genotipova u osam klastera. Greene i sar. (2004) su proučavali 33 divlje populacije crvene deteline na osnovu 15 morfoloških osobina i ustanovili su da su se populacije grupisale u tri klastera na osnovu osobina vremena cvetanja i perzistentnosti. Rosso i Paggano (2005) su proučavali sorte i odomaćene populacije crvene deteline na osnovu 14 morfoloških osobina i ukazali su na to da su prinos, vreme cvetanja i prinos semena od najvećeg značaja u objašnjenju genetičkog variranja proučavanih populacija. Dias i sar. (2008) su analizirali 58 genotipova na osnovu 21 morfološke i agronomske osobine, pri čemu su ustanovili povezanost velikog broja cvasti (intenzivnog cvetanja) i slabe perzistentnosti. Svi genotipovi su se razdvojili u pet klastera, uglavnom na osnovu vremena cvetanja, perzistentnosti, prinosa suve materije i forme rasta.

6.2. Agronomske osobine genotipova crvene deteline

6.2.1. Analiza varijanse

Jednofaktorskom analizom varijanse ustanovljeno je da uticaj blokova nije bio značajan, a da je uticaj genotipova na varijabilnost posmatranih agronomskih osobina bio statistički visoko značajan, za obe ispitivane godine.

Tabela 5. Jednofaktorska analiza varijanse agronomskih osobina crvene deteline u 2011. godini

Osobina	Blok		Genotip	
	F	P	F	P
BI	0,73	0,4856	7,04	< 0,0001
BG	0,40	0,6695	5,61	< 0,0001
DUS	1,26	0,2873	6,91	< 0,0001
DES	0,72	0,4916	4,38	< 0,0001
DCL	1,30	0,2768	5,94	< 0,0001
ŠCL	0,20	0,8185	4,82	< 0,0001
PZM	0,77	0,4657	3,92	< 0,0001
PSM	0,95	0,3893	2,90	< 0,0001

(BI-broj internodija; BG-broj grana; DUS-dužina stabljike; DES-debljina stabljike; DCL-dužina centralne liske; ŠCL-širina centralne liske; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije)

Tabela 6. Jednofaktorska analiza varijanse agronomskih osobina crvene deteline u 2012. godini

Osobina	Blok		Genotip	
	F	P	F	P
BI	0,38	0,6875	6,83	< 0,0001
DUS	0,01	0,9924	5,81	< 0,0001
PZM	0,93	0,3998	5,56	< 0,0001
PSM	1,16	0,3182	4,40	< 0,0001

(BI-broj internodija; DUS-dužina stabljike; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije)

6.2.2. Vrednosti agronomskih osobina i deskriptivni statistički parametri

U tabeli 7 predstavljene su prosečne vrednosti agronomskih osobina (opšti prosek, min i max vrednosti, standardna devijacija (σ) i koeficijent varijacije (CV) za 46 genotipova crvene deteline za 2011. godinu.

Tabela 7. Prosečne vrednosti agronomskih osobina 46 genotipova crvene deteline, deskriptivni statistički parametri, i značajnost razlika srednjih vrednosti na osnovu Tukey testa u 2011. godini

Genotip	BI	BG	DUS	DES	DCL	ŠCL	PZM	PSM
NCPGRU2	5,45 ^{cl}	4,13 ^{efik}	61,10 ^{ab}	3,91 ^{befgh}	40,10 ^a	19,63 ^b	319,00 ^a	60,43 ^a
NCPGRU3	5,86 ^{bcefg}	4,67 ^{bceg}	41,27 ^{efhikmno}	2,63 ^{mno}	22,67 ^{pq}	10,83 ^{jk}	141,67 ^{dehjm}	36,83 ^{bdfgjm}
NCPGRU4	5,13 ^{fiklno}	4,07 ^{eik}	38,60 ^{hip}	2,47 ^{no}	22,67 ^{pq}	10,77 ^{jk}	191,00 ^{bei}	51,47 ^{ad}
NCPGRU5	5,88 ^{bcefh}	4,23 ^{cik}	56,50 ^{bc}	3,51 ^{hikl}	31,20 ^{efjkm}	15,23 ^{cdefh}	230,33 ^{bc}	49,33 ^{acd}
Violeta	4,87 ^{ijklmno}	3,90 ^{ghijk}	36,00 ^{lmp}	4,01 ^{cdefgh}	32,90 ^{cdefi}	14,70 ^{deg}	86,00 ^{kmop}	32,17 ^{ghn}
Nessonas	4,67 ^{lmop}	3,67 ^{jkl}	36,70 ^{jkp}	3,42 ^{hilm}	29,03 ^{hikno}	13,07 ^{ghij}	88,67 ^{fmop}	22,60 ^{lmn}
Mercury	4,89 ^{gijklmno}	3,90 ^{ghijk}	36,10 ^{lmp}	3,85 ^{efhl}	27,23 ^{jnop}	12,40 ^{ghij}	138,00 ^{dehmn}	36,47 ^{defgjm}
Lemmon	4,95 ^{hijklmno}	3,97 ^{dgijk}	38,30 ^{hip}	3,95 ^{cdefgh}	27,60 ^{knop}	14,40 ^{deg}	101,00 ^{lmop}	27,43 ^{ikmn}
SA1	4,87 ^{ijklmno}	3,70 ^{jkl}	43,27 ^{efhikl}	3,30 ^{hn}	28,70 ^{hikno}	15,03 ^{dei}	118,67 ^{ilmop}	36,43 ^{defgjm}
SA3	3,87 ^p	2,83 ^l	37,63 ^{gkp}	3,48 ^{hiklm}	38,33 ^{ab}	23,40 ^a	106,00 ^{lmop}	35,80 ^{defgmo}
SA4	4,83 ^{ilmop}	4,07 ^{eik}	39,87 ^{hip}	3,45 ^{hilm}	34,77 ^{bcdef}	16,83 ^{be}	142,67 ^{dehjm}	43,40 ^{adfgi}
BGR1	8,00 ^a	6,60 ^a	59,00 ^{ab}	4,11 ^{ah}	26,60 ^{lmnq}	16,20 ^{cdef}	112,00 ^{ilmop}	34,10 ^{den}
BGR2	8,10 ^a	4,73 ^{bceg}	59,03 ^{ab}	3,68 ^{hikl}	31,13 ^{efjkl}	16,30 ^{def}	69,67 ^{jnop}	24,17 ^{kmn}
BGR3	8,53 ^a	7,47 ^a	65,27 ^a	4,79 ^{ad}	27,23 ^{jnop}	14,63 ^{deg}	120,67 ^{eo}	40,23 ^{bdfgkl}
Diana	5,24 ^{bikl}	4,23 ^{cik}	41,27 ^{efhikmno}	3,86 ^{efhl}	28,13 ^{ikno}	13,67 ^{fgik}	101,67 ^{lmop}	26,90 ^{ikmn}
Dicar	4,93 ^{hijklmno}	3,90 ^{ghijk}	39,40 ^{hip}	4,94 ^a	30,43 ^{fgjkl}	16,70 ^{be}	120,33 ^{ilmo}	30,53 ^{gn}
Nemaro	4,69 ^{lmop}	3,63 ^{jkl}	33,40 ^{np}	3,73 ^{fh}	26,20 ^{lnq}	12,20 ^{gij}	74,67 ^{hop}	20,77 ^{mn}
Una	5,91 ^{bcefh}	4,90 ^{bede}	49,13 ^{cde}	3,55 ^{hikl}	32,00 ^{cdefjk}	13,27 ^{cgij}	155,33 ^{cdem}	43,40 ^{adfgi}
Avala	4,77 ^{lmop}	3,80 ^{gijk}	41,77 ^{efhikmo}	3,85 ^{efhl}	32,73 ^{cdefi}	14,47 ^{deg}	117,00 ^{ilmop}	32,30 ^{cg}
Marina	5,10 ^{fiklno}	4,07 ^{eik}	45,27 ^{efghi}	4,03 ^{cdefgh}	32,90 ^{cdefi}	15,27 ^{cdefh}	143,67 ^{dehjm}	37,20 ^{bdfgm}
Amos	5,81 ^{bcej}	4,80 ^{bedeh}	44,40 ^{efhik}	4,74 ^{abc}	31,80 ^{defjk}	16,27 ^{cdef}	208,33 ^{bd}	50,87 ^{acd}
NS-Mlava	5,51 ^{bcefm}	4,50 ^{bcej}	45,63 ^{dgi}	3,79 ^{efhl}	33,53 ^{bcefh}	14,47 ^{deg}	168,33 ^{cedgl}	46,13 ^{adfg}
Italia								
centrale	5,33 ^{cil}	4,30 ^{cik}	40,23 ^{fhip}	3,82 ^{efhl}	26,77 ^{lmnq}	13,03 ^{ghij}	175,33 ^{edel}	46,70 ^{adg}
Bolognino	5,37 ^{cl}	4,33 ^{bk}	39,40 ^{hip}	3,93 ^{cefgh}	25,03 ^{oq}	12,30 ^{ghij}	151,00 ^{cdehm}	39,67 ^{bdfgkl}
Marino	5,31 ^{cil}	4,30 ^{cik}	38,23 ^{ip}	3,81 ^{efhl}	25,30 ^{nq}	11,90 ^{gj}	80,33 ^{mop}	23,00 ^{lmn}
Renova	4,37 ^{ip}	3,37 ^{il}	33,67 ^{op}	3,43 ^{hilm}	25,07 ^{oq}	10,83 ^{jk}	47,67 ^{op}	16,77 ⁿ
Titus	5,29 ^{cikl}	4,30 ^{cik}	40,33 ^{fhip}	4,30 ^{afi}	31,00 ^{efjkl}	13,97 ^{eg}	92,67 ^{gmop}	25,70 ^{ikmn}
Rotra	5,24 ^{bikln}	4,10 ^{efik}	37,90 ^{gkp}	4,54 ^{af}	30,80 ^{efjkl}	14,30 ^{deg}	97,00 ^{lmop}	26,23 ^{ikmn}
Kora	6,00 ^{bef}	5,00 ^{bee}	48,00 ^{df}	4,00 ^{cdefgh}	36,23 ^{ad}	14,63 ^{deg}	200,00 ^{be}	55,47 ^{ab}
Vivi	5,97 ^{bedf}	4,90 ^{bede}	44,97 ^{efghi}	4,78 ^{ac}	32,43 ^{cdefk}	14,47 ^{deg}	118,33 ^{ilmop}	41,90 ^{adfgk}
Lucrum	5,57 ^{bcefm}	4,53 ^{bcej}	41,90 ^{efhikm}	4,22 ^{afij}	31,97 ^{defjk}	13,50 ^{fgij}	101,33 ^{lmop}	30,63 ^{gn}
Noe	4,90 ^{eijklmno}	3,90 ^{ghijk}	38,80 ^{hip}	3,86 ^{efhl}	30,00 ^{fno}	12,47 ^{ghij}	102,00 ^{lmop}	31,87 ^{ghn}
Violetta	5,13 ^{fiklno}	4,13 ^{efik}	42,53 ^{efhikm}	3,87 ^{efhl}	32,40 ^{cdefk}	13,30 ^{fgij}	102,33 ^{ilmop}	33,57 ^{den}
Britta	4,50 ^{lop}	3,50 ^{kl}	46,40 ^{dh}	4,31 ^{afi}	35,60 ^{ae}	17,00 ^{bd}	112,67 ^{ilmop}	33,10 ^{dn}
Krano	5,00 ^{dhijklmno}	4,00 ^{dgijk}	32,67 ^p	4,60 ^{ae}	33,50 ^{bcefh}	16,77 ^{be}	97,33 ^{lmop}	30,37 ^{gn}
Triton	5,96 ^{bedf}	4,97 ^{bce}	46,03 ^{di}	4,95 ^a	30,10 ^{fgn}	14,57 ^{deg}	260,00 ^{ab}	52,10 ^{abe}
Lutea	4,48 ^{lp}	3,47 ^{kl}	34,60 ^{mp}	3,48 ^{hiklm}	34,43 ^{bedef}	15,17 ^{dei}	99,33 ^{ilmop}	27,77 ^{fn}
Bjorn	5,87 ^{bcefg}	5,03 ^{bef}	36,43 ^{kp}	1,93 ^o	21,97 ^q	10,60 ^j	91,33 ^{gmop}	30,17 ^{gn}
Bradlo	6,17 ^{bc}	5,17 ^{bc}	40,00 ^{fhip}	4,03 ^{cdefgh}	27,53 ^{knop}	12,20 ^{gij}	77,67 ^{mop}	30,67 ^{ghn}
Čortanovci	4,62 ^{lmop}	3,63 ^{jkl}	40,03 ^{fhip}	3,03 ^{ln}	27,57 ^{knop}	13,07 ^{ghij}	40,33 ^p	17,33 ^{no}
89 E-0	5,50 ^{bcefm}	4,50 ^{bcej}	43,50 ^{efhikl}	3,05 ^{ln}	22,10 ^q	13,60 ^{fgij}	60,00 ^{nop}	19,10 ^{mn}

91 E-44	4,30 ^{kp}	3,47 ^{kl}	37,60 ^{gkp}	3,50 ^{hikl}	29,23 ^{hikno}	15,13 ^{dei}	61,33 ^{nop}	19,57 ^{mn}
91 E-63	4,25 ^{np}	3,37 ^{il}	33,73 ^{op}	3,20 ^{gln}	26,37 ^{lmnq}	13,43 ^{fgij}	56,00 ^{op}	18,27 ^{jno}
Sofia52	5,48 ^{bco}	4,50 ^{bcej}	45,43 ^{efghi}	4,60 ^{ae}	36,97 ^{ac}	17,03 ^{bd}	168,00 ^{cdefgl}	51,20 ^{ad}
Fertody	5,10 ^{fiklno}	4,10 ^{efik}	44,77 ^{efghij}	4,32 ^{afk}	35,07 ^{bcdeg}	16,13 ^{cdef}	138,33 ^{dehmn}	46,30 ^{adfg}
Quinekel	6,25 ^c	5,27 ^b	53,57 ^{bd}	4,60 ^{ae}	33,57 ^{bdefh}	16,13 ^{cdef}	162,00 ^{cdefgkl}	51,83 ^{abe}
Opšti								
prosek	5,39	4,3	42,8	3,85	30,2	14,5	124,9	35,2
Min	3,87	2,83	32,67	1,93	21,97	10,60	40,33	16,77
Max	8,53	7,47	65,27	4,95	40,10	23,40	319,00	60,43
σ	0,93	0,8	7,61	0,64	4,32	2,36	56	11,3
CV (%)	17,4	18,7	17,8	16,6	14,3	16,3	44,8	32,2

Proseci u redovima svake kolone označeni istim slovima nisu statistički značajno različiti na 0,05 nivou značajnosti (BI-broj internodija; BG-broj grana; DUS-dužina stabljike; DES-debljina stabljike; DCL-dužina centralne liske; ŠCL-širina centralne liske; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije; σ -standardna devijacija; CV-koeficijent varijacije)

Broj internodija varirao je od 3,87 kod genotipa SA3, do 8,53 kod genotipa BGR3. Najmanji broj grana zabeležen je kod genotipa SA3 (2,83), a najveći kod genotipa BGR3 (7,47). Genotip Krano imao je najmanju (32,67 cm), a genotip BGR3 najveću dužinu stabljike po biljci (65,27 cm). Debljina stabljike se kretala od 1,93 cm (Bjorn) do 4,95 cm (Triton). Dužina centralne liske imala je vrednosti od 21,97 cm (Bjorn) do 40,10 cm (NCPGRU2). Najmanju širinu centralne liske ostvario je genotip Bjorn (10,60 cm), a najveću SA3 (23,40 cm). Prinos zelene mase kretao se od 40,33 g kod genotipa Čortanovci, do 319 g kod genotipa NCPGRU2. Najmanji prinos suve materije izmeren je kod genotipa Renova (16,77 g), a najveći kod genotipa NCPGRU2 (60,43 g).

Genotip BGR3 imao je statistički značajno veći broj internodija u odnosu na sve genotipove iz grupe, osim genotipova BGR1 i BGR2, od kojih se nije razlikovao. Broj grana je kod genotipa BGR3 bio statistički značajno veći u odnosu na sve ostale genotipove osim u odnosu na BGR1. Genotip BGR3 imao je statistički značajno veću dužinu stabljike od ostalih genotipova, osim od genotipova BGR1, BGR2 i NCPGRU2 od kojih se nije razlikovao. Genotipovi Bjorn, NCPGRU4 i NCPGRU3 imali su statistički značajno manju debljinu stabljike u poređenju sa ostalim genotipovima. Statistički značajno veću dužina centralne liske ostvarili su genotipovi NCPGRU2, SA3, Sofia52, Kora i Britta u odnosu na sve ostale genotipove. Genotip sa najvećom

debljinom centralne liske (SA3) statistički se značajno razlikovao od svih ostalih. Genotip NCPGRU2 imao je statistički značajno veći prinos zelene mase u odnosu na sve ostale genotipove, osim od genotipa Triton. Sledećih 14 genotipova imalo je statistički značajno veći prinos suve materije u odnosu na sve ostale genotipove: Vivi, SA4, Una, NS-Mlava, Fertody, Italia centrale, NCPGRU5, Amos, Sofia52, NCPGRU4, Quinekel, Triton, Kora i NCPGRU2.

