

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

мр Ратибор Т. Штрбановић

ИДЕНТИФИКАЦИЈА СОРАТА ЛУЦЕРКЕ
ПРИМЕНОМ МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА У
ПОЧЕТНИМ ФАЗАМА РАЗВИЋА БИЉАКА

докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

mr Ratibor T. Štrbanović

IDENTIFICATION OF ALFALFA CULTIVARS
APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS
IN THE INITIAL PHASES OF DEVELOPMENT
PLANTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

БЕОГРАД – ЗЕМУН

МЕНТОР: др Томислав Живановић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
Ужа научна област: генетика

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ: др Гордана Шурлан-Момировић, редов. професор у пензији
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
Ужа научна област: генетика

др Славољуб Лекић, ванредни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
Ужа научна област: семенарство

др Славен Продановић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
Ужа научна област: оплемењивање биљака

др Гордана Бранковић, доцент
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
Ужа научна област: генетика

Датум одбране: _____

Користим прилику да се захвалим менторима проф. др Гордани Шурлан-Момировић и проф. др Томиславу Живановићу за упуства и корисне савете приликом израде и реализације овог рада.

Посебно се захваљујем др Радету Станисављевићу, др Вељку Гавриловићу, др Жарку Ивановићу и др Лани Ђукановић за несебичну помоћ приликом реализације и израде овог рада.

Велику захвалност дугујем колеги др Мирославу Зорићу који ми је несебично помогао приликом обраде статистичких података, а захвалност дугујем и колегама др Драгославу Ђокићу и др Добривоју Поштићу на такође указаној великој помоћи приликом израде овог рада.

Такође се захваљујем колективу Института за заштиту биља и животну средину у Београду на помоћи и обезбеђењу услова за извођење самих истраживања.

Највећу захвалност дугујем својој породици на безграничном разумевању и подрици коју су ми пружили током израде овог рада.

ИДЕНТИФИКАЦИЈА СОРАТА ЛУЦЕРКЕ ПРИМЕНОМ МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА У ПОЧЕТНИМ ФАЗАМА РАЗВИЋА БИЉАКА

ИЗВОД: У обављеним истраживањима процењена је варијабилност десет различитих сората и партија луцерке. Оглед је изведен у акредитованим лабораторијама Института за заштиту биља и животну средину у Београду. Применом *ISSR* и *RAPD* молекуларних маркера извршено је груписање сродних генотипова луцерке, а конструисана филогенетска стабла су извршила груписање сората луцерке према генетичкој сродности у кластере. На гелу на коме се налазе различите сорте луцерке са прајмером *OPB 10*, могу се уочити разлике између сората луцерке. Молекуларном методом *ISSR* и коришћењем прајмера $(GACA)_4$ и $(TGTC)_4$ потврђене су разлике између испитиваних сората луцерке.

Генетичке дистанце између десет проучаваних генотипова луцерке кретале су се у интервалу од 0,097 до 0,310. У анализи главних координата прве и друге осе објасниле су укупно 63,1 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. Груписање података на основу анализе главних координата показало је сличност и са моделом груписања на основу кластер анализе. Јасно се може видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од осталих проучаваних генотипова луцерке. Анализом молекуларне варијансе у укупној варијацији знатно веће варирање било је резултат диференцијације у оквиру група (98,22 %), него диференцијације између група (1,78 %).

Применом теста убрзаног старења код десет различитих сората и партија луцерке, утврђена је значајност између партија семена, као показатељ виталности семена луцерке. Применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 41 °C након излагања семена у времену од 72 h на свим испитиваним сортама, било је могуће детектовати партије семена које су биле виталније од других.

Примена теста убрзаног старења модификованом методом, на температури од 45 °C у времену трајања од 120 h, утврђене су виталније партије семена код свих испитиваних сората луцерке.

Испитивањем здравственог стања семена утврђена је толерантност према фитопатогеним микроорганизмима (гљивама) и утицај локалитета (партије семена) на варијабилност патогена семена исте сорте. Утврђени микроорганизми (гљиве) на семену луцерке утицале су на смањење укупне клијавости семена, што указује негативна корелациона међузависност.

Кључне речи: луцерка, *PCR*, молекуларни маркери, тест убрзаног старења, здравствено стање семена.

Научна област: БИОТЕХНИЧКЕ НАУКЕ

Ужа научна област: РАТАРСТВО И ПОВРТАРСТВО

UDK број: 633.31:631.53.01(043.3)

IDENTIFICATION OF ALFALFA CULTIVARS APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS IN THE INITIAL PHASES OF DEVELOPMENT PLANTS

ABSTRACT: The aims of the investigation were to estimate variability of ten different cultivars and lots of alfalfa. The experiment was performed in accreditation laboratories of the Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade. *ISSR* and *RAPD* molecular markers were clustered closely related genotypes of alfalfa and constructed phylogenetic trees were performed grouping cultivar of alfalfa according to their genetic relatedness in clusters. Gel that includes the different cultivars of alfalfa with a primer OPB 10, can spot the differences between cultivars of alfalfa. *ISSR* molecular method and using primers (GACA) 4 and (TGTC) 4 confirmed the differences between the cultivars of alfalfa.

Genetic distans between ten studied alfalfa genotypes were in the range of 0,097 to 0,310. In the analysis of the main coordinates of the first and second axes are explain 63,1 % genetic variation contained in the original data set. Group data based on analysis of the main coordinates showed similarity with the model of grouping based on cluster analysis. We can clearly see that the genotype Zajecharska 83 genetically furthest from the other studied alfalfa genotypes. The analysis of molecular variance in total variation much greater variation was a result of differentiation within the group (98,22 %), but differentiation between groups (1,78 %).

Applying the accelerated aging test in ten different cultivars and lots of alfalfa, determined significance between seed lots, as an indicator of the vitality of alfalfa seed. Using a standard accelerated aging test at a temperature of 41 ° C after exposure to the seed for a period of 72 h in all tested varieties, it is possible to detect the seed lots that were more vital than others. Application of accelerated aging by the modified method and at a temperature of 45 ° C for the duration of 120 h, were determined vital seed lot in all the cultivars of alfalfa.

Seed health testing determined tolerance to phytopathogenic microorganisms (fungi) and effect of the site (seed lot) on the variability of the pathogen seed of the same variety. Fortified microorganisms (fungi) on seeds alfalfa resulted in the reduction of total seed germination, indicating a negative correlation interdependence.

Key words: alfalfa, *PCR*, molecular markers, accelerated aging test, seed health.

Scientific field: BIOTECHNICAL SCIENCES

Specific scientific field: FIELD AND VEGETABLE CROPS

UDK number: 633.31:631.53.01(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	8
3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	9
4. РАДНА ХИПОТЕЗА.....	18
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА.....	19
5.1. Биљни материјал.....	19
5.2. Карактеристике и опис сората луцерке.....	20
5.3. Екстракција ДНК.....	24
5.4. Изоловање ДНК.....	24
5.5. Умножавање фрагмената ДНК <i>PCR</i> методом.....	25
5.6. <i>ISSR</i> анализа.....	26
5.7. <i>RAPD</i> анализа.....	27
5.8. Оцена теста убрзаног старења семена.....	27
5.9. Утврђивање здравственог стања семена.....	28
5.10. Статистичка обрада података.....	29
5.10.1. Израчунавање генетичке сличности.....	29
5.10.2. Мултиваријациона анализа генетичких дистанци генотипова.....	29
5.10.3. Анализа молекуларне варијансе.....	30
5.10.4. Програми коришћени за анализу података.....	31
6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА.....	33
6.1. Примена молекуларних маркера.....	33
6.1.1. Анализа главних координата (<i>PCoA</i>).....	43
6.1.2. Анализа молекуларне варијансе (<i>AMOVA</i>).....	46
6.2. Примена теста убрзаног старења семена.....	49
6.2.1. тест убрзаног старења семена (стандардни метод).....	66
6.2.2. тест старења убрзаног семена (модификовани метод).....	69
6.3. Испитивање здравственог стања семена.....	71
7. ЗАКЉУЧАК.....	78
8. ЛИТЕРАТУРА.....	80
9. БИОГРАФИЈА.....	97

1. УВОД

Плава луцерка (*Medicago sativa* L.) једна је од најстаријих крмних култура и била је позната још пре 8000 година. Води порекло са територије данашњег Ирана и Арабије, мада се врсте рода *Medicago* могу наћи по целој Азији (Michaud et al., 1988). Ареал гајења луцерке је на свим континентима у више од 80 земаља, од умерено хладног до тропског појаса. Широка географска распрострањеност луцерке условљена је њеном великом адаптабилношћу на различите климатске и земљишне услове (Julier et al., 1995).

Према Мишковићу (1986) северна граница гајења луцерке за производњу крме налази се на 55-60° северне географске ширине, односно у јужним деловима Скандинавије. На јужној хемисфери луцерка се гаји до 45° јужне географске ширине (Нови Зеланд), односно 55° јужне географске ширине (Аргентина, Чиле).

Плава луцерка (*Medicago sativa* L.) је најраспрострањенија на Балканском полуострву, односно до Тибета на истоку, док је жута луцерка (*Medicago falcata* L.) највише распрострањена у степским и шумско-степским пределима Европе и Азије.

О значају луцерке говоре и површине које ова биљна врста заузима, како у нашој земљи, тако и у свету. Луцерка се у свету гаји на око 33 милиона ha⁻¹, највише у Северној и Централној Америци, затим у Јужној Америци, Европи, Азији, државама бившег СССР-а и у Аустралији. Последњих година луцерка је у Србији заступљена на око 200000 ha⁻¹. Најзначајнији региони гајења луцерке у нашој земљи су у Поморављу, Војводини, Посавини са Мачвом, Стигу, Шумадији и Тимочкој крајини. У Централној Србији луцерка је заступљена на око 130000 ha⁻¹, у Војводини на око 60000 ha⁻¹ (Lugić et al., 2010, Štrbanović, 2010).

Луцерка образује врло јак, вретенаст коренов систем, просечно дубок до 5 m, али може бити и дубљи. Из главног корена се развија неколико снажних бочних жила. Плава луцерка има особину да коренов врат увлачи у земљиште, и тако штити пупољке и младе изданке од измрзавања, што је код севернијих форми израженије у односу на јужније форме.

Стабло је жбунасто, зељасто, једногодишње и нежно, висине 60-120 cm. У години сетве се развија из клице семена. Број стабла који избије из круне корена у

првој години живота је 2-5, а у годинама пуног искоришћавања тај број је у зависности од вегетационог простора много већи (20-60). Листови су тропери, налазе се на дугој лисној дршци, средња лиска је на дужој дршци, док остале лиске немају дршку, или им је врло кратка, што луцерку одваја од детелина. Цветови су скупљени у гроздасту цваст љубичасто-плаве боје. Обично у цвасти има 12-26 цветова, а величина цветова износи 6-12 mm. Плод је вишесемена, спирално увијена махуна, са 1,5-3,5 завоја, дуга 4-6 mm. Махуна је глатка или обрасла длакама, са 3-8 семена. У једном килограму има око 500000 семена, а маса 1000 семена износи 1,5-2,5 g. Цветање првог откоса почиње почетком маја (Vučković, 1999).

Луцерка одлично подноси различите температурне услове. У току ницања може поднети слабе мразеве до $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$, док одрасла биљка може поднети ниже температуре, и до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lukić, 2000). Може се успешно гајити у регионима са мало падавина, мање од 200 mm, као и у хумидним областима са 2500 mm падавина, и на надморској висини до 2500 m (Melton et al., 1988).

Луцерка има посебно место у плодореду. Способност да у симбиози са бактеријом *Rhizobium meliloti* фиксира атмосферски азот, у великој мери смањује потребе за применом азотних минералних хранива како у луцеришту, тако и у усеву који се гаји након разоравања луцеришта, што даје овој врсти и еколошки значај. Количина фиксираних азота зависи од великог броја фактора и креће се од $50\text{-}463\text{ kg ha}^{-1}$ годишње (Vance et al., 1988).

Након разоравања површина под луцерком, у земљишту остају велике количине азота и органске материје, чијом хумификацијом, а потом и минерализацијом долази до значајног побољшања физичких и хемијских особина земљишта.

Луцерка поседује многобројне особине које човек од давнина, а поготову данас вишеструко користи, првенствено у производњи квалитетне сточне хране. Одликује се изузетно високим потенцијалом за принос суве материје који се креће од $15\text{-}18\text{ t ha}^{-1}$ у сувом ратарењу, односно у условима наводњавања и преко 25 t ha^{-1} суве материје. Користи се континуирано 4-5 година, дајући сваке године у току вегетације 4-5 откоса (Adoyan and Liyv, 1974).

Поред високих приноса, луцерка се одликује и изванредним квалитетом суве материје, посебно у погледу садржаја протеина, који се крећу од 18-22 % у зависности од фазе развића вегетативних органа биљке. Протеини луцерке су високе биолошке вредности, посебно у погледу аминокиселинског састава, јер је удео есенцијалних аминокиселина веома изражен. Осим протеина, луцерка има и значајан садржај других органских једињења као што су: целулоза, масти, разни шећери и друго. Значајан је и садржај минералних материја, посебно фосфора, калцијума, калијума, сумпора, магнезијума, хлора итд., који су неопходни у исхрани свих домаћих животиња (Marković i sar., 2007).

Поред наведених, луцерка садржи и већи број органских стимулативних материја као што су витамини А, В₁, В₂, В₃, С, D, Е, К, РР, затим хормони и разне органске киселине (лимонска, јабучна и малонска).

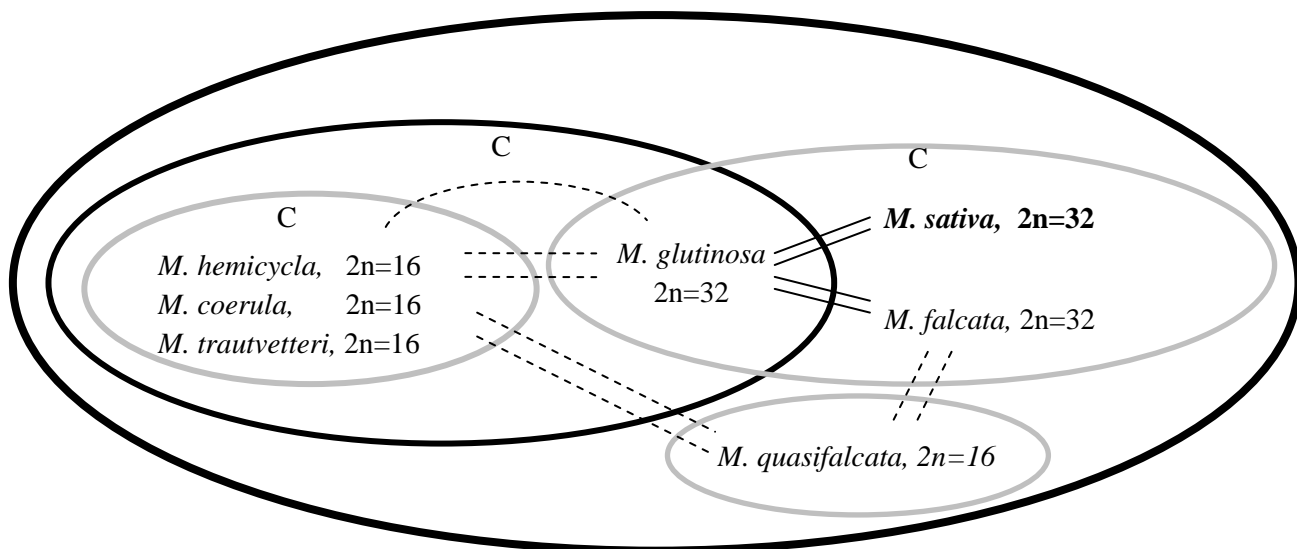
Луцерка је, после кукуруза, најважнија крмна врста у нашој земљи, захваљујући не само повољном хемијском саставу и високом садржају протеина, већ и високим приносима и веома добрим биолошким особинама. У исхрани домаћих животиња може се користити као зелена маса, сено или конзервисана у комбинацији са другим крмним биљкама (Djordjević i Dinić, 2007).

Плава луцерка, *Medicago sativa* L. ($2n = 32$) је природни тетраплоид (Stanford and Clement, 1958). Таксономски луцерка припада фамилији *Fabaceae* (махунарке), роду *Medicago*, који укључује више од 60 различитих врста, једногодишњих и вишегодишњих диплоида, тетраплоида и хексаплоида са хромозомским бројем $n = 8$.

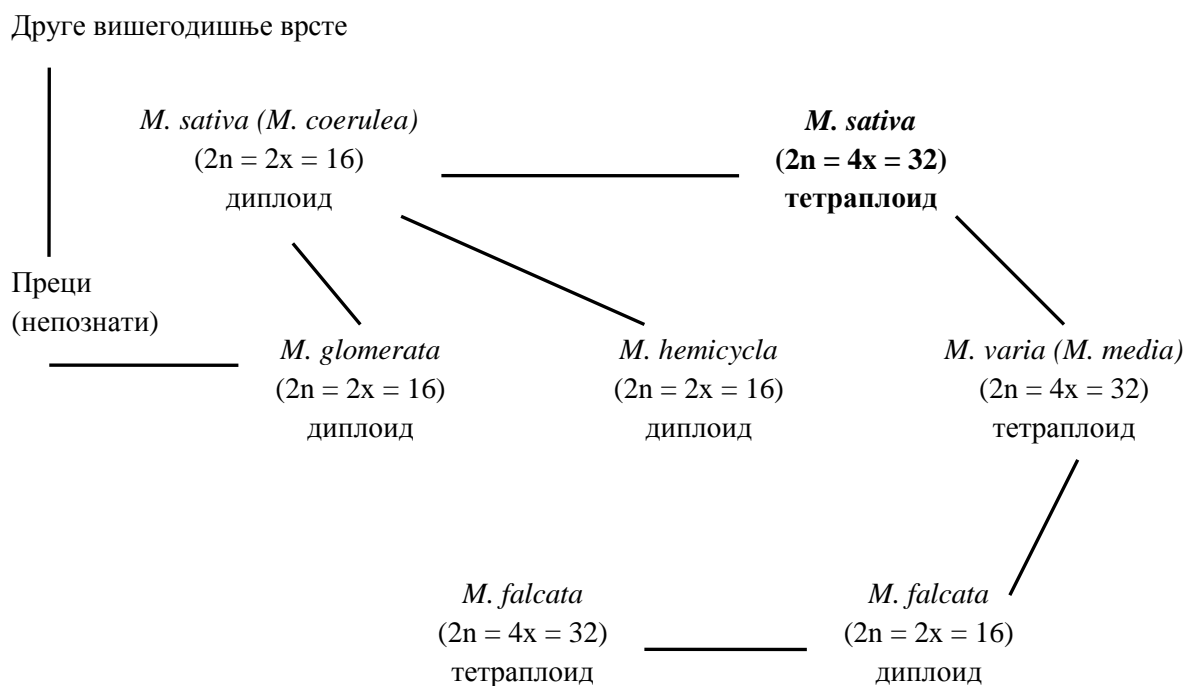
Када је о еволуцији рода *Medicago* реч, она се развијала од диплоидних и тетраплоидних до хексаплоидних форми, путем природне хибридизације (Ivanov, 1980).

Претпоставља се да су тетраплоидна *Medicago sativa* L. и *Medicago falcata* L. потекле од диплоида природним удвостручавањем броја хромозома, односно диплоидних гамета. *Medicago media* Pers. је настала природном хибридизацијом двеју тетраплоидних врста.

На слици 1. можемо видети еволуцију вишегодишњих форми луцерке (Sinskaja, 1950). Слика 2 представља хипотетичку еволуцију луцерке (Quiros, 1979).



Слика 1. Еволуција вишегодишњих форми луцерке (по Sinskaји, 1950).



Слика 2. Хипотетичка еволуција луцерке (Quiros, 1979).

Све гајене сорте су тетраплоиди, мада постоје диплоидне форме које имају значај у истраживању ове врсте, али немају широку примену у пољопривредној производњи.

За успешну селекцију је неопходно стално уводити нови селекциони материјал и користити га преко разних видова хибридизације за повећање постојеће варијабилности. Генетичка варијабилност представља тенденцију индивидуалних генотипова и популација да се разликују једни од других, у зависности од утицаја њиховог генотипа и спољашње средине. Генетичка варијабилност је важна због биодиверзитета, зато што без варијабилности одређена популација не би успела да се прилагоди променама у спољашњој средини. Варијабилност је важан фактор у еволуцији и омогућава преживљавање организама у оквиру популације захваљујући природној селекцији (Falconer and Mackay, 1996).

Примена молекуларних метода, односно *PCR*-а или полимеразна ланчана реакција је поступак који је означио револуцију у молекуларној биологији. Молекуларни маркери су нарочито важни у оплемењивању биљака, посебно код вишегодишњих биљних врста јер омогућују бржи оплемењивачки рад и ефикасније издвајање појединих генотипова (сората) само на основу ДНК анализе.

Генетичку разноврсност ДНК молекула чине разлике у редоследу нуклеотида, од којих зависе промене аминокиселинског редоследа у протеинима које ти гени кодирају. Такве промене у протеинима могу утицати на њихову биохемијску функцију или могу довести до морфолошких промена које утичу на преживљавање јединки у популацији. Генетичка разноврсност настаје најчешће као последица мутација и рекомбинација и она представља еволуцијски потенцијал врсте и важна је за способност прилагођавања на промене у спољашњој средини. Генетичке разноврсности се прате помоћу генетичких маркера, где се одређује присутност одређених алела у популацији.

Развојем молекуларних метода у употребу улазе молекуларни маркери као што су: Полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената - *RFLP* (енгл. *Restriction fragment length polymorphism*), Насумично умножавање ДНК полиморфизма - *RAPD* (енгл. *Random amplified polymorphic DNA*), Полиморфизам дужине умножених фрагмената - *AFLP* (енгл. *Amplified fragment length polymorphism*), Полиморфизам појединачних нуклеотида - *SNP* (енгл. *Single nucleotide polymorphism*), Полиморфизам једноланчане конформације - *SSCP*

(енгл. *Single strand conformational polymorphisms*), Варијабилни број тандемских понављања - *VNTR* (енгл. *Variable number tandem repeats*), Микросателитске ДНК секвенце - *SSR* (енгл. *Simple sequence repeat*) и *ISSR* (енгл. *Inter simple sequence repeat*).

У биљном и животињском геному неки региони су јако варијабилни и садрже једноставне секвенце које се називају микросателити (*SSR*). Код биљака, микросателити су чести и раширени по целом геному. Они су коришћени за истраживање генетичке варијабилности код гајених биљака, али и код популација аутохтоних биљака. Микросателити су коришћени као генетички маркери за интраспецијско и интерспецијско истраживање варијабилности (Soranzo et al., 1999).

Генетички маркери коришћени у овом истраживању су *ISSR* микросателитске ДНК секвенце. Молекуларна метода *ISSR* (енгл. *Inter simple sequence repeat*) представља технику карактеризације микросателита базирану на умножавању, уз помоћ ланчане полимеразне реакције *PCR* (енгл. *Polimerase chain reaction*), *ISSR* региона коришћењем прајмера који одговара једном делу микросателита. Под овим условима биће умножене само секвенце окружене са два идентична микросателита. Обзиром да су микросателити широко распрострањени дуж генома онда су и *ISSR* мете у великом броју генетичких студија (Benharrat, 2002).

Предходних година, ДНК базни маркери су били успешно примењивани за одређивање разлика између таксона и између индивидуалних генотипова код многих врста биљака и животиња. ДНК базни маркери нису зависни од фактора спољашње средине као ни од развојних фактора.

RAPD (енгл. *Random amplified polymorphic DNA*) је техника која се користи да се детектује полиморфизам у ДНК секвенцама.

Утврђивање генетичке удаљености сората је веома важан корак у свим програмима оплемењивања луцерке пре избора одговарајућих родитеља. Штавише, идентификовање група са сличном генетичком разноврсношћу је од суштинског значаја у очувању генетичког фонда (Živković i sar., 2012).

Да би се испитао квалитет семена, тест убрзаног старења семена (*AA–Accelerated ageing*) је један од највише примењиваних тестова за контролу семена

који даје веома значајне информације о квалитету семена појединих биљних врста. Тај тест се сматра једним од најпопуларнијих техника, због своје једноставности, лакоће стандардизовања и примене на великом броју биљних врста (McDonald, 1998).

Истовремено тест убрзаног старења семена (АА) тражи константно усавршавање и прилагођавање семенима појединих биљних врста. У југоисточној Европи луцерка је за пољопривреду веома значајна биљна врста како за производњу крме тако и за производњу и промет семена. У овом делу Европе у литератури нема значајнијих података о испитивању теста убрзаног старења на семену луцерке.

