

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tijana B. Banjanac

FIZIOLOŠKI I MOLEKULARNO-GENETIČKI
POKAZATELJI MEĐUVRSNE
HIBRIDIZACIJE U OKVIRU RODA
CENTAURIUM HILL (GENTIANACEAE)

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tijana B. Banjanac

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR
GENETIC INDICATORS OF
INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION WITHIN
THE GENUS *CENTAURIUM* HILL
(*GENTIANACEAE*)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTORI:

Dr Branislav Šiler, viši naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Mihailo Jelić, docent,

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Danijela Mišić, viši naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Marijana Skorić, naučni saradnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 173024), u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem svojim mentorima dr Branislavu Šileru i dr Mihailu Jeliću na pruženoj nesebičnoj stručnoj pomoći, rečima ohrabrenja, toleranciji i velikom razumevanju. Veliku zahvalnost dugujem i dr Danijeli Mišić na velikoj stručnoj pomoći, ali i uvek prisutnim rečima i delima podsticaja, usmeravanja i vođenja koje su mi pomogle da istrajem. Teško je opisati i zahvalnost koju dugujem i dr Milanu Dragičeviću koji je mnogo truda i vremena uložio pokušavajući da me uputi u tajne statistike i natera da razmišljam na neki drugi način. Dr Marijani Skorić, uvek spremnoj da svojim velikim iskustvom pomogne u rešavanju interesantnih problema i svojim smernicama uputi na ispravne zaključke, dugujem pored stručne i veliku ličnu i prijateljsku zahvalnost.

Zahvaljujem se dr Ani Simonović na istrajnosti u realizaciji sekvenciranja transkriptoma kičice i profesoru Saši Malkovu za savete koji su pomogli adekvatnu bioinformatičku obradu podataka. Posebnu zahvalnost dugujem i profesoru Dmitru Lakušiću koji je sa velikim entuzijazmom pomogao oko rešavanja svih pitanja vezanih za taksonomiju. Deo istraživanja ove disertacije urađen je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo uz podršku dr Valentine Đorđević. Takođe za deo rezultata koji se tiču nivoa ploidije zahvalnost dugujem profesoru Borutu Bohaneću sa Univerziteta u Ljubljani. Posebnu zahvalnost dugujem Nedi Đedović zbog započetih genetičkih analiza vrsta kojima se bavi ova doktorska disertacija. Za preliminarne kvalitativne analize sekundarnih metabolita zahvalna sam Urošu Gašiću sa Hemijskog fakulteta, a za stručnu savete oko postupanja sa uzorcima biljaka zahvaljujem se Urošu Buzuroviću iz Prirodnjačkog muzeja. Profesorki Aneti Sabovljević zahvaljujem na podršci u pravcu mojih istraživanja.

Veliko hvala svim divnim koleginicama i kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka: dr Suzani Živković, dr Dragani Božić, dr Slađani Todorović, dr Milici Bogdanović, dr Slavici Dmitrović, dr Biljani Filipović, Milici Milutinović, Jeleni Boljević i Nedi Aničić na podršci, razumevanju i toleranciji. Posebno hvala dr Jasmini Nestorović Živković bez čije pomoći bi se eksperimentalni deo neizmerno produžio. Nabilu Galavenžiju hvala za stručnu pomoć gajenja biljaka u stakleniku i prijateljskom razgovoru. Dr Stevanu Avramovu sa Odeljenja za evolucionu biologiju se zahvaljujem na stručnim savetima i podršci na terenskim istraživanjima.

Zahvalnost za divnu temu ove doktorske disertacije i ljubav prema kičicama, koju je podelio sa mnom, dugujem profesoru Dragoljubu Grubišiću.

Veliko hvala suprugu Mariju Belamariću na bioinformatičkom radu, ali i na ljubavi, razumevanju i podršci bez koje ne bih mogla. Hvala mami i tati.

Za Matiju i Luku

Fiziološki i molekularno-genetički pokazatelji međuvrsne hibridizacije

u okviru roda *Centaurium* Hill (*Gentianaceae*)

REZIME

Vrste roda *Centaurium* Hill često hibridizuju u prirodi. Brojni primeri ukazuju na značaj poliploidizacije i hibridizacije tokom specijacije u okviru ovog roda.

Ukrštanjem *Centaurium erythraea* Rafn \times *C. littorale* (Turner) Gilmour u uslovima *in vitro*, dobijeno je alotetraploidno potomstvo, što ide u prilog hipotezi postojanja nedovoljno efikasnih prereproduktivnih barijera, koje bi sprečavale hibridizaciju. Primjenjene metode za detekciju hibridnih jedinki u uslovima *in vitro* su uspešno iskorišćene i u slučaju prirodnih populacija poreklom sa Subotičko-horgoške peščare. Novi takson, nazvan *Centaurium pannonicum*, je heksaploid nastao iz ukrštanja *C. erythraea* \times *C. littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kischner, nakon fertilizacije, tj. spajanja diploidnog i tetraploidnog jedra. *De novo* razvijeni *EST-SSR* markeri ukazuju da *C. pannonicum* konvergira vrsti *C. erythraea*, dok je prema fitohemijskim markerima hibridni takson sličniji *C. littorale* ssp. *compressum*. Razvijeni setovi *EST-SSR* i fitohemijskih markera, su transferabilni i na druge vrste roda *Centaurium*, i mogu značajno doprineti daljim istraživanjima međuvrsne hibridizacije.

C. pannonicum stabilno održava svoju heksaploidnu genetičku konstituciju u prirodnim populacijama, umnogome zahvaljujući samooplodnji i/ili drugim vidovima ukrštanja u srodstvu.

Ključne reči: *Centaurium*, hemotaksonomski markeri, *EST-SSR*, međuvrsna hibridizacija, polimorfizam, poliploidija, *RAPD*

Physiological and molecular genetic indicators of interspecific hybridization
within the genus *Centaurium* Hill (*Gentianaceae*)

ABSTRACT

Species of genus *Centaurium* Hill readily hybridize in natural habitats. Plenty of evidence reveal the importance of polyploidization and hybridization as evolutionary mechanisms responsible for speciation within this genus.

Allotetraploids obtained from *Centaurium erythraea* Rafn \times *C. littorale* (Turner) Gilmour cross under *in vitro* conditions supported hypothesis that pre-reproductive barriers existing in these species are poorly efficient in preventing hybridization. Implemented methodology for the detection of hybrid individuals were successfully applied in natural populations from Subotica-Horgoš sands. New taxon, named *Centaurium pannonicum*, is a hexaploid hybrid arisen from *C. erythraea* \times *C. littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kischner cross, after fertilization, i.e. joining of diploid and tetraploid nuclei. *De novo* developed EST-SSR markers suggested that hybrid taxon converges to *C. erythraea*. As revealed by the selected set of phytochemical markers, *C. pannonicum* was more similar to *C. littorale* ssp. *compressum*. Developed sets of EST-SSR and phytochemical markers are transferable to other *Centaurium* species and could facilitate further investigation of interspecific hybridization within the genus.

C. pannonicum maintains its hexaploidy in natural populations by self-fertilization and/or other forms of positive assortative crossing.

Keywords: *Centaurium*, chemotaxonomic markers, EST-SSR, interspecific hybridization, polymorphism, polyploidy, RAPD

SADRŽAJ:

UVOD	1
Poliploidija, hibridizacija i specijacija kod biljaka	2
Mehanizmi reproductivne izolacije biljaka	4
Nastanak i održavanje poliploidnih i/ili hibridnih taksona	5
Promene na genetičkom materijalu uslovljene hibridizacijom i poliploidizacijom	12
Učestalost hibridizacije i poliploidije kod biljnih taksona.....	15
Rod <i>Centaurium</i> Hill	16
Poliploidija i međuvrsna hibridizacija u okviru roda <i>Centaurium</i> Hill	25
Proučavanje genetičke varijabilnosti prirodnih biljnih populacija.....	30
DNK molekularni markeri.....	31
Sekundarni metaboliti roda <i>Centaurium</i> kao fitohemijski markeri genetičke varijabilnosti	39
CILJEVI RADA.....	47
MATERIJAL I METODE.....	48
Biljni materijal korišćen u analizama	48
Sakupljanje biljnog materijala	54
Gajenje biljaka u kulturi <i>in vitro</i>	54
Gajenje biljaka u stakleniku za potrebe fitohemijskih analiza.....	55
Eksperimentalna hibridna ukrštanja u uslovima <i>in vitro</i>	55
Analiza ploidnosti metodom protočne citometrije	58
Analiza genetičkog diverziteta populacija molekularnim markerima.....	59
Izolacija DNK za analizu molekularnim markerima	59
RAPD-PCR analiza.....	60
EST-SSR analiza	65
Analiza sadržaja sekundarnih metabolita.....	75
Priprema uzoraka za fitohemijske analize	75
Statistička obrada podataka i vizuelno predstavljanje rezultata.....	80

Analiza i vizuelizacija podataka dobijenih molekularnim markerima.....	80
Predstavljanje i vizuelizacija podataka dobijenih fitohemijskom analizom	81
REZULTATI.....	84
Ploidnost biljka korišćenih u eksperimentima međuvrsnog ukrštanja i ploidnost populacija.....	84
Eksperimentalna međuvrsna ukrštanja	84
Analiza genetičke varijabilnosti vrsta roda <i>Centaurium</i> primenom <i>RAPD</i> molekularnih markera	87
Informativnost podataka dobijenih <i>RAPD</i> molekularnim markerima i elektroforetski profili ..	87
<i>PCoA</i> analiza <i>RAPD</i> podataka.....	88
Hijerarhijska analiza klastera <i>RAPD</i> podataka	90
Analiza genetičke varijabilnosti vrsta roda <i>Centaurium</i> <i>EST-SSR</i> molekularnim markerima	92
Razvoj <i>EST-SSR</i> markera	92
Elektroforetski profili i genetički diverzitet populacija određen pomoću <i>EST-SSR</i> molekularnih markera	97
<i>PCoA</i> analiza <i>EST-SSR</i> podataka	103
Hijerarhijska analiza <i>EST-SSR</i> podataka	105
Analiza multilokusnih fenotipova	107
Analiza sadržaja sekundarnih metabolita.....	109
Analiza osnovnih komponenti (<i>PCA</i>).....	119
Hijerarhijska analiza klastera fitohemijskih podataka	122
Linearna diskriminantna analiza (<i>LDA</i>)	124
DISKUSIJA	126
Eksperimentalna ukrštanja kao model sistem za proučavanje međuvrsne hibridizacije	127
Izbor konkretnog potencijalnog primera međuvrsne hibridizacije u prirodnim uslovima u okviru roda <i>Centaurium</i>	131
Preliminarne analize međuvrsne hibridizacije prirodnih populacija	134
Analiza ploidnosti.....	134
Primena <i>RAPD</i> molekularne analize u razmatranju međuvrsne hibridizacije	134
Primena <i>EST-SSR</i> molekularne analize u razmatranju međuvrsne hibridizacije	138

Razvoj mikrosatelitskih molekularnih markera.....	138
Genetička struktura populacija na osnovu <i>EST-SSR</i> markera.....	142
Doprinos kvantitativne hemijske analize razmatranju međuvrsne hibridizacije roda <i>Centaurium</i>	151
Aloheksaploidni takson <i>C. pannonicum</i>	155
Mogući mehanizmi nastanka i održavanja aloheksaploidnih populacija <i>C. pannonicum</i>	159
Održavanje aloheksaploidnih populacija <i>C. pannonicum</i>	161
ZAKLJUČCI	164
LITERATURA.....	166
PRILOG	194
Tabela S1:.....	194
Tabela S2:.....	197
BIOGRAFIJA AUTORA	200

Prilog 1- Izjava o autorstvu

Prilog2- Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Prilog 3-Izjava o korišćenju

UVOD

“Each species is a small universe in itself, from its genetic code to its anatomy, behavior, life cycle, environmental role, a self-perpetuating system created during an almost unimaginably complicated evolutionary history. Each species merits careers of scientific study and celebration by historians and poets.”

„Svaka vrsta je mali univerzum za sebe, od svog genetičkog koda do svoje anatomije, ponašanja, životnog ciklusa, uloge u okruženju, samoodrživi sistem nastao tokom gotovo nezamislivo komplikovane evolucione istorije. Svaka vrsta je dostojna naučno-istraživačke karijere i slave istoričara i pesnika.“

The encyclopedia of life; Edward O. Wilson, 2003

Iako naučnici intenzivno opisuju vrste već nekoliko vekova, još uvek ne postoji konsenzus o tome koliko vrsta danas živi na Zemlji. Do sada je opisano između 1,5 i 1,8 miliona vrsta (Wilson 2003), a najbolje su proučene grupe kičmenjaka i biljaka cvetnica. Međutim, broj opisanih vrsta cvetnica se svake godine poveća za oko 2000 novih vrsta, dok procene o njihovom ukupnom broju variraju i kreću se od 272.000 do 300.000 vrsta (Wilson 2003). Uzrok i priroda specijacije biljnih vrsta su zbog toga važni za razumevanje porekla i načina održavanja ovako velikog učešća biljnih taksona u opštem biološkom diverzitetu. Jedna od najupadljivijih razlika između biljaka i životinja je veoma velika učestalost poliploidije i hibridizacije među biljnim taksonima, nasuprot vrlo oskudnim primerima ovih procesa kod životinja (Orr 1990; Mable 2004; Vrijenhoek 2006). Smatra se da je hibridna specijacija u velikoj meri doprinela diverzitetu cvetnica (Soltis i Soltis 2009). Takođe, jedan od osnovnih evolucionih trendova vaskularnih biljaka predstavlja uvećanje broja garnitura hromozoma, tj. poliploidija (Soltis, Soltis i Rieseberg, 1993; Bretagnolle i Thompson, 1995; Ramsey i Schemske, 1998; Soltis, Soltis i Tate, 2004; Soltis i sar., 2010). Da bismo razumeli procese specijacije kod biljaka, poreklo adaptacija i održavanje raznovrsnosti biljnih vrsta, potrebno je da metodički proučimo procese formiranja novih vrsta, kao i njihovu adaptaciju u ekosistemima koji ih okružuju.

Poliploidija, hibridizacija i specijacija kod biljaka

Poliploidija je stanje u kome ćelija, organizam ili deo organizma sadrži **jedan ili više dodatnih setova hromozoma**, odnosno haploidni set hromozoma je umnožen tri ili više puta. Poliploidija nastaje kao rezultat nerazdvajanja hromozoma tokom mitoze ili mejoze. Kod biljaka se poliploidija može javiti na nivou pojedinačnih ćelija i tkiva (endopoliploidija), a takođe je učestala i pojava poliploidnih individua i populacija. Endopoliploidija je kod biljaka zabeležena u različitim tkivima i organima, uključujući i endosperm, plodove, listove, trihome ili kotiledone.

Hibridizacija predstavlja proces ukrštanja (kroz seksualnu reprodukciju) različitih, genetički diferenciranih jedinki ili populacija, pa čak i vrsta. U savremenoj literaturi pod „hibridizacijom“ (u širem kontekstu) se najčešće podrazumevaju sva ukrštanja između genetički diferenciranih grupa, bez obzira na taksonomski status (Tucić, 2003; Soltis i Soltis,

2009). Ipak, termin „međuvrsna hibridizacija“ (eng.: *interspecific hybridisation*) se koristi u naučnoj literaturi za opisivanje načina nastanka novih taksona putem ukrštanja različitih vrsta, kao i izraz „unutarvrsna hibridizacija“ (eng.: *intraspecific hybridisation*) koji se koristi kada govorimo o ukrštanju varijeteta, rasa, sorti ili populacija jedne vrste (Volker, Potts i Borralho 2007; Rosenthal, Ramakrishnan i Cruzan 2008; Santos i sar., 2012). Potomstvo nastalo hibridizacijom može biti fertilno, delimično fertilno ili sterilno.

Procesi poliploidizacije i hibridizacije se, posebno kod biljaka, često javljaju zajedno i često imaju važnu ulogu u specijaciji: poliploidija može pratiti hibridizaciju između blisko srodnih, genetički nediferenciranih taksona (autopoliploidija) ili može pratiti međuvrsnu hibridizaciju (alopoliploidija) (Arnold, 1997; Soltis i Soltis, 2009). Međutim, svaki od ovih procesa može se posmatrati i odvojeno, jer mnogi poliploidi nisu i hibridi i obrnuto (Otto i Whitton 2000).

Bez obzira da li se uvećao broj setova hromozoma, formiranje međuvrsnih hibrida može i ne mora voditi specijaciji. Kada jednom dođe do hibridizacije, mogući su različiti ishodi: nastajanje malih hibridnih linija i razvoj tzv. „hibridnih rojeva“ (eng.: *hybrid swarm*; roj, jato gomila), razvoj nove homoploidne hibridne vrste, razvoj nove autopoliploidne ili aloploidne hibridne vrste, ili, pak, izumiranje hibridnih jedinki (Soltis i Soltis 2009). Hibridni rojevi predstavljaju pojavu ekstremno varijabilnih populacija sastavljenih od roditeljskih i hibridnih jedinki (javljaju se kada dođe do preklapanja staništa dve, međusobno fertile vrste), gde dolazi do ukrštanja među hibridima kao i povratnih ukrštanja sa roditeljskim taksonima. Njihove genetičke i fenotipske karakteristike veoma variraju u opsezima karakteristika oba roditeljska taksona, a često se javljaju i jedinke sa nespecifičnim brojem hromozoma (poliploidi sa neparnim brojem hromozomskih garnitura i/ili aneuploidi) (Keim i sar., 1989).

Specijacija označava procese nastanka dve ili više novih vrsta od jedne ili više predačkih vrsta (Tucić 2003). Hibridizacija i poliploidizacija biljnih taksona su procesi koje su posebno značajni kada vode ka specijaciji (Rieseberg 1998; Rieseberg i sar., 2003; Chapman i Burke 2007; Soltis i Soltis 2009) i imaju osnovnu i ključnu ulogu u evoluciji i ekološkim adaptacijama biljnih vrsta.

Mehanizmi reproduktivne izolacije biljaka

Koncepcija vrste je jedno od ključnih pitanja biologije, ali ne možemo reći da je među biologima postignuta saglasnost oko odgovora na pitanja šta su vrste i kako one nastaju (Tucić 2003). Sa stanovišta evolucione biologije je možda najprihvatljivija formulacija proširene biološke koncepcije vrste koju je dao Ernst Majer (Mayr 1982): “Vrste su reproduktivne zajednice populacija (reproduktivno izolovane od drugih zajednica), koje se međusobno ukrštaju, stvarno ili potencijalno, i koje zauzimaju specifičnu nišu u prirodi“. Mnogo više problema sa biološkom koncepcijom vrste imaju botaničari, nego zoolozi uravo zbog česte pojave poliploidije, hibridizacije, aseksualnog razmnožavanja i samooplodnje, kao i velike fenotipske plastičnosti biljaka. Zbog navedenih razloga, mehanizmi reproduktivne izolacije, čija je uloga upravo sprečavanje hibridizacije, moraju biti izloženi na ovom mestu.

U zavisnosti od toga da li sprečavaju formiranje hibridnog zigota, ili smanjuju vijabilnost ili fertilitnost hibrida, uobičajena je klasifikacija na prefertilizacione (prezigotske) i postfertilizacione (postzigotske) mehanizme reproduktivne izolacije.

Prefertilizacioni mehanizmi reproduktivne izolacije obuhvataju (Tucić 2003):

- **Ekološku** izolaciju, koja se sreće kod organizama koji naseljavaju različita mikrostaništa jednog staništa. Ovaj oblik izolacije se često sreće kod biljaka. Takođe, kod entomofilnih biljnih vrsta, oprašivači često imaju glavnu ulogu u izolaciji vrsta. Naklonjenost i efikasnost pojedinih grupa oprašivača prema određenoj biljnoj vrsti može poslužiti kao efikasna barijera razmeni polena među vrstama;
- **Sezonsku** ili **temporalnu** izolaciju, koja se kod biljaka odnosi na poklapanje vremena cvetanja, koje se, pak, može meriti satima ili čak godinama;
- **Mehaničku** izolaciju, koja podrazumeva postojanje mehaničkih barijera koje sprečavaju oplođenje. Ovakva izolacija je češća kod biljaka koje imaju cvetove složene građe (npr. oprašivanje ne uspeva usled razlika u morfologiji cvetova);
- **Gametsku** izolaciju koja se odnosi na odsustvo hemijske atraktivnosti između muških i ženskih gameta ili se ogleda u invijabilnosti muških gameta u ženskim

polnim organima (npr. inkompatibilnost polena i stigme, konkurencija polenovih cevi i slično).

Postfertilizacioni mehanizmi reproduktivne izolacije obuhvataju:

- **Hibridnu invijabilnost**, koja podrazumeva neuspešno razviće eventualno nastalog hibrida između dve vrste;
- **Hibridnu sterilnost**, koja podrazumeva da su hibridi između vrsta (F_2 generacija) vijabilni, ali su ili potpuno sterilni ili daju F_2 generaciju u kojoj postoji čitav niz genetičkih poremećaja.

Razmatrajući sve ove potencijalne izolacione mehanizme koji obično razdvajaju vrste, možda je iznenađujuće da biljne vrste uopšte hibridizuju. Međutim, imajući u vidu brojne primere međuvrsne hibridizacije kod biljaka (Rieseberg 1995; Smith, Burke i Wagner 1996; Whitney i sar., 2010; Zozomová-Lihová i sar., 2014) i, takođe, visoku učestalost alopoliploidije kod biljaka (Otto i Whitton, 2000; Soltis, Soltis i Tate, 2004; Jiao i sar., 2011), postaje jasno da ovi izolacioni mehanizmi često nisu dovoljno efikasni (Soltis i Soltis 2009). Mala promena u ponašanju oprašivača, mali pomak u vremenu cvetanja, hromozomska mutacija koja poboljšava mejotičko uparivanje hromozoma i na taj način povišava fertilitet, može biti dovoljno da omogući hibridizaciju i eventualno uspostavljanje hibridnih individua (Soltis i Soltis, 2009).

Većina evolucionih biologa danas smatra da se prefertilizacioni i postfertilizacioni mehanizmi reproduktivne izolacije ne javljaju kao adaptacije, karakteristike selekcionisane iz razloga da podstaknu specijaciju ili očuvaju identitet vrste, već kao posredni proizvodi genetičkih promena koje se odigravaju iz drugih razloga (Tucić, 2003).

Nastanak i održavanje poliploidnih i/ili hibridnih taksona

Postoje dva osnovna načina postanka novih vrsta putem brzih genetičkih promena u uslovima simpatrije. To su homoploidna hibridna specijacija i poliploidizacija (Tucić, 2003).

Homoploidna hibridna specijacija se zasniva na ukrštanju dve dva taksona istog nivoa ploidije pri čemu i hibridno potomstvo ostaje istog nivoa ploidije (Soltis i Soltis, 2009).

Opšti model homoploidne hibridne specijacije dao je Templton (Templeton, 1981). Polazna pretpostavka modela je da se dva roditeljska taksona (sa istim nivoom ploidijske) moraju međusobno razlikovati u prisustvu dva ili više hromozomskih rearanžmana (na primer, translokacija). Iako je najveći procenat ovako nastalih gameta invijabilan, njihov delimično sterilan hibrid može tokom segregacije i rekombinacije da stvori nove tipove homozigotnih kariotipova za te rearanžmane. Novostvoreni kariotipovi mogu biti međusobno fertilni, ali su, bar delimično, sterilni kada se ukrste sa roditeljskim vrstama. Posle hibridizacije sledi ukrštanje u srodstvu i sniženje fertilnosti u sledećim generacijama (eng.: *hybrid breakdown*) usled hromozomske i genske inkompatibilnosti. Ipak, retke hibride koji imaju najvišu fertilnost i vijabilnost favorizuje prirodna selekcija. Reproductivna izolacija od roditeljskih vrsta je preduslov za stabilizaciju novih hibridnih genotipova. Ona najverovatnije nastaje kao nusproizvod selekcije za povećanu fertilnost i vijabilnost. Kada je hibridni genotip stabilizovan, da bi došlo do specijacije, on mora da se nađe u novoj ekološkoj niši, bez obzira da li se i dalje nalazi u simpatriji sa roditeljskim vrstama (Tucić, 2003).

Postoje dva načina **specijacije poliploidizacijom**, putem **autopoliploidije** ili **alopoliploidije**. Koncept autopoliploidije i aloploidije su prvi predložili Kihara i Ono (1926).

Nastanak poliploidnog tkiva kod biljaka se može odvijati preko somatskog dupliranja ili, češće, putem mehanizama nerazdvajanjem hromozoma tokom gametogeneze (Soltis, Soltis i Tate, 2004). Somatsko dupliranje, koje obuhvata izostanak deobe ćelije nakon mitotičkog udvajanja hromozoma u zigotskoj, embrionalnoj ili meristemskoj fazi životnog ciklusa biljke, dovodi do stvaranja poliploidnog tkiva i mogućeg formiranja poliploidnog potomstva. Kod biljaka može doći do izostanka redukcije broja hromozoma pri formiranju polena i jajnih ćelija (Otto i Whitton, 2000). Iako postoji mnogo primera nastanka poliploida putem somatskog dupliranja (Ramsey i Schemske, 1998), ovaj mehanizam se u prirodnim populacijama ređe sreće od mehanizma gametskog nerazdvajanja hromozoma kao način formiranja poliploida (Mok i Peloquin, 1975; Bretagnolle i Thompson, 1995). Spajanje neredukovanih gameta je dominantan model nastajanja autopoliploida i aloploidija zato

što skoro svaka biljna vrsta produkuje malu, varijabilnu količinu neredukovanih gameta (Mok i Peloquin, 1975).

Autopoliploidizacija predstavlja duplikaciju broja hromozoma unutar genetički nediferenciranih grupa. Nova vrsta može nastati autopoliploidijom kada se ukrste dve jedinke iste populacije (vrste, rase, sorte, varijeteta), čije reproduktivne ćelije sadrže neredukovan osnovni broj hromozoma. Ovako dobijeno potomstvo se može međusobno ukrštati (kod velikog broja biljaka prisutna je i samooplodnja) tako da se pojavljuju fertilne jedinke višeg nivoa ploidije koje su na ovaj način genetički izolovane od ostatka populacije. Do autopoliploidije može doći mejotičkim ili mitotičkim nerazdvajanjem hromozoma.

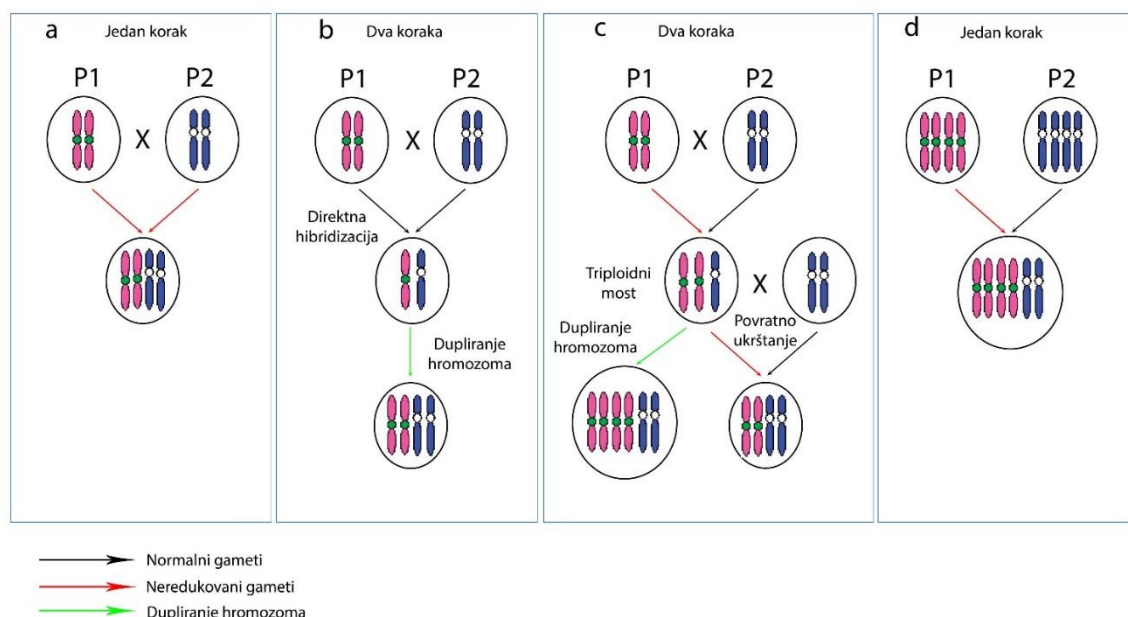
Drugi način brze alopatričke specijacije putem poliploidije je **alopoliploidija** koja predstavlja duplikaciju broja hromozoma kod međuvrskih hibrida.

Formiranje poliploidnih biljaka može biti posledica različitih događaja na nivou hromozoma i može se odvijati u jednom ili više koraka. Nekoliko mehanizama vodi ka formiranju poliploida kod biljaka; mehanizmi formiranja su u suštini isti i pri formiranju autopoliploida i pri formiranju aloploida, a razlike se ogledaju u taksonomskim kategorijama koje učestvuju u ovom procesu (**Slika 1**).

Aloploidi, kao i autopoliploidi, mogu nastati u jednom koraku posle formiranja i spajanja neredukovanih gameta poreklom od različitih vrsta (**Slika 1a**; Chen i Ni, 2006). Na ovaj način samo u jednom koraku dolazi do uspostavljanja reproduktivne barijere putem različitih nivoa ploidije između roditeljskih taksona i novoformiranih aloploida. Pojava neredukovanih gameta je zapažena kod mnogih vrsta, pre svega kod onih taksona koji često produkuju poliploide (Ramsey i Schemske, 1998). Eksperimenti su pokazali brze selekzione odgovore za osobinu učestalosti neredukovanih gameta ukazujući da biljne populacije mogu posedovati naslednu genetičku varijabilnost za ovu osobinu. Takođe, postoje podaci da faktori sredine (npr. temperatura, nedostatak vode i različitih hranljivih materija u zemljištu) mogu uticati na proporciju formiranja neredukovanih gameta (Ramsey i Schemske, 1998). Učestalost neredukovanih gameta određuju stope formiranja poliploida, kao i tip poliploida koji će se formirati.

Sa druge strane, aloploidna individua može nastati i iz više koraka ali može biti i posledica jednostavnog dupliranja hromozoma kod homoploidnog hibrida (**Slika 1b**; Chen i Ni, 2006). Jedan od načina nastanka poliploida u dva koraka obuhvata formiranje tzv. „triploidnog mosta“ (eng.: *triploid bridge*; **Slika 1c**; prerađeno prema Ramsey i Schemske, 1998; Soltis, Soltis i Tate, 2004). Prvi korak predstavlja formiranje triploida tako što se retki, neredukovani gameti diploida spoje sa normalno redukovanim gametima druge jedinice iste ili različitih vrsta. Ovako dobijeni triploidni hibrid je sterilan, ali može doprineti formiranju tetraploida tako što povremeno formira neredukovane triploidne gamete. Triploidni gamet se mogu povratno ukrstiti sa roditeljskom linijom i na taj način se formira tetraploidni hibrid ili mogu proći proces dupliranja hromozoma i formirati heksaploidni hibrid (**Slika 1c**).

U već poliploidnim populacijama može doći do spajanja jednog redukovanog gameta i jednog neredukovanog gameta i na taj način može nastati novi kariotip više ploidije (**Slika 1d**; Ramsey i Schemske, 1998).



Slika 1: Modeli formiranja alopoliploida (prerađeno iz Chen i Ni, 2006, dopunjen iz Ramsey i Schemske, 1998): **a-** spajanje neredukovanih gameta diploidnih roditeljskih vrsta vodi ka formiranju alotetraploida u jednom koraku; **b-** formiranje alotetraploida homoploidnom hibridizacijom dva diploidna roditeljska taksona praćena dupliranjem hromozoma (model u dva koraka); **c-** formiranje alopoliploida različitog nivoa ploidije preko modela „triploidnog mosta“; **d-** formiranje poliploida višeg nivoa u već poliploidnim populacijama.

Iz same prirode autopoliploida i alopoliploida proizilazi i da se kod ove dve grupe poliploida sreću i dva različita načina nasleđivanja. Na primer, kod autotetraploidnih vrsta nalaze se četiri kopije svakog hromozoma od kojih su sva četiri **homologi** i mogu proizvesti različite konfiguracije tokom mejoze, uključujući i multivalentne formacije. Ovaj način nasleđivanja se naziva i **polizomsko** (eng.: *polysomic inheritance*). Kod alopoliploidnih vrsta, način nasleđivanja uključuje sparivanje homologih hromozoma poreklom od istog diploidnog pretka (zadržava se integritet celih hromozomskih garnitura), a hromozomi poreklom od različitih vrsta se označavaju kao **homeologi** hromozomi. Ovakav načina nasleđivanja naziva se **dizomsko** nasleđivanje (eng.: *disomic inheritance*). Ipak, opisani načini nasleđivanja kod poliploidnih vrsta samo predstavljaju granične primere i veliki broj poliploidnih vrsta zapravo pokazuje intermedijarni tip nasleđivanja koji predstavlja kombinaciju dva navedena načina (De Silva i sar., 2005).

U procesu evolucije novonastalih poliploida i hibrida mogu se identifikovati dve ključne faze: 1.) **formiranje** i 2.) **održavanje** i eventualna **specijacija** novoformiranih grupa (Ramsey i Schemske, 1998; Hegarty i Hiscock, 2005). Novoformirani hibridi i poliploidi nisu prave vrste osim ako ne održe svoj taksonomski identitet i reproduktivnu izolaciju od obe roditeljske vrste, bilo genetički, bilo ekološki (Ungerer i sar., 1998). Ključni činioci koji utiču na uspešnost uspostavljanja poliploidnih i/ili hibridnih taksona su vijabilitet i fertilitet novostvorenog taksona i postojanje reproduktivne izolacije u okviru i između različitih kariotipova (Ramsey i Schemske, 1998). Ekološki faktori, koji se ogledaju u dostupnosti i mogućnosti zauzimanja novih ekoloških niša od strane novoformiranog taksona, imaju takođe ključnu ulogu u uspešnoj specijaciji.

Postfertilizacione reproduktivne barijere se ogledaju u **invijabilnosti** ili **sterilnosti hibrida**. Postoje mnogi mehanizmi koji sprečavaju formiranje i konačno uspostavljanje hibrida, čak i ako dođe do oplodjenja. Ove barijere se javljaju u najranijoj fazi posle oplodjenja i deluju u pravcu sprečavanja održavanja hibridnih jedinki u prirodnim populacijama. Nakon uspešnog oplodjenja, izolacija može da nastane kao posledica zigotskog ili embrionskog mortaliteta, ali i u bilo kom trenutku do reprodukcije novonastalog hibrida. Ako hibrid preživi do reproduktivne faze, može biti suočen sa parcijalnom ili potpunom sterilnošću usled nemogućnosti formiranja balansiranih gameta (Osborn i sar., 2003; Bowers i sar., 2003; Leitch i Leitch, 2008; Doyle i sar., 2008). Čak i ako hibrid preživi i reprodukuje se, kasnije generacije mogu imati sve nižu adaptivnu vrednost usled hromozomske i genske inkompatibilnosti. Ova pojava se naziva hibridni slom (eng.: *hybrid breakdown*; Grant, 1981).

Novonastali poliploidi su reproduktivno izolovani od roditeljskih taksona zbog razlike u broju hromozomskih garnitura. Ukrštanje poliploida i roditeljskih taksona daje potomstvo koje ima neparan broj hromozomskih garnitura i stoga nebalansiran genotip (Hegarty i Hiscock, 2005). Ovakvo potomstvo može biti vijabilno, ali produkuje mahom sterilne gamete sa nespecifičnim brojem hromozoma (aneuploidne gamete). Novoformirane hibridne jedinke, bez obzira da li su diploidne ili poliploidne, često ne stupaju u reproduktivne odnose zbog niske učestalosti pogodnih individua za uspešno oprašivanje i oplodjenje (Soltis i Soltis, 2009). Hibridi i/ili poliploidi često poseduju nove adaptivne

atribute koji omogućavaju biljkama da zauzimaju nove ekološke niše, da imaju nove fiziološke odlike i karakteristike životne istorije (eng.: *life history*) koje nisu prisutne kod predačkih taksona (Ramsey i Schemske, 1998). Međutim, čak i vijabilni i fertilni hibridi i/ili poliploidi mogu biti potisnuti i osuđeni na izumiranje kada ne postoji odgovarajuća ekološka niša koju mogu da zauzmu ili kada su prisiljeni da obitavaju u roditeljskim staništima gde njihova adaptivna vrednost može biti značajno niža (Ramsey i Schemske, 1998).

Zbog svega navedenog poliploidizacija je, bez obzira da li je praćena hibridizacijom ili ne, jednostavan, skokovit način koji umnogome doprinosi postizanju brze specijacije u uslovima simpatrije.

Ipak, mnogi evolucionari procesi, pa i specijacija putem hibridizacije i/ili poliploidije, mogu biti vođeni veštačkim poremećajima staništa ili introdukovanjem vrsta u staništa u kojima ih prirodno nema (den Nijs, Marhold i Hurka, 1999). Narušavanje staništa i introdukovanje invazivnih vrsta mogu da uspostave kontaktnu zonu između populacija koje su bile izolovane distancom i/ili sredinom. U ovom slučaju jedan od ishoda može biti i hibridizacija, a novoformirani hibridni takson može biti kompetitivan u novonastalom okruženju. Dokumentovani su primeri kada novostvoreni hibridogeni taksoni uspešno opstaju i evoluiraju u staništima narušenim od strane čoveka (den Nijs, Marhold i Hurka, 1999; Bleeker, Huthmann i Hurka, 1999). Ovakvi primeri demonstriraju da uticaj čoveka na promenu okoline ne mora obavezno biti kontraproduktivno sa evolucione tačke gledišta. Ipak, preovlađujuće mišljenje je da je čovekov uticaj na životnu sredinu (introdukovanjem vrsta, fragmentacijom staništa, itd.) u najvećem broju slučajeva razoran i štetan za biodiverzitet u celini. Postoje brojni primeri gde se retke vrste smatraju ugroženim kao posledica hibridizacije sa srodnim taksonom (dolazi do genetičke asimilacije) sa kojim su došle u kontakt zbog narušavanja staništa od strane čoveka (Levin, Francisco-Ortega i Jansen, 1996). Poznati su takođe primeri gde novoformirani hibridi mogu da potisnu jednu ili obe roditeljske vrste (Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006).

Promene na genetičkom materijalu uslovljene hibridizacijom i poliploidizacijom

Evolucionarna genetika biljaka je u poslednje vreme doživela veliki napredak. Ovaj napredak je proistekao iz upotrebe novih tehnologija, uglavnom razvojem tehnika masovnog paralelnog sekvenciranja i primenom savremenih računarskih i bioinformatičkih metoda obrade podataka. Sve ovo dovelo je do poboljšanog uvida u strukturu, evoluciju i funkciju hibridnih i poliploidnih biljnih genoma, ali je, sa druge strane, otvorilo još mnogo više pitanja koja će usmeravati istraživanja u narednim decenijama (Wendel, 2015).

Brojni su dokazi značajne i, u nekim slučajevima, veoma brze promene genoma do kojih dolazi nakon formiranja hibrida i poliploida (Leitch i Bennett, 1997; Hegarty i Hiscock, 2005; Ranney, 2006; Buggs i sar., 2012). Takve promene su identifikovane na svim nivoima genoma, od hromozoma i hromozomskih rearanžmana do DNK sekvenci, ali se ove promene ispoljavaju i na epigenetičkom nivou (Hegarty i Hiscock, 2005; Ranney, 2006; Wendel, 2015). Sve ove promene se nastavljaju kaskadno na proteinskom, fiziološkom i metaboličkom nivou da bi, na kraju, imali efekta na fenotip (Wendel, 2015).

Kao što je već napomenuto, model homoploidne hibridne specijacije, kao polaznu pretpostavku navodi da se dva roditeljska taksona moraju međusobno razlikovati u prisustvu dva ili više hromozomskih rearanžmana (na primer: translokacija, inverzija...). Novostvoreni hibridi tokom procesa segregacije i rekombinacije stvaraju nove tipove homozigotnih kariotipova za te rearanžmane i daljim međusobnim ukrštanjem vode ka reproduktivnoj izolaciji od roditeljskih taksona i specijaciji. Znači, promene na genetičkom materijalu u vidu različitih hromozomskih rearanžmana su neophodan preduslov za ovakav način specijacije (koja se ponekad i naziva rekombinaciona specijacija; Grant, 1957) dok sa druge strane, prisustvo različitih hromozomskih rearanžmana u populacijama organizama sa polnim razmnožavanjem može da dovede do daljih hromozomskih promena (Shaw, Wilkinson i Coates, 1983), posebno ako je praćeno ukrštanjem u srodstvu. Postoji i veliki broj empirijskih podataka da se u hibridnim populacijama povećavaju i stope genskih mutacija (Barton i Hewitt, 1985). Povećanje stope hromozomskih i genskih mutacija u hibridnim populacijama često se naziva „hibridnom dizgenezom“ i uključuje pojavu niza defekata: mutacija, hromozomskih aberacija, sterilnosti, itd. Na veštačkim homoploidnim hibridima suncokreta

pokazano je da dolazi do brzih (u samo nekoliko generacija) hromozomskih rearanžmana kod novoformiranih hibrida (Rieseberg, 1996). Novoformirani hibridi nasleđuju citoplazmatske genome (mitohondrije i hloroplasti) isključivo od majčinske vrste te je stoga hromozomski rearanžman često neophodan da bi se obnovila citoplazmatsko-jedarna kompatibilnost (Soltis i Soltis, 1999).

Važna karakteristika poliploidnih taksona je veći nivo heterozigotnosti u odnosu na roditeljske taksone. Aloploidni mogu imati mnogo veći stepen heterozigotnosti koji može doprineti **heterozisu** ili hibridnom vigoru. Dalje, kod poliploidnih taksona ova **heterozigotnost** je u neku ruku fiksirana: hromozomi aloploidna koji potiču od jedne vrste se prvenstveno uparuju sa homologim hromozomima (poreklom od iste vrste) tokom mejoze, osiguravajući da genomi obe roditeljske vrste ostanu prisutni (Ranney, 2006; Teixeira, Rodríguez-Echeverría i Nabais, 2014). Sa druge strane, dodatak multiplih kopija homozigotnih hromozoma, kao što je to slučaj kod autoploidna, malo doprinosi pojačavanju genetičke superiornosti i može u stvari delovati tako što smanjuje vigor i fertilitet multiplikujući efekte **inbriding depresije** (Ranney, 2006). Inbriding je manje štetan kod aloploidna zbog njihove veće heterozigotnosti (Ranney, 2006).

Autoploidni imaju određenu količinu genetičke redundantnosti (ponovljenosti) koja se ogleda u višestrukim kopijama gena koje mogu da mutiraju i divergiraju, što dovodi do pojave novih osobina, a da pri tom nisu ugrožene osnovne funkcije organizma. Aloploidni takođe poseduju genetičku redundantnost sa jedne strane, a sa druge strane i dva ili više različitih genoma, što sve zajedno može obezbediti biohemijsku fleksibilnost, a samim tim i mogućnost da se uspešno prilagode širem rasponu različitih prirodnih okruženja.

Poliploidni genomi, bilo da je reč o autoploidima ili aloploidima, prolaze kroz različite promene na genetičkom materijalu a one se mogu podeliti na fazu brzih genetičkih i epigenetičkih promena („revolucionarna faza“; Levy i Feldman, 2002), odmah posle formiranja poliploidnog genoma, i fazu sporih promena i rearanžmana („evolucionarna faza“; Levy i Feldman, 2002) u DNK sekvencama u potonjim generacijama.

Veštački dobijeni poliploidi ili pak novoformirani prirodni poliploidi su odličan genetički materijal za komparativne analize genske ekspresije i genomskih promena u ranim fazama formiranja poliploida (Chen i Ni, 2006; Buggs i sar., 2012). Kod proučavanja veštačkih poliploida velika je prednost tačnog poznavanje roditeljskih taksona, dok su taksoni od kojih su nastali mnogi prirodni aloploidi nepoznati ili nedostupni. Tako, **promene u ekspresiji gena** koje su primećene kod veštačkih alotetraploida u odnosu na njihove roditeljske vrste uključuju gensku represiju, subfunkcionalizaciju (podelu u funkciji ortologa), neofunkcionalizaciju (sticanje novih funkcija dupliranih gena), kao i aktiviranje gena utišanih kod roditeljskih taksona (Chen i Ni, 2006; Wendel, 2015). Neke od ovih promena mogu se pripisati promenama na nivou DNK sekvenci kao što su: delecije sekvenci, interhromozomske promene i rearanžmani, sinonimne i nesinonimne nukleotidne supstitucije (Chen i Ni, 2006; Wendel, 2015), dok su druge promene posledica promena na transkripcionim i posttranskripcionim nivoima. Još raznovrsniji, a ipak oskudno proučeni, su razni kratkoročni evolucionari odgovori na poliploidizaciju koji se ogledaju kroz epigenetičke promene u malim RNK molekulima, promene koje kaskadno obuhvataju promene u proteinima, fiziologiji i metabolizmu i koje na kraju utiču na fenotip biljaka i njihovu funkciju (Wendel, 2015). Mehanizmi koji stoje u pozadini ovih promena na genetičkom materijalu kod novoformiranih aloploida su još uvek slabo objašnjeni (Chen i Ni, 2006). Razumevanje svih ovih promena kao i njihovih evolucionih posledica je veoma privlačna oblast za istraživanje u narednim godinama. Na kraju, postoje i primeri gde su rezultati testiranja molekularnim markerima ukazali da nije došlo do značajnih reorganizacija genoma (npr. kod aloploidne vrste *Spartina anglica*; Ainouche i sar., 2004), već da su sve fenotipske varijacije između hibrida i roditeljskih taksona potekle od epigenetičkih faktora.

Dugoročne promene poliploidnih genoma se ogledaju u fenomenima gubitka i diferencijalnog zadržavanja dupliranih gena, pristrasnog frakcionisanja genoma (na primer: veći gubitak jednog od roditeljskih genoma), fenomena smanjenja celog genoma i smanjenja broja hromozoma putem obimnih rearanžmana (npr. fuzije hromozoma). Svi ovi procesi su ciklični i genomi prolaze kroz više ciklusa ovih fenomena u vremenskom razdoblju koje se meri u hiljadama i milionima godina (Wendel, 2015). Iz svega ovoga postaje jasno da je

poliploidizacija bar delimično reverzibilna i da tokom vremena masovni hromozomski rearanžmani, smanjenje broja hromozoma i veliki gubici repetitivnih sekvenci i dupliranih gena (Leitch i Leitch, 2008; Freeling i sar., 2012) vode ka diploidizaciji genoma koji predstavlja funkcionalni i citogenetski povratak poliploidnog genoma u diploidni status.

Učestalost hibridizacije i poliploidije kod biljnih taksona

Procenjeno je da je od 30% do 80% vrsta cvetnica poliploidnog porekla (Soltis i Soltis, 1995; Ramsey i Schemske, 1998; Otto i Whitton, 2000). U nešto novijoj literaturi se takođe nalaze različite pretpostavke. Arrigo i Barker (2012) navode da kod skoro 35% biljnih vrsta broj hromozoma ukazuje na nedavno umnožavanje genoma, dok je za oko 15% vrsta cvetnica procenjeno da je njihova specijacija rezultat poliploidizacije (Wood i sar., 2009). Udeo diverziteta biljaka nastao duplikacijama genoma je verovatno i mnogo veći ako se uzme u obzir da su mnogi autoploidni taksoni neprepoznati i svrstani u diploidne taksone (Soltis i sar., 2010; Parisod, Holderegger i Brochmann, 2010) i da su mnogi primeri homoploidne hibridne specijacije ostali neprimećeni. Nije sasvim jasno koliko je homoploidna hibridna specijacija učestala u prirodi i izgleda da se ovaj oblik specijacije javlja retko: u publikaciji autora Gross i Rieseberg (2005) navodi se 20 potvrđenih primera. Mišljenja se razlikuju ali ipak preovlađuje gledište da su aloploidni evoluciono uspešniji od autoploida (Coyne, Orr i sar., 2004; Soltis, Soltis i Tate, 2004). Specijacija obuhvata i prirodnu selekciju koja, pak, za svoje delovanje zahteva prisustvo genetičke varijabilnosti, koja je po prirodi procesa viša kod hibridnih taksona (aloploida). Za oko 25% biljnih vrsta se zna da hibridizuju bar sa još jednom drugom vrstom (Mallet, 2007). Pokazana je i evoluciono veoma stara duplikacija celog genoma vrsta iz roda *Arabidopsis* (Vision, Brown i Tanksley, 2000), pa i dupliranje genoma svih semenjača (Jiao i sar., 2011). Procene učesća poliploidizacije i hibridizacije u nastajanju novih biljnih taksona se uglavnom povećavaju sa napretkom tehnika, mahom molekularne biologije, koje omogućavaju detekciju poliploidizacije i hibridizacije, kako u skorašnjoj, tako i u davnijoj istoriji genoma. Donekle izmenjen pogled savremene nauke na pitanje zastupljenosti poliploidije među biljnim taksonima može se sagledati u pomeranju težišta pitanja koja se postavljaju u istraživanjima ove teme. Dok je ranije bilo važno saznati procenat cvetnica koji je prošao kroz ciklus

poliploidizacije, danas je ključno pitanje koliko rundi genomske duplikacije se odigralo u genomima različitih taksona tokom njihove evolucije (Soltis, Soltis i Tate, 2004; Soltis i Soltis, 2009; Soltis i sar., 2010)?

Rod *Centaurium* Hill

Karl fon Line (1707 -1778) je još 1753. godine vrste koje, po aktuelnoj klasifikaciji spadaju u rod *Centaurium* sistematizovao u okviru naziva *Gentiana* (Linnaeus, 1753). Prvi autor koji je odvojio ovaj rod od ostalih u okviru familije *Gentianaceae* je Džon Hil koji je ponovo uveo naziv *Centaurium* (Hill, 1756). Hil je, međutim, unutar ove grupe biljaka obuhvatio i druge rodove: *Chora*, *Cicendia* i *Blackstonia* (Stearn i Hill, 1967; Mansion, 2014). Međutim, Hila nisu priznali savremenici i u najznačajnijoj naučnoj literaturi vezanoj za sistematiku familije *Gentianaceae* sa kraja osamnaestog veka, pa sve do druge polovine dvadesetog veka, naziv „*Erythraea*“ se koristi za biljke ove grupe (Natalis Joseph de Necker, 1790; Bentham i Hooker, 1876; Don, 1838; Gilg, 1895; Grisebach, 1839; Grisebach, 1845). Konačno, 1954. godine Robins (Robyns, 1954) ponovo uvodi naziv *Centaurium* prateći osnovni princip prioriteta botaničke nomenklature, te se važeći naziv roda zadržao i glasi: *Centaurium* Hill.

Klasifikacijom familije *Gentianaceae* tokom istorije su se bavili i mnogi drugi autori: Endliher (Endlicher, 1838), Grizbah (Grisebach, 1839), Bentam i Huker (Bentham i Hooker, 1876) i Gilg (Gilg, 1895). Klasifikacija po Gilgu je korišćena tokom XX veka. Tek 2002. godine (Struwe i Albert, 2002) predložena je nova klasifikacija familije koja se oslanjala na molekularne metode i kombinaciju filogenetskog i tradicionalnog taksonomskog pristupa. Prema ovoj klasifikaciji, familija *Gentianaceae* (87 rodova i procenjenih 1615-1688 vrsta) je podeljena na **6 monofiletskih tribusa** (*Chironieae*, *Exaceae*, *Gentianeae*, *Helieae*, *Potalieae* i *Saccifolieae*). U tribus *Chironieae* je svrstano 23 roda (oko 160 vrsta) i podeljen je na tri monofiletska podtribusa: *Canscorinae*, *Chironiinae* i *Coutoubeinae*, na osnovu tipa polena, dužine krunične tube cveta i načina uvijanja antera.

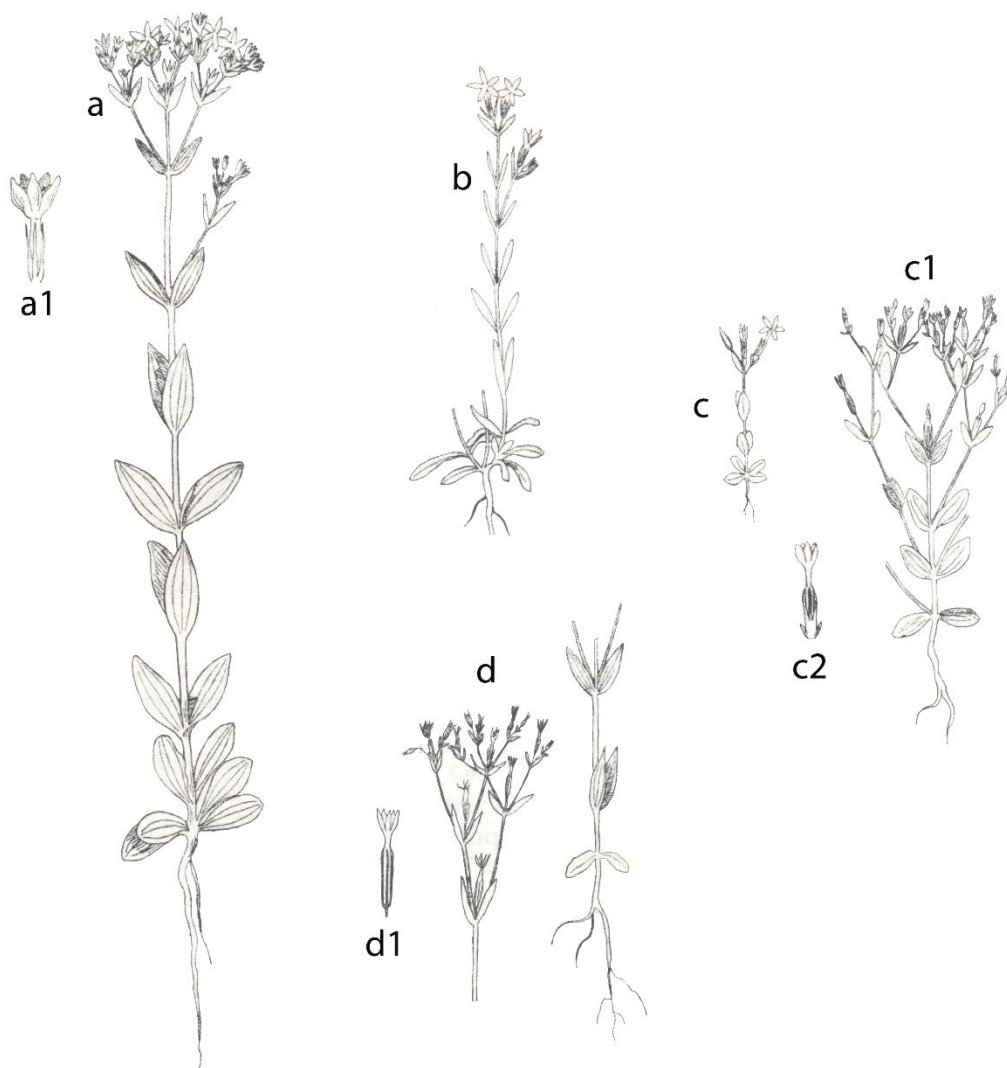


Slika 2: Detalji cvetova kičice. Strelicama je označena uvijena zrela antera i dvorežnjeviti tučak. Uočljiva je pojava herkogamije.

Rod *Centaurium*, prema ovoj klasifikaciji, spada u **podtribus Chironiinae** i sačinjavaju ga uglavnom kratkoživeće (jednogodišnje, dvogodišnje i retko višegodišnje) zeljaste vrste koje karakterišu ružičasti (ređe beli i samo u jednom slučaju žuti- *Centaurium maritimum*) petodelni cvetići, končasti stubić, dvorežnjeviti žig i antere koje se uvijaju po oslobađanju polena (**Slika 2**). Taksoni ovog podtribusa su kosmopolitski rasprostranjeni, pretežno na vlažnim i narušenim staništima gde je smanjena kompeticija. U okviru podtribusa *Chironiinae* postoje dva glavna regiona diverziteta: vrste koje naseljavaju Stari svet su koncentrisane oko mediteranskog basena (oko 25 vrsta; Zeltner, 1970) i vrste Novog sveta (oko 30 vrsta) koje se uglavnom rasprostiru u zapadnom delu severnoameričkog kontinenta,

od Meksika do Kanade, sa centrom diverziteta u Kaliforniji i Teksasu. Sveobuhvatno filogenetsko istraživanje autora Mansion i Struwe (2004) je, upotrebom različitih molekularnih markera i morfoloških karakteristika, napravilo korak unapred u rešavanju filogenetskih odnosa među vrstama podtribusa *Chironiinae* i snažno podržalo njegovo monofiletsko poreklo. Međutim, istim istraživanjem, kao i dodatnim razmatranjima (Mansion, 2004) je potvrđen polifiletski status samog roda *Centaurium*, tako da je predložena podela na četiri roda: *Centaurium*, *Gyrandra*, *Schenkia* i *Zeltnera*. Ova najnovija, priznata klasifikacija samog roda *Centaurium*, zasnovana je, kako na morfološkim i biogeografskim, tako i na opsežnim istraživanjima pomoću molekularnih markera, Ona je definisala rod *Centaurium sensu sstricto* kao monofiletski, sa oko 20 vrsta (broj vrsta unekoliko varira i zavisi od interpretacije ranga brojnih podvrsta i varijeteta opisanih unutar roda), a koji se karakteriše primarno mediteranskim rasprostranjenjem (Mansion, 2004; Mansion i Struwe, 2004).

U flori SR Srbije, prema prilično zastarelim informacijama (Jovanović-Dunjić, 1973), u okviru roda *Centaurium* zastupljene su vrste: *Centaurium umbellatum* Gilib. (sinonim: *C. erythraea* Rafn; The Euro+Med Plantbase Project, 2016; **Slika 3: a i a1**), *C. uliginosum* (Waldst. et Kit.) Beck, (sinonim: *C. littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kirscher; The Euro+Med Plantbase Project, 2016; **Slika 3: b**), *C. pulchellum* (Sw.) Druce (**Slika 3: c i c1 i c2**) i *C. tenuiflorum* (Hoffmanns. et Link) Fritsch (**Slika 3: d i d1**). U ovoj disertaciji će se, radi usaglašavanja taksonomskih statusa sa savremenim saznanjima i dostignućima, koristiti klasifikacija taksona prema najrelevantnijem taksonomskom i nomenklaturnom izvoru: *on-line* bazi podataka i informacionom sistemu vaskularnih biljaka Evrope i Mediterana, *Euro+Med Plantbase* (The Euro+Med Plantbase Project, 2016).



Slika 3: Vrste roda *Centaurium* zastupljene u flori Srbije (preuzeta ilustracija M. Gajić, tablica LXXVIII iz Jovanović-Dunjić, 1973; prerađeno po relevantnoj nomenklaturi, The Euro+Med Plantbase Project, 2016): **a**-*Centaurium erythraea*, opšti izgled; **a1**- cvet; **b**- *Centaurium littorale* ssp. *compressum*, opšti izgled; **c**- *Centaurium pulchellum*, opšti izgled; **c1**- jednogodišnja biljka ; **c2**-cvet; **d**- *Centaurium tenuiflorum* gornji i donji deo stabljike sa cvetovima i listovima; **d1**-cvet.

Centaurium erythraea Rafn (1800) (srp.: kičica; **Slika 3: a**) je rozetasta dvogodišnja vrsta čiji areal obuhvata potez od zapadne Evrope, pa sve do kavkaskog regiona i Avganistana na istoku i jugoistoku i južno do severnih delova Afričkog kontinenta (Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006; West, Baldwin i Rich, 2014; Çiçek, Yaprak i

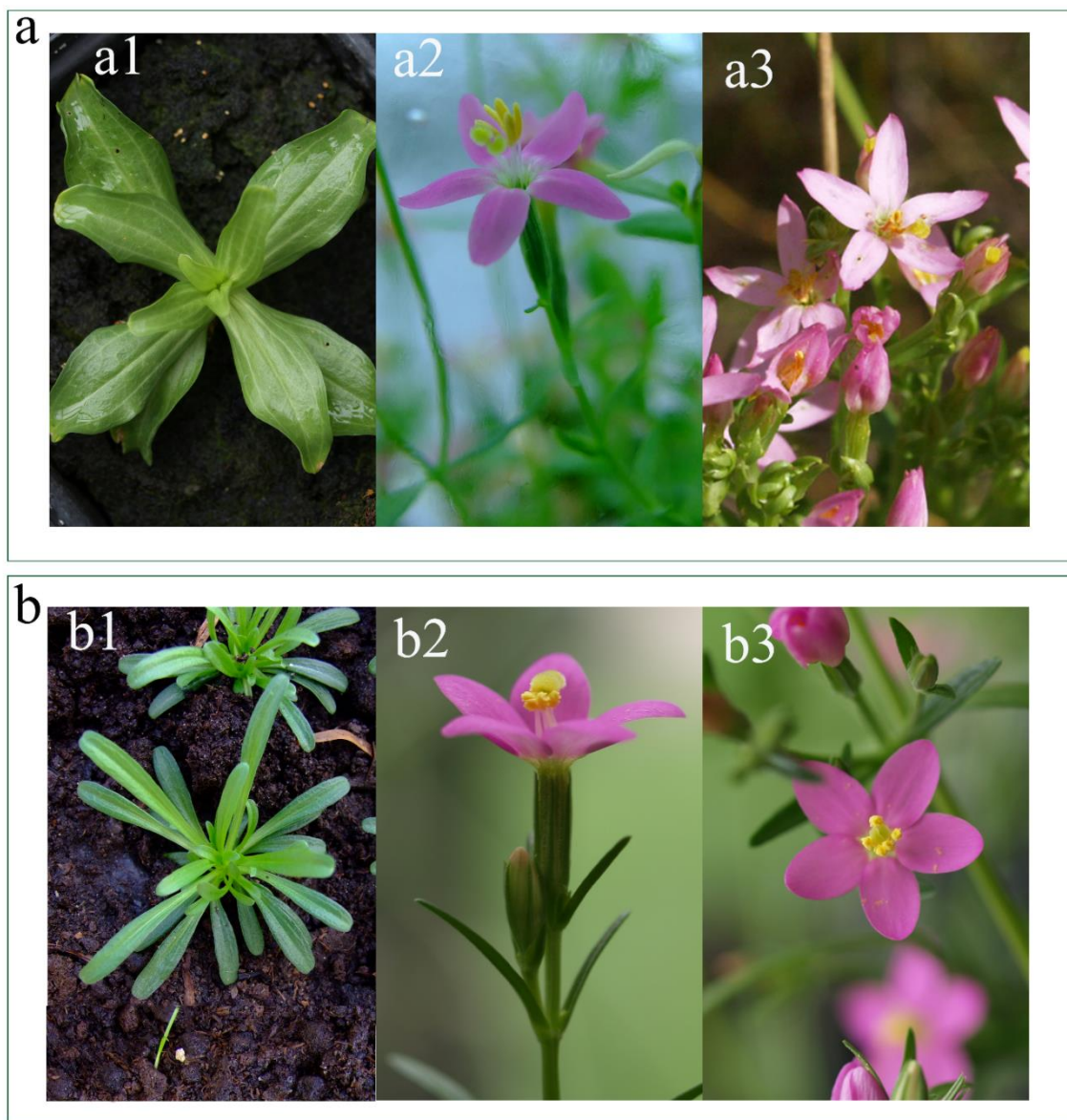
Alan, 2015; The Euro+Med Plantbase Project, 2016). Naturalizovana je u Severnoj Americi (Mansion i Struwe, 2004) i Australiji. Skorašnji relevantni podaci o rasprostranjenju ove vrste na teritoriji Republike Srbije i Balkanskog poluostrva predstavljeni su u okviru doktorske disertacije dr Branislava Šilera (Šiler, 2012). Na teritoriji Republike Srbije, vrsta *Centaureum erythraea* je prilično rasprostranjena i česta (Jovanović-Dunjić, 1973; Šiler, 2012), ali se sastoji iz pretežno malih populacija na izrazito fragmentisanim staništima (Van Rossum, 2009; Šiler, 2012). Takođe, zastupljenost ove vrste na području Vojvodine, severno od Fruškogorskih planina je prilično oskudna i obuhvata samo nekoliko nalaza: Elemir (Šiler, 2012) i jedan lokalitet na području Subotičko-horgoške pešćare (Bački Vinogradi – lokalitet u okviru ove disertacije).