Prosečne vrednosti agronomskih osobina kod 46 genotipova crvene deteline, opšti prosek, Min i Max vrednosti, standardna devijacija (σ) i koeficijent varijacije (CV) za 2012. godinu prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Prosečne vrednosti agronomskih osobina kod 46 genotipova crvene deteline, deskriptivni statistički parametri, i značajnost razlika prosečnih vrednosti procenjenih na osnovu Tukey testa u 2012. godini

Genotip	BI	DUS	PZM	PSM
NCPGRU2	5,87 ^{efhij}	43,47 ^{cdfjl}	178,33 ^{gikl}	49,93 ^{ghm}
NCPGRU3	6,00 ^{efh}	41,67 ^{cdfijk}	165,00 ^{hijkm}	43,00 ^{iklm}
NCPGRU4	5,93 ^{efhi}	43,13 ^{cdfjk}	253,33 ^{beg}	68,40 ^{dgi}
NCPGRU5	5,50 ^{ghkl}	45,17 ^{afg}	210,67 ^{efj}	44,27 ^{iklm}
Violeta	5,53 ^{ghkl}	42,37 ^{cdfijk}	208,67 ^{efj}	68,10 ^{dgi}
Nessonas	6,30 ^{defg}	42,40 ^{cdfijk}	188,67 ^{fgik}	62,53 ^{efghjk}
Mercury	5,93 ^{efhi}	39,93 ^{fjkm}	195,33 ^{fgi}	67,17 ^{dgk}
Lemmon	5,53 ^{ghkl}	38,77 ^{ghjkm}	196,67 ^{fgi}	54,97 ^{ghl}
SA1	4,60 ^{lm}	41,47 ^{cdfijk}	205,67 ^{ei}	67,83 ^{dgi}
SA3	3,33 ⁿ	28,13 ^{pq}	75,33 ⁿ	23,27 ^m
SA4	3,73 ^{mn}	29,43 ^{pq}	107,00 ^{lmn}	23,83 ^{mn}
BGR1	4,90 ^{jkl}	39,70 ^{efjkm}	225,00 ^{defh}	61,10 ^{efghl}
BGR2	4,93 ^{ikl}	45,47 ^{af}	225,00 ^{defh}	60,77 ^{efghl}
BGR3	4,73 ^{km}	40,53 ^{dfjkm}	220,00 ^{efh}	57,20 ^{fghl}
Diana	6,47 ^{cfg}	49,33 ^{ab}	301,00 ^{abc}	88,67 ^{bde}
Dicar	5,73 ^{fk}	44,37 ^{afh}	298,67 ^{abd}	84,70 ^{cdf}
Nemaro	5,13 ^{hkl}	36,23 ^{imno}	176,00 ^{fikl}	54,80 ^{ghl}
Una	6,4 ^{cdfg}	47,80 ^{ac}	347,00 ^a	130,80 ^a
Avala	6,23 ^{defg}	44,43 ^{afh}	306,00 ^{ab}	114,17 ^{ab}
Marina	6,10 ^{efh}	43,73 ^{bcdjf}	274,00 ^{ae}	101,43 ^{bc}
Amos	6,23 ^{defg}	46,50 ^{ad}	279,00 ^{ae}	93,37 ^{bd}
NS-Mlava	6,27 ^{defg}	50,23 ^a	348,00 ^a	68,97 ^{dgi}
Italia centrale	5,73 ^{fk}	34,53 ^{mnop}	188,33 ^{fgik}	62,90 ^{efghjk}
Bolognino	6,03 ^{efh}	37,73 ^{jn}	174,33 ^{fikl}	60,83 ^{efghl}
Marino	6,03 ^{efh}	40,90 ^{df km}	197,00 ^{fgi}	61,93 ^{efghjk}
Renova	5,57 ^{ghkl}	38,43 ^{hjk m}	143,67 ^{ijn}	48,60 ^{gm}
Titus	6,10 ^{efh}	40,10 ^{dfjkm}	163,67 ^{hijkm}	51,40 ^{ghln}
Rotra	5,87 ^{efhij}	40,63 ^{fjkm}	141,00 ^{ijn}	49,27 ^{gm}

Kora	8,73 ^a	47,40 ^{ac}	180,00 ^{fgikl}	57,60 ^{fghl}
Vivi	6,03 ^{efh}	36,73 ^{kno}	132,00 ⁱⁿ	49,00 ^{gm}
Lucrum	6,27 ^{defg}	37,57 ^{jn}	158,00 ^{hijkm}	56,60 ^{ghl}
Noe	5,87 ^{efhij}	39,00 ^{fjkm}	169,67 ^{hijkm}	54,37 ^{ghl}
Violetta	5,90 ^{efhij}	40,13 ^{df km}	203,67 ^{ei}	72,50 ^{dg}
Britta	7,33 ^{bc}	45,70 ^{ade}	230,67 ^{bef h}	77,53 ^{cdh}
Krano	7,70 ^b	37,80 ^{jn}	189,00 ^{fgik}	66,93 ^{dgk}
Triton	6,73 ^{bf}	28,87 ^{pq}	230,00 ^{cdefh}	59,80 ^{fghl}
Lutea	5,90 ^{efhij}	39,50 ^{efjkm}	167,67 ^{hijkm}	55,57 ^{ghl}
Bjorn	6,00 ^{efh}	37,07 ^{klm}	98,33 ^{mn}	42,70 ^{iklm}
Bradlo	7,37 ^{bc}	44,70 ^{afh}	162,00 ^{ijkm}	67,93 ^{dgi}
Čortanovci	4,6 ^{lm}	38,33 ^{hjn}	111,33 ^{lmn}	39,67 ^{klm}
89 E-0	5,43 ^{dhkl}	37,23 ^{klm}	247,67 ^{bef}	77,50 ^{cdh}
91 E-44	4,80 ^{kl}	30,47 ^{oq}	114,00 ^{kn}	35,23 ^{jlm}
91 E-63	4,60 ^{lm}	26,77 ^q	106,00 ^{lmn}	33,87 ^{lm}
Sofia52	4,83 ^{kl}	31,93 ^{nq}	164,33 ^{hijkm}	54,13 ^{ghl}
Fertody	5,73 ^{fk}	41,43 ^{cdfijk}	210,00 ^{efj}	63,00 ^{efghjk}
Quinkel	6,87 ^{bce}	45,80 ^{ade}	132,00 ⁱⁿ	43,60 ^{iklm}
Opšti prosek	5,81	40,06	195,53	61,57
Min	3,33	26,77	75,33	23,27
Max	8,73	50,23	348,00	130,80
σ	0,96	5,56	63,34	20,87
CV (%)	16,59	13,88	32,39	33,89

Proseci u redovima svake kolone označeni istim slovima nisu statistički značajno različiti na 0,05 nivou značajnosti (BI-broj internodija: DUS-dužina stabljike; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije; σ = standardna devijacija; CV = koeficijent varijacije)

Najveća vrednost broja internodija izmerena je za genotip Kora (8,73) dok je genotip SA3 imao najmanju vrednost osobine (3,33). Analizirajući 48 genotipova crvene deteline sakupljenih sa 20 različitih lokacija Crnomorskog regiona, Ascii (2011) je ustanovio da se broj internodija kretao u opsegu od 5,75 do 16,25.

Dužina stabljike kretala se od 26,77 cm kod genotipa 91 E-63 do 50,23 cm kod genotipa NS-Mlava. Tucak i sar. (2009) su utvrdili prosečnu visinu biljaka kod analiziranih sorti i populacija crvene deteline od 53,98 cm, i variranje je bilo u opsegu od 32,65-66,69 cm. Ascii (2011) navodi veći opseg variranja (46,20-92,20 cm) visine biljaka nego što je ustanovljen u ovom radu. Kada je u pitanju debljina stabljike, Ascii (2011) je utvrdio da se ona kretala u opsegu od 2,18 mm do 4,19 mm, što je saglasno sa rezultatima dobijenim u ovom doktoratu. Isti autor navodi da je dužina centralne liske

bila u opsegu od 13,3 mm do 44,3 mm, a prosečna širina centralne liske je iznosila 15,7 mm, slično kao u ovom istraživanju.

Najmanji prinos zelene mase formirao je genotip SA3 (75,33 g), a najveći genotip NS-Mlava (348 g). Interval variranja prinosa suve materije je bio 23,27 g (SA3)-130,80 g (Una). Tucak i sar. (2009) su analizirali 30 sorti i populacija poreklom iz 11 zemalja uključujući i dve populacije iz Hrvatske, i ustanovili su značajno variranje prinosa zelene mase. Najveće prosečne vrednosti zelene mase i suve materije su zabeležene kod Hrvatske populacije Pop 11 (1008,6 i 262,73 g/biljci) i bile su za 52% više u odnosu na proseke ostalih. Prema literaturnim podacima koje navodi Asci (2011), ustanovljena je velika razlika između minimalnih i maksimalnih vrednosti u prinosu suve materije kod 48 proučavanih genotipova, što ukazuje na veliku uočenu varijabilnost ove osobine.

Genotip Kora je imao statistički značajno veći broj internodija u odnosu na ostale, a genotip SA3 je imao statistički značajno niži broj internodija u odnosu na ostale, osim u odnosu na genotip SA4. Prema dužini stabljike genotip 91 E-63 se statistički značajno razlikovao od svih ostalih genotipova, osim od genotipova SA3, Triton, SA4, 91 E-44 i Sofia52. Genotipovi NS-Mlava i Una ostvarili su statistički značajno viši prinos zelene materije u odnosu na većinu ostalih genotipova, osim u odnosu na genotipove Avala, Diana, Dicar, Amos i Marina. Prinos suve materije, kod genotipa Una je bio statistički značajno veći u poređenju sa svim ostalim genotipovima, osim u odnosu na genotip Avala.

6.3. Hemijske osobine genotipova crvene deteline

Tabela 9. Hemijske osobine genotipova crvene deteline u 2012. godini

Genotip	SP %	ADF %	NDF %
NCPGRU2	15,10	37,23	53,45
NCPGRU3	16,14	37,86	45,28
NCPGRU4	16,29	30,23	45,17
NCPGRU5	16,22	35,59	47,57
Violeta	16,54	35,93	45,17
Nessonas	17,01	32,15	46,34
Mercury	13,73	38,93	52,51
Lemmon	15,97	32,35	45,79
SA1	17,30	35,07	48,36
SA3	16,82	42,03	51,08

SA4	16,86	37,65	47,34
BGR1	15,44	38,88	48,06
BGR2	14,56	39,76	53,59
BGR3	17,87	36,63	45,65
Diana	17,50	41,00	48,14
Dicar	14,91	41,31	50,85
Nemaro	16,37	33,71	47,77
Una	15,72	35,64	45,63
Avala	15,16	35,03	48,10
Marina	17,08	28,51	46,02
Amos	15,36	32,36	46,98
NS-Mlava	15,68	41,48	46,68
Italia centrale	17,81	33,88	48,01
Bolognino	17,17	28,90	43,08
Marino	15,04	34,91	49,23
Renova	16,42	35,28	49,88
Titus	17,35	41,24	50,18
Rotra	17,67	33,40	47,61
Kora	14,45	37,52	45,87
Vivi	13,74	30,89	48,19
Lucrum	16,38	29,44	46,76
Noe	15,73	33,75	53,69
Violetta	15,20	34,99	43,64
Britta	16,38	36,93	44,08
Krano	14,41	34,19	47,42
Triton	19,23	31,23	44,71
Lutea	17,15	34,21	43,42
Bjorn	15,48	39,38	48,96
Bradlo	14,74	27,78	45,62
Čortanovci	16,45	34,91	48,25
89 E-0	18,12	42,60	55,54
91 E-44	16,75	38,34	45,84
91 E-63	16,19	34,65	45,24
Sofia 52	16,57	42,56	47,76
Fertody	16,78	30,57	45,57
Quinekelly	17,30	36,44	44,05
Opšti prosek	16,22	35,59	47,57
Min	13,73	27,78	43,08
Max	19,23	42,60	55,54
σ	1,18	3,92	2,89
CV(%)	7,3	11,01	6,08

(SP-sadržaj sirovih proteina; ADF-sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu; NDF-sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu; σ -standardna devijacija; CV-koeficijent varijacije)

Prosečna vrednost sadržaja sirovih proteina kod analiziranih genotipova crvene deteline iznosila je 16,22%. Najniža vrednost sadržaja sirovih proteina izmerena je kod genotipa Mercury (13,73%), a najviša kod genotipa Triton (19,23%).

Prosečna vrednost sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) iznosila je 35,59%. Najmanji sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu bio je kod genotipa Bradlo (27,78%), a najveći kod genotipa 89 E-0 (42,60%).

Prosečna vrednost sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF) iznosila je 47,57. Najmanja vrednost sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu izmerena je za genotip Bolognino (43,08%), a najveća vrednost za genotip 89 E-0 (55,54%).

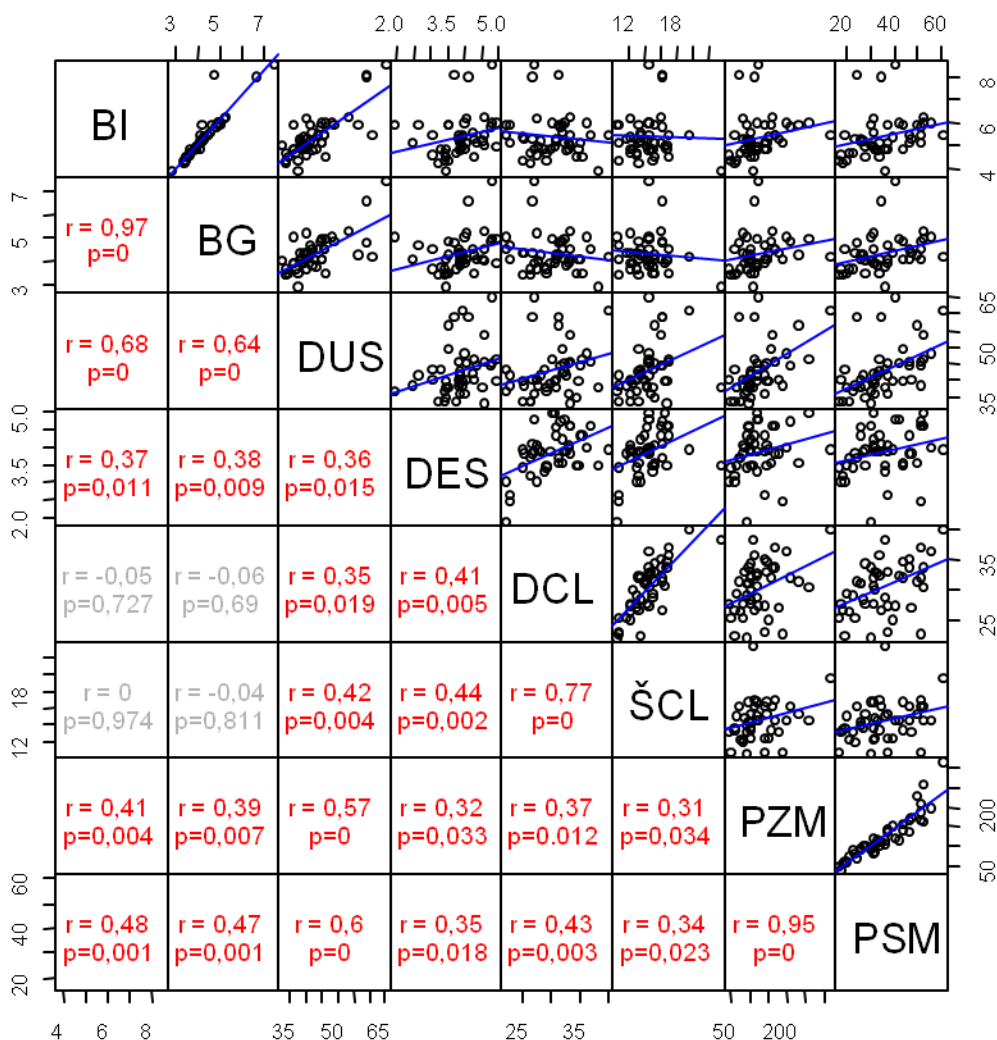
6.4. Korelacije između agronomskih osobina, i između agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline

Vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije ranga agronomskih osobina crvene deteline iz 2011. godine prikazane su na grafikonu 5.

Najveći koeficijent korelacije utvrđen je između broja internodija (BI) i broja grana (BG) i bio je pozitivan i statistički visoko značajan ($r = 0,97$, $P < 0,001$). Takođe, pozitivna, veoma jaka i statistički visoko značajna korelacija je utvrđena između prinosa zelene mase (PZM) i prinosa suve materije (PSM) ($r = 0,95$, $P < 0,001$). Dužina centralne liske (DCL) i širina centralne liske (ŠCL) su osobine koje su bile u jakoj, pozitivnoj i statistički visoko značajnoj korelaciji ($r = 0,77$, $P < 0,001$). Korelacija između broja internodija (BI) i dužine stabljike (DUS) ($r = 0,68$, $P < 0,001$), broja grana (BG) i dužine stabljike (DUS) ($r = 0,64$, $P < 0,001$), dužine stabljike (DUS) i prinosa suve materije (PSM) ($r = 0,60$, $P < 0,001$) je bila jaka, pozitivna i statistički visoko značajna.