Луцерку напада велики број проузроковача биљних болести и штеточина. Микроорганизми који изазивају трулеж корена и увенућа луцерке су главни агенси који изазивају прогресивни пад продуктивности луцерке. Многи патогени који изазивају болести надземног дела и корена луцерке се преносе зараженим семеном, тако да семе може да представља веома опасан извор заразе.

Разне патогене гљиве (*Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia* spp. итд.) изазивају одређене врсте трулежи корена и стабљике луцерке, а могу се јавити и неспецифични симптоми на биљкама као што су нижи пораст, хлороза и увенуће (Krnjaja i sar., 2011).

Семе луцерке игра веома важну улогу у производњи здравих биљака, јер ако је заражено оно може да носи споре гљива које могу да изазову трулеж семена, смањену клијавост и тотално уништење клијанаца након клијања (Abdul-Aziz A. et al., 2012).

Најштетнији патоген на семену луцерке је гљива *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* која изазива болест увенућа луцерке и преноси се семеном (Štrbac i sar., 1996). Због опасности од ширења болести луцерке преко зараженог семена, веома је важно да се користи квалитетно и здравствено исправно семе за сетву.

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Узимајући у обзир велики значај луцерке као крмне биљне врсте, како у свету тако и код нас, посвећена јој је велика пажња са циљем добијања што већег приноса биомасе и семена како у погледу квантитета тако и у погледу квалитета.

Циљ овог рада је да се испитивањем десет различитих сората луцерке одреди варијабилност и груписање сродних генотипова луцерке применом *ISSR* и *RAPD* молекуларних маркера.

Такође ће се применом теста убрзаног старења код десет различитих сората луцерке и по три партије од сваке сорте, утврдити значајност између партија семена, као показатељ животне способности семена луцерке. Унапређењем методе за оцену теста убрзаног старења оцениће се која концентрација соли и која температура при спровођењу теста убрзаног старења је оптимална за детектовање разлика између партија семена различитих сората луцерке.

Испитивањем здравственог стања семена утврдиће се толерантност према патогенима и утицај локалитета (партије семена) на варијабилност патогена семена исте сорте.

Циљ ове докторске дисертације је такође коначан избор најбољих генотипова који ће послужити као родитељи за стварање нових сорти луцерке.

3. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Успех у оплемењивању биља првенствено зависи од постојања генетичке варијабилности у почетној или изворној популацији, избора методе и начину испитивања одабраних генотипова. Идеална популација, као изворни материјал у оплемењивању биља, треба да има високе просечне вредности тражених особина, значајну генетичку варијабилност, широку адаптивност, добру комбинациону способност и задовољавајућу фреквенцију пожељних алела (Rojs and Kozumplik, 1996).

Извори генетичке варијабилности за поједине особине луцерке могу бити локални екотипови, постојеће сорте, оплемењивачке популације, дивљи сродници, интродуковане сорте и др. Ако генетичка варијабилност код луцерке није довољна за постизање специфичног циља или се ради о особини ниске наследности, могуће је створити нову варијабилност међуврсним укрштањем, док примена индукованих мутација није дала неког већег ефекта код крмних биљних врста (Bowley, 1997).

Природна аутотетраплоидност и странооплодни начин опрашивања, праћен јако малим процентом самооплодње (до 10 %) у великој мери доприноси повећању постојеће генетичке варијабилности луцерке. Богат и варијабилан генетички фонд омогућава луцерки високу полиморфност и одличну адаптивност на варијабилне услове спољашње средине у току вишегодишњег периода искоришћавања (Radović, 2005).

Посебно важан извор варијабилности су свакако и локални екотипови који су високо адаптирани на агроеколошке услове у којима се гаје (Mijatović, 1960; Sikora, 1974).

Одабирање селекционог материјала који је генерално адаптиран на еколошке услове датог региона је главни услов за постизање високих и стабилних приноса. То је један од разлога што у многим испитивањима домаћи варијетети остварују боље резултате од интродукованих сорти (Rumbaugh et al., 1988).

Dehghan-Shoag et al. (2005) су спровели истраживање са циљем процењивања успешности утврђивања разлика између четири иранске и две новозеландске сорте оцењивањем морфолошких особина у пољу и стакленику, у

односу на предходно спроведену фотографску анализу семена (*digital image processing algorithm-VIPS*) на истим сортама (Dehghan-Shoar et al., 1998). Наводе да су већина морфолошких особина, нарочито дужина и ширина средњег листића у тролиску, почетак цветања као и висина биљака, под великим утицајем агроеколошких услова у којима биљка расте. Исти аутори истичу да резултати истраживања указују на потребу проналажења ефикаснијих и прецизнијих метода (молекуларних анализа) за идентификацију и дескрипцију сорти луцерке.

Cooke (1995) наводи да велики број морфолошких својстава има квантитативну генетичку основу, што значи да на његову експресију утиче већи број гена, али да је њихова експресија под значајним утицајем спољашње средине. Такође, наглашава да код оцењивања морфолошких особина постоји опасност због субјективности приликом обављања запажања истраживаних материјала, док код примене молекуларних анализа то није случај.

Примена метода молекуларних маркера у оплемењивању луцерке може помоћи у утврђивању генетичке дивергентности између и унутар испитиваних популација, одабирању удаљених потенцијалних родитеља синтетичке популације као и у проучавању инбридинга и хетерозиса код те врсте (Radović, 2005).

Процена генетичке разноврсности и односа између различитих приступања је од фундаменталног значаја за програме оплемењивања. Ова информација може да пружи предвиђања процене генетичке варијације унутар врсте, чиме се олакшава избор селекционог материјала (Qi et al., 2008).

Неопходно је и даље трагати за оптималним селекционим методама, које омогућују постизање максималног хетерозиса. Развој класичне квантитативне генетике у решавању овог проблема је веома значајан, као и коришћење нових метода као што су примена молекуларних маркера (Gallais, 2003).

Све више се ради на мапирању генома луцерке. За сада су успешно нађени маркери који су повезани са неким важним особинама као што је осетљивост према ниским температурама, толеранција на Al^{3+} и сл. (Veronesi et al., 2003).

Поред плаве луцерке, ради се и на мапирању *Medicago truncatula*, диплоидној врсти рода *Medicago*. Циљ истраживања је да се на мапирању *Medicago truncatula* као биљке модела, нађе одговарајући метод за развијање одговарајуће процедуре за *Medicago sativa* (Julier et al., 2003).

Прва примена ових метода била је на диплоидним формама луцерке (Brummer et al., 1993) и на једногодишњим врстама рода *Medicago sp.* (Brummer et al., 1995). Луцерка је странооплодна врста са израженом инбридинг депресијом, па је добијање хомогеног материјала (хомозигота) тешко изводљиво (Osborn et al., 1998).

Молекуларни маркери су фрагменти ДНК који представљају део гена или некодирајућег дела генома и одликују се високим полиморфизмом. Генетички полиморфизам је присуство два или више алела у истом локусу у некој популацији, при чему сваки алел има значајну фреквенцију (Cavalli-Sforza and Bodmer, 1971). Полиморфизам молекуларних маркера се заснива на варијацији одређених ДНК секвенци у популацији и може се детектовати на више начина (Liu, 1998).

У последњих десет година, различите методе молекулских маркера као што су *RFLP* - (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *SSR* - (*Simple Sequence Repeats*), *SRAP* - (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) и *RAPD* - (*Random Amplified Polymorphism DNA*) нашле су своју примену у оплемењивању многих пољопривредних биљних врста. Апликација ових метода у оплемењивању луцерке је прилично отежана из више разлога. Један од разлога је природна аутотетраплоидност луцерке, која у великој мери отежава рад на тој врсти.

У поређењу са другим ДНК маркерима као што су *RFLP* - полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената, *RAPD* - насумично умножавање ДНК полиморфизма, *SNP* - полиморфизам појединачних нуклеотида и *AFLP* - полиморфизам дужине умножених фрагмената, *SSR* - микросателитске ДНК секвенце су маркери који се често користе код биљака, јер су мултиалелни, кодминантни, високо поновљиви и могу да функционишу са ниском чистоћом ДНК (Morgante and Olivieri, 1993; Wang et al., 1994).

Брза „*CTAB*“ (Doyle and Doyle, 1990), ДНК изолација је као техника за екстраховање ДНК из пет врста биљака и једне врсте гљиве доказана као ефикасна за *PCR* анализе (Stewart and Via, 1993).

Систематска и прецизна евалуација гермплазме је предуслов за њено ефикасно коришћење у истраживачким и оплемењивачким програмима (Nelson, 2011).

Евалуација на молекуларном нивоу омогућава карактеризацију генотипских разлика узорака у колекцијама и мапирање гена од значаја за селекцију (Qiu et al., 2011).

Евалуација на молекуларском нивоу омогућава класификацију материјала у групе према циљевима оплемењивања, олакшавајући избор селекционерима (Frankel, 1984).

Многи *SSR* маркери су развијени и имају широку примену на биљкама за развој генетичких мапа, процену генетичке разноврсности, популационе генетике и као маркери који се користе за одабир биљака приликом селекције (Gupta and Varshney, 2000).

Молекуларни маркери су се показали као веома моћан алат за карактеризацију генотипа и процену генетичке разноврсности. У последњих неколико година, разни молекуларни маркери, укључујући и *RAPD* - насумично умножавање ДНК полиморфизма (Deshwall et al., 2005; Teklewold and Becker 2006), *AFLP* - полиморфизам дужине умножених фрагмената (Laurentin and Karlovsky 2006; Wang et al. 2010a), и *SSR* - микросателитске ДНК секвенце (Beuene et al., 2006; Wang et al., 2010b) се користе за детекцију генетичке разноврсности код различитих биљних врста.

ISSR и *SSR* маркер системи се нашироко користе за процену генетичке разноврсности (Ariss and Vandemark, 2007; Uysal et al., 2010; Yang et al., 2010; Iwata et al., 2005; Ofori et al., 2008; Panguluri, 2007).

ISSR маркери се успешно користе за идентификацију сората и процену генетичких односа и различитости у великом броју хортикултурних врста, укључујући јабуку (Goulaõ and Oliveira, 2001), крушку (Monte-Corvo et al. 2001), лупину (Talhinhas et al., 2003), јагоду (Arnau et al., 2003) и хризантему (Chatterjee et al., 2006).

Молекуларни маркери су корисни у идентификовању максимално различитих родитељских генотипова, у процени генетичке разноврсности која је корисна у идентификацији сората, у анализи генетичке чистоће семена, оплемењивању и управљању гермплазмом (Xavier et al., 2011).

Генотипизација или ДНК фингерпринт (метод отиска прста), представља технику која се користи за карактеризацију и поређење секвенци било којих организама. Подаци добијени на овај начин могу да се користе за идентификацију индивидуа у популацији, разликовање индивидуа приликом стварања инбред линија или детекцију генетичких дистанци између генотипова уопштено. Ове методе могу да се користе за проверу чистоће семенског материјала, за утврђивање идентитета сорте и касније заштиту интелектуалне својине креатора сорте односно оплемењивача. У ширем смислу, генотипизација омогућава утврђивање нивоа генетичког диверзитета, што је веома битно за оплемењиваче јер представља основу за селекцију супериорних родитељских комбинација. Потреба за новим генетичким комбинацијама стално је присутна како би се одговорило на различите изазове природе, као што су климатске промене, варијабилност у расном саставу патогена и недостатак есенцијалних нутритијената (Landjeva et al., 2007).

Микросателити имају улогу молекуларних дескриптора, могу послужити за добијање јединственог документа генотипског идентитета који омогућава разликовање фенотипски идентичних индивидуа (Giancola et al., 2002; Tantasawat et al., 2011).

У ужем смислу се практично користи у утврђивању генетичке чистоће признатих сорти (Yates et al., 2012).

Примена молекуларних маркера је достигла највећи ступањ у програмима побољшања биљне производње, где се примењује као сама или у комбинацији са конвенционалним методама оплемењивања биљака, како би се добила највећа прецизност у програмима селекције и стварања нових сорти (Varshney et al., 2012).

Анализирањем фенотипских особина и *RAPD* маркера у процени различитости 10 сората луцерке (*Medicago* sp.) пореклом из Европе, Северне Америке и Аустралије, квантификација генетичке варијансе важних морфо-агрномских особина је од суштинског значаја у оплемењивању јер открива генетичку структуру популације. Велико варирање испитиваних морфо-агрномских особина у овој студији указује на могућност да се изаберу супериорне индивидуе за даљи рад у процесу селекције и оплемењивања (Tusak et al., 2010).

На луцерки, са *RFLP* и *SSR* маркерима, пронађена је разлика између врста *M. sativa* и *M. falcata*, али ниво различитости је био веома низак између три сорте које су биле од три различита оплемењивача (Maureira et al., 2004). Слично томе, низ од 9 (девет) *SSR* маркера био је у стању да утврди разлике између три популације тетраплоидне брезе (*Betula pubescens* L.) Truong et al., (2004). Али на диплоидном енглеском љуљу (*Lolium perenne* L.) на седам испитиваних сорти могу се детектовати разлике коришћењем низа од 22 *SSR* маркера (Kubik et al., 2001).

Жетва семена у одговарајућој фази је важна ради постизања доброг квалитета семена (Copeland and McDonald, 1995).

Добијање нормалних и различитих категорија ненормалних клијанаца је заједничка карактеристика многих стресних фактора као и примене различитих тестова. Већина тестова за одређивање животне способности су дуготрајни и скупи у поређењу са стандардним тестовима за испитивање клијавости семена (Sako et al., 2001).

Убрзаним условима старења семена на 44 °C и 72 h препоручује се као тест за одређивање животне способности на семену пиринча за заједничке Таи сорте. Међутим, то треба узети у разматрање пре него што би се тест стандардизовао (Chhetri, 2009).

Два најважнија фактора спољашње средине који утичу на животну способност семена су релативна влажност ваздуха, која контролише садржај влаге у семену и температура ваздуха (McDonald, 1999).

Већина семена гајених биљака губи животну способност на високим температурама ваздуха и са високом релативном влажношћу ваздуха. У таквим условима долази до старења семена и његовог „пропадања“. Пропадање семена може да се дефинише као губитак животне способности, било због старења семена или неповољних услова околине. Стопа пропадања семена рапидно расте или са повећањем садржаја влаге у семену или са повећањем температуре у складиштима, где се семе чува (Ellis et al, 1985).

Животна способност семена и тестови клијавости семена су битне компоненте контроле квалитета семена за индустрију семена. Тест убрзаног старења семена је један од најкориснијих тестова који се користи за процену животне способности семена.

Здраво и зрело семе своју животну способност задржава током временског периода различите дужине, зависно од биљне врсте, услова у којима се чува и његове целокупне историје. Целокупна семенска производња почива на начелима одржавања и побољшања животне способности семена (Лекић, 2003). Исти аутор истиче да су покушаји да се разуме погоршање стања партије семена, које се изражава као општи пад његове животне способности, у времену и простору, оптерећени како проблемом дефинисања тако и њиховим тумачењем.

Ширина и ниво опадања животне способности семена, у оквиру партије семена, током складиштења, одражава предисторију партије семена, па су отуда и велике разлике између семена различитих партија са становишта њихових биохемијских и физиолошких особина (Лекић, 2001).

Лекић (2001) истиче да код убрзаног старења, које се постиже деловањем неповољних спољашњих фактора димензија времена остаје апсолутна константа која је непромењива и да би једино зато убрзано старење семена уз убрзано време могло бити једнако природном старењу.

Испитивањем убрзаног старења на семену сорте мунг пасуља (*Phaseolus aureus* Roxb.) на 45 °C и 100 % релативне влажности ваздуха у периоду од 2, 4, 8 и 14 дана са контролом дошло је до драстичног смањења процента клијавости већ после 4 дана. Смањење клијавости било је прогресивно, а са повећањем периода старења клијавост је износила 36 % након 14 дана у односу на контролу где је клијавост била 100 % (Abass and Shaheed, 2012).

Torres et al., (2014) су испитивали две различите сорте бамње (*Abelmoschus esculentus* L.), једну сорту са четири а другу са пет различитих партија семена са две различите температуре од 38 и 41 °C у времену трајања од 24, 48, 72 и 96 h. Након завршених испитивања утврдили су да се при температури од 41 °C у трајању од 96 h могу утврдити разлике у животној способности семена између испитиваних сората и партија бамње.

Применом теста убрзаног старења семена на четири различите сорте зачинске биљке коријандера и три различите партије од сваке сорте, закључено је да је тест убрзаног старења семена био ефикасан да процени физиолошки потенцијал семена коријандера на температури од 41 °C у трајању 48 h (стандардни метод) и модификованим методом са раствором соли на температури од 41 °C и трајању 72 h (Pereira, 2012).

Испитивањем две партије жутог звездана резултати теста убрзаног старења и стандардни тестови клијавости семена показали су високо значајну корелацију ($r=0,82^{**}$) у односу на појаву клијанаца из земљишта. Међутим, тест убрзаног старења семена био је осетљивији од стандардног теста клијавости у детектовању разлика између партија семена жутог звездана. Ови резултати указују да тест убрзаног старења семена има капацитет да класификује одређене партије семена у односу на њихову потенцијалну животну способност (Artola et al., 2005).

Лекић (2001) у свом раду са пет хибрида кукуруза, истиче да је убрзано старење имало најјачи утицај на брзину клијања и да су дволинијски хибриди бољи од троллинијских, али да није могуће закључити који су од њих отпорнији на стресне услове.

У ратарској литератури се често спомиње „*Виталност семена*“, која обухвата особине семена које доприносе његовом одржавању у животу, односно виталност је израз животне снаге семена (Лекић, 2003).

Луцерку напада велики број проузроковача биљних болести и штеточина. Микроорганизми који изазивају трулеж корена и увенућа луцерке су главни агенси који изазивају прогресивни пад продуктивности луцерке. Многи патогени који изазивају болести надземног дела и корена луцерке преносе се зараженим семеном, тако да семе може да представља веома опасан извор заразе.

Семе је веома погодан супстрат за одржавање и ширење патогених проузроковача биљних болести. Здравствена контрола семена је неопходна као превентивна мера у сузбијању ширења економски значајних болести луцерке. У Србији не постоји довољно података о здравственом стању семена луцерке у односу на присуство важних патогених гљива.

Према правилнику о здравственом прегледу усева и објеката за производњу семена, расада и садног материјала и здравственог прегледа семена, расада и садног материјала (Сл. гласник РС, бр. 119/2007) дозвољен је следећи ниво инфекције семена луцерке (%): *Colletotrichum* spp. (1 %), *Fusarium* spp. (2 %), *Kabatiella caulivora* (2 %), *Sclerotinia* spp. (0 %), *Stemphylium* spp. (1 %), *Verticillium albo atrum* (1 %), вирус мозаика луцерке (AMV) (0 %), *Cuscuta* spp. (0 %).

Многи патогени који изазивају болест надземних делова луцерке и корена преносе се зараженим семеном, тако да семе може представљати веома опасан извор заразе. Симптоми присутни на семену луцерке, као и на семену других крмних биљака узрокованих патогеним организмима манифестују се као трулеж семена и пропадање клијанаца (Hancock, 1983).

Лукић и Пураp (1996), у анализи здравственог стања семена 10 домаћих сората луцерке, утврдили су присуство гљива из родова *Alternaria* spp. (3-48 %), *Botrytis* spp. (0-10 %) и *Fusarium* spp. (0-8 %).

Такође, анализом здравственог стања семена шест домаћих сорти луцерке, у третману где је семе дезинфиковано натријум-хипохлоритом (NaOCl) установљено је присуство гљива из следећих родова: *Alternaria* spp. (0-5 %), *Cladosporium* spp. (0-1 %), *Fusarium* spp. (0-2 %) и *Stemphylium* spp. (0-1 %) (Krnjaja i sar., 2003).

Посебна пажња, нарочито у Северној Америци, посвећена је отпорности луцерке на проузроковаче биљних болести и биљне штеточине, што у великој мери утиче на принос и квалитет добијене биомасе, као и на пољску перзистенцију луцерке.

Као резултат рада великог броја истраживача данас се већина сорти луцерке одликује средњом или високом толерантношћу на важније проузроковаче биљних болести и биљне штеточине, мада постигнута отпорност није потпуна и још увек није довољна да заштити луцерку од јачих напада патогена (Hill, 1987).

4. РАДНА ХИПОТЕЗА

Материјал који је одабран за анализу у овој докторској дисертацији, чини 10 сорти луцерке пореклом из Југоисточне Европе. У раду се полази од претпоставке да је одабрани материјал довољно дивергентан у погледу броја алела на већем броју локуса који ће се одредити *ISSR* и *RAPD* маркерима. Очекује се високи ниво полиморфности у анализираним локусима, као и да ће подела испитиваних генотипова на групе бити у сагласности са њиховим пореклом.

На основу вредности проучаваних карактеристика и њихових разлика издвојиће се сорте са пожељним особинама, које би могле да послуже као родитељске компоненте у даљем раду на оплемењивању луцерке на основу хијерархијске кластер анализе и да ће на основу формираних дендограма издвојити најбољи генотипови луцерке за даља истраживања.

Такође се очекује да ће се овим испитивањима издвојити сорте и партије луцерке са значајно бољим карактеристикама што ће бити веома значајно за директно унапређење производње луцерке у региону Југоисточне Европе.

Очекује се да ће се такође утврдити разлике између партија семена исте сорте луцерке као и разлике између сората на основу теста убрзаног старења семена.

Претпоставка је да ће се утврдити различита заступљеност најзначајнијих патогена на различитим партијама семена појединачних сорти као и на различитим сортама луцерке.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

5.1. Биљни материјал

У циљу реализације ове докторске дисертације, експерименти су постављени у акредитованим лабораторијама Института за заштиту биља и животну средину у Београду.

Као проучавани материјал користило се десет (10) сората луцерке различитог географског порекла са по три различите партије од сваке сорте (табела 1). Жетва семена свих сората луцерке је из рода 2013. године.

Табела 1. Порекло проучаваних генотипова луцерке (*Medicago sativa* L.)

Сорта	Порекло	Партија семена/локалитет	н.в.(m)
Крушевачка 22	Србија	Александрово	45°38'52.34"N 20°38'39.62"E 72
		Ратари	44°22'15.74"N 20°47'56.21"E 133
		Осипаоница	44°32'35.81"N 21°03'58.98"E 211
Крушевачка 28	Србија	Банатско Карађорђево	45°34'19.70"N 20°34'31.28"E 73
		Ратари	44°21'05.92"N 20°51'03.35"E 114
		Ниш	43°18'02.94"N 21°58'11.86"E 78
НС-Банат ЗМС II	Србија	Тител	45°13'09.02"N 20°24'23.48"E 77
		Руско Село	45°45'22.52"N 20°34'56.19"E 76
		Стеријино (Ада)	45°47'48.78"N 20°01'57.18"E 82
НС-Медиана ЗМС V	Србија	Вршац	45°04'12.22"N 21°33'38.96"E 182
		Бачко Градиште I	45°31'54.66"N 20°02'04.09"E 79
		Бачко Градиште II	45°32'53.23"N 20°00'34.35"E 76
Зајечарска 83	Србија	Бољевац	43°49'49.08"N 21°57'11.16"E 284
		Велики Извор	43°57'40.14"N 22°23'36.63"E 320
		Минићево	43°40'42.02"N 22°19'49.24"E 329
Чачанка 10	Србија	Ковин	44°45'00.00"N 20°59'00.00"E 76
		Чачак I	43°53'07.60"N 20°23'20.44"E 231
		Чачак II	43°54'00.66"N 20°19'19.68"E 241
Бањалучанка	Република Српска	Козарска Дубица	45°11'04.30"N 16°48'23.97"E 103
		Бања Лука	44°40'24.21"N 17°34'44.69"E 274
		Маглајани	44°57'00.38"N 17°20'53.29"E 111
Осјечка 66	Хрватска	Истра	45°02'41.96"N 13°52'15.19"E 234
		Осијек I	45°31'36.12"N 18°27'02.20"E 88
		Осијек II	45°36'20.63"N 18°33'23.55"E 85
Осјечка 88	Хрватска	Истра	45°20'46.64"N 13°33'15.51"E 22
		Осијек I	45°32'27.89"N 18°48'20.64"E 84
		Осијек II	45°31'01.11"N 18°42'53.79"E 86
Осјечка 99	Хрватска	Истра	45°05'42.90"N 13°50'58.82"E 276
		Осијек	45°31'53.77"N 18°40'54.94"E 87
		Широко Поље	45°24'13.92"N 18°28'19.63"E 90

5.2. Карактеристике и опис сората луцерке

- Крушевачка 22 (К-22)

Синтетичка сорта луцерке, селекционисана у Институту за крмно биље у Крушевцу, настала је поликрос методом од 19 инбред линија одабраних из домаћих популација и интродукованог материјала. Карактерише се усправним, добро олисталим и умерено разгранатим стабљикама. Лист је ланцетаст, тамно зелене боје. Остварује високе приносе квалитетне зелене масе и суве материје (око 20 t ha^{-1}). Сено је богато протеинима (око 20 %) одличне сварљивости. Добро подноси сушу и ниске температуре. Одлично је прилагођена нашим агроеколошким условима, што утиче на остваривање стабилних приноса у току вишегодишњег периода искоришћавања. Због својих особина је широко распрострањена сорта луцерке у Србији (<http://www.ikbks.com/?portfolio=lucerka>).