Staništa koja naseljava ova vrsta su otvorena, često privremena, sa smanjenom međuvrskom kompeticijom, kao što su pašnjaci, proplanci i ivice šuma; od nizija do 1400 m nadmorske visine (Jovanović-Dunjić 1973). Takođe, *C. erythraea* se nalazi i u sastavu rano i kasno sukcesivne šumske vegetacije posle krčenja šuma, ali i na staništima nastalim drugim vidovima degradacije i ljudskom delatnošću kao što su isušeni kanali za navodnjavanje, pored puteva, staza i sl. (Van Rossum, 2009). Ova vrsta se obično nalazi na krečnjačkim, suvim zemljištima, i na ilovastim, peščanim i močvarnim zemljištima (Jovanović-Dunjić, 1973).

Jedinke vrste *Centaureum erythraea* su u vreme cvetanja visoke 10-50 cm. Cvetna stabljika je jednostavna, uspravna i tek iznad polovine i pri vrhu granata, pojedinačna ili ih može biti nekoliko a broj cvetnih stabljika umnogome varira u zavisnosti od uslova staništa (do 6- Van Rossum, 2009; lična zapažanja). Ružičasti (samo kod retkih individua potpuno beli) hermafroditni cvetovi (**Slika 3: a1 i 4: a2 i a3**) čine guste cimozne cvasti. Listovi stabla su naspramni, objajasti do ovalno-duguljasti, po obodu celi i glatki sa jasno izraženim nervima (3-5) koji nikada nisu paralelni (**Slika 3a**). Prizemni listovi bazalne rozete su ovalni do eliptični i za vreme cvetanja ostaju većinom zeleni. Krunica cvetova je duga od 10 do 15 mm, a čašica, za vreme cvetanja, je ravna polovini dužine tubusa krunice.

Semena kičice klijaju u jesen ili proleće i biljke prezimljuju u fazi male rozete (Radušienė 1995; Van Rossum 2009; (**Slika 4 a1**). Sledeće godine, u julu ili avgustu

(Ubsdell, 1979; Brys i Jacquemyn, 2011), pojavljuju se cimozne cvasti (Van Rossum, 2009). Cvasti mogu imati od 50-70 cvetova, koji se pretežno nalaze u istoj ravni. Ako su vremenski uslovi povoljni, cvetovi se otvaraju ujutru, a zatvaraju uveče. Sazrevaju sukcesivno, ali na istoj biljci je obično veći broj cvetova istovremeno otvoren, te je uočena i pojava međusobnog oprašivanja cvetova poreklom sa iste jedinke posredstvom oprašivača koji posećuju cvast (**geitonogamija**; Lloyd i Schoen, 1992; Eckert, 2000). Cvetovi su otvoreni 4-5 dana (Brys i Jacquemyn, 2011). Dva žiga tučka sazrevaju dan ili dva pre oslobađanja polena iz antera (**protoginija**) i u prvo vreme stubić tučka i žigovi su okrenuti na suprotnu stranu od nezrelih antera – **herkogamija** (**Slika 2**) (Ubsdell, 1979; Van Rossum, 2009; Brys i Jacquemyn, 2011). Prisutnost i stepen herkogamije kao i veličina cvetova varira u zavisnosti od uslova sredine i prisutnosti oprašivača (Brys i Jacquemyn, 2012). Posle par dana, antere oslobađaju polen i zajedno sa žigovima se približavaju centru cveta tako da, ukoliko nije došlo do unakrsnog oprašivanja, može doći do samooprašivanja (Ubsdell, 1979). Kod ove vrste je samooplodnja veoma učestala tako da, po istraživanju Ubsdela (Ubsdell, 1979), od 70-100 % semena nastane na ovaj način, dok prema drugim novijim istraživanjima (Brys i Jacquemyn, 2011; Brys i Jacquemyn, 2012) na ovaj načina nastaje oko 55% semena, izuzimajući mogućnost geitonogamije. Semena su brojna i sitna tako da se u jednoj čauri može naći do 300 komada (Brys i Jacquemyn, 2011). Nemaju specifičan način rasejavanja. Biljke su monokarpne, te po donošenju semena venu i propadaju.



Slika 4: Izgled rozeta mladih biljaka gajenih u stakleniku i cvetova vrsta *Centaurium erythraea* (a) i *C. littorale* ssp. *compressum* (b). Ovalni do eliptični listovi rozete vrste *C. erythraea* (a1) sa jasno izraženom nervaturom (3-5 nerava) koja nije paralelna; Cvetovi vrste *C. erythraea* (a2 i a3); Linearno-loptičasti listovi rozete vrste *C. littorale* ssp. *compressum* (b1) sa paralelno postavljenom nervaturom; Cvetovi vrste *C. littorale* ssp. *compressum* (b2 i b3).

Centaurium littorale (Turner) Gilmour je takođe dvogodišnja zeljasta rozetasta vrsta koja naseljava Zapadnu Evropu i proteže se sve do Ukrajine, Belorusije na istoku i Kavkaskih planina na jugoistoku. (The Euro+Med Plantbase Project, 2016). Vrsta pokazuje morfološke varijacije koje se ogledaju u veličini i obliku listova i veličini cvetova i prisustvu

ili odsustvu maljavosti vegetativnih organa i čašičnih listića (Tutin, 1972). U okviru ove vrste prepoznaju se dve podvrste: *Centaurium littorale* ssp. *littorale* (Turner) Gilmour, koja naseljava područja Zapadne Evrope i *C. littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kischner (2000) koja se sreće u Zapadnoj Evropi (sem Velike Britanije, Belgije, Holandije i Danske) i predelima sve do Ukrajine, Belorusije na istoku i Kavkaskih planina na jugoistoku (The Euro+Med Plantbase Project 2016). ***C. littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kischner (2000)** (= *Centaurium uliginosum* (Waldst. & Kit.) Beck, ili *Centaurium littorale* ssp. *uliginosum* (Waldst. & Kit.) (The Euro+Med Plantbase Project, 2016) (srp.: kitica; **Slika 3b**) je zabeležena u Srbiji rasprostranjena na području Vojvodine (Jovanović-Dunjić, 1973). Staništa koja naseljava ova vrsta su, kao i u slučaju vrste *C. erythraea*, otvorena, livadska ili peščana, sa ogoljenim biljnim pokrivačem ili staništa nastala degradacijom i ljudskom delatnošću (iskopine peska, kanali za navodnjavanje, itd.). Za razliku od prethodne vrste, *C. littorale* ssp. *compressum* daje prednost zaslanjenim i vlažnim staništima (Jovanović-Dunjić, 1973) kao i druga opisana podvrsta *Centaurium littorale* (Turner) Gilmour ssp. *littorale* (Ubsdell, 1979).

Jedinke podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* (**Slika 3b**) visoke su u vreme cvetanja od 5 do 25 cm, mada se mogu naći i znatno viši primerci (od 40 cm) u izrazito povoljnim uslovima staništa. Cvetna stabljika je uspravna, razgranata pri vrhu gde gradi cimozne cvasti (Jovanović-Dunjić, 1973). Listovi stabla su linearno-lancetasti (dugi 10-20 mm i (1) 3-4(6) mm široki), malo zatupasti, a na njima se mogu uočiti 3 paralelno postavljena nerva. Prizemni listovi bazalne rozete su linearno-loptičasti, sa paralelno postavljenom nervaturom, zatupasti i zeleni u vreme cvetanja. Ružičasti cvetovi imaju 10-13 mm dugu krunicu, dok je čašica za vreme cvetanja iste dužine sa tubusom krunice (**Slika 4 b2 i b3**) (Jovanović-Dunjić, 1973). Semena biljaka su sitna (<0. 01 mg), brojna (oko 250 po čauri), kličaju u jesen ili u proleće, a biljke prezimljuju u fazi male rozete (**Slika 4 b1**).

***C. pulchellum* (Sw.) Druce (1897)** (srp.: kičica sitna; **Slika 3: c i c1**) je jednogodišnja zeljasta najšire rasprostranjena vrsta roda *Centaurium*, čiji se areal prostire od Finske do Severne Afrike i Kine (Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; The Euro+Med Plantbase Project, 2016). Na području Srbije se češće sreće u Vojvodini (Jovanović-Dunjić, 1973), ali

se nalazi i na području čitave Srbije (lična zapažanja). U manjim i većim skupinama naseljava vlažna, teška glinovita zemljišta, na plavnim poljima i njivama, i oko bara i močvara (Jovanović-Dunjić, 1973).

Jedinke vrste *C. pulchellum* su visoke od 4 do 20 cm u vreme cvetanja, ali habitus može veoma da varira u zavisnosti od uslova sredine, tako da cela biljka može biti predstavljena samo jednim nodusom i jednim cvetom (oko 0,9 cm) u nepovoljnim uslovima, dok se veoma razgranate biljke visine i do 40 cm sreću u povoljnim uslovima. Stabljika je čvrsta, od osnove ili od sredine granata sa račvastim, uspravnim, odstojećim granama. Cvetovi su usamljeni ili jedan do dva grupisani u kiticama, u rastresitoj, dihazijalnoj cvasti (Jovanović-Dunjić, 1973). Prizemni listovi su naspramni, eliptični, zatupasti, ne formiraju bazalnu rozetu. Listovi stabla su eliptični ili duguljasti. Režnjevi čašice su eliptični, prilegli, nešto kraći od tubusa krunice (**Slika 3 c2**). Krunica je tamno ružičasta ili retko bela, duga 10-15 mm. Plod je valjkasta čaura, a seme je brojno, sitno (3-5 mm), elipsoidno ili nepravilno loptasto, tamno mrke boje (Jovanović-Dunjić, 1973).

C. tenuiflorum (Hoffmanns. et Link) Fritsch (1907) (srp.: kitica; **Slika 3 d**) je jednogodišnja zeljasta biljka koja je zastupljena pretežno u mediteranskom području Balkanskog poluostrva a u Srbiji je, prema prilično zastarelim navodima (Jovanović-Dunjić, 1973), do sada zabeležena samo na području Deliblatske pešcare (Vojvodina). Međutim, tokom iscrpnog istraživanja lokaliteta navedenog u Flori SR Srbije za potrebe ove doktorske disertacije, nisu pronađene biljke ove mediteranske vrste. U literaturi je poznat problem pogrešnog determinisanja vrsta *C. tenuiflorum* i *C. pulchellum* jer ove vrste ponekad imaju veoma sličan habitus, posebno kada su u pitanju sitniji primerci (Pringle, 2010). Iz navedenih razloga, na ovom mestu, potrebno je izneti opravdane sumnje u postojanje ove vrste na području SR Srbije. Vrsta je česta na područjima primorja Crne Gore, Albanije i Grčke (lična zapažanja).

Stabljika ove vrste je uspravna, razgranata u gornjem delu sa jajastim ili duguljastim glatkim listovima na kojima se uočava 5 nerava. Prizemni listovi nisu sakupljeni u rozetu i za vreme cvetanja su sasušeni. Cvast je rastresita i siromašna cvetovim. Čašica je glatka, za

vreme cvetanja ravna dužini tubusa krunice. Cvetovi su ružičasti, retko beli (Jovanović-Dunjić, 1973).

Oprašivanje biljaka roda *Centaurium* vrše insekti i to najvećim delom muve lebdilice iz familije *Syrphidae* (*Diptera*) za koje je karakteristično da prenose polen na malim razdaljinama (do 200 m), retko bumbari koji, pak, spadaju u oprašivače koji prenose polen na nešto većim razdaljinama (do 2 km) i male solitarne pčele (preleću srednje razdaljine, od 150-600 m) (Van Rossum, 2009; Brys i Jacquemyn, 2011). Dosadašnja zapažanja ukazuju da oprašivači najverovatnije ne vrše diskriminaciju između vrsta *C. erythraea* i *C. littorale* na osnovu privlačnosti cvetova i da posećuju cvetove obe vrste nasumično (Ubsdell, 1979). Sve vrste se reprodukuju isključivo putem semena a ne postoji specifičan sistem njihovog rasejavanja (Ubsdell, 1979). Semena ulaze u sastav stalne banke semena zemljišta (Van Rossum, 2009).

Poliploidija i međuvrsna hibridizacija u okviru roda *Centaurium* Hill

Klasifikacija vrsta roda *Centaurium* je veoma otežana usled činjenice da samo na osnovu morfoloških karakteristika veoma često nije moguće precizno identifikovati vrste Sredinski faktori umnogome utiču na morfološke karakteristike jedinki. Takođe, različite vrste roda *Centaurium* često stupaju u međuvrsnu hibridizaciju (Ubsdell, 1979; Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006; Çiçek, Yaprak i Alan, 2015). Intenzivna citogenetička istraživanja sprovedena na vrstama ovog roda otkrila su dva osnovna broja hromozoma, $x=9$ i $x=10$, kao i tri nivoa ploidije: diploidne, tetraploidne i heksaploidne taksone (Zeltner, 1970; Mansion, 2004). Sve ovo je dovelo do velikih teškoća u definisanju vrsta i nižih taksonomskih kategorija, ali i do prisustva obilja sinonima i nomenklturnih odstupanja koji se javljaju u literaturi (Gilmour, 1937; Tutin, 1972; Jovanović-Dunjić, 1973; Mansion, 2014).

Istraživanja u cilju egzaktno klasifikacije vrsta, kao i utvrđivanje i karakterizacija međuvrsne hibridizacije u prirodnim populacijama su isprva obuhvatala morfološke, citogenetičke i ekološke aspekte (Ubsdell, 1976a; Ubsdell, 1976a; Ubsdell, 1979). Pomak u genetici biljnih populacija ogleđa se kroz razvoj i upotrebu različitih molekularnih i fitohemijskih tehnika u ove svrhe. Tri novija istraživanja (Mansion i Struwe, 2004; Mansion,

2004; Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005), objedinjena u radu Mansion 2014, predstavljaju sveobuhvatna filogenetska istraživanja koja su ukazala i na polifiletsko poreklo samog roda *Centaurium* i predložila novu klasifikaciju. Ova istraživanja obuhvatila su, kako jedarne i hloroplastne DNK molekularne markere (*ITS* nukleusne sekvence; *trnL* i *trnL-F* hloroplastne sekvence), tako i 27 fenotipskih karakteristika (morfoloških i fitohemijskih) i na ovaj način dala veoma veliki doprinos razumevanju filogenetskih odnosa u okviru roda.

Istraživanje je potvrdilo ranije iznetu pretpostavku o monofiletskom poreklu roda *Centaurium* (*sensu* Mansion, 2004; Mansion i Struwe, 2004; Mansion, 2004) i naglasila značaj poliploidizacije koja je često povezana sa hibridizacijom u okviru ovoga roda.

Primarno mediteranski rod *Centaurium* je podeljen u tri glavne klade koje delimično podržavaju sistematiku roda (Zeltner, 1970; Melderis, 1972). U svakoj od klada nalaze se primeri poliploidnih sistema vrsta, kao i potvrđeni ili potencijalni primeri međuvrskih hibridizacija.

Prva klada obuhvata 7 vrsta: *C. pulchellum*, *C. capense*, *C. centaurioides*, *C. mairei*, *C. maritimum*, *C. bianoris* i *C. malzacianum*, od kojih se prve četiri navedene vrste karakterišu sa 9 hromozoma u haploidnoj garnituri i mogu se svrstati u „*C. pulchellum*“ podgrupu.

Do sada je zabeležena samo jedna diploidna populacija vrste *C. pulchellum* u Izraelu (Zeltner, 1985), dok su tetraploidne populacije *C. pulchellum* najrasprostranjeniji takson roda *Centaurium*. Zanimljivo je da i diploidna i tetraploidne populacije ovog poliploidnog sistema imaju saamo jedan par velikih hromozoma. Pretpostavlja se da je u nekom trenutku u evoluciji došlo do pojave disploidije koja predstavlja promenu u broju pojedinačnih hromozoma populacije (ne celih setova hromozoma kao što je to slučaj kod poliploidije), koja je tipično posledica hromozomskih rearanžmana. Međutim, ostaje nejasno kako se i kod tetraploidnih populacija vrste *C. pulchellum* nalaze samo dva velika hromozoma, umesto četiri koliko bi bilo očekivano pod pretpostavkom da je pri formiranju tetraploidne vrste došlo do autopoliploidizacije. Ipak, prisustvo ovog para velikih hromozoma ukazuje, već pri citogenetičkim analizama, na eventualnu hibridizaciju koja uključuje vrstu *C. pulchellum*.

Najverovatnije heksaploidna vrsta *C. centaurioides*, raste na području Indije. Za ovu vrstu, molekularni i citogenetički podaci ukazuju na blisku vezu sa vrstama „*C. pulchellum*“ grupe i vrstom *C. tenuiflorum* i na aloploidno poreklo. *C. maritimum* je diploidna vrsta žutih cvetova čije se areal fragmentarno prostire od Atlantske obale do Turske. Za tetraploidnu vrstu *C. bianoris* je jasno potvrđeno poliploidno hibridno poreklo koje uključuje diploidnu vrstu *C. maritimum* kao majčinsku dok je, takođe diploidna vrsta *C. tenuiflorum* određena kao polenski donor u ovom hibridnom ukrštanju (Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006). *C. malzacianum* je heksaploidna vrsta Arabijskog poluostrva i Sinaja. Filogenetske analize zajedno sa citogenetičkim nalazima (prisustvo dva velika hromozoma) ukazuju takođe na poliploidno hibridno poreklo od vrste *C. maritimum* (kao majčinske) i vrste *C. pulchellum* (kao očinske).

Druga klada obuhvata „*C. tenuiflorum*“ podgrupu sa diploidnim i tetraploidnim populacijama *C. tenuiflorum*, tetraploidnu vrstu *C. serpentinicola* (čija morfologija ukazuje na srodnost sa vrstama *C. tenuiflorum* i *C. erythraea*) i nekoliko uzoraka vrste *C. bianoris*.

C. tenuiflorum kompleks vrsta obuhvata diploidne i tetraploidne taksone široko rasprostranjene oko mediteranskog basena. Diploidna podvrsta (*C. tenuiflorum* ssp. *acutiflorum*) je česta na ostrvima, dok se tetraploidna podvrsta (*C. tenuiflorum* ssp. *tenuiflorum*) nalazi u zaleđu Mediteranskog basena i ima više perifernu distribuciju (The Euro+Med Plantbase Project, 2016).

C. serpentinicola je tetraploidna vrsta koja pokazuje morfološke sličnosti sa biljkama svrstanim u „*C. erythraea*“ podgrupu (treća klada) i biljkama svrstanim u „*C. tenuiflorum*“ podgrupu tako da je hibridno poreklo pretpostavljeno i za ovu vrstu (Zeltner, 1991). Međutim, molekularne analize nisu nedvosmisleno potvrdile poziciju ovog taksona. Sa jedne strane, možda je reč o vrsti nastaloj poliploidizacijom i hibridizacijom diploidne podvrste *C. tenuiflorum* ssp. *acutiflorum* (kao majčinske vrste) i takođe diploidne podvrste *C. erythraea* ssp. *rumelicum* (kao očinske vrste). Sa druge strane, ne može se isključiti ni autotetraploidno poreklo od *C. tenuiflorum* ssp. *acutiflorum*. Svrstavanje nekoliko uzoraka *C. bianoris* u okviru ove klade dodatno potvrđuje aloploidno poreklo ove vrste.

Treća klada obuhvata, 17 vrsta koje se svrstavaju u dve podgrupe: „*C. erythraea*“ **podgrupa** (slabo filogenetski razrešena podgrupa koja se sastoji od diploidnih, tetraploidnih i heksaploidnih vrsta koje su u srodstvu sa tetraploidnom podvrstom *C. erythraea* ssp. *erythraea*) i slabo podržana „*C. littorale*“ **podgrupa** (ovde spadaju tetraploidne vrste *C. chloodes*, *C. littorale*, *C. somedanum*, diploidna vrsta *C. scilloides*, kao i tetraploidne hibridne populacije *C. erythraea* × *C. littorale*). U okviru ove klade jasno se izdvajaju i tetraploidne jedinice okarakterisane kao *C. × tenuiflorum* koje predstavljaju neopisani takson pretpostavljeno hibridnog porekla.

Glavni razlog slabog filogenetskog razgraničavanja taksona u okviru „*C. erythraea*“ podgrupe leži verovatno u veoma nedavnom nastanku i širenju ovih poliploidnih kompleksa vrsta (tokom Kvarternarnog ledenog doba; Mansion, nepublikovani rezultati) ili pak u značajnom protoku gena između taksona i obimnim pojavama hibridizacije i pojavi tzv. „hibridnih rojeva“ (eng.: *hybrid swarm*). Različiti, izuzetno promenljivi i rasprostranjeni taksoni kompleksa vrsta *C. erythraea* (diploidni, tetraploidni i heksaploidni taksoni) često hibridizuju sa takođe poliploidnim formama vrsta *C. tenuiflorum* i *C. littorale*. Tetraploidna podvrsta *C. erythraea* ssp. *erythraea* je verovatno (dosadašnji podaci ne dozvoljavaju konačan zaključak), uključena u poreklo heksaploidne vrste *C. turcicum* zajedno sa vrstom *C. littorale*.

Međuvrsna hibridizacija između *C. erythraea* ssp. *erythraea* i *C. littorale* ssp. *littorale* je možda najbolje dokumentovan primer koji je privlačio pažnju istraživača još od kraja 19. veka (Wheldon, 1897; Gilmour, 1937; Ubsdell, 1976b; Ubsdell, 1976a). Detaljna istraživanja iz sedamdesetih godina prošlog veka zasnovana su na proučavanju morfoloških, citogenetičkih i ekoloških pokazatelja ovog primera međuvrsne hibridizacije (Ubsdell, 1976b; Ubsdell, 1976a; Ubsdell, 1979). Ekstenzivna hibridizacija se dešava između podvrsta *C. erythraea* spp. *erythraea* i *C. littorale* ssp. *littorale* na nestalnim peščanim dinama obale Lankašira (Velika Britanija) i sličnim područjima Nemačke i Danske (Ubsdell, 1979). U ovim narušenim staništima, obe podvrste, koje normalno naseljavaju donekle različita staništa, rastu zajedno u mešovitim populacijama. Morfološki intermedijarni tetraploidni hibridi, označeni kao *C. erythraea* × *C. littorale*, se učestalo javljaju i verovatno predstavljaju

stabilizovane derivate *F1* generacije međuvrskog ukrštanja koji ponekad stupaju u povratna ukrštanja sa roditeljskim taksonima (Ubsdell, 1979). Na nekim staništima su uočene i heksaploidne populacije biljaka koje svojim habitusom blisko podsećaju na jedinke podvrste *C. littorale* ssp. *littorale* i koje su, kao kruna ovih istraživanja, opisane kao nova vrsta, *Centaurium intermedium* (Wheldon) Druce. Rezultati dobijeni na prirodnim populacijama, kao i rezultati istog autora u eksperimentima veštačke hibridizacije ovih podvrsta, podržavaju koncepciju nepostojanja efikasnih postfertilizacionih reproduktivnih barijera između dve proučavane srodne vrste. Filogenetska istraživanja molekularnim markerima (Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005) obuhvatila su tetraploidne hibridne populacije okarakterisane kao *C. erythraea* × *C. littorale* koje su se grupisale delom u „*C. littorale*“ podgrupu, a delom u „*C. erythraea*“ podgrupu. Potvrđeno je postojanje protoka gena, a pozicija hibridnih taksona u dva genska klastera predlaže ili višestruko poreklo ovih taksona ili intenzivnu introgresiju genskih alela između vrsta u oba pravca, kao i pojavu „hibridnih rojeva“.

Evidentno je da proces poliploidizacije ima veoma velikog značaja na evolucione i filogenetske odnose u okviru roda *Centaurium*. Pojava poliploidnih kompleksa (biljaka) koji se ogleda u postojanju različitih nivoa ploidije (diploidi, tetraploidi i heksaploidi) u okviru jednog taksona je veoma učestala i ima izraženu ulogu pri stupanju u različite hibridizacione odnose. Sa druge strane, pojava disploidije (promena u broju pojedinačnih hromozoma populacije) se retko javlja. Aloploidizacija je najčešći oblik hibridizacije taksona ovog roda i uzrok je složenog obrasca evolucionih odnosa, nastajanja novih taksona kroz delimično spajanje predačkih linija (eng.: *reticulate evolution*) koji se verodostojnije mogu predstaviti filogenetskom mrežom nego grananjem. Sve ovo ukazuje da rod *Centaurium* predstavlja idealnu grupu za istraživanje nagle specijacije hibridizacijom i poliploidizacijom (Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006), te da je nastavak ovakvih istraživanja neophodan tim pre što, dosadašnja opsežna filogenetska istraživanja ovog roda (Mansion i Struwe, 2004; Mansion, 2004; Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005) ipak nisu obuhvatila niti jednu populaciju sa područja jugoistočne Evrope.

Proučavanje genetičke varijabilnosti prirodnih biljnih populacija

Još je Darwin postulirao da je jedna od osnovnih karakteristika svake prirodne populacije prisustvo individualne varijabilnosti njenih (Darwin, 1859) Poseban značaj ima ona varijabilnost koja se na neki način prenosi kroz generacije i ta, nasledna raznovrsnost organizama, prisutna je na različitim nivoima organizacije genetičkog materijala. Variranje osobine neophodan je uslov za delovanje prirodne selekcije.

Jedan od polaznih pristupa istraživanju varijabilnosti prirodnih populacija podrazumeva praćenje diskontinuiranih, tj. kvantitativnih osobina (boja i tekstura ploda, otpornost na bolesti i insekte i sl.) i kontinuiranih, tj. kvalitativnih (visina, masa, broj semena u plodu i sl.). Među fenotipske osobine, koje često oslikavaju genetičku varijabilnost, spadaju i hemijski konstituenti i proteini. Kod biljaka, organska jedinjenja, koja ne učestvuju u primarnim procesima fiziologije i razvića, se nazivaju sekundarnim metabolitima i predstavljaju pogodne fitohemijske markere karakteristične za određeni takson.

Varijabilnost se može odnositi i na promene u broju ili strukturi hromozoma i tada govorimo o aneuploidiji i poliploidiji (promene u broju pojedinačnih, odnosno celih setova hromozoma), translokacijama, inverzijama, duplikacijama i delecijama (hromozomskim rearanzmanima). Pojave aneuploidije i poliploidije se često javljaju u prirodnim populacijama biljnih vrsta. Na nivou jedarne DNK i DNK organela (mitohondrija i hloroplasta) se može uočiti varijabilnost pojedinih delova ovih molekula, sve do nivoa njihovih osnovnih gradivnih jedinica - nukleotida.

Genetički marker predstavlja bilo koju karakteristiku (fenotipska osobina, protein, gen ili prepoznatljiv deo DNK) čije se nasleđivanje može pratiti i koja pruža informaciju o genotipu jedinke (Simonović, 2011).

Upotreba **molekularnih markera** podrazumeva analizu makromolekula tj. DNK i RNK. Prednost DNK markera se ogleda u njihovoj stabilnosti i mogućnosti da se detektuju u većini tkiva i organa, bez obzira na faze rasta i razvića organizma i uticaja sredine (Leitch i Bennett, 1997).

Molekularno-biološke tehnike, koje podrazumevaju upotrebu **DNK molekularnih markera**, omogućile su direktno upoređivanje različitog genetičkog materijala (Weising i sar., 1994); oni mogu da pokriju čitav genom, uključujući i delove DNK molekula koji se ne ekspimiraju. Ostali genetički markeri, kao što su na primer morfološki i fitohemijski, baziraju se na analizama fenotipskih osobina i neminovno obuhvataju komponentu uticaja sredine u manjoj ili većoj meri. U ovim činjenicama se i ogleda primena molekularnih markera u proučavanjima populacione i konzervacione genetike kao i evolucione biologije.

DNK molekularni markeri

Veliki broj DNK molekularnih markera podrazumeva *PCR* umnožavanje delova DNK molekula (lančana reakcija polimeraze; eng.: *Polymerase Chain Reaction*).

Prilikom odabira odgovarajućih molekularnih markera moraju se uzeti u obzir karakteristike ispitivanog taksona i tip problema na kome se radi, ali i tehnički detalji kao što su dostupnost markera (tj. da li je za primenu molekularnog markera potrebno prethodno imati informacije o ispitivanom genomu ili ne), cena, informativnost, dostupnost opreme i mnoge druge činjenice. Na osnovu 292 članka objavljenih između 2006. i 2009. godine, a koji se tiču diskriminacije biljnih sorti, mikrosatelitski molekularni markeri (jednostavni kratki ponovci ili kraće mikrosateliti; eng.: *Simple Sequence Repeats - SSR*) su se pokazali kao najpopularniji metod (36%), dok su *RAPD* (nasumično umnožena polimorfna DNK; eng.: *Random Amplified Polymorphic DNA*) bili zastupljeni u 27% radova. Ostale metode, kao što su *ISSR* (međumikrosatelitski ponovci; eng.: *Inter-Simple Sequence Repeats*), *AFLP* (polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata; eng.: *Amplified Fragment Length Polymorphism*), i druge metode zasnovane na analizi jedarnog genoma, bile su zastupljene u 34% radova (Nybom, Weising i Rotter, 2014).

Jedan od možda prvih kriterijuma za izbor pogodnog DNK molekularnog markera u konkretnim istraživanjima je pitanje njegove **dostupnosti**, tj. da li je za primenu molekularnog markera potrebno prethodno imati informacije o ispitivanom genomu ili ne.

Važan kriterijum pri izboru molekularnog markera je i pitanje njegove **senzitivnosti** (osetljivosti, rezolucije) i **polimorfnosti** u odnosu na zadatak koji se postavlja u okviru

istraživanja. Marker primenljiv u istraživanjima genetičkog diverziteta mora da bude polimorfan, jer se kroz polimorfnost ogleda njegova osnovna funkcija. Neki markeri su se bolje pokazali u detekciji varijabilnosti u okviru sorti i populacija, dok se, sa druge strane, upotreba nekih markera prevashodno vezuje za više sistematske kategorije. Uvid u literaturu nam obično može dati smernice oko informativnosti molekularnih markera u odnosu na dati nivo biološke hijerarhije, ali su preliminarna istraživanja poželjna, a često i neophodna.

Sledeće pitanje izbora pogodnog DNK molekularnog markera se tiče njegove sposobnosti da karakteriše **više lokusa** (eng.: *multilocus markers*) ili se zasniva na ispitivanju **pojedinačnih lokusa** (eng.: *single-locus markers*) u okviru genotipova. Multilokusni pristupi opisuju mnoge anonimne gene istovremeno (npr. *RAPD* i *AFLP* markeri). Ovi pristupi su tehnički lako izvodljivi, ali neprecizni i imaju nedostatke kao što je dominantnost (nemogućnost razlikovanja heterozigota od dominantnog homozigota) i, često, nemogućnost poređenja sa sličnim istraživanjima. Sa druge strane, pristupi koji se zasnivaju na detekciji varijabilnosti pojedinačnih lokusa imaju mogućnost detekcije kodominantnih alela i dobijeni podaci se mogu koristiti za mnogo preciznije analize koje se, u ovom slučaju, mogu porediti između različitih istraživanja i laboratorija (Sunnucks, 2000).

Upotreba više različitih tipova DNK markera je takođe opravdana i poželjna. Na ovaj način mogu se prevazići greške u rezultatima nastale zbog stohastičkih događaja pri uzorkovanju materijala.

RAPD

Nasumično umnožena polimorfna DNK (eng.: *Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD*; Williams i sar., 1990; Welsh i McClelland, 1990) je tip molekularnih markera koji podrazumeva *PCR* umnožavanje delova genomske, plastidne i mitohondrijske DNK (ukupne DNK) jednim kratkim prajmerom veličine oko 10 bp, koji funkcioniše i kao direktan i kao reverzni prajmer i koji ima arbitrarno izabranu sekvencu. Da bi došlo do hibridizacije i umnožavanja *PCR* produkta neophodno je da se prajmer veže za dve sekvence na suprotnim lancima DNK molekula koje međusobno nisu udaljene više od 2000 bp, što je maksimalna dužina *PCR* fragmenta. Varijabilnost genoma, koja se detektuje ovom tehnikom je u najvećoj

meri posledica varijacija sekvenci DNK matrica na mestima vezivanja prajmera, te se tada uočava prisustvo ili odsustvo amplikon. Takođe, nije isključena mogućnost da varijabilnost proističe i od razlika u dužini amplifikovane sekvence između mesta vezivanja prajmera. Elektroforetski *RAPD* „profil“ uzorka tako može sadržati od 1 do 20 traka (Anđelković i Stamenković-Radak, 2013).

Korišćenje arbitrarno izabranih prajmerskih sekvenci podrazumeva pristup skoro neograničenom broju markera pri čemu za primenu ove tehnike nije potrebna informacija o DNK sekvencama ispitivane vrste, a tehnika se može upotrebiti za procenu genetičke varijabilnosti unutar ili između vrsta i populacija. Na ovaj način dobija se informacija o varijabilnosti i polimorfizmu nasumično odabranih sekvenci duž biljnog genoma, pa *RAPD* tako predstavlja tehniku koja genotipove karakteriše analizom više lokusa (multilokusnu tehniku). Ova tehnika je relativno jednostavna, brza i jeftina. Koristi se za proveravanje (skrining) velikog broja uzoraka prilikom oplemenjivanja i selekcije uz pomoć markera, konstrukciju dendrograma, DNK profilisanje virusa, bakterija, gljiva, biljaka i životinja. Primena tehnike u proučavanju varijabilnosti biljnih populacija ogleđa se kroz oplemenjivanje biljaka i mapiranje lokusa kvantitativnih osobina (eng.: *Quantitative Trait Loci* –QTL). S obzirom da je u pitanju tehnika za koju poznavanje sekvenci DNK nije potrebna, ova tehnika se uspešno koristi u proučavanju prirodnih populacija biljnih vrsta koje ne spadaju u model organizme ili dobro proučene i istražene taksone (Nybom i Bartish, 2000).

Osnovni nedostatak tehnike ogleđa se u činjenici da su *RAPD* produkti dominantni pa veliki deo informacija o proučavanom genomu ostaje nepoznat (maskiran dominantnošću). Takođe, iz činjenice da je DNK amplifikacija uz pomoć nasumičnih kratkih prajmerskih sekvenci prilično stohastički proces, proizilazi da *RAPD* tehnika nije uvek savršeno reproducibilna. Vrlo male promene u uslovima reakcije mogu značajno uticati na dobijeni *RAPD* elektroforetski profil, što dovodi u pitanje pouzdanost rezultata i njihovu ponovljivost, što dalje onemogućava razmenu i poređenje rezultata među laboratorijama. Homologija dobijenih fragmenata predstavlja takođe jedan od problema tehnike, jer komigracija dobijenih fragmenata ne mora da podrazumeva i njihovu homologiju. Međutim,

opšte je stanovište da se ovaj problem javlja kada se upoređuju taksoni na višim nivoima klasifikacije, a da ne predstavlja problem u istraživanjima populacione genetike i analizama unutar vrsta (Lanner-Herrera i sar., 1996; Rieseberg, 1996). Tehnika zahteva relativno malu količinu DNK matrice za uspešnu amplifikaciju (obično 5-50 µg po reakciji), ali, zbog prirode same nasumične amplifikacije duž celog genoma, neophodno je imati kvalitetnu DNK matricu visoke molekulske težine, prečišćenu od mogućih kontaminacija polisaharidima, fenolima ili drugim nečistoćama. Posebna pažnja se mora posvetiti i kontaminacijama DNK uzorka koje mogu da poteknu od prisustva stranih DNK molekula u uzorku, jer tehnika podrazumeva nespecifično umnožavanje fragmenata, te se mogu amplifikovati fragmenti različitih organizama.

RAPD molekularni markeri su često korišćeni u procenama genetičkog diverziteta sorti poljoprivrednih kultura (Friesen, Fritsch i Bachmann, 1997; Mukherjee i sar., 2013), prirodnih populacija nekih biljnih vrsta (Smith, Burke i Wagner, 1996; Bertoni i sar., 2007), ali i prilikom analiza međuvrsne hibridizacije (Smith, Burke i Wagner, 1996; Srivastava i sar., 2010; Matoba i sar., 2011).

Mikrosatelitski molekularni markeri

U genomima svih viših organizama postoje regioni koji se sastoje od velikog broja ponovljenih sekvenci. Broj ponavljanja osnovnog motiva može da varira. Postoji više klasa ovakvih sekvenci od kojih je klasa tzv. mikrosatelitskih sekvenci (ili kraće, mikrosatelita; jednostavnih ponavljajućih sekvenci, eng.: *Simple Sequence Repeats –SSR*; Jacob i sar., 1991, ili kratki tandemske ponovci, eng.: *Short Tandem Repeats –STR*; Edwards i sar., 1991) zbog svojih karakteristika veoma interesantna sa stanovišta detekcije varijabilnosti ovih ponovaka. Mikrosatelitske sekvence su kratki ponovci (motiva 1-6 baznih parova), koji se ponavljaju u nizovima (Tautz i Renz, 1984). Za ove nizove je karakteristična pojava izrazite varijabilnosti broja ponovaka. Moguća objašnjenja za nastanak mikrosatelitskih sekvenci uključuju greške pri replikaciji (tzv. „proklizavanje“ DNK polimeraze *III* na monotonim nizovima nukleotida) i reparaciji, kao i nejednaku rekombinaciju i retrotranspoziciju (Li i sar., 2002). *SSR* sekvence se javljaju veoma često i distribuirane su u čitavom genomu. Pri analizi mikrosatelitskih lokusa potrebna je relativno mala količina DNK matrice za uspešnu

amplifikaciju (obično 5-50µg po reakciji), a pošto se koriste relativno dugački *PCR* prajmeri, reproducibilnost metode je velika i analiza ne zahteva visoko kvalitetnu DNK. Značajna prednost ove metode u odnosu na ostale DNK markere je specifičnost, tako da je mogućnost amplifikacije strane DNK veoma malo verovatna.

Mikrosatelitski molekularni markeri su veoma pogodni za razlikovanje blisko srodnih genotipova; zbog visokog stepena varijabilnosti koriste se u populacionim istraživanjima i analizi blisko srodnih sorti (Esselink, Smulders i Vosman, 2003; Kumar i sar., 2009). Ovi molekularni markeri su takođe primenjivi u detekciji hibridnih taksona (na primer: Nandakumar i sar., 2004; Schuck i sar., 2011; Subashini, Shanmugapriya i Yasodha, 2014; Turchetto i sar., 2015; Martínez-Garrido i sar., 2016).

Sekvence koje okružuju svaki *SSR* mogu biti različite i, ukoliko su poznate, to pruža mogućnost konstruisanja specifičnih prajmera (obično, 20-25 bp) i amplifikovanja regiona DNK molekula koji sadrži mikrosatelitsku sekvencu čime se dobija *SSR* molekularni marker za konkretan lokus. Ovako konstruisan marker, zbog visoke stope mutacija u samoj mikrosatelitskoj sekvenci, često ispoljava varijabilnost, pa se detektuju aleli koji se razlikuju u broju ponovaka mikrosatelitskog motiva i koji su kodominantni. Iako se ova metoda zasniva na analizi pojedinačnih lokusa u genomu, u jednoj *PCR* reakciji moguće je umožiti nekoliko lokusa (eng.: *multiplexing*) ili umnoženi produkti više *PCR* reakcija mogu da se pomešaju (metod mešanja amplikona; eng.: *multi pooling*) i tako združeno detektuju ukoliko se dužine i opsezi dužina alela različitih lokusa ne preklapaju (Ghislain i sar., 2004), ili ukoliko su lokusi obeleženi različitim fluorescentnim bojama. Ovaj način detekcije značajno umanjuje troškove analize.

Prepreke sa kojima se suočava ova metoda DNK molekularnih markera su upravo u konstruisanju *SSR* lokusa. Naime, *SSR* markeri su razvijeni samo za mali broj vrsta, vrlo često su visoko specifični i ne mogu se primenjivati na različite vrste. Ukoliko želimo da uradimo analize uz pomoć mikrosatelitskih molekularnih markera taksona za koji u literaturi nisu dostupne mikrosatelitske sekvence, moramo sami da ih konstruišemo.

Identifikacija novih *SSR* lokusa je do nedavno iziskivala veoma komplikovane i skupe procedure, koje su istovremeno dugotrajne i tehnički zahtevne (Cho i sar., 2000). Sa druge strane, na ovaj način je bilo moguće razviti samo ograničen broj markera, često nedovoljan za uspešnu primenu na polju populacione genetike (Castoe i sar., 2012). Ovi problemi su još više izraženi kada je reč o vrstama na kojima su vrlo malo vršena molekularno-genetička istraživanja, tj. one koje ne predstavljaju model-vrste (eng.: *non-model species*) (Ellis i Burke, 2007). Pojava tehnika sekvenciranja DNK nove generacije (eng.: *Next-Generation Sequencing - NGS*) i bioinformatičkih alata umanjila je vreme i trud koji je potrebno uložiti za razvijanje *SSR* markera. Poslednjih godina se intenzivno uvećava količina podataka o DNK sekvencama, dostupnih u javnim kolekcijama podataka (pregled je dat u Simonović, 2011). Mikrosatelitski markeri mogu se lako i brzo razviti na osnovu informacija već sekvenciranog DNK i RNK materijala, bilo da informacija potiče iz sekvenciranja celog genoma ili transkriptoma (Ekblom i Galindo, 2011; Zalapa i sar., 2012).

Poseban značaj u proučavanju unutar- i među- populacionih genetičkih varijabilnosti imaju mikrosatelitski markeri razvijeni na osnovu transkribujućih sekvenci DNK. Mikrosatelitski markeri u okviru transkribujućih sekvenci (eng.: *Expressed Sequenced Tags-Simple Sequence Repeats; EST-SSR*) su manje polimorfni od mikrosatelitskih markera izvedenih iz sekvenci genomske DNK, ali ipak zadržavaju dovoljan nivo varijabilnosti i polimorfizma kod blisko srodnih genotipova (Varshney, Graner i Sorrells, 2005; Kalia i sar., 2011). Sa druge strane, poseduju visok nivo **transferabilnosti**, tj. primenjivosti na srodne vrste (Postolache i sar., 2014; Dufresnes i sar., 2014), pa čak i na više taksonomske kategorije (Gupta i sar., 2003; Saha i sar., 2004; Vendramin i sar., 2007; Feng i sar., 2008; Raveendar i sar., 2015).

Procene zastupljenosti mikrosatelitskih unutar *EST* sekvenci se razlikuju u zavisnosti od kriterijuma pretrage, ali se može reći da su iznenađujuće česte; mogu se naći na svakih 2-10 Kb (npr. prosečno 6,3 Kb kod transkriptoma vrste *Hordeum vulgare*; Thiel i sar., 2003). Pretpostavka je da se u bazi podataka kontiga od 1000 sekvenci može naći dovoljno markera za populaciono-genetičke analize (Ellis i Burke, 2007). Trinukleotidni ponovci često preovlađuju u protein-kodirajućim regionima *EST*, dok su dinukleotidni ponovci češći u 5' i

3' netranslirajućim regionima. Ovo se objašnjava činjenicom da se dodavanjem ili gubitkom trinukleotidne sekvence ne pomera okvir čitanja pri transkripciji i zato ovakve promene mogu da se održe u genomu kroz generacije, bez značajnih posledica po fenotip (Nybom, Weising i Rotter, 2014).

Možda najvažnija prednost *EST-SSR* markera, u odnosu na *SSR* markere izolovane iz celog genoma, se ogleda u činjenici da se i prajmerske sekvence *EST-SSR* markera nalaze u delovima DNK koji se transkribuju, te su u određenom stepenu evoluciono očuvane, što umnogome povećava šansu za transferabilnost, dok sa druge strane, smanjuje učestalost pojave nultih alela (Ellis i Burke, 2007).

Pravilnu interpretaciju rezultata dobijenih uz pomoć mikrosatelitskih markera može ugroziti činjenica da mutacije u delovima DNK za koje se vezuju prajmeri dovode do pojave nultog alela (tj. ne dolazi do amplifikacije produkta). Ova pojava dovodi do grešaka u detekciji genotipova i dovodi do pogrešne procene učestalosti alela, genotipova i potcenjivanja heterozigotnosti (usled toga što se pojava jednog amplikona detektuje kao homozigotnost).

Teškoće pri analizi mikrosatelitskih molekularnih markera kod poliploidnih biljnih vrsta

Postoje dve glavne poteškoće vezane za analize mikrosatelitskih markera, posebno kada je reč o biljnim populacijama kod kojih su pojave **poliploidizacije** i **hibridizacije** između različitih taksona veoma učestale.

Prvi problem je vezan za tzv. „**alelsko doziranje**“ (eng.: *allelic dosage*) koje se odnosi na nedoumice koje se javljaju prilikom detekcije broja alela heterozigotnih genotipova poliploidnih vrsta. Uprkos činjenici što su mikrosatelitski markeri kodominantni, često je veoma teško, ili čak nemoguće, odrediti broj kopija više različitih alela u poliploidnim genomima.

Drugi problem ogleda se u **načinu nasleđivanja** kod poliploidnih vrsta, koje može biti polizomsko, dizomsko ili kombinacija ova dva načina nasleđivanja. Način nasleđivanja može snažno uticati na distribuciju genotipova u populaciji i samim tim na pravilnu interpretaciju rezultata (poglavlje: Nastanak i održavanje poliploidnih i/ili hibridnih taksona).

Sledeći problem vezan za analizu mikrosatelitskih markera kod poliploidnih vrsta je i **detekcija nultih alela**. Naime, iako se ovaj problem javlja i pri analizi diploidnih genoma, kod poliploida je detekcija nultih alela još više otežana prostom činjenicom da je pojava individua sa nultim homozigotnim stanjem (da su svi aleli poliploidnog genotipa nulti aleli) jako retka, čak i kada je učestalost nultih alela tog taksona relativno visoka (De Silva i sar., 2005).

Još jedan problem vezan za istraživanju biljnih populacija je činjenica da se pri populacionoj analizi najčešće polazi od pretpostavke da je populacija u Hardi-Vajnbergovom ravnotežnom stanju. Kod biljnih populacija se ne sme zanemariti činjenica da se mnoge vrste reprodukuju mešavinom **nasumičnog** ukrštanja i **samooplodnje**. Pod pretpostavkom slučajnog ukrštanja, ravnotežno stanje populacije se postiže posle jedne generacije. Kod populacija kod kojih se javlja nasumično ukrštanje i samooplodnja, dva suprotna efekta koji imaju ovi načini razmnožavanja na učestalost genotipova dovode do toga da se ravnotežno stanje populacije dostiže asimptotski. Uz više stope samooplodnje i broj generacija potrebnih da se dostigne ravnotežno stanje populacije je veći (De Silva i sar., 2005).

Imajući u vidu sve nabrojane probleme vezane za analizu mikrosatelitskih lokusa poliploidnih biljnih vrsta, njihovo rešavanje je okrenuto ka upotrebi kompleksnih matematičkih modela, koji istovremeno uzimaju u obzir brojne promenljive i njihove interakcije, za koje je često potrebno izvršiti i više hiljada ponovljenih preračunavanja. Zbog toga, ovakva izračunavanja je jako teško, ako ne i nemoguće, izvršiti bez upotrebe kompjuterskih resursa. Samo nekoliko kompjuterskih programa je dostupno za izračunavanje broja alelnih kopija poliploidnih organizama (pregled je dat u Clark i Jasieniuk, 2011). Međutim, ovi pristupi često polaze čak i od netačne pretpostavke da je kod delimičnih heterozigota verovatnoća da svaki alel bude prisutan u heterozigotnom genotipu ista, ili pak, ne mogu da analiziraju podatke poliploidnih vrsta i porede podatke različitih nivoa ploidijske, a neki ne uzimaju u obzir način nasleđivanja i stope samooplodnje. Odabir softvera je, dakle, jedno od ključnih pitanja, koje treba da bude vođeno konkretnim problemom analize mikrosatelitskih lokusa poliploidnih vrsta, ali je sa druge strane često ograničeno dostupnošću programskih rešenja.

Sekundarni metaboliti roda *Centaurium* kao fitohemijski markeri genetičke varijabilnosti

Fitohemijska istraživanja u populacionoj genetici biljaka se u osnovi bave analizom varijabilnosti u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu produkata sekundarnog metabolizma biljaka, na intra- i inter-specijskom nivou.

Fitohemijski markeri su još jedno korisno oruđe u proceni genetičke varijabilnosti populacija i biljnoj taksonomiji i potvrđivanju hibridne prirode biljaka pošto hibridizacija najčešće sa sobom nosi i kvalitativne i kvantitativne razlike u produkciji sekundarnih metabolita (Orians, 2000).

Sekundarni metaboliti biljaka su niskomolekulska jedinjenja koja nemaju energetski značaj, i za koja je karakteristična veoma velika raznolikost hemijskih struktura. Oni se mogu naći u inaktiviranim oblicima deponovanim u vakuolama ćelija, imaju ulogu u zaštiti biljaka od abiotičkih i biotičkih stresogenih agenasa ili regulišu interakcije biljaka sa drugim organizmima. Mnoga jedinjenja sekundarnog metabolizma imaju veliku adaptivnu vrednost u zaštiti od mikrobnih infekcija i herbivora, kao atraktanti za oprašivače ili životinje koje raznose semena, ali i kao repelenti (Kliebenstein i Osbourn, 2012). Sekundarni metaboliti se u većini slučajeva ne smatraju esencijalnim za preživljavanje biljaka, ali mogu imati kompetitivnu prednost.

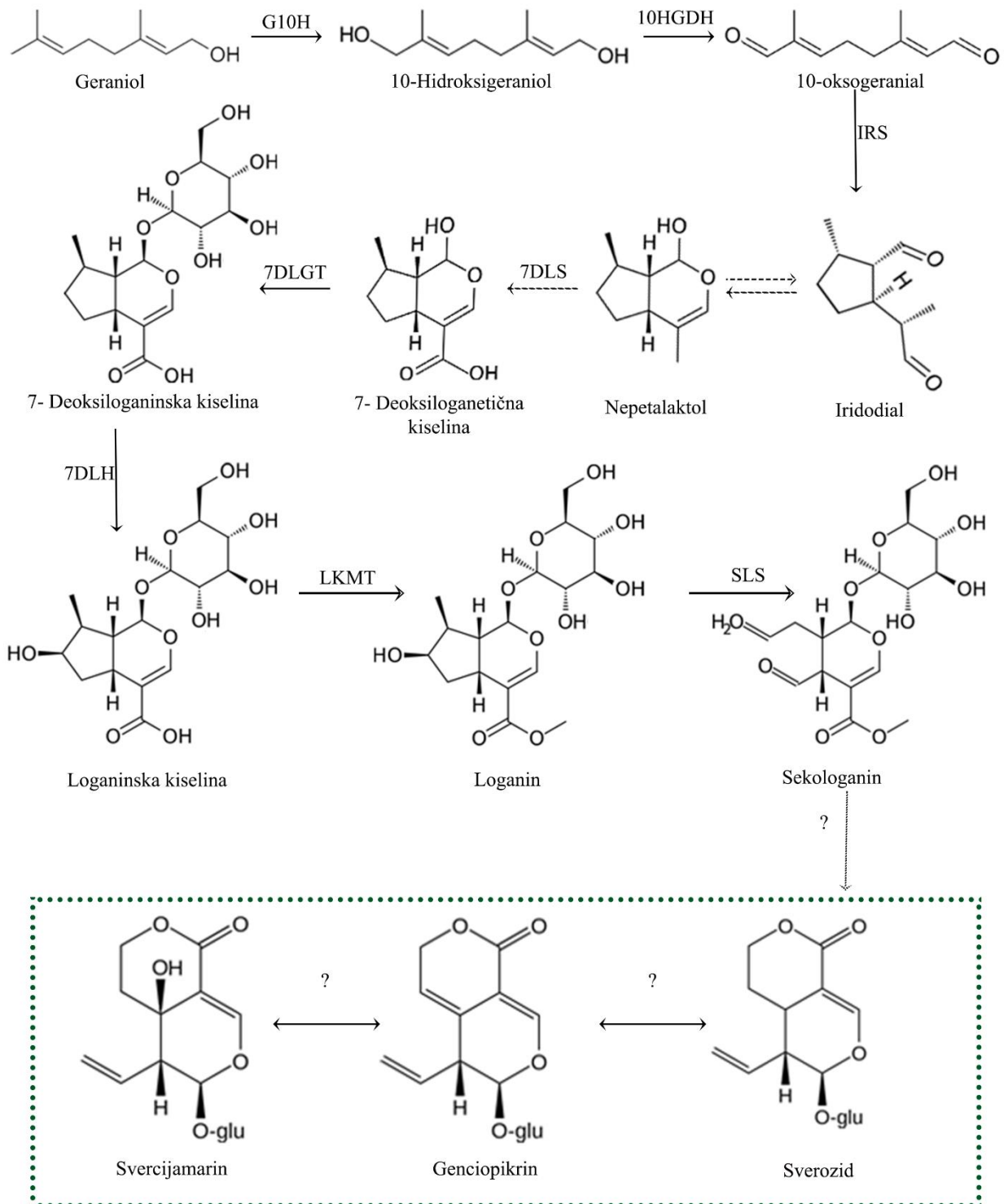
Prethodna fitohemijska istraživanja vrsta roda *Centaurium* su ukazala na prisustvo raznovrsnih sekundarnih metabolita, uključujući jedinjenja koja pripadaju terpenoidima (monoterpenoidi, seskviterpenoidi, diterpenoidi i triterpenoidi), fenolima (fenolne kiseline, flavonoidi, ksantoni) kao i alkaloidima i steroidima (pregled dat u Šiler i Mišić, 2016).

Veoma su značajna farmakološka dejstva ekstrakata vrsta roda *Centaurium*. Prema mnogim izvorima, zvanična biljna droga „*Centaurii herba*“, pored vrste *C. erythraea* uključuje i vrstu *C. pulchellum*, a veći broj istraživanja je ukazao da i vrsta *C. littorale* ima veoma veliki potencijal za upotrebu u farmakologiji (npr. Van der Sluis, 1985; Krstić i sar., 2003; Wichtl, 2004; Šiler i sar., 2014). U narodnoj medicini, kičica se koristi od antičkih vremena. Različiti preparati se koriste za lečenje stomaćnih tegoba, u tretmanima za lečenje

astme, žutice, crevnih parazita, u redukciji hipertenzije i lečenju dijabetesa, lečenju rana i mehaničkih povreda (npr. Grieve, 1971; Botion i sar., 2005). Smatra se da lekovitost ovih vrsta potiče od gorkih iridoidnih jedinjenja koja svoja dejstva ostvaruju tako što pospešuju sekreciju želudačnih i crevnih sokova, pa na taj način deluju na poboljšanje varenja i povećanje apetita. Za iridoidne glukozide je pokazano da imaju i druga značajna biološka svojstva: antikancerogeno, antimikrobno, antifungicidno i sedativno dejstvo. Takođe, i ksantonska jedinjenja se intenzivno proučavaju zbog farmakoloških efekata kao što su: antidepresivno, antituberkulozno, mutageno, citotoksično, antitumorsko dejstvo.

Glavni i najviše proučeni sekundarni metaboliti pripadaju grupi sekoiridoida sverozidnog tipa od kojih su najviše zastupljeni: svercijamarin (SVM), sverozid (SV) i genciopikrin (GP) (van der Sluis i Labadie, 1981; Kumarasamy i sar., 2003; Piateczak, Wielanek i Wysokinska, 2005; Šiler, 2012; Mišić i sar., 2013; revidirano u Šiler i Mišić, 2016). Sekoiridoidi su u biljnim tkivima zastupljeni u glikozilovanoj formi. Njihovi aglikoni su uglavnom veoma nestabilna jedinjenja. Pomenuta tri sekoiridoidna jedinjenja (SVM, SV i GP) zabeležena su kod svih vrsta roda *Centaurium* koje se nalaze na području Srbije (Šiler i sar., 2014). Ova jedinjenja su karakteristična po veoma gorkom ukusu i smatra se da predstavljaju adaptacije biljaka u zaštiti od herbivora i parazita.

Biosinteza sekoiridoida otpočinje tako što dolazi do kondenzacije tri molekula acetilkoenzima A (acetil-CoA), koji se potom redukuju gradeći mevalonsku kiselinu (**Slika 5**). Dva molekula mevalonske kiseline u reakcijama fosforilacije, izomerizacije i polimerizacije formiraju osnovni prekursor u biosintezi svih terpena, pa i monoterpena: geraniola. Hidroksilaciju geraniola u položaju 10 obavlja enzim geraniol 10-hidroksilaza tako da nastaje 10-hidroksigeraniol. Put dalje sinteze ka loganinu uključuje nekoliko reakcija katalisanih citohrom *P450* enzimima, zajedno sa *NADPH*-citohrom *P450* reduktazama kao elektron transporterima. Loganin se prevodi u sekologanin posredstvom enzima sekologanin sintaze (takođe *P450* monooksigenaza) koji kataboliše oksidativno cepanje ciklopentanskog prstena. Dalja konverzija sekologanina, preko sverozida i svercijamarina, do genciolikrina, se odvija kroz nekoliko koraka koji nisu razjašnjeni (**Slika 5**).

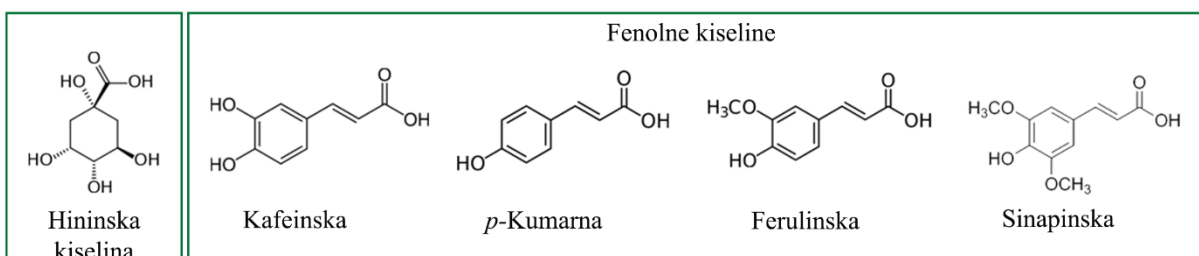


Slika 5: Pretpostavljeni biosintetski put sekoiridoidnih glukozida roda *Centaurium*. Prikazana su jedinjenja i enzimi koji katalizuju reakcije do formiranja sekologanina. Krajnji koraci sinteze koji vode do formiranja sverozida, genciopikrina i svercijamarina još uvek nisu rasvetljeni. **G10H:** Geraniol 10-hidroksilaza; **10HGDH:** 10-Hidroksigeraniol dehidrogenaza (Ikeda i sar., 1991; Krithika i sar., 2015) ; **IRS:** Iridoid sintaza (Geu-Flores i sar., 2012); **7DLS:** Sintaza 7-deoksiloganetične kiseline (Salim i sar., 2014; Asada i sar., 2013); **7DLGT:** Glukoziltransferaza 7-deoksiloganetične kiseline (Giglioli-Guivarc'h, 2013); **7DLH:** Hidroksilaza 7-deoksiloganinske kiseline (Salim i sar., 2013); **LKMT:** o-Metiltransferaza loganinske kiseline (Murata i sar., 2008); **SLS:** sekologanin sintaza (Yamamoto i sar., 2000). Prerađeno iz (Šiler i Mišić, 2016).

Široko rasprostranjena jedinjenja sekundarnog metabolizma biljaka su fenolna jedinjenja. Do sada je poznato više hiljada različitih fenolnih jedinjenja koje sintetišu više biljke (Lattanzio, 2013). U prirodi se fenoli mogu naći u slobodnom (aglikoni), metilovanom, hidroksilovanom i glikozilovanom obliku (Harborne i Williams, 2000; Van Sumere, 1989). Od mnogobrojnih klasa fenolnih jedinjenja kod vrsta roda *Centaurium*, do sada su zabeležene fenolne kiseline (Beerhues i Berger, 1995; El-Mawla, Schmidt i Beerhues, 2001), flavonoidi (flavoni i flavonoli; Kulevanova i sar., 2003; Stefkov i sar., 2014; Valentão i sar., 2001; Markham, 1989) kao i ksantonska jedinjenja (van der Sluis i Labadie, 1981; van der Sluis i Labadie, 1985; Van der Sluis, 1985; Vaillant i Mariotte, 1986; Valentão i sar., 2002; Janković i sar., 2002; Krstić i sar., 2003; Kaouadji, Šiler i sar., 2014). Za fenolna jedinjenja se smatra da imaju ključnu ulogu kao odbrambene supstance, zaštiti od UV zračenja, niskih temperatura, infekcija patogena, napada herbivora, kao i da imaju antioksidativna svojstva. Takođe, boja voća, povrća i cvetova, potiče od fenolnih jedinjenja (Lattanzio, 2013). Fenoli su jedinjenja izgrađena od jednog ili više aromatičnih prstenova supstituisanih hidroksilnim grupama.

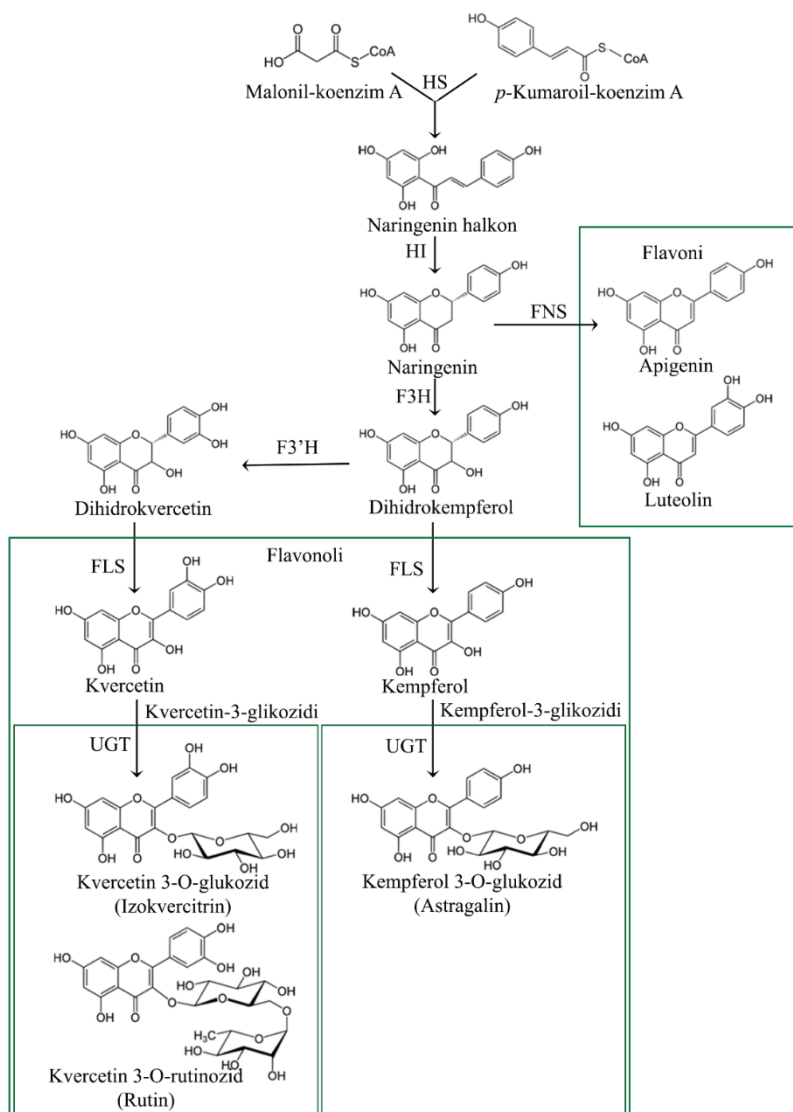
Fenolne kiseline u svom sastavu sadrže karboksilnu grupu i u prirodi se nalaze u obliku derivata hidroksibenzoeve i hidroksicinaminske kiseline. Položaj karboksilne grupe fenolnih kiselina u velikoj meri menja biološka i hemijska svojstva ovih molekula, iako je osnovni skelet isti. Kod vrste *C. erythraea* do sada je identifikovano devet jedinjenja koja pripadaju grupi fenolnih kiselina: dva jedinjenja koja pripadaju podgrupi hidroksibenzoevih kiselina (Galna kiselina i 3-hidroksibenzoeva kiselina; El-Mawla, Schmidt i Beerhues, 2001; Beerhues i Berger, 1995; Dogan i sar., 2010) i sedam jedinjenja koja pripadaju podgrupi

hidroksicinaminskih kiselina (ferulinska kiselina, sinapinska kiselina, kafeinska kiselina, rozmarinska kiselina, *p*-kumarna kiselina, umbeliferon, i 5-formil-2,3-dihidroizokumarin; Valentão i sar., 2001; Valentão i sar., 2003). Hininska kiselina je cikloheksankarboksilna kiselina koja je prekursor hidroksicinaminskih kiselina. Na **Slici 6** prikazane su hemijske strukture hininske kiseline i fenolnih kiselina obuhvaćenih istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.