Umereno jake, pozitivne i statistički visoko značajne korelacije su utvrđene između sledećih parova agronomskih osobina: dužina stabljike (DUS) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,57$, $P < 0,001$), broj internodija (BI) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,41$, $P < 0,01$), broj internodija (BI) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,48$, $P < 0,01$), broj grana (BG) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,47$, $P < 0,01$), dužina centralne liske (DCL) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,43$, $P < 0,01$), debljina stabljike (DES) i

dužina centralne liske (DCL) ($r = 0,41$, $P < 0,01$), debljina stabljike (DES) i širina centralne liske (ŠCL) ($r = 0,44$, $P < 0,01$), dužina stabljike (DUS) i širina centralne liske (ŠCL) ($r = 0,42$, $P < 0,01$), u 2011. godini.

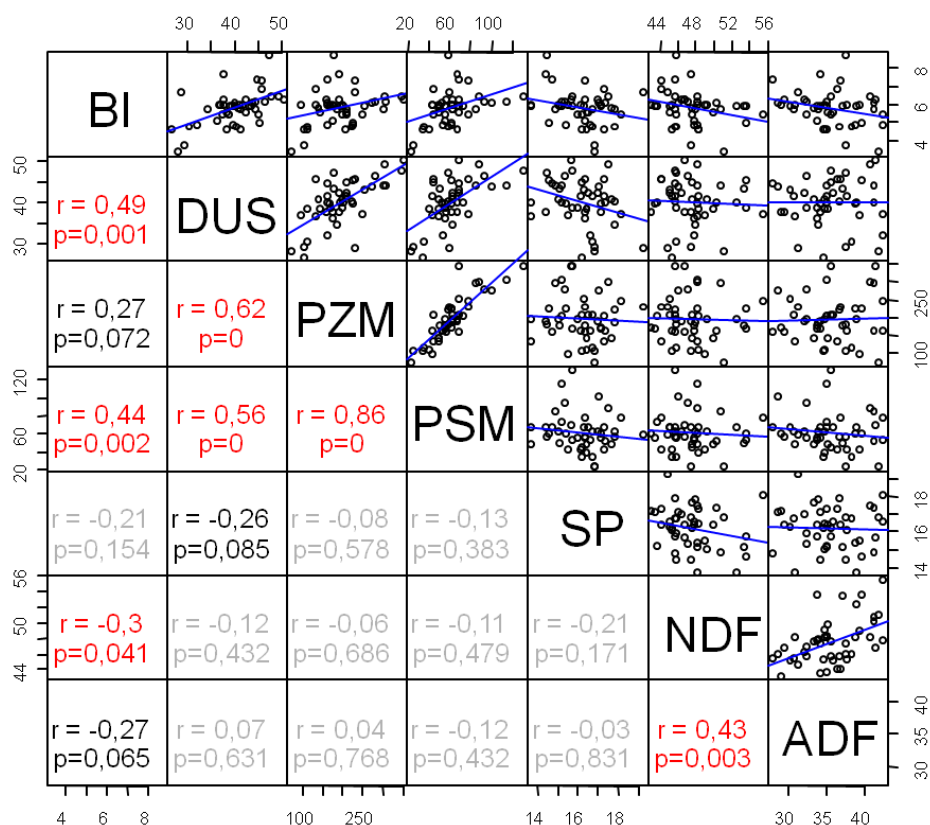


Grafikon 5. Spearman-ov koeficijent korelacije ranga agronomskih osobina crvene deteline za 2011. godinu (BI-broj internodija; BG-broj grana; DUS-dužina stabljike; DES-debljina stabljike; DCL-dužina centralne liske; ŠCL-širina centralne liske; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije)

Slaba, pozitivna i statistički visoko značajna korelacija utvrđena je između sledećih agronomskih osobina: broj grana (BG) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,39$, $P < 0,01$), broj grana (BG) i debljina stabljike (DES) ($r = 0,38$, $P < 0,01$), u 2011. godini.

Slabe, pozitivne i statistički značajne korelacije su dobijene za sledeće parove agronomskih osobina: debljina stabljike (DES) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,32$, $P < 0,05$), dužina centralne liske (DCL) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,37$, $P < 0,05$), širina centralne liske (ŠCL) i prinos zelene mase (PZM) ($r = 0,31$, $P < 0,05$), debljina stabljike (DES) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,35$, $P < 0,05$), širina centralne liske (ŠCL) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,34$, $P < 0,05$), dužina stabljike (DUS) i debljina stabljike (DES) ($r = 0,36$, $P < 0,05$), dužina stabljike (DUS) i dužina centralne liske (DCL) ($r = 0,35$, $P < 0,05$), broj internodija (BI) i debljina stabljike (DES) ($r = 0,37$, $P < 0,05$), u 2011. godini.

Vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije ranga četiri agronomske i tri hemijske osobine crvene deteline iz 2012. godine prikazane su na grafikonu 6.



Grafikon 6. Spearman-ov koeficijent korelacije ranga agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline za 2012 godinu (BI-broj internodija; DUS-dužina stabljike; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije; SP-sadržaj sirovih proteina; ADF-sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu; NDF-sadržaj vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu)

Najveći koeficijent korelacije za analizirane osobine genotipova crvene deteline u 2012. godini utvrđen je između prinosa zelene mase i prinosa suve materije ($r = 0,86$, $P < 0,001$). Ove osobine su bile veoma jako i statistički veoma značajno korelisane u 2012. godini.

Pozitivna, jaka i statistički visoko značajna korelacija je utvrđena između dužine stabljike i prinosa zelene materije ($r = 0,62$, $P < 0,001$) u 2012. godini.

Umereno jake, pozitivne i statistički visoko značajne korelacije bile su dobijene za sledeće parove agronomskih osobina: dužina stabljike (DUS) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,56$, $P < 0,001$), broj internodija (BI) i dužina stabljike (DUS) ($r = 0,49$, $P < 0,01$), broj internodija (BI) i prinos suve materije (PSM) ($r = 0,44$, $P < 0,01$) u 2012. godini. Između sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF) i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) je u 2012. godini detektovana srednja statistički značajna korelacija ($r = 0,43$, $P < 0,01$).

Slaba negativna i statistički značajna korelacija je utvrđena za broj internodija (BI) i sadržaj vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF) ($r = -0,3$, $P < 0,05$).

Brojni istraživači (Wioncek i sar., 1976; Kuehbauch i Voiglaender, 1981; Vasiljević i sar., 2006) su ustanovili značajne korelacije između prinosa zelene mase i dužine stabla crvene deteline, što ukazuje da bi selekcija na duže stablo mogla dovesti do povećanja prinosa suve materije. U istraživanjima koje navodi Asci (2011) utvrđeno je postojanje pozitivnih korelacija između dužine stabla i prinosa suve materije ($0,870$, $P < 0,05$), kao i između dužine stabla i broja internodija ($0,296$, $P < 0,05$), što je u saglasnosti sa istraživanjem u ovom doktoratu. Tucak i sar. (2013) su ustanovili postojanje pozitivnih korelacija između prinosa zelene mase i prinosa suve materije ($r = 0,93$, $P < 0,01$), prinosa zelene mase i prinosa suve materije sa visinom biljke ($r = 0,85$, $P < 0,01$; $r = 0,81$, $P < 0,01$), prinosa zelene mase i prinosa suve materije sa brojem internodija ($r = 0,74$, $P < 0,01$; $r = 0,65$, $P < 0,01$) prinosa zelene mase i prinosa suve materije sa širinom i dužinom centralne liske ($r = 0,72$, $P < 0,01$; $r = 0,54$, $P < 0,05$; $r = 0,79$, $P < 0,01$; $r = 0,62$, $P < 0,01$), visine biljke sa brojem internodija ($r = 0,79$, $P < 0,01$), visine biljke sa širinom i dužinom centralne liske ($r = 0,60$, $P < 0,01$; $r = 0,84$, $P < 0,01$) kao i dužine i širine centralne liske ($r = 0,72$, $P < 0,01$). Tucak i sar. (2013) navode takođe pozitivnu korelaciju broja internodija sa širinom i dužinom centralne liske ($r = 0,52$, $P < 0,05$; $r = 0,77$, $P < 0,01$) dok je u istraživanju u ovom doktoratu

utvrđena statistički neznačajna korelacija ovih osobina. Za razliku od istraživanja u ovom doktoratu kojim su utvrđene statistički neznačajne vrednosti korelacija između sadržaja proteina i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (ADF), kao i sadržaja proteina i sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (NDF), Tucak i sar. (2013) navode postojanje značajnih negativnih korelacija ovih osobina crvene deteline ($r = -0,64, P < 0,01$; $r = -0,73, P < 0,01$)

6.5. Analiza glavnih komponenti (PCA) agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline

Biplotovi dobijeni PCA analizom prikazuju distance između jedinica posmatranja, kao i odstupanja i korelacije varijabli velikih skupova podataka. Mogu se koristiti za određivanje klastera, utvrđivanje multi-kolinearnosti, uočavanje podataka koji se izdvajaju iz grupe (Kohler i Luniak, 2005).

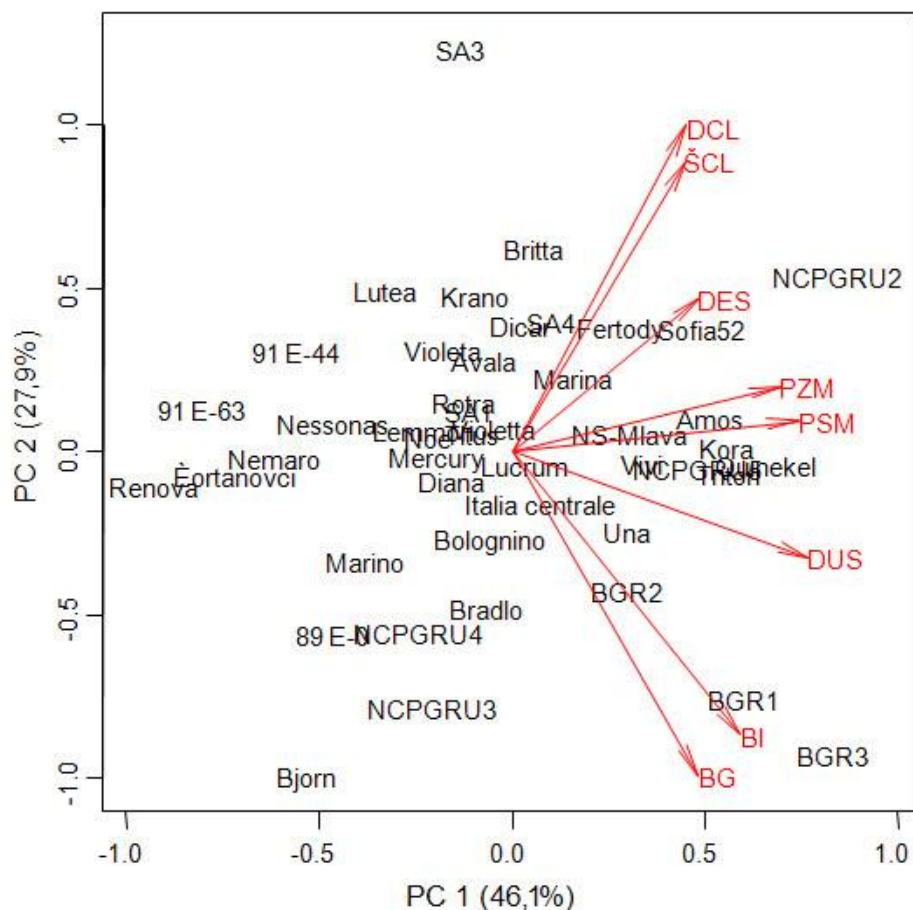
Na biplotu, dužina linije vektora predstavlja varijansu osobine od interesa, i što je ona veća, i varijansa posmatrane osobine je veća.

Ugao između vektora predstavlja asocijaciju između osobina. Ugao od 0 ili 180 stepeni označava potpunu korelaciju sa vrednostima +1, tj. -1. Kada je ugao dve osobine bliži vrednosti od 90 stepeni, manja je i korelacija, a ako je to ugao od 90 stepeni, znači da između osobina nema korelacije tj. da su osobine nezavisne u svom ispoljavanju.

Tačka preseka koju formira linija koja se povlači pod pravim uglom od markera genotipa do linije osobine oslikava vrednost tog genotipa po toj osobini. Ako se tačka preseka poklapa sa koordinatnim početkom, onda taj genotip ima prosečnu vrednost osobine. Tačke preseka koje su udaljene u pravcu osobine ukazuju na visoke vrednosti, dok tačke preseka koje su udaljene duž linije osobine koja se produži kroz koordinatni početak predstavljaju niske vrednosti genotipova po toj osobini.

Konačno, distanca između dve tačke na biplotu prikazuje Euklidske distance između dve genotipa-u multivarijacionom prostoru.

Na grafiku 7 prikazan je PC biplot 46 genotipova crvene deteline na osnovu osm agronomskih osobina za 2011. godinu. PC biplotom je objašnjeno 74% varijanse standardizovanih podataka.



Grafikon 7. PCA biplot 46 genotipova crvene deteline na osnovu osam agronomskih osobina za 2011. godinu (DCL-dužina centralne liske; ŠCL-širina centralne liske, DES-debljina stabljike; PZM-prinos zelene mase; PSM-prinos suve materije; DUS-dužina stabljike; BI-broj internodija; BG-broj grana)

Prinos zelene mase i prinos suve materije bili su u međusobno jakoj pozitivnoj povezanosti asocijaciji, što važi i za njihovu povezanost sa dužinom stabljike i debljinom stabljike. Osim toga, prinos zelene mase i prinos suve materije su ostvarili u srednje jaku, takođe pozitivnu povezanost sa dužinom i širinom centralne liske. Umereno jaka pozitivna povezanost postojala je i između prinosa zelene mase i prinosa suve materije i broja internodija, dok je povezanost prinosa zelene mase i prinosa suve materije i broja grana bila takođe pozitivna, ali slabije izražena. Odsustvo povezanosti je utvrđeno za dužinu stabljike i dužinu i širinu centralne liske, kao i za debljinu stabljike i broj internodija. Negativno povezane su bile osobine dužine i širine centralne liske sa brojem internodija i brojem grana.

Na PC biplotu se izdvojilo 7 grupa genotipova.

Prvu grupu čine genotipovi koji su ostvarili visoke vrednosti prinosa zelene mase i prinosa suve materije, a koji su imali i iznad-prosečne vrednosti debljine stabljike, dužine stabljike, broja internodija, broja grana, dužine centralne liske i širine centralne liske. Genotipovi pripadnici ove grupe su: NS-Mlava, Amos, Kora, Vivi, NCPGRU5, Quinekel i Triton.

Drugu grupu čine genotipovi koji su ostvarili visoke vrednosti prinosa zelene mase i prinosa suve materije, a koji su imali i iznad-prosečne vrednosti debljine stabljike, dužine centralne liske i širine centralne liske. Genotipovi u ovoj grupi su: Marina, Fertody, Sofia52 i NCPGRU2.

U trećoj grupi su genotipovi Una, BGR2, BGR1 i BGR3, koji su ostvarili visoke vrednosti prinosa zelene mase i prinosa suve materije, a koji su imali i iznad-prosečne vrednosti za broj internodija, broj grana i dužinu stabljike.

Četvrtu grupu čine genotipovi sa prosečnim prinosom zelene mase i prinosom suve materije, a koji su ostvarili iznad-prosečne vrednosti dužine centralne liske i širine centralne liske, a ispod-prosečne vrednosti broja internodija i broja grana. Ovoj grupi pripadaju: Avala, Violeta, Dicar, SA4, Krano, Britta, Lutea i SA3.

Petu grupu čine genotipovi sa ispod-prosečnim prinosom zelene mase i prinosom suve materije, i ispod-prosečnim vrednostima za debljinu stabljike i dužinu stabljike. Genotipovi u ovoj grupi su: Renova, Čortanovci, Nemaro, Nessonas, 91 E-63 i 91 E-44.

Šestu grupu čine genotipovi sa ispod-prosečnim prinosima, ispod-prosečnim osobinama dužine stabljike, dužine centralne liske i širine centralne liske, i iznad-prosečnim vrednostima broja internodija i broja grana. Genotipovi u šestoj grupi su: Bolognino, Marino, Bradlo, 89 E-0, NCPGRU4, NCPGRU3 i Bjorn.

Sedmu grupu čine genotipovi koji su bili ispod-prosečni do prosečni za najveći broj posmatranih osobina i grupisali su se u blizini koordinatnog početka biplota. Sedmoj grupi pripadaju sledeći genotipovi: Rotra, SA1, Lemmon, Titus, Violetta, Noe, Mercury, Lucrum, Diana i Italia centrale.

Na grafiku 8 prikazan je PC biplot 46 genotipova crvene deteline na osnovu sedam agronomskih osobina za 2012. godinu. PC biplotom je objašnjeno 63,7% varijanse standardizovanih podataka.

internodija. Takođe, negativne i srednje jake povezanosti utvrđene su između dva tipa prinosa i dužine stabljike u odnosu na sadržaj sirovih proteina.