- Крушевачка 28 (К-28)

К-28 је високоприносна сорта луцерке настала фенотипском рекурентном селекцијом из материјала различитог географског порекла, селекционисана у Институту за крмно биље у Крушевцу. Сорта се одликује усправном, добро олисталом стабљиком. Остварује високе просечне приносе суве материје, преко 20 t ha^{-1} у условима сувог ратарења и до 25 t ha^{-1} у условима наводњавања, уз просечан садржај сирових протеина у сувој материји око 21 % и сирове целулозе око 32 %. Добро се бокори и брзо регенерише након косидбе. Поседује повећану толерантност према слабо-киселим земљиштима, па може и успевати и на гранично киселим земљиштима за гајење луцерке (<http://www.ikbks.com/?portfolio=lucerka>).

- НС-Банат ЗМС II

Сорта је створена индивидуалном селекцијом из локалне популације панонског типа луцерке коришћењем поликроса. Сорта је селекционисана у Институту за ратарство и повртарство из Новог Сада на одељењу за крмно биље. Одликује се високим генетичким потенцијалом за принос сена до 27 t ha^{-1} . Сорта је раностасна и брзо се регенерише након кошења, а толерантна је и на често

кошење. Веома је толерантна према суши и отпорна на ниске температуре. Без наводњавања даје око 84 t ha⁻¹ зелене крме или 18 t ha⁻¹ сена. Просечан садржај сирових протеина у сувој материји је 19,8 %, а сирове целулозе 22,2 %. У производњи је најзаступљенија сорта (<http://www.nsseme.com/products/?opt=forage&cat=products>).

- НС-Медиана ЗМС V

Сорта је настала индивидуалном селекцијом из локалних популација и интерспециес хибридизацијом плаве и жуте луцерке (*Medicago sativa* L. x *Medicago falcata* L.), селекционисана у Институту за ратарство и повртарство из Новог Сада на одељењу за крмно биље. Одговарају јој добра земљишта, а успешно се гаји и на тежим хидроморфним земљиштима. Генетички потенцијал за принос сена је 27 t ha⁻¹. Веома је отпорна према ниским температурама, средње отпорна према полегању и најважнијим болестима. Брзо се регенерише и толерантна је на често кошење. У годинама нормалног коришћења даје око 80 t ha⁻¹ зелене крме или 20 t ha⁻¹ сена. Просечан садржај сирових протеина у сувој материји је 19,4 %, а сирове целулозе 22,1 %. Веома је раширена у производњи (<http://www.nsseme.com/products/?opt=forage&cat=products>).

- Зајечарска 83 (ЗА-83)

Сорта је настала индивидуалном селекцијом из домаћих популација луцерке углавном са подручја Источне Србије. Селекционисана је у Институту за пољопривредна и технолошка истраживања у Зајечару. По ботаничкој припадности је *Medicago sativa* L. Стабљике су усправне, дебљине 2,5-3,2 mm. Лист је средње крупан, тамно зелене боје. Цветови су љубичасти, са светлијим и тамнијим нијансама. Сорта је средње рана, отпорна је према проузроковачима биљних болести. Веома толерантна према суши и ниским температурама. У фази почетка цветања однос стабљика/лист је 45,98 : 54,02. У овој фази одликује се одличним квалитетом суве материје са просечним садржајем сирових протеина 19,8 %, сирове целулозе 25,0 %, сирових масних материја 3,0 % као и уделом пепела од 9,0 %. Од стране Савезне комисије за признавање сората призната је 1984. године (Станисављевић, 2006).

- Чачанка 10

Сорта је селекционисана на Агрономском факултету у Чачку. Веома погодна за интензивну производњу крме и у условима без наводњавања. Захваљујући добро развијеним бочним кореновима у ораничном слоју може се гајити и на земљиштима лошијих производних способности. Такође, због средње отпорности према полегању, погодна је за гајење у условима наводњавања. У време цветања стабљика је средње висока. Сетвом у пролеће, у редовном року и при просечним временским условима, може се остварити до 7 t ha^{-1} сена, односно у каснијим годинама искоришћавања преко 18 t ha^{-1} сена. Одликује се високим производним потенцијалом за принос семена, па се у просечним агроколошким условима може остварити преко 800 kg ha^{-1} семена. Квалитет суве материје је веома добар. Сорта се одликује високом хранљивом вредношћу суве материје са садржајем сирових протеина од 21 % и 25 % сирове целулозе. Отпорност на *Verticillium albo-atrum* и остале болести и штеточине је веома добра (<http://www.afc.kg.ac.rs/index.php/sr/>).

- Бањалучанка

Сорта је селекционисана на Пољопривредном Институту Републике Српске у Бања Луци и призната је 1991. године. Створена је од страних и домаћих популација избором 30 најбољих клонова. То је синтетичка сорта створена индивидуалним избором у комбинацији са поликрос методом. Средње рана је сорта, висине преко једном метра. Стабљика је добро обрасла лишћем и има од 4-5 откоса годишње. Принос виши од 85 t ha^{-1} зелене масе и 20 t ha^{-1} сена. Принос сирових протеина по хектару износи 2800 kg ha^{-1} . (<http://www.poljinstrs.org/sr-YU/zavodzakrmnobilje/zkb-sorte/zkb-banjalucanka.html>)

- Осјечка 66 (ОС-66)

Синтетичка сорта настала од изабраних типова панонске луцерке и неких европских сората. Сорта је селекционисана на Пољопривредном Институту у Осијеку на одељењу за оплемењивање и генетику крмног биља. Оплемењивањем је повећана дуговечност и удео листа. Биљке су средње висине, усправне са

робусном стабљиком. Већина биљака је светло и средње љубичастог цвета, са мањим уделом тамно плавог цвета. Одлично подноси сушне услове и има средње брзу регенерацију након кошења. Средње рана сорта намењена за производњу сена. Просечни принос преко 16 t ha^{-1} суве материје. Принос зелене масе $97,6 \text{ t ha}^{-1}$, сена $19,8 \text{ t ha}^{-1}$ и протеина $3,3 \text{ t ha}^{-1}$. Сорта је призната 1970. године. Најпознатија је и најраширенија сорта на подручју југоисточне Европе (<http://www.poljinos.hr/pdf/katalogOKB2012.pdf>).

- Осјечка 88 (ОС-88)

Сорта високог приноса сена и доброг квалитета. Селекционисана на Пољопривредном Институту у Осијеку на одељењу за оплемењивање и генетику крмног биља. Одликује се танком стабљиком, средњом висином и великим уделом листа. Добро подноси високо интензивну производњу и кошење, као и гажење. Сорту одликује брза регенерација након кошења и добра толерантност на најучесталије болести листа и корена. Средње рана сорта намењена за производњу сена. Велики удео листа утиче на висок квалитет па остварује приносе протеина веће од $3,5 \text{ t ha}^{-1}$ у 4 до 6 откоса. Просечни принос преко 16 t ha^{-1} суве материје. Принос зелене масе $98,6 \text{ t ha}^{-1}$, сена $20,3 \text{ t ha}^{-1}$ и протеина $3,6 \text{ t ha}^{-1}$. Сорта је призната 1988. године (<http://www.poljinos.hr/pdf/katalogOKB2012.pdf>).

- Осјечка 99 (ОС-99)

Сорта луцерке која се уводи у производњу само за тржиште Републике Хрватске. Селекционисана на Пољопривредном Институту у Осијеку на одељењу за оплемењивање и генетику крмног биља. Одликује се високом и средње танком стабљиком, отпорна на полегање, са добрим односом листа и стабљике. Биљке су тамно зелене боје са већим уделом тамно љубичастог цвета. Добро подноси интензивну косидбу и толерантна је на сушу и ниске температуре. Средње рана сорта намењена за производњу сена. Остварује високе приносе сена ($\geq 20 \text{ t ha}^{-1}$) врло високог квалитета са високим уделом протеина око 23 % у сувој материји. Просечни принос преко $3,5 \text{ t ha}^{-1}$ протеина. Принос зелене масе $100,6 \text{ t ha}^{-1}$, сена $20,9 \text{ t ha}^{-1}$ и протеина $3,9 \text{ t ha}^{-1}$. Сорта је призната 2005. године (<http://www.poljinos.hr/pdf/katalogOKB2012.pdf>).

5.3. Екстракција ДНК

По 100 семена свих 10 (десет) сората луцерке постављено је на наклијавање у Петри шоље и стављено у клијалиште са наизменичном температуром од 20 °C у тами у трајању од 16 h и 30 °C на светлу у трајању од 8 h. Семе је наклијавано седам дана. За екстракцију ДНК из биљног материјала коришћени су први зелени листићи клијанаца луцерке (котиледони). Екстракција ДНК из биљног материјала извршена је модификованом „СТАВ“ методом (Doyle and Doyle, 1990).

5.4. Изоловање ДНК

Екстракција ДНК вршена је помоћу стандардног „DNeasy Plant Mini Kita“. Уситњено је 0,1 g биљног ткива помоћу тучка и авана, уз додавање течног азота. Уситњени биљни прах је пребачен у тубице од 2 ml и у сваку тубицу додато је 400 µl AP1 пуфера за лизирање ћелија и 4 µl Rnase A (100 mg/ml) и све је извортексовано. Тубице са миксом су инкубирани у воденом купатилу на 65 °C у трајању од 10 минута. Током инкубације на сваких 2-3 минута тубице су промућкане. Након инкубације, у тубице је додато 130 µl AP2 пуфера за преципитацију ДНК, све је извортексовано и инкубирано 5 минута на леду. Микс је затим пребачен у „QIAshredder Mini Spin Column-u“ која се налазила у колекторској туби и све је центрифугирано 2 минута на 14000 rpm. Након центрифугирања течност која је прошла кроз филтер пребачена је у нову тубицу од 1,5 ml при чему се водило рачуна да се не поремети плака на дну колекторске тубице. Затим је у тубицу додато AP3/E пуфера за везивање ДНК за филтер мембрану у запремини 1,5 пута течности, коју смо добили екстракцијом тј. на запремину од 450 µl додато је 675 µl пуфера и све је промешано пипетом. Узето је 650 µl овог микса и пребачено у „DNeasy Mini Spin Column-u“, која се налазила у колекторској туби и све је центрифугирано 1 минут на 8000 rpm. Након центрифугирања исфилтрирана течност је просута, па је поново коришћена иста колекторска туба и у њу је преко филтера сипан остатак микса и поново је центрифугирано 1 минут на 8000 rpm. Након центрифугирања „DNeasy Mini Spin

Column-a“ је стављена у нову колекторску тубицу и додато је 500 μ l AW пуфера за испирање и центрифугирано је 1 минут на 8000 rpm. Након тога је просута исфилтрирана течност и поново је коришћена иста колекторска тубица. Поново је додато 500 μ l AW пуфера и све је центрифугирано 2 минута на 14000 rpm. „DNeasy Mini Spin Column-a“ је пажљиво уклоњена тако да не дође у контакт са исфилтрираном течношћу. После овога је филтер „DNeasy Mini Spin Column-e“ био благо обојен. „DNeasy Mini Spin Column-a“ је пребачена у тубицу од 1,5 ml и додато је 100 μ l AE пуфера за испирање ДНК директно на мембрану колумне. Инкубирано је 10 минута на собној температури и након тога центрифугирано 1 минут на 8000 rpm. У течности која је добијена на дну тубице налазила се растворена ДНК.

5.5. Умножавање фрагмената ДНК *PCR* методом

PCR реакциона смеша сваке сорте луцерке, запремине 25 μ l, садржала је: 1 x *PCR* пуфера (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3]) 1 μ l екстраховане ДНК; по 0.5 μ M прајмера (табела 2); 200 μ M dNTP смеше (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,5 mM MgCl₂; 0,025 U Taq полимеразе (Fermentas, Litvanija). Као негативна контрола коришћена је *PCR* реакциона смеша у коју је уместо ДНК додат 1 μ l стерилне воде. Умножавање ДНК фрагмената је обављено у *PCR* апарату (Eppendorf Master Cycler, Hamburg, Немачка).

Добијени *PCR* производи су раздвојени електрофорезом на 1 % агарозном гелу у TE пуферу. Смеше од 5 μ l узорка и 3 μ l боје за наливање (Loading dye, Fermentas, Litvanija) наносене су на гел. Електрофореза је текла при константном напону струје од 95 V. Бојење гела је урађено потапањем у раствор етидиум-бромида (0,2 mg/l) у трајању од 15 минута, а визуализација умножених производа је обављена на UV трансилуминатору (TFP-M/WL 312, Vilber Lourmat, Francuska). Након тога гелови су фотографисани апаратом (DOC PRINT DP-001, FDC). На основу ДНК маркера (100 bp GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, Litvanija) одређена је приближна молекулска маса *PCR* производа. Прајмери коришћени у овом истрживању (табела 2).

Табела 2. Прајмери коришћени у истраживању

Назив прајмера	PCR-метод	Секвенца прајмера	Референца
(GACA) ₄	ISSR	GACAGACAGACAGACA	(Moretti et al., 2004)
(TGTC) ₄	ISSR	TGTCTGTCTGTCTGTC	(Moretti et al., 2004)
OPA 01	RAPD	CAGGCCCTTC	(Moretti et al., 2004)
OPA 02	RAPD	TGCCGAGCTG	(Moretti et al., 2004)
OPA 13	RAPD	CAGCACCCAC	(Moretti et al., 2004)
OPB 10	RAPD	CTGCTGGGAC	(Moretti et al., 2004)

5.6. ISSR анализа

За ISSR анализу ДНК је умножена коришћењем два (GACAC)₃ и (TGTC)₄ прајмера (табела 2.). Умножавање фрагмената ДНК вршено је у 25 µl реакционе смеше која садржи ДНК пуфер (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3]), 1,5 mM MgCl₂, 200 µl dNTPs, 0,5 mM прајмера 0,025 U *Taq* полимеразе и 1 µl узорка. Као контрола коришћена је стерилна дестилована вода. Програм коришћен за PCR анализу приказан је у (табела 3).

Табела 3. Програм за PCR (ISSR анализа)

Програм за PCR	Време трајања (min.)	Температура (°C)
Почетна денатурација	5 мин.	95 °C
30x		
Денатурација	0,5 мин.	95 °C
Хибридизација прајмера	0,5 мин.	48 °C
Елонгација	1,5 мин.	72 °C
Финална елонгација	5 мин.	72 °C

Умножени ДНК фрагменти су раздвојени процесом електрофорезе у 1 % агарозном гелу и 0,5 TAE (40 mM Tris-acetat, 1M EDTA) пуферу при напону од 95 V. Као пуфер за електрофорезу коришћен је 0,5 x TAE пуфер. Фрагменти су обојени потапањем гела у раствор етидијум-бромида (100 µg/ 100 ml) у трајању од 20 минута и посматрани под UV светлом на трансилуминатору.

5.7. RAPD анализа

У оквиру ове анализе коришћена су четири прајмера ОРА 01, ОРА 02, ОРА 13 и ОРВ 10 (табела. 2). Умножавање фрагмената ДНК вршено је у 25 µl реакционе смеше која садржи ДНК пуфер (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3]), 1,5 mM MgCl₂, 200µl dNTPs, 0,5 mM прајмера, 0,025 U *Taq* полимеразе и 1 µl узорка. Као контрола коришћена је стерилна дестилована вода. Програм коришћен за *PCR* анализу приказан је у (табела 4).

Табела 4. Програм за *PCR* (*RAPD* анализа)

Програм за <i>PCR</i>	Време трајања (min.)	Температура (°C)
Почетна денатурација	5 мин.	94 °C
45x		
Денатурација	1 мин.	94 °C
Хибридизација прајмера	1 мин.	37 °C
Елонгација	2 мин.	72 °C
Финална елонгација	5 мин.	72 °C

Умножени ДНК фрагменти су раздвојени процесом електрофорезе у 1 % агарозном гелу и 0,5 ТАЕ (40 mM Tris-acetat, 1M EDTA) пуферу при напону од 95 V. Као пуфер за електрофорезу коришћен је 0,5 x ТАЕ пуфер. Фрагменти су обојени потапањем гела у раствору етидијум-бромида (100 µg/ 100 ml) у трајању од 20 минута и посматрани под UV светлом на трансилуминатору.

5.8. Оцена теста убрзаног старења семена

Семе свих партија испитиваних сората луцерке чувано је у папирним кесама у контролисаним условима температуре и релативне влажности ваздуха. Пре постављања семена на тест убрзаног старења утврђен је почетни садржај влаге сваке партије испитиваних сората луцерке према Правилнику о квалитету семена пољопривредног биља (Сл. лист СФРЈ, бр. 47/87, 1987).

Тест убрзаног старења семена (АА - *Accelerated ageing*) обављен је у воденом купатилу TW 20, постављањем семена свих партија испитиваних сората

луцерке у 4 понављања на металну мрежицу, која је постављена непосредно изнад површине воде у воденом купатилу. Семе сваке партије испитиваних сората изложено је условима високе релативне влажности ваздуха (98-100 %), температури од 41 и 45 °C у трајању од 24, 48, 72, 96 и 120 h. Коришћене су две методе испитивања убрзаног старења семена. Стандардни метод (према *ISTA* правилима) са дестилованом водом и модификовани метод са засићеним раствором кухињске соли (NaCl).

Тест убрзаног старења семена рађен је и по стандардној и по модификованој методи, што у практичном смислу значи унапређење методе за оцену теста убрзаног старења семена луцерке. Након излагања семена екстремно неповољним условима у воденом купатилу утврђен је садржај воде семена према Правилнику. Семена у оквиру сваке партије, постављена су на наклијавање у клијалиште (4 x 100 семена). Очитавање клијавости обављено је после 10 дана од стављања семена на клијање и утврђена је укупна клијавост у процентима, према наведеном Правилнику.

5.9. Утврђивање здравственог стања семена

Испитивање здравственог стања семена утврђено је према Правилнику о квалитету семена пољопривредног биља (Сл. лист СФРЈ, бр. 47/87, 1987). За испитивање је узето 4 x 100 семена од сваке сорте луцерке. Семе је дезинфиковано у 1 % раствору натријум-хипохлорита (NaOCl) у трајању од 10 минута и постављено у Петри кутије пречника 90 mm. За подлогу је коришћен филтер папир који је натопљен до потпуног засићења дестилованом водом. Узорци су стављени у клијалиште на температуру од 20 °C, са наизменичним осветљењем, 12 h без осветљења и 12 h са ултравиолетним осветљењем (UV) таласне дужине 360 nm. Испитивање је обављено после 7 дана од дана стављања на инкубацију, а резултати испитивања здравственог стања семена исказују се у процентима оболелог семена.

5.10. Статистичка обрада података

Визуелном оценом производа амплификације на гелу, присуство *ISSR* и *RAPD* алела је кодирано као 1, а одсуство као 0. Тако је добијена матрица бинарних података величине $X (n, k)$. Статистичка анализа резултата бинарних података је укључила израчунавање генетичке сличности између генотипова луцерке, мултиваријациону анализу матрице удаљености генотипова помоћу нехијерархијске кластер анализе и анализе главних координата и анализу молекуларне варијансе.

5.10.1. Израчунавање генетичке сличности

Коефицијенти генетичке сличности између парова генотипова за оба маркер система израчунат је по Dice-у, (1945):

$$GS_{ij} = 2a/2a+b+c:$$

где је:

a – присуство траке у оба генотипа i и j (1.1)

b – присуство траке код генотипа i а одсуство код генотипа j (1.0)

c - присуство траке код генотипа j а одсуство код генотипа i (0.1)

5.10.2. Мултиваријациона анализа генетичких дистанци генотипова

Из D_{SM}^{ij} матрице у циљу груписања генотипова и визуелног приказа генетичког диверзитета генотипова урађена је кластер анализа применом UPGMA алгоритма за грађење група генотипова. Као комплементаран приступ у анализи генетичке дивергентности примењена је анализа главних координата (PCoA) са циљем редукције димензије D_{SM}^{ij} матрице на неколико интерпретативних главних координата. PCoA је погодна метода за визуелизације када постоји нехијерархијска структура генетичке дивергентности генотипова, тј. када имамо генотипове који јасно не припадају ни једној од претпостављених група генотипова (Lessa, 1990). Слично другим ординационим мултивариационим техникама, PCoA је поуздана само уколико се користи мањи број димензија редуковане генетичке матрице удаљености генотипова.

5.10.3. Анализа молекуларне варијансе (AMOVA)

Анализа молекуларне варијансе (AMOVA; Weir and Cockerham, 1984; Weir, 1996; Excoffier et al., 1992) омогућава поделу матрице генетичких дистанци генотипова на изворе варијације следећи предходно дефинисане хијерархијске групе на основу географских, биолошких или оплемењивачких критеријума класификације. У односу на класичну анализу варијансе код које се израчунавају суме квадрата (SS) извора варијације, код анализе молекуларне варијансе се користе суме квадратних одступања (SSD). Суме квадратних одступања су дефинисане као одступања од центроида вишедимензионалног простора пошто се у анализи користе генетичке удаљености генотипова.

Модел AMOVA (табела 5) може се представити помоћу следећег линеарног модела:

$$y_{ijg} = \mu + a_g + b_{ig} + c_{ijg}$$

где је y_{ijg} - вредност генотипа j популације i групе g ; μ – очекивана средња вредност;

a – ефекат групе;

b – ефекат популације;

c – ефекат генотипа.

Сви ефекти у линеарном AMOVA моделу се третирају као случајни, адитивни, некорелисани са осталим ефектима (σ_a^2 , σ_b^2 , σ_c^2) и укупном варијансом посматраног узорка, односно $\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$ (Excoffier et al., 1992).

За свако груписање генотипова у стратуме укупна сума квадрата разлика (SSD) се може представити као: $SSD_{(укупно)} = SSD_{(између\ група)} + SSD_{(унутар\ група)}$, након чега следећи приступ класичне анализе варијансе, оцењују компоненте варијансе извора варијације. Следећи структуру анализе описану од стране Cockerham, (1969) за различите F статистике, Excoffier et al., (1992) су предложили мерила и формалне тестове статистичке инференције постојања генетичке структуре на различитим хијерархијским нивоима.

На пример, са $\Phi_{ST} = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 / \sigma^2$ се мери постојање генетичке структуре на нивоу популација и група и тестира σ_c^2 ; $\Phi_{ST} = \sigma_b^2 / \sigma_b^2 + \sigma_c^2$ се мери постојање генетичке структуре на нивоу популација и тестира σ_b^2 ; и $\Phi_{CT} = \sigma_a^2 / \sigma^2$ се мери постојање генетичке структуре на нивоу група и тестира σ_a^2 .

Табела 5. Општи облик AMOVA табела

Извор варијације	Степен слободе	Сума квадрата	Средина квадрата	Очекивана средина квадрата	Компоненте варијансе
Између група	S – 1	$SS_{(a)}$	$MS_{(a)}$	$n'' \sigma_a^2 + n' \sigma_b^2 + \sigma_c^2$	$\sigma_a^2 = \frac{MS_{(a)} - n' \times \sigma_b^2 - \sigma_c^2}{n''}$
Између популација унутар група	$\Sigma P - S$	$SS_{(b)}$	$MS_{(b)}$	$n \sigma_b^2 + \sigma_c^2$	$\sigma_b^2 = \frac{MS_{(b)} - \sigma_c^2}{n}$
Између индивидуа унутар популација	N – ΣP	$SS_{(c)}$	$MS_{(c)}$	σ_c^2	$\sigma_c^2 = MS_{(c)}$

n -коэффициенти (n, n', n'') служе за израчунавање просечне величине узорка сваког хијерархијског нивоа омогућавајући различит број индивидуа у популацијама и групама као и различит број популација у групама.

На основу Φ статистике доноси се статистичка инференција о генетичкој структури у оквиру претпостављене хијерархијске структуре. Пермутацијом у оквиру популација, популација у оквиру група и свих других хијерархијских нивоа, односно редова и колона матрице удаљености могуће је проценити нулту расподелу компоненти варијанси и припадајућих Φ статистика као и формалних Φ статистика као и формалних тестова статистичке значајности (Excoffier et al., 1992).