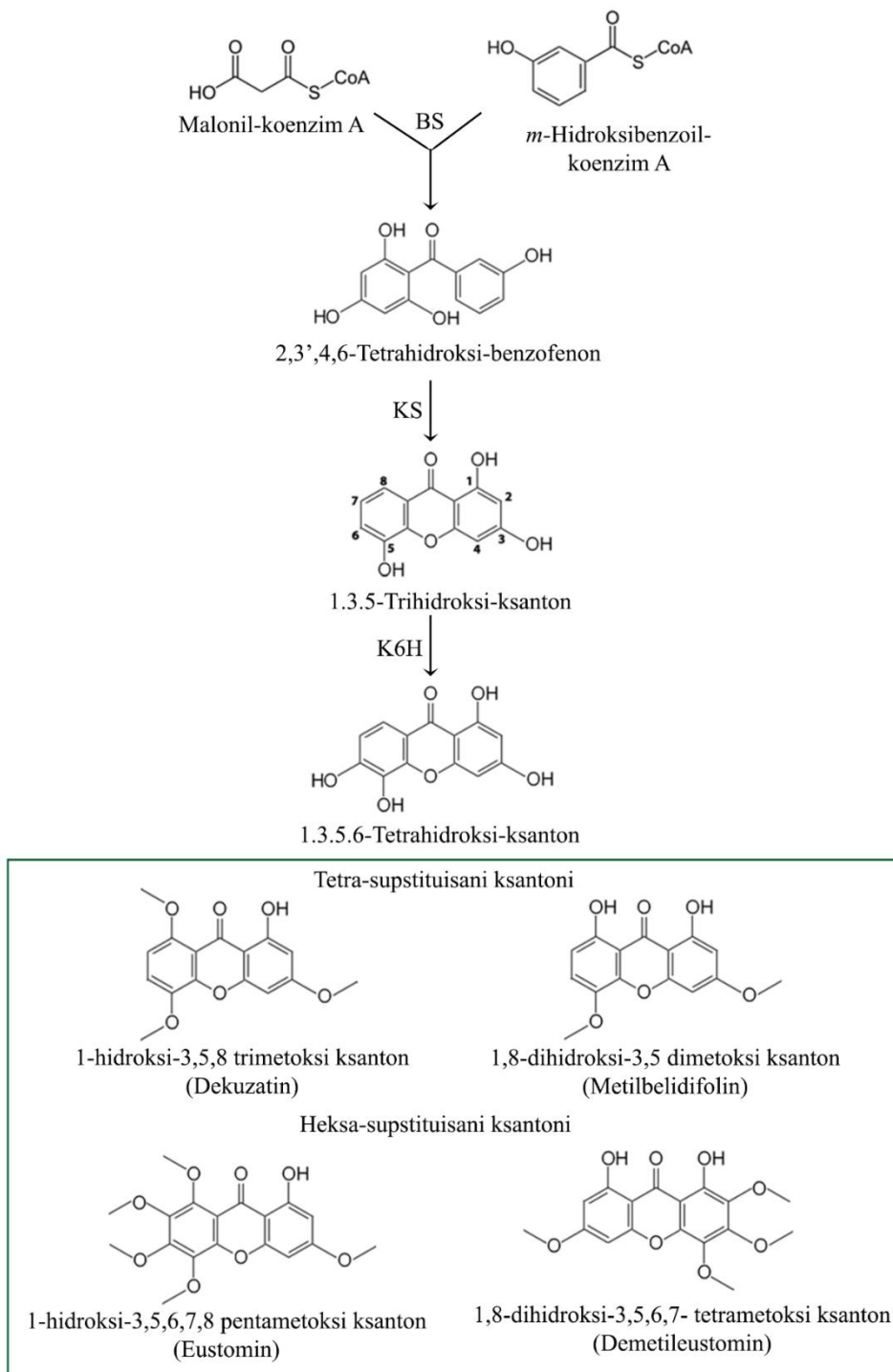
Slika 6: Hemijske strukture hininske kiseline i fenolnih kiselina analiziranih za procenu fitohemijskog diverziteta vrsta roda *Centaurium*.

Flavonoidi nastaju biosintezom od prekursora šikimske kiseline. Biosinteza flavonoida počinje kondenzacijom tri molekula malonil-koenzima A sa jednim molekulom *p*-kumaroil-koenzima A pri čemu se formira halkonski skelet. Naringenin halkon se izomerizuje u naringenin od koga se biosintetski put grana na sintezu flavona i flavonola. Kod vrste *C. erythraea* zabeleženi su flavoni luteolin i apigenin (Martens i Mithöfer, 2005). Flavonoli su najbrojnija grupa flavonoida u rodu *Centaurium* i prisutni su: kvercetin, kempferol i njihovi derivati (glikozidi i acetilovani glikozidi) (Kulevanova i sar., 2003; Valentão i sar., 2001; Stefkov i sar., 2014). Na **Slici 7** prikazane su hemijske strukture i biosintetski putevi flavanona, flavona i flavonola obuhvaćenih istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.



Slika 7: Putevi biosinteze glavnih flavonoida prisutnih kod roda *Centaurium*. **HS:** halkan sintaza; **HI:** halkan izomeraza; **F3H:** flavanon 3-hidroksilaza **F3'H:** flavonoid 3'-hidroksilasa; **FLS:** flavonol sintaza; **UGT:** (UTP) -glukozno-zavisna glikoziltransferaza; **CGT:** C-glukozil transferaza. Prerađeno iz (Šiler i Mišić, 2016)

U vrstama roda *Centaurium* prisutna su i ksantonska jedinjenja. Ksantoni su grupa jedinjenja koji pripadaju biljnim polifenolima. Karakterišu se dibenzo- γ -pironskom strukturom. Po hemijskoj strukturi su slični flavonoidima, ali za razliku od njih, ksantoni su prisutni samo u ograničenom broju familija: *Gentianaceae*, *Guttiferae*, *Polygalaceae*, *Leguminosae*, *Lythraceae*, *Moraceae*, *Loganiaceae* i *Rhamnaceae* (Hostettmann i Hostettmann, 1989). U okviru familije *Gentianaceae* identifikovano je više od 110 ksantona i većina ih je tetrasupstituisano. Na osnovu hemijske strukture, ksantoni su podeljeni u pet grupa: prosti ksantoni (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, heksa-supstituisani), ksantonski glikozidi (*O*- i *C*- glukozidi), prenilovani ksantoni, ksantonolignoidi, ksantoni sa neobičnim tipom supstitucije. U okviru roda *Centaurium* nalaze se tri-, tetra-, penta- i heksa-supstituisani ksantoni u slobodnom obliku (aglikoni) ili u obliku *O*-glukozida. Poredak supstitucije u okviru određenih grupa ksantona je uniforman što ima veliki hemotaksonomski značaj (van der Sluis i Labadie, 1985; Mészáros, 1994). Na **Slici 8** prikazan je pretpostavljeni put biosinteze ksantona, kao i ksantoni obuhvaćeni istraživanjem fitohemijskog diverziteta roda *Centaurium*.



Slika 8: Biosintetski put sinteze ksantona: **BS-** benzofenon sintaza; **KS-** ksanton sintaza; **K6H-** ksanton 6-hidroksilaza. Prerađeno iz Šiler i Mišić, (2016).

CILJEVI RADA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je utvrđivanje postojanja međuvrsne hibridizacije i njene karakterizacije u okviru roda *Centaureum* Hill na području Balkanskog poluostrva.

U cilju boljeg razumevanja procesa međuvrsne hibridizacije i njenog potencijalnog značaja za specijaciju u okviru roda *Centaureum*, prvenstveno između vrsta *Centaureum erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*, istraživanja su usmerena na:

- Sprovođenje i praćenje eksperimentalne međuvrsne hibridizacije unutar roda *Centaureum* u kontrolisanim *in vitro* uslovima analizom ploidnosti i upotrebom fitohemijskih i molekularno-genetičkih markera, a sa ciljem uspostavljanja model sistema koji bi omogućio dalje proučavanje ovog procesa.
- Primenu uspostavljenog model sistema detekcije međuvrsne hibridizacije u prirodnim populacijama upotrebom optimizovanih protokola.
- *De novo* konstruisanje i karakterizaciju polimorfnih *EST-SSR* markera za brzu determinaciju taksona i detekciju međuvrsnih hibrida u okviru roda *Centaureum*.
- Određivanje varijabilnosti u sadržaju dominantnih jedinjenja sekundarnog metabolizma biljaka sa ciljem identifikacije i selekcije fitohemijskih markera koji omogućavaju pouzdanu hemotaksonomsku klasifikaciju u okviru roda *Centaureum*.
- Predlaganje evoluciono-genetičkih mehanizama nastanka potencijalno hibridnih jedinki, njihove stabilizacije i održanja na prirodnim staništima.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal korišćen u analizama

Biljni materijal, semena i listovi biljaka roda *Centaurium*, korišćeni u eksperimentalnom radu, sakupljeni su iz prirodnih populacija na lokalitetima predstavljenim u **Tabeli 1**.

Sav biljni materijal je determinisan direktno na terenu. Uzorci jasnog taksonomskog statusa su determinisani u skladu sa Florom Srbije i *on-line* bazom podataka i informacionim sistemom vaskularnih biljaka Evrope i Mediterana (The Euro+Med Plantbase Project 2016) i klasifikovani su u jedan od priznatih taksona: *Centaurium erythraea* Rafn, *Centaurium littorale* ssp. *compressum* (Hayne) Kirschner, *Centaurium pulchellum* (Sw.) Druce, *Centaurium tenuiflorum* (Hoffmanns. et Link) Fritsch. Istraživanja obuhvataju i primerke potencijalno međuvrskog porekla: hibridne biljke između vrsta *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* (ovde navedene kao poseban takson sa neformalnim imenom „*Centaurium pannonicum*“) i hibridne biljke između vrsta *C. erythraea* i *C. tenuiflorum* (navedene kao poseban, takođe neformalan takson „*Centaurium* × *tenuiflorum*“, prema Mansion, Zeltner, i Bretagnolle (2005)). Ovi primerci su determinisani kao međuvrski hibridi prvenstveno prema morfološkim karakteristikama. Takođe, u istraživanja su uključene i jedinke vrste *C. littorale* (Turner) Gilmour čija su semena dobijena posredstvom razmene sa botaničkom baštom *Kew Garden*, a poreklom su iz Nanta (*Jardin Botanique de Nantes*, Francuska). Navedena nomenklatura će se nadalje koristiti u celom tekstu, a geografska distribucija lokaliteta je predstavljena na **Slici 9**.

Po nekoliko jedinki iz svake populacije analiziranih taksona je herbarizovano, i deponovano u herbarijumu botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Tabela 1: Pregled biljnog materijala sakupljenog za potrebe istraživanja, lokaliteti sakupljanja i analize u kojima je materijal korišćen.

Takson	Lokalitet ¹	Geografska širina i dužina	Šifra lokaliteta	Godina sakupljanja	Biljni materijal ₂	RAPD-PCR	EST-SSR	Fitohemijske analize	Analize ploidnosti
<i>Centaurium erythraea</i>	Beočin (RS)	45°10'34.05"N 19°43'09.83"E	BE	2010	S		+		
<i>Centaurium erythraea</i>			BE	2013	S	+		+	+
<i>Centaurium erythraea</i>			BE	2015	L			+	
<i>Centaurium erythraea</i>	Iriški Venac (RS)	45°09'27.65"N 19°51'43.64"E	IV	2010	S	+	+	+	+
<i>Centaurium erythraea</i>			IV	2013	S	+			
<i>Centaurium erythraea</i>			IV	2015	L			+	
<i>Centaurium erythraea</i>	Bački Vinogradi (RS)	46° 07'30.56"N 19°50'57.43"E	BV	2015	S, L	+	+		
<i>Centaurium erythraea</i>	Vlasina (RS)	42°51'55.96"N 22°51'55.96"E	VL	2001	S	+	+		
<i>Centaurium erythraea</i>	Orjen (ME)	42°33'37.09"N 18°32'43.96"E	OR	2009	S		+		
<i>Centaurium erythraea</i>	Žanjice (ME)	42°23'45.28"N 18°34'44.89"E	ŽA	2009	S		+		
<i>Centaurium erythraea</i>	Andrijevića (ME)	42°44'30.64"N 19°48'12.75"E	AN	2012	S		+		
<i>Centaurium erythraea</i>	Sutorina (ME)	42°27'15.18"N 18°29'47.83"E	SU	2012	S		+		

Nastavak Tabele 1

Takson	Lokalitet ¹	Geografska širina i dužina	Šifra lokaliteta	Godina sakupljanja	Biljni materijal ₂	RAPD- PCR	EST- SSR	Fitohemijske analize	Analize ploidnosti
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			MJ	2012	S		+		
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	Majdan (RS)	46° 9'25.50"N 19°36'31.56"E	MJ	2013	S	+		+	+
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			MJ	2014	S			+	+
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			MJ	2015	L			+	
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			PA	2012	S			+	
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	Palić (RS)	46°01'48.61"N 19°44'27.96"E	PA	2014	S			+	+
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			PA	2015	S, L	+	+		
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			HA	2012	S			+	
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	Hajdukovo (RS)	46°06'51.07"N 19°49'48.85"E	HA	2014	S			+	+
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>			HA	2015	L			+	

Nastavak Tabele 1

Takson	Lokalitet ¹	Geografska širina i dužina	Šifra lokaliteta	Godina sakupljanja	Biljni materijal ₂	RAPD- PCR	EST- SSR	Fitohemijske analize	Analize ploidnosti
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	Ásotthalom (HU)	46°11'04.50"N 19°50'47.62"E	AS	2015	L		+		
<i>Centaurium littorale</i>	Nant (FR)	<i>Kew Garden</i>	NA	1999	S	+	+		
<i>Centaurium pannonicum</i> *			MJ	2012	S		+		
<i>Centaurium pannonicum</i> *	Majdan (RS)	46° 09'25.50"N 19°36'31.56"E	MJ	2013	S	+		+	+
<i>Centaurium pannonicum</i> *			MJ	2014	S			+	+
<i>Centaurium pannonicum</i> *			MJ	2015	S, L	+	+		
<i>Centaurium pannonicum</i> *			PA	2012	S		+		
<i>Centaurium pannonicum</i> *	Palić (RS)	46°01'48.61"N 19°44'27.96"E	PA	2014	S			+	+
<i>Centaurium pannonicum</i> *			PA	2015	S, L	+	+		

Nastavak Tabele 1

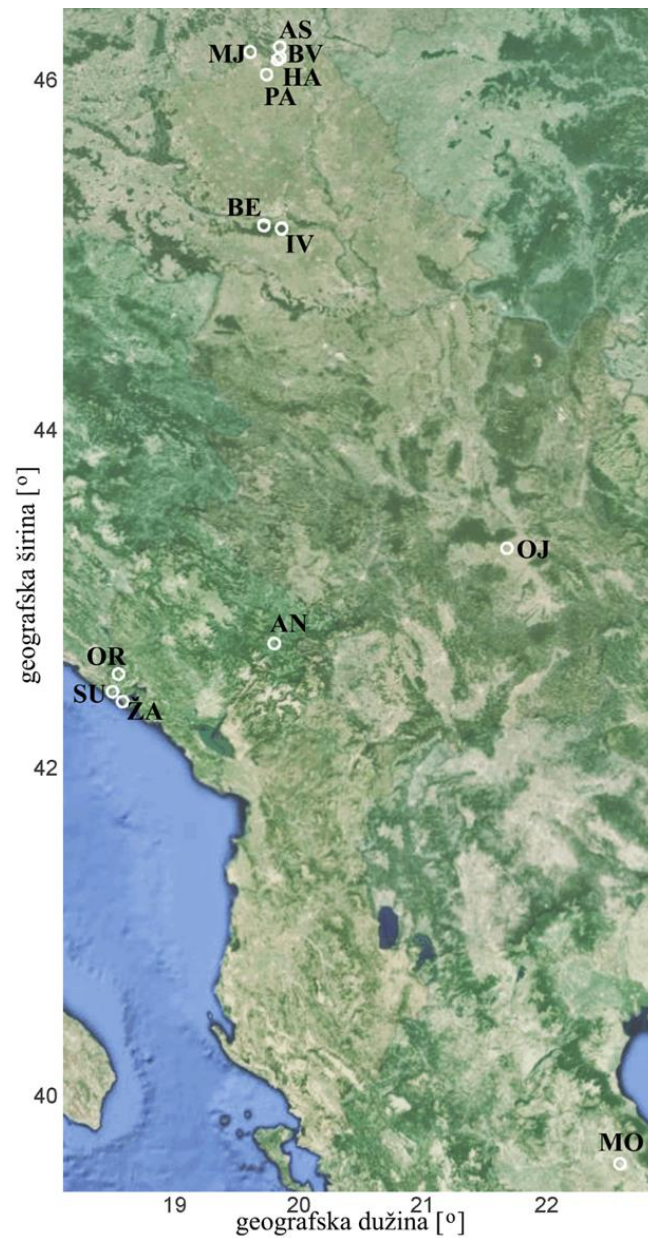
Takson	Lokalitet ¹	Geografska širina i dužina	Šifra lokaliteta	Godina sakupljanja	Biljni materijal ₂	RAPD- PCR	EST- SSR	Fitohemijske analize	Analize ploidnosti
<i>Centaurium pulchellum</i>	Oblačinsko jezero (RS)	43°18'16.90"N 21°40'54.39"E	OJ	2006	S	+	+		
<i>Centaurium pulchellum</i>	Sutorina (ME)	42°27'15.18"N 18°29'47.83"E	SU	2012	S		+		
<i>Centaurium tenuiflorum</i>	Sutorina (ME)	42°27'15.18"N 18°29'47.83"E	SU	2012	S		+		
<i>Centaurium tenuiflorum</i>	Žanjice (ME)	42°23'45.28"N 18°34'44.89"E	ŽA	2009	S		+		
<i>Centaurium</i> × <i>tenuiflorum</i> **	Žanjice (ME)	42°23'45.28"N 18°34'44.89"E	ŽA	2009	S		+		
<i>Centaurium</i> × <i>tenuiflorum</i> **	Modestos (GR)	39°34'25.93"N 22°35'38.12"E	MO	2009	S		+		
<i>Blackstonia perfoliata</i>	Majdan (RS)	46°09'25.50"N 19°36'31.56"E	MJ	2013	S	+			

¹ Upotrebene skraćenice država u okviru kojih se nalaze lokaliteti: **RS**- Republika Srbija, **ME**- Crna Gora, **GR**-Republika Grčka, **HU**- Mađarska i **FR**-Fancuska

² S- semena; L- listovi

*pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. littorale* ssp. *compressum*

**pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. tenuiflorum*



Slika 9: Geografska distribucija analiziranih populacija roda *Centaurium*. Šifre lokaliteta označenih na mapi su date u **Tabeli 1**.

Sakupljanje biljnog materijala

Sakupljano je najmanje deset jedinki po populaciji na najmanjoj međusobnoj udaljenosti od nekoliko metara, pri čemu se takođe vodilo računa da se pri sakupljanju pokrije što veći deo staništa. Semena sakupljena na prirodnim staništima su osušena na sobnoj temperaturi, deponovana u staklene posude i pohranjena na -20°C . Na ovaj način formirana je banka semena pri Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu.

Listovi intaktnih biljaka namenjeni izolaciji DNK (0,15-0,20 g svežeg materijala po uzorku) sakupljeni su u kesice sa silika gelom (*Centrohem*, Stara Pazova, SR Srbija) i čuvani u desikatoru na sobnoj temperaturi do trenutka analiza.

Gajenje biljaka u kulturi *in vitro*

Semena su površinski sterilisana u 20% rastvoru natrijum-hipohlorita, tokom pet minuta, a zatim su pet puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom. Sterilisana semena su prebačena na hranljivu podlogu koja je sadržala makro i mikro mineralne soli po Murashige i Skoog-u (1962) upola razblaženog sastava soli (u daljem tekstu MS/2 hranljiva podloga) i 20 g l^{-1} saharoze, 7 g l^{-1} agara (*Torlak*, Beograd, Srbija) i 100 mg l^{-1} *myo*-inozitola (*Sigma*, *Aldrich*, Nemačka). pH vrednost hranljive podloge je podešavana na 5,8 neposredno pre sterilizacije na 114°C tokom 25 minuta.

Semena su iskljavana u polikarbonatnim Petri kutijama, prečnika 9 cm, koje su sadržale po 25 ml hranljive MS/2 podloge.

Za potrebe izolacije DNK (*RAPD* analize, uspostavljanje i optimizacija *EST-SSR* markera, kao i za dobijanje biljaka potrebnih za hibridna ukrštanja), klijanci stari dve nedelje su nasumično odabrani i prebačeni u staklene tegle zapremine 750 ml sa MS/2 hranljivom podlogom (100 ml) i providnim polikarbonatnim zatvaračima. Biljke su gajene u uslovima dugog dana (ciklus, 16/8 sati: svetlo/mrak), na temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha 60-70% u posudama tokom tri meseca. Biljke potrebne za eksperimente hibridnog ukrštanja su redovno prebacivane na svežu hranljivu podlogu (u intervalima od po

četiri nedelje) sve do pojave cvetanja. Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe bele svetlosti, jačine 65 W. Gustina svetlosnog fluksa iznosila je $32,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

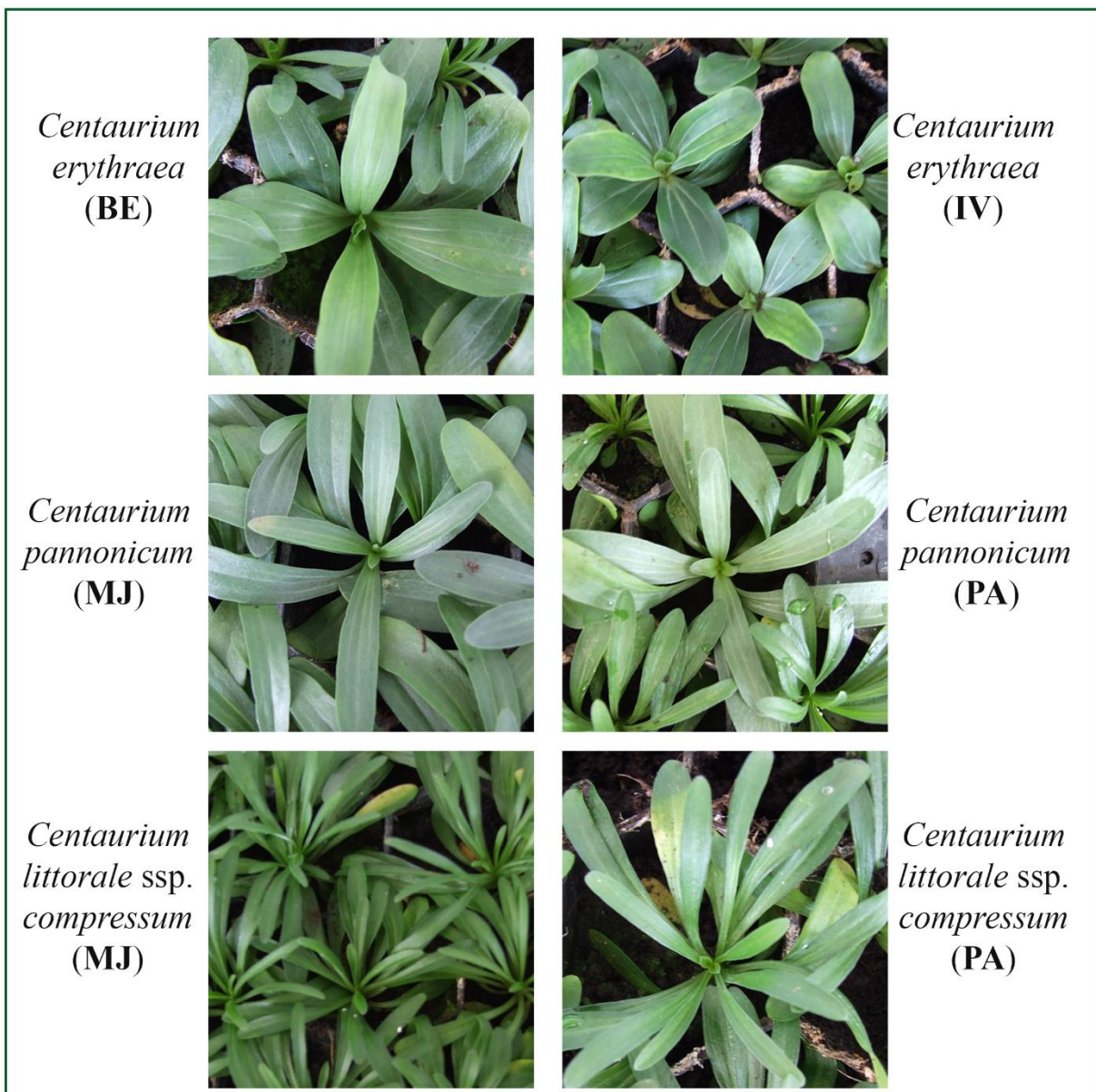
Gajenje biljaka u stakleniku za potrebe fitohemijskih analiza

Za potrebe dobijanja biljnog materijala za kvalitativne i kvantitativne analize sadržaja sekundarnih metabolita, semena odabranih populacija su sejana u saksije sa supstratom za setvu semena, sastava: 70% beli treset, 30% crni treset, pesak i perlit (*Floradur B fine*, Futog, SR Srbija). Dva meseca stari klijanci su pojedinačno prebaćeni u kontejnere za rasad, sa standardnom mešavinom treseta (60%, v/v), kvarcnog peska (20%) i glistenjaka i gajeni u kontrolisanim uslovima staklenika pri vlažnosti vazduha od 50-85%. Nakon još dva meseca gajenja u stakleniku (ukupno 4 meseca; **Slika 10**), izvršeno je uzorkovanje listova za potrebe ekstrakcije sekundarnih metabolita i protočne citometrije.

Eksperimentalna hibridna ukrštanja u uslovima *in vitro*

Biljke korišćene u hibridnim ukrštanjima gajene su u uslovima *in vitro* i to: biljke vrste *Centaureum erythraea* poreklom sa lokaliteta Vlasinsko jezero u Srbiji (semena sakupljena, 2001. godine; biljke označena sa *C.e. VL'01*) i biljke vrste *Centaureum littorale* čija su semena dobijena iz botaničke bašte u Nantu (biljke označene sa *C.l. NA'99*).

Biljke vrste *Centaureum erythraea* (*C.e. VL'01*; **Tabela 3**) su stimulisane da cvetaju primenom mehaničkog stresa. Da bi se izazvalo izduživanje cvetne stabljike vršeno je odsecanje centralnog dela rozete biljaka. Biljke vrste *C. littorale* (*C.l. (11-12)NA'99*; **Tabela 3**) su tretirane 0,01 mM gibberelnom kiselinom da bi se izazvalo izduživanje cvetne stabljike, kao što se predlaže u radu Cvetic i sar. (2004). Rastvor hormona (10 μl) jenanošen u centar rozete tri puta u intervalima od dva dana. Demaskulinizacija cvetova je izvođena nekoliko dana pre otvaranja cvetova u uslovima *in vitro*, kako bi se sprečilo samooprašivanje.



Slika 10: Četiri meseca stare biljke gajene u uslovima staklenika za potrebe fitohemijskih analiza i analize ploidnosti. Skraćenice lokaliteta ispod imena odgovarajuće vrste su date u Tabeli 1.

Oprašivanja biljaka urađena su u oba smera: kada je biljka vrste *C. littorale* upotrebljena kao polenski donor, a *C. erythraea* kao majčinska biljka i obrnuto (**Tabela 2**). Demaskulinizovani cvetovi su oprašivani kompletnim, potpuno zrelim anterama poreklom od biljaka očinske vrste. Za potrebe kontrole samooprašivanja, izvršena je demaskulinizacija dodatnih 38 cvetova koji nisu oprašeni.

Tabela 2: Broj pokušaja međuvrskog oprašivanja vrsta *C. littorale* i *C. erythraea*, broj dobijenih čaura i biljaka u uslovima *in vitro*.

Eksperimenti hibridnog ukrštanja		Broj pokušaja	Broj čaura sa vijabilnim semenima	Broj dobijenih biljaka
Majčinska biljka	Očinska biljka			
<i>C. littorale</i>	<i>C. erythraea</i>	6	5	11
<i>C. erythraea</i>	<i>C. littorale</i>	3	0	0

Posle sazrevanja, čaure su pregledane i beležena je pojava vijabilnih semena. Sferična i potpuno popunjena semena koja nisu pokazivala morfološke abnormalnosti su prebačena na MS/2 hranljivu podlogu. Dobijeni klijanci su održavani u uslovima *in vitro* sve dok nije dobijeno dovoljno biljnog materijala za dalje analize.

Iz eksperimentalnih ukrštanja dobijeno je 11 hibridnih biljaka od kojih je devet obuhvaćeno analizama *RAPD* molekularnim markerima, šest biljaka je analizirano u pogledu sadržaja sekoiridoidnih glukozida (*GP*, *SV* i *SVM*), dok je osam hibridnih biljaka obuhvaćeno analizama mikrosatelitskim markerima (**Tabela 3**).

Podaci kvantifikacijesadržaja sekoiridoidnih glukozida obrađeni primenom računarskog programa Statgraphics verzija 4,2 (*STSC Inc. i Statistical Graphics Corporation*, 1985-1989, SAD). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (*ANOVA*), kao i *LSD* (eng.: *least significant*

difference) test za utvrđivanje najmanjih statistički značajnih razlika na nivou $p \leq 0,05$. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću programa za tabelarni prikaz podataka.

Jedna biljka (H19) je izgubljena zbog kontaminacije *in vitro* kulture i nije dalje analizirana.

Tabela 3: Pregled dobijenih hibridnih biljaka u uslovima *in vitro* i analize u kojima su korišćene.

Eksperimenti hibridnog ukrštanja	Hibridne biljke	Korišćene u <i>RAPD</i> molekularnim analizama	Korišćene u <i>EST-SSR</i> analizama	Korišćene u kvantifikaciji sekoiridoidnih glukoziida
<i>C. littorale</i> ♀ (<i>C.l.</i> (11 i 12) NA'99)	H13			+
	H14	+	+	+
	H15	+	+	+
	H16	+	+	+
	H17	+		+
X	H18	+	+	+
	H20	+	+	
<i>C. erythraea</i> ♂ (<i>C.e.</i> VL'01)	H21	+	+	
	H22	+	+	
	H23	+	+	

Analiza ploidnosti metodom protočne citometrije

Sve biljke koje su obuhvaćene u eksperimentima hibridnog ukrštanja, po pet nasumično odabranih jedinki devet populacija (**Tabela 7**), kao i dodatnih populacija *C.e.* **BV**'15 i *C.l.c.* **AS**'15, korišćene su u analizi utvrđivanja prosečne količine DNK po ćeliji metodom protočne citometrije. Kao materijal za analizu korišćeni su diferencirani listovi približne površine oko 1 cm². Na osnovu prethodnih istraživanja (Šiler, 2012), populacija poreklom sa Iriškog Venca je korišćena kao referentna populacija poznate ploidije (tetraploid). Bojenje jedara je urađeno uz pomoć 4',6'-diamidino-2-fenilindola (*DAPI*) po proceduri opisanoj u radu Bohanec (2003). U svaki uzorak je dodat i manji komad lista vrste *Pisum sativum* cv. *Kleine Rheinländerin* kao interni standard poznate količine DNK (9,07 pg

po jedru). Usitnjeni uzorci listova su potopljeni u rastvor 0,1 M limunske kiseline koji je sadržao 0,5% Tween 20. Suspenzija je profiltrirana kroz najlon filtere (prečnik pora 30 µm), nakon čega je filtratu dodato 3-4 zapremine pufera za bojenje (4 µg ml⁻¹ DAPI boje i 0,4 M Na₂HPO₄). Nakon inkubacije, uzorci su analizirani protočnim citometrom *CyFlow*® *Space flow* (*Partec, Münster, Nemačka*). Relativna količina DNK je izračunata uz pomoć *FloMax*® softvera (*Partec, Münster, Nemačka*) za detekciju i obradu signala. Količina DNK po ćeliji je dobijena poređenjem srednje vrednosti fluorescencije uzoraka i srednje vrednosti fluorescencije internog standarda očitanih sa histograma. Nivo ploidnosti svake jedinke dobijen je poređenjem količine DNK uzoraka i tetraploidnog referentnog standarda.

Analiza genetičkog diverziteta populacija molekularnim markerima

Izolacija DNK za analizu molekularnim markerima

Za potrebe *RAPD* analize biljaka uključenih u eksperimentalna međuvrsna ukrštanja i analize populacija *RAPD* molekularnim markerima, kao i za potrebe eksperimenata potvrde, provere valjanosti i transferabilnosti konstruisanih *EST-SSR* molekularnih markera, za izolaciju DNK korišćene su biljke gajene isključivo u uslovima *in vitro*. Sa druge strane, za potrebe analiza populacija uz pomoć *EST-SSR* molekularnih markera, za izolaciju DNK korišćene su biljke sakupljene direktno iz prirode. Izolacija je vršena tako što je od 0,15-0,2 g svežeg biljnog materijala (u slučaju izolacije DNK iz biljaka gajenih u uslovima *in vitro*) ili 0,01-0,02 g suvog materijala (sakupljenog na terenu) samleveno u avanu u tečnom azotu, a zatim prebačeno u mikrotube od 1,5 ml. Ovako spraošen biljni materijal je ekstrahovan u 0,6 ml *CTAB* ekstrakcionog pufera, koji je sadržao: 20 mM *Na-EDTA*, 100 mM *Tris-HCl*, 2% (*w/v*) *CTAB* (cetil trimetilamonijum bromid) i 0,5% β-merkaptoetanol. Nakon, 20 minuta ekstrakcije na 56°C, u svaki uzorak je dodato po 0,6 ml smeše hloroform-izoamil alkohol (24:1 *v/v*). Uzorci su centrifugirani na 12.000 g tokom deset minuta na sobnoj temperaturi i supernatant, je prebacivan u nove mikrotube. Postupak ekstrakcije smešom hloroform-izoamil alkohol je ponovljen još tri puta a zatim je u supernatant (oko 0,5 ml) dodato po 0,25 ml 4 M *NaCl* i 0,75 ml izopropanola radi taloženja DNK. Nakon pola sata inkubacije na 4°C,

uzorci su centrifugirani pet minuta na 8.000 g. Precipitovana DNK je, posle odlivanja rastvora, isprana 70% etanolom i centrifugirana još jednom na 8.000 g tokom pet minuta. DNK je rastvorena u 0,2 ml *TE* pufera (10 mM *Tris*, 1 mM *EDTA*, pH 8). Uzorci su zatim inkubirani na 37°C, tokom sat vremena sa po 5 µg RNaze (tip A, *Fermentas*, *Vilnius*, Litvanija) u svrhu eliminacije RNK. Ponovljeno je prečišćavanje uzoraka smešom hloroform-izoamil alkohol, kako bi se odstranila RNAza. Kvalitet izolovane DNK analiziran je elektroforezom na agaroznom gelu (1%), a dodatna potvrda kvaliteta i kvantifikacija DNK u svakom uzorku je određena na spektrofotometru (*Agilent 8453*, *Agilent Technologies*, *Waldbonn*, Nemačka) posle razblaženja 1:1000 u dejonizovanoj vodi. Na osnovu odnosa apsorbanca (*A*) uzorka na 260 nm/230 nm i 260 nm/280 nm potvrđen je kvalitet DNK. Prihvatljive vrednosti su bile: $A_{260/230}$ - ne manje od 1,6 i $A_{260/280}$ - ne manje od 1,8. Kvantifikacija DNK je određena apsorbancom na 260 nm formulom:

$$\text{DNK koncentracija } [\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor razblaženja}$$

Prihvatljiva vrednost DNK koncentracije bila je - ne manje od 0,2 µg µl⁻¹. Uzorci DNK su čuvani na -20°C do trenutka korišćenja.

RAPD-PCR analiza

Postavka RAPD-PCR reakcija

Optimizacija uslova za *RAPD-PCR* metodu urađena je prema Skorić i sar. (2012). Svaka *PCR* reakcija se odvijala u reakcionoj smeši zapremine 25 µl i sadržala je sledeće komponente:

- 100 ng DNK uzorka,
- 1 × (*NH*₄)₂*SO*₄ reakcionog pufera (*Fermentas*, *Vilnius*, Litvanija),
- 2,5 mM *MgCl*₂,
- 200 µM od svakog *dNTP* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* i *dTTP*),
- 2 jedinice (*U*) *Taq* polimeraza (*Fermentas*, *Vilnius*, Litvanija),
- 5 pmol prajmera (*Metabion*, *Martinsried*, Nemačka).

Postavka *PCR* reakcija je urađena u sterilnim uslovima, na ledu. Kao negativne kontrole, pripremljene su reakcione smeše bez DNK. Amplifikacije su vršene u *PCR*-mašini *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf, Wiena, Austija*) prema programu:

- inicijalna denaturacija: 5 minuta na 95°C;
- 45 ciklusa:
 - denaturacija: 1 minut na 94°C;
 - hibridizacija: 1 minut na 36°C,
 - ekstenzija: 2 minuta na 72°C;
- finalna ekstenzija: 10 minuta na 72 °C.

Tabela 4: Spisak i sekvence korišćenih prajmera za *RAPD-PCR* reakcije u analizi biljaka dobijenih u eksperimentima hibridnog ukrštanja i u analizi diverziteta vrsta roda *Centaurium*.

Kod prajmera	Sekvenca prajmera
<i>OPB 11</i>	5'-GTAGACCCGT-3'
<i>OPB 15</i>	5'-GGAGGGTGTT-3'
<i>OPB 17</i>	5'-AGGGAACGAG-3'
<i>OPB 18</i>	5'-CCACAGCAGT-3'
<i>OPF 14</i>	5'-TGCTGCAGGT-3'
<i>OPH 01</i>	5'-GGTCGGAGAA-3'
<i>OPO 07</i>	5'-CAGCACTGAC-3'
<i>OPO 15</i>	5'-TGGCGTCCTT-3'
<i>OPT 14</i>	5'-ACCAGGTTGG-3'

Analiza biljaka iz eksperimentalnog hibridnog ukrštanja uz pomoć RAPD markera

Analiza biljaka koje su upotrebljene za eksperimentalna hibridna ukrštanja (roditeljske biljke kao i hibridno potomstvo) izvršena je uz pomoć *RAPD* molekularnih markera i obuhvatila je 11 jedinki predstavljenih u **Tabeli 5**.

Za amplifikaciju je izabrano šest desetomernih prajmera: *OPB 11*, *OPB 15*, *OPB 17*, *OPB 18*, *OPF 14*, i *OPT 14*. Spisak prajmera i njihove sekvence nalaze se u **Tabeli 4**.

Analiza genetičkog diverziteta vrsta roda Centaurium uz pomoć RAPD markera

U ovom delu istraživanja korišćene su biljke iz populacija sakupljenih na području Vojvodine i jedne populacije iz uže Srbije (*C. pulchellum* - Oblačinsko jezero). Uspostavljene su kulture biljaka u uslovima *in vitro* vrste *C. erythraea* (tri populacije), vrste *C. littorale* (jedna populacija), podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* (dve populacije) i dve populacije *Centaurium pannonicum* (potencijalno hibridnih biljaka između vrsta *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*). U analizu su uključene i tri jedinke vrste *C. pulchellum* i jedna jedinka vrste *Blackstonia perfoliata* koje su upotrebljene kao referentne grupe (eng.: *outgroups*). Eksperimentalna analiza genetičkog diverziteta uz pomoć *RAPD* molekularnih markera vrsta roda *Centaurium* obuhvatila je utvrđivanje *RAPD* profila 59 jedinki predstavljenih u **Tabeli 5**.

Za amplifikaciju je izabrano šest desetomernih prajmera: *OPB 11*, *OPB 15*, *OPF 14*, *OPH 01*, *OPO 07*, *OPO 15* (**Tabela 4**).

Tabela 5: Biljke korišćene u proceni genetičkog diverziteta populacija roda *Centaurium* RAPD-PCR metodom.

Takson:	Broj jedinki	Šifra lokaliteta ¹	Godina sakupljanja	Šifre uzoraka
<i>Centaurium erythraea</i>	10	BE	2013	<i>C.e.</i> (1-10) BE '13
<i>Centaurium erythraea</i>	3	IV	2010	<i>C.e.</i> (1-3) IV '10
<i>Centaurium erythraea</i>	3	IV	2013	<i>C.e.</i> (1-3) IV '13
<i>Centaurium erythraea</i>	4	BV	2015	<i>C.e.</i> (1-4) BV '15
<i>Centaurium pannonicum</i> *	10	MJ	2013	<i>C.pan.</i> (1-10) MJ '13
<i>Centaurium pannonicum</i> *	2	MJ	2015	<i>C.pan.</i> (1-2) MJ '15
<i>Centaurium pannonicum</i> *	2	PA	2015	<i>C.pan.</i> (1-2) PA '15
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	10	MJ	2013	<i>C.l.c.</i> (1-10) MJ '13
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	1	PA	2015	<i>C.l.c.</i> 1 PA '15
<i>Centaurium littorale</i>	10	NA	1999	<i>C.l.</i> (1-10) NA '99
<i>Centaurium pulchellum</i>	3	OJ	2006	<i>C.p.</i> (1-3) OJ '06
<i>Blackstonia perfoliata</i>	1	MA	2013	<i>B.p.</i> 1 MA '13
	Σ59			

¹ Videti tabelu 1

*pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. littorale* ssp. *compressum*

Razdvajanje i vizuelizacija produkata RAPD-PCR reakcija

Elektroforeza RAPD-PCR produkata vršena je na 1% agaroznim gelovima, uz dodatak etidijum bromida (0,5 µg ml⁻¹) u 1 × TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA) sa 0,5 µg ml⁻¹ etidijum bromida, pri konstantnom naponu od 100 V tokom 2 sata. Elektroforeza se odvijala u kadici za horizontalnu elektroforezu (*Compact L/XL*, Whatman, Biometra GmbH, Goettingen, Nemačka). Gelovi su vizualizovani u UV transiluminatoru (*ST4 3026-WL/26M*, Vilber Lourmat, Torcy, Francuska). Kao materijal za dalje analize korišćene su fotografije gelova dokumentovane na istom aparatu. DNK marker (100 bp, *DNA Ladder Plus*, Fermentas, Vilnius, Litvanija) je korišćen za utvrđivanje veličine fragmenata.

Analiza informativnosti podataka dobijenih RAPD markerima

Softverom *TotalLab TL120 ID v2009* (*Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, Velika Britanija*) analizirane su fotografije agaroznih gelova sa *RAPD-PCR* produktima. Detekcija i upoređivanje traka vršeni su uz automatsko podešavanje softvera, dok je revizija vršena manuлно. Prisustvo produkata je beleženo bez obzira na intenzitet. Za ko- migrirajuće trake je smatrano da su poreklom sa istog genskog lokusa i da su homologe. Prisustvo ili odsustvo amplikona date veličine u svakom uzorku označavano je sa „1“ odnosno „0“ i informacije su tako pretvorene u binarni matriks.

Na osnovu dobijenih matrica, izračunati su sledeći parametri za svaki *RAPD* lokus:

- p - proporcija uzoraka koji sadrže datu traku;
- Ib - informativnost trake (mera verovatnoće da je traka prisutna u 50% ispitivanih genotipova po formuli: $Ib=(1-(2 \cdot |0,5-p|))$).

Za svaki upotrebljeni prajmer (*RAPD*), odnosno kombinaciju prajmera (*EST-SSR*) izračunati su:

- Ukupan broj traka,
- Broj polimorfnih traka,
- Opseg veličina amplifikovanih produkata.

Za *RAPD* prajmere izračunata je prosečna informativnost traka, $AvIb$ po formuli: $AvIb=\sum^n Ib/n$, gde n predstavlja ukupan broj traka po prajmeru ili kombinaciji prajmera kao i razdvojna moć prajmer Rp (eng.: *resolving power*, prema Prevost i Wilkinson, 1999), po formuli: $Rp=\sum Ib$, koja predstavlja kvalitativni podatak i pruža mogućnost direktnog poređenja prajmera. Prosečan sadržaj polimorfnih informacija (prema Roldán-Ruiz i sar., 2000), PIC (eng.: *Polymorphic Information Content*), za dominantne *RAPD* lokuse je izračunat po formuli: $PIC=2fi(1-fi)$, gde fi predstavlja učestalost amplifikovanog alela, a $1-fi$ učestalost alela 0. Prosečna PIC vrednost za *RAPD* dominantne markere, izračunata je po formuli: $H_{av}=\sum[2 fi(1- fi)]/N$.

Kada se računa za dominantne molekularne markere, *PIC* vrednost se kreće u granicama od 0 do 0,5 (Deng i sar., 2007). *PIC* vrednost predstavlja heterozigotnost koja se iskazuje za markere i predstavlja verovatnoću da se dva nasumično uzeta alela (ili trake u slučaju *RAPD* markera) mogu razlikovati uz pomoć markera koji se koriste (Gupta i sar., 2008).

EST-SSR analiza

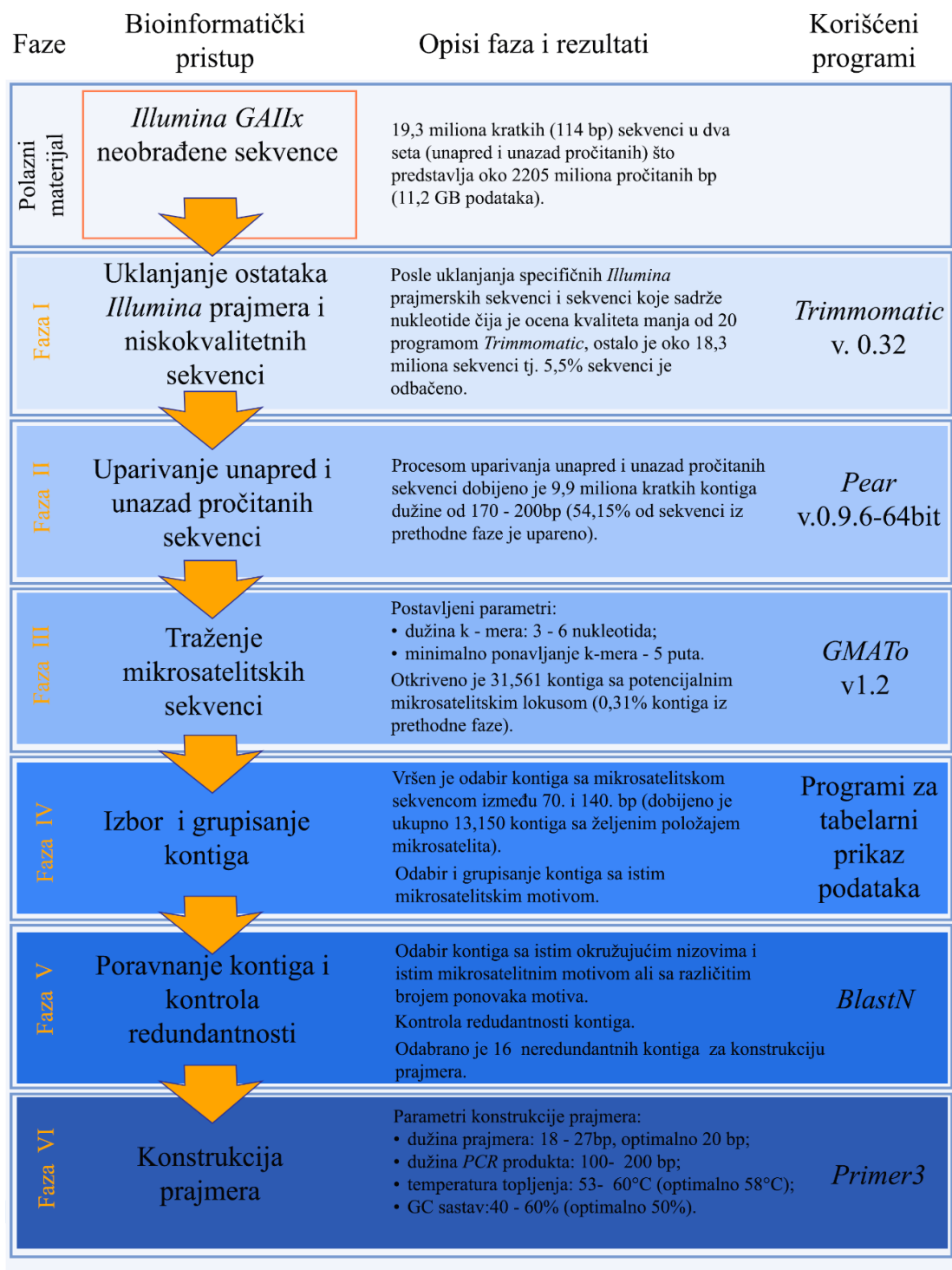
Razvoj EST-SSR genetičkih markera za potrebe istraživanja

Sekvenciranje, bioinformatički pristup i konstrukcija prajmera za EST-SSR lokuse

Ukupna RNK je ekstrahovana prema Gašić i sar., 2004 iz listova četiri nedelje stare individue vrste *Centaurium erythraea* poreklom sa lokaliteta Žanjice u Crnoj Gori, koja je gajena u uslovima *in vitro*. Posle tretmana DNK-azom I (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*), reverzna transkripcija je urađena pomoću *GeneAmp® Gold RNA PCR Reagent* kita (*Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija*), sa oligo-*dT* prajmerima (kako je preporučeno od strane proizvođača), korišćenjem *PCR* mašine *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf, Wiena, Austrija*). Dobijena *ds cDNK* je sekvencirana na *Illumina GAIIx* sekvenatoru. Dobijeni podaci predstavljaju 19,3 miliona kratkih (114 bp) sekvenci (tzv. „ridova“; eng.: *read*), odnosno oko 2205 miliona pročitanih baznih parova. Ovi podaci predstavljaju dva seta, unapred i unazad pročitanih sekvenci u *FASTQ* formatu i sadrže ukupno 11,2 GB podataka.

Obrada prikupljenih podataka je izvršena na virtuelnom računaru (softverska emulacija fizičkog računara koja omogućava precizan odabir virtuelnih resursa) sa dva procesorska jezgra i osam *GB* radne memorije (*RAM*). Na ovom virtuelnom računaru je instaliran 64-bitni *Linux* operativni sistem.

Bioinformatički pristup obradi podataka je podeljen u šest faza (**Slika 11**). Faze sadrže korake tokom kojih se dobijaju neophodne informacije koje vode do krajnjeg cilja - konstrukcije *PCR* prajmera za *EST-SSR* lokuse pronađene u transkriptomu.



Slika 11: Pregled faza bioinformatičkog pristupa obradi sekvenci dobijenih na *Illumina GAIIX* sekvenatoru, rezultati faza i korišćeni programi.

Svi korišćeni računarski programi, gotova softverska rešenja ili softverski paketi, su besplatni i dostupni (alati otvorenog koda).

U prvoj fazi (**Slika 11**) je upotrebljen softver *Trimmomatic* (v.0.32; Bolger, Lohse i Usadel, 2014), koji je namenjen početnoj obradi podataka dobijenih *Illumina* sekvenciranjem. Funkcija ovog programa je da ukloni ostatke *Illumina* prajmera korišćenih u samom procesu sekvenciranja i da, istovremeno, iz niza sekvenci ukloni one koje ne odgovaraju traženom nivou kvaliteta (uklonjene su sekvence koje sadrže nukleotide čija je ocena kvaliteta manja od 20). Program *Trimmomatic* dostupan je na adresi <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>.

U cilju dobijanja što dužih sekvenci u kojima će se vršiti potraga za *EST-SSR* lokusima bilo je potrebno kombinovati unapred i unazad pročitane ridove nastale sekvenciranjem *ds cDNK*. Za tu potrebu, upotrebljen je program *Pear* (v.0.9.6; Zhang i sar., 2014; druga faza bioinformatičkog pristupa; **Slika 11**). Ovaj program je podešen da pronalazi unapred i unazad pročitane sekvence koje se preklapaju u najmanje 10 nukleotida. U cilju pronalaska najtačnijih sekvenci za dalje traganje za *EST-SSR* lokusima, preklapanje je podešeno na 14 nukleotida. Program *Pear* dostupan je na adresi <http://sco.hits.org/exelixis/web/software/pear/>.

Pre početka naredne faze izvršena je konverzija formata sekvenci od interesa iz *FASTQ* u *FASTA* format, jer informacija o kvalitetu podataka, koju sadrži *FASTQ* format, više nije neophodna. Ova konverzija je izvršena uz pomoć *sed* funkcije programa u Linux-u.

Kao rezultat prethodnih faza obrade podataka formirana je baza kratkih kontiga (eng.: *contig*; od *contiguous*; susedni, kontinuirani; delimično sastavljen niz koji se sastoji od sekvenci koje se mogu sklopiti u linearnom redosledu), koja predstavlja kolekciju podataka u okviru kojih se vrši potraga za mikrosatelitskim lokusima. Za ovu pretragu korišten je program *GMATo* (v1.2, Wang, Lu i Luo, 2013; treća faza; **Slika 11**). Postavljeni parametri su: dužina k-mera je 3-6 nukleotida, minimalno ponavljanje k-mera u okviru kontige 5 puta. Program *GMATo* dostupan je na adresi: <https://sourceforge.net/projects/gmato/files/>.

Kao rezultat pretrage dobijene baze kontiga, *GMATo* program je generisao nekoliko fajlova podataka koje su dalje obrađeni u programima za tabelarni prikaz podataka (četvrta faza obrade podataka; **Slika 11**) u cilju pronalaženja kontiga koje imaju mikrosatelitske ponovke na pozicijama između 70-og i 140-og baznog para u izabranom nizu. Kontige sa istim mikrosatelitskim motivom su grupisane.

Odabrane kontige su unesene u *BlastN* (algoritam računarskog programa *BLAST* koji je namenjen poravnanju DNK sekvenci) radi provere sličnosti okružujućih nizova nukleotida unutar svake grupe sekvenci sa istim motivom (peta faza; **Slika 11**). Na osnovu ovih nalaza, kontige koje su posedovale iste okružujuće nizove nukleotida i iste mikrosatelitske motive ali sa različitim brojem ponovaka motiva su odabirani za dalji rad. U isto vreme vršena je i kontrola redundantnosti sekvenci (eng.: *redundancy*; suvišnost, ponavljanje više identičnih stavki u okviru seta uzoraka) kako bi se izbeglo javljanje dupliranih sekvenci. Odabrano je 16 neredundantnih kontiga kao materijal za konstrukciju prajmera. Program *BlastN* dostupan je u *on-line* verziji na:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn&BLAST_INIT=

U završnoj fazi (šesta faza; **Slika 11**), za konstruisanje prajmera na izabranim kontigama korišćen je program *Primer3* (Rozen i Skaletsky, 2000). U okviru ovog programa, parametri za konstrukciju prajmera su podešeni prema sledećim vrednostima:

- dužina prajmera: 18-25 bp,
- dužina *PCR* produkta: 100-200 bp,
- temperatura topljenja: između 53°C i 60 °C (sa optimumom od 58°C)
- GC sastav: 40-60% (sa optimumom na 50%).

Na ovaj način konstruisano je 16 parova prajmera za odabrane *EST-SSR* lokuse.

Program *Primer3* dostupan je na adresi: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

Provera funkcionalnosti konstruisanih EST-SSR prajmera

Inicijalna potvrda amplifikacije na očekivanim dužinama konstruisanih prajmerskih sekvenci za *EST-SSR* lokuse je urađena na DNK izolatu jedinke *C. erythraea* poreklom sa lokaliteta Žanjice u Crnoj Gori.

Postavka *PCR* reakcija je urađena po recepturi (finalna zapremina od 25 μ l) :

- 100 ng DNK uzorka,
- 1 \times $(NH_4)_2SO_4$ reakcionog pufera (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*),
- 2,5 mM $MgCl_2$,
- 200 μ M od svakog *dNTP* (*dATP, dCTP, dGTP i dTTP*),
- 1 jedinica (*U*) Taq polimeraza (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*),
- 5 pmol prajmera (*Metabion, Martinsried, Nemačka*).

Za svaki od 16 konstruisanih parova prajmera vršena je optimizacija temperaturnog programa *PCR* protokola. U ovu svrhu korišćena je mogućnost *PCR* mašine *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf, Wiena, Austija*) da uspostavi gradijent temperatura koraka hibridizacije prajmera sa DNK matricom. Amplifikacije su vršene prema programu:

- inicijalna denaturacija: 3 minuta na 94 °C;
- 38 ciklusa:
 - denaturacija: 30 sekundi na 94 °C;
 - hibridizacija: 30 sekundi na 53-60 °C (temperaturni gradijent),
 - ekstenzija: 45 sekundi na 72 °C;
- finalna ekstenzija: 10 minuta na 72 °C.

Elektroforeza, kao inicijalna potvrda *EST-SSR-PCR* produkata, vršena je na 3% agaroznim gelovima, uz dodatak etidijum bromida ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) u 1 x *TBE* puferu (89 mM *Tris*, 89 mM borna kiselina, 2 mM *EDTA*, $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ etidijum bromid), pri konstantnom naponu od 100 V tokom 2,5 sata. Elektroforeza se odvijala u kadici za horizontalnu elektroforezu (*Compact L/XL, Whatman, Biometra GmbH, Goettingen, Nemačka*), a gelovi su vizualizovani u *UV* transiluminatoru (*ST₄ 3026-WL/26M, Vilber Lourmat, Torcy, Francuska*). DNK marker od 50 bp (*DNA Ladder Plus, Fermentas, Vilnius, Litvanija*) je korišćen za utvrđivanje veličine fragmenata.

Provera transferabilnosti konstruisanih prajmera za *EST-SSR* lokuse je urađena na DNK izolatima 22 biljke, svrstane u sedam različitih taksona roda *Centaureum* (**Tabela 6**).

Razdvajanje i analiza *EST-SSR-PCR* produkata osam odabranih mikrosatelitskih prajmerskih parova u kombinaciji sa DNK izolatima navedene 22 individue obavljena je kapilarnom elektroforezom na *Agilent DNA 7500 Kit* čipovima pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistema (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD*). Razdvajanje i analiza *PCR* produkata lokusa *M17* urađena je na 3% agaroznom gelu.

Na ovaj načina procenjena je polimorfnost, opseg amplifikacije i transferabilnost u okviru upotrebljenog seta uzoraka.

Tabela 6: Individue koje su korišćene za potvrđivanje, procenu varijabilnosti i transferabilnosti novorazvijenih *EST-SSR* molekularnih markera, koje pripadaju različitim taksonima roda *Centaurium*.

Takson:	Šifra lokaliteta ¹	Godina sakupljanja	Šifre uzoraka
<i>Centaurium erythraea</i>	SU	2012	<i>C.e.1</i> SU'12
<i>Centaurium erythraea</i>	OR	2009	<i>C.e.1</i> OR'09
<i>Centaurium erythraea</i>	ŽA	2009	<i>C.e.1</i> ŽA'09
<i>Centaurium erythraea</i>	AN	2012	<i>C.e.1</i> AN'12
<i>Centaurium erythraea</i>	IV	2010	<i>C.e.1</i> IV'10
<i>Centaurium erythraea</i>	IV	2010	<i>C.e.2</i> IV'10
<i>Centaurium erythraea</i>	BE	2010	<i>C.e.1</i> BE'10
<i>Centaurium erythraea</i>	BE	2010	<i>C.e.2</i> BE'10
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	MJ	2012	<i>C.l.c.1</i> MJ'12
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	HA	2012	<i>C.l.c.1</i> HA'12
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	PA	2012	<i>C.l.c.1</i> PA'12
<i>Centaurium pannonicum</i> *	MJ	2012	<i>C.pan.1</i> MJ'12
<i>Centaurium pannonicum</i> *	PA	2012	<i>C.pan.1</i> PA'12
<i>Centaurium littorale</i>	NA	1999	<i>C.l.11</i> NA'99
<i>Centaurium littorale</i>	NA	1999	<i>C.l.12</i> NA'99
<i>Centaurium pulchellum</i>	SU	2012	<i>C.p.1</i> SU'12
<i>Centaurium pulchellum</i>	OJ	2006	<i>C.p.1</i> OJ'06
<i>Centaurium tenuiflorum</i>	SU	2012	<i>C.t.1</i> SU'12
<i>Centaurium tenuiflorum</i>	ŽA	2009	<i>C.t.1</i> ŽA'09
<i>Centaurium</i> × <i>tenuiflorum</i> **	ŽA	2009	<i>C.xt.1</i> ŽA'09
<i>Centaurium</i> × <i>tenuiflorum</i> **	ŽA	2009	<i>C.xt.2</i> ŽA'09
<i>Centaurium</i> × <i>tenuiflorum</i> **	MO	2009	<i>C.xt.1</i> MO'09
Σ 22			

¹ Videti tabelu 1

*pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. littorale* ssp. *compressum*

Analiza genetičkog diverziteta EST-SSR markerima

Biljni materijal korišćen u proceni genetičkog diverziteta odabranih taksona roda *Centaurium* upotrebom *EST-SSR* markera obuhvatio je 140 jedinki sakupljenih u prirodi. Od toga, 56 individua pripada trima populacijama vrste *C. erythraea*, 50 jedinki je poreklom iz četiri populacije vrste *C. littorale* ssp. *compressum*, a 31 jedinka sa dva lokaliteta je pretpostavljeno hibridnog porekla i svrstana u *Centaurium pannonicum* (**Tabela 7**). Biljni

materijal sakupljen je tokom tri dana, juna 2015. godine u okolini Subotičko-horgoške peščare i Fruške Gore. Dva uzorka vrste *C. littorale* poreklom iz Francuske, jedna biljka vrste *C. erythraea* poreklom sa Vlasinskog jezera, kao i osam biljaka nastalih u eksperimentima međuvrskog ukrštanja ovih jedinki su takođe uvršćene u analizu (**Tabela 7**). Ove biljke su gajene u uslovima *in vitro*.

Tabela 7: Biljke korišćene u analizi genetičke varijabilnosti populacija roda *Centaurium* EST-SSR markerima.