Na PC biplotu se izdvojilo 6 grupa genotipova.

Prvu grupu čine genotipovi koji su ostvarili visoke vrednosti prinosa zelene mase i prinosa suve materije, iznad-prosečne vrednosti sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu i ispod-prosečne vrednosti sadržaja sirovih proteina. Genotipovi u ovoj grupi su: Avala, Diana, NS-Mlava i Dicar.

Drugu grupu čine genotipovi koji su ostvarili prosečne vrednosti prinosa zelene mase, prinosa suve materije i dužine stabljike, a iznad-prosečne vrednosti sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu. Istovremeno, to su genotipovi sa ispod-prosečnim vrednostima sadržaja sirovih proteina i broja internodija. Pripadajući genotipovi su: NCPGRU5, SA4, Marino, Titus, Noe, BGR1, NCPGRU2, Mercury, 89 E-0 i BGR2.

U trećoj grupi su genotipovi Renova, Bjorn, Sofia 52 i SA3, koji su ostvarili ispod-prosečne vrednosti prinosa zelene materije, prinosa suve mase, dužine stabljike i broja internodija, a iznad-prosečne vrednosti sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu i vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu. U pogledu sadržaja proteina bili su sa prosečnim vrednostima.

U četvrtoj grupi su genotipovi Čortanovci, SA4, 91 E-44 i 91 E-63, koje su karakterisale ispod-prosečne vrednosti prinosa zelene mase, prinosa suve materije, dužine stabljike, broja internodija, a iznad-prosečne vrednosti u pogledu sadržaja sirovih proteina.

Petu najmnogobrojniju grupu čine genotipovi sa iznad-prosečnim osobinama sadržaja sirovih proteina i broja internodija, sa približno prosečnim prinosom zelene mase i prinosom suve materije i ispod-prosečnim vrednostima sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu. Petu grupu sačinjavaju sledeći genotipovi: NCPGRU3, Nemaro, BGR3, Vivi, Violeta, Italia centrale, Violetta, Rotra, Lemmon, Nessonas, Quinekel, Fertody, NCPGRU4, Lucrum, Lutea, Marina, Bradlo, Triton i Bolognino.

Šestu grupu čine genotipovi koji su ostvarili iznad-prosečne visoke vrednosti prinosa zelene mase, prinosa suve materije, dužine stabljike i broja internodija. U

pogledu sadržaja sirovih proteina, sadržaja vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterđentu i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterđentu bili su ispodprosečni. Genotipovi koji pripadaju ovoj grupi su: Una, Amos, Kora, Krano i Britta.

U istraživanjima Pagnotta i sar. (2011), PC analizom sedam statistički značajnih morfo-fizioloških osobina crvene deteline objašnjeno je 79% ukupne varijabilnosti originalnog seta podataka. Vektori osobina su ukazivali da je PC1 osa uglavnom bila pozitivan indikator uspravnog rasta i osobina koje doprinose srednje-ročnom prinosu zelene mase i visokom prinosu semena (visoke i brojne grane, krupni listovi, veliki broj cvetova po cvasti), ukazujući na značajne korelacije između ovih osobina. PC2 osa je bila uglavnom pozitivan indikator kasnog cvetanja i visoke učestalosti biljaka sa pegom na listu. Ordinacija i klasifikacija 22 uzorka crvene deteline (Pagnotta i sar., 2011), na osnovu morfo-fizioloških osobina bila je u skladu sa tipom i geografskim poreklom proučavane germplazme.

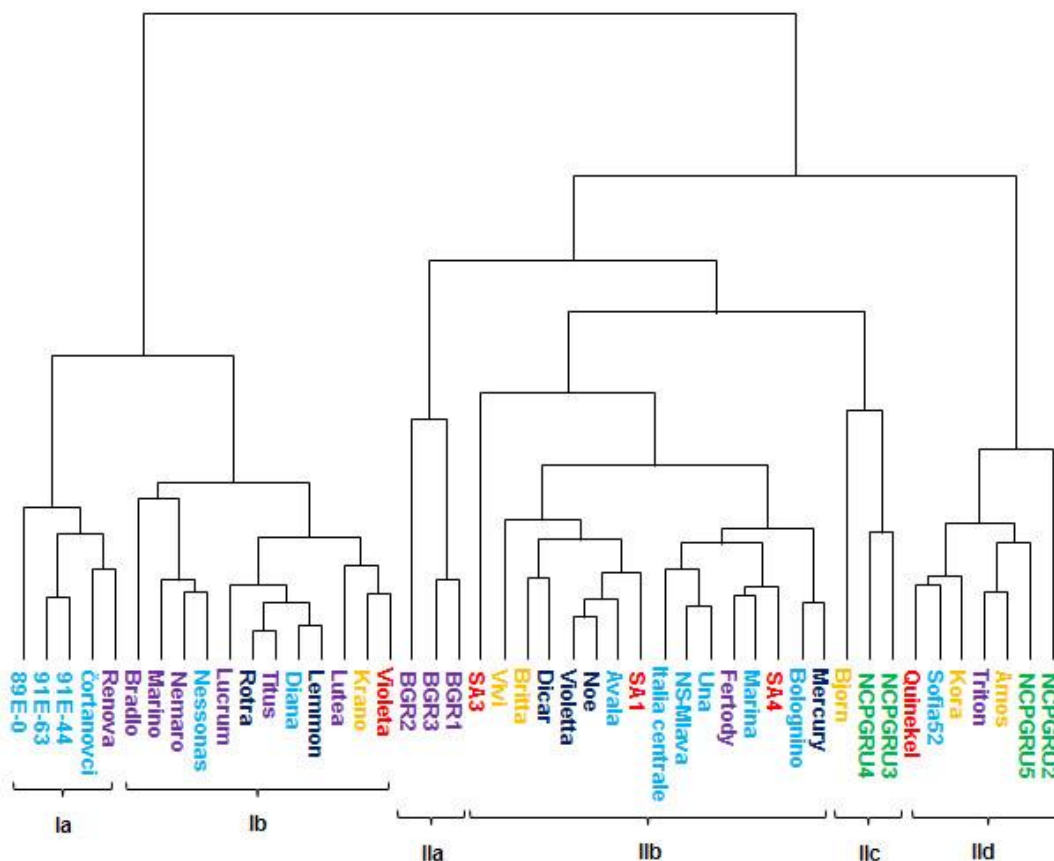
Petrović i sar. (2014) su kod 17 divljih populacija crvene deteline sakupljenih sa teritorije Srbije, analizirali morfološke osobine (prinos zelene mase i prinos suve materije, visina biljke, broj grana, broj lateralnih grana, broj internodija, dužina centralne liske i širina centralne liske). Na osnovu PC analize ovih osobina ustanovili su grupisanje genotipova na osnovu prinosa zelene mase, visine biljke, dužine centralne liske i širine centralne liske. U istom radu, ovi autori su PC analizom izdvojili sadržaj proteina, sadržaj masti i sadržaj vlakana, kao najindikativnije osobine kvaliteta, koje su u najvećoj meri doprinosile razdvajanju genotipova crvene deteline.

6.6. Klaster analiza agronomskih i hemijskih osobina crvene deteline

Na UPGMA dendrogramu klaster analize 46 genotipova crvene deteline na osnovu osam agronomski značajnih osobina izmerenih u 2011. godini, izdvojila su se dva klastera (grafikon 9).

I klaster uključuje genotipove grupisane u dva sub-klastera: Ia (Renova, Čortanovci, 91 E-44, 91 E-63, 89 E-0) i Ib (Violeta, Krano, Lutea, Lemmon, Diana, Titus, Rotra, Lucrum, Nessonas, Nemaro, Marino, Bradlo). II klaster sadrži genotipove grupisane u četiri sub-klastera: IIa (BGR1, BGR2, BGR3), IIb (Mercury, Bolognino, SA4, Marina, Fertody, Una, NS-Mlava, Italia centrale, SA1, Avala, Noe, Violetta, Dicar, Britta, Vivi, SA3), IIc (NCPGRU3, NCPGRU4, Bjorn) i IId (NCPGRU2,

NCPGRU5, Amos, Triton, Kora, Sofia52, Quinekel).

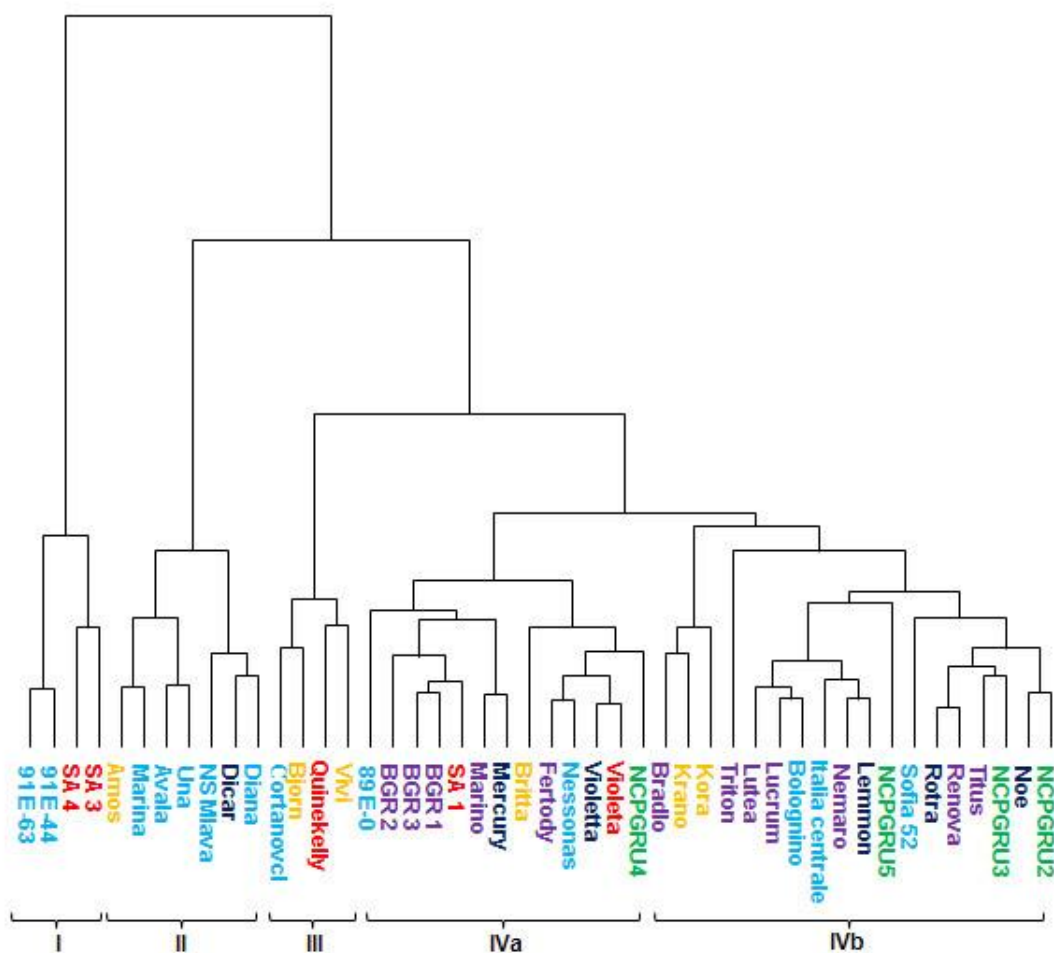


Grafikon 9. Dendrogram UPGMA klaster analize genotipova crvene deteline na osnovu osam agronomskih osobina za 2011. godinu (oznake genotipova prema geografskom poreklu: crvena-Australija i Južna Amerika; zelena-Istočna Evropa; svetlo plava-Južna Evropa; ljubičasta-Srednja Evropa; žuta-Severna Evropa; tamno plava-Zapadna Evropa)

Za sagledavanje genetičke udaljenosti 46 genotipova crvene deteline na osnovu osam agronomski značajnih osobina, za parove genotipova izračunate su Euklidske distance (prilog 3). Najmanja vrednost Euklidske distance utvrđena je za par genotipova Rotra i Titus i iznosila je 0,048. Najveća utvrđena distanca se odnosila na par genotipova NCPGRU2 i Čortanovci (1,099). Prosečna vrednost Euklidske udaljenosti parova genotipova je iznosila 0,380.

Na UPGMA dendrogramu klaster analize 46 genotipova crvene deteline na osnovu sedam agronomski značajnih osobina izmerenih 2012. godine, izdvojila su se četiri klastera (grafikon 10). I klaster uključuje četiri genotipa (SA3, SA4, 91 E-44, 91

E-63). II klaster obuhvata sedam genotipova (Diana, Dicar, NS-Mlava, Una, Avala, Marina, Amos), III klaster sadrži četiri genotipa (Vivi, Quinekel, Bjorn, Čortanovci). U IV-om klasteru su genotipovi grupisani u dva sub-klastera: IVa (NCPGRU4, Violeta, Violetta, Nessonas, Fertody, Britta, Mercury, Marino, SA1, BGR1, BGR3, BGR2, 89 E-0) i IVb (NCPGRU2, Noe, NCPGRU3, Titus, Renova, Rotra, Sofia52, NCPGRU5, Lemmon, Nemaro, Italia centrale, Bolognino, Lucrum, Lutea, Triton, Kora, Krano, Bradlo).



Grafikon 10. Dendrogram UPGMA klaster analize genotipova crvene deteline na osnovu sedam agronomskih osobina za 2012. godinu (oznake genotipova prema geografskom poreklu: crvena-Australija i Južna Amerika; zelena-Istočna Evropa; svetlo plava-Južna Evropa; ljubičasta-Srednja Evropa; žuta-Severna Evropa; tamno plava-Zapadna Evropa)

Na osnovu izučavanja 10 morfo-agronomskih osobina (vreme cvetanja, visina biljke, broj grana po biljci, broj internodija, debljina stabljike, oblik centralne liske,

maljavost stabljike, širina centralne liske, dužina centralne liske i prinos suve materije po biljci), genotipovi crvene deteline koje je proučavao Asci (2011) su bili grupisani u osam osnovnih grupa, pri čemu su genotipovi kolekcionisani iz bliskih regiona nalazili u istim grupama. Izučavajući 30 sorti i populacija crvene deteline na osnovu sedam morfo-agronomskih osobina (prinos zelene mase, visina biljke, prinos suve materije, sadržaj suve materije, perzistentnost, vreme cvetanja i prinos semena po biljci), Tucak i sar. (2009) su utvrdili postojanje ukupno šest klastera. Rosso i Pagano (2005) su naveli da su prinos zelene mase i prinos semena crvene deteline osobine koje su bile od najvećeg značaja za objašnjenje varijabilnosti kod 39 introdukovanih i odomaćenih populacija. Petrović i sar. (2014) su na osnovu izučavanja šest morfoloških osobina i prinosa suve materije, kod 17 divljih populacija crvene deteline, utvrdili grupisanje genotipova u tri klastera. U prvom klasteru su grupisani genotipovi crvene deteline visokih vrednosti visine biljke i prinosa zelene materije, broja internodija i lateralnih grana. U drugom klasteru su populacije crvene deteline sa višim vrednostima visine stabla, širine centralne liske i dužine centralne liske, dok se u okviru trećeg klastera izdvojio sub-klaster sa populacijama crvene deteline sa najnižim vrednosti ispitivanih osobina, kao i -sub-klaster sa populacijama crvene deteline, takođe niskih vrednosti ispitivanih osobina, ali i velikog prosečnog broja grana.

6.7. Genetička varijabilnost mikrosatelitskih (SSR) molekularnih markera za 46 genotipova crvene deteline

U cilju karakterizacije SSR genetičkog diverziteta germplazme crvene deteline određeni su broj alela, frekvencija alela, opseg veličine fragmenata i PIC vrednosti za svaki SSR marker. Osnovni pokazatelji genetičke varijabilnosti mikrosatelitskih markera crvene deteline predstavljeni su u tabeli 10.