5.10.4 Програми коришћени за анализу података

За анализу података добијених молекуларном карактеризацијом коришћени су статистички програми за популационо-генетичке анализе. Позиције трака посматране су кроз бинарни систем података и затим претварани у генетичке дистанце Рестдист програмом по методи (Nei and Li, 1979), а затим је

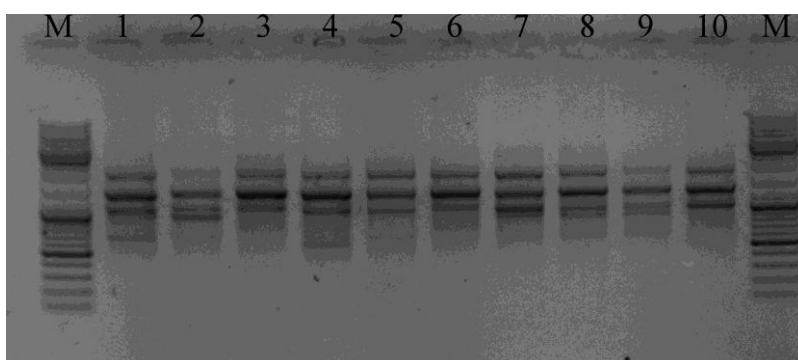
конструисано филогенетско стабло коришћењем UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) алгоритма, све у оквиру програмског пакета FILIP (Felsenstein, 1993).

Остали добијени подаци обрађени су анализом варијансе ANOVA, а разлике између третмана су тестиране применом Данкановог теста (Duncan's multiple range test) и приказани су табеларно и графички. Подаци су обрађени у програму STATISTICA 8,0.

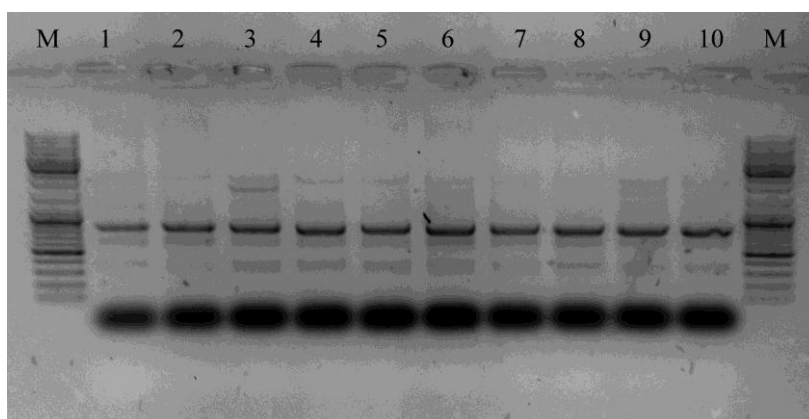
6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

6.1. Примена молекуларних маркера

Молекуларном методом *ISSR* и коришћењем прајмера (GACA)₄ и (TGTC)₄ потврђене су разлике између испитиваних сората луцерке (слике 3 и 4). Овом методом је утврђено да су сорте у великој мери сличне, али да постоје траке које су карактеристичне за сваку од њих.

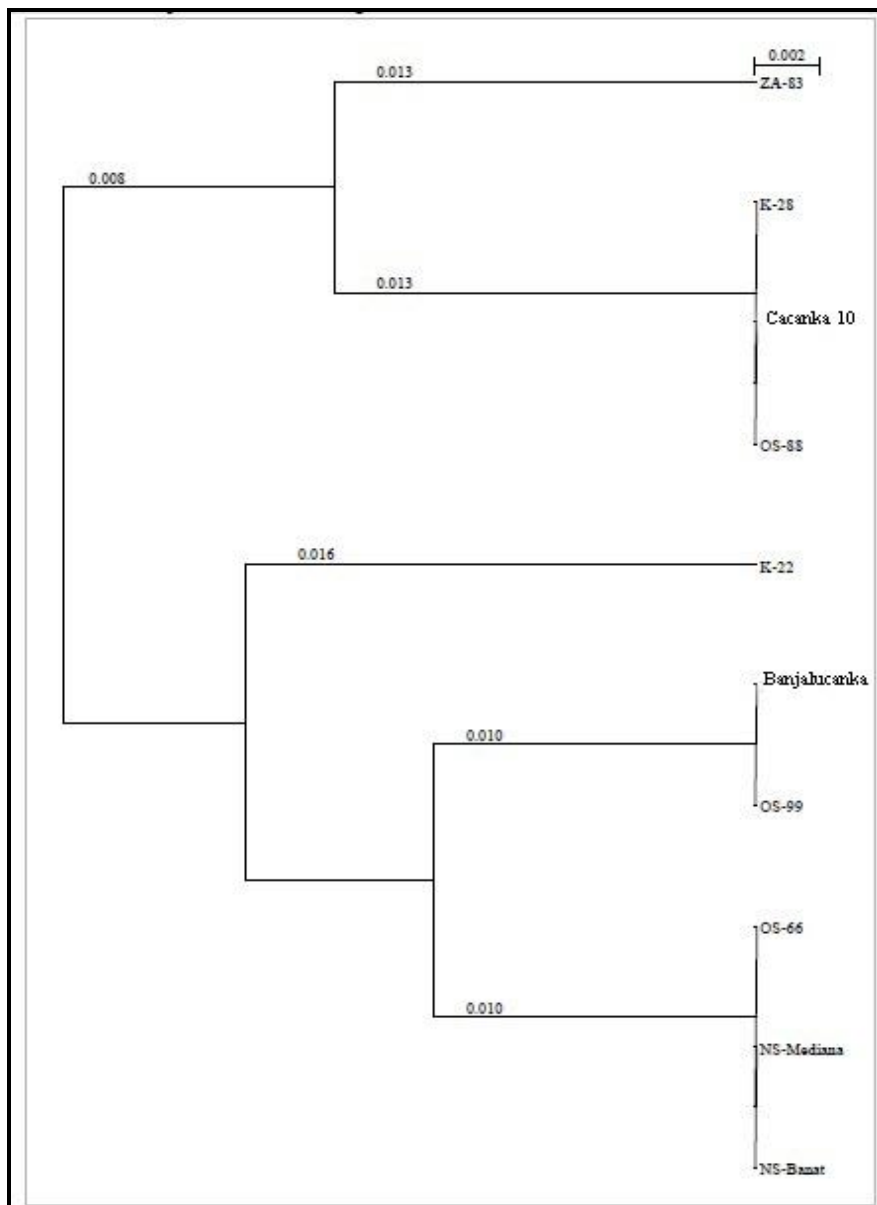


Слика 3. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером (GACA)₄ (M-Маркер;
1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ZA-83; 5. K-22; 6. Чачанка 10;
7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. K-28).



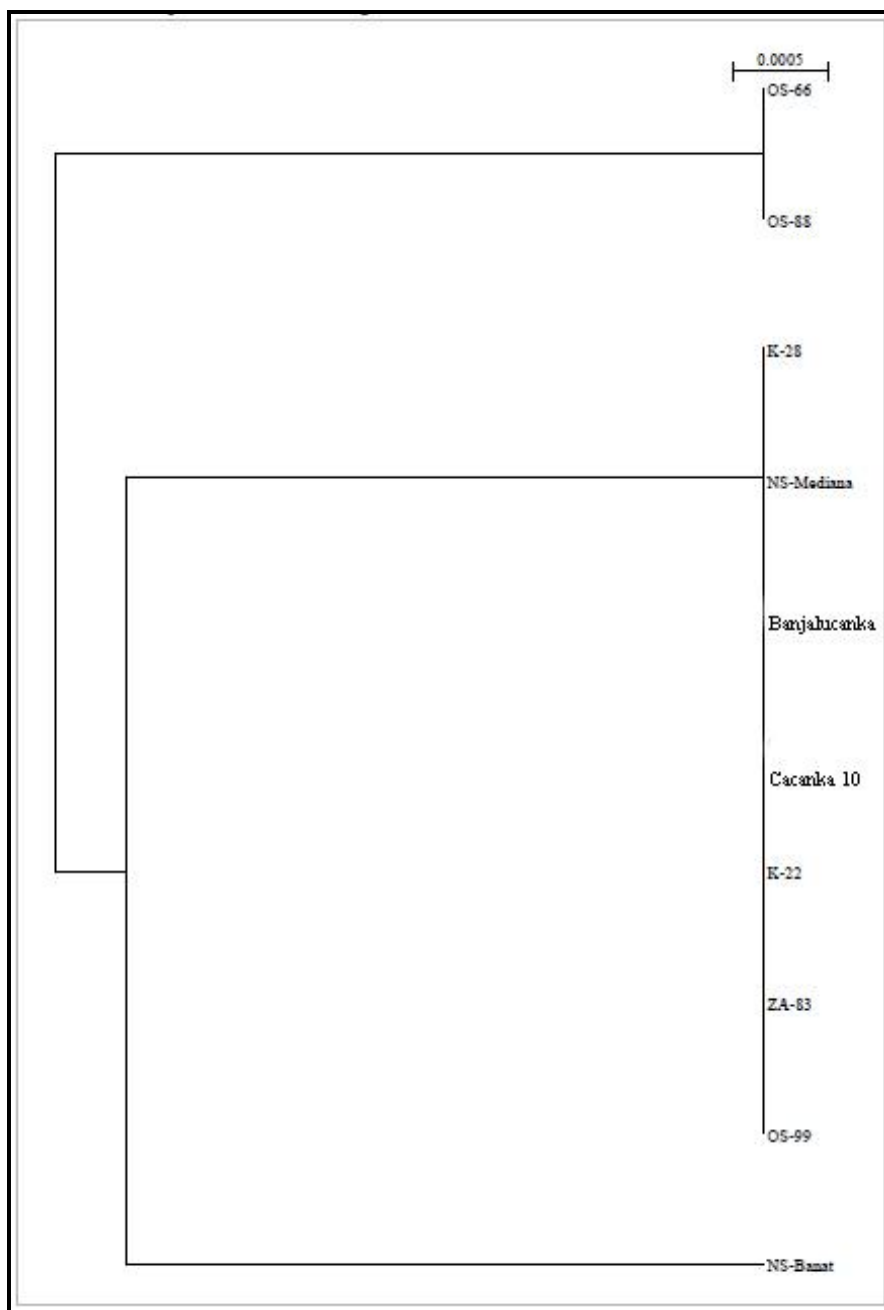
Слика 4. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером (TGTC)₄ (M-Маркер;
1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ZA-83; 5. K-22; 6. Чачанка 10;
7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. K-28).

Филогенетско стабло за *ISSR* ДНК профиле са $(GACA)_4$ прајмером добијено на основу матрица дистанци коришћењем UPGMA алгоритма састојало се од два кластера (слика 5.). Први кластер је подељен на два подкластера, један је чинила сорта Зајечарска 83 и други који се састојао од сорти Чачанка 10, Осјечка-88 и Крушевачка-28. Други кластер су образовале сорте Бањалучанка, Осјечка-99, Осјечка-66, НС-Медиана и НС-Банат које су биле груписане у подкластер, док је сорта Крушевачка-22 била издвојена.



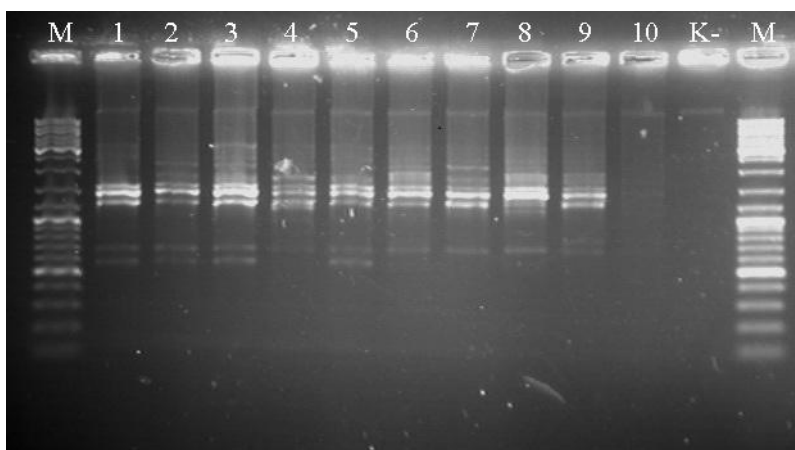
Слика 5. Дендограм различитих сората луцерке добијен на основу UPGMA анализе ДНК профила добијено коришћењем $(GACA)_4$ прајмера.

Дендограм различитих сората луцерке добијен на основу UPGMA анализе ДНК профила добијених помоћу $(TGTC)_4$ прајмера показало је да постоји мала разлика између испитиваних сората луцерке (слика 6.). Једино су се сорте Осјечка-88 и Осјечка-66, као и сорта НС-Банат издвојиле у посебне кластере.

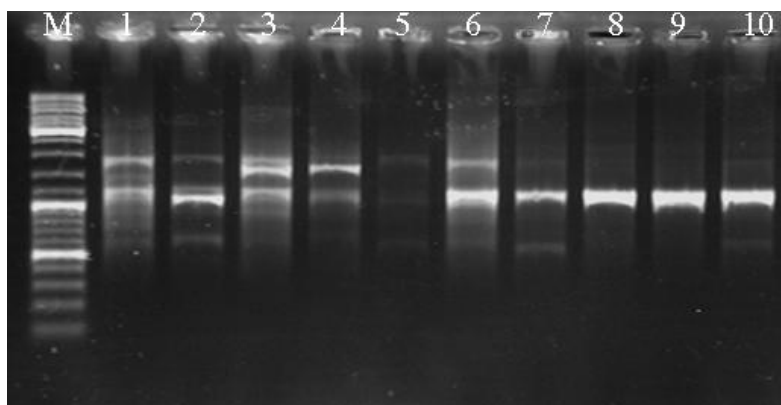


Слика 6. Дендограм различитих сората луцерке добијен на основу UPGMA анализе ДНК профила добијено коришћењем $(TGTC)_4$ прајмера.

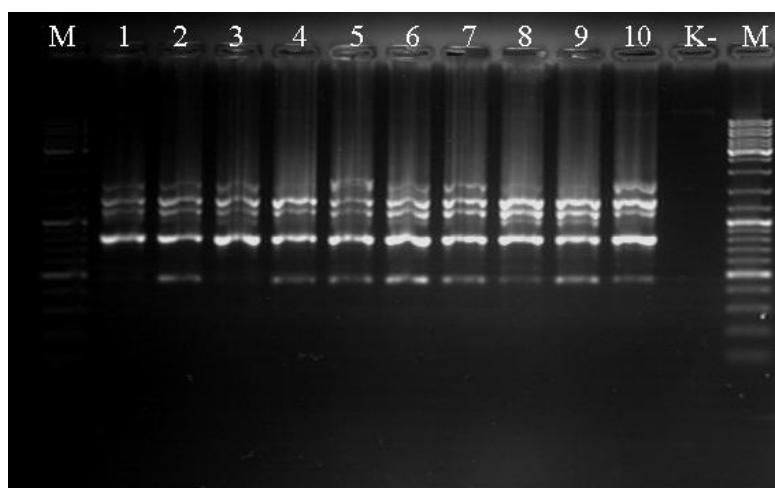
Примећено је да се у *RAPD* анализи генома биљака могу пратити репетативне секвенце које чине значајан део генетичког материјала. Ланчана реакција полимеразе базирана на репетативним секвенцама (*RAPD-PCR*) коришћена је за утврђивање генетичке разноврсности између различитих сората луцерке. ОРА 01, ОРА 02, ОРА 13 и ОРВ 10 прајмери су коришћени да би се добили различити ДНК профили (слике 7-10.). На основу *RAPD* ДНК профила може се видети раздвајање ДНК фрагмената различите величине од 100 bp до 3 kb. Разлике између фрагмената су оцењиване визуелно на основу њиховог положаја на гелу. Јасно се могу уочити да ли су ДНК профили добијени помоћу ОРА 01, ОРА 02, ОРА 13 и ОРВ 10 прајмера идентични или постоје разлике између испитиваних сората луцерке.



Слика 7. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером ОРА 01 (М-Маркер; К-Негативна контрола; 1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ЗА-83; 5. К-22; 6. Чачанка 10; 7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. К-28).



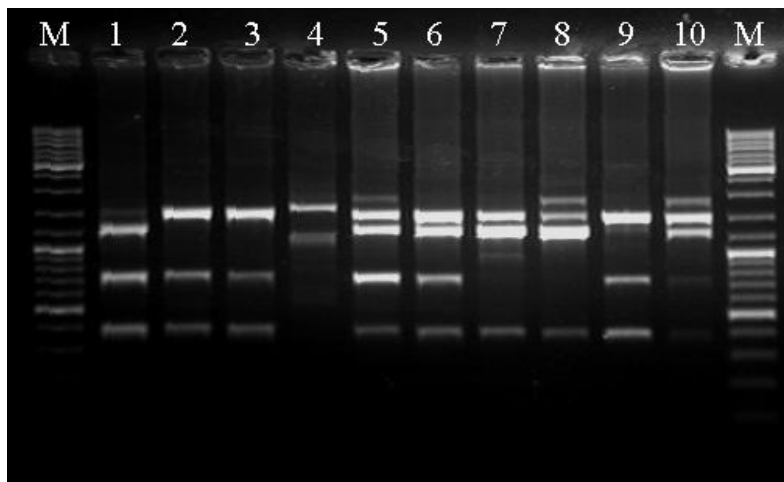
**Слика 8. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером ОРА 02 (М-Маркер;
1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ЗА-83; 5. К-22; 6. Чачанка 10;
7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. К-28).**



**Слика 9. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером ОРА 13 (М-Маркер;
К-Негативна контрола; 1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ЗА-83; 5. К-22; 6.
Чачанка 10; 7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. К-28).**

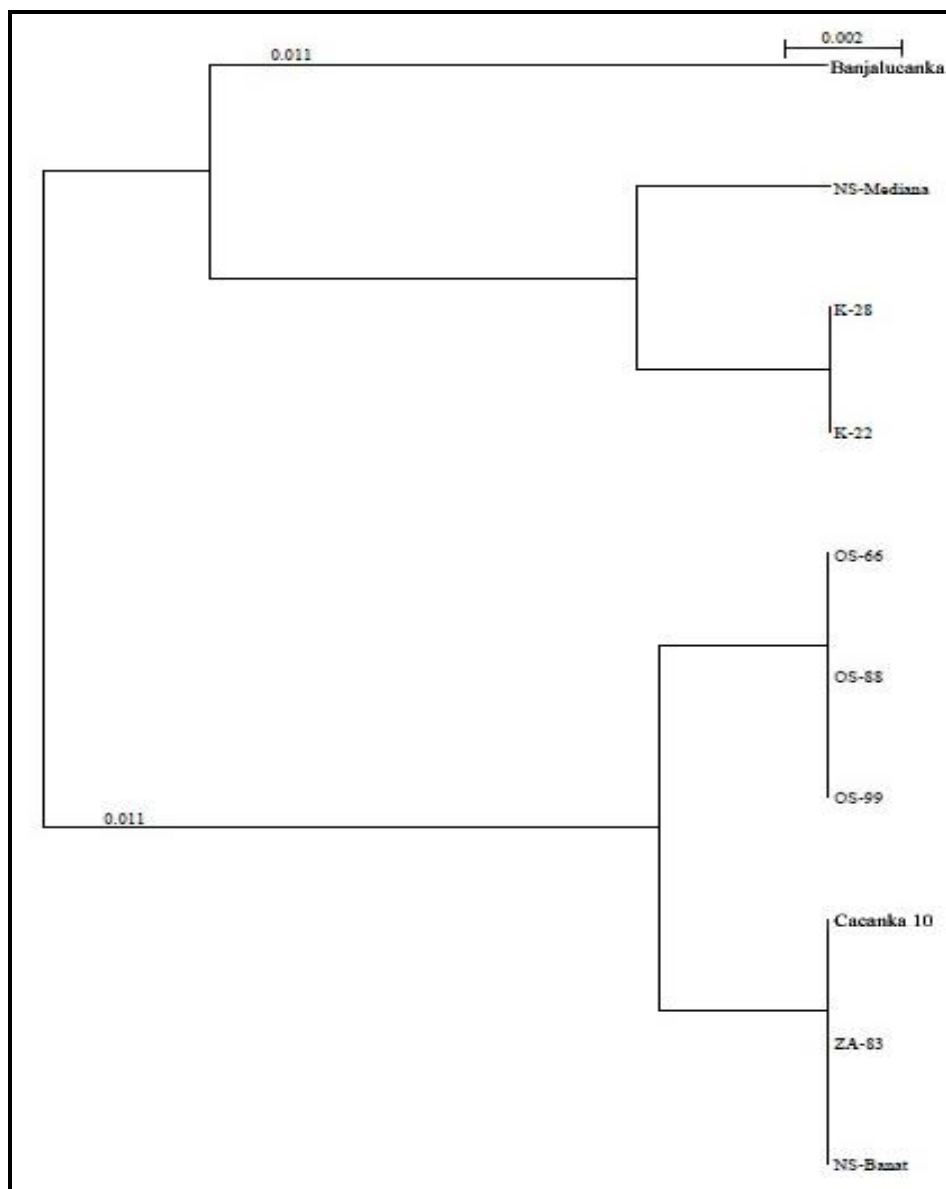
На гелу на коме се налазе различите сорте луцерке са прајмером ОРВ 10 (слика 10.), могу се уочити разлике између сората луцерке. Јасно се види да се сорта луцерке Зајечарска 83 која се налази у колони 4 разликује од свих осталих сората луцерке. Такође се уочава постојање заједничких трака од 300 bp код свих сората осим код сорте Зајечарска 83. Сорте Осјечка 99, Осјечка 88 и Осјечка 66 (колоне 2, 3 и 9) показују висок ниво међусобне сличности, као и сорте

Крушевачка 22 и Крушевачка 28 (колоне 5 и 10), што је и очекивано са обзиром да су наведене сорте које су сличне селекционисане у истим селекционим кућама.

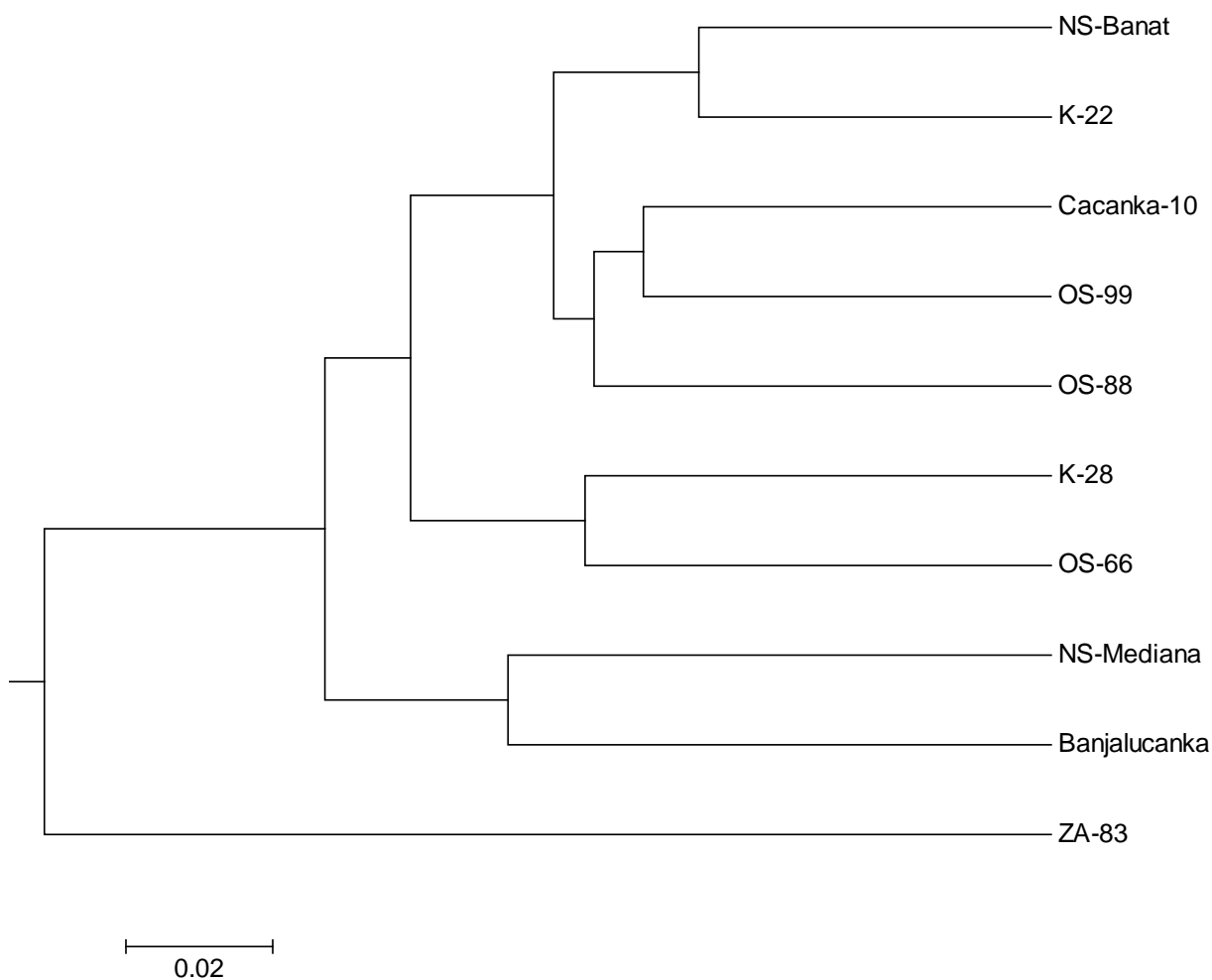


Слика 10. Гел на коме се налазе сорте луцерке са прајмером OPB 10 (M-Маркер; 1. HC-Банат; 2. OC-99; 3. OC-88; 4. ZA-83; 5. K-22; 6. Чачанка 10; 7. Бањалучанка; 8. HC-Медиана; 9. OC-66; 10. K-28).