Takson:	Broj jedinki	Šifra lokaliteta ¹	Godina sakupljanja	Šifre uzoraka
<i>Centaurium erythraea</i>	19	IV	2015	<i>C.e.</i> (1-19) IV '15
<i>Centaurium erythraea</i>	17	BE	2015	<i>C.e.</i> (1-17) BE '15
<i>Centaurium erythraea</i>	20	BV	2015	<i>C.e.</i> (5-24) BV '15
<i>Centaurium pannonicum</i> *	8	MJ	2015	<i>C.pan.</i> (3-10) MJ '15
<i>Centaurium pannonicum</i> *	23	PA	2015	<i>C.pan.</i> (3-25) PA '15
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	13	MJ	2015	<i>C.l.c.</i> (1-13) MJ '15
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	5	PA	2015	<i>C.l.c.</i> (2-6) PA '15
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	15	HA	2015	<i>C.l.c.</i> (1-15) HA '15
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	18	AS	2015	<i>C.l.c.</i> (1-18) AS '15
Biljke iz eksperimentalnih ukrštanja uvršćene u analize				
<i>Centaurium littorale</i>	2	NA	1999	<i>C.l.</i> (11-12) NA '99
<i>Centaurium erythraea</i>	1	VL	2001	<i>C.e.</i> VL '01
Hibridne biljke iz eksperimentalnih ukrštanja	8			H14-16, H18-H23
	Σ149			

¹ Videti tabelu 1

*pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. littorale* ssp. *compressum*

Postavka EST-SSR-PCR reakcija i metoda spajanja amplikona

Eksperimentalna analiza je obuhvatala utvrđivanje EST-SSR profila za 9 lokusa i 149 jedinke (**Tabela 5**). Postavka PCR reakcija i amplifikacija PCR produkata je urađena po recepturi prikazanoj u prethodnom poglavlju uz korišćenje optimalnih temperatura hibridizacije ustanovljenih eksperimentalno za svaki par prajmera (**Tabela 14**; Poglavlje: Rezultati).

Neposredno pre razdvajanja i kapilarnom elektroforezom i vizuelizacije, produkti nastali amplifikacijom određenih lokusa su pomešani (metod mešanja amplikona) u jednu smešu, a pritom su dodavani i odgovarajući standardi za dužinu. Ovo je bilo moguće jer se, u reakcijama čiji su produkti spajani, dobaju amplikoni koji se ne preklapaju po veličini. Korišćeni su komercijalni standardi za DNK dužine od 150 bp i 200 bp (*NoLimits 150 bp DNA Fragment* i *NoLimits, 200bp DNA Fragment; ThermoFisher Scientific, Bremen, Nemačka*). Standardi su razblaženi do koncentracije od 50 ng μ^{-1} i kao takvi korišćeni u smešama. Takođe, u sve smeše amplikona dodavan je i standard za dužinu proizveden posebno za ove potrebe. Reč je o amplikonu od 342 bp koji nastaje kao produkt *PCR* reakcije ukupne DNK izolovane termalnom lizom bakterijskog soja *A4M70GUS* (*Agrobacterium rhizogenes*) i prajmera za *rolC* gen (Jouanin i sar., 1989; Slightom i sar., 1985; Slightom i sar., 1986). Produkt *PCR* reakcije je pušten na 1% agaroznom gelu sa koga je traka od 342 bp isečena i preišćena uz pomoć kita za izolaciju DNK fragmenata sa gela (*Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Thermoscientific, Bremen, Nemačka*). Koncentracija amplikona od 342 bp je, nakon izolacije sa gela, određena fluorimetrijski pomoću *Qubit Fluorimeter* aparata (*Qubit Fluorimeter, ThermoFisher Scientific, Invitrogen[®], Carlsbad, California, SAD*). Koncentracija korišćenog standarda dužine 342 bp koja je dodavana u smešu amplikona iznosila je takođe 50 ng μl^{-1} .

Spajani su amplikoni i standardi za dužinu po sledećoj formuli:

- Produkti amplifikacije lokusa *M4* (1 μl) i *M7* (1 μl) + 342 bp (0,3 μl);
- Produkti amplifikacije lokusa *M8* (1 μl) i *M10* (1 μl) + 342 bp (0,3 μl);
- Produkti amplifikacije lokusa *M12* (1 μl) i *M13* (1 μl) + 200 bp (0,3 μl) + 342 bp (0,3 μl);
- Produkti amplifikacije lokusa *M5* (1 μl) i *M18* (1 μl) +150 bp (0,3 μl) + 342 bp (0,3 μl).

Razdvajanje i vizuelizacija produkata EST-SSR-PCR reakcija

Razdvajanje alela *EST-SSR* lokusa obavljeno je kapilarnom elektroforezom na *Agilent DNA 7500 Kit* čipovima (potvrda, procena varijabilnosti i transferabilnosti

novorazvijenih *EST-SSR* molekularnih markera) i na *Agilent DNA 1000 Kit* čipovima (analiza genetičke varijabilnosti populacija roda *Centaureum EST-SSR* markerima) pomoću *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistema (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD*), prema uputstvu proizvođača. Korišćen je softver *Agilent 2100 Expert*, B.02.08 (SR1) (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD*) kojim je vršena identifikacija produkata putem elektroferograma i njihovo upoređivanje između jedinki istih ili različitih populacija. Veličina fragmenata se ovim sistemom procenjuje poređenjem sa DNK (lederskim) markerom visoke preciznosti koji se detektuje nezavisno od uzoraka. U okviru svakog uzorka, nalaze se dodatni markerski standardi, koji predstavljaju kontrolnu gornju i donju granicu detekcije, a istovremeno služe i za sotversko poravnavanje između uzoraka. Navedeni softver ima i mogućnost poravnavanja profila na osnovu dodatih standarda za dužinu u različitim uzorcima, što dalje omogućava preciznije određivanje dužine fragmenata. Kao materijal za dalje analize korišćene su slike elektroferograma i sintetičkih gelova. Elektroforeza produkata *M17* lokusa vršena je u 3% agaroznim gelovima.

Parametri varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa

Očekivane učestalosti alela u populacijama svih uzoraka su izračunate uz pomoć programskog paketa *polysat* (Clark i Jasieniuk, 2011) u programskom jeziku *R* (R Core Team, 2014). Osnovna podešavanja u okviru *polysat* paketa su obuhvatila: polizomski način nasleđivanja svih populacija, odgovarajuću ploidnost populacija (tetraploidne/heksaploidne populacije), stopu samooplodnje od 0,55 (prema Brys i Jacquemyn, 2011) i dužine mikrosatelitskih ponovaka za svaki lokus. Genetička varijabilnost je kvantifikovana kao: ukupan broj alela u populaciji, prosečan broj alela po lokusu po populaciji, uočena i očekivana heterozigotnost, efektivan broj alela u populaciji na osnovu očekivane heterozigotnosti, a predstavljen je i opseg alelskog variranja. Za pojedninačne populacije, kao i za svaki poseban takson identifikovani su aleli koji se javljaju samo u okviru pomenutih grupa tzv. privatni aleli.

Pored očekivanih učestalosti alela u populacijama i procene učestalosti nultih alela, *polysat* paketom su izračunate i *Bruvo* genetičke distance između analiziranih jedinki.

Uočena heterozigotnost (eng.: *observed heterozygosity*; H_o) populacije dobijena je prebrojavanjem heterozigotnih jedinki.

Očekivana heterozigotnost (eng.: *expected heterozygosity*; H_e) je izračunata na osnovu učestalosti alela dobijenih *polysat* paketom po lokusu prema formuli:

$$H_e = 1 - \sum p_i^4$$

za tetraploidne populacije i

$$H_e = 1 - \sum p_i^6$$

za heksaploidne populacije, gde je p_i učestalost i -tog alela datog lokusa. Zatim je izračunata i prosečna heterozigotnost populacija u odnosu na sve analizirane lokuse.

Analiza sadržaja sekundarnih metabolita

Priprema uzoraka za fitohemijske analize

Kao polazni materijal za hemijske analize korišćene su biljke dobijene iz semena poreklom iz odabranih populacija i tokom nekoliko različitih godina, sakupljanog sa područja okoline Subotičko-horgoške pešćare i Fruške Gore. U kontrolisanim uslovima staklenika dobijene su biljke poreklom iz dve populacije vrsta *Centaureum erythraea* (semena sakupljena 2010. i 2013. godine). Semena biljaka vrste *C. littorale* ssp. *compressum* sakupljana su na tri lokaliteta (**MJ**, **PA** i **HA**) i u dve uzastopne godine (2013. i 2014). Semena biljaka koje pripadaju pretpostavljenim hibridnim populacijama *C. pannonicum* sakupljana su na dva lokaliteta (**MJ** i **PA**), takođe u iste dve uzastopne godine (**Tabela 8**).

Tabela 8: Populacije korišćene u fitohemijskim analizama i analizama ploidnosti metodom protočne citometrije. Biljke su gajene u stakleniku.

Takson:	Broj jedinki u fitohemijskim analizama	Šifra lokaliteta ¹	Godina sakupljanja	Šifre uzoraka
<i>Centaurium erythraea</i>	9	IV	2010	<i>C.e.</i> (4-12) IV '10
<i>Centaurium erythraea</i>	9	BE	2013	<i>C.e.</i> (11-19) BE '13
<i>Centaurium pannonicum</i> *	9	MJ	2013	<i>C.pan.</i> (11-19) MJ '13
<i>Centaurium pannonicum</i> *	7	MJ	2014	<i>C.pan.</i> (1-7) MJ '14
<i>Centaurium pannonicum</i> *	10	PA	2014	<i>C.pan.</i> (1-10) PA '14
<i>Centaurium littorale ssp. compressum</i>	9	MJ	2013	<i>C.l.c.</i> (11-19) MJ '13
<i>Centaurium littorale ssp. compressum</i>	10	MJ	2014	<i>C.l.c.</i> (1-10) MJ '14
<i>Centaurium littorale ssp. compressum</i>	10	PA	2014	<i>C.l.c.</i> (1-10) PA '14
<i>Centaurium littorale ssp. compressum</i>	9	HA	2014	<i>C.l.c.</i> (1-9) HA '14
	Σ82			

¹ Videti tabelu 1

*pretpostavljeni hibridi između *C. erythraea* × *C. littorale ssp. compressum*

Listovi rozeta su uzorkovani sa biljaka starih četiri meseca. Takođe, prikupljeni su listovi osam biljaka poreklom iz eksperimenata hibridnog ukrštanja (dve roditeljske jedinke, kao i šest hibridnih). Ove biljke su gajene neprekidno u uslovima *in vitro* i u trenutku sakupljanja materijala za hemijske analize su bile u fazi cvetanja. Listovi su očišćeni od supstrata i odloženi u kesice sa silika gelom radi ubrzanog sušenja. Ovako sakupljeni materijal je čuvan na sobnoj temperaturi do daljeg korišćenja. Svaki uzorak je usitnjen u avanu do sitnog praha pomoću tečnog azota i ekstrahovan u 99,8% metanolu (*AppliChem, Cheshire, CT, SAD*) u odnosu 1:50 (*w/v*). Materijal je ekstrahovan na sobnoj temperaturi, u mraku, tokom 24 sata. Uzorci su zatim prečišćeni kroz filter papir, a dodavanjem metanola je podešena zapremina ekstrakta u normalnim sudovima. Svaki uzorak je profiltriran kroz celulozni filter (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*), sa prečnikom pora od 0,2 μm. Uzorci su sačuvani u mraku na 4°C do trenutka korišćenja.

UHPLC-DAD/-HESI-MS/MS (tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa UV detekcijom i MS/MS masenom spektrofotometrijom) analiza

Hromatografsko razdvajanje komponenti metanolnih ekstrakata *C. erythraea*, *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*, kao i standarda fenolnih jedinjenja i sekoiridoidnih glukozi, urađeno je na *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistemu (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) u čijem se sklopu nalazi binarna pumpa, vakum degaser, termostat za kolone, auto-sempler i UV detektor (eng.: *Diode Array Detector; DAD*). *UHPLC* sistem je konfigurisan sa triple-quadrupole masenim spektrofotometrom (*TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*) sa elektron sprej jonizacijom (eng.: *Heated Electrospray Ionization; HESI*). Hromatografsko razdvajanje je urađeno na *Hypersil gold C18* koloni dimenzija 50 × 2.1 mm, sa česticama veličine 1.9 μm (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*). Mobilna faza se sastojala od 0,02% rastvora sirćetne kiseline (A) i acetonitrila (B), a uzorci su eluirani prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prva 3 min, 20–40% B od 3. do 5. min, 40-50% B od 5 do 7,5 min, 50–60% B u periodu od 7,5-8,5 min, 60–95% B od 8,5 do 10,5 min, 95% B do 11,5 min, 95% do 5% B od 11,5 do 12 min i na kraju 5% B do 15 min. Protok je podešen na 0,400 ml min⁻¹. Sve analize su urađene sa rastvorima MS kvaliteta (*Fisher Scientific UK, Leics, Velika Britanija*). Kolona je termostatorirana na 30°C, dok je injekciona zapremina bila 10 μL. Za kontrolu *UHPLC* instrumenta i za obradu podataka korišćen je *Chromeleon Xpress* softver (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka*).

Temperatura jonske probe (eng.: *vaporizer temperature*) masenog spektrofotometra je podešena na 350°C, a parametri *HESI* probe su bili: napon 3500 V, pritisak nosećeg gasa (N₂) 28 AU (arbitrarne jedinice; eng. *arbitrary units*), pritisak gasa u jonskom izvoru 0 AU, pritisak auksilarnog gasa 4 AU, temperatura kapilare 270°C, podešavanje jonskih sočiva 0 V. *Xcalibur* softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i obradu podataka. U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (eng.: *Collision-Induced Dissociation; CID*), pri čemu je koliziona energija varirala u zavisnosti od jedinjenja koje je analizirano (**Tabela 9**). U *PIS* (eng.: *Product Ion Scanning*) eksperimentima, *MS/MS* produkt-joni su dobijeni fragmentacijom jona prekursora

u kolizijskoj ćeliji *triple-quadrupole* masenog spektrofotometra (*Q2*), a njihove mase su analizirane u *Q3* kvadrupolu instrumenta. *SRM* (eng.: *Single Reaction Monitoring*) je najosetljiviji tip analize korišćenog instrumentak kojim su apsolutno kvantifikovana jedinjenja od interesa. Za svako jedinjenje izvršen je odabir predefinisanih masenih fragmenata, tj. produkt-jona, koji su korišćeni kao referentni u *SRM* eksperimentu.

Jedinjenja su u uzorcima identifikovana na osnovu *MS* i *MS/MS* spektara, poređenjem sa standardima, kao i na osnovu dostupnih podataka iz literature i *on-line* baza. Stok rastvor standarda je pripremljen rastvaranjem 1 mg standarda u 1 ml metanola. Razblaženja standarda su pripremljena rastvaranjem stok rastvora u metanolu, što je rezultovalo širokim opsegom koncentracija od 0,002 do 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Jedinjenja su kvantifikovana na osnovu površine pikova u *SRM* eksperimentu, korišćenjem kalibracionih kriva čistih standarda. Koncentracije jedinjenja su preračunate i predstavljene u jedinicama: mg g^{-1} suve mase biljnog tkiva. Kalibracioni podaci, kao što su korelacioni koeficijent jednačine kalibracione krive (r^2), granice detekcije (eng.: *Limit Of Detection*; *LOD*) i kvantifikacije (eng.: *Limit Of Quantification*; *LOQ*) jedinjenja, prikazani su u **Tabeli 9**. *LOD* vrednost u uspostavljenim hromatografskim uslovima određena je kao ona vrednost kod koje odnos signal/šum iznosi 3, dok je u slučaju *LOQ* ta vrednost 10.

Standardi hininske, kafeinske, *p*-kumarne, ferulinske i sinapinske kiseline, kvercetina, rutina, izokvercitrina, kempferola, astragalina, luteolina, apigenina i naringenina su komercijalno dostupni (*Sigma*, *Aldrich*, Nemačka), kao i standardi svercijamarina, genciopikrina i sverozida (*Oskar Tropitzsch*, *Marktrechwitz*, Nemačka). Standardi eustomina i demetileustomina izolovani su iz nadzemnog dela *C. erythraea* (za opis metode videti: Janković, 1998), dok su dekuzatin i metilbelidifolin izolovani iz nadzemnog dela vrste *C. pulchellum* (za opis metode videti: Krstić, 1998) i dobijeni su ljubaznošću dr Dijane Krstić.

Tabela 9: Kalibracioni podaci za 20 jedinjenja kvantifikovanih UHPLC-MS/MS analizom u SRM eksperimentu, uključujući koeficijent korelacije jednačine kalibracione krive (r^2), granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ).

Br.	Jedinjenje	Mod	(r^2)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
1	Hininska kiselina	-HESI	0,9970	0,010	0,025
2	Kafeinska kiselina	-HESI	0,9987	0,010	0,025
3	<i>p</i> -Kumarna kiselina	-HESI	0,9936	0,025	0,050
4	Ferulinska kiselina	-HESI	0,9950	0,100	0,200
5	Sinapinska kiselina	-HESI	0,9939	0,010	0,025
6	Luteolin	-HESI	0,9903	0,010	0,025
7	Apigenin	-HESI	0,9948	0,005	0,010
8	Rutin	-HESI	0,9956	0,005	0,010
9	Izokvercitrin	-HESI	0,9987	0,010	0,025
10	Astragalin	-HESI	0,9909	0,005	0,010
11	Kvercetin	-HESI	0,9939	0,005	0,010
12	Kemferol	-HESI	0,9911	0,010	0,025
13	Naringenin	-HESI	0,9981	0,010	0,025
14	Dekuzatin	+HESI	0,9944	0,010	0,025
15	Eustomin	+HESI	0,9920	0,005	0,010
16	Metilbelidifolin	+HESI	0,9983	0,100	0,250
17	Demetileustomin	+HESI	0,9987	0,005	0,010
18	Svercijamarin	-HESI	0,9970	0,025	0,100
19	Genciopikrin	-HESI	0,9990	0,010	0,025
20	Sverozid	-HESI	0,9973	0,050	0,100

Statistička obrada podataka i vizuelno predstavljanje rezultata

Analiza i vizuelizacija podataka dobijenih molekularnim markerima

Analiza i predstavljanje podataka dobijenih uz pomoć *RAPD* molekularnih markera obuhvatila je hijerarhijsku klaster analizu i *PCoA* (eng.: *Principal Coordinate Analysis*). Hijerarhijska klaster analiza urađena je softverom *PAST* (*PAleontological STatistics*, ver. 1,89; Hammer, Harper i Ryan, 2001) metodom *UPGMA* i korišćenjem Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti (Jaccard, 1908). Pri analizi binarnih podataka dobijenih na osnovu *RAPD* molekularnih markera često se koristi Žakardov koeficijent genetičke sličnosti (Duarte, Santos i Melo, 1999). Žakardov koeficijent (kao i npr. Dajsov) uzima u obzir samo poklapanja između traka koje su prisutne a zanemaruje parove gde su trake odsutne. Imajući u vidu genetičku osnovu *RAPD* markera (Williams i sar., 1990), odsustvo amplikona kod dva genotipa ne znači obavezno i genetičku sličnost među njima. Rezultati su predstavljeni u vidu fenograma. *PCoA* dijagram genetičkih udaljenosti jedinki na osnovu Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti konstruisan je uz pomoć modula *NTSYSpc* softvera: *DCENTER* (za transformaciju matrica) i *EIGEN* (za izračunavanje svojstvenih vektora transformisanog matriksa).

Podaci dobijeni uz pomoć *EST-SSR* molekularnih markera tetraploidnih i heksaploidnih taksona obuhvaćenih ovim istraživanjem su, u prvom koraku obrađeni uz pomoć *polysat* paketa *R* programskog jezika (Clark i Jasieniuk, 2011). Ovaj paket je za unete dužine mikrosatelitskih ponovaka i stopu samooplodnje izračunao očekivane učestalosti alela u populacijama i učestalosti nultih alela u populacijama dok su *Bruvo* genetičke distance između jedinki dobijene korišćenjem funkcije “*Mean Pairwise Distance Matrix*”. Dalje predstavljanje podataka obuhvatalo je hijerarhijsku analizu klastera (*UPGMA* metodu aglomeracije) konstruisanu na osnovu matrice *Bruvo* distanci između uzoraka u programskom jeziku *R*. Vizuelizacija hijerarhijske klaster analize i *PCoA* izvedna je pomoću *R* paketa *ggplot2* (Wickham, 2009). Primenom *polysat* paketa izračunati su i *Fst* indeksi između populacija.

Procena statističke podrške grananju hijerarhijske klaster analize, kako urađene uz pomoć *RAPD* podataka, tako i *EST-SSR* podataka urađena je butstrep (eng.: *bootstrap*)

metodom opisanom u radu Hennig (2007), koja se zasniva na pronalaženju prosečnog Žakarovog indeksa sličnosti između klastera dobijenih originalnom analizom i njima sličnih butstrepovanih klastera (prosek 1000 butstrep ponavljanja). Ovo je urađeno korišćenjem *R* paketa *fpc* (Hennig, 2015).

Paketom *poppr* (takođe u *R* programskom jeziku), konstruisana je mreža minimalnog raspona (eng.: *minimum spanning network*) na osnovu multilokusnih fenotipova. Ova analiza je uključila jedinke prikazane u **Tabeli 7** sa izuzetkom uzoraka veštačkih hibrida i jedinke *C.e. VL'01*.

Predstavljanje i vizuelizacija podataka dobijenih fitohemijskom analizom

Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti sadržaja 20 jedinjenja kod analiziranih *Centaurium* vrsta korišćena je analiza varijanse (*ANOVA*) i Tukijev *HSD* test (*Tukey's Honest Significant Difference test*) za utvrđivanje najmanjih statistički značajnih razlika na nivou $p \leq 0,05$. Da bi se postigla normalna raspodela analiziranih podataka primenjivane su *Box-Cox* transformacije (Box i Cox, 1964).

Grafičko predstavljanje objekata (u našem slučaju jedinki) i fitohemijskih podataka svih analiziranih jedinjenja kao varijabli urađeno je uz pomoć mape raspodele (toplotna mapa; eng.: *heat map*). Varijable su predstavljene u dvodimenzionoj matrici u kojoj su individualne vrednosti varijabli predstavljene preko različitih boja. Apsolutne koncentracije svih 20 prikazanih jedinjenja su skalirane na raspon od 0–1 deljenjem svake pojedinačne koncentracije sa maksimalnom izmerenom koncentracijom za dato jedinjenje. Na osnovu ovakvog prikaza mogu se doneti preliminarni zaključci o uticaju pojedinih varijabli na grupisanje objekata.

Multivarijantna analiza fitohemijskih podataka urađena je uz pomoć dve nenadgledane metode: analize osnovnih komponenti (eng.: *Principal Component Analysis, PCA*) i analize klastera (eng.: *cluster analysis*), dok je kao nadgledana metoda urađena linearna diskriminantna analiza (eng.: *Linear Discriminant Analysis, LDA*).

Sve statističke analize i vizuelizacije rezultata fitohemijskih analiza su urađene uz pomoć *R* paketa, i to: *PCA* korišćenjem paketa *stats*, a *LDA* funkcijama dostupnim u paketu

MASS (Venables i Ripley, 2002). Grafičko predstavljanje projekcije varijabli u *PCA* i *LDA* dimenzijama, kao i mapa raspodele, izvedeno je pomoću *R* paketa *ggplot2* (Wickham, 2009) i paketa *ggord* (Marcus, 2016).

Pre *PCA* analize, koncentracije jedinjenja su transformisane centriranjem srednje vrednosti na 0 i skaliranjem varijabilnosti tako da standardna devijacija iznosi 1. Pre hijerarhijske klaster analize podaci su transformisani skaliranjem na rasponu od 0 - 1. Tokom *LDA* analize, prethodna verovatnoća za pripadnost uzoraka nekoj od tri taksona definisana je kao podjednaka.

Dobijeni *LDA* modeli su testirani su nasumičnom unakrsnom validacijom sa slučajnim ponovljenim pod-uzorkom (eng.: *repeated random sub-sampling cross-validation*) koja se zasniva na formiranju *LDA* modela bez određenog broja masumično izabranih uzoraka (10 u ovom slučaju) i testiranju predikcije modela na tim izbačenim uzorcima. Kako bi se izbegla subjektivnost koja proizilazi iz nasumičnog izbora izbačenih uzoraka metoda je ponovljena 10×1000 puta i dat je procenat pogrešno klasifikovanih uzoraka \pm standardna devijacija. Na ovaj način se testira ponašanje modela na uzorcima koje sâm “nije video” što je mnogo bolji pokazatelj tačnosti modela od prostog izračunavanja natečno klasifikovanih uzoraka iz skupa onih koji su korišćeni za njegovu konstrukciju.

U cilju pojednostavljenja *LDA* modela koje se ogledalo u zadržavanju minimalnog broja jedinjenja uz održanje tačnosti predviđanja na nivou punog modela, urađena je selekcija najboljih podskupova (eng.: *best subset selection*; James i sar., 2013). Ukratko, za svaki m broj varijabli ($m < p$; $p=20$, tj. ukupan broj varijabli) napravljeni su svi $\binom{p}{m}$ mogući *LDA* modeli, i za svaki m odabrana je ona kombinacija varijabli koja pruža najbolju separaciju (odnos varijanse između grupa i varijanse unutar grupa) među vrstama. Za svako m , kombinacija varijabli sa najboljom separacijom testirana je nasumičnom unakrsnom validacijom.

Analiza koncentracija 20 odabranih jedinjenja sekundarnog metabolizma roda *Centaurium* obuhvatila je i hijerarhijsku klaster analizu uz pomoć kvadratnih Euklidskih distanci *Ward*-ovom metodom (Ward, 1963). Koncentracija jedinjenja je prethodno klaster

analizi skalirana na opseg 0-1. Grafičko predstavljanje fenograma izvedeno je pomoću *R* paketa *ggplot2* (Wickham, 2009). Za procenu statističke podrške grananju takođe je urađena butstrep analiza uz pomoć *R* paketa *fpc* (Hennig, 2015) metodom opisanom u radu Hennig (2007).

REZULTATI

Ploidnost biljka korišćenih u eksperimentima međuvrsnog ukrštanja i ploidnost populacija

Biljke korišćene u eksperimentima hibridnog ukrštanja u uslovima *in vitro*, jedinke *C. erythraea* i *C. littorale*, kao i sve hibridne jedinke nastale iz ukrštanja *C. erythraea* sa *C. littorale*, pokazale su količinu DNK ekvivalentnu tetraploidnom hromozomskom setu referentnog uzorka.

Sve prirodne populacije vrste *Centaureum erythraea* (*C.e.IV*'10, *C.e. BE*'13 i *C.e. BV*'15) kao i podvrste *Centaureum littorale* ssp. *compressum* (*C.l.c. MJ*'13, *C.l.c. MJ*14, *C.l.c. PA*'14, *C.l.c. HA*'14, *C.l.c. AS*'15) su pokazale količinu DNK ekvivalentnu tetraploidnom hromozomskom setu. Sa druge strane, sve jedinke okarakterisane kao *Centaureum pannonicum* (*C.pan. MJ*'13, *C.pan. MJ*'14 i *C.pan. PA*'14) su jasno pokazale količinu DNK ekvivalentnu heksaploidnom hromozomskom setu. Jedinke poreklom iz istih populacija nisu pokazivale međusobne razlike u količini DNK po ćeliji, niti je uočeno postojanje neparnih hromozomskih setova ili indikacije prisustva aneuploidije.

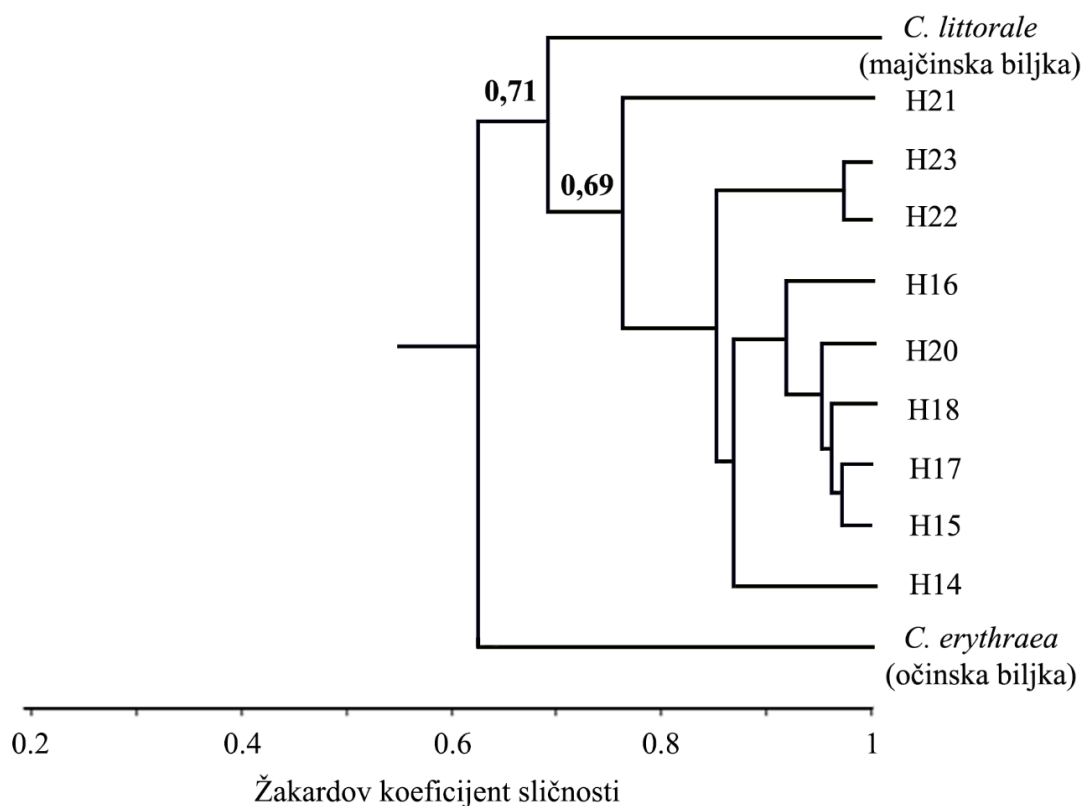
Eksperimentalna međuvrsna ukrštanja

Biljke korišćene kao roditeljske u eksperimentima međuvrsnog ukrštanja su uspešno indukovane da cvetaju u uslovima *in vitro*. Cvetanje obe vrste (jedinki vrsta *C. erythraea* i *C. littorale*) je zabeleženo 8-10 nedelja posle primenjenih tretmana. Izvedeno je šest pokušaja hibridizacije između vrste *C. littorale* (kao majčinske biljke) i vrste *C. erythraea* (kao očinske biljke, polenskog donora), i na ovaj način je dobijeno 11 hibridnih biljaka. Iz recipročnih pokušaja ukrštanja, u kojima je vrsta *C. erythraea* majčinska biljka, a vrsta *C. littorale* očinska biljka nisu dobijena vijabilna semena. Kod kontrolne grupe cvetova, kod kojih je vršena demaskulinizacija, a koji nisu naknadno oprašivani (ukupno 38 cvetova), nije došlo do formiranja semena.

Biljni materijal analiziran uz pomoć *RAPD* molekularnih markera je obuhvatio dve roditeljske biljke kao i devet biljaka nastalih hibridnim ukrštanjem. Ukupan broj zabeleženih

amplifikovanih fragmenata je bio 55, od kojih je 30 bilo polimorfno. Prosečna polimorfnost svih šest prajmera na ovom setu uzoraka je bila 57,4%.

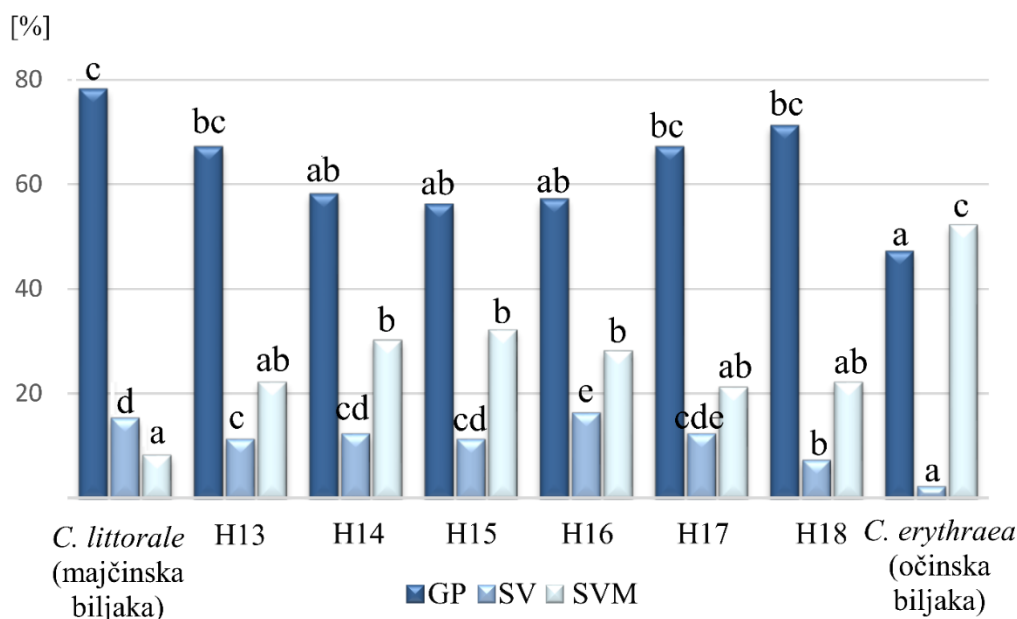
Obrazac pojave amplikona na agaroznim gelovima, dobijenim vizualizacijom *RAPD-PCR* je potvrdio hibridizaciju. Uočene su trake specifične za roditeljske vrste koje su se javljale kod hibridnih individua. Pažnja je posebno usredsređena na trake koje su specifične za očinsku vrstu (u našem ukrštanju to je *C. erythraea*) i koje su se javljale kod hibridnih biljaka. Procenat markerskih traka koje su delile hibridne biljke i očinska biljka se kretao od 13,3-20%. *RAPD* profili hibridnih biljaka odstupaju od kompletne aditivnosti u odnosu na roditeljske jedinice od 17,78% do 29%, u zavisnosti od korišćenog prajmera. Trake specifične samo za hibridne biljke nisu uočene.



Slika 12: Fenogram hijerarhijske analize klastera (*UPGMA* metoda aglomerizacije) dobijen na osnovu Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti roditeljskih i hibridnih biljaka upotrebom *RAPD* molekularnih markera.

Fenogram konstruisan na osnovu *RAPD* analize (Slika 12), je jasno ukazao na položaj hibridnih biljaka između dva roditeljska taksona. Sve hibridne biljke su bile nešto bliže majčinskoj vrsti (*C. littorale*). Jedinke *C. erythraea* (očinska) i *C. littorale* (majčinska) se odvajaju pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,625. Odvajanje klastera koji sadrži hibridne biljke i jedinke *C. littorale* je podržan butstrep podrškom od 0,71 i dešava se pri vrednosti koeficijenta genetičke sličnosti od 0,7.

Biljke koje su korišćene u eksperimentalnim hibridnim ukrštanjima su pokazale kvantitativne razlike u sadržaju sekoiridoidnih glukozida nadzemnog dela. Svercijamarin je bio najzastupljeniji sekoiridoidni glulozid kod jedinke vrste *C. erythraea* dok je jedinka vrste *C. littorale* sadržala najviše genciopikrina. Hibridne biljke su pokazale koncentracije sekoiridoidnih glukozida koje su bile između koncentracija zabeleženih kod roditeljskih biljaka u slučaju sva tri ispitivana jedinjenja (Slika 13).



Slika 13: Koncentracije (% suve mase) tri sekoiridoidna glukozida (GP=genciopikrin, SV=sverozid, SVM= svercijamarin) metanolnih ekstrakata nadzemnih delova biljaka iz eksperimenata međuvrskog ukrštanja. Različita slova predstavljaju statistički značajne razlike (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti koncentracije sekoiridoidnih glukozida (svaki nezavisno) kod analiziranih jedincki, primenom *LSD* testa.

Analiza genetičke varijabilnosti vrsta roda *Centaurium* primenom *RAPD* molekularnih markera

Informativnost podataka dobijenih *RAPD* molekularnim markerima i elektroforetski profili

Deo disertacije koji se bavi analizom genetičke varijabilnosti uz pomoć *RAPD* molekularnih markera obuhvatio je DNK izolovanu iz listova 59 jedinki amplifikovanu sa šest *RAPD* prajmera.

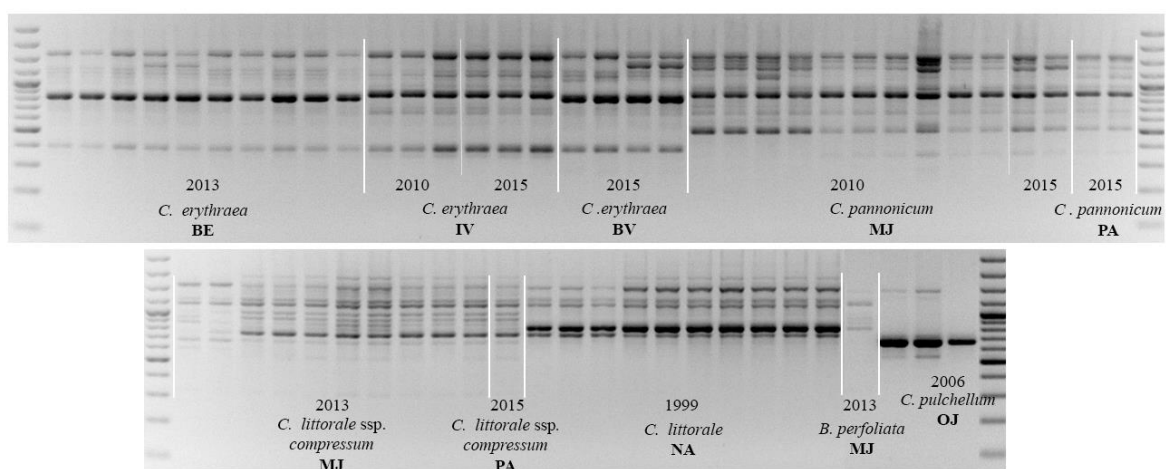
Ukupan broj amplifikovanih fragmenata je 91, od toga 88 traka su bile polimorfne i procenat polimorfnosti se kretao od 81,82% do 100%. Prosečan broj traka po prajmeru je bio 15,17. Opseg dužina amplifikovanih traka je od 300 do 3000 bp (**Tabela 10**).

Tabela 10: Polimorfnost i parametri informativnosti prajmera korišćenih u *RAPD-PCR* reakcijama u proceni genetičke varijabilnosti analiziranih populacija roda *Centaurium*.

Kod prajmera	Ukupan broj traka	Broj polimorfnih traka	Polimorfizam [%]	Prosečna informativnost traka (<i>AvIb</i>)	Razdvojna moć prajmera (<i>Rp</i>)	Prosečan polimorfni informacioni sadržaj-PIC (<i>AvPIC</i>)	Veličina amplifikovanih fragmenata [bp]
<i>OPB 11</i>	15	15	100	0.5527	8.2909	0.3665	300-3300
<i>OPB 15</i>	14	13	92,86	0.5287	6.8727	0.3394	300-3500
<i>OPF 14</i>	11	9	81.82	0.3717	3.3455	0.2621	450-2800
<i>OPH 01</i>	16	16	100	0.5977	9.5636	0.3882	550-3100
<i>OPO 07</i>	16	16	100	0.6318	10.1091	0.4036	370-1800
<i>OPO 15</i>	19	19	100	0.4612	8.7636	0.3238	300-2800
Ukupno/ prosečno	91	88	96.364	0.5240	7.8242	0.3473	300-3300

Prilikom izračunavanja prosečne informativnosti traka (*AvIb*), razdvojne moći prajmera (*Rp*) kao i prosečnog polimorfnog informacionog sadržaja (*AvPIC*), u obzir su uzete samo polimorfne trake, a izostavljene su tri jedinke vrste *Centaurium pulchellum* kao i

jedinka vrste *Blackstonia perfoliata* koje su korišćene kao *out*-grupe u konstrukciji fenograma. Prosečna informativnost traka po lokusu (*AvIb*) se kretala od 0,3717 (prajmer *OPF 14*) do 0,6318 (prajmer *OPO 07*), dok je prosečno (za svih šest prajmera) iznosila 0,5240. Razvojna moć prajmera (*Rp*) se kretala od 3,3455 (prajmer *OPF 14*) do 10,1091 (prajmer *OPO 07*) i prosečno je iznosila 7,8242 za svih šest prajmera. Prosečan polimorfni informacijski sadržaj (*AvPIC*) je iznosio od 0,2621 (prajmer *OPF14*) do 0,4036 (prajmer *OPO 07*). Radi ilustracije, na **Slici 14** su prikazani produkti *PCR* amplifikacije analiziranih jedinki sa prajmerom *OPO 07*. Na osnovu proseka *AvPIC* svih prajmera, dobijena je prosečna heterozigotnost (*Hav*) po prajmeru od $0,3473 \pm 0,05$.

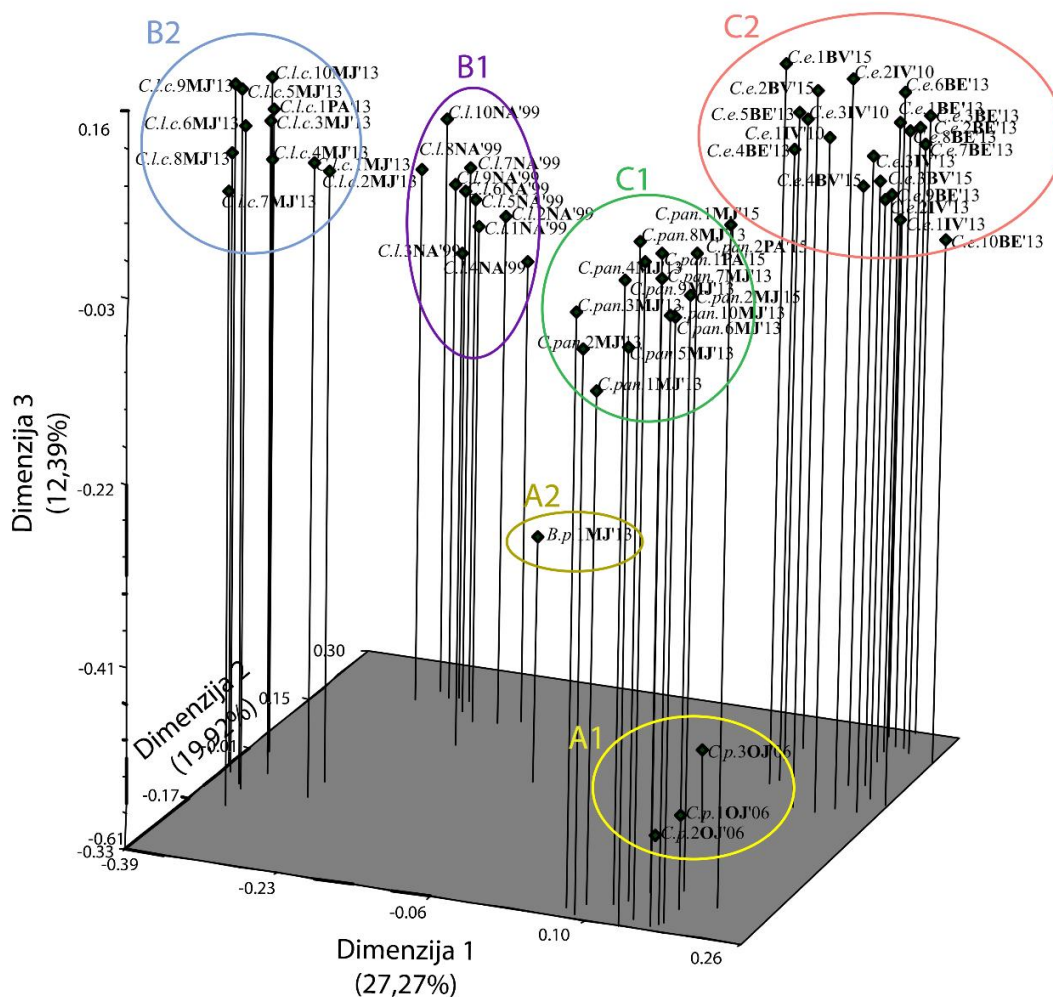


Slika 14: Elektroforetski profili *RAPD-PCR* produkata različitih populacija vrsta roda *Centaurium* i jedinke *Blackstonia perfoliata* (referentni uzorak) dobijenih upotrebom prajmera *OPO 07*. Za kodove populacija pogledati Tabelu 1.

***PCoA* analiza *RAPD* podataka**

PCoA analiza (**Slika 15**) je urađena na osnovu matrica Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti *RAPD* markera i konstruisan je dijagram projekcija jedinki u tri dimenzije. Prva dimenzija obuhvata 27,03% ukupne varijabilnosti, druga 19,92% dok treća dimenzija obuhvata 12,39%, što zbirno predstavlja 59,34% ukupne varijabilnosti prikazane na

dijagramu. Prve četiri osnovne koordinate imaju specifične vrednosti (eng.: *eigenvalues*) veće od 1.



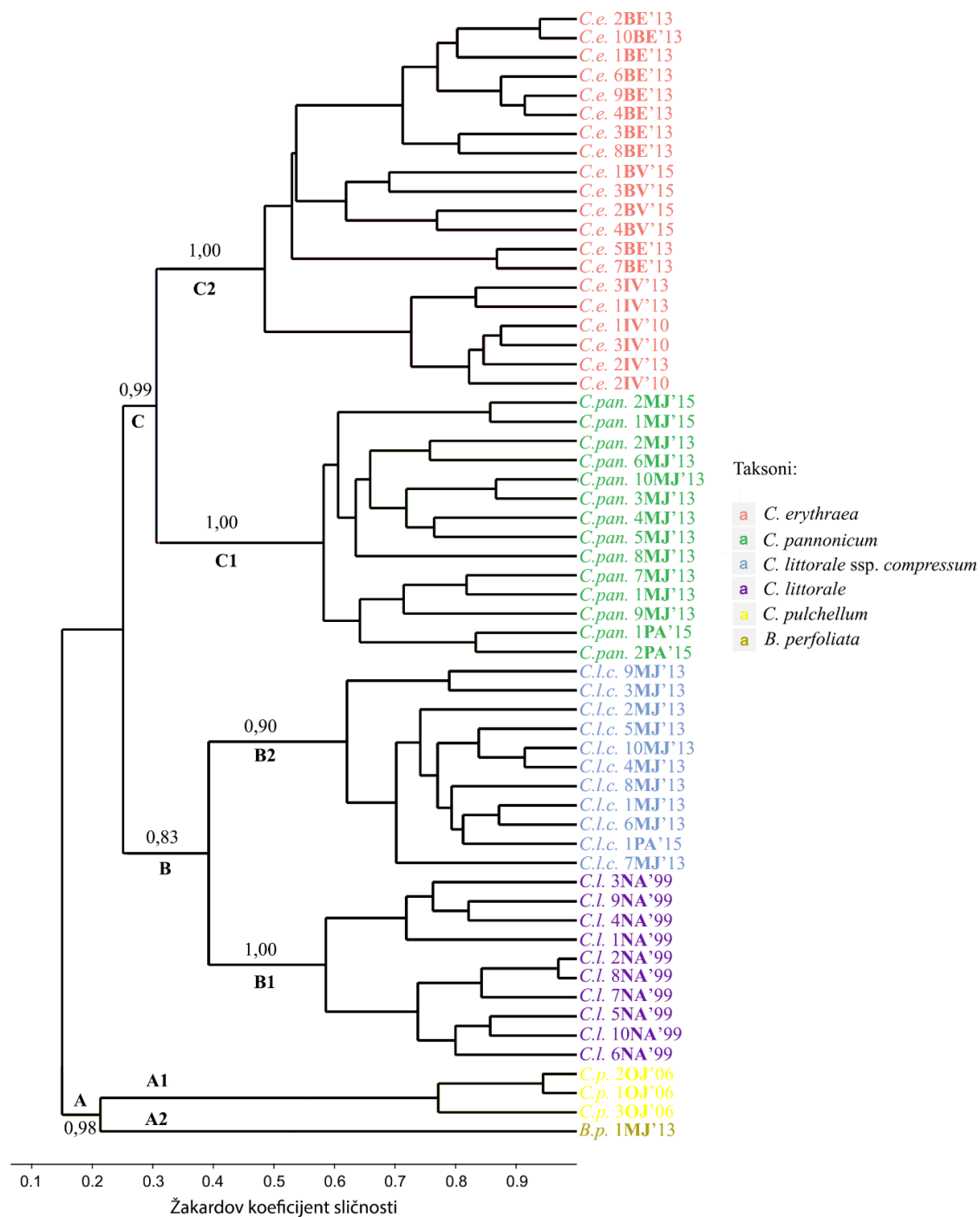
Slika 15: PCoA dijagram dobijen na osnovu Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti (dobijenih uz pomoć *RAPD* markera). Prve tri dimenzije opisuju 59,58% ukupne varijabilnosti. Elipsama su uokvirene jedinice čije je grupisanje uočeno i na fenogramu na **Slici 16**: elipsa **A1**: dve jedinice vrste *C. pulchellum* (*out-* grupa); **A2**: jedinka vrste *B. perfoliata* (*out-* grupa) referentne vrste; elipsa **B1**: jedinice vrste *C. littorale*; elipsa **B2**: jedinice podvrste *C. littorale* ssp. *compressum*; elipsa **C1**: jedinice vrste *C. pannonicum* i elipsa **C2**: jedinice *C. erythraea*.

Referentni uzorak (vrsta *B. perfoliata*) predstavljena jednom jedinkom se jasno izdvaja u sve tri dimenzije, dok se jedinke vrste *C. pulchellum* odvajaju ponajviše trećom dimenzijom od ostalih jedinki. Jasno se uočava grupacija jedinki koja odgovara vrstama *C. erythraea* i *C. littorale* kao i podvrsti *C. littorale* ssp. *compressum*. Potencijalno hibridne jedinke okarakterisane kao *C. pannonicum* su takođe jasno izdvojene od jedinki ostalih taksona.

Hijerarhijska analiza klastera RAPD podataka

Na **Slici 16** prikazan je rezultat hijerarhijske analize klastera uz pomoć *RAPD* genetičkih markera, *UPGMA* metodom i upotrebom Žakardovog koeficijenta genetičke sličnosti sa butstrep analizom od 1000 permutacija. Radi lakšeg sagledavanja rezultata, klasteri uočeni hijerarhijskom analizom klastera obeleženi su slovima.

Prvi klaster (klaster **A**) obuhvatio je tri jedinke vrste *Centaureum pulchellum* (potklaster **A1**) i jedinku vrste *Blackstonia perfoliata* (potklaster **A2**) i od ostatka dendrograma odvojen je već pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,14, podržan visokom butstrep vrednošću (0,98). Takođe, u okviru ovog klastera se jasno odvaja i potklaster koji odvaja jedinku vrste *B. perfoliata*, koja predstavlja *out-* grupu van roda *Centaureum*, od jedinki vrste *C. pulchellum*, koje predstavljaju *out-* grupu u okviru roda.



Slika 16: UPGMA fenogram sličnosti 59 jedinki dobijen upotrebom RAPD molekularnih markera. Klaster A predstavlja vrste (A1) *C. pulchellum* i (A2) *B. perfoliata* (out-grupa), klaster B predstavlja vrstu (B1) *C. littorale* i podvrstu (B2) *C. littorale ssp. compressum*, a klaster C sve jedinke vrste (C1) *C. Pannonicum* i (C2) *C. erythraea*.

Sve ostale jedinke se jasno izdvajaju i grupisane su u okviru dva klastera (klasteri **B** i **C**). Podela klastera **B** i **C** se dešava pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,26. U okviru klastera **B** grupisane su sve jedinke vrste *C. littorale* i podvrste *C. littorale* ssp. *compressum*, a sam klaster je podržan sa vrednošću od 0,83 butstrep podrške. Sa druge strane, u klaster **C** se svrstavaju sve jedinke vrste *C. erythraea* i jedinke okarakterisane kao *C. pannonicum*. Ovaj klaster je podržan još većom vrednošću butstrep podrške od 0,99. Ovakvo grupisanje jedinki klastera **B** i **C** je bez izuzetaka (ili *outlier*-a). U okviru klastera **B** mogu se uočiti dva potklastera koja jasno odvajaju jedinke vrste *C. littorale* (potklaster **B1**) od jedinki podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* (potklaster **B2**). Ovo granjanje se dešava pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,4, a potklasteri su takođe podržani visokim butstrep vrednostima (vrednost butstrepa od 1 za potklaster **B1** i vrednost od 0,9 za potklaster **B2**). I potklaster **C1** i potklaster **C2** su podržani vrednošću butstrep podrške od 1, odvajaju se pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,33 i u potpunosti podržavaju podelu na taksone: *C. pannonicum*, klaster **C1** i *C. erythraea*, klaster **C2**. U okviru potklastera **C2** se javlja još jedno grananje pri nešto višem koeficijentu genetičke sličnosti od 0,50. Ovde se odvajaju jedinke vrste *C. erythraea* sa lokaliteta **IV** od ostalih jedinki iste vrste, ali poreklom sa različitih lokaliteta.

Analiza genetičke varijabilnosti vrsta roda *Centaurium* EST-SSR molekularnim markerima

Razvoj EST-SSR markera

Kao rezultat procesa sekvenciranja dobijena su dva seta (unapred i unazad pročitanih) kratkih sekvenci dužine 114 baznih parova koje predstavljaju 19,3 miliona sekvenci u *FASTQ* formatu.

Prva faza obrade podataka obuhvatila je uklanjanje zaostalih specifičnih *Illumina* prajmerskih sekvenci i sekvenci sa niskim kvalitetom (**Slika 11**). Kao rezultat prve faze obrade podataka softverom *Trimmomatic*, dobijeno je ukupno 18,3 miliona unapred i unazad pročitanih sekvenci takođe u *FASTQ* formatu. U ovom koraku je odbačeno 5,05% sekvenci od inicijalnog seta podataka (**Tabela 11**).

Tabela 11: Rezultat obrade baze podataka sekvenci programom *Trimmomatic*.

Polazni materijal- <i>Illumina GAIIx</i> neobrađene sekvence	Zadržane unapred i unazad pročitane sekvence	Odbačene unapred pročitane sekvence	Odbačene unazad pročitane sekvence	Odbačene unapred i unazad pročitane sekvence
19.339.337	18.277.055 (94,51%)	873.413 (4,52%)	92.527 (0,48%)	96.342 (0,05%)

Druga faza (**Slika 11**) bioinformatičkog pristupa urađena *Pear* programom i obuhvatila je *de novo* kreiranje kratkih kontiga na osnovu spajanja unapred i unazad pročitanih sekvenci. Rezultat ove operacije je ukupno 9,9 miliona uparenih sekvenci (kontiga) dužine od 170 do 200 bp. U ovom koraku je preko 54% od 18,3 miliona sekvenci upareno (**Tabela 12**).

Tabela 12: Rezultat obrade baze podataka sekvenci programom *Pear*.

Uparene kratke sekvence - kontige	Odbačene kratke sekvence	Neuparene kratke sekvence
9.897.399 / 18.277.055 (54,15%)	0/ 18.277.055 (0%)	8,379.656/18.277.055 (45,85%)

Potruga za mikrosatelitskim lokusima u okviru seta od 9,9 miliona kontiga urađena je uz pomoć *GMATo* programa na sekvencama koje su prethodno konvertovane iz *FASTQ* u *FASTA* format (**Slika 11**). Rezultat pretrage *GMATo* programom su 31.561 kontige koji sadrže mikrosatelitske lokuse, što predstavlja 0,31% od broja kontiga dobijenih u prethodnoj fazi obrade podataka. Od ukupnog broja kontiga koje sadrže mikrosatelite, 30.014 kontiga sadrže trimerne, 913 kontiga sadrži tetramerne, 168 kontiga sadrži pentamerne, a 466 kontiga sadrži heksamerne mikrosatelitske ponovke (**Tabela 13**).

Tabela 13: Rezultat pretrage baze podataka kontiga programom *GMATo*.

Kontige sa trimernom mikrosatelitskom sekvencom	Kontige sa tetramernom mikrosatelitskom sekvencom	Kontige sa pentamernom mikrosatelitskom sekvencom	Kontige sa heksamernom mikrosatelitskom sekvencom	Ukupno
30.014	913	168	466	31.561

Od kontiga koje sadrže mikrosatelitske lokuse, uz pomoć programa za tabelarni prikaz podataka odabrane su one kod kojih je pozicija mikrosatelitskog ponovka između 70. i 140. baznog para unutar sekvence (**Slika 11**). Ovakvih kontiga je pronađeno ukupno 13.150 i one su zatim razvrstane u grupe sa zajedničkim mikrosatelitskim motivom.

Pronalaženje potencijalno polimorfnih mikrosatelitskih lokusa obavljeno je *BlastN* programom (**Slika 11**). Kao potencijalno polimorfne sekvence razmatrane su one sekvence koje poseduju iste okružujuće nizove nukleotida i iste mikrosatelitske motive, ali sa različitim brojem ponovaka motiva. Pronađene potencijalno polimorfne sekvence su takođe kontrolisane na redundantnost. Izabrano je 16 kontiga od kojih su dve sadržale heksanukleotidne motive, jedna je sadržala pentanukleotidni motiv, dve su sadržale tetranukleotidne motive i jedanaest sekvenci je sadržalo trinukleotidne motive.

Na osnovu 16 odabranih kontiga, uz pomoć programa *Primer3* (**Slika 11**), konstruisani su parovi prajmera za odabrane lokuse. Ovaj program izračunava i očekivane dužine amplikona.

Prvi korak provere amplifikacije 16 prajmerskih parova konstruisanih za potencijalne *EST-SSR* lokuse urađen je *PCR* amplifikacijom svih dobijenih prajmerskih parova na DNK izolatu poreklom iz iste jedinke čiji je izolat RNK upotrebljen u procesu sekvenciranja (*C. erythraea*; lokalitet: Žanjice). Rezultat ove amplifikacije je proveren na 3% agaroznim gelovima. Za 9 od 16 lokusa je potvrđena amplifikacija fragmenata na očekivanim (ili nešto većim) dužinama i određene su optimalne temperature hibridizacije u okviru *PCR* ciklusa

(**Tabela 14**). Pri *PCR* amplifikaciji za 5 dizajniranih prajmerskih parova (za lokuse *M1*, *M2*, *M3*, *M6* i *M9*) nije došlo do amplifikacije produkata. Pri analizi dva prajmerska para, za lokuse *M15* i *M16* došlo je do amplifikacije mnogostrukih nespecifičnih produkata, te su oni izuzeti iz dalje analize.

Sedam prajmerskih parova (za lokuse: *M4*, *M5*, *M7*, *M8*, *M10*, *M13* i *M18*) su proizveli trake (amplikone) čije dužine su se poklapale sa očekivanim dužinama. Prajmerski par dizajniran za lokus *M12* je amplifikovao produkt duži od očekivanog dok su se za prajmerski par dizajniran za lokus *M17* amplifikovali produkti od 75 bp i 170 bp, od kojih je prvi kraći, a drugi duži od očekivane dužine amplikona (**Tabela 14**). Od devet lokusa koji su ispunili kriterijume za dalje analize, šest (*M5*, *M8*, *M10*, *M12*, *M13*, *M17* i *M18*) ima mikrosatelitske ponovke sa trinukleotidnim motivima, dok jedan lokus ima mikrosatelitski ponovak sa heksanukleotidnim motivom (*M4*), a jedan lokus (*M7*) ima pentanukleotidni mikrosatelitski motiv (**Tabela 14**).

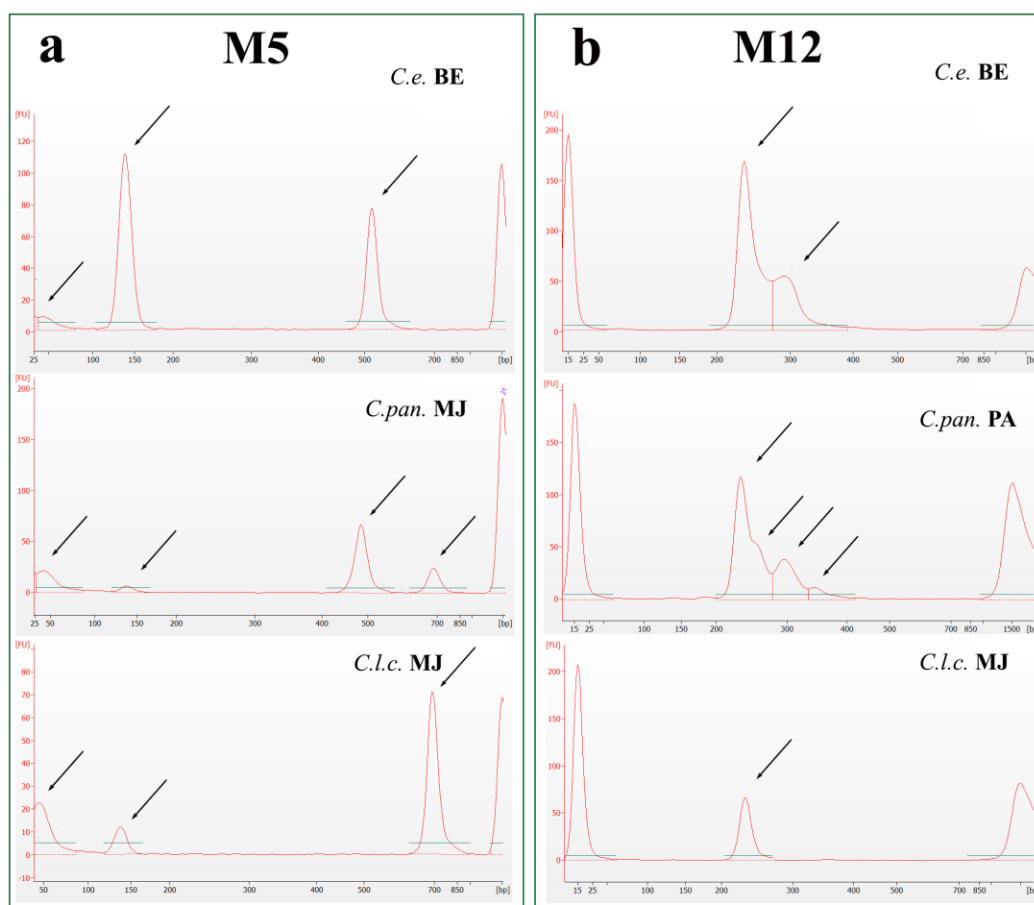
Dalja analiza i potvrda **kvaliteta, dužina produkata amplifikacija i transferabilnosti** devet *EST-SSR* markera koji su odabrani u prethodnim ogledima je urađena *PCR* amplifikacijom na 22 DNK izolata biljaka odabranih kao probni set uzoraka (**Tabela 7**). U ovoj fazi testiran je polimorfizam i transferabilnost razvijenih markera. Razdvajanje *EST-SSR-PCR* produkata kapilarnom elektroforezom potvrdilo je polimorfnost svih devet analiziranih lokusa. Međutim, za lokus *M18* je ovde ustanovljena amplifikacija fragmenata sa očekivanim dužinama, ali broj alela zabeleženih kod nekih jedinki je bio veći od ploidnosti jedinki, te je, usled nemogućnosti razjašnjavanja ovog problema bez sekvenciranja svakog pojedinačnog *PCR* produkta, ovaj lokus izostavljen iz daljih analiza. Osmam lokusa (*M4*, *M5*, *M7*, *M8*, *M10*, *M12*, *M13* i *M17*) su pokazali reproducibilnu amplifikaciju i polimorfizam. Svi lokusi, sa izuzetkom *M4* i *M17*, amplifikovali su se u svim analiziranim taksonima (**Tabela 14**). Lokus *M4* se nije amplifikovao u vrstama *C. pulchellum* i *C. tenuiflorum*. Alel lokusa *M17* od 170 bp amplifikovao se samo kod jedinki vrste *C. erythraea* i jedinki *C. pannonicum*. Takođe, kapilarnom elektroforezom dobijeni su i potvrđeni opsezi dužina produkata za svih 8 lokusa (*M4*, *M5*, *M7*, *M8*, *M10*, *M12*, *M13* i *M17*), koji su upotrebljeni u daljim istraživanjima prirodnih populacija (**Tabela 15**)

Tabela 14: Spisak i karakteristike osam *de novo* razvijenih mikrosatelitskih markera (*EST-SSR*) i karakteristike odgovarajućih prajmerskih parova koji su upotrebljeni u daljim analizama.