Tabela 10. Parametri genetičkog diverziteta 14 mikrosatelitskih lokusa crvene deteline

Lokus	Veličina uzorka	Broj alela	Frekvencija alela	Opseg veličine fragmenata (bp)	PIC
RCS0031	46	22	0,092	139-188	0,169
RCS0035	46	7	0,317	184-196	0,434
RCS0078	46	35	0,062	161-229	0,116
RCS0252	46	5	0,249	171-182	0,371
RCS0453	46	14	0,144	190-220	0,243
RCS0685	46	4	0,383	196-208	0,466
RCS0793	46	16	0,172	198-268	0,284
RCS0894	46	14	0,121	128-185	0,216
RCS1225	46	18	0,144	221-275	0,246
RCS1667	46	6	0,391	255-270	0,482
RCS1729	46	13	0,219	236-276	0,339
RCS2728	46	11	0,258	218-247	0,382
RCS2860	46	15	0,100	105-158	0,180
RCS3681	46	7	0,228	152-170	0,352
Prosek		13,36	0,206		0,306

Četrnaest parova prajmera amplifikovalo je ukupno 187 alela, prosečno 13,36 alela po lokusu. Najveći broj alela (35) imao je marker RCS0078, dok je najmanji broj alela (4) utvrđen za marker RCS0685. Trećina ukupnog broja lokusa imala je osam i više alela. Frekvencije alela 14 SSR lokusa bile su u opsegu od 0,062 (RCS0078) do 0,391 (RCS1667). Kod analiziranih genotipova crvene deteline najviše su bili prisutni umereno česti aleli (sa frekvencijama od 0,05-0,50), dok retki aleli sa frekvencijama manjim od 0,05, kao i česti aleli sa frekvencijama većim 0,50 nisu bili zastupljeni. Amplifikovani fragmenti DNK nalazili su se različitim opsezima za različite SSR markere, pri čemu su najmanje vrednosti opsega bile za marker RCS0252 (11 bp), a najveće za marker RCS0793 (70 bp). PIC vrednost ("Polymorphism Information

Content") je pokazatelj moći određenog markera da detektuje polimorfizam u populaciji (Botstein i sar., 1980). Najveća PIC vrednost (0,482) uočava se kod markera RCS1667, a najniža (0,116) je karakteristična za marker RCS0078. Marker sa dinukleotidnim motivima su prosečno imali veću polimorfnost (0,43) od markera sa trinukleotidnim motivima (0,32), kao i u odnosu na RCS0031 marker sa tetranukleotidnim motivom (0,17) (Tabela 3 i Tabela 10).

Prosečan broj SSR alela po lokusu u ovim istraživanjima je bio 13 i predstavlja pokazatelj značajnog diverziteta ispitivanih genotipova crvene deteline, i veći je u odnosu radove drugih autora. U radovima Sato i sar. (2005) i Dugar i Popov (2013) navodi se da je prosečan broj SSR alela po lokusu kod crvene deteline iznosio devet. Dias i sar. (2008) su objavili da je prosečan broj SSR alela kod crvene deteline bio devet u tri populacije i 11 za 56 individua. Berzina i sar. (2008) su utvrdili da je prosečan broj SSR alela za sedam analiziranih sorti bio najmanji kod sorte Arija (11,3), a najveći kod sorte Priekugi (19,2). Vymyslicky i sar. (2012) su ustanovili da se broj SSR alela po lokusu kod crvene deteline kretao u intervalu od 3 do 8, sa prosečnom vrednošću od 4,4. Gupta i sar. (2016) su utvrdili najnižu vrednost prosečnog broja SSR alela po lokusu kod crvene deteline od 3,18. PIC vrednosti SSR markera utvrđene u ovom radu su bile nešto niže u odnosu na radove drugih autora. PIC vrednost SSR markera koje su ustanovili Sato i sar. (2005) za iste SSR markere koji su korišćeni u ovim istraživanjima kretale su se u rasponu od 0,54 do 0,83. PIC vrednosti SSR markera koje su u istraživanjima koristili Dias i sar. (2008) su bile u rasponu od 0,64 do 0,85 za tri populacije i 0,70-0,91 za 56 biljaka crvene deteline. Gupta i sar. (2016) su za PIC vrednosti SSR markera kod crvene deteline dobili opseg od 0,301 do 0,719, a Vymyslicky i sar. (2012) od 0,4 do 0,86.

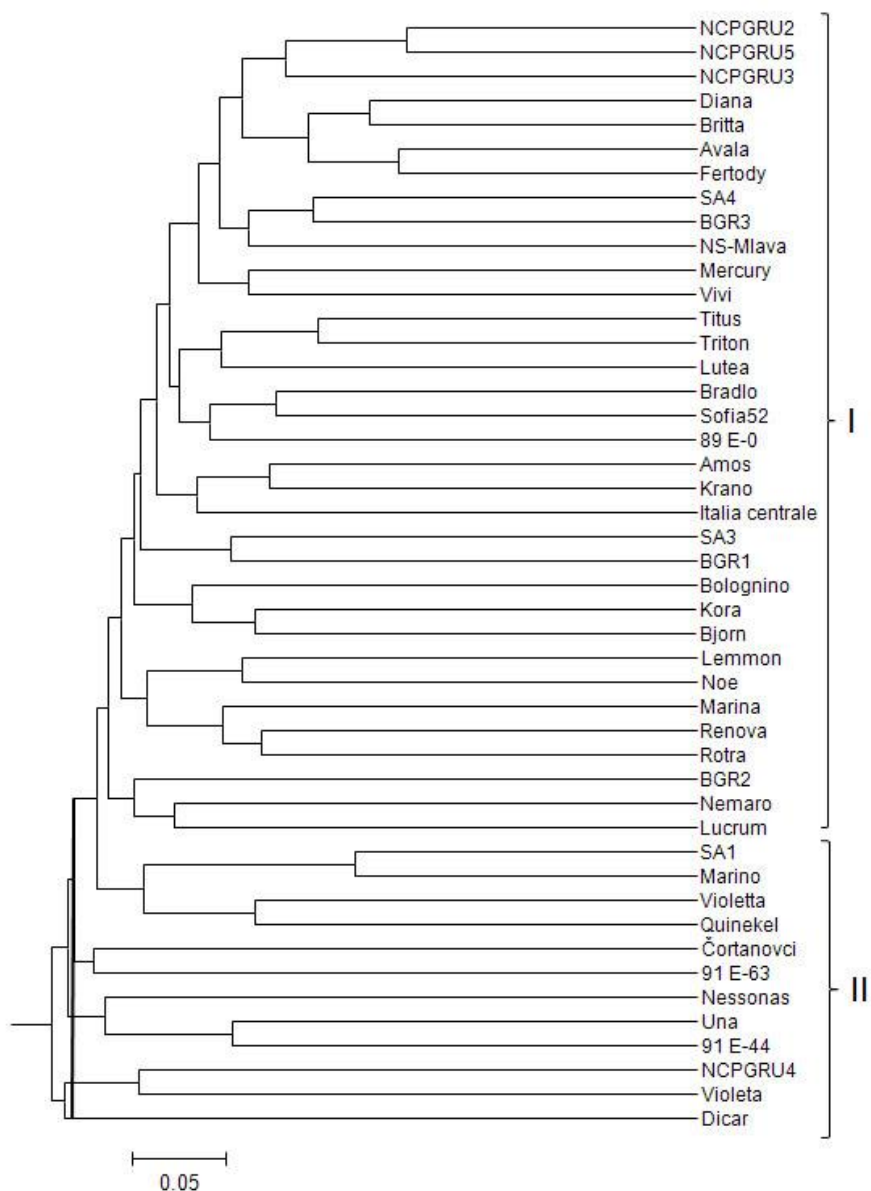
6.7.1. Klaster analiza genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera

Genetička udaljenost 46 genotipova crvene deteline je procenjena na osnovu polimorfizma SSR markera, i za parove posmatranih genotipova konstruisana je Dice matrica distanci koja je data u prilogu 4. Najmanje vrednosti genetičke udaljenosti utvrđene su između genotipova NCPGRU2 i NCPGRU5 (0,311). Najveća vrednost genetičke distance utvrđena je za par Violeta i BGR2 (0,933). Prosečna genetička distanca svih parova genotipova je iznosila 0,587.

Klaster analiza SSR molekularnih podataka crvene deteline rezultovala je grupisanjem genotipova crvene deteline u 2 grupe tj. klastera (grafikon 11):

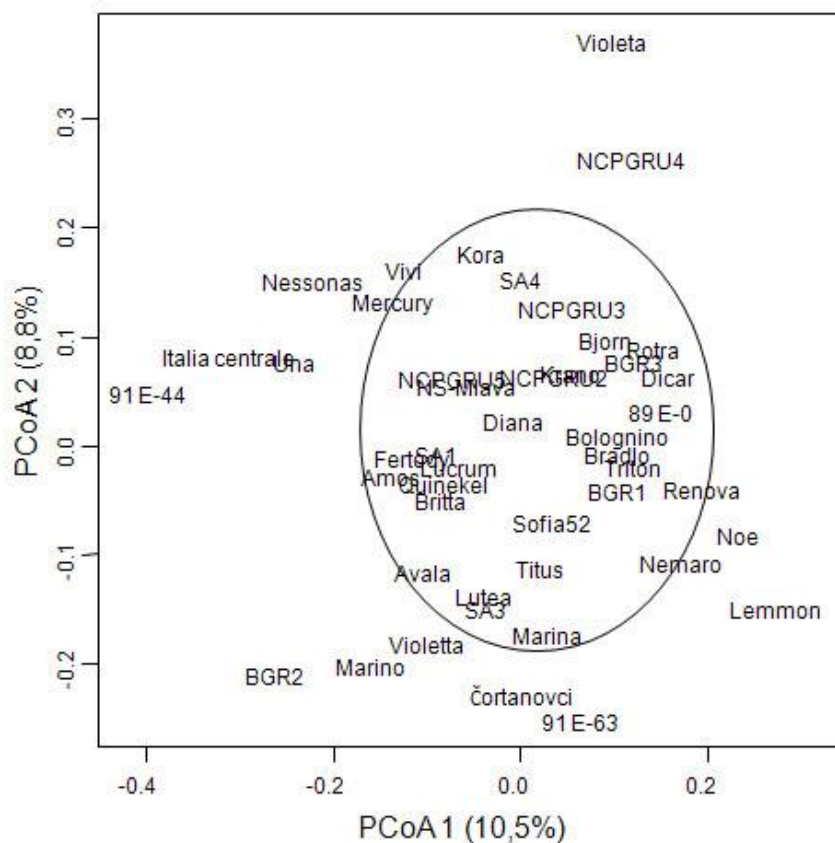
I klaster-NCPGRU2, NCPGRU5, NCPGRU3, Diana, Britta, Avala, Fertody, SA4, BGR3, NS-Mlava, Mercury, Vivi, Titus, Triton, Lutea, Bradlo, Sofia52, 89 E-0, Amos, Krano, Italia centrale, SA3, BGR1, Bolognino, Kora, Bjorn, Lemmon, Noe, Marina, Renova, Rotra, BGR2, Nemaro, Lucrum.

II klaster-SA1, Marino, Violetta, Quinekel, Čortanovci, 91 E-63, Nessonas, Una, 91 E-44, NCPGRU4, Violeta, Dicar.



Grafikon 11. UPGMA (Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic method) dendrogram 46 genotipova crvene deteline na osnovu Dice matrice distanci SSR markera

6.7.2. Analiza glavnih koordinata genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera



Grafikon 12. Analiza glavnih koordinata (PCOA) 46 genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera

Na grafikonu 12, uočava se da je analizom glavnih koordinata 46 genotipova crvene deteline na osnovu SSR markera, prvom i drugom osom objašnjeno ukupno 19,3% genetičke varijabilnosti originalnog seta podataka. U grupisanju genotipova na osnovu SSR marker analize, uočavaju se sledeći genotipovi koji su genetički odstupali po svojim molekularnim podacima u odnosu na većinu grupisanih oko koordinatnog središnjeg dela PCOA grafika: Čortanovci, 91 E-63, NCPGRU4, Violetta, Nessonas, Una, 91 E-44, Violetta, Marino. Rezultati PCOA analize su bili u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na osnovu klaster analize, jer prethodno navedeni genotipovi su genotipovi koji su klaster analizom bili grupisani u okviru II klastera. Analiza glavnih koordinata izdvojila je još četiri genotipa (Noe, Lemmon, BGR2, Italia centrale-genotipovi koji su odgovarali I klasteru), kao SSR molekularno različita u odnosu na većinu genotipova središnjeg dela grafika.

6.7.3. Analiza molekularne varijanse (AMOVA)

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je primenjena u cilju detaljnijeg sagledavanja genetičke varijabilnosti i diferencijacije 46 proučavanih genotipova crvene deteline.

Tabela 11. Analiza molekularne varijanse zasnovane na SSR markerima genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu četiri morfološke i jedne fenološke osobine za 2011. godinu

Izvor varijacije	d.f.	Suma kvadrata	Komponenta varijanse	% varijanse	$\Phi_{ST\#}$	$P\#$
Između grupa	2	0,702	0,00454	1,44	0,01442	0,09580
Unutar grupa	43	13,346	0,31038	98,56		
Ukupno	45	14,048	0,31492			

#-izračunato na osnovu 1000 permutacija; $P < 0,001$ -veoma visoko statistički značajno, $P < 0,01$ - visoko statistički značajno, $P < 0,05$ - statistički značajno, df-broj stepeni slobode

AMOVA zasnovana na SSR markerima 46 genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu morfoloških osobina (i jedne fenološke) za 2011. godinu (tabela 11), nije utvrdila postojanje statistički značajne među-grupne diferencijacije ($p < 0,05$).

Tabela 12: Analiza molekularne varijanse zasnovane na SSR markerima genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu agronomskih osobina za 2011. godinu

Izvor varijacije	d.f.	Suma kvadrata	Komponenta varijanse	% varijanse	$\Phi_{ST\#}$	$P\#$
Između grupa	2	0,582	-0,00268	-0,86	-0,00864	0,73705
Unutar grupa	43	13,467	0,31318	100,86		
Ukupno	45	14,048	0,31050			

#-izračunato na osnovu 1000 permutacija; $P < 0,001$ -veoma visoko statistički značajno, $P < 0,01$ - visoko statistički značajno, $P < 0,05$ - statistički značajno, df-broj stepeni slobode

Na osnovu podataka analize molekularne varijanse (tabela 12) uočava se da nije utvrđena statistički značajna diferencijacija između grupa, koje su su formirane na

osnovu vrednosti zasnovanim na SSR markerima i agronomskim osobinama za 2011. godinu.

Tabela 13: Analiza molekularne varijanse zasnovane na SSR markerima genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu agronomskih i hemijskih osobina 2012. godine

Izvor varijacije	d.f.	Suma kvadrata	Komponenta varijanse	% varijanse	$\Phi_{ST\#}$	$P\#$
Između grupa	2	0,555	-0,00258	-0,83	-0,00828	0,87390
Unutar grupa	43	13,493	0,31380	100,83		
Ukupno	45	14,048	0,31122			

#-izračunato na osnovu 1000 permutacija; $P < 0,001$ -veoma visoko statistički značajno, $P < 0,01$ - visoko statistički značajno, $P < 0,05$ - statistički značajno, df-broj stepeni slobode

Kada je u pitanju analiza molekularne varijanse (AMOVA) zasnovana na SSR markerima 46 genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu agronomskih i hemijskih osobina za 2012. godinu (tabela 13), nije utvrđeno postojanje statistički značajne (međugrupne diferencijacije).

Tabela 14: Analiza molekularne varijanse zasnovane na SSR markerima genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu tipa i ploidnosti

Izvor varijacije	d.f.	Suma kvadrata	Komponenta varijanse	% varijanse	$\Phi_{ST\#}$	$P\#$
Između grupa	2	0,729	0,00388	1,24	0,01236	0,04692
Unutar grupa	43	13,319	0,30975	98,76		
Ukupno	45	14,048	0,3236			

#-izračunato na osnovu 1000 permutacija; $P < 0,001$ -veoma visoko statistički značajno, $P < 0,01$ - visoko statistički značajno, $P < 0,05$ - statistički značajno, df-broj stepeni slobode

Primenom AMOVA analize zasnovane na SSR markerima 46 genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu tipa (sorta ili populacija) i ploidnosti (2n ili 4n) (tabela 14), utvrđeno je postojanje statistički značajne ($P < 0,05$) među-grupne diferencijacije.

Međutim, % varijanse između grupa je bio mnogo manji u odnosu na % variranja unutar analiziranih grupa, ukazujući na slabu međugrupnu diferencijaciju.

AMOVA je poslužila i za utvrđivanje indeksa genetičke diferencijacije (Φ_{ST}), koji predstavlja standardizovanu među-grupnu, interpopulacionu genetičku distancu između dve grupe, i pokazatelj je korelacije gena različitih individua u jednoj populaciji (Chen i Nelson, 2005). Vrednosti Φ_{ST} indeksa prema Hartl i Clark (1997), su definisane na sledeći način: diferencijacija može biti slaba ($\Phi_{ST} < 0,05$), umerena ($0,05 < \Phi_{ST} < 0,15$), velika ($0,15 < \Phi_{ST} < 0,25$) i veoma velika ($\Phi_{ST} > 0,25$). Uočava se da je genetička distanca izražena Φ_{ST} indeksom između grupa određenih na osnovu tipa i ploidnosti 46 genotipova crvene deteline bila slaba (0,01236) i ukazivala je na slabu genetičku diferencijaciju ove dve grupe.

Genetičke distance i Φ_{ST} indeks za grupe određene na osnovu morfoloških osobina (i jedne fenološke) za 2011. godinu, Φ_{ST} indeks za grupe određene na osnovu agronomskih osobina za 2011. godinu, kao i Φ_{ST} indeks za grupe određene na osnovu agronomskih i hemijskih osobina 2012. godine, nisu imali statistički značajne vrednosti.

Visoka unutar-populaciona varijabilnost crvene deteline je očekivana s obzirom na to da je crvena detelina stranooplodna vrsta sa visokim nivoom gametofitske inkompatibilnosti (Taylor i Quesenberry, 1996). S tim u vezi populacije ove vrste su heterogene mešavine heterozigotnih individua (Rosso i Paggano, 2005).