Дендограм различитих сората за *RAPD-PCR* ДНК профиле добијен на основу матрица дистанци коришћењем UPGMA алгоритма састојао се од два кластера (слика 11.). Први кластер укључује сорте Бањалучанка, HC-Медиана, Крушевачка 22 и Крушевачка 28, при чему су сорте HC-Медиана, Крушевачка 22 и Крушевачка 28 издвојене у посебан субкластер. Други кластер је подељен на два подкластера. Први подкластер је садржао сорте луцерке Осјечка 66, Осјечка 88 и Осјечка 99 а други подкластер чине сорте HC-Банат, Чачанка 10 и Зајечарска 83. Такође је и овде анализа показала да су сорте луцерке селекционисане у Институту у Крушевцу и Институту у Осијеку генетички најсродније.



Слика 11. Дендограм различитих сората луцерке добијено на основу UPGMA анализе ДНК профила добијено коришћењем ОПВ 10 прајмера.



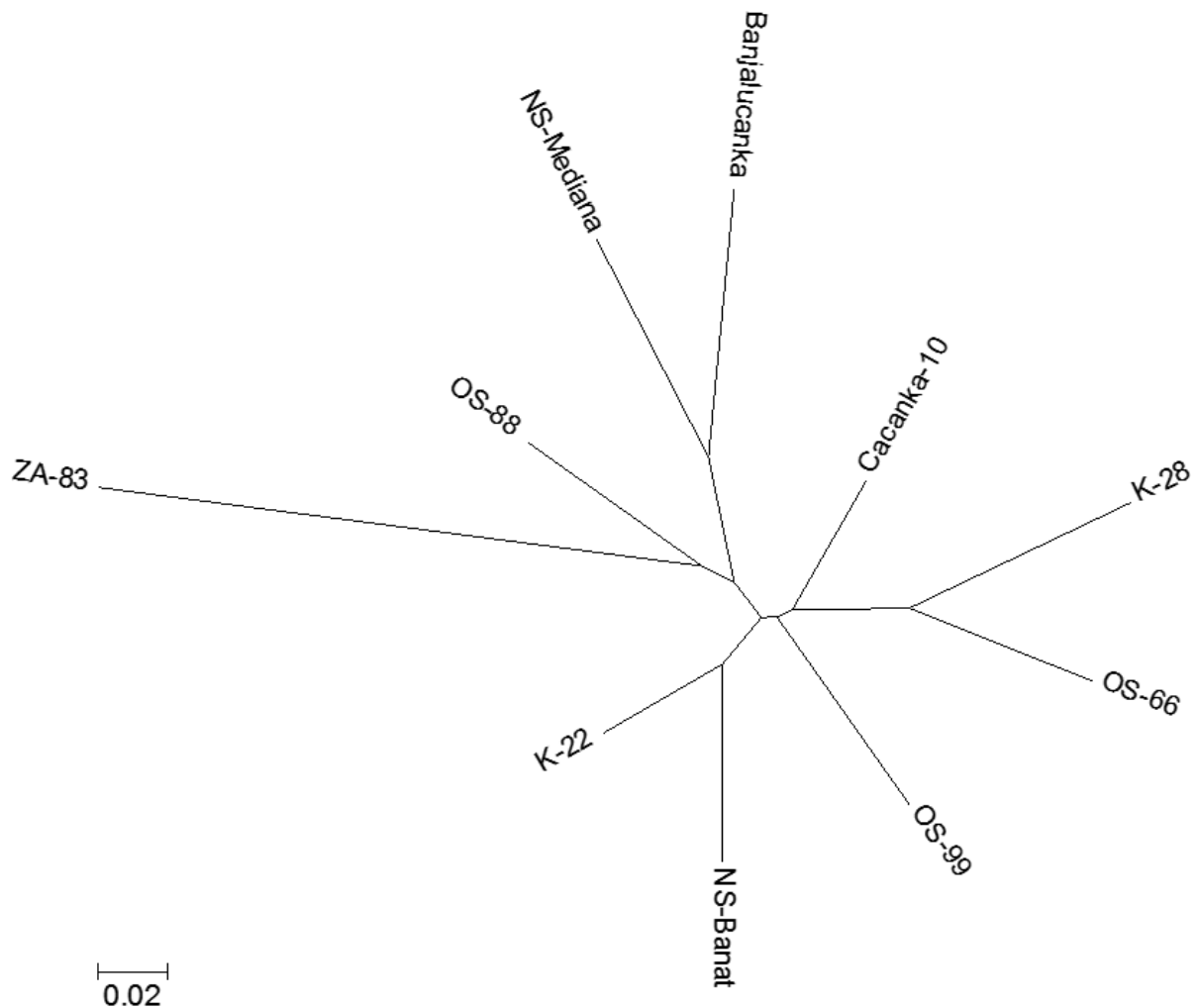
Графикон 1. Кластер дијаграм испитиваних сорти луцерке на основу свих проучаваних молекуларних маркера

Кластер дијаграм добијен анализом свих проучаваних молекуларних маркера састоји се од 4 групе кластера (графикон 1). У првој групи издвојиле су се сорте НС-Банат, Крушевачка 22, Чачанка 10, Осјечка 99 и Осјечка 88. У оквиру прве групе имамо две подгрупе. У прву подгрупу спадају сорте НС-Банат и Крушевачка 22, док у другу подгрупу спадају сорте Чачанка 10, Осјечка 99 и Осјечка 88. Другу групу чине сорте Крушевачка 28 и Осјечка 66, док су се у трећој групи издвојиле сорте НС-Медиана и Бањалучанка. У четвртој групи се издвојила сорта Зајечарска 83 која се показала као генетички најудаљенија сорта од свих осталих сорти.

Табела 6: Генетичке дистанце између генотипова луцерке базиране на основу Dice's коефицијента генетичке сличности и молекуларних маркера

	НС-Банат	ЗА-83	К-22	Чачанка 10	НС-Медиана	К-28	ОС-99	ОС-88	Бањалучанка
ЗА-83	0.310								
К-22	0.097	0.250							
Чачанка 10	0.138	0.269	0.107						
НС-Медиана	0.167	0.259	0.172	0.185					
К-28	0.220	0.283	0.123	0.132	0.200				
ОС-99	0.133	0.259	0.138	0.111	0.250	0.200			
ОС-88	0.148	0.236	0.153	0.127	0.228	0.250	0.123		
Бањалучанка	0.172	0.308	0.214	0.154	0.148	0.245	0.185	0.164	
ОС-66	0.167	0.296	0.172	0.148	0.179	0.127	0.143	0.193	0.259

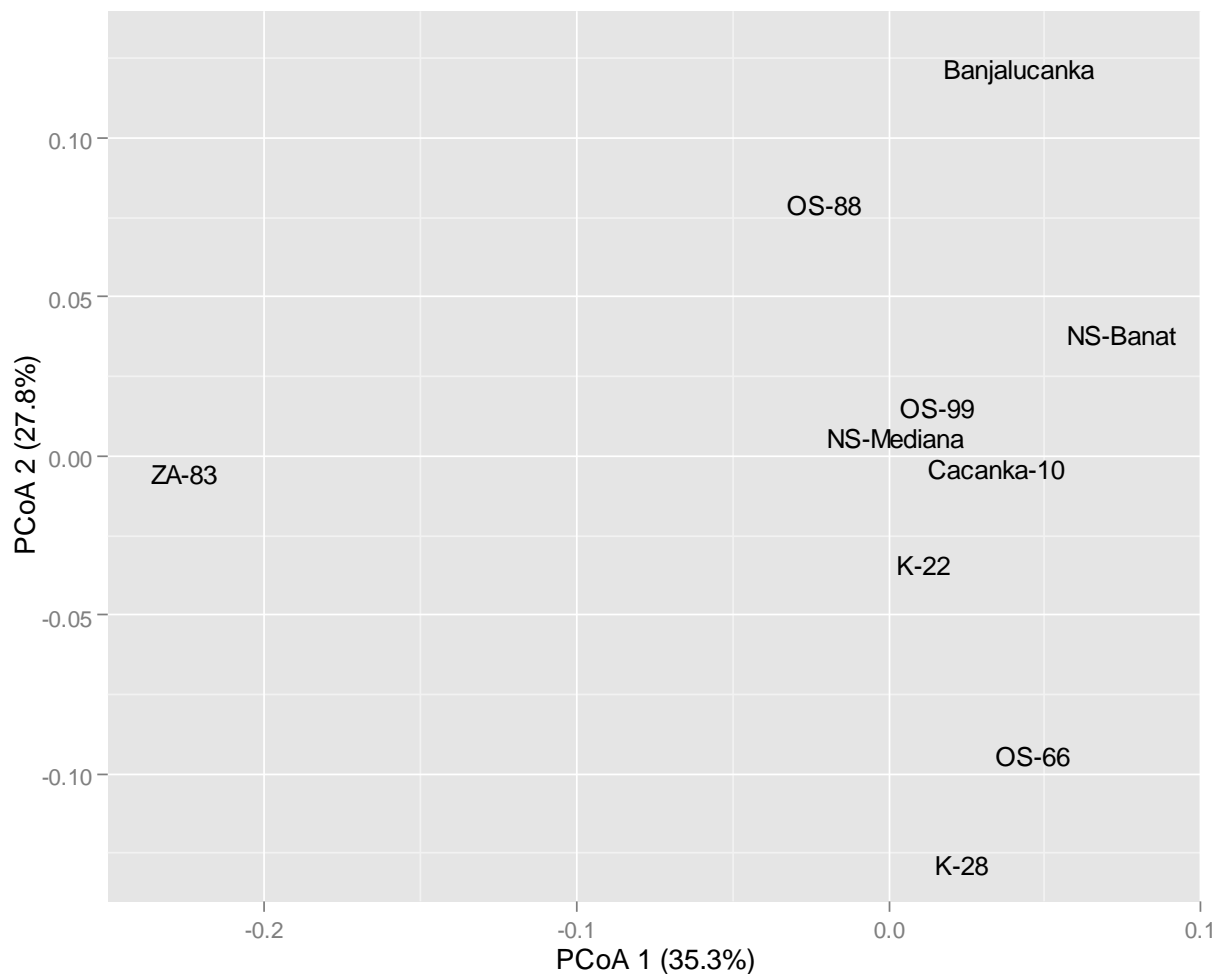
Генетичке дистанце између десет проучаваних генотипова луцерке кретале су се у интервалу од 0,097 до 0,310 (табела 6). Најмања генетичка дистанца забележена је између сората НС-Банат и Крушевачка 22 (0,097), као и између сората Крушевачка 22 и Чачанка 10 (0,107), док је највећа генетичка дистанца забележена између сората Зајечарска 83 и Бањалучанка (0,308), као и између сората Зајечарска 83 и НС-Банат (0,310). Ahsyee et al. (2013b) испитујући девет сората луцерке од којих су осам сората биле пореклом из Либије док је једна сорта луцерке била пореклом из Туниса, утврдили су најмању генетичку дистанцу између сората Fazania и Masratia (0,058), док је највећа генетичка дистанца утврђена између сората Denamo Ferade и Gabsia (0,655).



Слика 12. *Neighbor-Joining* стабло између 10 генотипова луцерке базирано на основу генетичке дистанце

Као што можемо видети из *Neighbor-Joining* стабла формираног на основу спаривања суседа на темељу матрице генетичке удаљености генотипова луцерке (слика 12), међусобно најсличнији генотипови су Крушевачка 22 и NS-Банат као и Крушевачка 28 и Осјечка 66. Такође можемо видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од свих осталих генотипова приказаних на формираном стаблу.

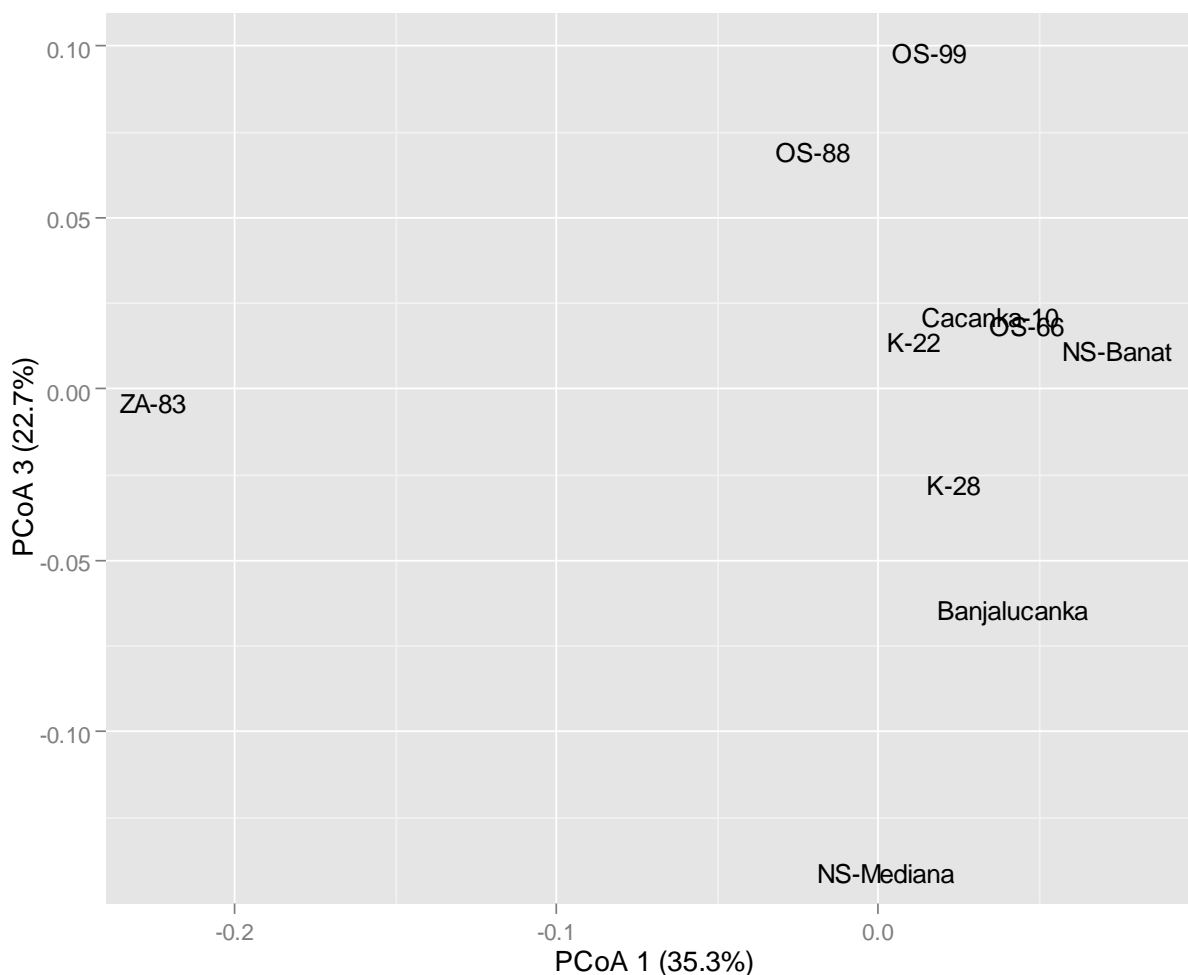
6.2. Анализа главних координата (PCoA)



Графикон 2. Анализа главних координата прве и друге осе (PCoA) генетичке структуре 10 генотипова луцерке на основу молекуларних маркера

Анализа главних координата (PCoA) користи се за идентификацију мултидимензионалних односа који описују делове генетичке варијабилности датих података. У анализи главних координата прве и друге осе (графикон 2) објасниле су укупно 63,1 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. На приказаном графикону јасно се може видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од осталих проучаваних генотипова луцерке.

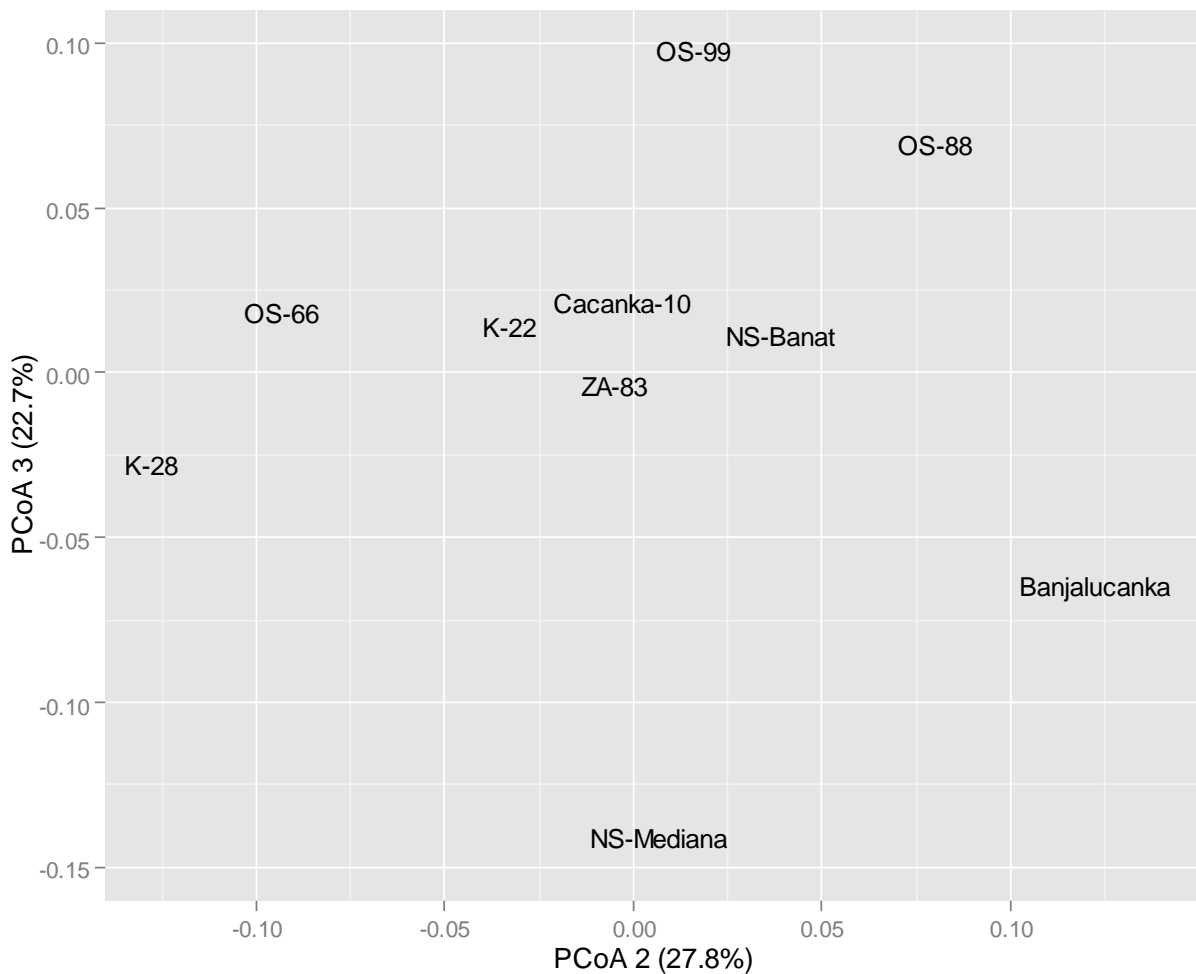
Груписање података на основу анализе главних координата показало је сличност и са моделом груписања на основу кластер анализе (графикон 1).



Графикон 3. Анализа главних координата прве и треће осе (PCoA) генетичке структуре 10 генотипова луцерке на основу молекуларних маркера

У анализи главних координата прве и треће осе (графикон 3) објасниле су укупно 58,0 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. На приказаном графикону груписање генотипова је било слично као код прве две осе.

Генотипови NS-Медиана и Зајечарска 83 су генетички најудаљенији од осталих генотипова, док су генотипови Осјечка 99 и Осјечка 88 најближи, што указује на сличност генетичког материјала у креирању ових сората јер оне потичу из исте селекционе куће.



Графикон 4. Анализа главних координата друге и треће осе (PCoA) генетичке структуре 10 генотипова луцерке на основу молекуларних маркера

У анализи главних координата друге и треће осе (графикон 4) објасниле су укупно 50,5 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. На приказаном графикону издвојили су се генотипови Крушевачка 22, Чачанка 10, Зајечарска 83 и НС-Банат, који су међусобно најсличнији, док су генотипови НС-Медиана, Крушевачка 28, Бањалучанка и Осјечка 99 генетички најудаљенији.

6.3. Анализа молекуларне варијансе (АМОВА)

Анализа молекуларне варијансе (АМОВА) примењена је како би се испитала дистрибуција генетичке варијације између и у оквиру две географске групе генотипова луцерке. Прву групу чини шест сората које су пореклом из Републике Србије (Крушевачка 22, Крушевачка 28, НС-Банат, НС-Медиана, Зајечарска 83 и Чачанка 10).

Другу групу чине четири сорте, од којих су три пореклом из Републике Хрватске (Осјечка 66, Осјечка 88 и Осјечка 99), а једна сорта пореклом из Републике Српске (Бањалучанка).

Велики проценат унутар групне варијације (98,22 %), указује да је материјал добар за даљу селекцију и мали проценат варијације између група (1,78 %), указује на слабу диференцијацију између група (табела 7) и у сагласности је са резултатима бројних студија у којима међусобно варирање износи мање од 10 % укупне варијације (Priolli et al., 2013; Sun et al., 2013; Guo et al., 2012, Perić, 2015).

Табела 7: АМОВА генотипова луцерке две географске групе на основу полиморфизма молекуларних маркера

Извор варијације	d.f.	Компонента варијансе	%	$\Phi_{ST}^{\#}$	$P^{\#}$
Између група	1	0.00171	1.78	0.02	0.338
Унутар група	8	0.094	98.22		

[#] израчунато на основу 1023 пермутација

Анализа молекуларне варијансе послужила је и за утврђивање међугрупне генетичке дистанце као мере укупне варијације садржане између две групе. Упоређење парова географских група извршена су на основу Φ_{ST} (индекс генетичке диференцијације) који представља стандардизовану интерпопулациону дистанцу између две географске групе, и мера је корелације гена различитих индивидуа у једној популацији (Chen and Nelson, 2005).

Према Hartl and Clark (1997), диференцијација може бити слаба ($\Phi_{ST} < 0,05$), умерена ($0,05 < \Phi_{ST} < 0,15$), велика ($0,15 < \Phi_{ST} < 0,25$) и веома велика ($\Phi_{ST} > 0,25$).

Вредност индекса диференцијације код испитиваних група био је слаб 0,02 (табела 7), што указује на чињеницу да сорте воде слично порекло.

За примену *PCR*-а коришћен је *ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)* метод, где се користе прајмери који налажу на микросателитску регију. За разлику од микросателита *SSR (Simple Sequence Repeats)* метод, не умножавају се микросателити, него регије ДНК између микросателита, док микросателитска регија служи као „сидро“ за прајмер.

Имајући у виду карактеристике програма оплемењивања и стварање нових сората открили смо да су оплемењивачи били у могућности да генеришу велики број диференцијација код стварања нових сората. Примена популационе генетике на *SSR* локусима може се применити за процену различитости између сората, односно популација, било да се користе само за разликовање или за управљање генетичким ресурсима (Flajoulot et al., 2005).

Генетичка карактеризација биљака коришћена је у многим студијама (Flajoulot et al., 2005; Kubik et al., 2001; Tucak et al., 2008; Yang et al., 2010a; Živković et al., 2012). Утврђивање генетичке разноврстности између испитиваних сората луцерке успешно је спроведено применом *RAPD-PCR* и *ISSR-PCR* методе (Xavier et al., 2011; Živković et al., 2012).