Mikrosatelitski marker	Motiv mikrosatelitskog lokusa	Naziv prajmera	Dužina prajmera [bp]	Prajmerske sekvence (5'→3')	GC sastav [%]	Očekivana dužina produkta [bp]	Dobijeni opseg dužina produkata [bp]	Eksperimentalno dobijena optimalna temperatura hibridizacije [°C]
M4	GAAGAT	M4F	21	TGAAATGAAACCCACCTATG	42.86	150	154-184	58.7
		M4R	20	GCATCATGTTGAAAGCGAAG	45.00			
M5	TAC	M5F	23	TTGTTGACAGAAGAGAGAGAGCA	43.48	100	110-137	56.5
		M5R	25	AGAAGCAAATTCAGACATAAATCAA	28.00			
M7	AAAGA	M7F	20	AGGCATAGCCCTTTTCCAT	45.00	100	97-127	56.1
		M7R	20	GACCTTCTCCACCTTCC	55.00			
M8	GTC	M8F	23	CAGGACGGATATTATTGTGGTTG	43.48	114	104-143	56.5
		M8R	18	CATCTGCGTCAGCCATGT	55.56			
M10	ATT	M10F	20	TACCCTGGGACAAAAAGCAT	45.00	185	179-218	56.5
		M10R	21	TGGTCATAAATCCTGCCTCTG	47.62			
M12	CGA	M12F	20	GACGACGACAGTGAGGATGA	55.00	151	237-282	56.5
		M12R	27	TTTTTGATCTGTAGTAGGTCAGAAATTT	29.63			
M13	GTT	M13F	20	GTCGCTTTTCGTCTCCCAAG	55.00	153	151-181	56.5
		M13R	23	TTCTACTGCGTCATGGATAATCA	39.13			
M17	TGT	M17F	22	AATTAGAGGGATCACTGAATGC	40.91	158	75, 170	56.5
		M17R	22	TGGTTAACAGATGGTACCACAA	40.91			

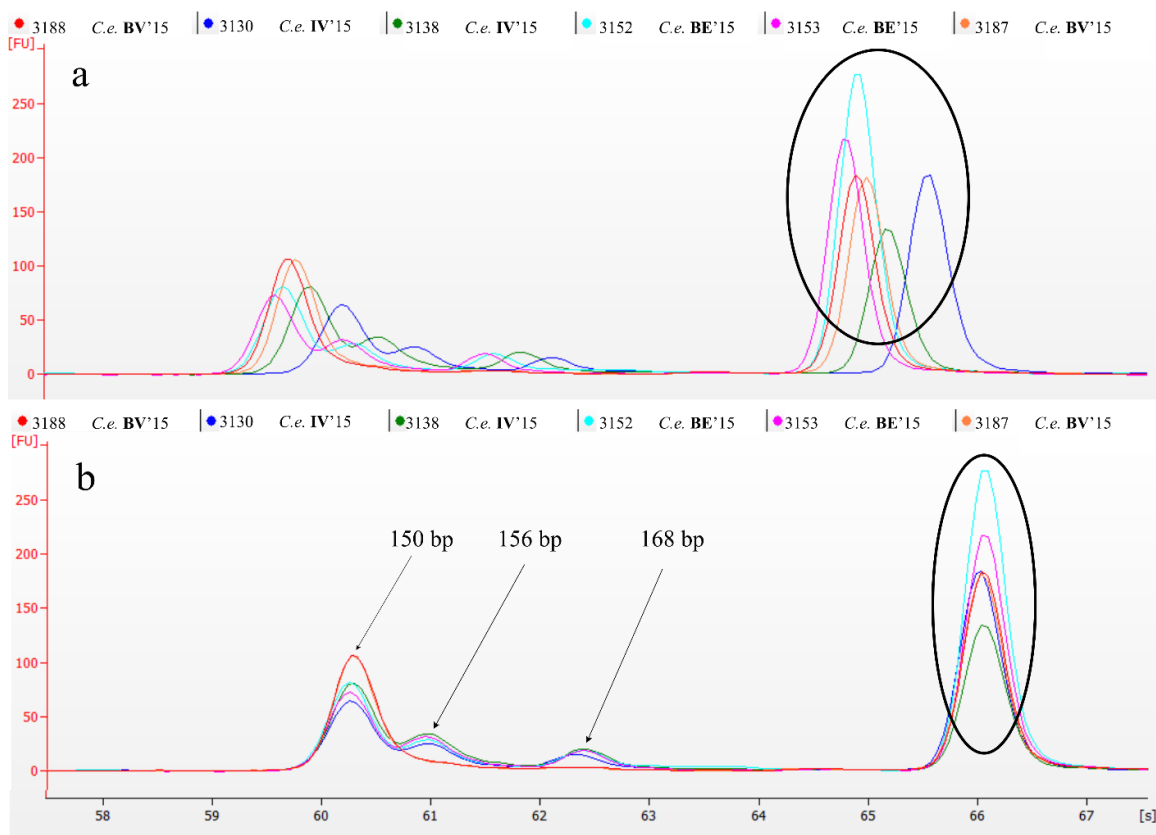
Elektroforetski profili i genetički diverzitet populacija određen pomoću *EST-SSR* molekularnih markera

Deo istraživanja koji se tiče analize genetičkog diverziteta populacija roda *Centaureum* pomoću osam novorazvijenih *EST-SSR* molekularnih markera obuhvatio je ukupno 138 jedinki *C. erythraea*, *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*, poreklom sa 7 lokaliteta i dva uzorka vrste *C. littorale* (*C.l. NA'99*) (Tabela 7). Na slici 17 su prikazani primeri elektroferograma dobijeni kapilarnom elektroforezom na *Agilent DNA 7500 Kit* čipovima.



Slika 17: Primeri *EST-SSR* elektroferograma dobijenih kapilarnom elektroforezom pomoću sistema *Agilent Bioanalyzer*. **a-** uz pomoć prajmera M5; **b-** uz pomoć prajmera M12. Prikazane su jedinke različitih populacija. Strelicama su označeni pikovi amplicona. Šifre lokaliteta su date u Tabeli 1.

Na **Slici 18** su prikazani delovi preklopljenih elektroferograma šest jedinki vrste *C. erythraea* poreklom iz tri različite populacije, dobijeni amplifikacijom lokusa *M13* uz dodati interni standard dužine od 200 bp. Na gornjoj slici (**Slika 18 a**) nije izvršeno poravnavanje profila na osnovu internog standarda dužine (pikovi na desnoj strani grafika), te se ne može jasno uočiti koliko različitih alela lokusa *M13* je prisutno kod jedinki (pikovi na levoj strani grafika). Sa druge strane, na istoj slici u donjem delu (**Slika 18 b**), interni standardi su međusobno poravnati i jasno se uočava poravnanje alelskih pikova i postojanje samo tri različita alela.



Slika 18: Delovi preklopljenih elektroferograma lokusa *M13* (softver *Agilent 2100 Expert*) šest jedinki poreklom iz tri populacije vrste *C. erythraea*. **a-**neporavnati profili **b-** poravnati profili prema internom standardu (200 bp); aleli lokusa *M13* detektovani na 150, 156 i 168 bp.

U prikazanom primeru, sve jedinke poreklom iz populacija **BE**'15 i **IV**'15 imaju po tri alela (150, 156 i 168 bp) dok preostale dve jedinke iz populacije **BV**'15 imaju po jedan alel (150 bp) (**Slika 18 b**).

Dužina amplifikovanih fragmenata u okviru populacionih analiza u potpunosti je odgovarala dužinama fragmenata koje su se dobile u preliminarnim probama *EST-SSR-PCR* produkata i ni u jednom slučaju nije došlo do preklapanja fragmenata poreklom od različitih lokusa kao ni preklapanja fragmenata lokusa sa dodatim internim standardima za dužinu.

Na ovaj način je, ukupno, uz pomoć svih osam *EST-SSR* markera, zabeleženo je 54 alela. Broj alela po lokusu je varirao od 2 u lokusu *M17* do 11 u lokusu *M10*, sa prosečnim brojem od 6,75 alela po lokusu. Veličina amplifikovanih traka se nalazila u opsegu od 75 do 274 bp (**Tabela 15**). Svi lokusi su pokazali variranje u dužini fragmenata, koje je odgovaralo dužini mikrosatelitskog motiva.

Kod vrste *C. littorale* (samo dve jedinke) je uočen privatni alel *M5* lokusa (alel od 118 bp). Populacija *C.l.c.* **AS**'15 takođe poseduje privatni alel (od 115 bp), na lokusu *M5*. Ostali lokusi sa privatnim alelima u populacijama su *M10* (alel od 167 bp kod populacije *C.l.c.* **HA**'15 i alel od 218 bp kod populacije *C.e.* **BV**'15) i *M12* (alel od 259 bp kod populacije *C.pan.* **PA**'15 i alel od 271 bp kod populacije *C.e.* **IV**'15). Četiri privatna alela u okviru vrste *C. erythraea* daju lokusi *M4*, *M7* i *M13*, dok tri privatna alela na nivou podvrste *C. littorale ssp. compressum* pripadaju lokusima *M4*, *M10* i *M13*. Samo jedan privatan alel je uočen kod populacija svrstanih u *C. pannonicum* (alel od 176 bp lokusa *M4*) (**Tabela 15**, **Tabela 16**).

U **Tabeli 15** su prikazane učestalosti alela po mikrosatelitskim lokusima i populacijama. Šest alela (*M5* - 106 bp i 112 bp; *M8* - 122 bp; *M10* - 188 bp; *M13* - 150 bp i *M17* - 75 bp) se pojavljivalo u svim populacijama. Mogu se uočiti aleli koji se javljaju samo u populacijama vrste *C. erythraea* i *C. pannonicum*. Ovakvih alela ima ukupno 16 (po dva alela u okviru lokusa *M4*, *M5* i *M7*, tri alela u okviru lokusa *M8*, *M10* i *M12* i jedan alel u okviru lokusa *M17*). Sa druge strane, mogu se uočiti i 5 alela koji se javljaju samo kod vrsta *C. littorale* i *C. pannonicum*: po jedan alel u okviru lokusa *M7*, *M8* i *M10* i dva alela u okviru lokusa *M12*. Alel od 152 bp (lokus *M4*) i alel od 156 bp (lokus *M13*) se javlja samo u populacijama vrste *C. erythraea* i *C. l. ssp. compressum*.

Za deset populacija je izvršeno sumiranje populaciono-genetičkih parametara (**Tabela 16**). Najveći broj alela po populaciji uočen je kod populacije *C.e. BV*'15: 34 alela tako da je i prosečan broj alela za sve lokuse za ovu populaciju bio najveći i iznosio je 4,25 alela po lokusu. Najmanji broj alela bio prisutan u populaciji *C.l. NA*'99 (15 alela), koja se sastojala od svega dve jedinke. Prosečan broj alela za sve lokuse za ovu populaciju takođe najmanji i iznosio je 1,875 alela po lokusu. Srednja vrednost ukupnog broja alela po populaciji za svih osam lokusa je iznosila 26,10 alela po populaciji.

Uočljivo je da se u populacijama podvrste *C. littorale ssp. compressum* (*C.l.c. MJ*'15, *C.l.c. PA*'15, *C.l.c. HA*'15 i *C.l.c. AS*'15) javlja manji prosečni broj različitih alela u odnosu na populacije vrsta *C. erythraea* (*C.e. IV*'15, *C.e. BE*'15, *C.e. BV*'15) i *C. pannonicum* (*C.pan. PA*'15 i *C.pan. MJ*'15) (**Tabela 16**). U **Tabeli 17** predstavljene su *Fst* vrednosti koje kvantifikuju različitosti između populacija

Očekivane vrednosti heterozigotnosti su se kretale od 0,8614 u populaciji *C.l. NA*'99 do 0,9912 u populaciji *C.pan. MJ*'15 sa prosečnom vrednošću od 0,9070. Uočena heterozigotnost je imala nešto niže vrednosti za sve populacije i kretala se od 0,5 kod populacije *C.l. NA*'99, pa do 0,8125 kod populacije *C.l.c. AS*'15 sa prosečnom vrednošću od 0,6575 (**Tabela 16**).

Tabela 16: Diverzitet populacija dobijen analizom osam mikrosatelitskih lokusa: ukupan, prosečan i efektivni broj alela u populacijama, broj i poreklo uočenih privatnih alela po populacijama i vrstama i vrednosti uočene i očekivane heterozigotnosti populacija.

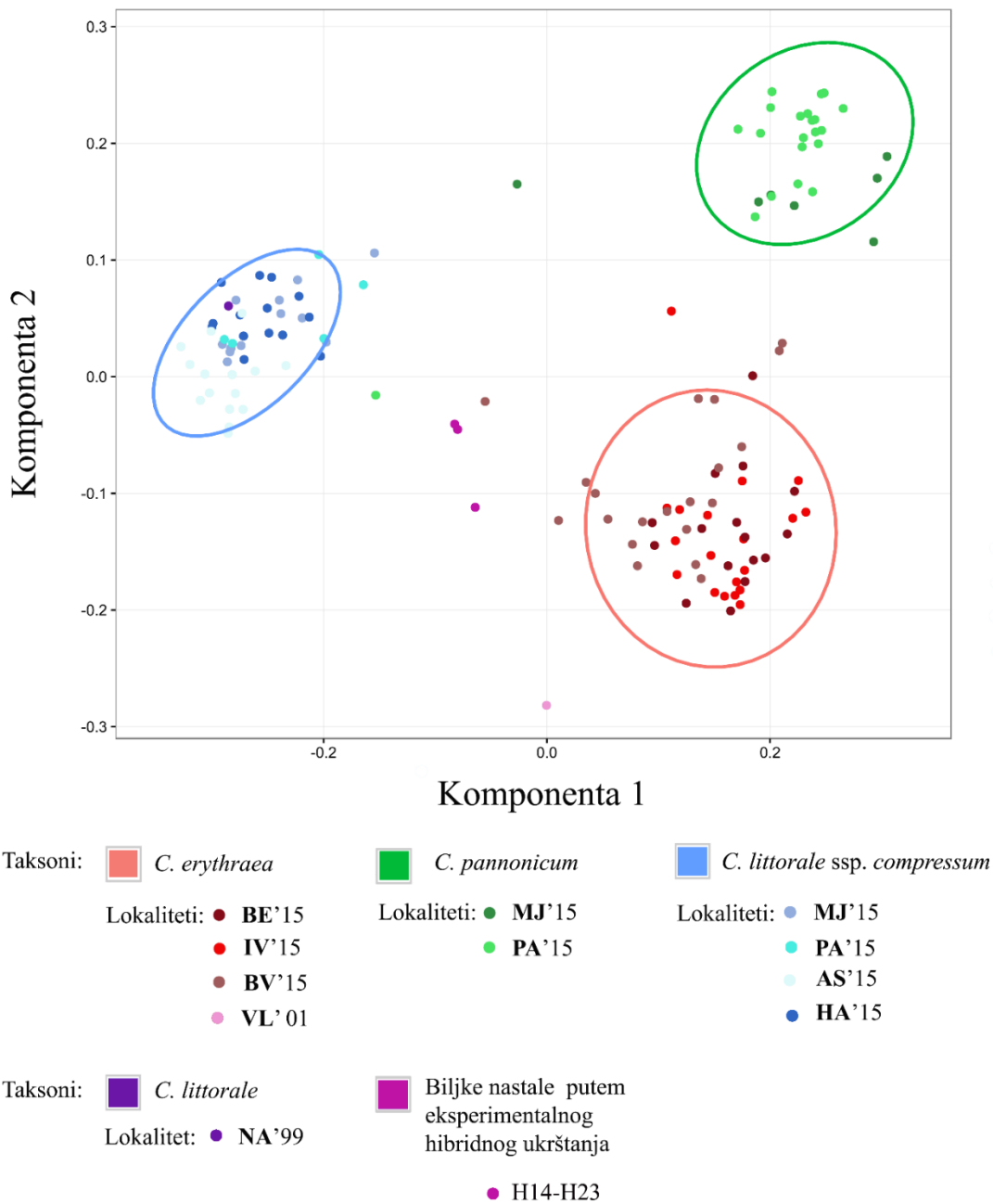
Populacije	Broj jedinki po populaciji	Ukupan broj alela u populaciji (svih 8 lokusa)	Prosečan broj alela za sve lokuse	Efektivni broj alela u populaciji (na osnovu očekivane H_o)	Privatni aleli za populacije	Privatni aleli za vrste	Prosečna očekivana heterozigotnost populacija (H_e)	Prosečna uočena heterozigotnost populacija (H_o)
<i>C.e. IV</i> '15	19	31	3.8750	1.1326	1 (M12)	2 (M4); 1 (M7); 1 (M13)	0.8829	0.5658
<i>C.e. BE</i> '15	17	29	3.6250	1.1400			0.8772	0.5588
<i>C.e. BV</i> '15	20	34	4.2500	1.1198	1 (M10)		0.8930	0.5938
<i>C.pan. MJ</i> '15	8	31	3.8750	1.0089		1 (M4)	0.9912	0.7969
<i>C.pan. PA</i> '15	23	33	4.1250	1.0114	1 (M12)		0.9888	0.7337
<i>C.l.c. MJ</i> '15	13	20	2.5000	1.1303		1 (M4); 1 (M10); 1 (M13)	0.8847	0.6635
<i>C.l.c. PA</i> '15	5	20	2.5000	1.1482			0.8709	0.5750
<i>C.l.c. HA</i> '15	15	24	3.0000	1.0995	1 (M10)		0.9095	0.7750
<i>C.l.c. AS</i> '15	18	24	3.0000	1.0982	1 (M5)		0.9105	0.8125
<i>C.l. NA</i> '99	2	15	1.8750	1.1608	1 (M5)		0.8614	0.5000
ukupno/ prosečno	$\Sigma=140$	sr. vrednost: 26.10	sr. vrednost: 3.2625	sr. vrednost: 1.1193	$\Sigma=6$	$\Sigma=8$	sr. vrednost: 0.9070	sr. vrednost: 0.6575

Tabela 17: Genetička diferencijacija populacija na osnovu *Fst* vrednosti. Različitim bojama predstavljene su paletom boja, od zelene preko žute do crvene predstavljen je raspon *Fst* vrednosti od najniže do najviše.

Populacije	<i>C.e.</i> IV'15	<i>C.e.</i> BE'15	<i>C.e.</i> BV'15	<i>C.pan.</i> MJ'15	<i>C.pan.</i> PA'15	<i>C.l.c.</i> MJ'15	<i>C.l.c.</i> PA'15	<i>C.l.c.</i> HA'15	<i>C.l.c.</i> AS'15
<i>C.e.</i> BE'15	0.0092								
<i>C.e.</i> BV'15	0.0351	0.0394							
<i>C.pan.</i> MJ'15	0.0611	0.0666	0.0472						
<i>C.pan.</i> PA'15	0.0784	0.0829	0.0804	0.0221					
<i>C.l.c.</i> MJ'15	0.1535	0.1599	0.1260	0.1192	0.1105				
<i>C.l.c.</i> PA'15	0.1077	0.1179	0.0838	0.1103	0.0692	0.0039			
<i>C.l.c.</i> HA'15	0.1400	0.1473	0.1172	0.1069	0.1083	0.0181	0.0147		
<i>C.l.c.</i> AS'15	0.1471	0.1538	0.1257	0.1146	0.1275	0.0228	0.0226	0.0109	
<i>C.l.</i> NA'99	0.0753	0.0838	0.0558	0.0987	0.0489	0.0289	0.0514	0.0268	0.0256

PCoA analiza EST-SSR podataka

Na **Slici 19** prikazani su rezultati *PCoA* analize koja je urađena na osnovu matrica *Bruvo* genetičkih distanci između 149 jedinki (**Tabela 7**). Uočljivo je jasno grupisanje jedinki u tri osnovne grupe. Prvi grupu sačinjavaju jedinke vrste *C. erythraea* među kojima se ne uočava posebno grupisanje jedinki poreklom sa različitih lokaliteta. U okviru drugog skupa nalaze se jedinke *C. littorale* ssp. *compressum* i dve jedinke vrste *C. littorale*. Treću grupu, takođe jasno izdvojenu čine jedinke svrstane u *C. pannonicum*. Od ukupno 31 jedinke svrstane u takson *C. pannonicum*, jedna jedinka poreklom sa lokaliteta Palić se izdvaja i nalazi se između grupa vrsta *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*, nešto bliže drugom taksonu. Druga jedinka, okarakterisana kao *C. pannonicum* sa lokaliteta Majdan takođe se unekoliko izdvaja.

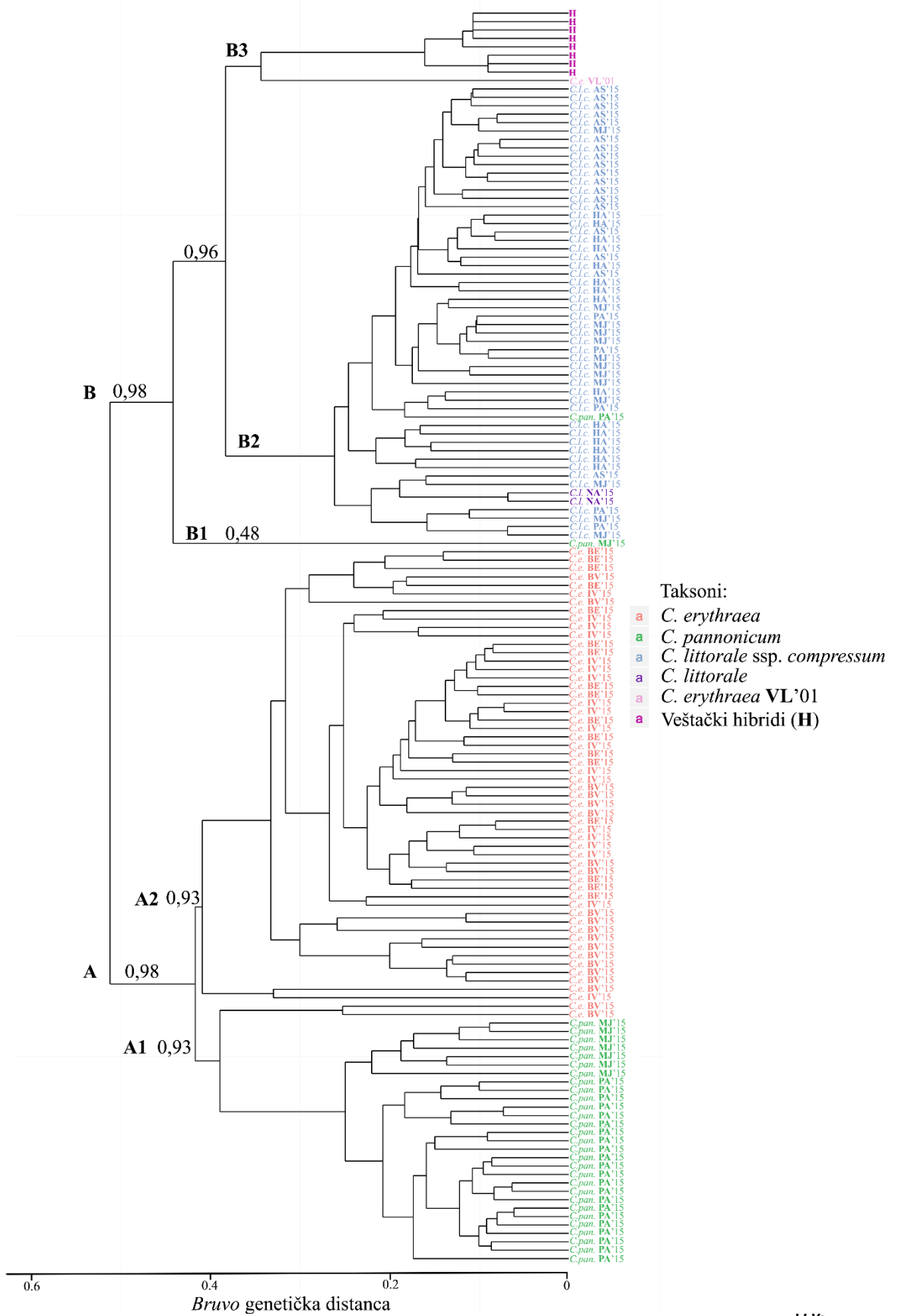


Slika 19: PCoA dijagram dobijen na osnovu *Bruvo* distanci izračunatih iz podataka dobijenih uz pomoć 8 *EST-SSR* molekularnih markera. Prve dve dimenzije opisuju 25% ukupne varijabilnosti. Elipse predstavljaju intervale pouzdanosti od 95% za projekcije uzoraka u dve prikazane komponente i uokvirene su jedinice vrste *C. erythraea* (crvene nijanse boja), jedinice *C. pannonicum* (zelene nijanse) i jedinice podvrste *C. littorale ssp. compressum* (plave nijanse).

Na slici se može uočiti i položaj koji zauzimaju jedinke koje su upotrebljene u eksperimentalnim hibridnim ukrštanjima, majčinske (*C.l. NA'99*) i očinska biljka (*C.e. VL'01*), kao i hibridne biljke nastale ovim ukrštanjem (H14-H16 i H18-H23; **Tabela 3**). Osam hibridnih biljaka *F1* generacije eksperimentalnih ukrštanja dale su rezultate koji se skoro potpuno preklapaju tako da su vidljive samo tri tačke na grafiku koje se nalaze između tačaka koje prikazuju roditeljske biljke.

Hijerarhijska analiza *EST-SSR* podataka

Hijerarhijska klaster analiza je takođe urađena na osnovu *Bruvo* genetičkih distanci izračunatih između 149 jedinki (**Tabela 7; Slika 20**). Prvo odvajanje fenograma uočava se pri vrednosti *Bruvo* genetičkih distanci od 0,52 pri čemu se odvajaju dva glavna klastera: klaster **A** i klaster **B**. Klaster **A** je podržan butstrep vrednošću 0,98 i sačinjavaju ga jedinke vrste *C. erythraea* (sem jedinke ove vrste poreklom sa Vlasine) i 29 od 31 biljke svrstane u *C. pannonicum*. U okviru ovog klastera mogu se uočiti dva potklastera (**A1** i **A2**), koji su takođe podržani visokim butstrep vrednostima (ista za oba potklastera i iznosi 0,93). Klasteri **A1** i **A2** se odvajaju pri vrednosti *Bruvo* genetičkih distanci od 0,42. Potklaster **A1** sačinjava 29 jedinki iz obe populacije taksona *C. pannonicum*. Njima su pridružene i dve jedinke vrste *C. erythraea* poreklom sa lokaliteta Bački Vinogradi. Potklaster **A2** sačinjavaju isključivo jedinke vrste *C. erythraea* sa lokaliteta Iriški venac, Beočin i ostale jedinke sa lokaliteta Bački Vinogradi. Potklaster **B** se odvoja pri vrednosti *Bruvo* genetičkih distanci od 0,45, podržan je sa butstrep vrednošću od 0,98 i u okviru njega mogu se uočiti tri potklastera (**B1**, **B2** i **B3**). Potklaster **B1** sadrži samo jednu jedinku *C. pannonicum* poreklom sa lokaliteta Majdan i podržan je relativno niskom butstrep podrškom od 0,48. Potklaster **B2** (odvoja se pri vrednosti *Bruvo* genetičkih distanci od 0,38) obuhvata sve jedinke podvrste *C. littorale* ssp. *compressum*, dve jedinke vrste *C. littorale* i jednu jedinku *C. pannonicum* sa lokaliteta Palić. Potklaster **B3** se odvajaju pri vrednosti *Bruvo* genetičkih distanci od 0,35 i objedinio je jedinku *C. erythraea* poreklom sa Vlasine, koja je korišćena kao donor polena u hibridnim ukrštanjima, i svih osam hibridnih biljka.



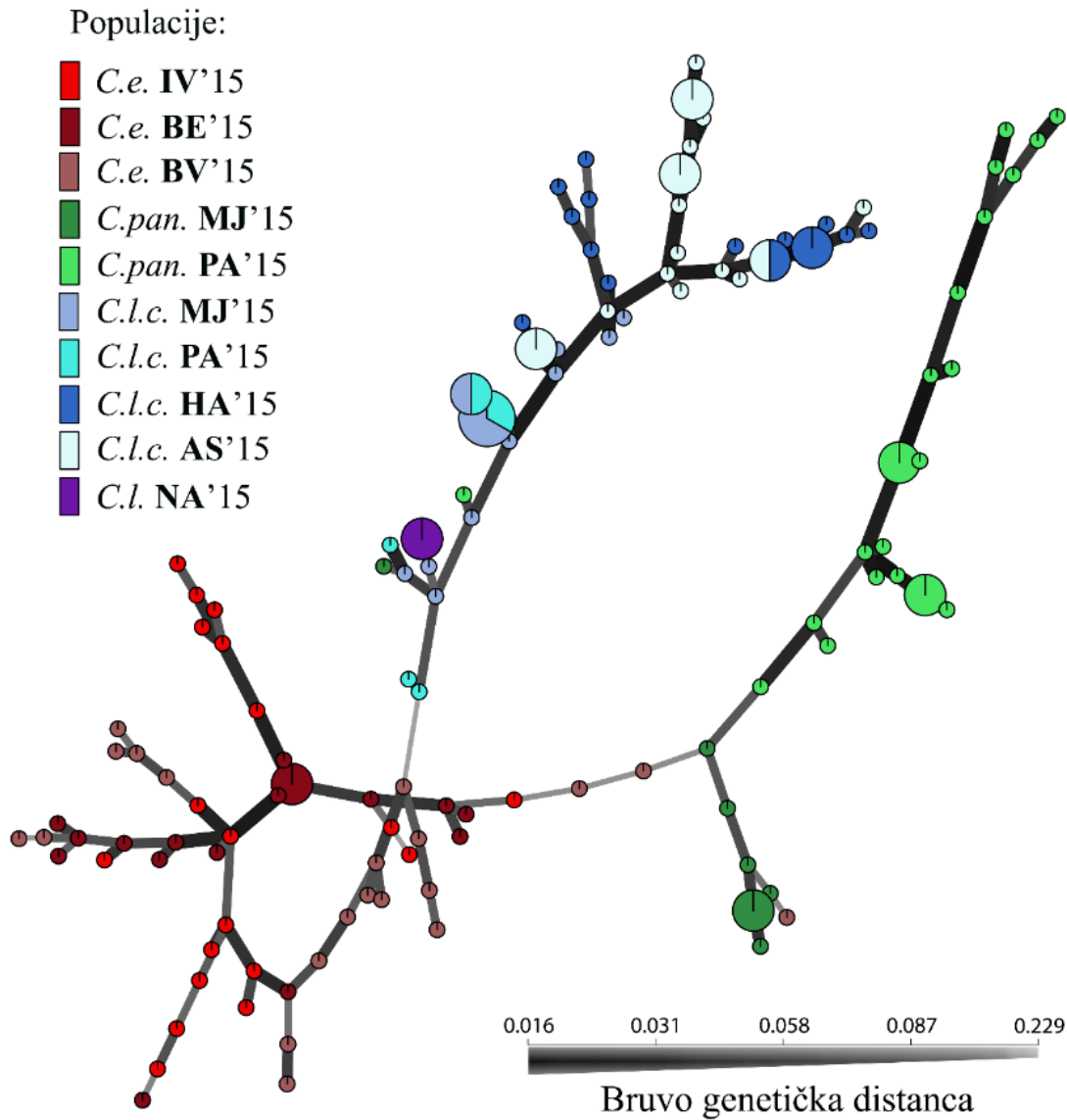
Slika 20: Grafički prikaz hijerarhijske klaster analize *UPGMA* metodom iz *Bruvo* genetičkih distanci dobijenih na osnovu učestalosti alela mikrosatelitskih lokusa. Brojevi uz odgovarajuće klastere predstavljaju butstrep vrednosti. Za kodove populacija pogledati Tabelu 1.

Jedino grupisanje jedinki po populacijama (a u ovom slučaju to grupisanje prati i pripadnost lokalitetima) koje se uočava na predstavljenom fenogramu je grupisanje u okviru potklastera **A1**, gde se mogu uočiti jedinke *C. pannonicum* poreklom sa lokaliteta **MJ** i, zasebno grupisane, jedinke *C. pannonicum* sa lokaliteta **PA**.

Analiza multilokusnih fenotipova

Pod multilokusnim alelski fenotipom se podrazumeva jedinstveni skup alela određene jedinke dobijeni na osnovu dva ili više lokusa, a u slučaju ove analize svih osam lokusa. Na osnovu multilokusnih fenotipova jedinki uključenih u analizu izračunate su *Bruvo* distance i konstruisana je mreža minimalnog raspona (**Slika 21**).

Broj različitih multilokusnih genotipova u različitim populacijama prikazan je u **Tabeli 18**. Od ukupno analiziranih 140 jedinki, zapaženo je 127 različitih multilokusnih genotipova. Identični multilokusni genotipovi se uočavaju u okviru populacija (*C.e.* **BE**'15, *C.pan.* **MJ**'15, *C.pan.* **PA**'15, *C.l.c.* **HA**'15, *C.l.c.* **AS**'15 i *C.l.* **NA**'15). Jedan multilokusni genotip dele po jedna jedinka populacije *C.l.c.* **HA**'15 i *C.l.c.* **AS**'15 i, takođe, jedan multilokusni genotip dele po jedna jedinka populacije *C.l.c.* **MJ**'15 i *C.l.c.* **PA**'15. Postoji samo jedan multilokusni genotip koji dele tri jedinke: dve jedinke populacije *C.l.c.* **MJ**'15 i jedna jedinka populacije *C.l.c.* **PA**'15 (**Slika 21**).



Slika 21: Mreža minimalnog raspona multilokusnih fenotipova. Svaki krug na slici predstavlja jedinstveni multilokusni fenotip, a veličina kruga je relativna u odnosu na broj jedinki koje su zastupljene za dati fenotip. Boje krugova predstavljaju pripadnost populacijama svakog multilokusnog fenotipa. Boja i širina linija koje povezuju multilokusne fenotipove je proporcionalna *Bruvo* distancama (prikazana skala). Za kodove populacija pogledati **Tabelu 1**.

Tabela 18: Uočeni multilokusni genotipovi u populacijama. Za kodove populacija pogledati **Tabelu 1.**

Populacija	Broj jedinki u populaciji	Broj uočenih multilokusnih genotipova u populaciji
<i>C.e.</i> IV '15	19	19
<i>C.e.</i> BE '15	17	16
<i>C.e.</i> BV '15	20	20
<i>C.pan.</i> MJ '15	8	7
<i>C.pan.</i> PA '15	23	21
<i>C.l.c.</i> MJ '15	13	12
<i>C.l.c.</i> PA '15	5	5
<i>C.l.c.</i> HA '15	15	14
<i>C.l.c.</i> AS '15	18	15
<i>C.l.</i> NA '99	2	1

Analiza sadržaja sekundarnih metabolita

Dvadeset jedinjenja, uključujući 17 fenolnih jedinjenja i tri sekoiridoidna glukozida (monoterpenoidi), je kvantifikovano u metanolnim ekstraktima *Centaurium erythraea*, *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum*, korišćenjem *QQQ MS* uređaja (**Tabela 19**). Razvijena je i validovana jednostavna i brza *UHPLC/(±)HESI-MS/MS* metoda za rutinsku identifikaciju i kvantifikaciju 20 odabranih jedinjenja u uzorcima, koja je omogućila efikasno prikupljanje podataka i njihovu dalju obradu. *UHPLC/(±)HESI-MS/MS* podaci analiziranih jedinjenja, uključujući retenciona vremena (t_R), kao i fragmentacione profile dobijene u *PS* (eng.: *Product Scan*) eksperimentu, predstavljeni su u **Tabeli 19**.

Tabela 19: Fenolna jedinjenja i sekoiridoidni glukozidi kvantifikovani u metanolnim ekstraktima *Centaurium erythraea*, *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum*, UHPLC/(±)MS/MS analizom. Predstavljena su retenciona vremena (t_R), mase roditeljskih jona u negativnom ili pozitivnom modu [m/z], kao i mase MS^2 fragmenata [m/z] u uslovima specifičnih kolizionih energija (eV).

(±)HESI-MS data					
FENOLNA JEDINJENJA					
Hidroksicinaminske kiseline					
Br.	Naziv	t_R [min]	[M-H] ⁻ [m/z]	MS^2 fragmenti [m/z] (Intenzitet pika)	cE [eV]
1	Hininska kiselina ¹	0,49	191	191 (40); 171 (<5); 127 (5); 93 (100); 85 (95); 69 (10)	30
2	Kafeinska kiselina ¹	2.47	179	135 (100); 134 (85); 117 (15); 89 (10); 63 (5)	30
3	<i>p</i> -Kumarna kiselina ¹	3.32	163	119 (100); 117 (20); 104 (5); 93 (50); 91 (8)	30
4	Ferulinska kiselina ¹	3.7	193	178 (<5); 134 (50); 133 (100); 129 (<5)	30
5	Sinapinska kiselina ¹	3.72	223	207 (5); 193 (75); 165 (30); 149 (40); 121 (100); 93 (80)	30
Flavoni					
6	Luteolin ¹	5.31	285	241 (5); 199 (10); 151 (15); 133 (100); 107 (8)	30
7	Apigenin ¹	5.76	269	225 (5); 159 (<5); 151 (20); 149 (10); 117 (100); 107 (20)	30
Flavonoli					
8	Rutin ¹	3.88	609	301 (20); 300 (100); 255 (15); 226 (<5)	30
9	Izokvercitrin ¹	4.11	463	300 (100); 255 (30); 243 (<5)	30
10	Astragalin ¹	4.41	447	300 (40); 284 (100); 255 (80); 227 (45); 151 (<5)	30
11	Kvercetin ¹	5.38	301	243 (10); 217 (15); 179 (<5); 161 (45); 151 (100); 107 (90)	30
12	Kempferl ¹	5.92	85	239 (10); 227 (10); 211 (<5); 157 (10); 93 (8)	30

Flavanoni					
13	Naringenin ¹	5.83	271	228 (<5); 184 (5); 151 (15); 119 (100); 107 (30)	30
Ksantoni					
Br.	Naziv	<i>t_R</i> [min]	[M-H] ⁻ [m/z]	MS ² fragmenti [m/z] (Intenzitet pika)	cE [eV]
14	Dekuzatin ¹	8.06	303	288 (25); 270 (100); 245 (80); 241 (25); 213 (5); 202 (<5); 149 (<5)	30
15	Eustomin ¹	8.49	363	347 (<5); 333 (100); 305 (5); 261 (<5)	30
16	Metilbelidifolin ¹	9.07	289	274 (40); 245 (100); 217 (<5); 199 (<5)	30
17	Demetileustomin ¹	9.32	349	319 (100); 301 (15); 291 (5); 276 (<5); 218 (<5)	30
MONOTERPENOIDI					
Sekoiridoidi					
Br.	Naziv	<i>t_R</i> [min]	[M-H] ⁻ [m/z]	MS ² fragmenti [m/z] (Intenzitet pika)	cE [eV]
18	Svercijamarin ¹	2.71	433	355 (5); 217 (25); 179 (100); 161 (8); 149 (15); 131 (50)	20
19	Genciopikrin ¹	2.96	415	193 (20); 179 (100); 119 (65)	20
20	Sverozid ¹	3.09	417	205 (20); 195 (100); 177 (50); 161 (10); 125 (75)	20

¹ Potvrđeno pomoću standarda

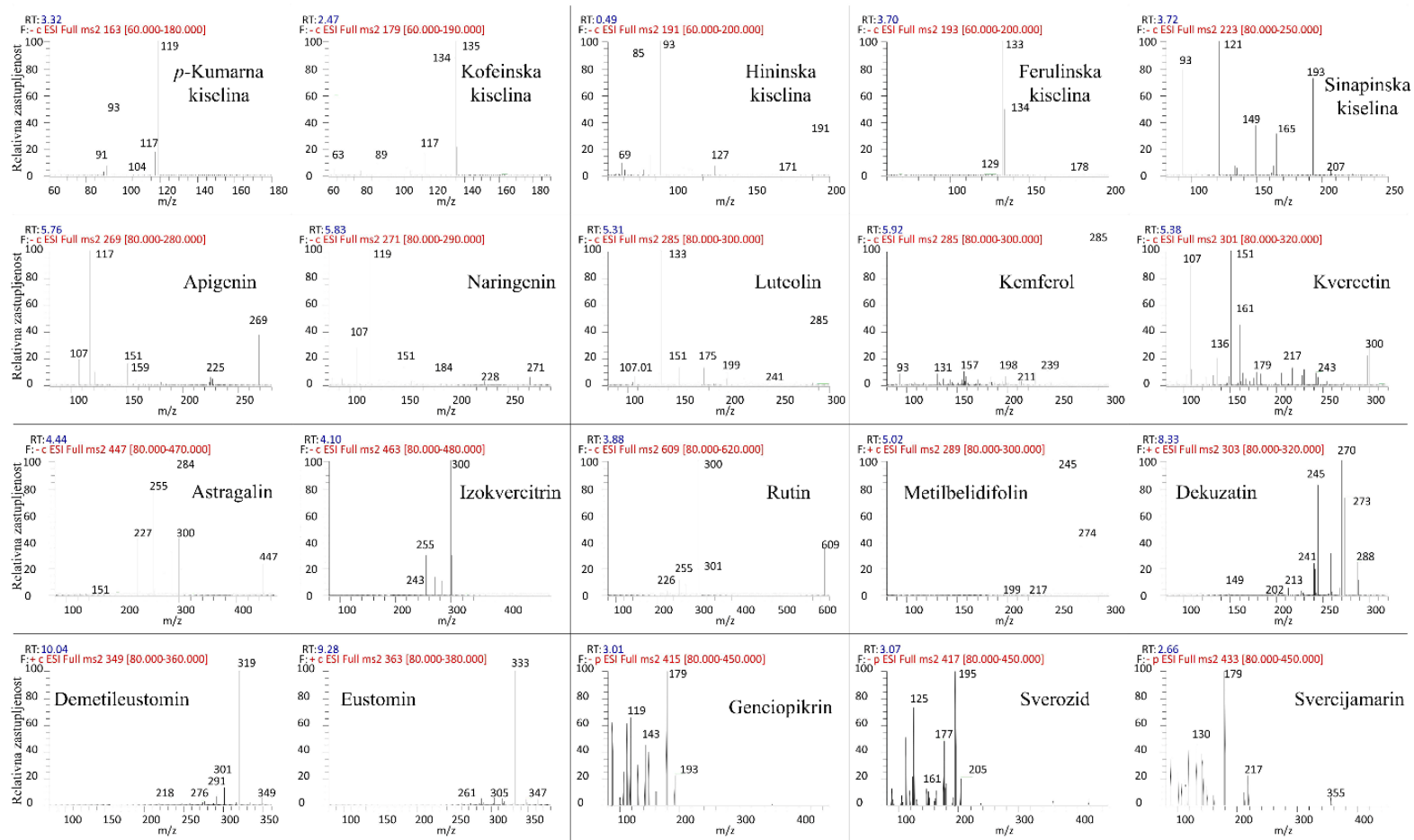
MS² fragmenti obojeni crvenom bojom su korišćeni kao referentni u SRM eksperimentu.

UHPLC/(-)HESI-MS/MS analiza je potvrdila prisustvo fenolnih jedinjenja iz grupe hidroksicinamičnih kiselina, kao što su kafeinska kiselina ([M-H]⁻ m/z 179), *p*-kumarna ([M-H]⁻ m/z 163), ferulinska ([M-H]⁻ m/z 193) i sinapinska kiselina ([M-H]⁻ m/z 223). Zastupljeni su flavonoidi iz grupa flavona, flavonola i flavanona, kao i ksantoni. Flavoni luteolin i apigenin pokazuju [M-H]⁻ m/z od 285, odnosno 269. Sve tri ispitivane vrste poseduju flavonol kvercetin ([M-H]⁻ m/z 301) i njegove glikozide, rutin (kvercetin-rutinosid) sa molekularnim jonom [M-H]⁻ m/z 609, izokvercitrin (kvercetin-3-O-glukozid), koji pokazuje ([M-H]⁻ m/z 463. Flavonoli kempferol ([M-H]⁻ m/z 285) i njegov glukozid

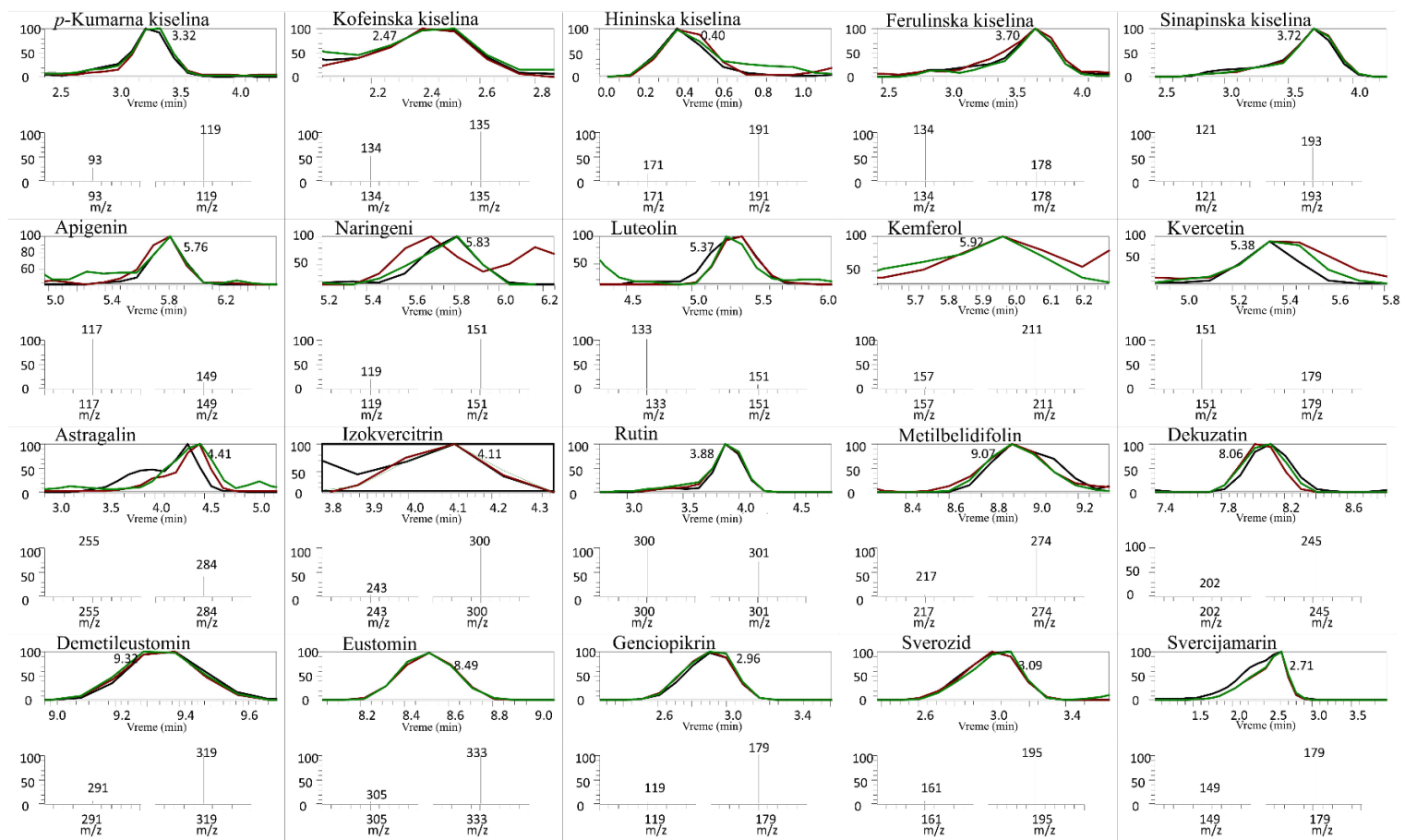
astagalin (kempferol-3-O-glukozid), koji ima $[M-H]^-$ m/z 447, su takođe prisutni u značajnim količinama u analiziranim vrstama. Naringenin ($[M-H]^-$ m/z 271) je jedino jedinjenje iz grupe flavanona koje je identifikovano i kvantifikovano kod *C. erythraea*, *C. pannonicum* i *C. littorale*. Ksantoni predstavljaju najzastupljeniju grupu fenolnih jedinjenja kod analiziranih vrsta roda *Centaureum* i oni su identifikovani UHPLC/(+)HESI-MS/MS analizom, to jest u pozitivnom modalitetu MS uređaja. Zastupljeni su tetrasupstituisani ksantoni - dekuzin ($[M+H]^+$ m/z 303) i metilbelidifolin ($[M+H]^+$ m/z 289), kao i heksasupstituisani ksantoni - eustomin ($[M+H]^+$ m/z 363) i demetileustomin ($[M+H]^+$ m/z 271).

UHPLC/(-)HESI-MS/MS analiza je takođe potvrdila prisustvo monoterpenoida iz grupe iridoidnih glikozida - sekoiridoida, koji su identifikovani kao adukti sa sirćetnom kiselinom (CH_3COOH), koja je korišćena kao mobilna faza prilikom analiza. Svercijamarin, koji pokazuje $[M-H+CH_3COOH]^-$ m/z 433, genciopikrin sa $[M-H+CH_3COOH]^-$ m/z 415, i sverozid sa $[M-H+CH_3COOH]^-$ m/z 433), su identifikovani kao dominantna jedinjenja u metanolnim ekstraktima analiziranih kičica.

Na osnovu fragmentacionih profila analiziranih jedinjenja (**Slika 22**) dobijenih u PIS (eng.: *Product Ion Scanning*) eksperimentu, izvršena je selekcija dominantnih fragmenata, koji su korišćeni kao referentni u SRM (eng.: *Single Reaction Monitoring*) eksperimentima za kvantifikaciju. SRM hromatogrami i odgovarajući MS/MS spektri su predstavljeni na **Slici 23**.



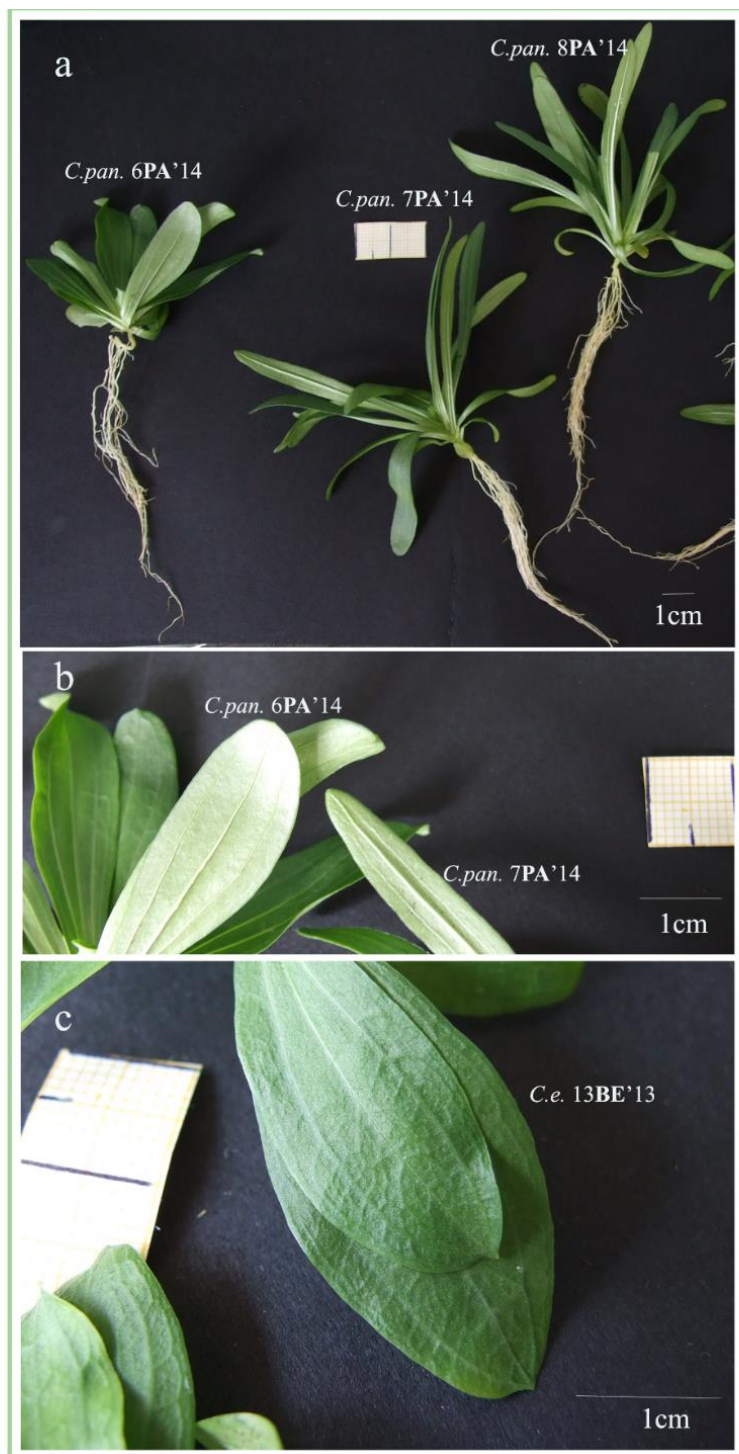
Slika 22: MS/MS spektri standarda *p*-kumarne, kafeinske, hininske, ferulinske i sinapinske kiseline, apigenina, naringenina, luteolina, kempferola, kvercetina, astragalina, izokvercitrina, rutina, metilbelidifolina, dekuzatina, demetileustomina, eustomina, genciopikrina, sverozida i svercijamarina



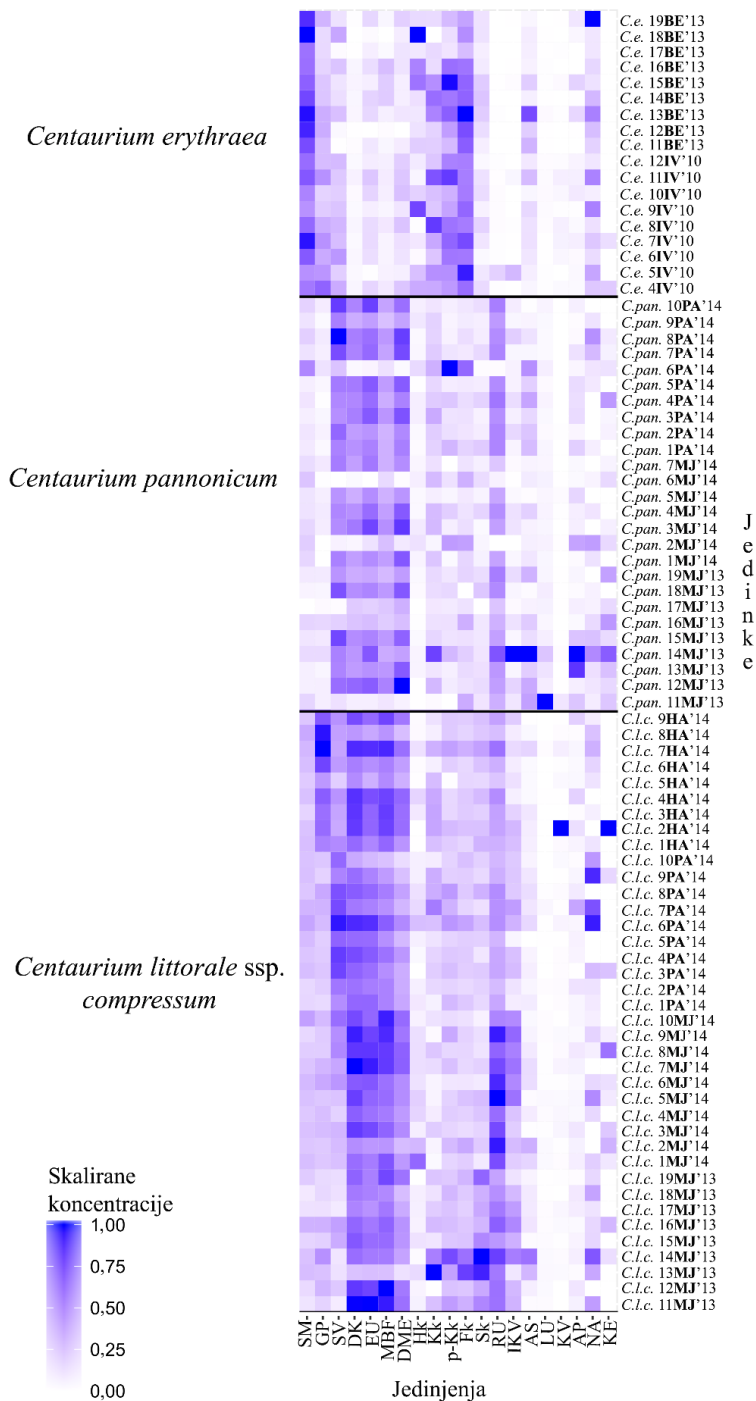
Slika 23: SRM (eng.: Single Reaction Monitoring) hromatogrami i odgovarajući MS/MS spektri analiziranih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *Centaurium erythraea* (crna linija), *C. pannonicum* (crvena linija) i *C. littorale* ssp. *compressum* (zeleno linija).

Od ukupno 85 analiziranih jedinki, u analize 20 odabranih sekundarnih metabolita uvršćeni su rezultati za 82 jedinke, od kojih su 18 jedinki vrste *C. erythraea*, 26 jedinki okarakterisanih kao *C. pannonicum* i 38 jedinki *C. littorale* ssp. *compressum*. Iz inicijalnog seta rezultata izbačeni su rezultati za tri jedinke (po jedna jedinka iz populacija: *C. pannonicum* **MJ**'13, *C. littorale* ssp. *compressum* **HA**'14 i *C. erythraea* **IV**'10). Rezultati ovih uzoraka su više desetine puta premašivali koncentracije ispitivanih jedinjenja u odnosu na ostale jedinke istih populacija, te je zaključeno da je došlo do tehničke greške u pripremi uzoraka ili tokom kvantifikacije. i zbog toga su izuzeti iz analiza. Sa druge strane, uzorak br.6 iz populacije *C. pannonicum* Palić (2014.godine) (*C.pan.6* **PA**'14) je, kako će se pokazati, po svim parametrima pokazao pripadnost populacijama vrste *C. erythraea*. Naknadnim pregledom fotografija uslikanih tokom eksperimenta, izdvojena je fotografija sporne jedinke na kojoj se jasno vidi da morfološki podseća na jedinke vrste *C. erythraea* (**Slika 24**). Ova jedinka je zadržana u setu uzoraka.

Na **Slici 25** su predstavljene koncentracije 20 jedinjenja kod 82 jedinke. Zbog velikih razlika u koncentracijama različitih jedinjenja, koncentracije svakog jedinjenja su skalirane (usklađene, usaglašene) na (opseg) vrednosti između 0 i 1 da bi se omogućio ovakav pregled. Koncentracije ispitivanih sekoiridoida i ksantona su u ekstraktima izražene u mg g⁻¹ suve mase dok se ostala jedinjenja javljaju u koncentracijama µg g⁻¹ suve mase.



Slika 24: a- Izgled biljke *C.pan.6 PA'14* koja se jasno razlikuje od ostale dve prikazane biljke iste populacije (*C.pan. 7PA'14* i *C.pan. 8PA'14*); b- detalj listova biljaka *C.pan. 6PA'14* *C.pan. 7PA'14*; c- detalj listova biljke vrste *C. erythraea* (*C.e. 13BE'13*).



Slika 25: Mapa raspodele skaliranih (od 0 do 1) koncentracija 20 analiziranih jedinjenja, kod 82 jedinjeke vrsta roda *Centaurium*. **Slika** raspodele je podeljena horizontalnim linijama na delove u kojima su predstavljene rezultati različitih taksona od interesa. Skraćenice jedinjenja: sverozid -SV; genciopikrin - GP; svercijamarin - SM; hininska kiselina-Hk; kafeinska kiselina-Kk; *p*-kumarna kiselina-*p*-Kk; ferulinska kiselina-Fk; sinapinska kiselina- Sk; luteolin-LU; apigenin-AP; naringenin-NA; izokvercitrin-V; astragalina-AS; kvercetin-KV; kempferol-KE; rutin-RU; dekuzatin-DK; metilbelidifolin-MBF; eustomin-EU; demetileustomin- DME.

Kvantitativni podaci ukazuju na to da su sekoiridoidni glukozidi daleko najzastupljenija grupa jedinjenja u metanolnim ekstraktima analiziranih vrsta kičica, pri čemu je svercijamarin dominantno jedinjenje kod sve tri analizirane vrste. *C. erythraea* poseduje daleko veću količinu ovog sekoiridoida (139 mg g⁻¹ suve mase) od *C. littorale* (54 mg g⁻¹ suve mase) i *C. pannonicum* (38 mg g⁻¹ suve mase). *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* imaju veći sadržaj genciopikrina od *C. pannonicum*, dok značajne razlike između vrsta u pogledu sadržaja sverozida nisu uočene.

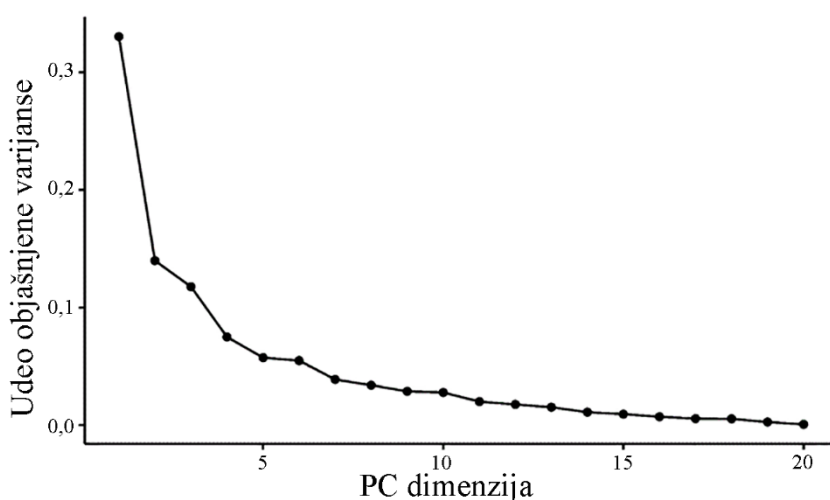
Ksantoni predstavljaju dominantnu grupu fenolnih jedinjenja kod analiziranih vrsta roda *Centaurium*, pri čemu su najzastupljeniji metilbelidifolin (0,5 - 3,7 mg g⁻¹ suve mase) i demetileustomin (0,4 - 0,9 mg g⁻¹ suve mase). *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum* se odlikuju većim sadržajem ksantona u poređenju sa *C. erythraea*.

Hininska kiselina i hidroksicinamične kiseline (kafeinska, *p*-kumarna, ferulinska i sinapinska kiselina) su prisutne u uzorcima u većoj količini nego flavonoidi. Među fenolnim kiselinama, dominantno jedinjenje je ferulinska kiselina (6 - 24 µg g⁻¹ suve mase), koja je praćena *p*-kumarnom kiselinom (6 - 13 µg g⁻¹ suve mase). *C. erythraea* poseduje veću količinu ovih jedinjenja nego druge dve analizirane vrste kičice. Rutin je dominantan flavonoid kod sve tri vrste, a naročito je zastupljen kod *C. littorale* ssp. *compressum* (~30 µg g⁻¹ suve mase) i *C. pannonicum* (~27 µg g⁻¹ suve mase).

Podaci dobijeni analizom koncentracija 20 odabranih jedinjenja, u odnosu na ispitivani primer hibridnih i roditeljskih taksona, pokazale su rezultate koji podržavaju kombinacije: 1) sedam jedinjenja (sverozid, demetileustomin, kafeinska kiselina, sinapinska kiselina, naringenin, kempferol, rutini) su pokazali koncentracije kod *C. pannonicum* slične kao kod oba, ili jednog od roditeljskih taksona; 2) četiri jedinjenja (izokvercitrin, dekuzatin, eustomin i metilbelidifolin) su pokazali intermedijarne koncentracije kod hibridnih biljaka u odnosu na roditeljske; 3) tri jedinjenja (astragalina, luteolin, apigenin) su detektovana u višim koncentracijama kod hibrida nego kod bilo kog od roditeljskih taksona; i 4) šest jedinjenja (svercijamarin, genciopikrin, hininska kiselina, *p*-kumarna kiselina, ferulinska kiselina, kvercetin) je kod hibrida pokazalo niže koncentracije nego kod bilo kog od roditeljskih taksona.