Veće unutar-grupno variranje u odnosu na među-grupno variranje su utvrdili i drugi autori. Dias i sar. (2008) su testirali pet klastera dobijenih na osnovu morfoloških osobina 56 jedinki u odnosu na SSR podatke, i ustanovili da je unutar-grupna varijabilnost iznosila 98,1%, dok je među-grupna varijabilnost bila 1,9%. U istom radu je primenom AMOVA kod tri populacije crvene deteline takođe utvrđeno da je unutar-grupna varijabilnost bila veća (83,6%), a među-grupna dosta niža (16,4%). Dugar i Popov (2013) su proučavajući 15 ukrajinskih sorti crvene deteline utvrdili da je među-grupna genetička varijabilnost SSR markera bila niska i da je činila svega 6,9% ukupne varijabilnosti. Gupta i sar. (2016) su analizirali sržnu kolekciju crvene deteline koju su uspostavili Kouamé i Quesenberry (1993), a rastavljanje genetičke varijanse pomoću AMOVA je pokazalo da je veći deo genetičkog diverziteta sadržan unutar populacija (91%), dok je 9% genetičke varijabilnosti predstavljala među-grupna varijabilnost.

Berzina i sar. (2008) su proučavajući sedam diploidnih sorti crvene deteline na osnovu šest SSR markera utvrdili da među-grupna varijabilnost predstavlja samo 2% ukupnog genetičkog polimorfizma, kao i da Φ_{ST} vrednosti (0,006-0,043) ukazuju na nisku genetičku diferencijaciju između sorti u različitim grupama.

6.8. Saglasnost rezultata dobijenih na osnovu morfoloških, agronomskih, hemijskih i SSR molekularnih podataka

Varijabilnost genotipova crvene deteline može se tumačiti i poređenjem vrednosti matrica distance koje su dobijene na osnovu proučavanih morfoloških osobina (i jedne fenološke), agronomskih osobina, hemijskih osobina i SSR molekularnih podataka. S tim u vezi, u ovim istraživanjima je ustanovljeno da je najmanja prosečna genetička udaljenost utvrđena na osnovu agronomskih osobina (0,380), veća je na osnovu morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog) (0,587), a najveća na osnovu molekularnih markera (0,623).

Prosečno veće distance dobijene na osnovu molekularnih markera ukazuju na to da su SSR molekularni markeri diferencirali genotipove crvene deteline na većem stepenu genetičke udaljenosti u odnosu na fenotipske osobine (i agronomske i morfološke i jednu fenološku), što bi se moglo objasniti time da je fenotipska ekspresija ovih osobina predstavljala samo manji deo ukupne ekspresije genoma. Osim toga broj korišćenih SSR markera (15) bio je veći od broja analiziranih morfoloških i fenoloških osobina (4 morfološke i 1 fenološka) i agronomskih osobina (8).

U cilju utvrđivanja korelacija između genetičkih i fenotipskih distanci često se koristi Mantel statistički test (Mantel, 1967). Ovaj test je korišćen radi utvrđivanja korelacija tri tipa matrica distanci koje su dobijene na osnovu dva tipa fenotipskih osobina (morfološke osobine-uz jednu fenološku, i agronomske osobine) i direktnom analizom na nivou genoma (SSR markeri), što je prikazano u tabeli 15.

Kada je u pitanju saglasnost SSR matrice distanci u odnosu na ostale matrice distanci, nije bilo statistički značajne korelacije između njih. Međutim, statistički značajna ($P < 0,05$) pozitivna korelacija (0,178) je utvrđena između matrice distanci morfoloških osobina (i jedne fenološke) u 2011. godini i matrice distanci agronomskih osobina u 2011. godini. Takođe, statistički značajna ($P < 0,05$) pozitivna korelacija (0,122) je prisutna između matrice distanci morfoloških osobina (i jedne fenološke) u

2011. godini i matrice distanci agronomskih i hemijskih osobina za 2012. godinu. Na osnovu toga proizilazi da su genotipovi sličnih morfoloških osobina (i jedne fenološke) istovremeno pokazali i određenu sličnost na nivou agronomskih osobina 2011. godine, kao i hemijskih i agronomskih osobina 2012. godine, odnosno da genotipovi sličnih morfoloških profila pokazuju, u izvesnoj meri, i slične agronomske i hemijske karakteristike.

Tabela 15: Korelacija matrica distanci osobina ispitivanih u 2011. i 2012. godini na osnovu Mantel testa

Matrice distanci	Molekularne SSR osobine	Agronomske osobine u 2011. godini	Agronomske i hemijske osobine u 2012. godini	Morfološke osobine (i jedna fenološka) u 2011. godini
Molekularne SSR osobine				
Agronomske osobine u 2011. godini	-0,011			
Agronomske i hemijske osobine u 2012. godini	-0,048	0,049		
Morfološke osobine (i jedna fenološka) u 2011. godini	-0,035	0,178*	0,122*	

izračunato na osnovu 1000 permutacija; *-P < 0,05 - statistički značajno

Saglasnost matrica distanci na osnovu morfoloških i molekularnih SSR podataka nije utvrđena ni u radu Dias i sar. (2008), slično kao u ovom istraživanju. Pagnotta i sar. (2011) su takođe, proučavajući 22 uzorka crvene deteline, na osnovu Mantel testa utvrdili odsustvo korelacije matrice distanci morfo-fizioloških osobina i matrice distanci na osnovu AFLP markera. Vymyslicky i sar. (2012) su na osnovu primene Mantel testa zaključili da morfološki i molekularni SSR podaci 76 uzoraka crvene deteline nisu bili u statistički značajnoj korelaciji. Annicchiarico i sar. (2016) navode da je Mantel testom utvrđeno odsustvo korelacije matrice morfo-fizioloških osobina i matrice SSR markera, kod 11 proučavanih lokalnih populacija lucerke, kao i prisustvo slabe korelacije između matrice morfo-fizioloških osobina i matrice distanci na osnovu SNP markera. Grljušić i sar. (2008) su proučavajući genotipove crvene deteline, suprotno prethodnim autorima, Mantel testom utvrdili postojanje statistički značajne korelacije između morfoloških i molekularnih (RAPD) matrica distanci.

ZAKLJUČAK

- Na osnovu prosečne vrednost Shannon-ovog indeksa diverziteta (0,711) dobijenog na osnovu proučavanja četiri morfološke i jedne fenološke osobine kod 46 genotipova crvene deteline, može se zaključiti da je u okarakterisanom materijalu bio prisutan visok nivo morfološkog diverziteta.
- Analizom homogenosti izvršeno je grupisanje genotipova crvene deteline na sedam umereno homogenih grupa i to na osnovu osobina: vreme cvetanja, intenzitet obojenosti pege lista i delimično na osnovu osobine maljavosti stabljike. UPGMA klaster analizom je izvršeno grupisanje genotipova crvene deteline na četiri klastera i to na osnovu vremena cvetanja i boje lista (uz manji doprinos i ostalih osobina).
- HOMALS analiza je omogućila da se jasno izdvoje oni genotipovi crvene deteline koji su bili sa jedinstvenim profilima u odnosu na homogene grupe, i takvi genotipovi nisu bili jasno uočljivi pri primeni UPGMA klaster metode. HOMALS metoda se pokazala kao informativnija, jer je jasnije prikazala morfološku varijabilnost ispitivanog materijala.
- Analizom varijanse ustanovljeno je da je uticaj genotipova crvene deteline na varijabilnost posmatranih agronomskih osobina bio statistički visoko značajan, za obe ispitivane godine.
- Između svih ispitivanih agronomskih osobina crvene deteline u prvoj godini istraživanja su utvrđene pozitivne korelacije, a najveći statistički visoko značajan koeficijent korelacije je bio između broja internodija i broja grana ($r = 0,97$, $P < 0,001$), kao i između prinosa zelene mase i prinosa suve materije ($r = 0,95$, $P < 0,001$). Najveći statistički veoma značajan koeficijent korelacije agronomskih osobina genotipova crvene deteline u drugoj godini istraživanja je utvrđen između prinosa zelene mase i prinosa suve materije ($r = 0,86$, $P < 0,001$). Slaba negativna i

statistički značajna korelacija bila je prisutna između osobina broja internodija i sadržaja vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu ($r = -0,3, P < 0,05$).

- Primenom PCA i klaster analize kod 46 genotipova crvene deteline na osnovu agronomskih i hemijskih osobina, grupisanje genotipova se nije moglo dovesti u vezu sa geografskim poreklom.
- Utvrđena je značajna polimorfnost korišćenih SSR (Simple Sequence Repeat) markera. Četrnaest parova prajmera amplifikovalo je ukupno 187 alela, prosečno 13,36 alela po lokusu, a trećina ukupnog broja lokusa imala je osam i više alela. Najveću frekvenciju alela imao je RCS0078 marker (0,062), a najmanju RCS1667 (0,391), dok je prosečna frekvencija alela iznosila 0,206. PIC vrednost (Polymorphism Information Content) proučavanih SSR lokusa bila je u rasponu od 0,12 (RCS0078) do 0,48 (RCS1667), a prosečna PIC vrednost je iznosila je 0,306.
- Na osnovu analize glavnih koordinata (PCOA) i klaster analize mikrosatelitskih podataka 46 genotipova crvene deteline, grupisanje genotipova bilo je saglasno na osnovu obe primenjene statističke metode.
- AMOVA zasnovana na SSR markerima 46 genotipova crvene deteline grupisanih na osnovu morfoloških osobina (i jedne fenološke), agronomskih osobina i hemijskih osobina, nije utvrdila postojanje statistički značajne međugrupne diferencijacije. Grupisanje na osnovu statusa i nivoa ploidnosti je bilo statistički značajno ($p < 0,05$), ali međupopulaciono razdvajanje je bilo slabo izraženo ($\Phi_{ST} = 0,01236$).
- Najmanja prosečna genetička udaljenost genotipova crvene deteline je utvrđena na osnovu agronomskih osobina (0,380). Prosečna genetička distanca na osnovu morfoloških deskriptora (i jednog fenološkog) je bila veća (0,587), a najveća genetička distanca je dobijena na osnovu molekularnih markera (0,623). Rezultati Mantel testa su pokazali da nije bilo statistički značajne korelacije SSR matrice distanci u odnosu na matrice distanci morfoloških (i jedne fenološke), agronomskih i

hemijskih osobina crvene deteline. Statistički značajna pozitivna korelacija je utvrđena između matrice distanci morfoloških osobina (i jedne fenološke) u odnosu na matrice agronomskih i hemijskih osobina, što ukazuje da genotipovi sličnih morfoloških profila pokazuju u izvesnoj meri i slične agronomske i hemijske karakteristike.

LITERATURA

- Abberton, M.T. (2007): Interspecific hybridization in the genus *Trifolium*. *Plant Breeding* 126:337-342.
- Amdahl, H., Aamlid, T. S., Ergon, Å., Kovi, M. R., Marum, P., Alsheikh, M., Rognli O. A. (2016): Seed yield of Norwegian and Swedish tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.) populations. *Crop Science* 56:603-612.
- Anderson, J.R., Lubberstedt, T. (2003): Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.
- Annicchiarico, P., Royo, C., Bellah, F., Moragues, M. (2009): Relationship of genotype similarity for adaptation pattern with similarity based on morphophysiological traits or molecular markers in durum wheat. *Plant Breeding* 128:164-71.
- Annicchiarico, P., Nazzicari, N., Ananta, A., Carelli, M., Wei, Y., Brummer, E.C. (2016): Assessment of cultivar distinctness in alfalfa: a comparison of genotyping-by-sequencing, simple-sequence repeat marker, and morphophysiological observations. *Plant Genome* 9. doi:[10.3835/plantgenome2015.10.0105](https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.10.0105)
- Asci, O.O. (2011): Biodiversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) collected from Turkey. I: Morpho-agronomic properties. *African Journal of Biotechnology* 10(64):14073-14079.
- Bertan, I., de Carvalho, F.I.F., de Oliveira, A.C. (2007): Parental selection strategies in plant breeding programs. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10(4):211-222.
- Berzina, I., Zhuk, A., Veinberga, I., Rashal, I., Rungis, D. (2008): Genetic fingerprinting of Latvian red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties using simple sequence repeat (SSR) markers: comparisons over time and space. *Latvian Journal of Agronomy* 11:28-32.
- Boller, B., Tanner, P., Günter, S., Schubiger, F.X. (2003): Description and evaluation of a collection of former Swiss red clover landraces. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding* 39:31-37.
- Boller, B., Schubiger, F.X., Kölliker, R. (2010): Red clover. In: Boller, B., Posselt, U.K., Veronesi, F. (Eds.), *Handbook of plant breeding: Fodder crops and amenity grasses*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 439-456.

- Botstein, D., White, R.L., Skalnick, M.H., Davies, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Bowley, S.R., Taylor, N.L., Dougherty, C.T. (1984): Physiology and morphology of red clover. *Advances in Agronomy* 37:318-347.
- Bremner, J.M. (1996): Nitrogen-total. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert R.H. (Eds.), *Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods*. American Society of Agronomy, Wisconsin, pp. 1085-1121.
- Buyukkartal, H.N. (2003): *In vitro* pollen germination and pollen tube characteristics in tetraploid red clover (*Trifolium pratense* L.). *Turkish Journal of Botany* 27:57-61.
- Buyukkartal, H.N. (2008): Causes of low seed set in the natural tetraploid *Trifolium pratense* L. (Fabaceae). *African Journal of Biotechnology* 7:1240-1249.
- Campos-De-Quiroz, H., Ortega-Klose, F. (2001): Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 122:61-67.
- Charcosset, A., Moreau, L. (2004): Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica* 137:81-94.
- Chen, Y., Nelson, R.L. (2005): Relationship between origin and genetic diversity in Chinese soybean germplasm. *Crop Science* 45(4):1645-1653.
- Cilev, G., Gacovski, Ž., Petrovska, B., Stojković, J. (2014): Efekti upotrebe različitih obroka u ishrani visokoproizvodnih krava na količinu i kvalitet mleka. *Agroznanje* 15(2):185-194.
- Colwell, R.K. (2009): Biodiversity: concepts, patterns, and measurement. In: Levin, S.A. (Eds.), *The Princeton guide to ecology*. Princeton University Press, Princeton, pp. 257-263.
- Crinò, P., Tavazza, R., Rey Muñoz, N.A., Nisini, P.T., Saccardo, F., Ancora, G., Pagnotta, M.A. (2008): Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke 'Romanesco' landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:823-833.
- Delečić, N. (2009): Uvod u molekularnu genetiku. Poljoprivredni fakultet, Kosovska Mitrovica.

- Dias, P.M.B., Julier, B., Sampoux, J.P., Barre, P., Dall'Agnol, M. (2008): Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica* 160:189-205.
- Dugar, Y.N., Popov, V.N. (2013): Genetic structure and diversity of Ukrainian red clover cultivars revealed by microsatellite markers. *Open Journal of Genetics* 3:235-242.
- Dorđević, N., Grubić, G., Jokić, Ž. (2003): Osnovi ishrane domaćih životinja-praktikum. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.
- Eickler, B., Gierus, M., Taube, F. (2008): PPO activity in red clover (*Trifolium pratense* L.) as potential factor for protein quality? In: Hopkins, A., Gustafsson, T., Bertilsson, J., Dalin, G., Nilsson-Linde, N., Spörndly, E. (Ed.), *Book of Abstracts, 22nd General Meeting of the European Grassland Federation*. Uppsala, Sweden, pp. 82.
- Ellison, N.W., Liston, A., Steiner, J.J., Williams, W.M., Taylor, N.L. (2006): Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium* - Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:688-705.
- Elmeer, K., Sarwath, H., Malek, J., Baum, M., Hamwiah, A. (2011): New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *3 Biotech* 11:91-97.
- Erić, P., Đukić, D., Čupina, B., Mihailović, V. (1996): Krmno bilje-praktikum. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010): Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- FAO (2010): The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fothergill, M., Rees, M.E. (2005): Seasonal differences in polyphenol oxidase activity in red clover. In: Wachendorf, M., Helgadottir, A., Parente, G. (Ed.), *Proceedings of the 2nd COST 852 Workshop Sward Dynamics, N-flows and Forage Utilisation in Legume-Based Systems*. Grado, Italy, pp. 141-144.

- Frame, J. (1990): The role of red clover in United Kingdom pastures. *Outlook on Agriculture* 19(1):49-55.
- Frankel, O.H., Brown, A.H.D. (1984): Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: Holden, J.H.W., Williams, J.T. (Eds), *Crop genetic resources: conservation and evaluation*. George Allen and Unwin, London, pp. 249-257.
- Gonçalves-Vidigal, M.C, Rubiano, L.B. (2001): Development and application of microsatellites in plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* S1: 66-72.
- Gotor, E., Alercia, A., Rao, R.V., Watts, J., Caracciolo, F. (2008): The scientific information activity of Biodiversity International: the descriptor lists. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:757-772.
- Greene, S.L., Gritsenko, M., Vandemark, G. (2004): Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:643-653.
- Grljušić, S., Bolarić, S., Popović, S., Čupić, T., Tucak, M., Kozumplik, V. (2008): Comparison of morphological and RAPD markers in evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) changes caused by natural selection. *Periodicum Biologorum* 110(3):237-242.
- Guarino, L., Jarvis, A., Hijmans, R.J., Maxted, N. (2002): Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources. In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao, V., Brown, A.H.D., Jackson, M.T., (Eds.), *Managing plant genetic diversity*. CAB International, Wallingford, pp. 387–404.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Prasad, M. (2002): Molecular markers: principles and methodology. In: Jain, S.M., Ahloowalia, B.S., Brar, D.S. (Eds.), *Molecular techniques in crop improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 9-54.
- Gupta P.K., Rustgi, S. (2004): Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional and Integrative Genomics* 4:139-162.
- Gupta, M., Sharma, V., Singh, S.K., Chahota, R.K., Sharma, T.R. (2016): Analysis of genetic diversity and structure in a genebank collection of red clover (*Trifolium pratense* L.) using SSR markers. *Plant Genetic Resources*, available on CJO2016. doi:10.1017/S1479262116000034.