Различити генетички профили добијени применом *RAPD* и *ISSR* прајмера показали су генетичку разноврстност која потиче од различитих сората луцерке.

Diwan et al., (1997) су први развили *SSR* молекуларне маркере на роду *Medicago* sp. Они су показали како се *SSR* молекуларни маркери користе при описивању генетичке разноврстности и да анализирају генетичке везе између генотипова луцерке.

У истраживањима Tucak et al., (2010) утврђено је да су *RAPD* молекуларни маркери били ефикасни у процени генетичке разноврстности између испитиваних сората луцерке. Поред тога добијени резултати сугеришу да *RAPD* молекуларни маркери могу бити корисни за груписање гермплазме са сличном генетичком основом и за прескрининг потенцијалних хетеротичних група у програмима оплемењивања.

Примена *RAPD* и *ISSR* молекуларних маркера на 25 врста рода *Medicago* sp. прикупљених из долине Лекс, Хималајског региона, показала је да је ниво

генетичке варијабилности био релативно висок на шта указује проценат алелног полиморфизма ($P=96,54\%$) и индекс тоталне генетичке разноврсности ($Ht=0,285$).

Веома изражен ниво генетичке варијабилности говори да су врсте из рода *Medicago* sp. погодне за даља генетичка истраживања и да постоји велики оплемењивачки потенцијал за побољшање већ постојећих сората луцерке (Xavier et al., 2011).

Генетичка разноврсност заснована на различитим маркерима игра кључну улогу у програмима оплемењивања и један је од најважнијих критеријума за избор родитеља код селекције. Применом осам прајмера *ISSR* молекуларних маркера код 18 генотипова луцерке утврђена је различитост између испитиваних генотипова. Најмањи број бандова се односи на прајмер IS1 а највећи број на прајмер IS16 (Habibi et al., 2012).

Циљ анализе главних компонената (PCoA) на основу квантитативних података је да испита значај различитих особина у објашњењу мултивариационог полиморфизма и најчешћи је алат који се користит за скрининг, и на тај начин води у даљи избор родитеља за хибридизацију (Chozin, 2007).

Испитујући 40 различитих сората црвене детелине различитог географског порекла анализом главних координата (прве и друге осе) Ahsyee (2013a) објасниле су 83,7 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података.

У анализи главних координата 90 генотипова соје на основу *SSR* маркера, прва и друга оса објасниле су укупно 48,8 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података (Perić, 2015).

Према Priolli et al., (2013), савремено оплемењивање омогућава размену материјала између различитих оплемењивачких програма, што као резултат има већу пропорцију варијабилности која је узрокована разликама у оквиру групе, него разликама између посматраних група.

Применом анализе молекуларне варијансе (AMOVA) како би се испитала дистрибуција генетичке варијације између и у оквиру пет географских група соје на основу полиморфизма *SSR* маркера, показала је велики проценат унутар групне варијације (93,9 %) и мали проценат варијације између група (6,1 %) (Perić, 2015).

Ahsyee (2013a, 2014) користећи анализу молекуларне варијансе (AMOVA) како би испитао дистрибуција генетичке варијације између и у оквиру група црвене детелине на основу полиморфизма *SSR* маркера, добио је велики проценат унутар групне варијације (99,41 %) и мали проценат варијације између група (0,59 %).

6.2. Примена теста убрзаног старења семена

Заснивање усева крмних биљака врши се директном сетвом семена. Процена је да се на овакав начин врши заснивање око 80 % усева економски веома значајних пољопривредних биљних врста (стрна жита, индустријско биље, неке повртарске врсте и др). Обзиром на те околности, брза и униформна појава снажних клијанаца жељене гајене биљне врсте је веома значајна како би се осигурала висока униформност клијанаца, што утиче на почетну фазу развоја усева, а као резултат свега је висок и стабилан принос.

Све ово указује на важност избора семена веома доброг квалитета. Код заснивања усева луцерке и генерално код вишегодишњих крмних биљака, посебно уколико се гаје у смеси (травно-легуминозне) слабији почетни пораст може утицати на нарушавање пројектованог односа између врста у смеси, што у наредним годинама неизбежно води ка проређивању усева, смањењу приноса и лошијем квалитету крме као и краћем периоду коришћења усева.

Поред утврђивања клијавости семена, за успешну производњу усева лабораторијска примена тестова на семену је од значаја и за детектовање разлика у животној способности семена између тестираних сората и најчешће различитих партија семена.

У циљу процене животне способности семена десет испитиваних сората луцерке са по три различите партије сваке сорте, семе је подвргнуто тесту убрзаног старења. Због једноставне примене овог теста и кључних информација које пружа то је по многима један од највише примењиваних тестова за оцену животне способности семена.

Овај тест се заснива на излагању семена температури од 40 до 45 °C, и влажности око 100 % у трајању од 24 h до 120 h, након чега се испитује клијавост семена луцерке стандардном методом. У протеклих сто година, тест убрзаног

старења семена је стално побољшаван и њиме су обезбеђиване релевантније информације о квалитету испитиваног семена (Marcos Filho, 2015).

Унапређење теста убрзаног старења, модификован метод, на бројним пољопривредним врстама као што су: паприка (*Capsicum annuum* L.), броколи (*Brassica oleracea* var. *italica*), карфиол (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), краставац (*Cucumis sativus* L.), сочиво (*Lens esculentus* L.), диња (*Cucumis melo* L.), овас (*Avena sativa* L.), тиква (*Cucurbita pepo* L.), ротквица (*Raphanus sativus* L.), спанаћ (*Spinacea oleracea* L.), репа (*Beta vulgaris* L.), парадајз (*Solanum lycopersicum* L.), пшеница (*Triticum aestivum* L.) показао је бројне предности у односу на стандардни тест убрзаног старења семена (Marcos Filho, 2015; Hyatt and Tekrony, 2008; Bennett et al., 2004).

Тест убрзаног старења за семена различитих врста дат је у *ISTA* правилима, по којем се оцењује квалитет семена пољопривредних биљних врста у земљама Европе, Азије, Јужне Америке, Африке и то за семе у међународном промету (*ISTA Rules*, 2015).

Међутим, унапређен метод убрзаног старења семена стандардизован је само за соју (*ISTA Rules*, 2004).

Генерално тест старења за оцену семена на крмним биљним врстама се мало примењује у односу на друге пољопривредне биљне врсте (Wang et al., 2004). Као потврда тога може се навести чињеница да у литератури готово да нема резултата истраживања о примени овог теста на сортама и/или партијама вишегодишњих крмних легуминоза са простора југоисточне Европе. Такође нема резултата истраживања на унапређењу теста старења на овим најзначајнијим крмним врстама за регион .

Недостатак оваквих истраживања се може приписати на једној страни мањој стратешкој улози крмних биљака у односу на кукуруз, пшеницу, соју и друге биљне врсте које се гаје на значајно већим површинама, или у односу на интензивније пољопривредне гајене биљне врсте са далеко већим улагањима за заснивање усева по јединици површине, нарочито са врстама које имају веома скупо семе (хибридно семе поврћа и сл.).

Са друге стране вероватно је традиција да се крмним биљкама даје мања важност због мишљења да су то екстензивне пољопривреде врсте.

Међутим истраживачи широм света и даље раде на унапређењу метода и добијању релевантнијих информација при испитивању семена у лабораторијским условима који су у сагласности са резултатима клијања и ницања на семену после сетве као током складиштења семена.

Табела 8. Примена теста убрзаног старења семена (AA) на различитим сортама и партијама луцерке на температури од 41 °C, стандардни метод, са средњим вредностима (\bar{x}), грешком средње вредности ($s\bar{x}$) и коефицијентом варијације (CV) са различитим временом излагања (h).

Сорта	Локалитет/партија	Излагања семена тесту старења (h)				
		$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 24 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 48 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 72 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 96 h	
К-22	Александрово	59 ± 0,17 а С	70 ± 0,21 а А	71 ± 0,22 а А	65 ± 0,22 а В	
	Рагари	56 ± 0,19 а С	70 ± 0,26 а В	73 ± 0,24 а А	66 ± 0,19 а D	
	Осипаоница	59 ± 0,21 а С	64 ± 0,19 b В	67 ± 0,21 b А	52 ± 0,24 b D	
\bar{x} за локалитете/партије	58	68	70	61		
CV (%)	2,99	5,09	4,34	12,80		
К-28	Банатско Карађорђево	83 ± 0,21 а В	90 ± 0,16 а А	71 ± 0,21 а С	61 ± 0,20 а D	
	Рагари	81 ± 0,20 а В	88 ± 0,23 а А	59 ± 0,25 b С	53 ± 0,23 b D	
	Ниш	80 ± 0,25 а В	87 ± 0,20 а А	72 ± 0,17 а С	50 ± 0,19 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	81	88	67	55		
CV (%)	1,88	1,73	10,74	10,40		
НС-Банат	Тител	91 ± 0,19 а А	90 ± 0,21 а А	78 ± 0,20 а В	73 ± 0,15 а С	
	Руско Село	90 ± 0,21 а А	87 ± 0,18 а В	69 ± 0,23 b С	64 ± 0,19 b D	
	Стеријино (Ада)	93 ± 0,22 а А	87 ± 0,16 а В	59 ± 0,27 c С	43 ± 0,23 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	91	88	69	60		
CV (%)	1,67	1,97	13,84	25,66		
НС-Медана	Вршац	89 ± 0,12 а А	89 ± 0,19 а А	74 ± 0,20 а В	59 ± 0,16 а С	
	Бачко Градиште I	87 ± 0,21 а А	87 ± 0,16 а А	70 ± 0,12 b В	53 ± 0,18 b С	
	Бачко Градиште II	86 ± 0,18 а В	89 ± 0,25 а А	72 ± 0,21 ab С	56 ± 0,26 ab D	
\bar{x} за локалитете/партије	87	88	72	56		
CV (%)	1,75	1,31	2,78	5,36		
ЗА-83	Бољевац	96 ± 0,20 а А	94 ± 0,16 а А	81 ± 0,19 b В	62 ± 0,26 b С	
	Велики Извор	95 ± 0,13 а А	91 ± 0,21 а В	82 ± 0,23 b С	67 ± 0,21 а D	
	Минићево	94 ± 0,21 а А	93 ± 0,20 а А	87 ± 0,25 а В	55 ± 0,20 c С	
\bar{x} за локалитете/партије	95	93	83	61		
CV (%)	1,05	1,65	3,86	9,83		

Чачанка 10	Ковин	90 ± 0,29 а А	89 ± 0,26 а А	60 ± 0,18 с В	49 ± 0,18 с С
	Чачак I	93 ± 0,19 а А	92 ± 0,21 а А	79 ± 0,17 а В	64 ± 0,24 а С
	Чачак II	92 ± 0,23 а А	89 ± 0,26 а В	75 ± 0,23 б С	60 ± 0,22 б D
\bar{x} за локалитете/партије	92	90	71	58	
CV (%)	1,67	1,92	14,04	13,47	
Бањалучанка	Козарска Дубица	89 ± 0,12 а В	94 ± 0,26 а А	75 ± 0,16 б С	51 ± 0,28 с D
	Бања Лука	90 ± 0,23 а В	93 ± 0,25 а А	79 ± 0,27 аb С	69 ± 0,14 б D
	Маглајани	91 ± 0,20 а В	96 ± 0,22 а А	82 ± 0,21 а С	80 ± 0,22 а С
\bar{x} за локалитете/партије	90	94	79	67	
CV (%)	1,11	1,62	4,46	21,96	
ОС-66	Истра	89 ± 0,20 а А	86 ± 0,28 а В	63 ± 0,26 а С	54 ± 0,26 а D
	Осијек I	86 ± 0,18 а А	85 ± 0,22 а А	56 ± 0,17 б В	43 ± 0,26 б С
	Осијек II	88 ± 0,19 а А	84 ± 0,23 а А	65 ± 0,24 а В	53 ± 0,26 а С
\bar{x} за локалитете/партије	88	85	61	50	
CV (%)	1,74	1,18	7,71	12,17	
ОС-88	Истра	73 ± 0,22 а В	88 ± 0,20 а А	70 ± 0,29 а С	60 ± 0,19 б D
	Осијек I	73 ± 0,20 а В	89 ± 0,17 а А	70 ± 0,18 а С	64 ± 0,23 а D
	Осијек II	70 ± 0,17 а В	86 ± 0,16 а А	56 ± 0,21 б В	48 ± 0,21 с С
\bar{x} за локалитете/партије	72	88	65	57	
CV (%)	2,41	1,74	12,37	14,52	
ОС-99	Истра	89 ± 0,26 а А	80 ± 0,19 а В	69 ± 0,24 б С	46 ± 0,24 с D
	Осијек	91 ± 0,12 а А	83 ± 0,22 а В	77 ± 0,24 а С	63 ± 0,18 а D
	Широко Поље	91 ± 0,19 а А	83 ± 0,24 а В	69 ± 0,12 б С	59 ± 0,19 б D
\bar{x} за локалитете/партије	90	82	72	56	
CV (%)	1,28	2,11	6,44	15,87	
CV (%) за сорту	13,44	8,49	9,01	7,80	

a, b... (мала слова) у колони означавају значајност разлика између вредности у колони (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

A, B... (велика слова) у реду означавају значајност разлика између вредности у реду (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

Табела 9. Примена теста убрзаног старења семена (AA) на различитим сортама и партијама луцерке на температури од 45 °C, стандардни метод, са средњим вредностима (\bar{x}), грешком средње вредности ($s\bar{x}$) и коефицијентом варијације (CV) са различитим временом излагања (h).

Сорта	Локалитет/партија	Излагања семена тесту старења (h)				
		$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 24 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 48 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 72 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 96 h	
К-22	Александрово	83 ± 0,12 а А	71 ± 0,21 b B	49 ± 0,19 b C	34 ± 0,12 b D	
	Рагари	86 ± 0,14 а А	80 ± 0,23 а В	53 ± 0,16 а C	42 ± 0,16 а D	
	Осипаоница	84 ± 0,19 а А	61 ± 0,24 c B	40 ± 0,23 c C	30 ± 0,18 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	84	71	47	35		
CV (%)	1,81	13,44	14,07	17,29		
К-28	Банатско Карађорђево	86 ± 0,11 а А	80 ± 0,13 а В	66 ± 0,23 а C	44 ± 0,15 а D	
	Рагари	82 ± 0,21 а А	78 ± 0,19 ab B	53 ± 0,10 b C	40 ± 0,17 b D	
	Ниш	82 ± 0,19 а А	75 ± 0,15 b B	55 ± 0,19 b C	32 ± 0,29 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	83	78	58	39		
CV (%)	2,77	3,24	12,09	15,80		
НС-Банат	Тител	87 ± 0,16 а А	84 ± 0,16 а В	75 ± 0,19 а C	68 ± 0,21 а D	
	Руско Село	85 ± 0,16 а А	84 ± 0,16 а В	64 ± 0,12 b C	60 ± 0,16 b D	
	Стеријино (Ада)	84 ± 0,16 а А	78 ± 0,16 b B	48 ± 0,16 c C	10 ± 0,17 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	95	82	62	46		
CV (%)	1,79	4,22	21,78	68,33		
НС-Медана	Вршац	91 ± 0,10 а А	87 ± 0,21 а В	48 ± 0,13 а C	39 ± 0,20 а D	
	Бачко Градиште I	89 ± 0,16 а А	74 ± 0,17 c B	37 ± 0,19 c C	17 ± 0,19 c D	
	Бачко Градиште II	90 ± 0,19 а А	80 ± 0,19 b B	44 ± 0,21 b C	28 ± 0,25 b D	
\bar{x} за локалитете/партије	90	80	43	28		
CV (%)	1,11	8,10	12,95	39,29		
ЗА-83	Бољевац	91 ± 0,19 а А	87 ± 0,21 а В	60 ± 0,19 c C	46 ± 0,19 b D	
	Велики Извор	90 ± 0,16 а А	88 ± 0,23 а А	78 ± 0,13 а В	57 ± 0,13 а C	
	Минићево	92 ± 0,12 а А	76 ± 0,16 b B	73 ± 0,21 b C	16 ± 0,10 c D	
\bar{x} за локалитете/партије	91	84	70	44		
CV (%)	1,10	7,96	13,21	12,65		

Чачанка 10	Ковин	85 ± 0,19 b A	77 ± 0,11 c B	61 ± 0,16 c C	39 ± 0,23 c D
	Чачак I	90 ± 0,11 a A	89 ± 0,19 a A	74 ± 0,15 a B	50 ± 0,10 a C
	Чачак II	88 ± 0,13 ab A	83 ± 0,23 b B	66 ± 0,19 b C	43 ± 0,21 b D
\bar{x} за локалитете/партије	88	83	67	44	
CV (%)	2,87	7,23	9,79	12,65	
Бањалучанка	Козарска Дубица	87 ± 0,19 a A	77 ± 0,12 b B	59 ± 0,18 c C	39 ± 0,13 c D
	Бања Лука	90 ± 0,14 a A	88 ± 0,21 a A	69 ± 0,15 b B	50 ± 0,26 b C
	Маглајани	90 ± 0,22 a A	90 ± 0,16 a A	73 ± 0,16 a B	58 ± 0,22 a C
	\bar{x} за локалитете/партије	89	85	67	49
CV (%)	1,95	8,24	10,76	19,47	
ОС-66	Истра	94 ± 0,14 a A	82 ± 0,25 a B	54 ± 0,19 a C	40 ± 0,12 a D
	Осијек I	90 ± 0,13 a A	69 ± 0,20 b B	40 ± 0,22 c C	14 ± 0,16 c D
	Осијек II	91 ± 0,19 a A	69 ± 0,23 b B	50 ± 0,23 b C	30 ± 0,19 b D
\bar{x} за локалитете/партије	92	73	48	28	
CV (%)	2,27	10,23	15,02	46,84	
ОС-88	Истра	82 ± 0,27 a A	77 ± 0,19 a B	51 ± 0,11 a C	43 ± 0,18 a D
	Осијек I	79 ± 0,19 b A	71 ± 0,18 b B	50 ± 0,25 a C	35 ± 0,22 b D
	Осијек II	79 ± 0,15 b A	64 ± 0,26 c B	41 ± 0,17 b C	31 ± 0,19 c D
\bar{x} за локалитете/партије	80	71	47	36	
CV (%)	2,17	9,21	11,64	16,82	
ОС-99	Истра	89 ± 0,16 a A	87 ± 0,19 b A	56 ± 0,26 b B	35 ± 0,16 c C
	Осијек	91 ± 0,25 a A	86 ± 0,14 a B	64 ± 0,19 a C	56 ± 0,12 a D
	Широко Поље	90 ± 0,19 a A	81 ± 0,21 b B	58 ± 0,31 b C	51 ± 0,19 b D
\bar{x} за локалитете/партије	90	82	59	47	
CV (%)	1,11	3,61	4,16	23,18	
CV (%) за сорту	5,18	6,82	17,37	19,31	

a, b... (мала слова) у колони означавају значајност разлика између вредности у колони (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

A, B... (велика слова) у реду означавају значајност разлика између вредности у реду (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

Табела 10. Примена теста убрзаног старења семена (AA) на различитим сортама и партијама лущерке на температури од 41 °C, модификовани метод, са средњим вредностима (\bar{x}), грешком средње вредности ($s\bar{x}$) и коефицијентом варијације (CV) са различитим временом излагања (h).

Сорта	Локалитет/партија	Излагања семена тесту старења (h)					
		$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 24 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 48 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 72 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 96 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 120 h	
K-22	Александрово	89 ± 0,16 а А	88 ± 0,13 а А	89 ± 0,17 а А	88 ± 0,14 а А	87 ± 0,19 а А	
	Ратари	88 ± 0,14 а А	90 ± 0,17 а А	89 ± 0,19 а А	90 ± 0,15 а А	88 ± 0,21 а А	
	Осипаоница	88 ± 0,21 а А	90 ± 0,19 а А	90 ± 0,23 а А	89 ± 0,11 а А	90 ± 0,17 а А	
\bar{x} за локалитете/партије	88	89	89	89	88		
CV (%)	0,65	1,29	0,65	1,12	1,73		
K-28	Бан. Карађорђево	88 ± 0,23 а А	90 ± 0,17 а А	88 ± 0,15 а А	89 ± 0,21 а А	88 ± 0,24 а А	
	Ратари	86 ± 0,20 а А	87 ± 0,19 а А	89 ± 0,19 а А	88 ± 0,22 а А	87 ± 0,19 а А	
	Ниш	87 ± 0,19 а А	89 ± 0,13 а А	88 ± 0,18 а А	90 ± 0,17 а А	89 ± 0,17 а А	
\bar{x} за локалитете/партије	87	89	88	89	89		
CV (%)	1,15	1,72	0,65	1,12	1,14		
НС-Банат	Тител	91 ± 0,14 а А	90 ± 0,16 а А	88 ± 0,16 а А	89 ± 0,13 а А	88 ± 0,22 а А	
	Руско Село	89 ± 0,23 а А	89 ± 0,24 а А	88 ± 0,11 а А	88 ± 0,16 а А	87 ± 0,17 а А	
	Стеријино (Ада)	90 ± 0,22 а А	88 ± 0,27 а А	89 ± 0,23 а А	88 ± 0,21 а А	88 ± 0,14 а А	
\bar{x} за локалитете/партије	90	89	88	88	88		
CV (%)	1,11	1,12	0,65	0,65	0,66		
НС-Медиана	Вршац	88 ± 0,21 а А	90 ± 0,15 а А	88 ± 0,21 а А	90 ± 0,19 а А	89 ± 0,21 а А	
	Б.Градиште I	87 ± 0,13 а А	88 ± 0,18 а А	89 ± 0,24 а А	88 ± 0,12 а А	87 ± 0,23 а А	
	Б.Градиште II	89 ± 0,16 а А	88 ± 0,19 а А	87 ± 0,17 а А	89 ± 0,14 а А	87 ± 0,19 а А	
\bar{x} за локалитете/партије	88	89	88	89	89		
CV (%)	1,14	1,30	1,14	1,12	1,32		
ЗА 83	Бољевац	90 ± 0,16 а А	91 ± 0,25 а А	89 ± 0,23 а А	90 ± 0,16 а А	89 ± 0,17 а А	
	Белики Извор	89 ± 0,19 а А	89 ± 0,18 а А	88 ± 0,19 а А	89 ± 0,24 а А	88 ± 0,14 а А	
	Минићево	92 ± 0,14 а А	92 ± 0,21 а А	90 ± 0,17 а А	88 ± 0,22 а А	88 ± 0,19 а А	
\bar{x} за локалитете/партије	90	91	89	89	88		
CV (%)	1,69	1,68	1,12	1,12	0,65		

Чачанка 10	Ковин	90 ± 0,13 a A	91 ± 0,17 a A	90 ± 0,13 a A	89 ± 0,22 a A	90 ± 0,16 a A
	Чачак I	92 ± 0,14 a A	90 ± 0,20 a A	91 ± 0,11 a A	92 ± 0,17 a A	90 ± 0,21 a A
	Чачак II	89 ± 0,23 a A	89 ± 0,24 a A	92 ± 0,19 a A	90 ± 0,19 a A	89 ± 0,17 a A
\bar{x} за локалитете/партије		90	90	91	90	90
CV (%)		1,69	1,11	1,10	1,69	1,64
Бањалу-чанка	Козарска Дубица	90 ± 0,15 a A	89 ± 0,17 a A	88 ± 0,13 a A	88 ± 0,10 a A	89 ± 0,23 a A
	Бања Лука	91 ± 0,16 a A	91 ± 0,13 a A	89 ± 0,17 a A	88 ± 0,16 a A	88 ± 0,24 a A
	Маглајани	90 ± 0,21 a A	92 ± 0,19 a A	91 ± 0,22 a A	89 ± 0,18 a A	90 ± 0,21 a A
\bar{x} за локалитете/партије		90	91	89	88	89
CV (%)		0,64	1,68	1,71	0,65	1,12
ОС-66	Истра	90 ± 0,11 a A	89 ± 0,23 a A	89 ± 0,10 a A	90 ± 0,22 a A	89 ± 0,13 a A
	Осијек I	88 ± 0,14 a A	87 ± 0,21 a A	86 ± 0,13 a A	89 ± 0,26 a A	87 ± 0,16 a A
	Осијек II	89 ± 0,19 a A	88 ± 0,19 a A	88 ± 0,19 a A	88 ± 0,17 a A	87 ± 0,19 a A
\bar{x} за локалитете/партије		89	88	88	89	88
CV (%)		1,12	1,14	1,74	1,12	1,32
ОС-88	Истра	85 ± 0,14 a A	86 ± 0,17 a A	83 ± 0,17 a A	84 ± 0,23 a A	85 ± 0,24 a A
	Осијек I	86 ± 0,12 a A	84 ± 0,21 a A	83 ± 0,16 a A	82 ± 0,20 a A	84 ± 0,18 a A
	Осијек II	84 ± 0,19 a A	85 ± 0,13 a A	82 ± 0,19 a A	83 ± 0,19 a A	83 ± 0,21 a A
\bar{x} за локалитете/партије		85	85	83	83	84
CV (%)		1,18	1,18	0,70	1,20	1,20
ОС-99	Истра	90 ± 0,16 a A	90 ± 0,17 a A	89 ± 0,15 a A	89 ± 0,19 a A	90 ± 0,19 a A
	Осијек	92 ± 0,13 a A	89 ± 0,21 a A	88 ± 0,13 a A	90 ± 0,11 a A	89 ± 0,19 a A
	Широко Поље	90 ± 0,19 a A	91 ± 0,18 a A	90 ± 0,21 a A	90 ± 0,17 a A	89 ± 0,19 a A
\bar{x} за локалитете/партије		90	90	89	90	90
CV (%)		1,27	1,11	1,12	0,40	0,65
CV (%) за сорте		1,92	1,94	2,32	2,27	1,93

a, b... (мала слова) у колони означавају значајност разлика између вредности у колони (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