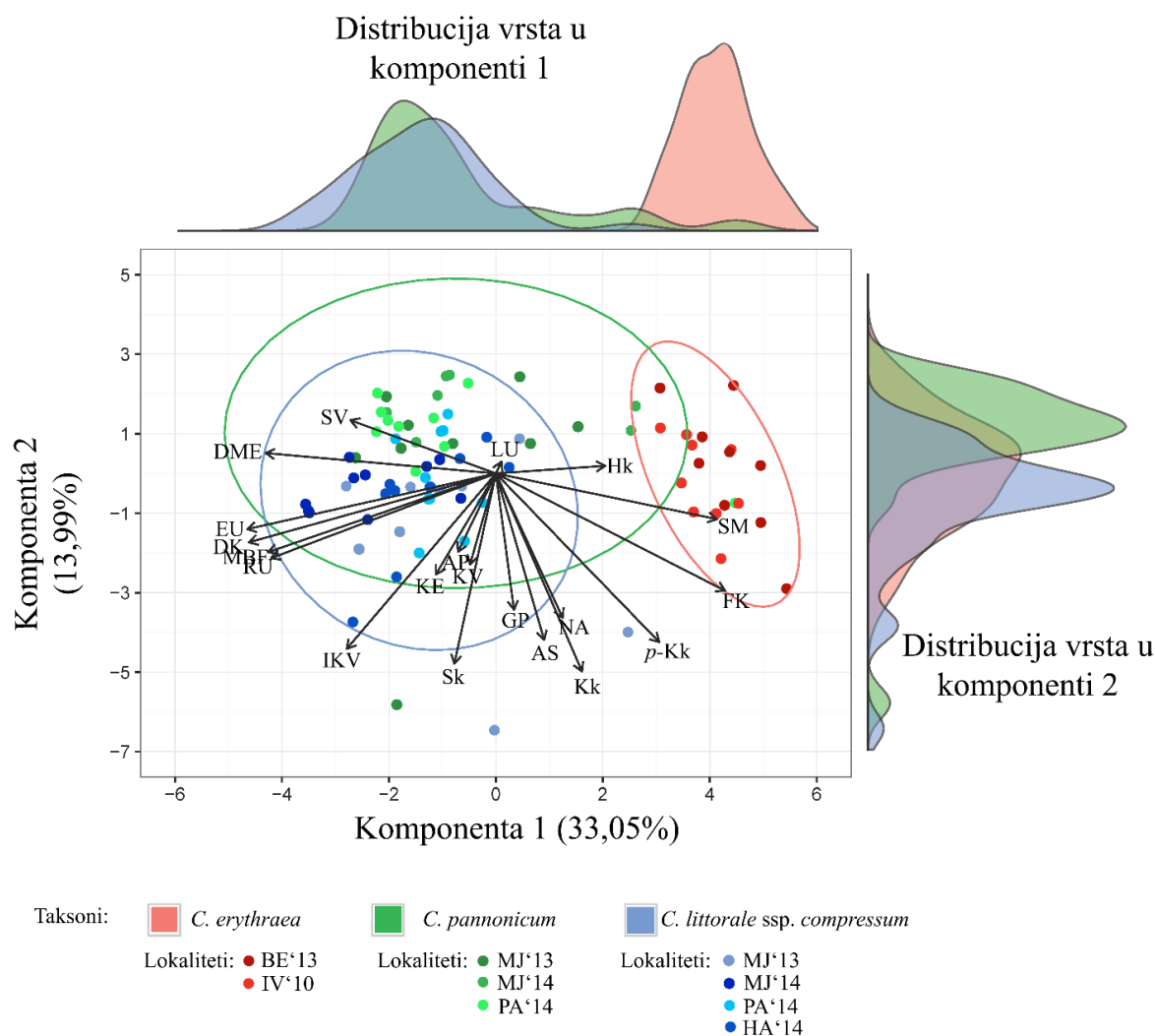
Analiza osnovnih komponenti (PCA)

PCA analiza na datom setu podataka je pokazala da nije moguće objasniti zadovoljavajući deo varijanse u uzorcima malim brojem ortogonalnih osnovnih komponenti. Na **Slici 26** predstavljen je udeo varijanse koju objašnjava svaka od 20 osnovnih komponenti analize. Daljim razmatranjima udela prvih šest dimenzija u objašnjavanju ukupne varijanse dolazi se do podatka da prvih šest dimenzija ukupno objašnjavaju 77,5% varijanse. Ujedno, tih prvih šest dimenzija treba zadržati prema Kajzerovom kriterijumu ($\text{eigenvalue} > 1$).

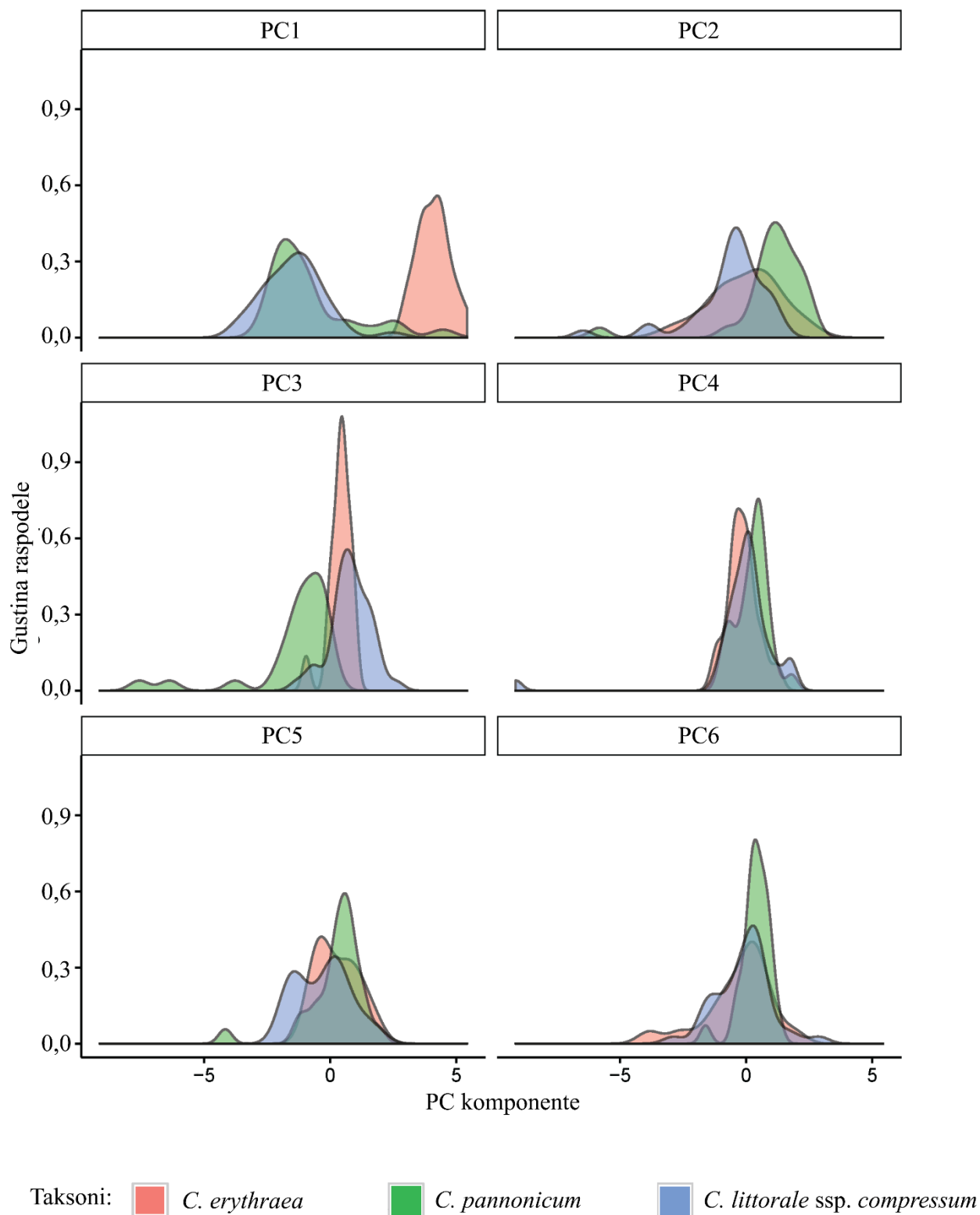


Slika 26: Udeo objašnjene varijanse odgovarajućim osnovnim komponentama.

Prve dve dimenzije (osnovne komponente) PCA analize odabranih 20 jedinjenja, objašnjavaju 47% ukupne varijanse (**Slika 27**) i karakteristično razdvajaju populacije vrste *C. erythraea* od ostala dva taksona. Ovom razdvajanju najviše doprinosi prva dimenzija PCA dijagrama, što se može videti i na grafikonu gustine raspodele (**Slika 27**). Druga dva taksona (*C. erythraea* i *C. pannonicum*) imaju međusobno veoma sličnu distribuciju. Druga i treća dimenzija (**Slika 27** i **28**) delimično razdvajaju grupe jedinki *C. littorale* ssp. *compressum* od jedinki *C. pannonicum*, ali ne razdvajaju ove grupe od jedinki vrste *C. erythraea*. Gledajući gustinu raspodele prvih šest dimenzija (**Slika 28**) dolazi se do zaključka da ni dimenzije od 4-6 ne doprinose razdvajanju između vrsta.



Slika 27: Prve dve dimenzije (osnovne komponente) PCA analize za 20 odabranih jedinjenja. Elipse predstavljaju intervale pouzdanosti od 95% za projekcije uzoraka taksona u dve prikazane osnovne komponente: crvena - *C. erythraea*, zelena - *C. pannonicum*, plava - *C. littorale ssp. compressum* korišćenjem nijansi odgovarajuće boje predstavljene su individue različitih populacija. Vektori su konstruisani na osnovu koeficijenata za prvu i drugu osnovnu komponentu za navedena jedinjenja. Gustine distribucija razdvajanja tri taksona od interesa za ovo istraživanje u prve dve dimenzije su prikazane desno i gore od osnovnog dijagrama. Učešće 20 jedinjenja u razdvajanju prve dve prikazane dimenzije PCA je prikazano vektorima sa oznakama skraćenice jedinjenja: sverozid-SV; genciopikrin-GP; svercijamarin-SM; hininska kiselina-HK; kafeinska kiselina-KK; *p*-kumarna kiselina-*p*-Kk; ferulinska kiselina-Fk; sinapsinska kiselina-Sk; luteolin-LU; apigenin-AP; naringenin-NA; izokvercitrin-IKV; astragalin-AS; kvercetin-KV; kempferol-KE; rutin-RU; dekuzatin-DK; metilbelidifolin-MBF; eustomin-EU; demetileustomin-DME.

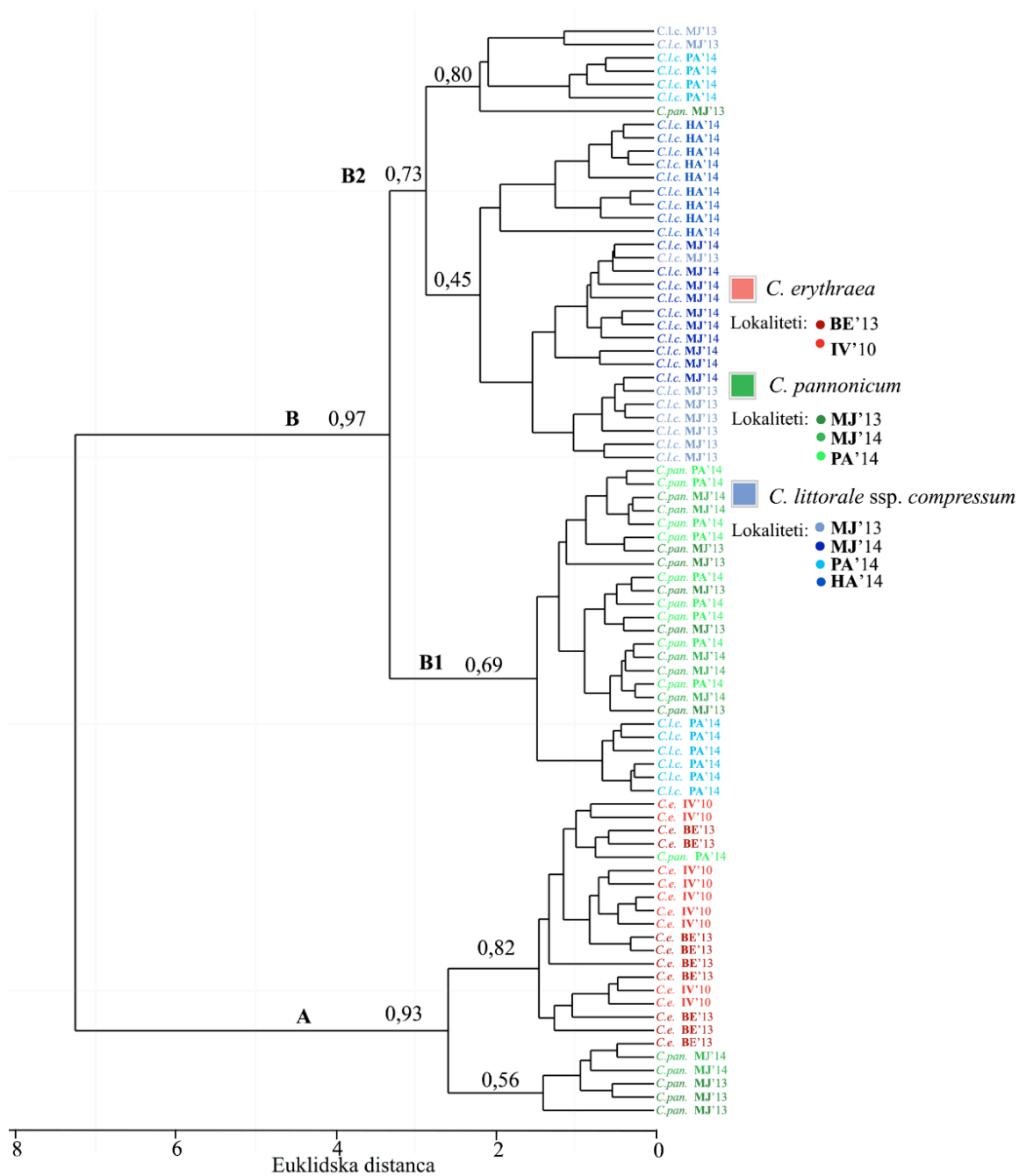


Slika 28: Gustine distribucija razdvajanja tri taksona u prvih šest PC dimenzija koje kumulativno objašnjavaju 77,5% varijanse.

U okviru sva tri taksona od interesa uočljivo je da ne dolazi do grupisanja jedinki po populacijama. Projekcije jedinki koje pripadaju različitim populacijama istog taksona su prilično ravnomerno raspoređene u okviru elipsi koje predstavljaju intervale pouzdanosti od 95% odgovarajućih taksona u prve dve osnovne komponente.

Hijerarhijska analiza klastera fitohemijskih podataka

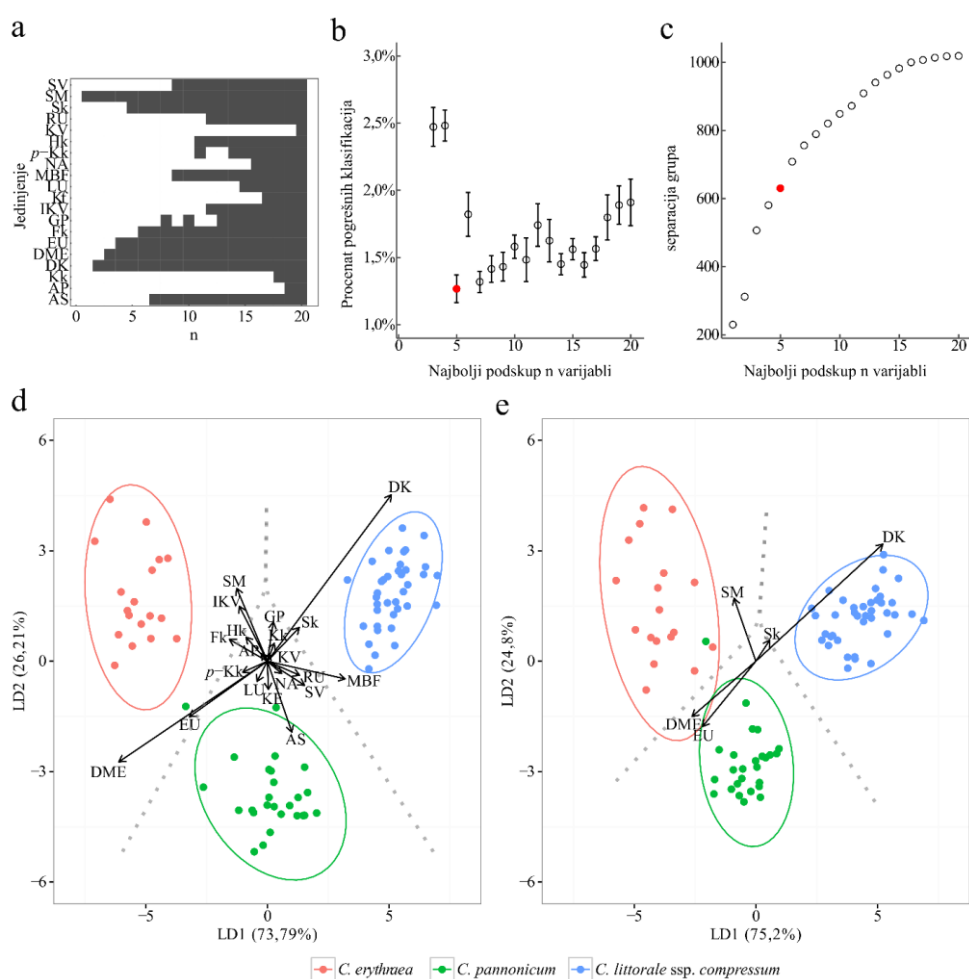
Radi boljeg sagledavanja odnosa tri istraživana taksona, urađena je i hijerarhijska klaster analiza na istom setu fitohemijskih podataka. Na osnovu prikazanog dendrograma mogu se doneti zaključci o grupisanjima taksona koji u potpunosti odgovaraju rezultatima PCA analize (**Slika 27**). Međutim, hijerarhijska klaster analiza može jasnije da predstavi grupisanje jedinki tri taksona na osnovu fitohemijskih podataka (**Slika 39**). Pri distanci od 7,25 odvajaju se dva glavna klastera: klaster **A**, koji uglavnom objedinjuje jedinke vrste *C. erythraea* i klaster **B**, gde su grupisane jedinke podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* i jedinke svrstane u *C. pannonicum*. Oba klastera podržana su visokim butstrep vrednostima (0,93 za klaster **A** i 0,97 za klaster **B**). Klaster **B** se, pri nešto nižoj vrednosti Euklidske distance od 3,25 deli na dva potklastera od kojih potklaster **B1** (podržan butstrep vrednošću od 0,69) obuhvata najviše jedinki svrstanih u *C. pannonicum* dok potklaster **B2** (podržan butstrep vrednošću od 0,73) grupiše jedinke *C. littorale* ssp. *compressum*. U predstavljenoj klaster analizi mogu se uočiti i dva odstupanja od opšteg obrasca grupisanja jedinki. Naime, većina jedinki populacije *C.l.c.* **PA**'14 se grupiše u potklasteru **B1** zajedno sa većinom jedinki svrstanih u *C. pannonicum*. U okviru potklastera **B2** nalazi se jedna jedinka populacije *C.pan.* **MJ**'13. Takođe, uočljivo je grupisanje nekih jedinki populacija *C.pan.* **MJ**'13 i *C.pan.* **MJ**'14 u okviru klastera **A**, zajedno sa jedinkama vrste *C. erythraea*. Jedinka *C.pan.* 6 **PA**'14 je pridružena populacijama vrste *C. erythraea*.



Slika 29: Grafički prikaz hijerarhijske klaster analize urađene Ward-ovom metodom uz korišćenje kvadriranih Euklidskih distanci normalizovanih fitohemijskih podataka. Taksoni su predstavljeni bojama: crvena - *C. erythraea*, zelena- *C. pannonicum*, plava- *C. littorale ssp. compressum* uz korišćenje nijansi odgovarajućih boja za predstavljanje različitih populacija. Brojevi uz odgovarajuće klastere predstavljaju butstrep vrednosti.

Linearna diskriminantna analiza (LDA)

LDA model formiran na osnovu koncentracija svih 20 jedinjenja (Pun LDA model, **Slika 30d**) obezbeđuje veoma efikasno razdvajanje taksona, što je evidentno iz odnosa varijanse između grupa i varijanse unutar grupa (separacija grupa - analogna F-odnosu u ANOVA-i) koji iznosi 1019 (**Slika 30c**, $n=20$). Kada se navedeni model iskoristi za predviđanje pripadnosti uzoraka na osnovu kojih je konstruisan može se primetiti da je 1 uzorak (*C.pan.6 PA'14*) pogrešno klasifikovan tako da je greška klasifikacije $1/82 = 1,22\%$ (**Slika 30d**). Ovaj uzorak je jasno pokazao morfološke razlike u odnosu na ostale jedinike populacije u koju je klasifikovan (**Slika 24**). Pošto klasifikaciona greška dobijena na ovaj način nije dobar pokazatelj performansi modela na budućim, nepoznatim uzorcima koji nisu korišćeni za njegovu konstrukciju, model je testiran nasumičnom unakrsnom validacijom koja je pokazala da srednja vrednost \pm standardna devijacija klasifikacione greške (10 x 1000 ponavljanja unakrsne validacije) iznosi $1.91 \pm 0.17\%$ (**Slika 30b**, $n=20$). Kako bi se model dalje optimizovao kroz smanjenje broja varijabli uz održanje sličnog nivoa tačnosti, pristupljeno je selekciji najboljih potskupova (**Slika 30a-c**). Za svako $n < p$ ($p=20$ – broj varijabli) pronađena je ona kombinacija varijabli (**Slika 25a**) koja rezultuje najvišom separacijom grupa u LDA modelu (**Slika 30c**) i za nju je određena klasifikaciona greška unakrsnom validacijom (**Slika 25b**). Grafička tabela koja prikazuje koje varijable su bile prisutne u selektovanim modelima, za svako n , prikazana je na **Slici 30a**. LDA model koji minimizuje klasifikacionu grešku dobijenu unakrsnom validacijom je model napravljen na osnovu pet varijabli ($n=5$: svercijamarin (SM), eustomin (EU), dekuzatin (DK), demetileustomin (DME) i sinapinsku kiselinu (Sk), **Slika 30b,e**). Tačnost predviđanja ovako izabranog modela je viša od punog LDA modela (klasifikaciona greška unakrsnom validacijom je smanjena na $1.27 \pm 0.1\%$). Dalje smanjenje broja jedinjenja nije opravdano, jer je klasifikaciona greška najboljeg LDA modela sa četiri jedinjenja viša od 2%.



Slika 30: Selekcija optimalnog *LDA* modela za predviđanje pripadnosti jedinki jednoj od tri vrste roda *Centaurium* na osnovu kvantitativnih fitohemijskih analiza. a - Grafička tabela koja prikazuje koje varijable su uzete u obzir pri konstrukciji *LDA* modela dobijenih selekcijom najboljih podskupova, za svako $n = (1-20)$. b - Tačnost predikcije za navedene modele, predstavljena kao srednja klasifikaciona greška \pm standardna devijacija, koje su dobijene nasumičnom ponavljanom unakrsnom validacijom (10×1000 ponavljanja). c - separacija među grupama za navedene modele *LDA* modele; crveno je obeležen model kojim minimizuje klasifikacionu grešku ($n = 5$). d - *LDA* model konstruisan na osnovu svih 20 kvantifikovanih jedinjenja. Elipse predstavljaju intervale pouzdanosti od 95% za projekcije uzoraka u dve prikazane *LD* dimenzije. Vektori su konstruisani na osnovu *LD1* i *LD2* koeficijenata za navedena jedinjenja. Isprekidane linije predstavljaju *LDA* granice između grupa. Za skraćenice jedinjenja pogledati tekst slike 15. e - *LDA* model konstruisan na osnovu 5 odabranih jedinjenja. Elipse predstavljaju intervale pouzdanosti od 95% za projekcije uzoraka u dve prikazane *LD* dimenzije. Skraćenice jedinjenja: svercijamarin-**SM**; sinapsinska kiselina- **Sk**; dekuzin-**DK**; eustomin-**EU**; demetileustomin-**DME**. Isprekidane linije predstavljaju *LDA* granice između grupa.

DISKUSIJA

Obimna, višegodišnja istraživanja na vrstama roda *Centaureum* obuhvatila su proučavanje njihovog rasteanja i razvića u uslovima *in vitro* i uključila praćenje efekata različitih komponenti i regulatora rasteanja u hranljivim podlogama, efekte svetlosnih tretmana na rast i razviće biljaka, proizvodnju sekundarnih metabolita (na primer: Krstić, 1998; Janković i sar., 2002; Mišić i sar., 2009; Todorović i sar., 2009; Šiler i sar., 2012). Takođe, praćeni su efekti genetičkih transformacija (Subotić i sar., 2003), ispitivanje cvetanja (Cvetić, Budimir i Grubišić, 2004), plodonošenja i produkcije semena (Todorović i sar., 2006; Todorović i sar., 2008), antimikrobno i antioksidativno dejstvo ekstrakata (Šiler i sar., 2014), i td.

U novijoj literaturi evidentan je nedostatak podataka vezanih za rasprostranjenje i genetički diverzitet vrsta roda *Centaureum* na teritoriji Republike Srbije, Balkanskog poluostrva i jugoistočne Evrope. Jedina vrsta sa ovih prostora, na kojoj je obavljena detaljna analiza rasprostranjenja i genetičkog diverziteta je *Centaureum erythraea*, a rezultati su predstavljeni u okviru doktorske disertacije dr Branislava Šilera sa Univerziteta u Beogradu (Šiler, 2012).

Sa druge strane, veliki broj istraživanja je proučavao genetički diverzitet i evolucione odnose koji se javljaju u okviru roda *Centaureum* (na primer: Ubsdell, 1979; Mansion, 2004; Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006) prvenstveno na području severozapadne i jugozapadne Evrope.

Opsežna, dugogodišnja terenska istraživanja su doprinela saznanjima o rasprostranjenju vrsta roda *Centaureum* na području Republike Srbije i Balkanskog poluostrva. Biljni materijal koji je sakupljen, kao i uspostavljena banka semena vrsta roda *Centaureum*, koja praktično reprezentuje biodiverzitet ovih vrsta na Balkanskom poluostrvu, predstavlja pogodnu osnovu za istraživanje, do sada slabo proučenih aspekata diverziteta, ekoloških i evolucionih odnosa. Iznenadjuće, ova terenska istraživanja su potvrdila i evidentno postojanje formi biljaka koje nisu odgovarale opisima taksona prisutnih u literaturi i morfološki su pokazale njihove intermedijarne karakteristike. Štaviše, ova pojava se uočava na velikom broju lokaliteta na kojima različite vrste roda *Centaureum* rastu u uslovima simpatrije ili, pak, u

neposrednoj blizini. Posebno interesantna situacija se sreće na crnogorskom i albanskom primorju, gde se ponekad na istim lokalitetima susreće i po nekoliko vrsta (*C. erythraea*, *C. tenuiflorum*, *C. pulchellum*, pa i *Schenkia spicata*) i gde se, na osnovu morfoloških karakteristika, mogu uočiti kombinacije intermedijarnih formi prisutnih u velikom broju.

U literaturi postoje detaljno dokumentovani, kako potvrđeni (Ubsdell, 1979; Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006) tako i brojni potencijalni, još uvek nedovoljno proučeni i nepotvrđeni (Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; Çiçek, Yaprak i Alan, 2015) primeri međuvrsnih hibridizacija vrsta roda *Centaureum* u prirodnim uslovima. Takođe, i rezultati eksperimenata ukrštanja različitih vrsta roda *Centaureum* u uslovima staklenika (Ubsdell, 1979), idu u prilog pretpostavci da su, uopšteno govoreći, mehanizmi reproduktivne izolacije ovih vrsta često veoma neefikasni.

Istraživanja mogućnosti međuvrsne hibridizacije u okviru roda *Centaureum* primarno su obuhvatila eksperimente ukrštanja različitih vrsta u laboratorijskim uslovima primenom tehnika gajenja biljaka u *in vitro* uslovima (Banjanac i sar., 2014). Na ovaj način dobijene hibridne biljke su poslužile kao model sistem na kome su uspostavljeni pristupi za proučavanje međuvrsne hibridizacije. Ustanovljeni pristupi su potom uspešno primenjeni u proučavanjima međuvrsne hibridizacije u okviru roda *Centaureum* u prirodnim uslovima.

Eksperimentalna ukrštanja kao model sistem za proučavanje međuvrsne hibridizacije

Mali je broj istraživanja u kojima je primenjen pristup oprašivanja i seksualne reprodukcije biljaka u uslovima *in vitro* (Van Tuyl i sar., 1991; Janson, 1993; Chi, 2000), dok su literaturni podaci o primeni ovakvih pristupa na vrstama roda *Centaureum* proistekli upravo iz ove doktorske disertacije (Banjanac i sar., 2014). Eksperimenti ukrštanja različitih vrsta roda *Centaureum* seksualnom reprodukcijom su sprovedeni u potpunosti u uslovima *in vitro* što je omogućilo strogo kontrolisane uslove za rastenje i razviće biljaka, sinhronizaciju cvetanja različitih vrsta, mogućnosti izvođenja analiza tokom cele godine, i visoku stopu propagacije roditeljskih i hibridnih biljaka. Ovakav pristup je obezbedio dovoljno materijala za dalje molekularno-genetičke i fitohemijske

analize. Još jedna od prednosti izvođenja *in vitro* eksperimenata hibridizacije, jeste to što na ovaj način dobijen biljni materijal nije kontaminiran stranom DNK, a što je veoma bitno za izvođenje analiza nespecifičnim molekularnim markerima kao što je *RAPD*.

Da bi eksperimenti hibridnog ukrštanja u uslovima *in vitro* bili mogući, bilo je neophodno dobiti biljke koje su u fazi cvetanja. Cvetanje u uslovima *in vitro* je prethodno dokumentovano za vrste *C. pulchellum* i *C. maritimum* (Cvetić, Budimir i Grubišić, 2004; Todorović i sar., 2009; Mišić i sar., 2009). Uprkos činjenici da je u slučaju vrsta *C. littorale* i *C. erythraea* reč o dvogodišnjim biljkama, uspešno je indukovano i sinhronizovano cvetanje obe vrste u uslovima *in vitro*. Tretman giberelinom je uspešno indukovao cvetanje vrste *C. littorale*, kao što je i pokazano u ranijim istraživanjima (Cvetić, Budimir i Grubišić, 2004). Primena mehaničkog stresa u uslovima *in vitro* je izazvala izduživanje cvetne stabljike i cvetanje kod vrste *C. erythraea*, što do sada nije zabeleženo u literaturi.

Cvetovi koji su demaskulinizovani neposredno pre otvaranja, nisu produkovali semena, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja za vrste *C. erythraea*, *C. littorale* i *C. pulchellum*, koja navode da rana demaskulinizacija uspešno sprečava samooplođenje i ukazuje da ove vrste ne razvijaju semena kroz proces apomiksije (Brys i Jacquemyn, 2011).

U okviru ove doktorske disertacije detaljno je izložen i obrazložen deo istraživanja međuvrsne hibridizacije u uslovima *in vitro* koji se odnosi na ukrštanje tetraploidnih vrsta *C. littorale* i *C. erythraea*, jer su glavni objekat disertacije upravo ove dve vrste. Međutim, eksperimentalna istraživanja predstavljena u radu Banjanac i sar. (2014) obuhvatila su i druge kombinacije međuvrsnih ukrštanja četiri vrste: *C. erythraea*, *C. littorale*, *C. maritimum* i *C. pulchellum*. Od ukupno 76 pokušaja, pored ovde opisanog ukrštanja vrsta *C. littorale* i *C. erythraea*, još dva tipa ukrštanja su rezultovala u produkciji semena i dala ukupno 20 međuvrsnih hibridnih jedinki. Ovi rezultati su još jednom ukazali da su prefertilizacione reproduktivne barijere, koje bi sprečavale oplodnju posle oprašivanja polenom druge vrste, veoma neefikasne kod vrsta roda *Centaureum*. Što se tiče postfertilizacionih reproduktivnih barijera, koje se ogledaju u sterilnosti hibridnih biljaka i njihovoj često smanjenoj vitalnosti (Rieseberg, 1995), one su se u slučaju eksperimentalnih hibridnih ukrštanja pokazale donekle efikasne. Naime, sve hibridne

biljke ovog istraživanja bile su sterilne, mada se nisu odlikovale smanjenom vitalnošću. Na ovaj način dobijen je još jedan argument koji ide u prilog opravdanosti pretpostavke da je međuvrsna hibridizacija unutar roda *Centaureum* moguća i da je svakako treba potražiti i u okviru prirodnih populacija.

Biljke dobijene međuvrskom hibridizacijom u eksperimentalnim uslovima uvršćene su u analize procene količine DNK po ćeliji metodom protočne citometrije. Identifikacija homoploidnih hibrida, kao što su jedinke dobijene eksperimentalnim ukrštanjima (*C. littorale* × *C. erythraea*) metodom protočne citometrije je jedino moguća ukoliko se jedarni DNK sadržaj roditeljskih vrsta dovoljno razlikuje u količini DNK. Nažalost, u ovom slučaju, metoda nije bila u mogućnosti da razlikuje dve roditeljske vrste, jer imaju sličnu relativnu količinu DNK po ćeliji. Za međuvrsne hibride ovog eksperimentalnog ukrštanja, količina DNK po ćeliji je ukazivala na njihovu tetraploidnost (kao i za roditeljske vrste), a potvrda samog hibridnog porekla je dokazana uz pomoć *RAPD* molekularnih markera i fitohemijskih analiza. Međutim, za ostala eksperimentalna međuvrsna ukrštanja predstavljena u radu Banjanac i sar. (2014), ovaj pristup je nedvosmisleno potvrdio postojanje hibridnih individua. U slučaju ukrštanja diploidne vrste *C. maritimum* i tetraploidne vrste *C. erythraea* relativna količina DNK po ćeliji hibridnih potomaka ukazala je na prisustvo tri hromozomska seta tj. veličinu genoma ekvivalentnu jednom hromozomskom setu vrste *C. maritimum* i dvostrukom hromozomskom setu vrste *C. erythraea*. Takođe, hibridne biljke nastale ukrštanjem *C. littorale* × *C. pulchellum* su takođe pokazali relativnu količinu DNK ekvivalentu prisustvu tri hromozomska seta, ali, zbog malih razlika u količini DNK po ćeliji kod roditeljskih vrsta, u ovom slučaju nije bilo moguće zaključiti koji odnos hromozomskih setova je prisutan kod hibridnih biljaka.

Iz svega navedenog proističe zaključak da analiza ploidnosti metodom protočne citometrije prilikom proučavanja međuvrsne hibridizacije u okviru roda *Centaureum*, može biti izuzetno korisna u nekim slučajevima, i da je u potpunosti opravdano uključivanje ove metode u analize prirodnih populacija i potencijalno hibridnih jedinki ukoliko sa roditeljske biljke značajno razlikuju u količini DNK po ćeliji. Na ovaj zaključak ukazuju i mnoga ranija istraživanja koja uključuju metodu protočne citometrije u istraživanje međuvrsne hibridizacije (Bureš i sar., 2003; Plačková i Suda, 2004; Contreras, Ranney i Tallury, 2007; Rosenbaumová, Çiçek, Yaprak i Alan, 2015).

RAPD molekularna analiza je nesumnjivo potvrdila hibridno poreklo svih biljaka dobijenih u eksperimentalnim ukrštanjima. Prisustvo *RAPD* traka specifičnih za očinsku biljku u profilima hibridnih biljaka prve generacije nesumnjivo potvrđuje uspešnost hibridizacije (Yin i sar., 2001; Mehetre i sar., 2004; Mehetre, 2004; Liu i sar., 2007; Amjad Ali i sar., 2008). *RAPD* markeri se biparentalno nasleđuju (Williams i sar., 1990) i kod hibridnih biljaka prve generacije se očekuje kompletna aditivnost. Ipak, ovakva pojava nije uočena kod *RAPD* profila hibridnih jedinki dobijenih u ovom istraživanju. Objašnjenje ove pojave se verovatno nalazi u činjenici da se rekombinacije, mutacije ili slučajne segregacije hromozoma takođe često javljaju pri formiranju hibrida (Smith, Burke i Wagner, 1996; Mehetre, 2004; Mehetre i sar., 2004; Terzioğlu, Coşkunçelebi i Gültepe, 2012). I pored minornih odstupanja od kompletne aditivnosti, položaj hibridnih jedinki na fenogramu konstruisanom na osnovu *RAPD* analize je takav da su sve one svrstane između roditeljskih taksona, što je dalo argumente za dalju primenu ove metode u analizama prirodnih populacija.

Poznato je da sekoiridoidni glukozi mogu uspešno da se koriste kao taksonomski markeri u okviru roda *Centaureum* (van der Sluis i Labadie, 1981; Struwe i Albert, 2002; Jensen i Schripsema, 2002). Analiza sadržaja tri jedinjenja iz grupe sekoiridoida (GP, SVM i SV) kod roditeljskih i hibridnih jedinki dobijenih tokom eksperimentalnih *in vitro* ukrštanja je izvršena u cilju ispitivanja mogućnosti korišćenja dobijenih kvantitativnih razlika kao indikatora međuvrsne hibridizacije. Kvantifikacija ova tri jedinjenja je kod hibridnih biljaka pokazala intermedijarne koncentracije u odnosu na roditeljske biljke, što ne mora uvek da bude slučaj (Rieseberg, 1995). Dobijeni hemijski polimorfizmi su jasno ukazali na hibridno poreklo potomstva, tim pre što je istraživanje obuhvatilo konkretne roditeljske biljke i međuvrsne hibride *F1* generacije. Rezultati dobijeni na jedinki *C. erythraea* (polenski donor iz eksperimentalnih međuvrsnih ukrštanja) su pokazali da je SVM najzastupljeniji sekoiridoidni glukozi, a da je GP takođe prisutan u značajnoj količini. *C. littorale* se odlikuje visokim sadržajem GP, dok su ostala dva jedinjenja prisutna u značajno nižim koncentracijama. Kod svih analiziranih hibridnih jedinki su uočene intermedijarne vrednosti koncentracija SVM, GP i SV, što je ukazalo da kvantitativni sadržaj sekundarnih metabolita biljaka može biti jedan od pokazatelja međuvrsne hibridizacije u okviru roda *Centaureum*. Međutim,

optimizacija, tj. ujednačavanje uslova gajenja biljaka jedan je od bitnih preduslova ovog pristupa.

Rezultati nastali u eksperimentima hibridnog ukrštanja, a tiču se analize nivoa ploidije, varijabilnosti odabranih polimorfnih genskih lokusa *RAPD* molekularnim markerima, kao i kvantitativne analize sadržaja sekundarnih metabolita, ukazuju da primenjene metode mogu biti korisna oruđa prilikom identifikacije i potvrde hibridnog porekla biljaka, te da se mogu primeniti u istraživanjima međuvrskih hibridizacija u prirodnim populacijama vrsta roda *Centaureum*.

Izbor konkretnog potencijalnog primera međuvrsne hibridizacije u prirodnim uslovima u okviru roda *Centaureum*

Tokom višegodišnjih istraživanja pronađen je veliki broj lokaliteta, kako na području Balkanskog poluostrva, tako i severno od Save i Dunava, na kojima su uočene forme biljaka morfološki intermedijarne vrstama opisanih u taksonomskim ključevima referentne literature. Ipak, fokus ove doktorske disertacije zadržao se na proučavanju međuvrsne hibridizacije u okviru dva lokaliteta (lokaliteti Majdan - **MJ** i Palić - **PA**) na području Subotičko-horgoške peščare i njene okoline. Ovaj pravac istraživanja je odabran iz više razloga. Literaturni podaci ukazuju na veoma veliku filogenetsku srodnost dve pomenute vrste (Mansion, 2004; Mansion, Zeltner i Bretagnolle, 2005; Mansion, 2014). Takođe, primeri hibridizacije određenih podvrsta ovih taksona su ranije detaljno dokumentovani i potvrđeni (Ubsdell 1976b; Ubsdell 1976a; Ubsdell 1979; Mansion, Zeltner i Bretagnolle 2005).

Lokaliteti **MJ** i **PA**, sa kojih potiče biljni materijal korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji nalaze se na područjima pod zaštitom države e ili su u njihovoj neposrednoj blizini. Veštačko jezero Majdan nalazi se u okviru Predela Izuzetnih odlika „Subotička Peščara“. Ovo zaštićeno prirodno područje predstavlja prostor izuzetne biološke raznovrsnosti, što je posledica mozaičnog rasporeda različitih tipova staništa, i obuhvata jezero nastalo nakon površinske eksploatacije peska i njegove neposredne okoline. Lokalitet Palić se nalazi u neposrednoj blizini Parka prirode-Palić koji čini istoimeno jezero i njegova okolina. Biljke poreklom sa ovog lokaliteta rastu po obodima isušenog kanala za odvodnjavanje Palićkog jezera, tako da je i ovo stanište nastalo ljudskom

delatnošću. Lokaliteti Bački Vinogradi (**BV**) i Hajdukovo (**HA**), su izabrani zbog neposredne blizine lokalitetima **MA** i **PA**, i zbog prisutnosti vrste *C. erythraea* (**BV**) odnosno *C. littorale* ssp. *compressum* (**HA**). Populacije uvrštene u istraživanja sa navedenih lokaliteta, prikazane su na **Slici 31**. Lokalitete **MJ** i **PA**, u uslovima simpatrije, nastanjuju jedinke *C. littorale* ssp. *compressum* i biljke okarakterisane kao *C. pannonicum*, dok se na ostalim prikazanim lokalitetima nalaze samo jedinke *C. littorale* ssp. *compressum* (lokaliteti **AS** i **HA**) ili jedinke vrste *C. erythraea* (lokalitet **BV**).

Sveprisutne obradive površine ovih ravničarskih krajolika, saobraćajnice i druge prepreke nastale ljudskom delatnošću predstavljaju barijere rasprostranjenju vrsta i utiču na snažnu fragmentaciju staništa (što se i može uočiti na priloženom satelitskom snimku područja, **Slika 31**). Vrste roda *Centaurium* se mogu naći na otvorenim livadskim ili rano sukcesivnim staništima, koja se javljaju u okviru zaštićenih područja ili kao ostaci nekadašnjih otvorenih stepskih krajolika koji nisu pretvoreni u obradivo zemljište ili pak urbanizovani. Relativno mali broj jasno ograničenih fragmentisanih populacija, daje dobru osnovu za uspostavljanje odgovarajućeg model sistema za proučavanje međuvrsne hibridizacije u prirodnim uslovima u okviru roda, koji bi se mogao u budućnosti primeniti i na druge slične probleme i lokalitete za koje postoje indikacije da predstavljaju mesta intenzivnih međuvrsnih ukrštanja u okviru roda *Centaurium*.



Slika 31: Satelitski snimak područja Subotičko-horgoške pešcare i njene okoline sa označenim lokalitetima i populacijama sa ovih lokaliteta uvrštenih u istraživanja. Spisak lokaliteta i populacija dat je u **Tabeli 1**. Satelitski snimak preuzet sa *Google Earth* softvera (*GoogleEarthPro*, V 7.1.7.2600, datum snimanja: 21.05.2016, Subotica, visina pogleda: 22,52km, *DigitalGlobe* 2016, datum preuzimanja: 09.10.2016).

Preliminarne analize međuvrsne hibridizacije prirodnih populacija

Analiza ploidnosti

Rezultati analiza ploidnosti populacija dobijeni u okviru disertacije su jasno i nedvosmisleno ukazali na postojanje heksaploidnih taksona koji rastu simpatrički sa tetraploidnim, i otvorili pitanje složenih i zanimljivih pitanja evolucione istorije ovih blisko srodnih taksona u okviru roda *Centaureum* na lokalitetima **MA** i **PA**.

Informacije o nivou ploidije su veoma korisne u različitim istraživanjima biljne sistematike, pošto omogućavaju pouzdanu i brzu determinaciju vrsta u okviru blisko srodnih grupa (Bureš i sar., 2003; Rosenbaumová, Plačková i Suda, 2004). U slučaju populacione biologije, ovakva informacija opisuje distribucije genotipova u različitim prostornim okvirima, i daje uvid u diploidno-poliploidne komplekse populacija koje egzistiraju u uslovima simpatrije (Keeler i sar., 1987; Suda i Trávníček, 2006; Pfeiffer i sar., 2011). Ovi podaci su od posebnog značaja u slučaju postojanja mnogostrukih poliploidnih kompleksa, i kada je evidentna uloga poliploidije u evolucionim i filogenetskim odnosima, kao što je to slučaj sa vrstama roda *Centaureum*. Metoda je takođe primenljiva u identifikaciji prirodno nastalih hibridnih biljaka (Baumel i sar., 2003) i hibrida nastalih eksperimentalnim ukrštanjima (Contreras, Ranney i Tallury, 2007; Liesebach, Naujoks i Ewald, 2011; Ito i sar., 2011; Meiners i Winkelmann, 2011). Analiza količine DNK po ćeliji metodom protočne citometrije je uključena i u druga istraživanja međuvrsne hibridizacije roda *Centaureum* (Guggisberg, Bretagnolle i Mansion, 2006; Çiçek, Yaprak i Alan, 2015), u kojima se takođe pokazala kao veoma informativna.

Primena *RAPD* molekularne analize u razmatranju međuvrsne hibridizacije

S obzirom da su se *RAPD* molekularni markeri pokazali kao veoma korisni u potvrđivanju hibridna prirode jedinki eksperimentalnih ukrštanja, primenjeni su i u analizi odabranih prirodnih populacija. *RAPD* analiza je urađena uz pomoć relativno malog broja prajmera (svega šest) i obuhvatila je ukupno 59 jedinki. Odabrane su populacije sa dva lokaliteta (**MJ** i **PA**), gde se u okviru istih lokaliteta nalaze jedinke vrste *C. littorale* ssp. *compressum* i jedinke okarakterisane kao *C. pannonicum*. Polazna

pretpostavka (hipoteza) ove doktorske disertacije je alopoliploidno poreklo jedinki *C. pannonicum* kao taksona nastalog hibridizacijom i poliploidizacijom vrsta *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*. Međutim, jedinke vrste *C. erythraea* nisu pronađene u simpatriji sa jedinkama *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*. Najbliži lokalitet gde je pronađena vrsta *C. erythraea* je lokalitet **BV** koji se nalazi u neposrednoj blizini prethodna dva (16 do 18 km vazdušnom linijom, **Slika 31**), tako da su jedinke ove populacije uvrštene u analize kao populacija koja bi filogenetski bila najbliža populacijama koje su hibridizovale na ovim prostorima. Dva udaljena lokaliteta sa područja Fruške Gore, na kojima se nalaze samo jedinke vrste *C. erythraea* (**IV** i **BE**) su takođe uvrštene u analize kao referentne populacije, s obzirom da na ovim lokalitetima vrsta *C. littorale* nije detektovana. Izabrana serija uzoraka obuhvatila je i neke uzorke iz istih populacija, ali poreklom od semena sakupljanog tokom više različitih godina (**Tabela 5**), s ciljem sagledavanja genetičke postojanosti populacija tokom vremena.

Rezultati *PCoA* kao i hijerarhijske analize klastera dale su jasnu sliku grupisanja u zavisnosti od taksona kojoj jedinke pripadaju. Prve tri dimenzije *PCoA* analize opisuju ukupno 59,34% totalne varijacije, što je saglasno sa rezultatima istraživanja koje je obuhvatilo sličan broj uzoraka (Grljušić i sar., 2008). Koeficijent kofenetičke korelacije hijerarhijske analize klastera predstavljenog fenograma iznosi 0,9538 što sugerise na veoma snažnu saglasnost samih matrica Žakardovih koeficijenta genetičke sličnosti između jedinki i dobijenog fenograma.

Pri hijerarhijskoj analizi klastera, na niskim vrednostima koeficijenta sličnosti odvajaju se klasteri vrsta upotrebljenih kao *out-* grupe: klaster koji čine tri jedinke vrste *C. pulchellum* a klaster koji predstavlja samo jedinka vrste *Blackstonia perfoliata*. Jasna odvojenost, a ipak dovoljna bliskost *out-* grupa jedinki u odnosu na ispitivane taksone, sugerise na adekvatno izabrane *out-* grupe, te pruža mogućnost korektnog uvida u odnose svih taksona obuhvaćenih analizom.

Najznačajniji rezultat hijerarhijske klaster analize sprovedene uz pomoć *RAPD* molekularnih markera je: odvajanje klastera koji grupiše jedinke taksona *C. littorale* i *C. littorale* ssp. *compressum*, sa jedne strane, i klastera koji grupiše jedinke vrste *C. erythraea* i jedinke okarakterisane kao *C. pannonicum* sa druge strane. Ovaj rezultat po prvi put ukazuje na nespornu genetičku sličnost između jedinki *C. pannonicum* i jedinki

C. erythraea. Grupisanje jedinki *C. littorale* i jedinki *C. littorale* ssp. *compressum* ide u prilog pretpostavci da su ovo dva jako bliska taksona tj. da su najverovatnije u pitanju dve podvrste. Značajno za navedene rezultate, a sa stanovišta razmatranja međuvrsne hibridizacije, je činjenica da se na lokalitetima na kojima sa nalaze populacije *C. pannonicum* uopšte ne nalaze jedinke vrste *C. erythraea* dok se na lokalitetima (**MJ** i **PA**) nalaze zajedno (u uslovima simpatrije) jedinke *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*. Sve jedinke okarakterisane kao *C. pannonicum* se, sa maksimalnom butstrep podrškom, odvajaju u okviru zasebnog potklastera, pri koeficijentu genetičke sličnosti od 0,33, bliskom onom pri kom se odvaja i priznati takson *C. littorale* ssp. *compressum*, što daje podršku pretpostavci da je reč o zasebnom, do sada neopisanom taksonu.

Na osnovu *RAPD* markera, od svih pomenutih taksona, jedino se u okviru vrste *C. erythraea*, može uočiti grupisanje jedinki po populacijama iz kojih potiču. Jedinke poreklom sa lokaliteta **IV** su odvojene od ostalih jedinki vrste *C. erythraea*. Populacije sa lokaliteta **BV** i **BE** takođe pokazuju grupisanje koje prati populacionu pripadnost, ali ne u potpunosti. Interesantno je da su populacije sa lokaliteta **IV** i **BE** geografski veoma bliske, a da je sa, druge strane, populacija sa lokaliteta **BV** veoma udaljena i izolovana od pomenutih lokaliteta. Opsežno istraživanje vrste *C. erythraea*, sprovedeno u okviru doktorske disertacije dr Branislava Šilera (Šiler, 2012), je pokazalo izraženu genetičku diferencijaciju između populacija. Dobijeni rezultati populacija sa lokaliteta **IV**, **BE** i **BV** na osnovu *RAPD* markera takođe ukazuju na istu pojavu.

RAPD analize se intenzivno koriste za pružanje molekularnih dokaza hibridnog porekla biljnih taksona. U istraživanju Smith i sar. (1996), uz pomoć 13 *RAPD* markera, potvrđeno je hibridno poreklo 17 taksona u okviru roda *Cyrtandra*. Donekle izmenjen pristup upotrebe *RAPD* molekularnih markera je primenjen u istraživanju grupe autora (Srivastava i sar., 2010) gde su ovi markeri, u kombinaciji sa još dva DNK marker sistema (eng.: *Inter Simple Sequence Repeats*, *ISSR* i eng.: *Direct amplification of minisatellite DNA markers*, *DAMD*), pokazali veoma veliku efikasnost u ispitivanjima odnosa hibridizacije između različitih sorti manga (*Mangifera indica*; Srivastava i sar., 2010). Pojedina istraživanja su, primenom *RAPD* markera na veštačkim hibridima, ukazala na njihovu pogodnost u razmatranjima međuvrsne hibridizacije biljnih taksona (Mehetre i sar., 2004; Divakaran i sar., 2006; Amjad Ali i sar., 2008).

Biljke upotrebljene u *RAPD* analizi predstavljaju *F1* generaciju u odnosu na biljke koje su sakupljane i determinisane na prirodnim staništima. Potpuno konzistentni rezultati hijerarhijske klaster analize, kada je reč o grupisanju jedinki u okviru taksona, ukazuju na pravilnu determinaciju jedinki pri sakupljanju i, takođe, ukazuju na postojanost uočenih taksona.

Zabeleženi nivo polimorfности svih *RAPD* markera dobijen u analizi diverziteta analiziranih populacija vrsta roda *Centaureum* je bio 95,78%, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim populacionim istraživanjima (Gupta i sar., 2008; Ray i Roy, 2009; Šiler, 2012; Venkatachalam, Sreedhar i Bhagyalakshmi, 2008). Takođe, **prosečan zabeležen broj traka po prajmeru** u ovom istraživanju je 15,17, što je takođe u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja (Ray i Roy, 2009; Mujaju i sar., 2010). Prosečna **razdvojna moć prajmera** *RAPD* markera (Prevost i Wilkinson, 1999) od 7,82 pokazala se nešto nižom nego u prethodnom istraživanju na vrsti *C. erythraea* (Šiler, 2012).

Prosečna *PIC* vrednost svih korišćenih *RAPD* prajmera imala je vrednost 0,3473 što je u poređenju sa drugim istraživanjima veoma visok rezultat (Venkatachalam, Sreedhar i Bhagyalakshmi, 2008; Šiler, 2012; Tonk i sar., 2014) koji ukazuje na veliku efikasnost upotrebljenog seta prajmera i njihovu dobru diskriminacionu moć.

Najveću *PIC* vrednost kao i prosečnu informativnost traka i razdvojnu moć prajmera pokazao je prajmer *OPO 07*, te je on najinformativniji za diskriminaciju ispitivanih populacija. Sa druge strane, prajmer *OPF 14* je za sva tri navedena parametra imao najniže vrednosti, te je najmanje informativan za razlikovanje populacija.

Analiza sprovedena sa setom od šest prajmera se pokazala dovoljnom za preliminarnu procenu genetičke sličnosti/srodnost odabranih taksona. Ovakav rezultat nije u skladu sa podacima Landry i Lapointe, 1996, koji sugerišu upotrebu najmanje 12 prajmera pri upotrebi Žakardovog koeficijenta sličnost. Međutim, treba naglasiti da su prajmeri korišćeni u ovom istraživanju visoko polimorfni, te mogu prevazići nedostatke malobrojnosti upotrebljenih markera.

Pored pouzdanosti koje su *RAPD* molekularni markeri pokazali pri identifikaciji hibridnih jedinki (Banjanac i sar., 2014), oni su upotrebljeni i u analizama prirodnih

populacija zbog toga što za njihovu primenu nije potrebna informacija o DNK sekvencama ciljane vrste, zato što karakterišu genotipove preko više lokusa (praktično u okviru celog genoma) i pogodni su za analizu genetičke varijabilnosti unutar ili između vrsta i populacija. Ipak, deo istraživanja koji obuhvata analizu populacija vrsta roda *Centaurium*, uključio je isključivo jedinke koje su gajene u sterilnim *in vitro* uslovima. Na ovaj način se izbegla mogućnosti amplifikacije neželjene DNK i problemi koji bi mogli da proisteknu iz nespecifične prirode samih *RAPD* molekularnih markera.

Primena *EST-SSR* molekularne analize u razmatranju međuvrsne hibridizacije

U cilju daljeg razumevanja i opisivanja genetičke varijabilnosti i međuvrsne hibridizacije u prirodnim populacijama vrsta roda *Centaurium*, po prvi put je urađena analiza *EST-SSR* molekularnim markerima. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o razvoju mikrosatelitskih molekularnih markera, bilo genomskih, bilo genskih, za vrste roda *Centaurium*.

Razvoj mikrosatelitskih molekularnih markera

U literaturi se sreću različiti pristupi obradi podataka dobijenih sekvenciranjem transkriptoma u zavisnosti od primenjene tehnologije sekvenciranja, kvaliteta i dužine dobijenih nizova. Zajedničko za veliku većinu pristupa, bilo da se radi o sekvencama dobijenim uz pomoć *Illumina* platformi (sekvenciranje sintezom; metodom skeniranja oba kraja (eng.: *pair-end sequencing*)) ili *454* platformi (metodom pirosekvenciranja; eng.: *pyrosequencing*), je korak kontrole redundantnosti tj. izbacivanja ponovljenih sekvenci i korak asemblovanja (sklapanja, slaganja, nadovezivanja; eng.: *assembly*) sekvenciranog materijala u kontige. Tehnologija pirosekvenciranja (*454* platforme) kao rezultat procesa pruža duže sekvence, mada sa nešto manjom tačnošću (Ekblom i Galindo, 2011; Luo i sar., 2012), tako da neki autori (Abdelkrim i sar., 2009; Castoe i sar., 2012) ipak preskaču korak asemblovanja sekvenci u kontige i mikrosatelitske sekvence pronalaze direktno na materijalu dobijenom sekvenciranjem. Oba koraka obično zahtevaju veoma velike bioinformatičke resurse, posebno kada je reč o poliploidnim vrstama, jer je redundantnost sekvenci u ovom slučaju veoma velika i dovodi do problema kombinovanja izuzetno velike količine podataka (Malkov i

Simonović, 2011). Takođe, proces asemblovanja može dovesti do grešaka u smislu pogrešno nadovezanih nizova posebno kada je reč o vrstama za koje ne postoji referentni genom (Ekblom i Galindo, 2011; Vijay i sar., 2013; Vukosavljev i sar., 2015), kao što je to slučaj sa vrstom *C. erythraea*.

U pristupu primenjenom u okviru ove doktorske disertacije, preskočen je korak asemblovanja sekvenci u dugačke kontige i kontrola redundantnosti na početku obrade podataka. Umesto toga, pristup se sastojao u postupnom filtriranju podataka (**Slika 11**) odbacivanjem sekvenci koje nisu zadovoljavale postavljene kriterijume. Pri tom je bilo moguće celokupnu obradu podataka izvršiti na prosečnom personalnom računaru. Osobnost celokupnog primenjenog pristupa ogleda se u odabiru i primeni odgovarajućih bioinformatičkih softvera kako bi se na efikasan delotvoran način došlo do upotrebljivih rezultata. Osobnost se takođe ogleda i u kreiranju kratkih kontiga koje čine materijal u kome se vrši potraga za mikrosatelitskim ponovcima.

Tek pre konačne konstrukcije prajmera izvršena je kontrola redundantnosti izabranih kratkih kontiga na umnogome smanjenom obimu podataka. Postoje ranija istraživanja koja opravdavaju ovaj pristup kontrole redundantnosti (Kota i sar., 2001; Kantety i sar., 2002; Thiel i sar., 2003; Varshney, Graner i Sorrells, 2005).

Set podataka od 31.561 kontiga koje sadrže mikrosatelitske ponovke ne može se bez rezerve posmatrati kao reprezentativni uzorak u smislu zastupljenosti mikrosatelitskih klasa u transkriptomu iz više razloga. Kao prvo, radi se o redundantnom skupu sekvenci. Takođe, ovaj skup ne predstavlja ni polazne podatke koji su dobijeni procesom sekvenciranja, jer je već izvršena obrada podataka koja je uklonila više od polovine polaznih sekvenci. Ipak, u pogledu zastupljenosti mikrosatelitskih klasa rezultati ovog istraživanja se slažu sa literaturnim podacima (Vukosavljev i sar., 2015; Chen i sar., 2015). Ova činjenica se može objasniti time što su, do ovog koraka bioinformatičkog pristupa, sekvence nasumično odbacivane u pogledu zastupljenosti mikrosatelitskih klasa i to u veoma velikom uzorku. U okviru seta podataka od 31.561 kontige zabeležena je velika zastupljenost (oko 95%) trinukleotidnih ponovaka, kao što je slučaj i u sličnim istraživanjima, dok su sledeći po učestalosti ili dinukleotidni ili tetranukleotidni mikrosatelitski ponovci (Vukosavljev i sar., 2015; Chen i sar., 2015). Visok procenat trinukleotidnih ponovaka se opravdava hipotezom da selekcija protiv mutacija koje

pomeraju okvir čitanja ograničava ekspanziju mikrosatelita koji nemaju motiv deljiv sa tri u kodirajućim regionima genoma (Metzgar, Bytof i Wills, 2000). Ova činjenica može takođe biti i objašnjenje zašto se heksanukleotidni motivi češće javljaju od pentanukleotidnih. Sličan obrazac učešća heksa- i pentamernih motiva se javlja i u istraživanju *EST-SSR* markera vrste *Vigna angularis* (Chen i sar., 2015) i nekih vrsta ruža (Vukosavljev i sar., 2015). Ipak, pentamerni mikrosatelitski motivi su bili češći od heksamernih u istraživanju na slatkom krompiru (Wang i sar., 2011).

Mnoga istraživanja umanjuju potencijal mikrosatelitskih markera razvijenih na osnovu eksprimirajućih sekvenci (*EST-SSR* markera) zbog očekivano smanjene polimorfnosti ovako razvijenih markera (Dufresnes i sar., 2014). Sa druge strane, tetraploidnost sekvenciranog transkriptoma je pružila veće šanse da se, unutar seta podataka izabranih kratkih kontiga, pronađu sekvence sa istim okružujućim nizovima i mikrosatelitskim motivom a različitim brojem ponovaka sekvence tj. polimorfni mikrosatelitski lokusi. Sličan pristup opisan je i u radu Vukosavljev i sar. (2015) sa tom razlikom što su polimorfni mikrosatelitski lokusi pronalazeni u okviru 11 sekvenciranih genotipova tetraploidnih vrsta ruža. Ovaj pristup, kojim se traga za polimorfizmima mikrosatelitskih lokusa još na nivou odabira kratkih kontiga koje će biti uključene u dalja istraživanja (*in silico*), je opravdan činjenicom da je potvrđena polimorfnost svih devet lokusa koji su uspešno razvijeni.

Za dalja testiranja odabrano je 16 potencijalno polimorfni i neredundantnih kontiga sa „idealno“ pozicioniranim mikrosatelitskim ponovcima na kojima su konstruisane prajmerske sekvence.

Pet (od 16) parova dizajniranih prajmera nije rezultovalo amplifikacijom, dok su dva prajmerska para izuzeta iz dalje analize jer su produkovala mnogostruke nespecifične ponovke. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima sličnih istraživanja gde je zabeležena uspešnost amplifikacije *EST-SSR* lokusa oko 60-90% (Kota i sar., 2001; Thiel i sar., 2003; Nicot i sar., 2004; Saha i sar., 2004; Wang i sar., 2014; Chen i sar., 2015).