- Hartl, D.L., A.G. Clark (1997): Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland.
- He, C., Xia, Z.L., Campbell, T.A., Bauchan, G.R. (2009): Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfalfa germplasms. *Crop Science* 49:2176-2186.
- Hejduk, S., Knot, P. (2010): Effect of provenance and ploidity of red clover varieties on productivity, persistence and growth pattern in mixture with grasses. *Plant Soil and Environment* 56:111-119.
- Herrmann, D., Boller, B., Widmer, F., Kölliker, R. (2005): Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. *Genome* 48:474-486.
- Herrmann, D., Boller, B., Studer, B., Widmer, F., Kölliker, R. (2006): Qtl analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112:536-545.
- Hess, H.E., Landolt, E., Hirzel, R. (1970): Flora der Schweiz, Band 2. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Hsieh, Y.C. (2007): Homals-clustering analysis and its applications in computational sequence analysis. PhD thesis. University of California, USA.
- Isobe, S., Klimenko, I., Ivahuta, S., Gau, M., Kozlov, N.N. (2003): First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasms. *Theoretical and Applied Genetics* 108:105-112.
- Jones, B.A., Muck R.E., Hatfield, R.D. (1995): Red clover extracts inhibit legume proteolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67:329-333.
- Julen, G. (1959): Red clover (in German, original title: Rotklee). In: Kappert, H., Rudolf, W. (Eds.), *Züchtung der Futterpflanzen, Handbuch der Pflanzenzüchtung, Volume IV*. Paul Parey, Berlin-Hamburg, pp. 242-305.
- Kohler, U., Luniak, M. (2005): Data inspection using biplots. *Stata Journal* 5(2): 208-223. <http://www.stata-journal.com/sjpdf.html?articlenum=gr0011>.
- Kölliker, R., Jones, E.S., Drayton, M.C., Dupal, M.P., Forster, J.W. (2001): Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for

- white clover (*Trifolium repens* L.). Theoretical and Applied Genetics 102:416-424.
- Kölliker, R., Herrmann, D., Boller, B., Widmer, F. (2003): Swiss Mattenklees landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). Theoretical and Applied Genetics 107:306-315.
- Kölliker, R., Enkerli, J., Widmer, F. (2006): Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. Molecular Ecology Notes 6:50-53.
- Kolodinska-Brantestam, A., von Bothmer, R., Dayteg, C., Rashal, I., Tuveesson, S., Weibull, J. (2006): Genetic diversity changes and relationships in spring barley germplasm of Nordic and Baltic areas as shown by SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 54:749-758.
- Kongkiatngam, P., Waterway, M.J., Fortin, M.G., Coulman, B.E. (1995): Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.)- Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. Euphytica 84:237-246.
- Kongkiatngam, P., Waterway, M.J., Coulman, B.E., Fortin, M.G. (1996): Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. Euphytica 89:355-361.
- Kouamé, C.N., Quesenberry, K.H. (1993): Cluster analysis of a world collection of red clover germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution 40(1):39-47.
- Kovačić, Z. (1998): Multivarijaciona analiza. Ekonomski fakultet, Beograd.
- Krizsan, S.J., Nyholm, L., Nousiainen, J., Südekum, K.H., Huhtanen, P. (2012): Comparison of *in vitro* and *in situ* methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. Journal of Animal Science 90:3162-3173.
- Kuehbauch, W., Voigtlaender, G. (1981): Calculation of the forage quality of white clover, red clover and lucerne using morphological criteria and/or plant constituents. 3rd report: Yield performance and forage quality of red clover and lucerne with special regard to morphological differentiation. (English summary). Journal of Agronomy and Crop Science 150(5):339-348.
- LaRue, T.A., Patterson, T.G. (1981): How much nitrogen do legumes fix? Advances in Agronomy 34:15-38.

- Makević, M., Đorđević, N., Grubić, G., Jokić, Ž. (2004): Ishrana domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Malik, R., H. Sharma, I. Sharma, K. Sushila, V. Ajay, S. Sheoran, R. Kumar, R. Chatrath (2014): Genetic diversity of agro-morphological characters in Indian wheat varieties using GT biplot. *Australian Journal of Crop Science* 8(9):1266-1271.
- Mantel, N.A. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Marković, J. (2014): Uticaj fenofaze razvića na zastupljenost lignina i hranljivu vrednost lucerke i crvene deteline. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Mertens, D. R. (1997): Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80:1463-1481.
- Michailidis, G., de Leeuw J. (1998): The Gifi System of descriptive multivariate analysis. *Statistical Science* 13(4):307-336.
- Miladinović, M. (2001): Proizvodnja semena krmnog bilja. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
- Milošević, M., Kobiljski, B., Mladenović, G. (2011): Semearstvo 1. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, SP Print, Novi Sad.
- Mohan Jain, S., Brar D.S. (2010): *Molecular techniques in crop improvement*. Springer, New York.
- Morgante, M., Salamini, F. (2003): From plant genomics to breeding practice. *Current Opinion in Biotechnology* 14:214-219.
- Morris, S.L., Greene S.L. (2001): Defining a multiple-use germplasm collection for the genus *Trifolium*. *Crop Science* 41:893-901.
- Morris, J.B., Pederson, G., Quesenberry, K., Wang, M.L. (2009): Clover. In: Singh, R.J. (Eds.), *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, Volume V: Forage crops*. CRC Press, Boca Raton, pp. 207-228.
- Mosjidis, J. A., Klingler K. A. (2006): Genetic diversity in the core subset of the U.S. red clover germplasm. *Crop Science* 46:758-762.

- Mousset-Declas, C. (1992): Le tréfle violet. In: Gallais, A., Bannerot, H. (Eds.), *Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection*. INRA Editions, Paris, pp. 339-348.
- Mukhina, N.A., Khoroshailov, N.G., Kolomiets, T.A., Stankevich, A.K. (1993): *Flora of cultivated plants, volume XIII. Perennial leguminous grasses (Clover, Birdsfoot trefoil)*. Kolos, Moscow.
- Muntean, L., Tamas, E. (2005): The variability of the morphological traits of diploid red clover cultivars studied in Cluj-Napoca environmental conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 33:42-54.
- Muntean L. (2006): The variability of the morphological traits of tetraploid red clover cultivars studied in Cluj-Napoca environmental conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 34:79-87.
- Niwińska, B. (2012): Digestion in Ruminants. In: Chang, C-F. (Eds.), *Carbohydrates - comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology*. InTech, doi: 10.5772/51574. Available from: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/digestion-in-ruminants>.
- OECD 2015. List of varieties eligible for certification. OECD.
<http://www.oecd.org/tad/code/oecdlistofvarietieseligibleforcertification-onlineversion.htm>; <http://www.oecd.org/tad/code/Grasses-and-legumes.pdf>
- Ortiz Ríos, R. (2015): Plant genetic resources for food and agriculture. In: Ortiz Ríos, R. (Eds.), *Plant breeding in the omics era*. Springer International Publishing Switzerland, Cham, pp. 19-39.
- Pagnotta, M.A., Mondini, L., Atallah, M.F. (2005): Morphological and molecular characterization of Italian emmer wheat accessions. *Euphytica* 146:29-37.
- Pagnotta, M.A., Mondini, L., Noorani, A. (2009): Plant genetic resources conservation and plant breeding. In: Huttunen, N., Sinisalo, T. (Eds.), *Plant breeding*. Nova Publisher ISBN: 978-1-60741-624-1. ISBN: 978-1-61668-211-8 on line book.
- Pagnotta, M.A., Annicchiarico, P., Farina, A., Proietti, S. (2011): Characterizing the molecular and morphophysiological diversity of Italian red clover. *Euphytica* 179(3):393-404.

- Pantović, M., Džamić, R., Petrović, M., Jakovljević, M. (1989): Praktikum iz agrohemije. Naučna knjiga, Beograd.
- Papadopoulos, Y.A. and McKersie, B.D. (1983): A comparison of protein degradation during wilting and ensiling of six forage species. *Canadian Journal of Plant Science* 63:903-912.
- Perry, M.C., McIntosh, M.S. (1991): Geographical patterns of variation in the USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. *Crop Science* 31:1350-1355.
- Petrović, M., Dajić-Stevanović, Z., Sokolović, D., Radović, J., Milenković, J., Marković, J. (2014): Study of red clover wild populations from the territory of Serbia for the purpose of preselection. *Genetika* 46(2): 471-484.
- Phelan, P., Moloney, A. P., McGeough, E. J, Humphreys, J., Bertilsson, J., O’Riordan, E. G., O’Kiely, P. (2015): Forage legumes for grazing and conserving in ruminant production systems. *Critical Reviews In Plant Sciences* 34(1-3):281-326.
- Pollet, T. V. (2005): Childlessness and genetic relatedness: their influence on sibling ties in a Post-Industrial society. MSc.Thesis. University of Liverpool, England.
- R Core Team (2015): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rancane, S., Jansone, B., Sparnina, M. (2006): The evaluation of genetic resources of forage legumes collected from natural grassland. In: Lloveras, J., González-Rodríguez, A., Vázquez-Yañez, O., Piñeiro, J., Santamaría, O., Olea, L., Poblaciones, M. J. (Ed.), *Sustainable grassland productivity: Proceedings of the 21st General Meeting of the European Grassland Federation*, Badajoz, Spain, pp. 327-329.
- Riday, H. (2010): Progress made in improving red clover (*Trifolium pratense* L.) through breeding. *International Journal of Plant Breeding* 4(1):22-29.
- Rogers, S.O., Bandich, A.J. (1988): Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. (Eds.), *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. A6:1-10.
- Rohlf, F.J. (2009): NTSYSpC: Numeical Taxonomy System. ver. 2.21c. Exeter Software. Setauket, New York.

- Roldán-Ruiz, I., Van Eeuwijk, F.A., Gilliland, T.J., Dubreuil, P., Dillmann, C., Lallemand, J., De Loose, M., Baril, C.P. (2001): A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1138-1150.
- Rosso, B.S., Pagano, E.M. (2005): Evaluation of introduced and naturalized populations of red clover (*Trifolium pratense* L.) at Pergamino EEA-INTA, Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:507-511.
- Semerikov, V.L., Belyaev A.Y., Lascoux, M. (2002): The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theoretical and Applied Genetics* 106:127-132.
- Smykal, P., Coyne, C.J., Ambrose, M.J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M.W., Berger, J., Greene, S., Nelson, M.N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R.K., Roorkiwal, M., Pandey, M.K., Hu, J., Li, Y.H., Wang, L.X., Guo, Y., Qiu, L.J., Redden, R.J., Varshney, R.K. (2014): Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34(1-3):43-104.
- Statistički godišnjak Republike Srbije (2015): Statistički godišnjak. Republički zavod za statistiku.
http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/repository/documents/00/01/88/51/Statisticki_godisnjak_Srbije_2015.pdf
- Sato, S., Isobe, S., Asamizu, E., Ohmido, N., Kataoka, R., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sakurai, N., Okumura, K., Klimenko, I., Sasamoto, S., Wada, T., Watanabe, A., Kohara, M., Fujishiro, T., Tabata, S. (2005): Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research* 12:301-364.
- Sattler, M.C., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2016): The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243(2):281-296.
- Shannon, C.E., Weaver, W. (1949): *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Sørensen, A.P., Stuurman J., van der Voort, J.R., Peleman, J. (2007): Molecular breeding: maximizing the exploitation of genetic diversity. In: Varshney, R.K.,

- Tuberosa, R. (Eds.), *Genomics-assisted crop improvement: Vol. 1: Genomics approaches and platforms*, Springer, Dordrecht, pp. 31-56.
- Sjodin, J., Ellerstrom, S. (1986): Autopolyploid forage crops. In: Olsson, G. (Eds), *Svalof 1886-1986. Research and results in plant breeding*. LTs forlag, Stockholm, pp. 102-113.
- Simonović, A. (2011): *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*. NNK internacional, Beograd.
- Sokal, R.R., Michener, C.D. (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas science bulletin* 38:1409-1438.
- Sourial, N., C. Wolfson, B. Zhu, B., Quail, J., Fletcher, J., Karunanathan, S., Bandeen-Roche, K., Béland, F., Bergman, H. (2010): Correspondence analysis is a useful tool to uncover the relationships among categorical variables. *Journal of Clinical Epidemiology* 63 (6):638-646.
- Stebler, F.G., Volkart, A. (1913): *Die besten Futterpflanzen. Erster Band. 4. Auflage*. K.J. Wyss, Bern.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar (2007): MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tamminga, S. (1993): Influence of feeding management on ruminant fiber digestibility. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralf J. (Eds.), *Forage cell wall structure and digestibility*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 571-602.
- Taylor, N.L., Smith, R.R. (1979): Red clover breeding and genetics. *Advances in Agronomy* 31:125-154.
- Taylor, N.L., Quesenberry, K.H. (1996): *Red clover science*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Taylor, N.L. (2008): A Century of clover breeding development in the United States. *Crop Science* 48:1-13.
- Thormann, I., Gaisberger, H., Mattei, F., Snook, L., Arnaud, E. (2012): Digitization and online availability of original collecting mission data to improve data quality and enhance the conservation and use of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59(5):635–644.

- Thulin, S., Hill, M., Held, A., Jones, S., Woodgate, P. (2014): Predicting levels of crude protein, digestibility, lignin and cellulose in temperate pastures using hyperspectral image data. *American Journal of Plant Sciences* 5(7):997-1019.
- Tich, D. (2005): Animal feeds, feeding and nutrition, and ration evaluation CD-ROM. Delmar Cengage Learning, New York.
- Tucak, M ; Čupić, T ; Popović, S ; Stjepanović, M ; Gantner, R ; Meglič, V. (2009): Agronomic evaluation and utilization of red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37(2):206-210.
- Tucak, M., Popović, S., Čupić, T., Španić, V., Meglič, V. (2013): Variation in yield, forage quality and morphological traits of red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations and cultivars. *Zemdirbyste-Agriculture* 100(1):63-70.
- Ulloa, O., Ortega, F., Campos, H. (2003): Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome* 46:529-535.
- UPOV (2001): Guidelines for the conduct of test for the distinctness, uniformity and stability. Red clover (*Trifolium pratense* L.).
<http://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg005.pdf>
- Van Soest, P.J. (1963): Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of AOAC International / Association of Analytical Communities* 46(5):829-835.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H. (1967): Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of AOAC International / Association of Analytical Communities* 50(1):50-55.
- Van Soest, P.J. (1985): Composition, fiber quality and nutritive value of forages. In: Heath, M.E., Barnes, E.M., Metcalfe, D.S. (Eds.), *Forages-the science of grassland agriculture*. Iowa State University Press, Ames, pp. 412-444.
- Varshney, R.K., Mahender, T., Aggrawal, R.K., Börner, A. (2007): Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney, R.K., Tuberosa, R. (Eds.), *Genomics-assisted crop improvement, Vol I: Genomics approaches and platforms*. Springer, Dordrecht, pp. 13–30.

- Varshney, R.K., Nayak, S.N., May, G.D., Jackson, S.A. (2009): Next generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27(9): 522-530.
- Vasiljević, S., Šurlan-Momirović, G., Živanović, T., Ivanović, M., Mihailović, V., Mikić, A., Katić, S., Milić, D. (2006): Genetic analysis of inheritance and mutual relationships among yield components, morphological-biological traits and yield of green mass of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genetika* 38(1):1-8.
- Vasiljević, S., Milić, D., Mikić, A. (2009): Chemical attributes and quality improvement of forage legumes. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25:5-6, I 493-504.
- Vasiljević, S., Mikić, A., Pataki, I. (2011): Semearstvo crvene deteline. In: Milošević, M., Kobiljski, B. (Eds.), *Semearstvo II*. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, pp. 665-726.
- Vasiljević, S., Šurlan-Momirović, G., Živanović, T., Ivanović, M., Mihailović, V., Mikić, A., Katić, S., Milić, D. (2006): Genetic analysis of inheritance and mutual relationships among yield components, morphological-biological traits and yield of green mass of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genetika* 38(1):1-8.
- Vizintin, L., Javornik, B., Bohanec, B. (2006): Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. *Plant Science* 170: 859-866.
- Vieira, E.A., Carvalho, F.I.F., Bertan, I., Kopp, M.M., Zimmer, P.D., Benin, G., Silva, J.A.G., Hartwig, I., Malone, G., Oliveira, A.C. (2007): Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology* 30:392-399.
- Vučković, S. (1999): *Krmno bilje - monografija*. Izdavač: Institut "Srbija" i "Bonart".
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Vymyslicky, T., Smarda, P., Pelikan, J., Cholastova, T., Nedelnik, J., Moravcova, H., Pokorny, R., Soldanova, M., Polakova, M. (2012): Evaluation of the Czech core collection of *Trifolium pratense*, including morphological, molecular and phytopathological data. *African Journal of Biotechnology* 11(15):3583-3595.