A, B... (велика слова) у реду означавају значајност разлика између вредност у реду (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

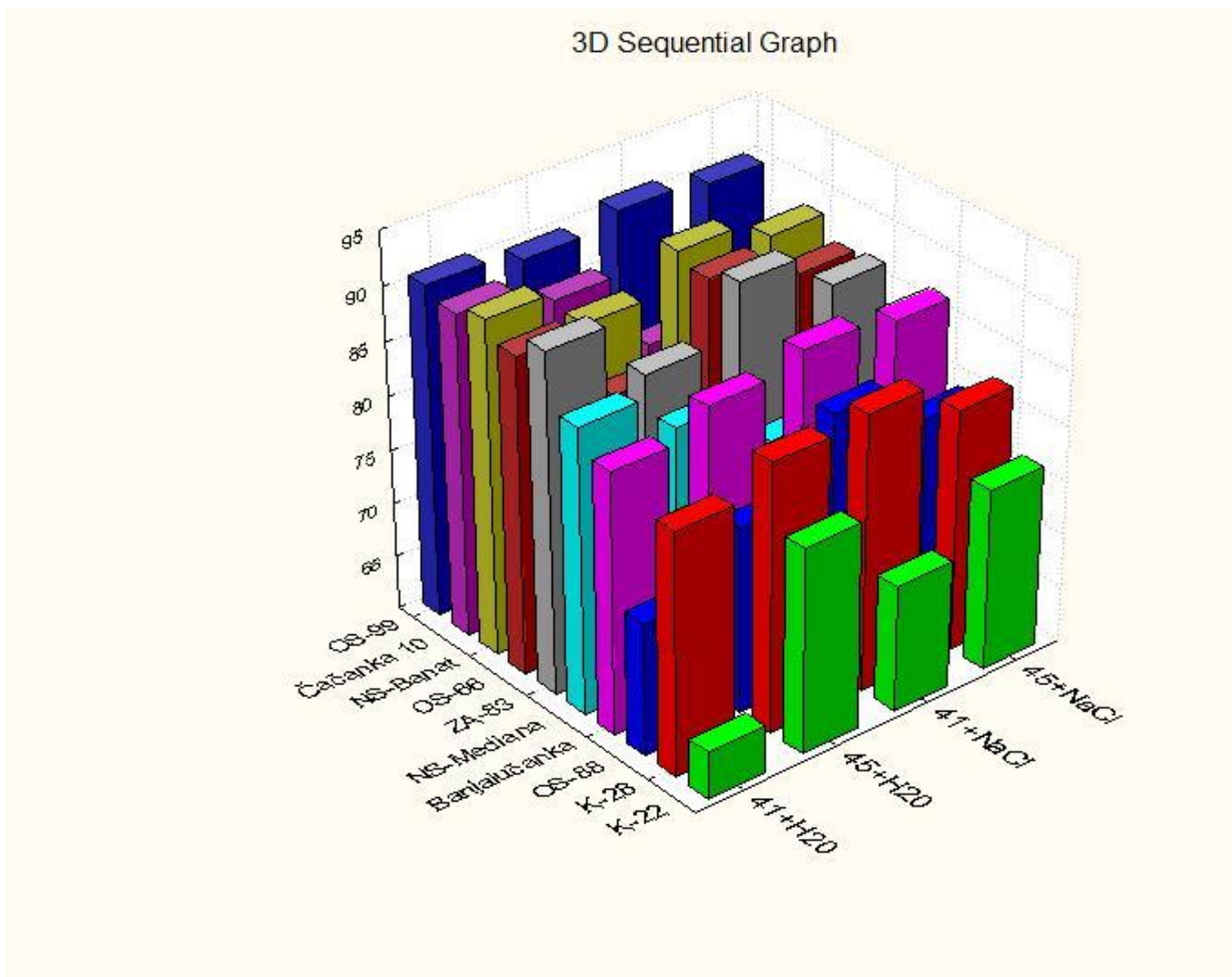
Табела 11. Примена теста убрзаног старења семена (AA) на различитим сортама и партијама лущерке на температури од 45 °C, модификовани метод, са средњим вредностима (\bar{x}), грешком средње вредности ($s\bar{x}$) и коефицијентом варијације (CV) са различитим временом излагања (h).

Сорта	Локалитет/партија	Излагања семена тесту старења (h)					
		$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 24 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 48 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 72 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 96 h	$\bar{x} \pm s\bar{x}$ 120 h	
K-22	Александрово	89 ± 0,17 а А	88 ± 0,14 а А	87 ± 0,11 а А	86 ± 0,14 а А	74 ± 0,19 b B	
	Ратари	90 ± 0,19 а А	88 ± 0,16 а А	87 ± 0,13 а А	87 ± 0,18 а А	78 ± 0,14 а B	
	Осипаоница	88 ± 0,15 а А	87 ± 0,18 а А	86 ± 0,17 а А	85 ± 0,16 а А	70 ± 0,21 c B	
\bar{x} за локалитете/партије	89	88	87	86	74		
CV (%)	1,12	0,66	0,67	1,16	5,41		
K-28	Бан. Карађорђево	92 ± 0,17 а А	91 ± 0,19 а А	90 ± 0,12 а А	89 ± 0,13 а А	77 ± 0,13 а B	
	Ратари	91 ± 0,13 а А	91 ± 0,17 а А	88 ± 0,11 а А	88 ± 0,17 а А	73 ± 0,14 b B	
	Ниш	90 ± 0,16 а А	89 ± 0,14 а А	88 ± 0,15 а А	87 ± 0,14 а А	72 ± 0,15 b B	
\bar{x} за локалитете/партије	91	90	89	88	74		
CV (%)	1,10	1,28	1,30	1,14	3,58		
НС-Банат	Тител	91 ± 0,13 а А	90 ± 0,11 а А	90 ± 0,21 а А	88 ± 0,12 а А	85 ± 0,16 а B	
	Руско Село	89 ± 0,17 а А	89 ± 0,14 а А	88 ± 0,18 а А	87 ± 0,14 а А	82 ± 0,11 ab B	
	Стеријино (Ада)	89 ± 0,19 а А	88 ± 0,19 а А	88 ± 0,22 а А	86 ± 0,17 а А	80 ± 0,19 b B	
\bar{x} за локалитете/партије	90	89	89	87	82		
CV (%)	1,29	1,12	1,30	1,15	3,06		
НС-Медиана	Вршац	91 ± 0,21 а А	90 ± 0,17 а А	90 ± 0,14 а А	89 ± 0,17 а А	83 ± 0,14 а B	
	Б.Градиште I	90 ± 0,18 а А	89 ± 0,19 а А	88 ± 0,16 а А	87 ± 0,19 а А	80 ± 0,11 ab B	
	Б.Градиште II	89 ± 0,19 а А	88 ± 0,13 а А	88 ± 0,18 а А	86 ± 0,21 а А	78 ± 0,17 b B	
\bar{x} за локалитете/партије	90	89	89	87	80		
CV (%)	1,11	1,12	1,30	1,75	3,13		
ЗА 83	Бољевац	90 ± 0,11 а А	90 ± 0,21 а А	89 ± 0,17 а А	87 ± 0,18 а А	82 ± 0,17 ab B	
	Белики Извор	91 ± 0,14 а А	90 ± 0,18 а А	89 ± 0,19 а А	89 ± 0,17 а А	84 ± 0,13 а B	
	Минићево	89 ± 0,15 а А	88 ± 0,16 а А	87 ± 0,15 а А	86 ± 0,14 а А	80 ± 0,11 b B	
\bar{x} за локалитете/партије	90	89	88	87	82		
CV (%)	1,11	1,29	1,31	1,75	2,44		

Чачанка 10	Ковин	91 ± 0,13 a A	90 ± 0,21 a A	89 ± 0,15 a A	88 ± 0,17 a A	74 ± 0,16 a B
	Чачак I	92 ± 0,16 a A	91 ± 0,23 a A	90 ± 0,14 a A	89 ± 0,14 a A	76 ± 0,19 a B
	Чачак II	90 ± 0,17 a A	90 ± 0,16 a A	88 ± 0,17 a A	87 ± 0,21 a A	69 ± 0,13 b B
\bar{x} за локалитете/партије		91	90	89	88	73
CV (%)		1,10	0,64	1,12	1,14	4,94
Бањалу-чанка	Козарска Дубица	90 ± 0,16 a A	88 ± 0,12 a A	88 ± 0,18 a A	87 ± 0,21 a A	76 ± 0,17 c B
	Бања Лука	91 ± 0,18 a A	89 ± 0,19 a A	89 ± 0,19 a A	88 ± 0,11 a A	80 ± 0,19 b B
	Маглајани	92 ± 0,11 a A	90 ± 0,11 a A	90 ± 0,14 a A	89 ± 0,22 a A	84 ± 0,13 a B
\bar{x} за локалитете/партије		91	89	89	88	80
CV (%)		1,10	1,12	1,12	1,14	5,00
ОС-66	Истра	90 ± 0,13 a A	89 ± 0,19 a A	88 ± 0,16 a A	87 ± 0,14 a A	81 ± 0,14 a B
	Осијек I	89 ± 0,16 a A	88 ± 0,20 a A	87 ± 0,19 a A	86 ± 0,23 a A	76 ± 0,16 b B
	Осијек II	90 ± 0,19 a A	89 ± 0,22 a A	88 ± 0,13 a A	87 ± 0,12 a A	78 ± 0,17 ab B
\bar{x} за локалитете/партије		90	89	88	87	78
CV (%)		0,64	0,65	0,66	0,67	3,21
ОС-88	Истра	87 ± 0,11 a A	89 ± 0,12 a A	89 ± 0,13 a A	84 ± 0,22 a AB	80 ± 0,21 a B
	Осијек I	85 ± 0,13 a A	87 ± 0,11 a A	87 ± 0,17 a A	85 ± 0,13 a A	78 ± 0,18 ab B
	Осијек II	87 ± 0,16 a A	87 ± 0,17 a A	87 ± 0,10 a A	84 ± 0,19 a A	76 ± 0,17 b B
\bar{x} за локалитете/партије		86	88	88	84	78
CV (%)		1,34	1,32	1,32	0,68	2,56
ОС-99	Истра	90 ± 0,17 a A	88 ± 0,15 a A	88 ± 0,18 a A	87 ± 0,14 a A	80 ± 0,21 b B
	Осијек	90 ± 0,11 a A	90 ± 0,12 a A	88 ± 0,16 a A	87 ± 0,15 a AB	84 ± 0,16 a B
	Широко Поље	91 ± 0,19 a A	89 ± 0,13 a A	88 ± 0,19 a A	88 ± 0,11 a A	82 ± 0,20 ab B
\bar{x} за локалитете/партије		90	89	88	87	82
CV (%)		0,64	1,12	0,00	0,66	2,44
CV (%) за сорте		1,64	0,75	0,79	1,38	4,51

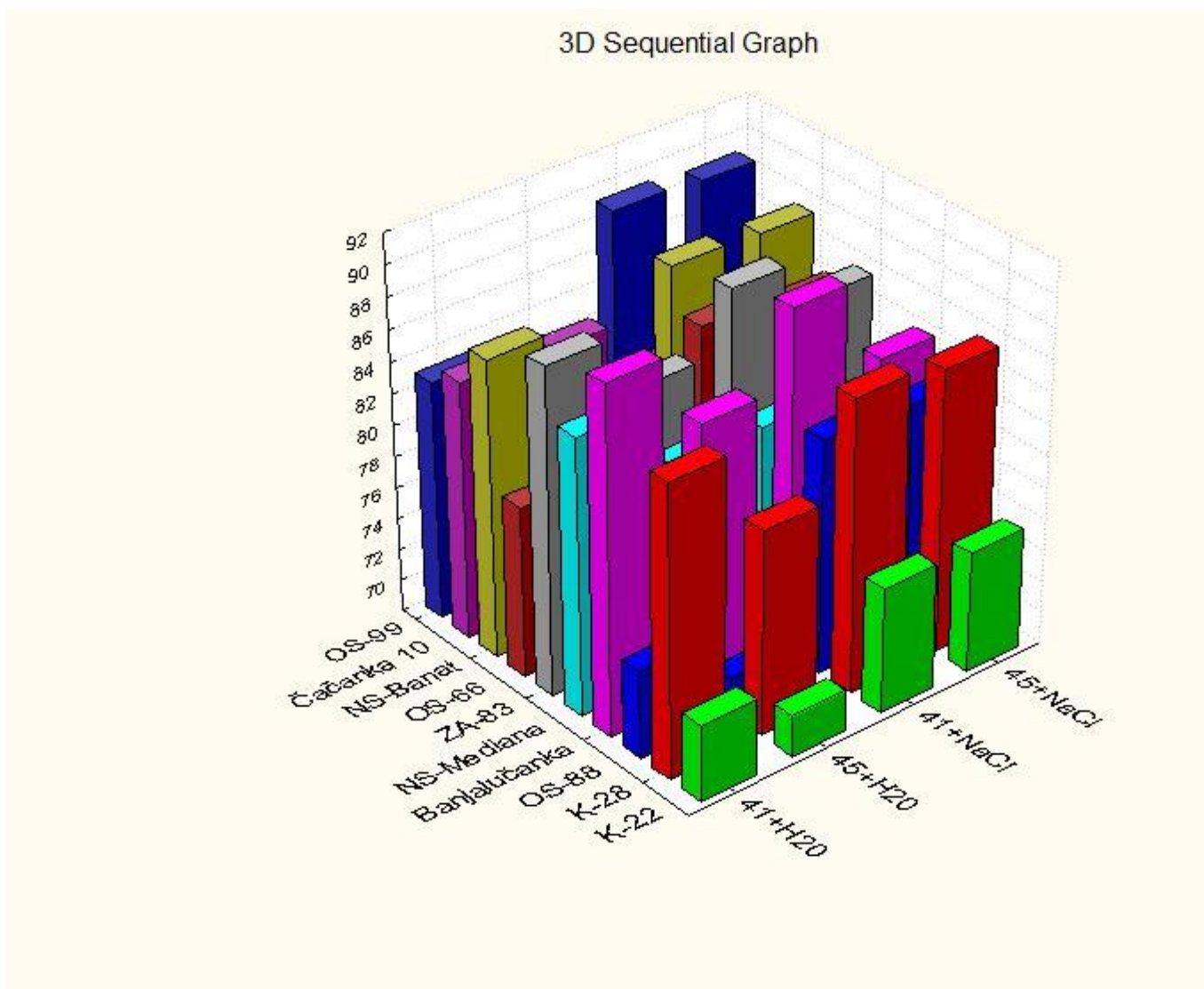
a, b... (мала слова) у колони означавају значајност разлика између вредности у колони (Duncan's test; $p \leq 0.01$).

A, B... (велика слова) у реду означавају значајност разлика између вредности у реду (Duncan's test; $p \leq 0.01$).



Графикон 5. Варијабилност клијавости семена различитих сората луцерке (просек за три локалитета/партије) применом теста убрзаног старења на температурама 41 и 45 °C, стандардном методом и модификованом методом у трајању од 24 h.

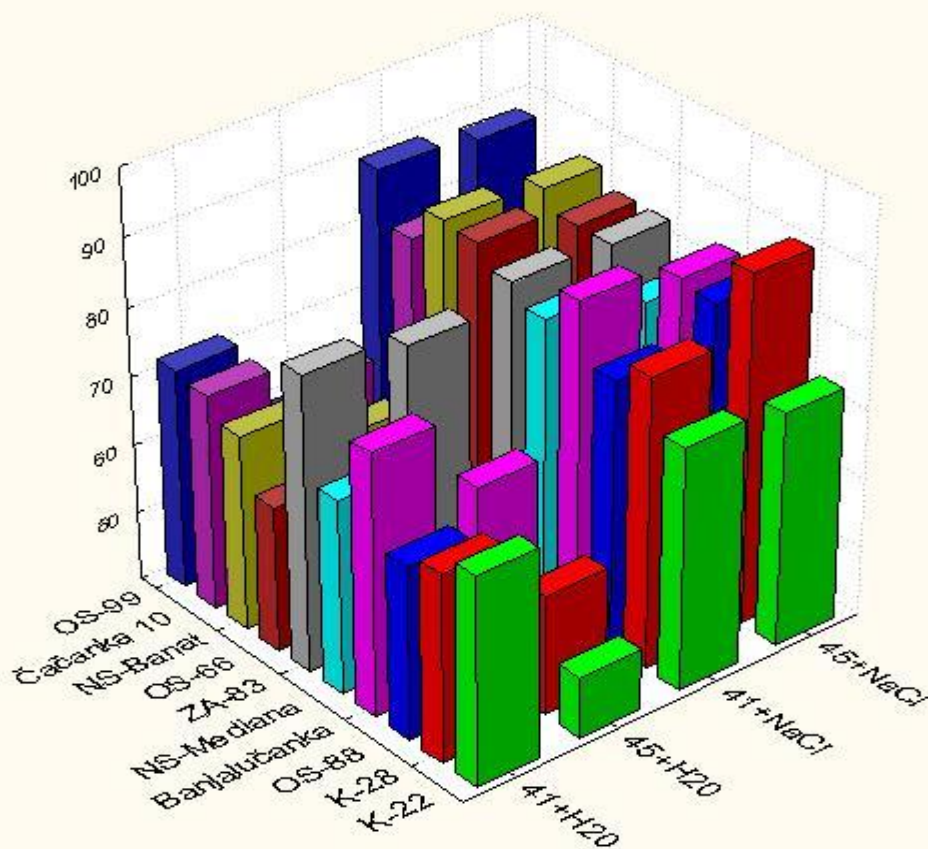
Након испитивања луцерке тестом убрзаног старења са различитим температурама у времену трајања од 24 h можемо видети да су сорта Крушевачка 22 и Осјечка 88 имале нешто мању клијавост при температури од 41 °C стандардном методом (са дестилованом водом), док код осталих сората нису утврђене веће разлике (грфикон 5).



Графикон 6. Варијабилност клијавости семена различитих сората луцерке (просек за три локалитета/партије) применом теста убрзаног старења на температурама 41 и 45 °C, стандардном методом и модификованом методом у трајању од 48 h.

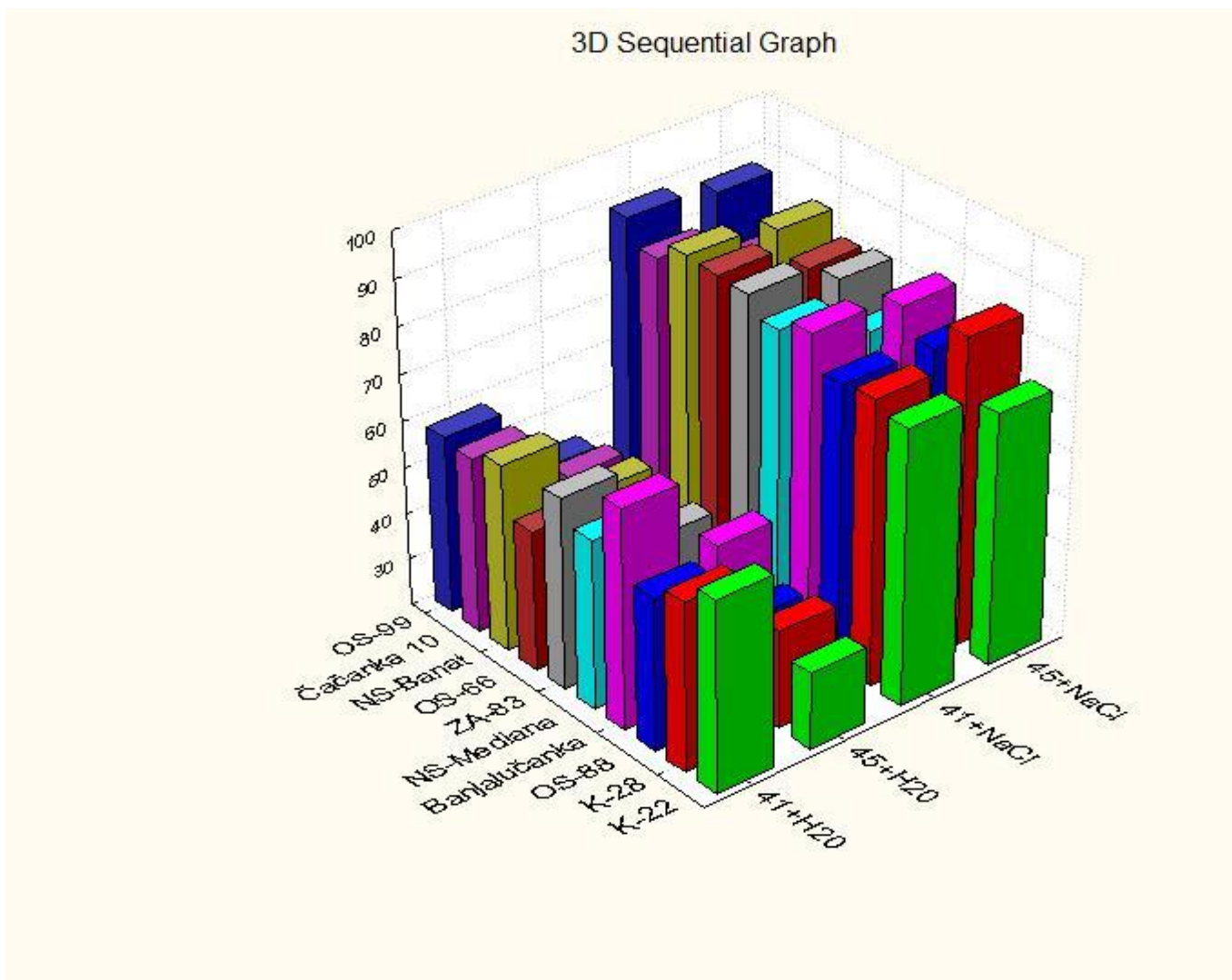
Након испитивања луцерке тестом убрзаног старења са различитим температурама у времену трајања од 48 h можемо видети да су сорте реаговале смањењем клијавости на температурама од 41 и 45 °C стандардном методом (са дестилованом водом). Најмања клијавост констатована је код сорти Крушевачка 22 и Осјечка 88 при температури од 45 °C стандардном методом (графикон 6).

3D Sequential Graph



Графикон 7. Варијабилност клијавости семена различитих сората луцерке (просек за три локалитета/партије) применом теста убрзаног старења на температурама 41 и 45 °C, стандардном методом и модификованом методом у трајању од 72 h.

Након излагања семена луцерке тесту убрзаног старења са различитим температурама у времену трајања од 72 h можемо видети да су скоро све сорте реаговале смањењем клијавости на температурама од 41 и 45 °C стандардном методом, а највећа клијавост установљена је код сорти Зајечарска 83 и Бањалучанка при температури од 41 и 45 °C стандардном методом, док остале сорте на температурама од 41 и 45 °C модификованом методом нису показале значајне разлике (графикон 7).