Od devet *EST-SSR* markera koji su pokazali uspešnu amplifikaciju, samo je lokus *M7* sadržao pentamerni mikrosatelitski motiv. Ostali lokusi sadrže ili trimerni (*M5*, *M8*, *M10*, *M12*, *M13*, *M17* i *M18*) ili heksamerni (*M4*) mikrosatelitski motiv. Prajmerski par konstruisan za lokus *M12* dao je znatno duži produkt amplifikacije nego što je to

predviđeno. Pri amplifikaciji produkata *MI7* lokusa, zabeleženi su produkti od 75 bp i 170 bp, od kojih je prvi kraći, a drugi duži od očekivane (158 bp) dužine fragmenata. Do pojave dužih i kraćih fragmenata pri amplifikaciji može doći u slučaju kada su amplifikacijom obuhvaćeni delovi genoma koji sadrže introne, insercije ili delecije (Saha i sar., 2004). Amplifikacija introna koji se nalaze između mesta vezivanja prajmera, može rezultovati pojavom fragmenata dužih od očekivanih, a u ekstremnim slučajevima, introni (jedan ili više njih) obuhvaćeni amplifikacijom mogu biti toliko veliki da uopšte ne dolazi do amplifikacije (Ellis i Burke, 2007). Pojava dužih amplikona od očekivane vrednosti se znatno češće javlja kod *EST-SSR* markera nego kod *SSR* markera konstruisanih na osnovu genomske DNA (Kota i sar., 2001; Thiel i sar., 2003; Nicot i sar., 2004; Yu i sar., 2004). Jedan od konstruisanih prajmera (lokus *MI8*) je verovatno amplifikovao više od jednog lokusa (postojanje više od četiri alela kod tetraploidnih individua), ukazujući da je verovatno došlo do amplifikacije dupliranih gena ili genskih familija, kao što je to bio slučaj u istraživanju Vukosavljev i sar. (2015).

Polimorfnost i transferabilnost svih razvijenih markera je potvrđena na odabranom uzorku od 22 individue koje pripadaju različitim taksonima u okviru roda *Centaureum*. Asocijacija sa eksprimirajućim regionima ponekad ograničava polimorfnost *EST-SSR* markera (Thiel i sar., 2003). Međutim mnoga istraživanja pokazuju da ovi markeri, u proseku, pokazuju sličan nivo polimorfnosti kao i genomski *SSR* markeri (Nybom, Weising i Rotter, 2014).

Poželjno je da se tokom procesa razvijanja mikrosatelitskih markera obuhvati i testiranje na DNK izolatima srodnih vrsta, posebno kada je reč o vrstama koje ne predstavljaju model organizme (Reid, Hoareau i Bloomer, 2012). Na ovaj način se mogu smanjiti troškovi razvijanja novih markera za srodne vrste i omogućiti populaciono-genetička istraživanja u širim taksonomskim okvirima. Upravo iz navedenih razloga, eksperimenti karakterizacije *EST-SSR* lokusa ovog istraživanja su obuhvatili sedam taksona roda *Centaureum* (**Tabela 7**), čime je urađena procena njihove transferabilnosti. Zabeležena je visoka transferabilnost *EST-SSR* markera, pri čemu je šest od osam markera uspešno amplifikovano u jedinkama svih analiziranih taksona. Literaturni podaci ukazuju na primenjivosti *EST-SSR* markera na srodne vrste i više taksonomske kategorije (Gupta i sar., 2003; Saha i sar., 2004; Vendramin i sar., 2007; Feng i sar., 2008; Postolache i sar., 2014; Dufresnes i sar., 2014; Raveendar i sar., 2015). Transferabilnost *EST-SSR* markera

direktno zavisi od srodnosti ispitivanih taksona, tj. veće su stope transferabilnosti kod blisko srodnih taksona (Postolache i sar.,2014; Raveendar i sar.,2015). Lokusi za koje je ustanovljeno da su primenljivi i za druge vrste roda *Centaureum* mogu biti od velike koristi u budućim populaciono-genetičkim istraživanjima, kao i u istraživanjima međuvrsne hibridizacije.

Genetička struktura populacija na osnovu *EST-SSR* markera

Primena mikrosatelitskih markera pruža prednost u odnosu na *RAPD* molekularne markere koja se ogleda u njihovoj specifičnosti za taksone za koje su konstruisani, i koja, na taj način, garantuje amplifikaciju ciljanog dela DNK. Ova prednost mikrosatelitskih markera omogućila je analizu biljnog materijala koji je sakupljen direktno na lokalitetima, tokom samo jedne sezone i omogućila je sagledavanje populacionih struktura, bez potrebe za razmatranjima vezanih za preklapanje generacija, postojanja banke semena u zemljištu i sl. Uspešna transferabilnost 8 mikrosatelitskih lokusa razvijenih za *C. erythraea*, na drugu roditeljsku vrstu (*C. littorale* ssp. *compressum*) i hibridnog potomka (*C. pannonicum*) omogućila je analizu genetičkih razlika između analiziranih taksona.

Optimizacija kapilarne elektroforeze za vizuelizaciju EST-SSR-PCR produkata

Razdvajanje produkata *PCR* amplifikacija mikrosatelitskih lokusa elektroforezom na agaroznim gelovima ne pruža mogućnost dovoljno preciznog beleženja dužina fragmenata jer ne zadovoljava rezoluciju od nekoliko baznih parova (Zalapa i sar., 2012) neophodnu za razlikovanje mikrosatelitskih alela. Najčešći način vizuelizacije mikrosatelitskih fragmenata danas obuhvata analize na automatskim sekvenatorima uz pomoć fluorescentno obeleženih prajmera, što omogućava preciznu, jasnu i reproducibilnu detekciju visoko varijabilnih *SSR* lokusa (Zalapa i sar., 2012). Nasuprot najčešće korišćenoj metodi, u ovom istraživanju primenjen je *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistem za analizu produkata *PCR* reakcija

Postoji samo nekoliko objavljenih istraživanja u kojima se *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistem koristi za analizu produkata *PCR* reakcija (Francisco-Candeira i sar., 2007; Muzzalupo i sar., 2010; Varela i sar., 2007; Šiler, 2012) ali nisu pronađeni literaturni podaci o primeni ovoga načina detekcije kao u opisanoj proceduri primenjenoj

u okviru ove doktorske disertacije. Ovaj način detekcije fragmenata *PCR* reakcija ne zahteva korišćenje fluorescentno obeleženih prajmera.

Jedna od prednosti sistema detekcije za analizu fragmenata uz pomoć *Agilent 2100 Bioanalyzer* sistema u odnosu na automatske sekvenatore je ta da, kada analize obuhvataju manji obim uzoraka (200-300), cena analize po uzorku je značajno niža usled toga što analiza fragmenata na automatskim sekvenatorima zahteva vrlo visoka inicijalna ulaganja.

Jedan od noviteta koji je primenjen u ovoj disertaciji se ogleda u korišćenju internih standarda za dužinu koji su dodavani kombinacijama mikrosatelitskih lokusa u cilju preciznog određivanja dužine amplifikovanih mikrosatelitskih alela. Naime, *Agilent DNA 1000 Kit* čipovi (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD*), može da pruži maksimalnu rezoluciju od ~5 bp

(<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?crumbAction=push&pageId=1636>).

Međutim, korišćeni lokusi imaju mikrosatelitske motive od 3 do 6 bp, što je blizu deklarisanе rezolucije čipova. Stoga je upotreba internih standarda za dužinu fragmenata, koji ne pokrivaju opseg veličina alela, ali se fizički nalaze u njihovoj blizini, bila nametnuti izbor ali je postignuta neophodna tačnost detekcije dužina amplikona.

Takođe, produkti različitih lokusa kojima se ne preklapaju opsezi dužina alela, su pre nanošenja na čipove za kapilarnu elektroforezu pomešani (metoda mešanja amplikona), koja je široko korišćen pristup pri analizi fragmenata na automatskim sekvenatorima (Ghislain i sar., 2004). Ovaj način detekcije značajno je umanjio troškove i vreme potrebno za analize.

Informativnost razvijenih EST-SSR markera

Polimorfnost osam razvijenih *EST-SSR* molekularnih markera, koja iznosi 88,88%, je bliska vrednostima koje su zabeležene u sličnim istraživanjima (Gupta i sar., 2003; Vukosavljev i sar., 2015; Chen i sar., 2015; Wang i sar., 2014). Takođe, prosečan broj alela po lokusu od 6,75 je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima sličnih istraživanja sprovedenih sa *EST-SSR* markerima (Postolache i sar., 2014; Raveendar i sar., 2015). Nešto viši prosečan broj različitih alela po lokusu od zabeležen je u istraživanjima grupe

autora Vukosavljev i sar. (2015), koji su mikrosatelitske lokuse identifikovali u okviru mnogo većeg obima sekvenciranih podataka.

EST-SSR markeri čiji se aleli amplifikuju kod nekih vrsta ili populacija, dok se kod drugih ne amplifikuju su posebno informativni u opisivanju genetičkih odnosa vrsta i populacija roda *Centaurium*. U okviru istraživanja transferabilnosti novorazvijenih *EST-SSR* markera, uočeno je da se marker *M4* uopšte nije amplifikovao u vrstama *C. pulchellum* i *C. tenuiflorum*. Iako je neophodno uraditi istraživanja na obimnijem uzorku, ovaj marker može biti veoma informativan, ukoliko se pokaže njegova diskriminatorska sposobnost za pojedine vrste roda *Centaurium*. Sličan princip se može primeniti i za alele koji se amplifikuju, ali diferencijalno za različite grupe jedinki. Prisutnost privatnih mikrosatelitskih alela populacija i vrsta može pružiti veliku informativnost i dati uvid i osnovu za dobar odabir mikrosatelitskih markera za buduća istraživanja diverziteta i hibridizacije u okviru ovog roda.

Sa druge strane, sa stanovišta proučavanja konkretnog pitanja međuvrsne hibridizacije vrsta roda *Centaurium*, možda još veću informativnost pružaju aleli koji su zajednički za (potencijalno) hibridni takson (*C. pannonicum*) i jedan od taksona za koji se pretpostavlja da učestvuju u hibridizaciji (*C. littorale* ssp. *compressum* ili *C. erythraea*). U okviru ovog istraživanja uočeno je čak 16 alela koje dele vrste *C. erythraea* i *C. pannonicum* a ne poseduju ih populacije *C. littorale* ssp. *compressum*. Navedena činjenica predstavlja potvrdu genetičke sličnosti vrste *C. erythraea* hibridnom taksonu. Podatak sugerise da je neka od populacija *C. erythraea* svojim genofondom učestvovala u hibridizaciji. Takođe, postoji ukupno 5 alela koji su zajednički za *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum*, što navodi na zaključak da je upravo podvrsta *C. littorale* ssp. *compressum* druga vrsta koja je uključena u hibridizaciju. Postojanje samo dva alela zajednička za vrstu *C. erythraea* i podvrstu *C. littorale* ssp. *compressum*, a koji se ne javlja kod jedinki *C. pannonicum* se može objasniti slučajnim procesima, tj. ograničenim brojem jedinki koje su učestvovala u formiranju ovog taksona.

Sa stanovišta broja diferencijalno eksprimiranih alela kod analiziranih taksona, marker *M10* se pokazao kao najinformativniji. Naime, od 10 alela ovog markera tri alela su se amplifikovala kod populacija vrste *C. erythraea* i populacija okarakterisanih kao *C. pannonicum* a kod populacija podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* amplifikacija nije

uočena. Još jedan alel ovog markera pokazao kao veoma informativan jer se amplifikovao kod populacija *C. littorale* ssp. *compressum* i kod populacija okarakterisanih kao *C. pannonicum* ali ne i kod populacija vrsta *C. erythraea*.

Pored markera sa velikim brojem alela čije diferencijalno odsustvo u jednom od roditeljskih taksona ukazuje na hibridizaciju, veću verodostojnost pružaju aleli visoke učestalosti u jednom od roditeljskih taksona i *C. pannonicum*, a potpuno odsustvo kod drugog roditeljskog taksona. Ovakvo svojstvo pokazuju alel od 146 bp lokusa *M4*, alel od 105 bp lokusa *M7* i alel od 256 bp lokusa *M12*, koji su veoma učestali u populacijama *C. erythraea* i *C. pannonicum*, a potpuno izostaju u populacijama *C. littorale* ssp. *compressum*. Takođe, alel od 95 bp lokusa *M7* pojavljuje se u visokoj učestalosti kod populacija *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*, a nema ga kod populacija *C. erythraea*.

Zanimljivo je i postojanje pojedinih alela kod populacija *C. pannonicum* kojih potpuno izostaju kod populacija *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*. Alel dužine 176 bp lokusa *M4* prisutan u visokoj učestalosti kod populacija *C. pannonicum* i pri tom nije detektovan kod druge dve vrste. Takođe alel od 129 bp *M5* lokusa prisutan je u visokoj učestalosti kod obe populacije *C. pannonicum*, dok je kod populacija *C. erythraea* izuzetno redak, a kod populacija *C. littorale* ssp. *compressum* je potpuno izostaje. Isti obrazac uočen je i za alel od 170 bp lokusa *M17*. Donekle slično, alel od 130 bp lokusa *M7* je čest kod populacija *C. pannonicum*, dok je od ostalih taksona prisutan samo u jednoj populaciji *C. erythraea* i to u maloj učestalosti.

Takođe zanimljivo je odsustvo nekih alela kod *C. pannonicum* koji su prisutni u visokim učestalostima kod druge dva taksona. Alel od 90 bp lokusa *M7* se javlja sa veoma niskom učestalošću samo kod jedne populacije *C. pannonicum*, dok je kod ostala dva taksona prisutan sa visokom učestalošću.

Iako neki od uočenih obrazaca pokazuju odstupanja od hipoteze da je takson *C. pannonicum* nastao hibridizacijom dve vrste, moguće je da je u hibridizaciji učestvovao mali broj jedinki, pa su slučajni genetički procesi, donekle odgovorni za uočeni obrazac učestalosti alela.

Genetički diverzitet ispitivanih populacija

Najveći izazov u analizi genetičke varijabilnosti poliploidnih populacija pomoću kodominantnih genetičkih markera je nemogućnost detekcije tačnog broja alela heterozigotnih genotipova. Zbog nedostatka metodoloških pristupa rešavanju problema alelskih doza kod poliploidnih vrsta, mnogi autori (Hansen i sar., 2009; Robertson i sar., 2010) su pribegavali tretiranju uočenih alela mikrosatelitskih lokusa kao dominantnih. Međutim, na ovaj način gubi se veliki deo informacija koji ovi markeri obezbeđuju. Neki autori (Esselink, Nybom i Vosman, 2004) su razvili metod za procenu broja alelnih kopija poliploidnih vrsta koji se zasniva na relativnom intenzitetu fluorescencije amplifikovanih fragmenata. Ovaj pristup zahteva veoma veliku preciznost u eksperimentalnom izvođenju, kao i kvalitetne i ujednačene podatke. Čak i kad su ti uslovi ispunjeni, pristup je neprimenjiv kod vrsta čiji je nivo ploidije veći od pet (Helsen i sar., 2009). Različiti načini segregacije hromozoma autoploidna i alopoliploidna, nulti aleli kao i različita učestalost samooplodnje takođe otežavaju detekcije tačnog broja alela heterozigotnih genotipova. Na sreću, upotreba sve razvijenijih i dostupnijih kompjuterskih alata omogućava razvijanje programskih rešenja koja mogu da odgovore na veliki broj izazova koji se postavljaju pred istraživače. Tako se, u okviru ove doktorske disertacije pribeglo korišćenju *polysat* paketa u *R* programskom jeziku (Clark i Jasieniuk, 2011).

Paket *polysat* se, u procesu izračunavanja broja alela prisutnih kod heterozigotnih genotipova poliploidnih populacija sa parnim nivoom ploidije, poznatom stopom samooplodnje, i pod pretpostavkom Hardi-Vajnbergove ravnoteže populacija, oslanja na metode opisane u radu De Silva i sar. (2005). Osnovna premisa primenjenog matematičkog modela u okviru ovog programskog rešenja jeste ponovljena (iterativna; više puta ponovljena) procena broja kopija alela u genotipovima na osnovu učestalosti alela, i obrnuto. Prilikom izračunavanja učestalosti alela u populacijama *polysat* uzima u obzir odgovarajuću ploidnost populacija a ima i mogućnost uključivanja populacija različitog nivoa ploidije u okviru jedne analize, što omogućava adekvatno karakterisanje tetraploidnih i heksaploidnih populacija. *Polysat* programski paket može u analize uvrstiti i parametre stope samooplodnje, za koju je, u okviru ovog istraživanja, uzeta vrednost od 0,55. Ova vrednost predstavlja rezultat sveobuhvatnog istraživanja procesa samooplodnje kod vrste *C. erythraea* (Brys i Jacquemyn, 2011). Od svih parametara u okviru analize podataka *polysat* programskim paketom, jedino je parametar koji se tiče načina

nasleđivanja bio donekle nedosledno primenjen. Naime, *polysat* programski paket pretpostavlja isključivo jedan od načina nasleđivanja za sve populacije, polizomsko ili dizomsko. Zbog ovog ograničenja programskog paketa, sve populacije su tretirane kao autopoliploidne sa polizomskim načinom nasleđivanja. Drugim rečima, potencijalno aloheksaploidna priroda populacija *C. pannonicum* je zanemarena. Iako je evidentno da način nasleđivanja kod poliploidnih vrsta ima veliki uticaj na distribuciju genotipova u populaciji i interpretaciju rezultata, isto tako je nesporno da opisani, jasno razgraničeni načini nasleđivanja predstavljaju ekstremne primere i da se kod velikog broja poliploidnih vrsta faktički ispoljava kombinacija ova dva načina nasleđivanja (De Silva i sar., 2005). Takođe, hipoteza je da heksaploidne populacije okarakterisane kao *C. pannonicum* sadrže tetraploidnu hromozomsku garnituru jedne od vrsta koje hibridizuju te se za taj deo genoma takođe može pretpostaviti polizomski način nasleđivanja. Zbog svega navedenog, kao i usled nemogućnosti bilo kakvog drugog načina izračunavanja učestalosti alela u populacijama, pa samim tim i drugih populaciono-genetičkih parametara, *polysat* programski paket u *R* programskom jeziku (Clark i Jasieniuk, 2011) je iskorišćen u ove svrhe. Opravdanost korišćenje ovog programa (možda može da se potvrdi) ogleda se u činjenicama da su rezultati ovakve analize populacija u potpunosti saglasni sa rezultatima *RAPD* molekularnih markera (kao što će se nadalje iznositi), kao i sa teorijskim pretpostavkama.

Parametri kao što su ukupan i prosečan broj alela po populaciji za svih osam lokusa kao i efektivni broj alela za svaku populaciju imaju donekle više vrednosti zabeležene u populacijama *C. erythraea* i *C. pannonicum*, nego u populacijama *C. littorale* ssp. *compressum*. To ukazuje da su populacije podvrste *C. littorale* ssp. *compressum* pokazale manju varijabilnost primenom konkretnog seta *EST-SSR* markera. Imajući u vidu da su markeri dizajnirani na osnovu transkriptoma vrste *C. erythraea*, i to na osnovu potencijalno polimorfnih sekvenci, potpuno je jasno da kod ove vrste markeri pokazuju veću varijabilnost. Sa druge strane, interesantno je da isti set markera detektuje sličnu varijabilnost kod populacija vrste *C. erythraea* i onih okarakterisanih kao *C. pannonicum*. Ova činjenica takođe ide u prilog stanovištu o većoj genetičkoj bliskosti ovih taksona, i hipotezi da je *C. erythraea* jedna od vrsta koje su učestvovala u formiranju aloploidnih populacija *C. pannonicum*.

Vrednosti heterozigotnosti ispitivanih populacija, bilo da je reč o uočenim (H_o) ili o očekivanim vrednostima (H_e), su veoma visoke, kao što je primećeno i u sličnim istraživanjima poliploidnih taksona (Sampson i Byrne, 2012; Teixeira, Rodríguez-Echeverría i Nabais, 2014). Objašnjenje ovih rezultata svakako se nalazi u činjenici da poliploidne vrste imaju povećanu mogućnost prisustva više od dva alela ukoliko je lokus izrazito polimorfan zbog većeg broja hromozoma na kojima se nalaze aleli. (Ranney, 2006). Takođe, uočene razlike između H_e i H_o vrednosti, koje se kreću od 0,09 do 0,36, ukazuju na značajan udeo fiksirane heterozigotnosti populacija, što se i očekuje kod populacija poliploidnih vrsta (Ranney, 2006).

Važno je primetiti da su, kako vrednosti uočene, tako i očekivane heterozigotnosti, najviše u slučaju populacija *C. pannonicum*, što je u velikom delu posledica heksaploidnosti ovih populacija nasuprot tetraploidnosti ostalih populacija

Takođe, zanimljivo je primetiti da *C. pannonicum*, iako ima viši nivo heterozigotnosti u odnosu na roditeljske taksone, tu heterozigotnost ostvaruje sa manjim brojem alela u odnosu na populacije *C. erythraea*. Prilikom smanjenja veličine populacija, heterozigotnost se manje gubi u odnosu na alele čiji se broj znatno više smanjuje. Ovakav obrazac potvrđuje hipotezu da je mali broj jedinki učestvovao u formiranju ovog taksona. Alternativno, moguće je da su ovi hibridni taksoni zbog smanjene fertiliteti imali manju efektivnu veličinu populacija u toku svoje evolucione istorije. Na žalost još uvek nisu razvijeni programski paketi koji bi mogli da kvantifikuju i sa sigurnošću da detektuju pojavu smanjenja veličine populacija poliploidnih taksona.

Na osnovu alelskih učestalosti, *Polysat* paket ima mogućnost izračunavanja genetičkih distanci između analiziranih jedinki (npr. *Bruvo distance*). *Bruvo* genetičke distance (Bruvo i sar., 2004) su upravo i razvijene za analize mikrosatelitskih markera poliploidnih populacija i vrsta i široko su u upotrebi (na primer: Teixeira, Rodríguez-Echeverría i Nabais, 2014; García-Verdugo i sar., 2013; Ferriol, Merle i Garmendia, 2014). *PCoA* i hijerarhijske klaster analize (**Slike 19 i 20**) su, sem biljaka sakupljenih u prirodi, obuhvatile i biljke iz eksperimentalnih hibridnih ukrštanja, čime je potvrđena uspešnost *ESR-EST* markera i navedenih multivarijantnih analiza u cilju dokazivanja međuvrsne hibridizacije. Grupisanje *F1* hibrida bliže očinskoj biljci, kao i njihovo razdvajanje od majčinskih biljaka je jasno ukazalo na status hibrida, te da je sasvim

opravdano korišćenje ovih analiza i za potvrđivanje međuvrsne hibridizacije u prirodnim populacijama.

Doprinos sprovedenih multivarijantnih analiza razumevanju i karakterizaciji međuvrsne hibridizacije prirodnih populacija se ogleda prevashodno u jasnom grupisanju jedinki koje odgovara pripadnosti jedinki taksonima koji su analizirani (*C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum*, i potencijalno hibridnom taksonu (*C. pannonicum*).

Hijerarhijska klaster analiza *EST-SSR* lokusa, kao i u preliminarnim analizama uz pomoć *RAPD* molekularnih markera, jasno razdvaja biljke vrste *C. erythraea* i *C. pannonicum* sa jedne strane, od jedinki *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. littorale* sa druge strane, naglašavajući još jenom veću genetičku sličnost između vrste *C. erythraea* i *C. pannonicum* u odnosu na *C. littorale* ssp. *compressum*. Genetičko grupisanje *C. erythraea* zajedno sa *C. pannonicum* ima veoma veliku značajnost u tumačenju rezultata jer dva navedena taksona se ne nalaze na zajedničkim lokalitetima te je ovakva potvrda njihove bliskosti važna i sa stanovišta dokazivanja samih vrsta koje su stupile u hibridizaciju. Sa druge strane, grupisanje dve jedinke vrste *C. littorale* poreklom iz Nanta, zajedno sa ostalim jedinkama podvrste *C. littorale* ssp. *compressum*, kao što je to bio slučaj i sa *RAPD* markerima, ukazuje da je reč o blisko srodnim taksonima. Odstupanja od strogo navedenog grupisanja postoje u dva slučaja jedinki *C. pannonicum* koje se grupišu bliže podvrsti *C. littorale* ssp. *compressum*. Moguća objašnjenja leže u činjenici da su jedinke *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum* morfološki veoma slične i da postoji mogućnost da je došlo do pogrešne determinacije pri sakupljanju biljnog materijala. Drugo objašnjenje je da, sa obzirom na njihovu pretpostavljenu hibridnu prirodu, je slučajnost uvrštenih individua i alela koje poseduju, uzrokovala veću sličnost hibridnih jedinki i podvrste *C. littorale* ssp. *compressum*. S obzirom da nema u potpunosti diskriminativnih lokusa, i da tri vrste u određenoj meri dele alele, po zakonima verovatnoće je i logično očekivati da će mali broj jedinki jednog taksona sadržati genotip koji će ih grupisati ka jedinkama drugog taksona. Još jedno odstupanje od striktnog grupisanja se ogleda u bliskosti dve jedinke *C. erythraea* poreklom sa lokaliteta **BV** sa ostalim jedinkama *C. pannonicum*. U ovom slučaju potpuno je isključena mogućnost pogrešnog determinisanja jer se jedinke jasno morfološki razlikuju i ne rastu u simpatriji. Populacija sa lokaliteta **BV** je i uvrštena u analize kao populacija koja bi potencijalno mogla biti filogenetski najbliža populacijama *C. erythraea* koje su stupile u hibridizaciju

pri formiranju *C. pannonicum*. **BV** je prostorno najbliži lokalitetima na kojima je pronađen *C. pannonicum*. U ovom kontekstu, moguće je sagledati ovaj rezultat analize *EST-SSR* markerima, kao pokazatelj bliskost biljka *C. pannonicum* baš sa populacijom vrste *C. erythraea* sa lokaliteta **BV**.

Rezultati upotrebljenih mikrosatelitskih lokusa poliploidnih jedinki su nepotpuni u smislu tačnih alelskih doza i, ukoliko se na neki način ne izvrše aproksimacije i pretpostavke o tačnom broju alela unutar poliploidnih genotipova (kao što je to učinjeno u prethodnim analizama uz pomoć programskog paketa *polysat*), rezultati ove analize mogu se posmatrati zbirno tj. mogu se razmatrati kao multilokusni alelni fenotipovi za svaku jedinku (Sampson i Byrne, 2012; Zozomová-Lihová i sar., 2014). Multilokusni alelni fenotipovi nisu genotipovi jedinki jer ne sadrže informacije o broju kopija prisutnih alela već samo informaciju o tome koji su aleli prisutni. Jedino u slučaju kada je reč o jedinkama koje su homozigotne ili pak o jedinkama koje imaju onoliko različitih alela kolika im je i ploidnost odgovarajućem multilokusnom fenotipu može biti određen tačan genotip (Sampson i Byrne, 2012). Zbog toga se, u naučnoj literaturi često govori o multilokusnim alelnim fenotipovima (Sampson i Byrne, 2012; Zozomová-Lihová i sar., 2014; Stabile i sar., 2016). Iako se tretiranjem rezultata mikrosatelitskih markera sagledavanjem multilokusnih alelnih fenotipova gubi dosta genetičke informacije koju mogu pružiti kodominantni mikrosatelitski lokusi (Clark i Jasieniuk, 2011), ovim pristupom analiziraju se sirovi podaci, bez potrebe za bilo kakvim pretpostavkama i aproksimacijama, vezanim za način nasleđivanja, stopu samooplodnje, ploidnost populacija idr. Vizualizacija odnosa među multilokusnih alelnih fenotipova urađena je takođe pomoću *Bruvo* genetičkih distanci, ovoga puta računatih na osnovu multilokusnih alelnih fenotipova, i predstavljena je mrežom minimalnog raspona koja trodimenzionalno povezuje multilokusne fenotipove uz pretpostavku njihovih minimalnih međusobnih udaljenosti. Preko ovakve vizuelizacije mogu se sagledati međusobni odnosi, grupisanje i broj multilokusnih fenotipova. Grupisanje jedinki i populacija preko multilokusnih fenotipova u potpunosti odgovara grupisanjima koja su uočena i uz pomoć *PCoA* i hijerarhijske klaster analize i mogu se sagledati tri osnovna pravca grupisanja koji vode ka taksonima *C. erythraea*, *C. littorale* ssp. *compressum* ili jedinkama okarakterisanim kao *C. pannonicum*. Uočljiva je veća bliskost *C. pannonicum* sa *C. erythraea* nego sa *C. littorale* i *C. littorale* ssp. *compressum*.

Analiza multilokusnih genotipova (fenotipova) se često koristi u istraživanjima koje obuhvataju vrste koje pokazuju klonalnu reprodukciju, kao što su gljivični patogeni (Kepler i sar., 2015; Weiland i sar., 2015), pošto identični multilokusni fenotipovi upravo ukazuju na ovakav načina razmnožavanja. Vrste roda *Centaurium* razmnožavaju se isključivo putem semena a klonalna reprodukcija nije prisutna. Usled toga, pretpostavka je da se 13 multilokusnih fenotipova koji se javljaju kod dve, ili u jednom slučaju kod tri individue ispitivanih populacija, posledica slučajnog uzorka individua i alela koji se javljaju kod njih. Pojava identičnih multilokusnih fenotipova javila se samo u okviru populacija i u okviru istih taksona. Sa druge strane mogućnost pronalaženja istog multilokusnog alelnog fenotipa kod organizama sa seksualnom reprodukcijom je veoma niska (Martínez-Garrido i sar., 2016), te je potrebno upotrebiti veći broj markera u ovakvom pristupu.

Doprinos kvantitativne hemijske analize razmatranju međuvrsne hibridizacije roda *Centaurium*

Biljke analizirane u ovom delu istraživanja gajene su u kontrolisanim uslovima staklenika kako sredinski uslovi ne bi uticali na sadržaj sekundarnih metabolita u njihovim tkivima. Kvantitativni sadržaj hemijskih jedinjenja u biljnom materijalu svakako zavisi od genetičkih faktora tj. od genetičke konstitucije individua ali može značajno da varira od uslova spoljašnje sredine i životnog stadijuma biljaka (Sheorey i Tiwari, 2011; Dong i sar., 2011; Schlag i McIntosh, 2012). Preliminarna kvantifikacija sekoiridoidnih glukozida kod biljaka eksperimentalnih međuvrsnih ukrštanja gajenim u uslovima *in vitro* su veoma jasno ukazala na važnost ujednačavanja uslova gajenja biljaka, pa i kada je reč o primeni ovih metoda u razmatranjima vezanim za proces hibridizacije. Gajenje biljaka u uslovima *in vitro* pruža najveći mogući stepen kontrole sredinskih faktora na rasteenje i razviće biljaka dovodeći do drastičnih modifikacija primarnog i sekundarnog metabolizma, a podrazumevaju i delimičnu heterotrofnost usled dostupnosti izvora ugljenika - saharoze u hranljivoj podlozi. Gajenjem biljaka u uslovima staklenika omogućeni su ujednačeni uslovi podloge za gajenje, vlažnosti, temperature, svetlosti, a istovremeno je postignuta sinhronizacija rasta biljaka poreklom iz različitih populacija. Osim toga, biljke su potpuno autotrofne. Na ovaj način je umanjena

fenotipska varijabilnost između populacija i individua koja nastaje zbog uticaja sredine pružili su jasnu sliku razlika između analiziranih vrsta i populacija.

Prethodna fitohemijska istraživanja različitih vrsta roda *Centaureum* su pokazala prisustvo različitih sekundarnih metabolita, uključujući terpenoide (monoterpenoide, seskviterpenoide, diterpenoide, i triterpenoide), fenole (fenolne kiseline, flavonoide i ksantone), alkaloidne i steroide (pregled je dat u poglavlju objavljenom od strane Šiler i Mišić, 2016). U okviru ove doktorske disertacije urađena je kvantitativna fitohemijska analiza koja je obuhvatila 20 odabranih jedinjenja iz grupe sekoiridoidnih glukoza i fenola u nadzemnim delovima *C. erythraea*, *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*. Od pomenutih 20 analiziranih jedinjenja koja su uvršćena u ispitivanja, flavanon naringenin je prvi put identifikovan kod vrsta roda *Centaureum* u ovom istraživanju.

Međuvrsna hibridizacija kod biljaka može da rezultuje u kvalitativnim i kvantitativnim razlikama u sadržaju sekundarnih metabolita, koje mogu biti adaptivne (Orians, 2000). U literaturi se mogu naći i slučajevi gde neka od jedinjenja koja su prisutna kod roditeljskih taksona nedostaju kod hibridnih, ili, pak, da se kod hibrida mogu pojaviti jedinjenja koja nisu detektovana kod roditeljskih taksona (Orians, 2000). Međutim u proučavanom primeru međuvrsne hibridizacije nisu zapažene značajne kvalitativne razlike u sadržaju sekundarnih metabolita između roditeljskih vrsta i hibridnog taksona (rezultati nisu predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije), što nije iznenađujuće, ako se uzme u obzir da se radi o blisko srodnim vrstama. Kvantitativne razlike koje se mogu zapažati kod hibridnih jedinki mogu se ogledati kroz intermedijarne, povećane ili smanjene koncentracije sekundarnih metabolita u odnosu na oba roditeljska taksona (Orians, 2000). Podaci dobijeni analizom sadržaja 20 odabranih jedinjenja na ispitivanom uzorku hibridnih i roditeljskih taksona ukazale su na mogućnost postojanja svih navedenih kombinacija. Objašnjenja ovih pojava mogu se pronaći kako na genetičkom, tako i na epigenetičkom nivou. Nakon formiranja hibrida i poliploida dolazi do različitih, uslovno rečeno, ranih i kasnih promena na genetičkom materijalu (Hegarty i Hiscock, 2005; Ranney, 2006; Wendel, 2015). Tako se, kod alopoliploida sreće ne samo višestrukost već i prisutnost dva ili više različitih genoma što pruža mogućnosti veće hemijske fleksibilnosti i ispoljavanja najrazličitijih interakcija i alternacija biosintetskih puteva i regulatornih mehanizama. Kod novoformiranih alopoliploida veoma rano (u

okviru nekoliko generacija) zapažene su promene na nivou DNK sekvenci koje se ogledaju u delecijama i insercijama, nukleotidnim supstitucijama, hromozomskim rearanžmanima (Chen i Ni, 2006; Wendel, 2015). Takođe, kada je reč o sekundarnom metabolizmu, ne smeju se izgubiti iz vida i različite promene koje se tiču same regulacije ekspresije gena, a koje se mogu dešavati na nivou transkripcije, translacije i postranslacionih modifikacija (Chen i Ni, 2006). Uslovno rečeno, različiti biosintetski putevi mogu različito odgovoriti na hibridizaciju i poliploidizaciju. Sve ove promene na genetičkom materijalu mogu voditi do promena na nivou proteina, imati posledica na fiziološke procese i mogu se izraziti i na fenotipskom nivou, te mogu uticati na celokupno funkcionisanje biljke kao živog sistema u datom ekološkom okruženju.

Sadržaj sekundarnih metabolita biljaka predstavlja kvantitativnu karakteristiku, koja se može iskoristiti za opisivanje razlika i sličnosti unutar i između taksona i može pružiti uvid u veze između genotipa i fenotipa (Saito i Matsuda, 2010).

Prvi pregled dobijenih rezultata kvantifikacije 20 jedinjenja kod analizirane 82 jedinke predstavljen je mapom raspodele skaliranih (od 0 do 1) koncentracija svakog od jedinjenja. Iako je ovaj pristup samo ilustrativno predstavljanje rezultata, ukazao je na razlike između jedinki koje pripadaju analiziranim taksonima, te da ima osnova rezultate podvrgnuti statističkim alatima koji bi egzaktnije ukazali na takve pretpostavke.

Prvo opažanje koje je proisteklo iz *PCA* je da u okviru analiziranih taksona nije uočljivo grupisanje jedinki po populacijama ili lokalitetima sa kojih potiču. Sa druge strane, uočeno je odvajanje jedinki vrste *C. erythraea* od druga dva taksona, od *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*. Razdvajanje taksona *C. littorale* ssp. *compressum* i jedinki okarakterisanih kao *C. pannonicum* bilo je slabo izraženo u okviru ove analize. Ipak, doprinos *PCA* razmatranjima vezanim za hibridizaciju ovih taksona i leži upravo u činjenici da je ukazala na postojanje razlike između vrste *C. erythraea* i druga dva taksona.

Ovakav rezultat se može objasniti biološkom pozadinom pomenutih taksona. Populacije *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum* nalaze na istim lokalitetima u uslovima simpatrije dok na tim lokalitetima odsustvuje vrsta *C. erythraea*. Smatra se da upravo diferencijalna produkcija sekundarnih metabolita predstavlja mehanizam adaptacije biljne vrste na različite ekološke faktore (zaštita od mikrobnih infekcija,

herbivora, kao atraktanti itd.). U ovom svetlu, sasvim je očekivano da srodne vrste, koje su prilagođene na život u veoma sličnim ekološkim okolnostima, u okviru istih lokaliteta, pokažu i veću fitohemijsku bliskost.

Hijerarhijska analiza klastera je jasnije prikazala razlike koje su prisutne između jedinki okarakterisanih kao *C. pannonicum* i jedinki *C. littorale* ssp. *compressum*. Na osnovu nje može se zaključiti da se grupisanje jedinki podudara sa njihovim taksonomskim statusom, uz određena odstupanja.

Nekoliko jedinki *C. pannonicum* sa lokaliteta **MJ** se grupišu sa jedinkama vrste *C. erythraea*, što ide u prilog aloploidnom poreklu *C. pannonicum*. U ovom slučaju ne može biti reč o pogrešnom uzorkovanju jer se vrste jasno morfološki razlikuju i ne nalaze se na zajedničkim lokalitetima. Drugo objašnjenje je da njihova fitohemijska bliskost potiče od filogenetskog srodstva. Drugo neslaganje u uočenim grupisanjima predstavlja nekoliko jedinki vrste *C. littorale* ssp. *compressum* sa lokaliteta **PA** koje se grupišu sa jedinkama *C. pannonicum*. Hibridizacija i u ovom slučaju može da predstavlja odgovor na uočenu nepodudarnost ali se mora imati u vidu da je možda ipak došlo do pogrešne determinacije biljaka, jer su vrsta *C. littorale* ssp. *compressum* i hibridni takson *C. pannonicum* morfološki veoma slične. Još jedan (uzorak *C. pan.* 6**PA**'14; **Slika 18**) se grupisao uz jedinke vrste *C. erythraea*, i po svim parametrima pokazao karakteristike i pripadnost populacijama vrste *C. erythraea*. Fotografije toka eksperimenta nesumnjivo su potvrdile da ova jedinka i morfološki potpuno odgovara habitusu vrste *C. erythraea*, te je njeno grupisanje zajedno sa ostalim jedinkama *C. erythraea* ohrabrujuće, sa stanovišta poverenja u primenjene statističke metode. Pretpostavka je da je, do pogrešnog svrstavanja ove jedinke među jedinke *C. pannonicum*, došlo usled greške koja se potkrala pri rukovanju biljnim materijalom.

LDA je klasična supervizovana statistička metoda koja za cilj ima klasifikaciju objekata na osnovu njihovih karakterističnih svojstava (McLachlan, 2004), a u okviru ove teze je iskorišćena za taksonomsko predviđanje srodnih taksonomskih kategorija na osnovu kvantitativnog sadržaja odabranih sekundarnih metabolita. *LDA* model koji je obuhvatio svih 20 jedinjenja i tri taksona (*C. erythraea*, *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum*) pokazao je visoku tačnost pri diskriminaciji taksona, što je potvrđeno unakrsnom validacijom samodelu nepoznatim uzorcima .

Korišćenje *LDA* za određivanje pripadnosti jedinki definisanim grupama na osnovu fitohemijskih podataka, je čest pristup u hemotaksonomiji. Međutim, većina radova (Giansante, Di Vincenzo i Bianchi, 2003; Kusari i sar., 2009; Xue i sar., 2012; Kim i sar., 2012) ne obuhvata korišćenje objektivnih merila performansi konstruisanih modela, kao što je unakrsna validacija, a kada slična istraživanja i prikažu nekakvo merilo tačnosti modela, vrše to na osnovu uzorka koji su korišćeni prilikom konstrukcije samog modela, što je optimistična i izuzetno subjektivna ocena tačnosti konstruisanog modela.

Dobijeni *LDA* model je dalje pojednostavljen redukcijom varijabilnosti koja proističe iz samog broja korišćenih svojstava (u ovom slučaju kvantitativni sastav svakog od jedinjenja) u cilju povećanja tačnosti klasnog predviđanja na modelu nepoznatim uzorcima. Ovo je dovelo do izdvajanja pet jedinjenja na osnovu kojih je konstruisan redukovani *LDA* model koji pokazuje bolju tačnost predviđanja taksona u odnosu na pun model. Oskudni su literaturni podaci o istraživanjima koji na osnovu sprovedenih statističkih modela pristupaju redukciji broja jedinjenja koja bi sa istim uspehom bila primenjena u predviđanju pripadnosti nepoznatih uzoraka. U istraživanju Kim i saradnika (2012) testiranje pripadnosti taksonima 39 jedinki je izvršeno na osnovu 395 jedinjenja, dok je redukovani model uspeo da sa čak 129 jedinjenja postigne sličan nivo predviđanja pripadnosti nepoznatog uzorka.

Prednosti pristupa primenjenog u okviru ove doktorske disertacije ogleda se u velikoj interpretabilnosti i realnoj mogućnosti korišćenja rezultata u klasifikaciji nepoznatih uzoraka. Pored navedenog, velika prednost ovog modela ogleda se u činjenici da iziskuje kvantifikaciju četiri puta manjeg broja jedinjenja što značajno pojeftinjuje kvantitativnu analizu.

Aloheksaploidni takson *C. pannonicum*

Celokupna istraživanja molekularnim i hemijskim markerima u okviru ove doktorske disertacije, zajedno sa rezultatima nivoa ploidijske ispitivanih taksona, idu u prilog hipotezi o aloheksaploidnom poreklu taksona *C. pannonicum* (Slika 32 a i c) i ukazuju na dve vrste koje su učestvovala u hibridizaciji: *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* (Slika 32 b i c).



Slika 32: Izgled biljaka okarakterisanih kao *C. pannonicum* i *C. littorale* ssp. *compressum*: **a-** *C. pannonicum* na lokalitetu **PA** 2016. godine; **b-** *C. littorale* ssp. *compressum* na lokalitetu **MJ** 2016. godine; **c-** izgled cvetova biljaka gajenih u uslovima staklenika, a poreklom sa lokaliteta **PA** (2014); **d-** četiri meseca stare biljke u uslovima staklenika, sa leva na desno: *C. erythraea* **BE**, *C. erythraea* **IV**, *C. pannonicum* **MJ**, *C. pannonicum* **PA**, *C. littorale* ssp. *compressum* **MJ**, *C. littorale* ssp. *compressum* **PA**, *C. littorale* ssp. *compressum* **HA**.

Analize ploidnosti su jasno ukazale na postojanje različitih nivoa ploidije ispitivanih prirodnih populacija. Na dva lokaliteta, **MJ** i **PA**, u uslovima simpatrije, dokumentovano je postojanje tetraploidnih populacija vrste *C. littorale* ssp. *compressum* i heksaploidnih populacija *C. pannonicum* (Slike 32 i 33). Različiti nivoi ploidije upućuje na postojanje reproduktivne izolacije. Naime, autopoliploidne i alopoliploidne biljke su obično rezistentne, postojane na introgresiju roditeljskim taksonima zbog razlika u broju hromozomskih garnitura (Hegarty i Hiscock, 2005). Ukrštanje poliploidnih biljaka sa roditeljskim taksonima niže ploidije daje potomstvo sa neparnim brojem hromozomskih garnitura koje može biti vijabilno, ali je mahom sterilno ili produkuje nebalansirane gamete sa izraženom aneuploidijom. Jedinke kod kojih bi relativna količina DNK po ćeliji ukazala na prisustvo neparnih hromozomskih setova ili aneuploidnih kariotipova nisu pronađene u biljnom materijalu poreklom sa pomenutih lokaliteta tako da rezultati

analiza jasno ukazuju na reproduktivnu izolaciju ova dva taksona koji pak rastu u uslovima simpatrije.



Slika 33: a, b i c - Lokalitet Majdan (MJ) i d - Palić (PA) na kojima su pronađene aloheksaploidne populacije biljaka okarakterisane kao *C. pannonicum*.

Vrsta *C. erythraea* i takson okarakterisan kao *C. pannonicum* nisu pronađeni u okviru istih lokaliteta (**Slika 31**). Shodno pretpostavci (hipoteza) da je upravo vrsta *C. erythraea* učestvovala u međuvrskoj hibridizaciji, a koja se pokazala opravdanom, u analize molekularnim markerima uvršćene su populacije vrste *C. erythraea* sa područja Fruške Gore i jedna populacija sa lokaliteta **BV**, koja predstavlja najbližu pronađenu populaciju vrste *C. erythraea* lokalitetima **MJ** i **PA** (**Slika 32**). Preliminarne analize *RAPD* molekularnim markerima kao i analize novorazvijenim setom od osam *EST-SSR* molekularnih markera nedvosmisleno su uputile na genetičku sličnost (bliskost) vrste *C. erythraea* i biljaka okarakterisanih kao *C. pannonicum*, što je i dalo argumente u korist pretpostavke da je upravo *C. erythraea* takson koji je učestvovao u hibridizaciji.

Sa druge strane, kvantitativna akumulacija dvadeset odabranih jedinjenja prisutnih kod jedinki odabranih populacija i hemometrijske analize sprovedene uz pomoć

ovih podataka, pokazale su izdvajanje biljaka okarakterisanih kao *C. pannonicum* od druga dva taksona. Taksoni *C. littorale* ssp. *compressum* i *C. pannonicum* su morfološki veoma slični, uz napomenu da se razlike u građi cvetova (Slika 32 c) i obliku listova ipak jasno mogu uočiti u prirodnim populacijama kod zrelih biljaka u cvetu. Razlike u obliku listova rozete kod biljaka starih četiri meseca u uslovima staklenika su takođe uočljive (Slika 29 d). Sve navedeno ide u prilog hipotezi da je podvrsta *C. littorale* ssp. *compressum* drugi takson koji je učestvovao u hibridizaciji pri nastajanju heksaploidnog taksona *C. pannonicum*.

Jedini blisko srodan takson, koji raste na lokalitetima okoline Subotičko-horgoške peščare je *Centaureum pulchellum*. Ova jednogodišnja vrstase morfološki uočljivo razlikuje od ostalih taksona uključenih u međuvrsku hibridizaciju. Takođe, rezultati preliminarnih *RAPD* analiza, analiza količine DNK po ćeliji metodom protočne citometrije (Banjanac i sar., 2014), kao i činjenica da ova vrsta poseduje disploidni tetraploidni genom ($x=9$) isključuju ovu vrstu kao takson koji bi potencijalno učestvovao u formiranju heksaploidnog hibridogenog taksona *C. pannonicum*.

Hibridne biljke pronađene su na lokalitetima **MJ** i **PA**, koji su međusobno geografski udaljeni svega 20-ak kilometara vazdušnom (Slika 31). Rezultati svih sprovedenih analiza su potvrdili grupisanost jedinki na osnovu pripadnosti vrstama dok grupisanje u okviru populacija nije izraženo. Iako prostorno odvojene, populacije hibridnog taksona nisu pokazale značajne razlike među sobom. Takođe, činjenica da su sadašnji lokaliteti **MJ** i **PA** prostorno odvojeni ne znači da su bili i u skorijoj prošlosti. Ova dva lokaliteta predstavljaju zaostale delove nekadašnjih otvorenih stepskih krajolika koja su usled odredaba zaštite prirode pošteđeni bar nekih uticaja koje je izvršio čovek svojom delatnošću. Genetička sličnost jedinki dve populacije hibridnog taksona, kao i pretpostavka da je sadašnji fragmentisani raspored populacija nastao sekundarno u skorijoj prošlosti navodi na pretpostavku da je postojao samo jedan događaj međuvrsne hibridizacije.

Za mnoge vrste koje se oprašuju uz pomoć insekata i ne poseduju specifične načine rasejavanja, kao što je to slučaj sa vrstama roda *Centaureum*, karakteristično je da se razmena gena skoro isključivo odvija putem protoka polena (Van Rossum, 2009). Oprašivanje biljaka roda *Centaureum* vrše najčešće insekti koji spadaju u grupe

oprašivača koji prenose polen na malim (do, 200 m), pa bi sa ovog aspekta protok gena između dve populacije bio onemogućen. Stoga, odsustvo diferenciranosti populacija može biti posledica i sličnih ekoloških sredina koje naseljavaju dve populacije, te sličnosti u evolucionim pritiscima.

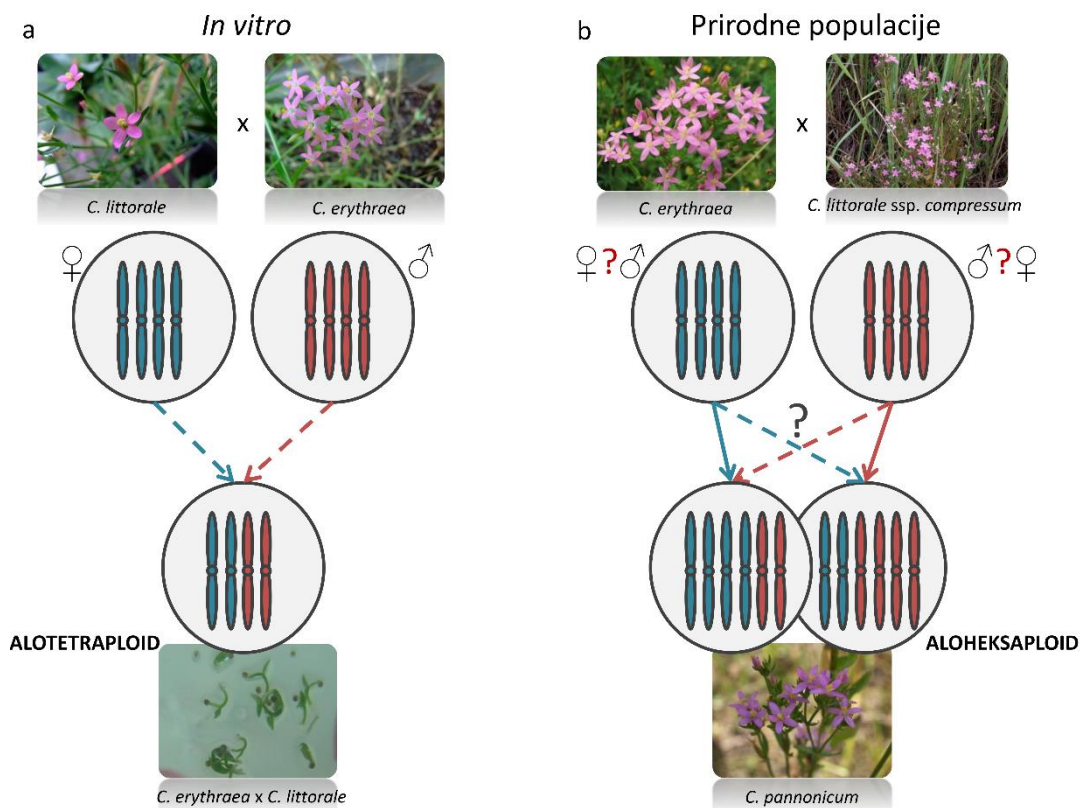
Hibridizacija i poliploidizacijavrstu *C. erythraea* ssp. *erythraea* i *C. littorale* ssp. *littorale* na lokalitetima okoline Lankašira (Velika Britanija) i sličnim područjima Nemačke i Danske je bila tema detaljnog istraživanja sprovedenog na osnovu morfoloških, citogenetičkih i ekoloških podataka (Ubsdell, 1979). Aloheksaploidni takson nastao ovim ukrštanjem opisan je kao nova vrsta pod nazivom *C. intermedium* (Wheldon) Druce (Ubsdell, 1979). Više je razloga zašto se aloheksaploidni takson neformalno označen kao *C. pannonicum* ne može izjednačiti sa navedenim hibridom obale Lankašira. Prvi razlog leži u činjenici da, iako u oba primera međuvrsne hibridizacije učestvuju iste vrste (*Centaureum littorale*), prilično je jasno da su u pitanju različite podvrste (ssp. *littorale* i ssp. *compressum*). Osim toga, nisu pronađeni literaturni podaci o hibridnim formama na prostorima između Lankašira i Subotičko-horgoške pešcare. Zbog ovoga se, kao najverovatnija, nameće pretpostavka da su dva hibridna taksona nastala nezavisno, te da nema opravdanja da se isto imenuju. Istraživanja u pravcu poređenja ova dva aloheksaploidna taksona je svakako tema koja se otvara ovom doktorskom disertacijom.

Mogući mehanizmi nastanka i održavanja aloheksaploidnih populacija *C. pannonicum*

Polazna činjenica koja se ne sme izgubiti iz vida pri razmatranju mogućih mehanizama nastanka aloheksaploidnih biljaka okarakterisanih kao *C. pannonicum* jeste autotetraploidnost oba roditeljska taksona, *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* (Slika 34). Alotetraploidne biljke eksperimentalnih ukrštanja između vrste *C. littorale* i *C. erythraeae* nastale su spajanjem redukovanih gameta obe roditeljske vrste (Slika 34 a). Aloheksaploidne hibridne biljke su verovatno nastale spajanjem jednog neredukovanog roditeljskog gameta sa četiri haploidne hromozomske garniture i drugog, redukovanih gameta sa dve haploidne hromozomske garniture (Slika 34 b). Opisani način formiranja međuvrsnih hibrida višeg nivoa ploidije od tetraploidnih roditeljskih taksona uključuje redak događaj formiranja neredukovanog gameta, a rezultat je

aloheksaploidna jedinka kod koje su prisutni različiti odnosi roditeljskih hromozomskih garnitura. Više različitih činjenica ide u prilog hipotezi da je upravo na ovaj način formiran heksaploidni hibridogeni takson *C. pannonicum*. U literaturi je opisan mogući mehanizam hibridizacije i poliploidizacije u okviru već poliploidnih taksona, pri čemu nastaje hibrid višeg nivoa ploidije (Slika 1d; Ramsey i Schemske, 1998). Ovaj način poliploidizacije i hibridizacije takođe je predložen i kao najverovatniji način formiranja pomenutog aloheksaploidnog taksona *C. intermedium* (Ubsdell, 1979). Rezultat analize ploidnosti populacija, koji ide u prilog navedenoj hipotezi, je nepostojanje dokaza jedinkama koje sadrže neparne hromozomske garniture ili pak aneuploidne kariotipove, što bi ukazalo na drugačije mehanizme njihovog formiranja (slika 1c; Ramsey i Schemske, 1998; Soltis, Soltis i Tate, 2004). Ipak, ostaje nedoumica oko pitanja koja vrsta je u procesu međuvrsne hibridizacije učestvovala sa četiri hromozomske garniture, a koja sa dve (**Slika 34 b**). Tetraploidni taksoni *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* se po količini jedarnog sadržaja DNK ne razlikuju, tako da je samo na osnovu analiza količine DNK metodom protočne citometrije nemoguće dati pretpostavke o udelu hromozomskih garnitura roditeljskih taksona kod hibrida. Prva hipoteza bi mogla da se iskaže gledištem da je vrsta *C. littorale* ssp. *compressum* donor četiri hromozomske garniture novoformiranom hibridu. Razlozi koji bi mogli da idu u prilog ovoj hipotezi su veća morfološka sličnosti i ekološke preferencija dva pomenuta taksona. Druga, alternativna hipoteza, bi se mogla objasniti većom genetičkom sličnošću taksona *C. erythraea* i *C. pannonicum* pokazanom preko dve vrste molekularnih markera. Analize molekularnim markerima snažno razdvajaju ova dva taksona i približavaju hibridogeni takson drugoj parentalnoj vrsti, *C. erythraea*. Naravno, dodatna istraživanja su potrebna kako bi bilo moguće utvrditi ispravnost ovakvog scenarija. Takođe bi bilo interesantno ustanoviti u kom smeru teče hibridizacija, tj. koja parentalna vrsta igra ulogu polenskog donora i da li, možda, hibridizacija teče u oba smera. Otvorenost ovih pitanja ukazuje na još pravaca budućih istraživanja koja bi vodila ka citogenetičkim metodama brojanja, identifikacije i diferencijalnog bojenja hromozoma *FISH* (eng.: *Fluorescent In Situ Hybridization*) i *GISH* (eng.: *Genomic In Situ Hybridization*) metodama, koje bi mogle da ponude konačan odgovor na pitanje o udelu roditeljskih genoma u hibridnim individuama (Bennett, Kenton i Bennett, 1992; Hegarty i Hiscock, 2005). Upotreba mitohondrijalnih ili plastidnih DNK markera zahvaljujući uniparentalnom nasleđivanju

genoma ovih organela kod biljaka (Neale i Sederoff, 1989), takođe može da pružiti oruđa koja bi pomogla u rasvetljavanju pitanja o udelu roditeljskih vrsta u formiranju hibridnih individua kao i smeru hibridizacije.



Slika 34: Pretpostavljeni modeli formiranja alotetraploidnih hibrida između *C. littorale* i *C. erythraea*, i aloheksaploidnih hibrida između vrsta *C. littorale ssp. compressum* i *C. erythraea*: **a-** formirane alotetraploidnih jedinki iz eksperimentalnih hibridnih ukrštanja, spajanjem redukovanih gameta tetraploidnih roditeljskih vrsta; **b-** nastajanje aloheksaploidnih jedinki prirodnih populacija spajanjem redukovanog gameta jedne tetraploidne vrste i neredukovanog gameta druge tetraploidne roditeljske vrste. Isprekidane strelice predstavljaju redukovane a pune neredukovane gamete koji učestvuju u međuvrskoj hibridizaciji.

Održavanje aloheksaploidnih populacija *C. pannonicum*

Sledeće pitanje koje se postavlja su mogući mehanizmi održavanja novonastalih aloploidna u prirodnim uslovima. Pored uspostavljanja reproduktivne barijere između novonastalog hibrida i roditeljskih taksona, neophodni uslovi za njegovo održavanje su vijabilitet i fertilitet. Uvid u vijabilitet međuvrskih hibrida mogu nam pružiti i eksperimenti međuvrskog ukrštanja sprovedeni na vrstama roda *Centaurium* (Banjanac i

sar., 2014). Naime, svi dobijeni međuvrsni hibridi dobijeni ovim istraživanjem bili su vijabilni. Takođe, do sličnog rezultata dovelo je i ranije istraživanje, gde su vršena međuvrsna ukrštanja biljaka roda *Centaureum* u uslovima staklenika. Postoje i podaci o postojanju tzv. „hibridnih rojeva“ u okviru vrsta ovoga roda, koji svojim postojanjem svedoče upravo o vijabilnosti biljaka nastalih međuvrsnim ukrštanjem (Ubsdell, 1976a; Ubsdell, 1976b; Ubsdell, 1979; Mansion, 2004). Iz iznetog možemo reći da u najvećem broju opisanih slučajeva međuvrsnih ukrštanja biljaka roda *Centaureum*, vijabilnost hibrida ne predstavlja prepreku u nastajanju hibridogenih taksona. Nešto drugačija slika je kada se u razmatranje uvrsti fertilitet ovakvih hibrida. Sve hibridne biljke nastale u eksperimentima međuvrsnog ukrštanja bile su sterilne (Banjanac i sar., 2014). Nebalansirani broj hromozomskih garnitura ili pojave velikih hromozomskih rearanžmana pri hibridizaciji i/ili poliploidiji umnogome mogu doprineti raznim neregularnostima tokom mejoze i samim tim i do sterilnosti (Osborn i sar., 2003; Leitch i Leitch, 2008; Doyle i sar., 2008). Međutim, uopšteno govoreći, biljke poseduju mehanizme koji im omogućavaju da prevaziđu mnoge slične barijere putem samooplodnje i vegetativnog razmnožavanja. Aloheksaploidna priroda *C. pannonicum*, koji, po izvedenim pretpostavkama, sadrži dve hromozomske garniture jednog i četiri hromozomske garniture drugog roditeljskog taksona, daje balansirani genom u smislu homologih sparivanja tokom mejoze, te i veliku verovatnoću formiranja balansiranih gameta i, samim tim, fertilitet. Takođe, za vrste roda *Centaureum* pokazano je da su u velikoj meri samooplodne (Brys, Cauwenberghe i Jacquemyn, 2016), što predstavlja pogodnost kada govorimo o održavanju novoformiranih hibridnih taksona.

Sledeće prepreke koje se nadalje javljaju u održavanju i konačnom uspostavljanju hibridogenih taksona ogledaju se u delovanju ekoloških i evolucionih faktora koji mogu biti i od presudne važnosti. Jedan od preduslova uspešne specijacije je upravo i zauzimanje nove ekološke niše u odnosu na roditeljske taksone, bez obzira da li se hibridogeni takson i dalje nalazi u simpatriji sa roditeljskim vrstama (Ramsey i Schemske, 1998; Tucić, 2003). Dokazi o ovakvim promenama u ekološkim nišama roditeljskih taksona i *C. pannonicum* nisu uočeni ali oni se mogu ogledati u veoma suptilnim promenama u vremenu cvetanja ili preferenciji određenog mikrostaništa. Ovakve razlike je veoma teško opisati i pratiti, ali ne smemo tvrditi da ne postoje. Sa druge strane, kada razmatramo tipove staništa koje naseljavaju vrste *C. erythraea* i *C. littorale* ssp.

compressum, u literaturi postoje navodi koji ukazuju da ove dve vrste pokazuju različite preferencije. Dok se vrsta *C. erythraea* češće nalazi na suvim krečnjačkim zemljištima, a tek retko na ilovastim, peščanim i močvarnim, *C. littorale* ssp. *compressum* ima preferenciju prema zaslanjenim i vlažnim staništima (Jovanović-Dunjić 1973). Takođe, u istraživanju međuvrsne hibridizacije vrsta *C. erythraea* ssp. *erythraea* i *C. littorale* ssp. *littorale* na području okoline Lankašira (Velika Britanija), Nemačke i Danske, kao jedan od zaključaka je i da navedeni taksoni pokazuju različite sklonosti kada je izbor staništa u pitanju, slične kao što je to navedeno za vrste na našim područjima (Ubsdell, 1979). Po ovom istraživanju (Ubsdell, 1979), najverovatnija je pretpostavka da ovi taksoni i stupaju u hibridizaciju kada dođe do narušavanja staništa, mahom ljudskom delatnošću, koje dovodi do kontakta dva taksona. Činjenica je da su lokaliteti **MJ** i **PA** svakako staništa nastala ljudskom delatnošću, te se ne sme izgubiti iz vida da je nastanak hibridnog taksona baš na ovim lokalitetima možda upravo posledica antropogenih promena.

Uspešna hibridna vrsta može ekološki potisnuti jednu ili obe roditeljske vrste i uništiti dokaze svog sopstvenog hibridnog porekla (Mallet, 2007, Guggisberg). Ova poslednja tvrdnja se verovatno može primeniti u primeru hibridizacije *C. erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* jer se na oba pronađena lokaliteta nalaze samo biljke *C. littorale* ssp. *compressum* i hibridnog taksona *C. pannonicum* dok jedinke vrste *C. erythraea* nisu pronađene. *C. erythraea*, kao vrsta koja daje prednost suvljim staništima, je možda potisnuta baš iz tog razloga.

Promene u staništu izazvane ljudskom delatnošću mogu umnogome izmeniti ekološke uslove, pa samim tim i favorizovati neke grupe organizama koje pre narušavanja nisu bile kompetitivne (Soltis i Soltis, 2009). Iako se lokaliteti Majdan i Palić nalaze na zaštićenim područjima ili u neposrednoj blizini, oni ipak predstavljaju staništa nastala ljudskom delatnošću. Tako, iz ove doktorske disertacije proističe zapanjujuće otkriće, da su ljudi potpuno nesvesno možda doveli do stvaranja novog hibridnog taksona koji je svoju ekološku nišu našao upravo na ovom području. Iako je neizvesna sudbina ovog taksona u prirodi, rezultati ove disertacije svakako ukazuju na potrebu zaštite jedinstvenog prirodnog dobra Majdan, koje predstavlja mesto na kome je *in situ* moguće pratiti evolutivne procese i specijaciju.