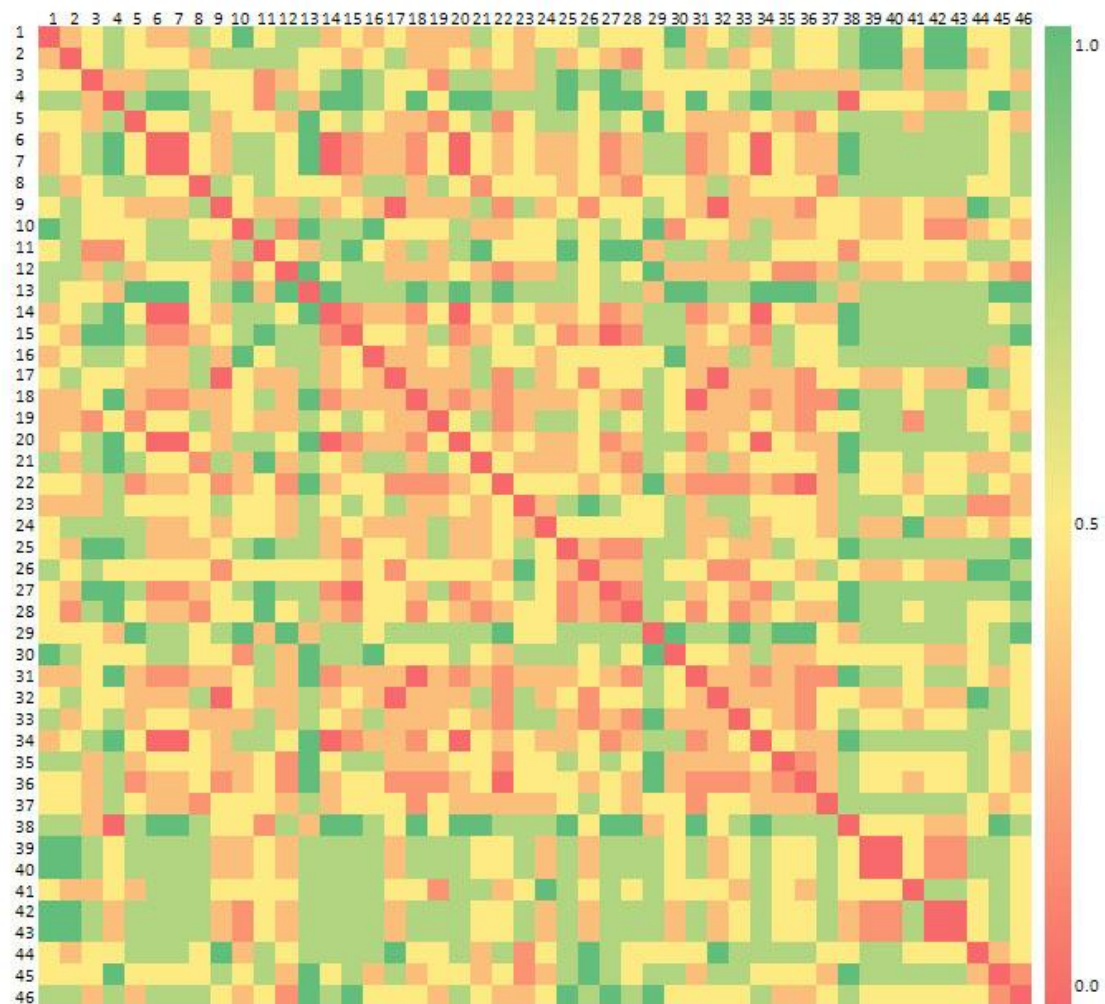
- West, M.A.L., Kim, K., Kliebenstein, van Leeuwen, H., Michelmore, R.W., Doerge, R.W., St Clair, D.A. (2006): Global eQTL mapping reveals the complex genetic architecture of transcript-level variation in *Arabidopsis*. *Genetics* 175:1441–1450.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218:704-740.
- Williams, W. M., Nichols, S. N. (2010): *Trifolium*. In: Kole, C. (Eds.), *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Legume crops and forages*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 249-272.
- Wioncek, J., Krzaczek, K., Marcinek, K., Hulewicz, T. (1976): Phenotypic correlations within some characters of mother plants and their offspring in red clover (*Trifolium pratense* L). I. Studies on diploid. *Genetica Polonica* 17:171-179.
- Xu, J., Liu, L., Xu, Y., Chen, C., Rong, T., Ali, F., Zhou, S., Wu, F., Liu, Y., Wang, J., Cao, M., Lu, Y. (2013): Development and characterization of simple sequence repeat markers providing genome-wide coverage and high resolution in maize. *DNA Research* 20:497-509.
- Zainol, R. (2008): Molecular genetic analysis of key traits in red clover (*Trifolium pratense* L.). Ph.D. Thesis, Aberystwyth University, UK.
- Zeven, A.C., de Wet, J.M.T (1982): *Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity*. International Book Distributors, Wageningen.
- Zhang, H., Chen, M., Tian, H., Cai, H., Liu, Y., Xiong, J. (2012): A study on the variation in phenotypic characters of wild red clover. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* 2012(01): 44-49.
- Zohary, M., Heller, D. (1984): *The genus Trifolium*. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.
- Zuk-Golaszewska, K., Purwin, C., Pysera, B., Wierzbowska, J., Golaszewski, J. (2010): Yields and quality of green forage from red clover di- and tetraploid forms. *Journal of Elementology* 15(4):757-770.

PRILOG

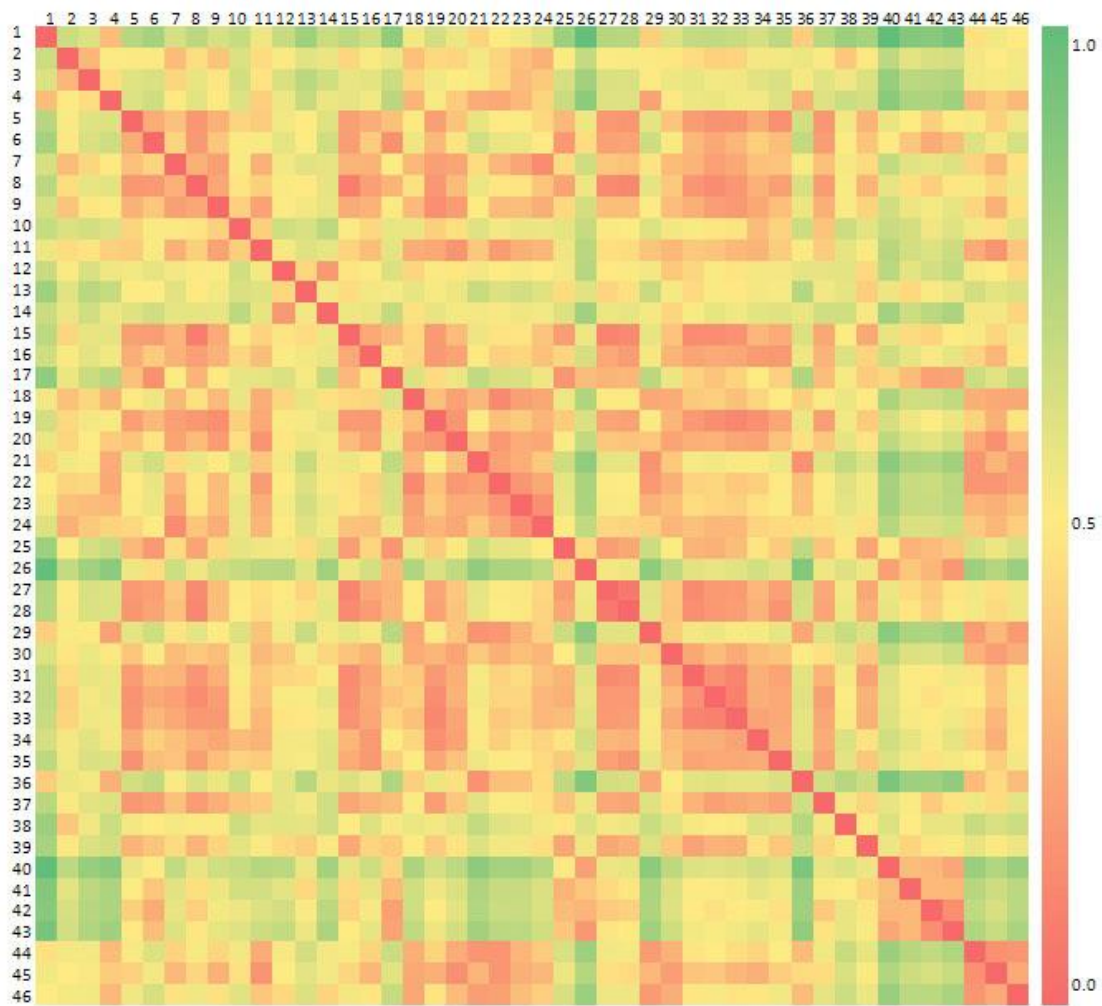
Prilog 1. Vizuelne ocene pet morfoloških osobina 46 genotipova crvene dateline (VC-vreme cvetanja; FR-forma rasta; MS-maljavost stabljike; BL-boja lista; IOP-intenzitet obojenosti pege na listu).

Genotip	VC	FR	MS	BL	IOP
NCPGRU2	3	5	1	7	9
NCPGRU3	3	3	1	7	3
NCPGRU4	5	5	1	5	3
NCPGRU5	5	7	1	5	1
Violeta	3	5	7	5	3
Nessonas	3	5	3	7	5
Mercury	3	5	3	7	5
Lemmon	5	3	3	7	3
SA1	3	5	3	5	1
SA3	1	7	3	5	3
SA4	5	5	1	5	1
BGR1	1	5	3	5	3
BGR2	5	3	1	3	1
BGR3	3	5	3	7	5
Diana	3	3	3	7	5
Dicar	3	5	5	7	1
Nemaro	3	5	3	5	1
Una	3	5	3	7	3
Avala	3	5	1	5	3
Marina	3	5	3	7	5
Amos	1	3	3	7	3
NS-Mlava	3	5	3	5	3
Italia centrale	1	5	1	7	3
Bolognino	1	5	3	7	1
Marino	3	3	3	7	2
Renova	3	3	3	5	1
Titus	3	3	3	7	5
Rotra	3	3	3	7	3
Kora	5	1	1	7	1
Vivi	7	7	3	5	3
Lucrum	3	5	3	7	3
Noe	3	5	3	5	1
Violetta	3	3	3	5	3
Britta	3	5	3	7	5
Krano	9	5	3	5	3
Triton	3	5	3	5	3
Lutea	5	5	3	7	3
Bjorn	5	7	1	5	1
Bradlo	1	9	3	5	1
Čortanovci	1	9	3	5	1
89 E-0	3	9	1	5	3
91 E-44	1	7	3	5	1
91 E-63	1	7	3	5	1
Sofia52	1	7	1	7	3
Fertody	1	5	5	7	3
Quinekel	1	5	5	5	3

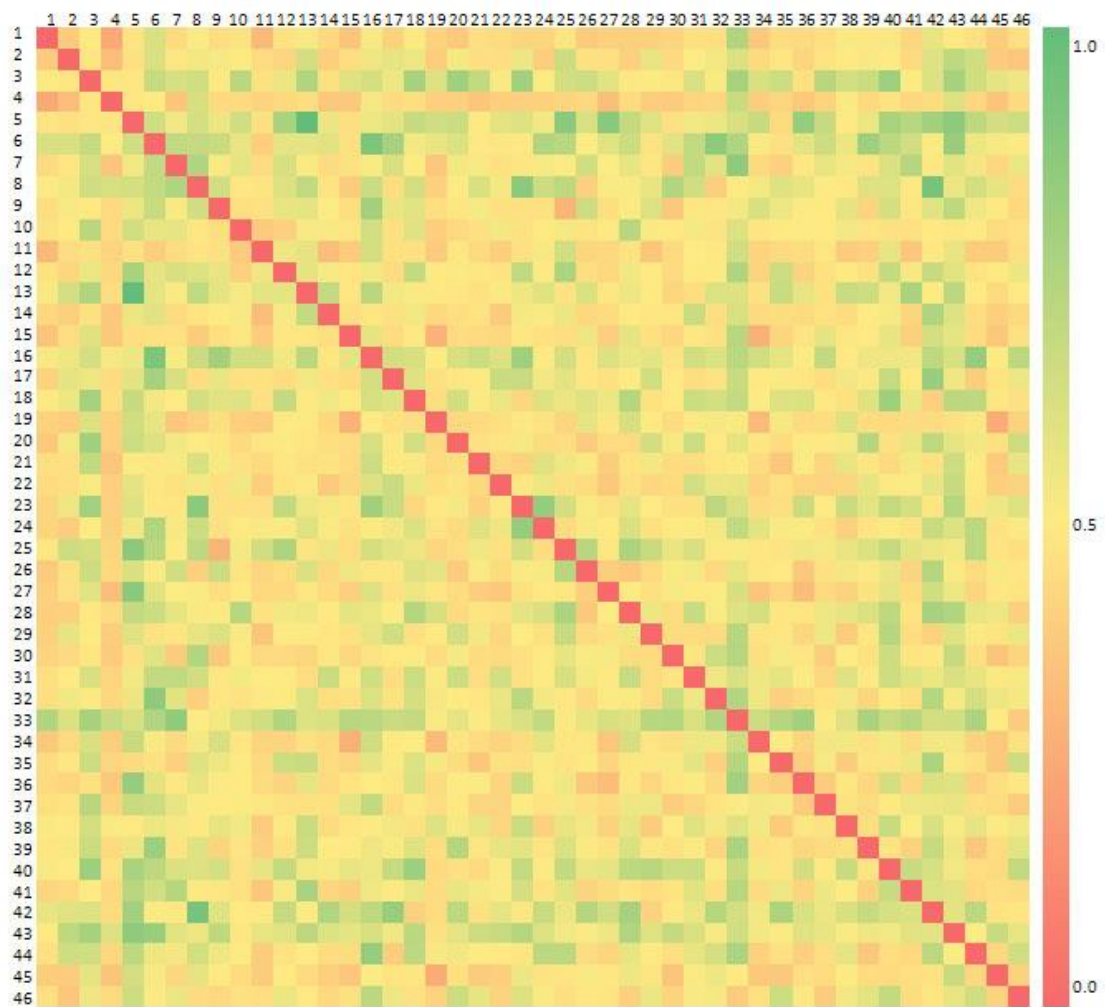
Prilog 2. Matrica genetičkih distanci između 46 genotipova crvene deteline izračunatih prema *simple matching* koeficijentu sličnosti na osnovu morfoloških osobina (Genotipovi crvene deteline su označeni brojevima od 1 do 46)



Prilog 3. Matrica Euklidskih distanci između 46 genotipova crvene deteline na osnovu agronomskih osobina (Genotipovi crvene deteline su označeni brojevima od 1 do 46)



Prilog 4. Matrica genetičkih distanci između 46 genotipova crvene deteline izračunatih prema *Dice* koeficijentu sličnosti na osnovu SSR markera (Genotipovi crvene deteline su označeni brojevima od 1 do 46)



BIOGRAFIJA

Irena Radinović je rođena 19.07.1975. u Zemunu. Nakon osnovne škole pohađala je X gimnaziju opšteg smera "Mihajlo Pupin". Diplomirala je 2003. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Biologija. Radno iskustvo i angažovanje je obuhvatalo rad na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu gde je tokom dve godine bila saradnik na projektima i na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu gde je tokom dve školske godine bila saradnik u nastavi. Zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, gde učestvuje u izvođenju nastave na predmetima koji pripadaju užoj naučnoj oblasti Genetika. U saradnji sa drugim autorima objavila je 16 naučnih radova iz oblasti Genetika i oplemenjivanja biljaka i koautor je jedne monografije. Učestvovala je u realizaciji četiri projekta koje je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Član je Društva selekcionera i semenara Srbije i Društva genetičara Srbije. Govori engleski a služi se ruskim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Irena Radinović

broj indeksa 11/40

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Varijabilnost genotipova crvene deteline na osnovu agronomskih osobina, morfoloških i

mikrosatelitskih markera

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.11.2016.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Irena Radinović

Broj indeksa 11/40

Studijski program Poljoprivredne nauke-Ratarstvo i povrtarstvo

Naslov rada Varijabilnost genotipova crvene deteline na osnovu agronomskih osobina, morfoloških i mikrosatelitskih markera

Mentor prvi mentor: docent dr Gordana Branković; drugi mentor: dr Sanja Vasiljević

Potpisani/a Irena Radinović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.11.2016.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Varijabilnost genotipova crvene deteline na osnovu agronomskih osobina,

morfoloških i mikrosatelitskih markera

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.11.2016.

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.