ZAKLJUČCI

1. Uspješna hibridizacija u uslovima *in vitro* između vrsta *Centaureum erythraea* i *C. littorale*, pri čemu nastaje alotetraploidno potomstvo, ukazala je na nedovoljno efikasne prerproduktivne barijere koje bi sprečile međuvrsku hibridizaciju.
2. Citogenetičke, molekularno-genetičke i fitohemijske tehnike testirane na eksperimentalno dobijenim međuvrskim hibridima u uslovima *in vitro*, pokazale su se kao pogodan alat za utvrđivanje i detekciju ovakvih jedinki u prirodnim populacijama.
3. Potvrđena je međuvrsta hibridizacija između vrsta *Centaureum erythraea* i *C. littorale* ssp. *compressum* na lokalitetima Majdan i Palić (Subotičko-horgoške peščara) na kojima hibridogeni takson raste u simpatriji sa *C. littorale* ssp. *compressum*.
4. Hibridogeni takson, nazvan *Centaureum pannonicum*, je heksaploidnog kariotipa iako su roditeljske vrste tetraploidne, što ukazuje da je prilikom hibridizacije došlo do spajanja jednog diploidnog i jednog tetraploidnog gameta poreklom od različitih roditeljskih taksona.
5. *Lab-on-a-Chip* tehnologija omogućava precizno razlikovanje alela mikrosatelitskih lokusa, pri čemu se dodatna rezolucija postiže dodavanjem internog standarda.
6. *De novo* razvijenim mikrosatelitskim markerima (*EST-SSR*) utvrđeno je da hibridogeni takson konvergira vrsti *C. erythraea*, dok se roditeljske vrste jasno razdvajaju na osnovu genetičkih distanci.
7. Razvijeni *EST-SSR* markeri za osam lokusa su pokazali značajnu informativnost i zadovoljavajuću transferabilnost na druge vrste roda *Centaureum*, omogućavajući dalja istraživanja međuvrsne hibridizacije u okviru ovog roda.

8. Odabran set od 20 dominantnih jedinjenja sekundarnog metabolizma je pokazao visoku diskriminatornu rezoluciju za potrebe tasonomske klasifikacije u slučaju analizirane međuvrsne hibridizacije *Centaurium erythraea* × *C. littorale* ssp. *compressum*. Fitohemijski markeri su ukazali da hibridogeni takson konvergira vrsti *C. littorale* ssp. *compressum*.
9. Redukovani *LDA* model koji uključuje 5 selekcionisanih fitohemijskih markera: svercijamarin, sinapinsku kiselinu, dekuzatin, eustomin i demetileustomin, pokazuje visoku tačnost predviđanja pripadnosti taksonomskim kategorijama.
10. Sveobuhvatna istraživanja ukazuju na postojanje *Centaurium pannonicum* kao novog taksona, koji stabilno održava svoju heksaploidnu genetičku konstituciju u prirodnim populacijama zahvaljujući samooplodnji i drugim vidovima ukrštanja u srodstvu

LITERATURA

- Abdelkrim, J., Robertson, B., Stanton, J.-A. i Gemmell, N. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46, 185–192.
- Ainouche, M. L., Baumel, A., Salmon, A. i Yannic, G. (2004). Hybridization, polyploidy and speciation in *Spartina* (Poaceae). *New Phytol.* 161, 165–172.
- Amjad Ali, M., Tahir Seyal, M., Iqbal Awan, S., Niaz, S., Ali, S. i Abbas, A. (2008). Hybrid authentication in upland cotton through RAPD analysis. *Aust. J. Crop Sci.* 2, 141–149.
- Anđelković, M. i Stamenković-Radak, M. (2013). Geni u populacijama, Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet.
- Arnold, M. L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*, Oxford University Press.
- Arrigo, N. i Barker, M. S. (2012). Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 140–146.
- Asada, K., Salim, V., Masada-Atsumi, S., Edmunds, E., Nagatoshi, M., Terasaka, K., Mizukami, H. i Luca, V. D. (2013). A 7-Deoxyloganetic Acid Glucosyltransferase Contributes a Key Step in Secologanin Biosynthesis in Madagascar Periwinkle. *Plant Cell* 25, 4123–4134.
- Banjanac, T., Šiler, B., Skorić, M., Ghalawenji, N., Milutinović, M., Božić, D. i Mišić, D. (2014). Interspecific *in vitro* hybridization in genus *Centaureum* and identification of hybrids via flow cytometry, RAPD i secondary metabolite profiles. *Turk. J. Bot.* 38, 68–79.
- Barton, N. H. i Hewitt, G. M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113–148.
- Baumel, A., Ainouche, M. L., Misset, M. T., Gourret, J. P. i Bayer, R. J. (2003). Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the

- introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina* × *neyrautii* re-examined. *Plant Syst. Evol.* 237, 87–97.
- Beerhues, L. i Berger, U. (1995). Differential accumulation of xanthenes in methyl-jasmonate- and yeast-extract-treated cell cultures of *Centaureum erythraea* and *Centaureum littorale*. *Planta* 197, 608–612.
- Bennett, S. T., Kenton, A. Y. i Bennett, M. D. (1992). Genomic in situ hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). *Chromosoma* 101, 420–424.
- Bentham, G. i Hooker, J. D. (1876). *Gentianeae*. In: *Genera Plantarum*, London, UK: (Williams, Norgates, Eds.). Lovell & Reeve, 799–820.
- Bertoni, B. W., Astolfi Filho, S., Martins, E. R., Filho, D., Ferreira, C., França, S. de C., Pereira, A. M. S., Telles, M. P. de C., Filho, D. i F, J. A. (2007). Genetic variability in natural populations of *Zeyheria montana* mart. from the Brazilian Cerrado. *Sci. Agric.* 64, 409–415.
- Bleeker, W., Huthmann, M. i Hurka, H. (1999). Evolution of Hybrid Taxa in *Nasturtium* R.Br. (Brassicaceae). *Folia Geobot.* 34, 421–433.
- Bohanec, B. (2003). Ploidy determination using flow cytometry. In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, Springer, 397–403.
- Bolger, A. M., Lohse, M. i Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Botion, L. M., Ferreira, A. V. M., Côrtes, S. F., Lemos, V. S. i Braga, F. C. (2005). Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. *J. Ethnopharmacol.* 102, 137–142.
- Bowers, J. E., Chapman, B. A., Rong, J. i Paterson, A. H. (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422, 433–438.
- Box, G. E., i Cox, D. R. (1964). A analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 211–252.

- Bretagnolle, F. i Thompson, J. D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 129, 1–22.
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D’Souza, T. G. i Schulenburg, H. (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13, 2101–2106.
- Brys, R., Cauwenberghe, J. i Jacquemyn, H. (2016). The importance of autonomous selfing in preventing hybridization in three closely related plant species. *J. Ecol.*
- Brys, R. i Jacquemyn, H. (2011). Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaureum* species. *Ann. Bot.* 107, 917–925.
- Brys, R. i Jacquemyn, H. (2012). Effects of human-mediated pollinator impoverishment on floral traits and mating patterns in a short-lived herb: an experimental approach. *Funct. Ecol.* 26, 189–197.
- Buggs, R. J. A., Chamala, S., Wu, W., Tate, J. A., Schnable, P. S., Soltis, D. E., Soltis, P. S. i Barbazuk, W. B. (2012). Rapid, repeated i clustered loss of duplicate genes in allopolyploid plant populations of independent origin. *Curr. Biol.* CB 22, 248–252.
- Bureš, P., Tichý, L., Wang, Y.F. i Bartoš, J. (2003). Occurrence of *Polypodium ×mantoniae* and new localities for *P. interjectum* in the Czech Republic confirmed using flow cytometry. *Preslia*, 293–310.
- Castoe, T. A. et al. (2012). Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE* 7(2), e30953.
- Chapman, M. A. i Burke, J. M. (2007). Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution* 61, 1773–1780.

- Chen, H., Liu, L., Wang, L., Wang, S., Somta, P. i Cheng, X. (2015). Development and Validation of EST-SSR Markers from the Transcriptome of Adzuki Bean (*Vigna angularis*). PLoS ONE 10(7), e0131939.
- Chen, Z. J. i Ni, Z. (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. Bioessays 28, 240–252.
- Chi, H.-S. (2000). Interspecific crosses of lily by *in vitro* pollinated ovules. Bot. Bull. Acad. Sin. 41.
- Cho, Y. G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S. R., Park, W. D., Ayres, N. i Cartinhour, S. (2000). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100, 713–722.
- Çiçek, M., Yaprak, A. E. i Alan, A. R. (2015). Morphometric and flow cytometric evaluations of a putative natural hybrid of *Centaurium* (*Gentianaceae*) from Turkey. Phytotaxa 204, 22–32.
- Clark, L. V. i Jasieniuk, M. (2011). polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. Mol. Ecol. Resour. 11, 562–566.
- Contreras, R. N., Ranney, T. G. i Tallury, S. P. (2007). Reproductive behavior of diploid and allotetraploid *Rhododendron* L. “Fragrant Affinity.” HortScience Publ. Am. Soc. Hortic. Sci.
- Coyne, J. A., Orr, H. A. i sar. (2004). Speciation, Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Cvetić, T., Budimir, S. i Grubišić, D. (2004). *in vitro* flowering of darkgrown *Centaurium pulchellum*. Arch Biol Sci 56, 21–22.
- De Silva, H. N., Hall, A. J., Rikkerink, E., McNeilage, M. A. i Fraser, L. G. (2005). Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. Heredity 95, 327–334.

- Deng, Z., Goktepe, F., Harbaugh, B. K. i Hu, J. (2007). Assessment of genetic diversity and relationships among caladium cultivars and species using molecular markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132, 219–229.
- Divakaran, M., Babu, K. N., Ravindran, P. N. i Peter, K. V. (2006). Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Sci. Hortic.* 108, 414–422.
- Dogan, S., Diken, M. E., Dogan, M. i sar. (2010). Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *J Med Plant Res* 4, 2566–73.
- Don, G. (1838). *A general history of the dichlamydeous plants*, London: J.G. and F. Rivington.
- Dong, J., Ma, X., Wei, Q., Peng, S. i Zhang, S. (2011). Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. *Ind. Crops Prod.* 34, 1607–1614.
- Doyle, J. J., Flagel, L. E., Paterson, A. H., Rapp, R. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S. i Wendel, J. F. (2008). Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annu. Rev. Genet.* 42, 443–461.
- Duarte, J. M., Santos, J. B. dos i Melo, L. C. (1999). Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. *Genet. Mol. Biol.* 22, 427–432.
- Dufresne, F., Stift, M., Vergilino, R. i Mable, B. K. (2014). Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Mol. Ecol.* 23, 40–69.
- Dufresnes, C., Brelsford, A., Béziers, P. i Perrin, N. (2014). Stronger transferability but lower variability in transcriptomic- than in anonymous microsatellites: evidence from Hyliid frogs. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 716–725.
- Eckert, C. G. (2000). Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology* 81, 532–542.

- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A. i Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 746–756.
- Ekblom, R. i Galindo, J. (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107, 1–15.
- Ellis, J. R. i Burke, J. M. (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* 99, 125–132.
- El-Mawla, A. M. A. A., Schmidt, W. i Beerhues, L. (2001). Cinnamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN. *Planta* 212, 288–293.
- Endlicher, S. (1838). *Genera plantarum secundum ordines naturales disposita*, Vienna, Austria: Vindobonae.
- Esselink, G. D., Nybom, H. i Vosman, B. (2004). Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting—peak ratios) method. *Theor. Appl. Genet.* 109, 402–408.
- Esselink, G., Smulders, M. i Vosman, B. (2003). Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theor. Appl. Genet.* 106, 277–286.
- Feng, S. P., Li, W. G., Huang, H. S., Wang, J. Y. i Wu, Y. T. (2008). Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol. Breed.* 23, 85–97.
- Ferriol, M., Merle, H. i Garmendia, A. (2014). Microsatellite evidence for low genetic diversity and reproductive isolation in tetraploid *Centaurea seridis* (Asteraceae) coexisting with diploid *Centaurea aspera* and triploid hybrids in contact zones. *Bot. J. Linn. Soc.* 176, 82–98.
- Francisco-Candeira, M., González-Tizón, A., Varela, M. A. i Martínez-Lage, A. (2007). Development of microsatellite markers in the razor clam *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 87, 977–978.

- Freeling, M., Woodhouse, M. R., Subramaniam, S., Turco, G., Lisch, D. i Schnable, J. C. (2012). Fractionation mutagenesis and similar consequences of mechanisms removing dispensable or less-expressed DNA in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 131–139.
- Friesen, N., Fritsch, R. i Bachmann, K. (1997). Hybrid origin of some ornamentals of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* verified with GISH and RAPD. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1229–1238.
- García-Verdugo, C., Calleja, J. A., Vargas, P., Silva, L., Moreira, O. i Pulido, F. (2013). Polyploidy and microsatellite variation in the relict tree *Prunus lusitanica* L.: how effective are refugia in preserving genotypic diversity of clonal taxa? *Mol. Ecol.* 22, 1546–1557.
- Gasic, K., Hernandez, A. i Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Report.* 22, 437–438.
- Geu-Flores, F., Sherden, N. H., Courdavault, V., Burlat, V., Glenn, W. S., Wu, C., Nims, E., Cui, Y. i O'Connor, S. E. (2012). An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature* 492, 138–142.
- Ghislain, M., Spooner, D. M., Rodríguez, F., Villamón, F., Núñez, J., Vásquez, C., Waugh, R. i Bonierbale, M. (2004). Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 108, 881–890.
- Giansante, L., Di Vincenzo, D. i Bianchi, G. (2003). Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *J. Sci. Food Agric.* 83, 905–911.
- Gilg, E. (1895). *Gentianaceae*. In: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, Leipzig, Germany: (Engler, A., Prantls, K., Eds.). Verlag von Wilhelm Engelmann, 50–108.
- Gilmour, J. S. L. (1937). Notes on the Genus *Centaurium*. 1. The Nomenclature of the British Species. *Bull. Misc. Inf. R. Bot. Gard. Kew* 1937, 497–502.

- Grant, V. (1957). The plant species in theory and practice. In: The Species Problem, Washington: AAAS.
- Grant, V. (1981). Plant Speciation, Columbia University Press.
- Grieve, M. (1971). A Modern Herbal, Vol. I, Dover Publications, New York.
- Grisebach, A. (1845). *Gentianaceae*. In: Prodrum Systematis Naturalis Regni Vegetabilis, Paris: Fortin, Masson et Sociorum, 39–141.
- Grisebach, A. H. R. (1839). Genera et species Gentianearum adjectis observationibus quibusdam phytogeographicis, Stuttgart and Tubingen, Germany: J.G. Cotta.
- Grljušić, S., Bolarić, S., Popović, S., Čupić, T., Tucak, M. i Kozumplik, V. (2008). Comparison of morphological and RAPD markers in evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) changes caused by natural selection. Period. Biol. 110, 237–242.
- Gross, B. L. i Rieseberg, L. H. (2005). The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. J. Hered. 96, 241–252.
- Guggisberg, A., Bretagnolle, F. i Mansion, G. (2006). Allopolyploid origin of the Mediterranean endemic, *Centaureum bianoris* (*Gentianaceae*), inferred by molecular markers. Syst. Bot. 31, 368–379.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N. i Balyan, H. S. (2003). Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Mol. Genet. Genomics 270, 315–323.
- Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G. P., Naik, P. K., Chauhan, R. S., Tiwari, S. K., Kumar, M. i Singh, R. (2008). Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. Afr. J. Biotechnol. 7.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. i Ryan, P. D. (2001). PAST-PALaeontological STatistics, ver. 1.89. Palaeontol. Electron. 4, 1–9.

- Hansen, M., Israel, J. A., Bando, K. J. ierson, E. C. i May, B. (2009). Polyploid microsatellite data reveal stock complexity among estuarine North American green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 1491–1504.
- Harborne, J. B. i Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.
- Hegarty, M. J. i Hiscock, S. J. (2005). Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytol.* 165, 411–423.
- Helsen, P., Verdyck, P., Tye, A. i Van Dongen, S. (2009). Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galapagos). *Plant Syst. Evol.* 279, 1–10.
- Hennig, C. (2007). Cluster-wise assessment of cluster stability. *Comput. Stat. Data Anal.* 52, 258–271.
- Hennig, C. (2015). Package “fpc.”
<http://up2date.hmdc.harvard.edu/CRAN/web/packages/fpc/fpc.pdf>
- Hill, J. (1756). *The British Herbal*.
- Hostettmann, K. i Hostettmann, M. (1989). Xanthones. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Elsevier, 493–508.
- Ikedo, H., Esaki, N., Nakai, S., Hashimoto, K., Uesato, S., Soda, K. i Fujita, T. (1991). Acyclic Monoterpene Primary Alcohol:NADP+ Oxidoreductase of *Rauwolfia serpentina* Cells: The Key Enzyme in Biosynthesis of Monoterpene Alcohols. *J. Biochem. (Tokyo)* 109, 341–347.
- Ito, T. et al. (2011). Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* L. *Euphytica* 182, 285–294.
- Jaccard, P. (1908). *Nouvelles Recherches Sur La Distribution Florale*. *Ulletin Société Vaudoise Sci. Nat.* 44, 223–270.
- Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Y. P., Ganten, D., Dzau, V. J. i Lander, E. S. (1991). Genetic mapping of a gene

causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67, 213–224.

James, G., Witten, D., Hastie, T. i Tibshirani, R. (2013). An introduction to statistical learning, Springer.

Janković, T. (1998). *In vitro* kultura i produkcija ksantona i sekoiridoida kod kičice *Centaurium erythraea* Rafn. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Janković, T., Krstić, D., Šavikin-Fodulović, K., Menković, N. i Grubišić, D. (2002). Xanthones and Secoiridoids from Hairy Root Cultures of *Centaurium erythraea* and *C. pulchellum*. *Planta Med.* 68, 944–946.

Janson, J. (1993). Placental pollination in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Sci.* 90, 105–115.

Jensen, S. R. i Schripsema, J. (2002). Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*. In: *Gentianaceae*, Cambridge University Press.

Jiao, Y. et al. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473, 97–100.

Jouanin, L., Bouchez, D., Drong, R. F., Tepfer, D. i Slightom, J. L. (1989). Analysis of TR-DNA/plant junctions in the genome of a *Convolvulus arvensis* clone transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plant Mol. Biol.* 12, 75–85.

Jovanović-Dunjić, R. (1973). Fam. *Gentianaceae*. In: Flora SR Srbije, Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti, 403–432.

Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. i Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177, 309–334.

Kantety, R. V., Rota, M. L., Matthews, D. E. i Sorrells, M. E. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol. Biol.* 48, 501–510.

- Kaouadji, M., Vaillant, I. i Mariotte, A.-M. (1986). Polyoxygenated Xanthenes from *Centaureum erythraea* Roots. *J. Nat. Prod.* 49, 359–359.
- Keeler, K. H., Kwankin, B., Barnes, P. W. i Galbraith, D. W. (1987). Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. *Genome* 29, 374–379.
- Keim, P., Paige, K. N., Whitham, T. G. i Lark, K. G. (1989). Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. *Genetics* 123, 557–565.
- Kepler, R. M., Ugine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A. i Rehner, S. A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environ. Microbiol.* 17, 2791–2804.
- Kihara, H. i Ono, T. (1926). Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 4, 475–481.
- Kim, Y. M., Lee, J., Park, S.-H., Lee, C., Lee, J. W., Lee, D., Kim, N., Lee, D., Kim, H. Y. i Lee, C. H. (2012). LC–MS-based chemotaxonomic classification of wild-type *Lespedeza sp.* and its correlation with genotype. *Plant Cell Rep.* 31, 2085–2097.
- Kliebenstein, D. J. i Osbourn, A. (2012). Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 415–423.
- Kota, R., Varshney, R. K., Thiel, T., Dehmer, K. J. i Graner, A. (2001). Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas* 135, 145–151.
- Krithika, R., Srivastava, P. L., Rani, B., Kolet, S. P., Chopade, M., Soniya, M. i Thulasiram, H. V. (2015). Characterization of 10-Hydroxygeraniol Dehydrogenase from *Catharanthus roseus* Reveals Cascaded Enzymatic Activity in Iridoid Biosynthesis. *Sci. Rep.* 5, 8258.
- Krstić, D. (1998). Ontogeneza *Centaureum pulchellum* (Sw) Druce u kulturi *in vitro* i analiza sekundarnih metabolita. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

- Krstić, D., Janković, T., Šavikin-Fodulović, K., Menković, N. i Grubišić, D. (2003). Secoiridoids and xanthenes in the shoots and roots of *Centaureum pulchellum* cultured *in vitro*. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39, 203–207.
- Kulevanova, S., Stefova, M., Panovska, T. K. i Stafilov, T. (2003). HPLC identification and determination of myricetin, quercetin, kaempferol and total flavonoids in herbal drugs. *Почитувани*, 25.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R. i Pandey, B. K. (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics* 2, 141–162.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Jaspars, M. i Sarker, S. D. (2003). Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine* 10, 344–347.
- Kusari, S., Zühlke, S., Borsch, T. i Spiteller, M. (2009). Positive correlations between hypericin and putative precursors detected in the quantitative secondary metabolite spectrum of *Hypericum*. *Phytochemistry* 70, 1222–1232.
- Lanner-Herrera, C., Gustafeson, M., Filt, A. S. i Bryngelsson, T. (1996). Diversity in natural populations of wild *Brassica oleracea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 43, 13–23.
- Lattanzio, P. V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In: *Natural Products*, ed. K. G. Ramawat i ed. J.-M. Mérillon, Springer Berlin Heidelberg, 1543–1580.
- Leitch, A. R. i Leitch, I. J. (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320, 481–483.
- Leitch, I. J. i Bennett, M. D. (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* 2, 470–476.
- Levin, D. A., Francisco-Ortega, J. i Jansen, R. K. (1996). Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. *Conserv. Biol.* 10, 10–16.
- Levy, A. A. i Feldman, M. (2002). The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiol.* 130, 1587–1593.

- Li, Y.-C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A. i Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453–2465.
- Liesebach, H., Naujoks, G. i Ewald, D. (2011). Successful hybridisation of normally incompatible hybrid aspen (*Populus* × *P. tremuloides*) and eastern cottonwood (*P. deltoides*). *Sex. Plant Reprod.* 24, 189–198.
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*, Stockholm: Salvii.
- Liu, L.-W., Wang, Y., Gong, Y.-Q., Zhao, T.-M., Liu, G., Li, X.-Y. i Yu, F.-M. (2007). Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers. *Sci. Hortic.* 115, 7–12.
- Lloyd, D. G. i Schoen, D. J. (1992). Self- and Cross-Fertilization in Plants. I. Functional Dimensions. *Int. J. Plant Sci.* 153, 358–369.
- Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N., Read, T. i Konstantinidis, K. T. (2012). Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLOS ONE* 7(2), e30087.
- Mable, B. K. (2004). “Why polyploidy is rarer in animals than in plants”: myths and mechanisms. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 453–466.
- Malkov, S. i Simonović, A. (2011). Shotgun assembly of *Centaureum erythraea* transcriptome. In: 19th Symposium of the Serbian Plant Physiology Society, Book of abstracts, 16.
- Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature* 446, 279–283.
- Mansion, G. (2004). A new classification of the polyphyletic genus *Centaureum* Hill (Chironiinae, *Gentianaceae*): description of the New World endemic *Zeltnera* i reinstatement of *Gyrandra* Griseb. and *Schenkia* Griseb. *Taxon* 53, 719–740.
- Mansion, G. (2014). Twenty-first Century Centauries: An Updated Review on *Centaureum* Hill and Allies (*Gentianaceae*). In: *The Gentianaceae - Volume 1: Characterization and Ecology*, ed. J. J. Rybczyński, ed. M. R. Davey i ed. A. Mikula, Springer Berlin Heidelberg, 231–250.

- Mansion, G. i Struwe, L. (2004). Generic delimitation and phylogenetic relationships within the subtribe Chironiinae (Chironieae: *Gentianaceae*), with special reference to *Centaurium*: evidence from nrDNA and cpDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 951–977.
- Mansion, G., Zeltner, L. i Bretagnolle, F. (2005). Phylogenetic patterns and polyploid evolution within the Mediterranean genus *Centaurium* (*Gentianaceae*-Chironieae). *Taxon*, 931–950.
- Marcus, W. B. (2016). *ggord: Ordination Plots with ggplot2*. R package version 0.9.9000., Springer
- Markham, K. R. (1989). Flavones, Flavonols and their Glycosides. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Elsevier, 197–235.
- Martens, S. i Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66, 2399–2407.
- Martínez-Garrido, J., Serrão, E. A., Engelen, A. H., Cox, C. J., García-Murillo, P. i González-Wangüemert, M. (2016). Multilocus genetic analyses provide insight into speciation and hybridization in aquatic grasses, genus *Ruppia*. *Biol. J. Linn. Soc.* 117, 177–191.
- Matoba, H., Inaba, K., Nagano, K. i Uchiyama, H. (2011). Use of RAPD analysis to assess the threat of interspecific hybridization to the critically endangered *Polemonium kiushianum* in Japan. *J. Plant Res.* 124, 125–130.
- Mayr, E. (1982). *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution i Inheritance*, Harvard University Press.
- McLachlan, G. (2004). *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition*, John Wiley & Sons.
- Mehetre, S. S. (2004). RAPD analysis of hybrid nature of the offspring of *Gossypium hirsutum* × *G. raimondii*. *Curr. Sci.* 87, 25–28.

- Mehetre, S. S., Aher, A. R., Shinde, G. C., Gomes, M. i Eapen, S. (2004). RAPD analysis of interspecific hybrid between *Gossypium arboreum* and *Gossypium stocksii*. *Caryologia* 57, 167–171.
- Meiners, J. i Winkelmann, T. (2011). Evaluation of reproductive barriers and realisation of interspecific hybridisations depending on genetic distances between species in the genus *Helleborus*. *Plant Biol.* 14, 576–585.
- Melderis, A. (1972). Taxonomic studies on the European species of the genus *Centaureum* Hill. *Bot J Linn Soc*, 224–250.
- Mészáros, S. (1994). Evolutionary significance of xanthones in *Gentianaceae*: A reappraisal. *Biochem. Syst. Ecol.* 22, 85–94.
- Metzgar, D., Bytof, J. i Wills, C. (2000). Selection Against Frameshift Mutations Limits Microsatellite Expansion in Coding DNA. *Genome Res.* 10, 72–80.
- Mišić, D., Filipović, B., Popović, Z., Živković, S., Cvetić, T. i Mijović, A. (2009). Rapid *in vitro* selection of salt-tolerant genotypes of the potentially medicinal plant *Centaureum maritimum* (L.) fritsch. *Arch. Biol. Sci.* 61, 57–69.
- Mišić, D., Šiler, B., Skorić, M., Djurickovic, M. S., Nestorović Živković, J., Jovanović, V. i Giba, Z. (2013). Secoiridoid glycosides production by *Centaureum maritimum* (L.) Fritch hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. *Process Biochem.* 48, 1587–1591.
- Mok, D. W. S. i Peloquin, S. J. (1975). The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity* 35, 295–302.
- Mujaju, C., Sehic, J., Werlemark, G., Garkava-Gustavsson, L., Fatih, M. i Nybom, H. (2010). Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. *Hereditas* 147, 142–153.
- Mukherjee, A., Sikdar, B., Ghosh, B., Banerjee, A., Ghosh, E., Bhattacharya, M. i Roy, S. C. (2013). RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties i cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae). *Turk. J. Bot.* 37, 605–618.

- Murata, J., Roepke, J., Gordon, H. i De Luca, V. (2008). The Leaf Epidermome of *Catharanthus roseus* Reveals Its Biochemical Specialization. *PLANT CELL ONLINE* 20, 524–542.
- Muzzalupo, I., Chiappetta, A., Benincasa, C. i Perri, E. (2010). Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers. *Sci. Hortic.* 126, 324–329.
- Nandakumar, N., Singh, A. K., Sharma, R. K., Mohapatra, T., Prabhu, K. V. i Zaman, F. U. (2004). Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136, 257–264.
- Natalis Joseph de Necker, J. N. de N. (1790). *Elementa botanica*, Apud Bossange et Soc. Bibliopol.
- Neale, D. B. i Sederoff, R. R. (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.* 77, 212–216.
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M. i Sourdille, P. (2004). Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 109, 800–805.
- den Nijs, J. H. (Hans) C., Marhold, K. i Hurka, H. (1999). Plant evolution in disturbed habitats: an introduction. *Folia Geobot.* 34, 399–403.
- Nybom, H. i Bartish, I. V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 3, 93–114.
- Nybom, H., Weising, K. i Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investig. Genet.* 5, 1.
- Orians, C. M. (2000). The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *Am. J. Bot.* 87, 1749–1756.

- Orr, H. A. (1990). “Why Polyploidy is Rarer in Animals Than in Plants” Revisited. *Am. Nat.* 136, 759–770.
- Osborn, T. C. et al. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19, 141–147.
- Otto, S. P. i Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401–437.
- Parisod, C., Holderegger, R. i Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol.* 186, 5–17.
- Pfeiffer, T., Roschanski, A. M., Pannell, J. R., Korbecka, G. i Schnittler, M. (2011). Characterization of Microsatellite Loci and Reliable Genotyping in a Polyploid Plant, *Mercurialis perennis* (Euphorbiaceae). *J. Hered.* 102, 479–488.
- Piatczak, E., Wielanek, M. i Wysokinska, H. (2005). Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurium erythraea* Rafn. *Plant Sci.* 168, 431–437.
- Postolache, D., Leonarduzzi, C., Piotti, A., Spanu, I., Roig, A., Fady, B., Roschanski, A., Liepelt, S. i Vendramin, G. G. (2014). Transcriptome versus Genomic Microsatellite Markers: Highly Informative Multiplexes for Genotyping *Abies alba* Mill. and Congeneric Species. *Plant Mol. Biol. Report.* 32, 750–760.
- Prevost, A. i Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing *PCR* primers applied to *ISSR* fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98, 107–112.
- Pringle, J. S. (2010). The identity and nomenclature of the Pacific North American species *Zeltnera muhlenbergii* (*Gentianaceae*) and its distinction from *Centaurium tenuiflorum* and other Species with which it has been confused. *Madroño* 57, 184–202.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing.
- Radušienė, J. (1995). Biological peculiarities and possibilities of introduction of *Centaurium erythraea* Rafn. *Biologija*, 55–57.

- Ramsey, J. i Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms i rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 467–501.
- Ranney, T. (2006). *Polyploidy: From Evolution to New Plant Development*.
- Raveendar, S., Lee, G.-A., Jeon, Y.-A., Lee, Y. J., Lee, J.-R., Cho, G.-T., Cho, J.-H., Park, J.-H., Ma, K.-H. i Chung, J.-W. (2015). Cross-Amplification of *Vicia sativa* subsp. *sativa* Microsatellites across 22 Other *Vicia* Species. *Molecules* 20, 1543–1550.
- Ray, T. i Roy, S. C. (2009). Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *J. Hered.* 100, 338–347.
- Reid, K., Hoareau, T. B. i Bloomer, P. (2012). High-throughput microsatellite marker development in two sparid species and verification of their transferability in the family Sparidae. *Mol. Ecol. Resour.* 12, 740–752.
- Rieseberg, L. H. (1995). The Role of Hybridization in Evolution: Old Wine in New Skins. *Am. J. Bot.* 82, 944–953.
- Rieseberg, L. H. (1996). Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol. Ecol.* 5, 99–105.
- Rieseberg, L. H. (1998). Genetic mapping as a tool for studying speciation. In: *Molecular Systematics of Plants II*, Springer, 459–487.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J. L., Schwarzbach, A. E., Donovan, L. A. i Lexer, C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301, 1211–1216.
- Robertson, A., Rich, T. C., Allen, A. M., Houston, L., Roberts, C. A. T., Bridle, J. R., Harris, S. A. i Hiscock, S. J. (2010). Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Mol. Ecol.* 19, 1675–1690.
- Robyns, A. (1954). Essai d'étude systématique et écologique des *Centaureum* de Belgique. *Bull. Jard. Bot. L'État Brux.* 24, 349–398.

- Roldán-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., van Eijk, M. J. T. i De Loose, M. (2000). [No Title]. *Mol. Breed.* 6, 593–602.
- Rosenbaumová, R., Plačková, I. i Suda, J. (2004). Variation in *Lamium* subg. *Galeobdolon* (Lamiaceae)–insights from ploidy levels, morphology and isozymes. *Plant Syst. Evol.* 244, 219–244.
- Rosenthal, D. M., Ramakrishnan, A. P. i Cruzan, M. B. (2008). Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Mol. Ecol.* 17, 4657–4669.
- Rozen, S. i Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 365–386.
- Saha, M. C., Mian, M. A. R., Eujayl, I., Zwonitzer, J. C., Wang, L. i May, G. D. (2004). Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor. Appl. Genet.* 109, 783–791.
- Saito, K. i Matsuda, F. (2010). Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology i Biotechnology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 463–489.
- Salim, V., Wiens, B., Masada-Atsumi, S., Yu, F. i De Luca, V. (2014). 7-Deoxyloganetic acid synthase catalyzes a key 3 step oxidation to form 7-deoxyloganetic acid in *Catharanthus roseus* iridoid biosynthesis. *Phytochemistry* 101, 23–31.
- Salim, V., Yu, F., Altarejos, J. i Luca, V. (2013). Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Plant J.* 76, 754–765.
- Sampson, J. F. i Byrne, M. (2012). Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae): Genetic diversity in polyploid *Atriplex*. *Biol. J. Linn. Soc.* 105, 218–230.
- Sandasi, M., Kamatou, G. P. P. i Viljoen, A. M. (2012). An untargeted metabolomic approach in the chemotaxonomic assessment of two *Salvia* species as a potential source of α -bisabolol. *Phytochemistry* 84, 94–101.

Santos, E. A., Souza, M. M., Abreu, P. P., Araújo, I. S., Viana, A. P., de Almeida, A.-A. F., de Oliveira Freitas, J. C. i sar. (2012). Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L.(*Passifloraceae*) for ornamental use. *Euphytica* 184, 389–399.

Schlag, E. M. i McIntosh, M. S. (2012). RAPD-based assessment of genetic relationships among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations and their implications for a future conservation strategy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59, 1553–1568.

Schuck, M. R., Biasi, L. A., Mariano, A. M., Lipski, B., Riaz, S. i Walker, M. A. (2011). Obtaining interspecific hybrids i molecular analysis by microsatellite markers in grapevine. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 46, 1480–1488.

Shaw, D. D., Wilkinson, P. i Coates, D. J. (1983). Increased chromosomal mutation rate after hybridization between two subspecies of grasshoppers. *Science* 220, 1165–1167.

Sheorey, R. R. i Tiwari, A. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of herbal materials and medicines—A review. *J Sci Ind. Res* 70, 319–326.

Šiler, B. (2012). Phytochemical and molecular characterization of centaury (*Centaureum erythraea* Rafn) populations from the Balkan Peninsula. *Doktorska disertacija*

Šiler, B., Avramov, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Patenković, A. i Mišić, D. (2012). Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaureum erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. *Ind. Crops Prod.* 40, 336–344.

Šiler, B. i Mišić, D. (2016). Biologically Active Compounds from the Genus *Centaureum* s.l. (*Gentianaceae*): Current Knowledge and Future Prospects in Medicine. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier.

- Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Nestorović Živković, J., Ćirić, A., Soković, M. i Mišić, D. (2014). Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. *Food Chem.* 147, 367–376.
- Simonović, A. (2011). *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*, Beograd.
- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. i Tepfer, D. (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *J. Biol. Chem.* 261, 108–121.
- Slightom, J. L., Jouanin, L., Leach, F., Drong, R. F. i Tepfer, D. (1985). Isolation and identification of TL-DNA/plant junctions in *Convolvulus arvensis* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *EMBO J.* 4, 3069.
- van der Sluis, W. G. i Labadie, R. P. (1981). Secoiridoids and Xanthones in the genus *Centaureum*. *Planta Med.* 41, 221–231.
- van der Sluis, W. G. i Labadie, R. P. (1985). Polyoxygenated xanthones of *Centaureum littorale*. *Phytochemistry* 24, 2601–2605.
- Smith, J. F., Burke, C. C. i Wagner, W. L. (1996). Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: Evidence from RAPD markers. *Plant Syst. Evol.* 200, 61–77.
- Soltis, D. E., Buggs, R. J. A., Doyle, J. J. i Soltis, P. S. (2010). What we still don't know about polyploidy. *Taxon* 59, 1387–1403.
- Soltis, D. E. i Soltis, P. S. (1995). The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 8089–8091.
- Soltis, D. E. i Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends Ecol. Evol.* 14, 348–352.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. i Rieseberg, L. H. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 243–273.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. i Tate, J. A. (2004). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytol.* 161, 173–191.

- Soltis, P. S. i Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 561–588.
- Srivastava, N., Bajpai, A., Chandra, R., Rajan, S., Srivastava, M. K. i Muthukumar, M. (2010). Parentage and hybridity confirmation in mango hybrids by three DNA marker system combinations. *J. Biotechnol.* 150, 492–492.
- Stabile, J., Lipus, D., Maceda, L., Maltz, M., Roy, N. i Wirgin, I. (2016). Microsatellite DNA analysis of spatial and temporal population structuring of *Phragmites australis* along the Hudson River Estuary. *Biol. Invasions*, 1–13.
- Stearn, W. T. i Hill, J. (1967). Hill's The British Herbal (1756-1757). *Taxon* 16, 494–498.
- Stefkov, G., Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S., Stanoeva, J. P., Stefova, M., Petrusevska, G. i Kulevanova, S. (2014). Chemical characterization of *Centaurium erythrea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 152, 71–77.
- Struwe, L. i Albert, V. A. (2002). *Gentianaceae: systematics and natural history*, Cambridge University Press.
- Subashini, V., Shanmugapriya, A. i Yasodha, R. (2014). Hybrid purity assessment in *Eucalyptus F1* hybrids using microsatellite markers. *3 Biotech* 4, 367–373.
- Subotić, A., Budimir, S., Grubišić, D. i Momčilović, I. (2003). Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biol. Plant.* 47, 617–619.
- Suda, J. i Trávníček, P. (2006). Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry A* 69, 273–280.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15, 199–203.
- Tautz, D. i Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4127–4138.

- Teixeira, H., Rodríguez-Echeverría, S. i Nabais, C. (2014). Genetic diversity and differentiation of *Juniperus thurifera* in Spain and Morocco as determined by *SSR*. *PloS One* 9(2), e88996.
- Templeton, A. R. (1981). Mechanisms of speciation—a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 12, 23–48.
- Terzioğlu, S., Coşkunçelebi, K. i Gültepe, M. (2012). *Primula* × *uzungolensis* (Primulaceae): a new natural hybrid from NE Anatolia. *Turk. J. Bot.* 36, 9–19.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R. K. i Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived *SSR*-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106, 411–422.
- Todorović, S., Giba, Z., Simonović, A., Božić, D., Banjanac, T. i Grubišić, D. (2009). Manganese effects on *in vitro* development of Lesser Centaury [*Centaureum pulchellum* (Sw.) Druce]. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 61 (2): 279-283.
- Todorović, S., Grubišić, D., Giba, Z., Mišić, D. i Konjević, R. (2006). Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaureum pulchellum*. *Biol. Plant.* 50, 771–774.
- Todorović, S. jana, Giba, Z., Bačić, G., Nikolic, M. i Grubišić, D. (2008). High seed Mn content does not affect germination of *in vitro* produced *Centaureum pulchellum* seeds. *Environ. Exp. Bot.* 64, 322–324.
- Tonk, F. A., Tosun, M., Ilker, E., Istipliler, D. i Tatar, O. (2014). Evaluation and comparison of *ISSR* and *RAPD* markers for assesment of genetic diversity in Triticale genotypes. *Bulg. J. Agric. Sci.* 20, 1413–1420.
- Tucić, N. (2003). *Evoluciona biologija*, NNK International Beograd
- Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L. i Freitas, L. B. (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants* 7, plv084.
- Tutin, T. G. (1972). *Flora Europaea*, Cambridge University Press.

- Ubsdell, R. A. E. (1976a). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles 1. Taxonomy and biometrical studies. *Watsonia* 11, 7–31.
- Ubsdell, R. A. E. (1976b). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles 2. Cytology. *Watsonia* 11, 33–43.
- Ubsdell, R. A. E. (1979). Studies on variation and evolution in *Centaureum erythraea* Rafn and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles, 3. Breeding systems, floral biology and general discussion. *Self* 46, 10.
- Ungerer, M. C., Baird, S. J., Pan, J. i Rieseberg, L. H. (1998). Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11757–11762.
- Valentão, P. irade, P. B., Silva, A. M., Moreira, M. M. i Seabra, R. M. (2003). Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2, 3-dihydroisocoumarin from *Centaureum erythraea* aerial parts. *Nat. Prod. Res.* 17, 361–364.
- Valentão, P. irade, P. B., Silva, E., Vicente, A., Santos, H., Bastos, M. L. i Seabra, R. M. (2002). Methoxylated Xanthenes in the Quality Control of Small Centaury (*Centaureum erythraea*) Flowering Tops. *J. Agric. Food Chem.* 50, 460–463.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F. irade, P. B., Seabra, R. M. i Bastos, M. L. (2001). Antioxidant Activity of *Centaureum erythraea* Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3476–3479.
- Van der Sluis, W. G. (1985). Chemotaxonomical investigations of the genera *Blackstonia* and *Centaureum* (*Gentianaceae*). *Plant Syst. Evol.* 149, 253–286.
- Van Rossum, F. (2009). Pollen dispersal and genetic variation in an early-successional forest herb in a peri-urban forest. *Plant Biol.* 11, 725–737.
- Van Sumere, C. F. (1989). Phenols and Phenolic Acids. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Elsevier, 29–73.

- Van Tuyl, J. M., Van Diën, M. P., Van Creijl, M. G. M., Van Kleinwee, T. C. M., Franken, J. i Bino, R. J. (1991). Application of *in vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci.* 74, 115–126.
- Varela, M. A., González-Tizón, A., Mariñas, L. i Martínez-Lage, A. (2007). Genetic Divergence Detected by ISSR Markers and Characterization of Microsatellite Regions in *Mytilus Mussels*. *Biochem. Genet.* 45, 565–578.
- Varshney, R. K., Graner, A. i Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23, 48–55.
- Venables, W. N. i Ripley, B. P. (2002). *Modern Applied Statistics with S*, New York: Springer.
- Vendramin, E., Dettori, M. T., Giovinazzi, J., Micali, S., Quarta, R. i Verde, I. (2007). A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. *Mol. Ecol. Notes* 7, 307–310.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R. V. i Bhagyalakshmi, N. (2008). The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47, 974–985.
- Vijay, N., Poelstra, J. W., Künstner, A. i Wolf, J. B. W. (2013). Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive in silico assessment of RNA-seq experiments. *Mol. Ecol.* 22, 620–634.
- Vision, T. J., Brown, D. G. i Tanksley, S. D. (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290, 2114–2117.
- Volker, P. W., Potts, B. M. i Borralho, N. M. G. (2007). Genetic parameters of intra- and inter-specific hybrids of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Tree Genet. Genomes* 4, 445–460.
- Vrijenhoek, R. C. (2006). Polyploid Hybrids: Multiple Origins of a Treefrog Species. *Curr. Biol.* 16, R245–R247.

- Vukosavljev, M., Esselink, G. D., van 't Westende, W. P. C., Cox, P., Visser, R. G. F., Arens, P. i Smulders, M. J. M. (2015). Efficient development of highly polymorphic microsatellite markers based on polymorphic repeats in transcriptome sequences of multiple individuals. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 17–27.
- Wang, X., Lu, P. i Luo, Z. (2013). GMATo: A novel tool for the identification and analysis of microsatellites in large genomes. *Bioinformatics* 9, 541–544.
- Wang, Z., Li, J., Luo, Z., Huang, L., Chen, X., Fang, B., Li, Y., Chen, J. i Zhang, X. (2011). Characterization and development of EST-derived *SSR* markers in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *BMC Plant Biol.* 11, 139.
- Wang, Z., Yu, G., Shi, B., Wang, X., Qiang, H. i Gao, H. (2014). Development and characterization of simple sequence repeat (*SSR*) markers based on RNA-sequencing of *Medicago sativa* and in silico mapping onto the *M. truncatula* genome. *PloS One* 9(3), e92029.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58, 236–244.
- Weiland, J. E., Garrido, P., Kamvar, Z. N., Espíndola, A. S., Marek, S. M., Grünwald, N. J. i Garzón, C. D. (2015). Population Structure of *Pythium irregulare*, *P. ultimum* i *P. sylvaticum* in Forest Nursery Soils of Oregon and Washington. *Phytopathology* 105, 684–694.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. i Meyer, W. (1994). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*, CRC Press.
- Welsh, J. i McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using *PCR* with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218.
- Wendel, J. F. (2015). The wondrous cycles of polyploidy in plants. *Am. J. Bot.*
- West, W., Baldwin, S. i Rich, T. C. G. (2014). Pollen viability and size in British *Centaureum Hill* and *Gentianella Moench* (*Gentianaceae*) taxa. *Grana* 53, 111–116.
- Wheldon, J. A. (1897). Variation in *Erythraea*. *Sci. Gossip* 4, 111.

- Whitney, K. D., Ahern, J. R., Campbell, L. G., Albert, L. P. i King, M. S. (2010). Patterns of hybridization in plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 12, 175–182.
- Wichtl, M. (2004). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis*, CRC Press.
- Wickham, H. (2009). *ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. i Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535.
- Wilson, E. O. (2003). The encyclopedia of life. *Trends Ecol. Evol.* 18, 77–80.
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B. i Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13875–13879.
- Xue, S.-Y., Li, Z.-Y., Zhi, H.-J., Sun, H.-F., Zhang, L.-Z., Guo, X.-Q. i Qin, X.-M. (2012). Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC–MS and multivariate data analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 41, 6–12.
- Yamamoto, H., Katano, N., Ooi, A. i Inoue, K. (2000). Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry* 53, 7–12.
- Yin, T., Huang, M., Wang, M., Zhu, L.-H., Zeng, Z.-B. i Wu, R. (2001). Preliminary interspecific genetic maps of the *Populus* genome constructed from RAPD markers. *Genome* 44, 602–609.
- Yu, J.-K., Dake, T. M., Singh, S., Benscher, D., Li, W., Gill, B. i Sorrells, M. E. (2004). Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome* 47, 805–818.
- Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R. i Simon, P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am. J. Bot.* 99, 193–208.

- Zeltner, L. (1970). Recherches de biosystématique sur les genres *Blackstonia* Huds. et *Centaureum* Hill (*Gentianaceae*). Bull. Société Neuchâtel. Sci. Nat. 93, 1–164.
- Zeltner, L. (1985). Étude cytotaxonomique et cytogéographique du *Centaureum pulchellum* (Swartz) Druce, sensu lato. Bot. Helvetica 95, 47–57.
- Zeltner, L. (1991). Contribution a l'étude cytogeographique des genres *Blackstonia* Huds. et *Centaureum* Mill (*Gentianaceae*) en Turquie, a Rhodes et a Chypre. Bull Soc Neuchatel Sci Nat 114, 77–103.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. i Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics 30, 614–620.
- Zozomová-Lihová, J., Krak, K., Mandáková, T., Shimizu, K. K., Spaniel, S., Vít, P. i Lysak, M. A. (2014). Multiple hybridization events in *Cardamine* (*Brassicaceae*) during the last 150 years: revisiting a textbook example of neoallopolyploidy. Ann. Bot. 113, 817–830.
- (2013). New Light on Alkaloid Biosynthesis and Future Prospects, Volume 68, Burlington: Academic Press.
- (2016). The Euro+Med Plantbase Project.
- Box, G. E., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 211–252.

PRILOG

Tabela S1: Kvantitativni sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) zabeležen kod jedinki ispitivanih vrsta roda *Centaurium*.

Vrsta	Uzorak	Lokalitet	Hininska kiselina ($\mu\text{g DW}$)	Kafeinska kiselina ($\mu\text{g DW}$)	<i>p</i> -Kumarna kiselina ($\mu\text{g DW}$)	Ferulinska kiselina ($\mu\text{g DW}$)	Sinapinska kiselina ($\mu\text{g DW}$)	Rutin ($\mu\text{g DW}$)	Izokvercitrin ($\mu\text{g DW}$)	Astragalın ($\mu\text{g DW}$)	Luteolin ($\mu\text{g DW}$)	Kvercetin ($\mu\text{g DW}$)	Apigenin ($\mu\text{g DW}$)	Naringenin ($\mu\text{g DW}$)	Kempferol ($\mu\text{g DW}$)
<i>Centaurium pannonicum</i>	1	Majdan 2013	0.178	0.166	2.800	12.743	2.554	23.012	0.049	0.092	1.224	0.335	0.055	0.006	0.072
	2		0.207	1.105	4.492	4.444	2.966	28.020	0.084	0.083	0.098	0.029	0.017	0.008	0.049
	3		1.026	0.443	4.109	5.413	2.769	29.892	0.021	0.048	0.146	0.005	0.192	0.010	0.081
	4		1.126	2.808	8.801	7.342	2.566	49.492	0.462	0.221	0.305	0.049	0.222	0.037	0.209
	5		0.590	0.662	5.130	4.639	2.447	27.305	0.018	0.034	0.088	0.023	0.057	0.019	0.045
	6		0.267	0.510	5.356	12.127	2.446	22.521	0.058	0.050	0.048	0.010	0.007	0.011	0.132
	7			0.415	4.548	4.370	1.426	16.860	0.011	0.016	0.078	0.026	0.016	0.004	0.048
	8		0.534	0.579	6.082		3.838	33.885	0.022	0.007	0.099	0.023	0.005	0.004	
	9		0.690	0.624	4.875	6.445	2.882	37.503	0.069	0.075	0.055	0.030	0.011		0.120
	10		9.695	2.773	42.109	98.231	14.455	223.287	1.317	1.606	0.618	0.140	0.051	0.113	0.150
	11	1.161	0.916	3.393	6.199	2.068	26.514	0.017	0.025	0.052	0.014	0.005	0.009		
	12	2.708	0.231	11.263	14.524	1.906	0.362	0.002	0.017	0.071	0.033	0.088	0.031	0.047	
	13	1.880	1.089	4.292	5.049	1.717	27.544	0.056	0.015	0.056		0.017		0.020	
	14	0.687	1.051	6.895	4.251	3.249	32.782	0.058	0.046	0.066	0.034	0.017	0.008		
	15	0.673	0.313	3.749	3.406	1.997	25.518	0.015	0.006	0.049	0.058	0.039			
	16	1.621	1.071	5.282	12.040	2.906	4.318	0.004	0.021	0.080	0.026	0.006	0.004	0.047	
	17	0.866	0.525	2.806	4.211	2.109	16.530	0.012	0.014	0.049	0.013	0.008		0.017	
	18	0.434	0.723	8.957	6.637	3.685	35.168	0.024	0.065	0.058		0.046	0.005		
	19	0.682	0.802	5.472	4.031	2.249	35.146	0.076	0.056	0.030	0.037	0.009		0.017	
	20	1.529	1.310	5.152	4.500	2.012	32.478	0.032	0.039	0.044	0.008	0.034		0.013	
	21	1.638	0.819	7.512	5.116	3.351	39.538	0.067	0.087	0.068	0.016	0.031		0.130	
	22	0.266	0.652	4.343	3.380	2.232	33.559	0.029	0.047	0.030	0.018	0.034	0.007		
	23	3.323	1.219	22.412	23.388	1.599	1.245	0.028	0.108	0.087	0.012	0.009	0.008	0.036	
	24	0.811	0.820	5.053	3.472	3.029	35.365	0.019	0.012	0.035	0.011	0.028	0.022	0.019	
	25	0.695	0.715	4.040	5.059	2.245	33.205	0.097	0.030	0.038		0.005	0.035	0.028	
	26	2.145	0.723	3.877	3.039	2.151	29.281	0.020	0.014	0.043	0.007	0.004	0.008		
	27	1.511	0.460	4.262	3.808	2.858	37.350	0.038	0.005	0.064	0.006	0.015			

Nastavak table S1

Vrsta	Uzorak	Lokalitet	Hininska kiselina (mikrog/g DW)	Kafeinska kiselina (mikrog/g DW)	p- Kumarna kiselina (mikrog/g DW)	Ferulinska kiselina (mikrog/g DW)	Sinapinska kiselina (mikrog/g DW)	Rutin (mikrog/g DW)	Izokvercitrin (mikrog/g DW)	Astragalin (mikrog/g DW)	Luteolin (mikrog/g DW)	Kvercetin (mikrog/g DW)	Apigenin (mikrog/g DW)	Naringenin (mikrog/g DW)	Kempferol (mikrog/g DW)
<i>Centaurium erythraea</i>	67	Iriški Venac	7.703	1.317	11.422	22.488	3.000	1.156		0.013	0.018	0.089	0.007	0.017	0.067
	68		5.670	1.697	12.290	33.686	2.453	13.374	0.141	0.018	0.017	0.003	0.007	0.028	
	69		0.539	0.903	14.406	20.751	1.718	1.169		0.025	0.009	0.109	0.006	0.011	
	70		2.092	1.338	15.902	27.509	2.524	1.167	0.004	0.031	0.009	0.195	0.017	0.017	0.042
	71		0.293	2.915	14.664	20.039	3.337	1.357	0.007	0.030	0.022	0.206	0.007	0.010	
	72		16.733	0.887	10.551	23.468	2.047	1.416	0.002	0.039	0.028	0.041	0.003	0.040	
	73		4.114	0.982	9.351	20.212	2.928	1.281		0.012	0.029	0.117	0.021	0.005	
	74		0.966	2.583	19.340	19.864	2.719	0.903	0.020	0.066	0.024	0.230	0.015	0.039	
	75		6.514	2.442	26.437	51.288	5.710	4.559	0.011	0.061	0.077	1.078	0.029	0.152	
	76	1.882	0.895	13.464	19.832	1.754	1.038		0.024	0.019	0.057	0.011	0.008		
	77	4.520	0.778	8.608	24.883	2.198	0.266		0.074	0.012		0.001	0.014		
	78	2.590	0.711	11.049	27.137	2.874	0.367		0.049	0.012		0.002	0.020		
	79	2.158	1.880	16.468	35.510	3.617	0.955		0.172	0.031	0.035	0.038	0.040		
	80	2.838	2.199	14.313	23.935	3.951	0.548		0.017	0.011		0.003	0.023		
	81	12.715	1.711	22.158	23.744	3.639	0.835	0.009	0.049	0.015	0.070	0.043	0.009		
	82	11.327	0.579	15.114	21.422	2.316	0.436	0.003	0.015	0.015			0.013		
	83	2.113	0.623	5.036	10.050	2.185	0.189	0.002	0.019	0.009	0.035		0.008		
	84	21.014	0.079	5.543	17.412	2.676	0.199	0.001	0.020	0.010	0.011	0.008	0.008		
	85	3.304	0.596	8.565	14.097	2.642	0.294	0.004	0.011	0.005	0.023	0.023	0.073		

Tabela S2: Kvantitativni sadržaj sekoiridoidnih glikozida i ksantona ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) zabeležen kod jedinki ispitivanih vrsta roda *Centaurium*.

Vrsta	Uzorak	Lokalitet	Svercijamarin (mg/g DW)	Genciopikrin (mg/g DW)	Sverozid (mg/g DW)	Dekuzatin (mg/g DW)	Eustomin (mg/g DW)	Metilbelidifolin (mg/g DW)	Demetileustomin (mg/g DW)
<i>Centaurium pannonicum</i>	1	Majdan 2013	43.319	3.969	7.743	0.038	0.110	0.612	0.268
	2		26.518	3.863	34.053	0.338	0.576	3.021	1.626
	3		26.270	3.057	28.719	0.220	0.404	2.504	1.211
	4		39.764	6.852	29.615	0.233	0.588	2.007	0.769
	5		32.665	4.749	42.556	0.253	0.450	2.458	1.163
	6		44.100	7.292	11.420	0.130	0.262	1.221	0.581
	7		16.024	2.295	1.842	0.115	0.202	1.343	0.672
	8		23.843	3.069	40.448	0.250	0.445	2.459	1.230
	9		30.332	4.508	25.137	0.181	0.332	1.658	0.797
	10		51.625	7.377	12.802	0.035	0.099	0.419	0.216
	11	Majdan 2014	42.668	1.369	29.500	0.214	0.423	2.315	1.231
	12		48.637	1.379	4.246	0.021	0.145	1.518	0.319
	13		42.519	4.176	26.972	0.298	0.646	2.686	1.411
	14		33.990	4.437	28.306	0.245	0.526	2.293	1.219
	15		33.719	3.924	25.194	0.177	0.419	1.854	0.840
	16		54.273	1.775	0.943	0.014	0.054	0.880	0.205
	17		38.979	4.763	30.741	0.211	0.486	1.893	0.890
	18	Palić 2014	30.024	2.530	29.272	0.243	0.456	1.897	0.983
	19		32.699	3.436	35.493	0.216	0.396	1.821	0.920
	20		27.195	2.918	26.270	0.284	0.586	2.534	1.264
	21		33.171	1.882	27.790	0.265	0.525	1.951	0.961
	22		27.569	2.770	31.134	0.294	0.585	2.375	1.209
	23		95.273	5.663	14.393	0.017	0.090	0.714	0.222
	24		34.613	3.933	41.190	0.276	0.534	2.214	1.312
	25		46.989	4.562	53.418	0.286	0.514	2.501	1.382
	26		34.299	2.461	29.975	0.181	0.364	1.490	0.756
	27	44.920	4.293	44.811	0.272	0.660	2.201	1.081	

Nastavak tabele S2

Vrsta	Uzorak	Lokalitet	Svercijamarin (mg/g DW)	Genciopikrin (mg/g DW)	Sverozid (mg/g DW)	Dekuzatin (mg/g DW)	Eustomin (mg/g DW)	Metilbelidifolin (mg/g DW)	Demetileustomin (mg/g DW)
<i>Centaurium littorale</i> ssp. <i>compressum</i>	28	Majdan 2013	33.572	8.028	5.381	0.511	0.794	5.292	1.076
	29		39.834	12.541	13.328	0.436	0.651	5.575	1.022
	30		59.212	10.681	7.547	0.133	0.259	1.514	0.367
	31		56.220	18.180	6.641	0.324	0.481	3.180	0.754
	32		44.065	8.422	19.602	0.372	0.525	3.570	0.840
	33		66.255	13.154	22.445	0.339	0.485	3.768	0.857
	34		35.620	6.030	5.603	0.273	0.401	3.251	0.704
	35		30.998	7.206	7.742	0.297	0.456	2.846	0.590
	36	49.846	6.902	8.540	0.347	0.461	4.429	1.060	
	37	58.433	9.748	15.066	0.324	0.472	4.112	0.816	
	38	53.096	9.392	16.130	0.252	0.386	2.539	0.595	
	39	56.311	11.390	17.246	0.431	0.636	3.747	0.902	
	40	51.885	11.067	11.105	0.356	0.510	3.190	0.807	
	41	56.444	9.769	14.274	0.424	0.549	3.542	0.894	
	42	61.455	14.447	24.693	0.366	0.595	3.432	0.890	
	43	54.397	12.505	20.896	0.513	0.754	4.704	1.177	
	44	48.388	8.892	27.887	0.439	0.688	4.681	1.169	
	45	41.340	9.147	26.513	0.484	0.652	5.044	1.038	
	46	78.587	11.694	34.023	0.400	0.541	5.238	1.113	
	47	42.290	6.938	26.675	0.339	0.544	3.010	0.727	
	48	41.170	8.771	32.068	0.313	0.471	3.003	0.697	
	49	58.513	9.938	43.298	0.346	0.514	2.713	0.690	
	50	53.682	9.133	44.931	0.396	0.580	3.407	0.827	
	51	60.197	8.727	36.263	0.331	0.528	2.678	0.618	
	52	75.056	11.549	51.306	0.464	0.709	3.889	0.918	
	53	65.214	12.759	41.656	0.299	0.458	2.658	0.632	
	54	53.169	14.455	40.530	0.362	0.539	3.121	0.759	
	55	56.832	8.083	29.086	0.325	0.451	2.394	0.574	
	56	55.717	9.774	35.217	0.190	0.275	1.473	0.396	
	57	58.300	20.561	27.328	0.333	0.441	3.687	0.846	
	58	55.696	23.938	20.219	0.431	0.549	4.543	1.097	
	59	43.963	23.205	21.463	0.442	0.549	4.655	1.086	
	60	56.587	25.943	25.359	0.451	0.618	4.508	1.141	
	61	50.291	16.945	11.878	0.256	0.304	2.814	0.672	
	62	58.412	29.558	23.717	0.286	0.412	3.049	0.788	
	63	62.884	36.535	21.366	0.462	0.712	5.089	1.085	
64	72.278	35.382	22.615	0.230	0.330	2.578	0.580		
65	53.274	26.545	25.756	0.398	0.536	4.457	1.033		
66	231.876	164.135	92.429	1.385	2.075	10.949	2.364		

Nastavak table S2

Vrsta	Uzorak	Lokalitet	Svercijamarin (mg/g DW)	Genciopikrin (mg/g DW)	Sverozid (mg/g DW)	Dekuzatin (mg/g DW)	Eustomin (mg/g DW)	Metilbelidifolin (mg/g DW)	Demetileustomin (mg/g DW)
<i>Centaurium erythraea</i>	67	Iriški Venac	105.026	25.048	19.763	0.023	0.185	0.548	0.538
	68		88.753	17.380	11.925	0.017	0.063	0.346	0.279
	69		125.600	14.151	24.554	0.020	0.157	0.281	0.353
	70		163.419	17.973	15.654	0.015	0.170	0.286	0.378
	71		115.709	13.927	17.410	0.023	0.167	0.555	0.551
	72		87.415	9.144	14.266	0.015	0.107	0.262	0.339
	73		97.853	7.948	11.854	0.013	0.191	0.421	0.569
	74		126.704	18.033	13.193	0.031	0.233	0.466	0.536
	75		366.009	41.322	77.131	0.058	0.507	0.947	1.037
	76	112.976	11.368	16.497	0.015	0.114	0.388	0.487	
	77	Beočin	133.755	11.254	1.352	0.008	0.130	0.235	0.304
	78		157.075	13.907	2.709	0.005	0.056	0.087	0.182
	79		164.915	13.667	15.203	0.021	0.177	0.369	0.343
	80		137.043	10.090	8.198	0.022	0.194	1.228	0.294
	81		120.578	9.975	7.015	0.028	0.111	1.219	0.295
	82		110.960	7.754	14.199	0.024	0.162	1.582	0.354
	83		109.064	7.030	1.976	0.005	0.107	0.160	0.350
84	168.336		6.904	20.904	0.069	0.069	0.160	0.297	
85	152.034	12.646	7.389	0.007	0.181	0.237	0.475		

BIOGRAFIJA AUTORA

Tijana Banjanac rođena je 09.08.1978. godine u Beogradu. Nakon završene Prve beogradske gimnazije upisuje 1997. godine Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, na kome je diplomirala 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,21.

2007. godine je stekla zvanje istraživač pripravnik na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na nacionalnom projektu broj 143031 – „Svetlosna i hormonalna kontrola rastenja i razvića, *in vitro* razmnožavanje i *ex situ* zaštita retkih i ugroženih biljnih vrsta“ finansiranom od strane Ministarstva nauke Republike Srbije.

2009. godine stiče zvanje istraživač saradnik i učesnik je na nacionalnom projektu broj 173024 – „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“, finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Iste godine se priključuje učešću na međunarodnom projektu broj 227448 – „TERPMED - Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds“ finansiranom sredstvima Evropske komisije u okviru Sedmog okvirnog programa (FP7) na kome ostaje do završetka projekta 2013. godine.

Članica je Društva za fiziologiju biljaka Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а : Тијана Бањанац

број уписа Б3041/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Физиолошки и молекуларно-генетички показатељи међуврсне хибридизације у оквиру рода *Centaurium Hill (Gentianaceae)*

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.10. 2016

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тијана Бањанац

Број уписа Б3041/2007

Студијски програм Експериментална и примењенљ ботаника

Наслов рада

**Физиолошки и молекуларно-генетички показатељи међуврсне
хибридизације у оквиру рода *Centaurium Hill (Gentianaceae)***

Ментори др Бранислав Шилер и др Михаило Јелић

Потписани _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.10. 2016

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Физиолошки и молекуларно-генетички показатељи међуврсне хибридизације у оквиру рода *Centaurium Hill (Gentianaceae)*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.10.2016

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.