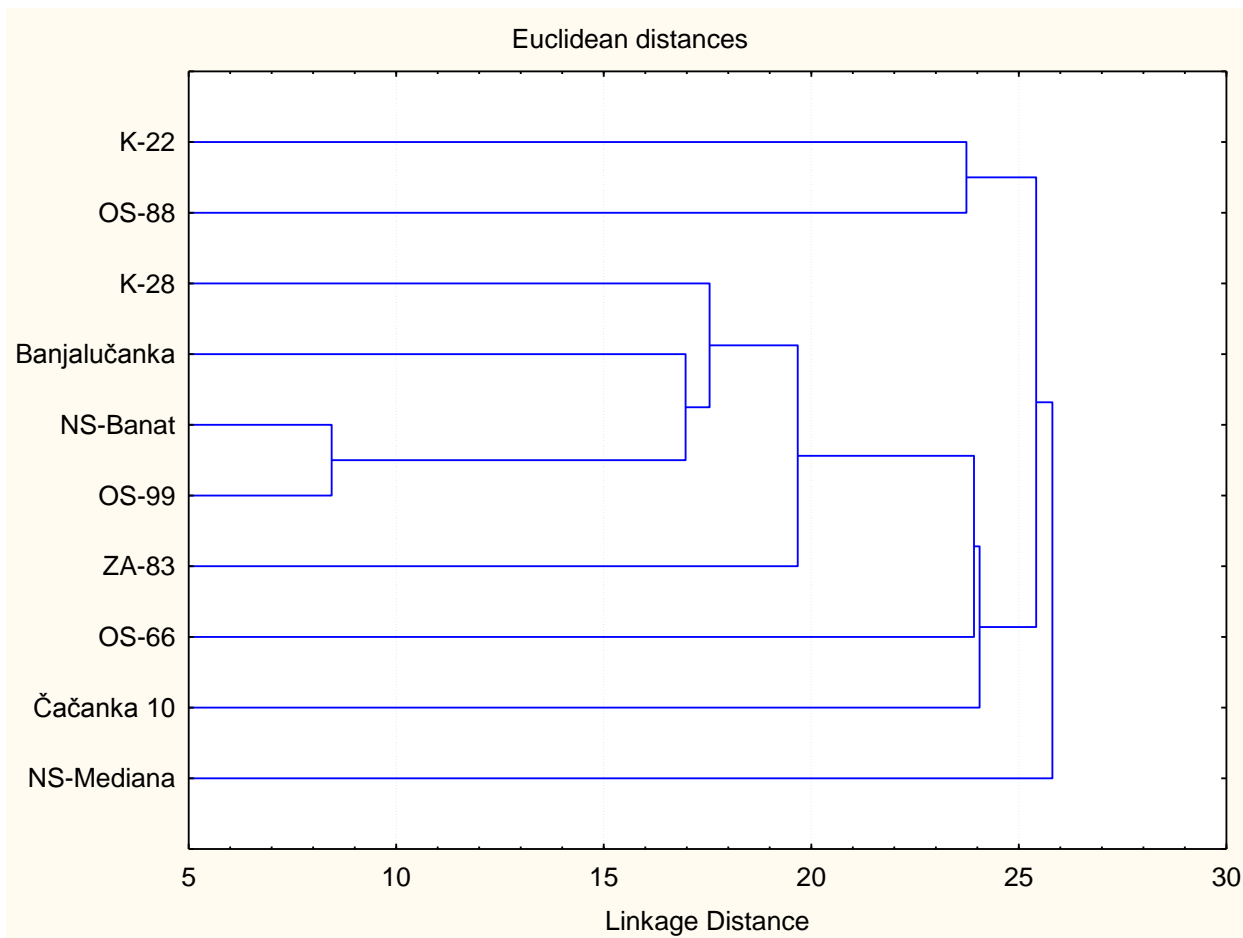
Графикон 8. Варијабилност клијавости семена различитих сората луцерке (просек за три локалитета/партије) применом теста убрзаног старења на температурама 41 и 45 °C, стандардном методом и модификованом методом у трајању од 96 h.

Након излагања семена луцерке тесту убрзаног старења са различитим температурама у времену трајања од 96 h можемо видети да су скоро све сорте реаговале смањењем клијавости на температурама од 41 и 45 °C стандардном методом, а најмања клијавост забележена је код сортата Крушевачка 22 и Осјечка 88 при температури од 45 °C стандардном методом, док остале сорте на температурама од 41 и 45 °C модификованом методом нису показале значајне разлике (графикон 8).

Табела 12. Прости коефицијенти корелација (r) између клијавости, тврдог семена и садржаја воде у семену (%), приликом примене теста убрзаног старења семена за стандардни метод (са временом излагања од 24-96 h и температурама од 41 °C и 45 °C) и модификовани метод (са временом излагања од 24-96 h и температуром од 41 °C и 45 °C) на семену десет различитих сората и партија луцерке (n=48).

Сорта	Процент (%)	Клијавост (%)	Тврдо семе (%)	Влага семена (%)
К-22	Клијавост	-	-0,405*	-0,475**
	Тврдо семе		-	-0,412*
	Влага семена			-
К-28	Клијавост	-	-0,789***	-0,802***
	Тврдо семе		-	-0,512**
	Влага семена			-
НС-Банат	Клијавост	-	-0,502**	-0,489**
	Тврдо семе		-	-0,509**
	Влага семена			-
НС-Медиана	Клијавост	-	-0,685***	-0,589***
	Тврдо семе		-	-0,498**
	Влага семена			-
ЗА-83	Клијавост	-	-0,698***	-0,599***
	Тврдо семе		-	-0,515***
	Влага семена			-
Чачанка 10	Клијавост	-	-0,319 ^{NS}	-0,326*
	Тврдо семе		-	-0,313 ^{NS}
	Влага семена			-
Бањалучанка	Клијавост	-	-0,876***	-0,749***
	Тврдо семе		-	-0,698***
	Влага семена			-
ОС-66	Клијавост	-	-0,613***	-0,515***
	Тврдо семе		-	-0,545***
	Влага семена			-
ОС-88	Клијавост	-	-0,678***	-0,595***
	Тврдо семе		-	-0,611***
	Влага семена			-
ОС-99	Клијавост	-	-0,326 *	-0,317 ^{NS}
	Тврдо семе		-	-0,312 ^{NS}
	Влага семена			-

Ниво значајности: ^{NS} P ≥ 0.05, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.



Графикон 9. Кластер дијаграм испитиваних сорти луцерке на основу свих проучаваних температура и времена трајања код примене теста убрзаног старења семена

На основу хијерархијске кластер анализе на основу свих проучаваних температура и времена трајања код примене теста убрзаног старења семена добијен је кластер дијаграм који се састоји од две групе кластера (графикон 9). У првој групи су сорте Крушевачка – 22, Осјечка - 88, Крушевачка – 28, Бањалучанка, НС-Банат, Осјечка - 99, Зајечарска 83, Осјечка – 66 и Чачанка 10, док се у другој групи издваја само сорта НС-Медиана. Ово нам указује да се сорта НС-Медиана значајно издваја од осталих сората. У оквиру прве групе разликујемо четири подгрупе. У оквиру прве подгрупе, прве групе, спадају сорте Крушевачка – 22 и Осјечка – 88. У оквиру друге подгрупе, прве групе сорте које су најближе према испитиваним особинама су Крушевачка – 28, Бањалучанка, НС-Банат, Осјечка – 99 и Зајечарска 83. У оквиру треће подгрупе, прве групе издвојила се

сорта Осјечка – 66, док се у оквиру четврте подгрупе, прве групе издвојила сорта Чачанка 10.

6.2.1. Тест убрзаног старења семена (стандардни метод)

Применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 41 °C након излагања семена времену од 72 h на свим испитиваним сортама било је могуће детектовати партије семена које су биле виталније од других. Такође у свим случајевима ово је потврдила и адекватна примена статистичке анализе (Duncan's test; $P \leq 0.01$), Табела 8, што је сагласно резултатима у истраживањима Bennett et al. (2004).

Након излагања семена 24 h и 48 h није утврђена могућност детектовања партија луцерке чије је семе виталније. Упоређујући укупну клијавост семена након теста убрзаног старења од 24 h и након времена од 48 h нема јасног закључка о смањењу или повећању клијавости семена луцерке ($P \leq 0,01$), већ је свака партија реаговала другачије. Након времена од 72 h дошло је до значајног смањења клијавости на свим сортама и партијама што потврђује потребно време при тој температури за детектовање разлика између сората, а посебно између партија испитиваних сората луцерке. Продужењем трајања теста на 96 h детектовано је смањење клијавости ($P \leq 0.01$) у односу на време од 72 h код партија семена свих сората луцерке, што је омогућило јасно детектовање разлика између сората и партија семена луцерке (Табела 8).

При примени теста убрзаног старења на нижој температури од 41 °C, након првог времена излагања од 24 h, између сората је утврђена већа варијабилност ($CV=13.44$ %) од варијабилности утврђене при наредним временима (48 h $CV=8.49$ %; 72 h $CV=9.01$ %; 96 h $CV=7.80$ %). То се може приписати присуству тврдох семена која су карактеристична за луцерку (Ћупић et al., 2005; Tiryak et al., 2009; Kandil et al., 2012; Štrbanović i sar., 2014). Семена у фази мировања не упијају воду па су она и један од разлога што у трајању од 48 h семе није имало смањену клијавост, док је код неких сората и/или партија дошло и до повећања клијавости. Ову констатацију потврђује и негативна корелациона зависност између тврдох семена и клијавости након теста убрзаног старења (ОС-99 $r = -0,326$, $P \geq 0.05$; ОС-88 $r = -0,678$, $P \geq 0.001$; ОС-66 $r = -0,613$, $P \geq 0.001$;

Бањалучанка $r = -0,876$, $P \geq 0.001$; НС-Медиана $r = -0,685$, $P \geq 0.001$; НС-Банат $r = -0,502$, $P \geq 0.05$; Чачанка 10 $r = -0,319$, $P \leq 0.05$; 3А-83 $r = -0,698$, $P \geq 0.001$; К-28 $r = -0,789$, $P \geq 0.001$; К-22 $r = -0,405$, $P \geq 0.05$) (табела 12).

Генерално сорта луцерке Зајечарска 83 (просек за три локалитета) показала је највећу клијавост (83 % након 72 h и 61 % након 96 h), међутим нејасно је да ли је то резултат аридних услова који владају у источној Србији (Бољевац, Велики Извор и Минићево) или је то сортна особина.

На другој страни сорта Осјечка 66 показала је најнижу клијавост (61 % након 72 h и 50 % након 96 h). Међутим ариднији услови локалитета Истра у односу на друга два локалитета нису јасно показали већи потенцијал за клијавост код свих испитиваних осјечких сората луцерке (Осјечка 99 након 72 h имала је клијавост 69 % са локалитета Истра, 77 % са локалитета Осјек и 69 % са локалитета Широко Поље; Осјечка 88 имала је клијавост 70 % са локалитета Истра, 70 % са локалитета Осјек I и 56 % са локалитета Осјек II; Осјечка 66 имала је клијавост 63 % са локалитета Истра, 56 % са локалитета Осјек I и 65 % са локалитета Осјек II).

Применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 45 °C и након времена излагања семена у трајању од 24 h ни на једној партији од десет сорта луцерке није било могуће детектовати партије које су биле виталније од других. То нам указује да семе није упило влагу из ваздуха, односно да је био повећан број тврдих семена.

То потврђује и негативна корелациона зависност између клијавости и садржаја воде семена на свим сортама луцерке (Осјечка 99 $r = -0,317$, $P \leq 0.05$; Осјечка 88 $r = -0,595$, $P \geq 0.001$; Осјечка 66 $r = -0,515$, $P \geq 0.001$; Бањалучанка $r = -0,749$, $P \geq 0.001$; НС-Медиана $r = -0,589$, $P \geq 0.001$; НС-Банат $r = -0,489$, $P \geq 0.001$; Чачанка 10 $r = -0,326$, $P \geq 0.05$; Зајечарска 83 $r = -0,599$, $P \geq 0.001$; Крушевачка 28 $r = -0,802$, $P \geq 0.001$; Крушевачка 22 $r = -0,475$, $P \geq 0.001$) (табела 12).

Међутим применом стандардног теста убрзаног старења на температури од 45 °C и након времена излагања семена у трајању од 48 h на свим испитиваним сортама луцерке било је могуће детектовати партије семена које су биле виталније од других (табела 9). Продужење трајања теста старења у времену од 72 h и 96 h при истој температури (45 °C) јасно је показало које сорте, посебно које партије

имају бољи потенцијал за сетву и/или чување семена и коришћење у наредним годинама.

Нешто више времена, у трајању од 72 h било је потребно семену ливадског вијука за детектовање партија које ће дати униформнији усев и које ће успешније моћи да се користе у наредним сетвеним роковима (Stanisavljević et al., 2013).

Информације о униформности клијанаца на врстама крмних легуминоза и крмних трава су од значаја за пројектовано заснивање и одржање у смеси током вишегодишњег периода коришћења.

За разлику од теста убрзаног старења са предходном температуром од 41 °C, при температури од 45 °C дошло је до смањења клијавости при времену излагања у трајању од 48 h у односу на време у трајању од 24 h што је код већине партија било и статистички значајно (Duncan's test; $P \leq 0,01$). Сваки наредни продужетак времена трајања теста убрзаног старења такође је деловао на значајно смањење клијавости у односу на предходно време код партија семена свих сората луцерке (табела 9).

Сорта Зајечарска 83 (просек са три локалитета) је и применом теста са вишим температурама потврдила супериорност у односу на друге сорте што се тиче клијавости (84 %, 70 %, 44 %, након трајања теста у времену од 48 h, 72 h и 96 h). Најнижу клијавост имале су сорте Осјечка 88 и Крушевачка 22 (71 %, 47 % и 36 % односно 71 %, 47 % и 35 % након трајања теста у времену од 48 h, 72 h и 96 h).

Супротно примени теста старења на нижој температури од 41 °C и на вишој температури од 45 °C након времена у трајању од 24 h, све испитиване сорте су испољиле нижу варијабилност за клијавост $CV = 5.18$ %, која се повећавала при дужем трајању теста старења у времену од 48 h $CV = 6.82$ %, 72 h $CV = 17.37$ % и 96 h $CV = 19.31$ %.

Применом стандардног теста убрзаног старења на семену луцерке са две испитиване температуре у трајању од 41 °C и 45 °C, утврђено је да је код сваке испитиване сорте могуће детектовати семе са локалитета – партије које је виталније и које може боље да се чува (Осјечка 99 локалитет Осијек; Осјечка 88 локалитет Истра; Осјечка 66 локалитет Истра; Бањалучанка локалитет Маглајани; НС-Медиана локалитет Вршац; НС-Банат локалитет Тител; Чачанка 10 локалитет

Чачак I; Зајечарска 83 локалитет Велики Извор; Крушевачка 28 локалитет Банатско Карађорђево и Крушевачка 22 локалитет Ратари). Добијени резултати су сагласни са испитивањима примене теста убрзаног старења и детектовања виталнијих партија семена на парадајзу (Demir et al., 2011), кукурузу (Matthews et al., 2011) и тикви (Mavi et al., 2010).

Коефицијенти корелација између клијавости након теста убрзаног старења и клијавости остварене у пољу код многих биљних врста била је у високој корелационој међузависности, као на: пшеници $r = 0.698$ $P \geq 0.01$ (Tomer and Maguire, 1990); кукурузу $r = 0.96$ $P \geq 0.01$ (Singhabumrung and Juntakool, 2004) и соји $r = 0.94$ $P \geq 0.01$ (Torres et al., 2004).

6.2.2. Тест убрзаног старења семена (модификовани метод)

Применом стандардног теста убрзаног старења током оцењивања клијанаца примећено је да је много семена заражено патогенима што је отежавало детектовање разлика између сората и/или партија. Зато је модификовани тест са раствором кухињске соли дао информације које су релевантније али су и у високој корелативној вези са информацијама добијеним стандардним тестом убрзаног старења (Bennett, 2004; Peñaloza et al., 2005; Nyatt and Tekrony, 2008; Lopes et al., 2009).

Код семена до сада испитиваних пољопривредних врста утврђено је да је применом метода са раствором кухињске соли потребно продужити време трајања теста или повећати температуру у односу на стандардни тест убрзаног старења. Односно треба доћи до оптималне комбинације времена трајања теста и температуре на којој се тест изводи. На основу литературних података време и температура се разликују за различите биљне врсте.

У нашим испитивањима на температури од 41 °C у периоду од 24 h, 48 h, 72 h, 96 h и 120 h није дошло до значајних разлика (Duncan's test; $P \geq 0.05$) које би на десет испитиваних сората омогућиле детектовање виталнијих партија семена. Ни период од 24 h до 120 h није омогућило детектовање разлика ни за једну партију семена луцерке (табела 10).

Након теста убрзаног старења варијабилност сората за клијавост била је веома ниска (24 h CV = 1.92 %; 48 h CV = 1.94 %; 72 h CV = 2.32 %; 96 h CV = 2.27 % и 120 h CV = 1.93 %). Добијени резултати упућују да примена теста убрзаног старења на температури од 41 °C и времену трајања до 120 h на семену не може дати релевантне информације о различитој виталности сората и/или партија семена водеће крмне легуминозе на простору југоисточне Европе.

Супротно нашим резултатима у литературним подацима постоје резултати истраживања где је применом теста убрзаног старења у раствору соли и на температури од 41 °C било могуће детектовати виталније сорте и/или партије на дињи (Torres and Marcos Filho, 2003), коријандеру и радичу (Vieira et al., 2013) и парадајзу (Hyatt and Tekrony, 2008). Ове разлике у резултатима истраживања које су другачије у односу на резултате семена луцерке су и очекиване јер је семе луцерке по анатомији, морфологији, хемијском саставу и другим особинама знатно другачије од семена диње, коријандера, радича и парадајза као и многих других пољопривредних биљних врста.

Примена теста убрзаног старења по модификованој методи и на вишој температури (45 °C) са временом трајања од 120 h било је могуће одредити виталније партије семена код свих испитиваних сората луцерке. Клијавост по сортама у зависности од локалитета износила је: Осјечка 99 – 84 %, на локалитету Осијек; Осјечка 88 – 80 %, на локалитету Истра; Осјечка 66 – 81 %, на локалитету Истра; Бањалучанка – 84 %, на локалитету Маглајани; НС-Медиана – 83 %, на локалитету Вршац; НС-Банат – 85%, на локалитету Тител; Чачанка 10 – 76 %, на локалитету Чачак I; Зајечарска 83 – 84 %, на локалитету Велики Извор; Крушевачка 28 – 77 %, на локалитету Банатско Карађорђево; Крушевачка 22 – 78 %, на локалитету Ратари (табела 11).

Клијавост након теста убрзаног старења показала је да су се сорте (просек три локалитета) након испитиваног времена трајања теста веома мало разликовале (24 h CV = 1,64 %; 48 h CV = 0,75 %; 72 h CV = 0,79 % и 96 h CV = 1,38 %) осим најдужега времена које је омогућило и детектовање виталнијих партија (120 h CV = 4,51 %).

Испитивањима је утврђено да је применом адекватног теста убрзаног старења на семену луцерке могуће детектовати виталније семе сората а посебно

партија појединих сората (табеле 8, 9 и 11). Испитивањем је унапређена метода која је адекватна и даје валидне резултате за семе луцерке, а која је потврдила и резултате добијене стандардним тестом убрзаног старења. Резултати о животној способности партија семена луцерке омогућавају доношење правилне одлуке о томе које семе ће задржати дуже клијавост односно које ће моћи да се успешније користи у наредним годинама, сетвеним роковима и/или које ће дати униформнији усев по заснивању.

У условима већих количина падавина у семенској производњи луцерке долази до прорастање усева, који утиче на смањење приноса и лошији квалитет семена (Karagić et al., 2010). Регион југоисточне Европе биће ариднији у наредном периоду, треба очекивати смањење падавина што ће делимично решити прорастање усева и довести до стабилнијих приноса семена. То ће довести и до повећање површина под семенском луцерком у региону западног Балкана. Међутим, ариднији услови могу утицати и неповољно на квалитет семена, на шта указују резултати са севера Грчке (Karamanos et al., 2009).

6.3. Испитивање здравственог стања семена

У зависности од сората, (просек три локалитета-партија) присуство гљиве *Alternaria* spp. на клијанцима је утврђено од 0,17 % код сорте луцерке НС Банат, до 3,58 % код сорте Зајечарска 83. Највећа заступљеност ове гљиве утврђена је на семену сорте Зајечарска 83, са локалитета Велики Извор (6,75 %). Са друге стране, на већини испитиваних локалитета ова гљива није уопште детектована (табела 13).

Гљива *Fusarium* spp. утврђена је на сорти Зајечарска 83 (0,25 %), а на сортама Крушевачка 28, НС-Банат, НС-Медиана, Бањалучанка и Осјечка 88 на клијанцима уопште је није било. Патоген је највише детектован на клијанцима семена сорте Осјечка 99 са локалитета Осјек (1,25 %).

Табела 13. Присуство и варијабилност гљива утврђених на десет различитих сората и партија семена луцерке

Сорта	Локалитет/ партија	Гљиве (%)				
		<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.
К-22	Александрово	0,25 a	0 a	0 a	0 b	0 a
	Ратари	0 a	0,25 a	0 a	0,75 a	0 a
	Осипаоница	0,25 a	0 a	0 a	0,25 b	0 a
Просек за локалитете/партије		0,17	0,08	0	0,33	0
К-28	Бан. Карађорђево	0,25 a	0 a	0 a	0 a	0 a
	Ратари	0 b	0 a	0 a	0 a	0 a
	Ниш	0 b	0 a	0 a	0,25 a	0 a
Просек за локалитете/партије		0,08	0	0	0,08	0
НС-Банат	Тител	0,25 a	0 a	0,75 a	0 b	0 a
	Руско Село	0 b	0 a	0 b	0,5 b	0 a
	Стеријино (Ада)	0,25 a	0 a	0 b	5,25 a	0 a
Просек за локалитете/партије		0,17	0	0,25	1,92	0
НС-Медиана	Вршац	0 b	0 a	0 b	0 b	0 a
	Бачко Градиште I	1,25 a	0 a	0 b	2,5 a	0 a
	Бачко Градиште II	0,5 b	0 a	0,25 a	0 b	0 a
Просек за локалитете/партије		0,58	0	0,08	0,83	0
ЗА-83	Бољевац	2 b	0,25 a	0 a	8 b	0 a
	Велики Извор	6,75 a	0,25 a	0,25 a	15,50 a	0 a
	Минићево	2 b	0,25 a	0 a	2,5 c	0 a
Просек за локалитете/партије		3,58	0,25	0,08	8,67	0
Чачанка 10	Ковин	0,75 b	0 a	0,5 a	0 b	0 a
	Чачак I	0 c	0,25 a	0,5 a	1,25 a	0 a
	Чачак II	2 a	0 a	0 b	1,25 a	0 a
Просек за локалитете/партије		0,92	0,08	0,33	0,83	0
Бањалучанка	Козарска Дубица	0 b	0 a	0 a	2,25 a	0 a
	Бања Лука	0,25 a	0 a	0 a	0 b	0 a
	Маглајани	0,5 b	0 a	0 a	0,5 b	0 a
Просек за локалитете/партије		0,25	0	0	0,92	0
ОС-66	Истра	0,75 a	0 b	0 a	3,75 a	0 b
	Осијек I	0 b	0,5 a	0,25 a	0 b	0 b
	Осијек II	0 b	0 b	0 a	0 b	0 b
Просек за локалитете/партије		0,25	0,17	0,08	1,25	0
ОС-88	Истра	0	0 a	0 b	2,5 a	0 a
	Осијек I	0	0 a	0 b	0 b	0 a
	Осијек II	0,5	0 a	0,5 a	0,5 b	0 a
Просек за локалитете/партије		0,17	0	0,17	1	0
ОС-99	Истра	0,25 c	0 b	0,5 ab	0 c	0 b
	Осијек	4 a	1,25 a	0,25 b	2,75 b	0 b
	Широко Поље	1,25 b	0,5 b	1 a	3,75 a	2,5 a
Просек за локалитете/партије		1,83	0,58	0,58	2,17	0,83

a, b... (мала слова) у колони означавају значајност разлика између вредности у колони (Duncan's test; $P \leq 0.01$)

Клијанци из семена сорте Зајечарска 83 показали су највећу осетљивост према гљиви *Mucor* spp. (8,67 %), где је на истој сорти са локалитета Велики Извор утврђен и максимално детектован проценат гљиве (15,5 %). Најмање присуство гљиве детектовано је на клијацима сората Крушевачка 28 и Крушевачка 22 (0,08 % односно 0,33 %).

За гљиву *Rhizopus* spp. се може констатовати да је најмање била на клијацима луцерке, са обзиром да је пронађен само на сорти Осјечка 99 и то на локалитету Широко Поље (2,50 %). На клијанцима из семена сората са других локалитета није утврђено присуство ове гљиве (табела 13).

Penicillium spp. највише је утврђен на клијанцима сорте Осјечка 99 (0,58 %), а на истој сорти на локалитету Широко Поље детектован је највише (1,0 %), док га на сортама Бањалучанка, Крушевачка 22 и Крушевачка 28 уопште није ни било.

Табела 14. Коефицијенти корелација (r) између клијавости и присутних гљива на семену десет различитих сората луцерке (n=30)

Особина	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.
Клијавост (%)	-0,130 ^{NS}	-0,274 ^{NS}	-0,415*	-0,225	-0,444*
<i>Alternaria</i> spp.	-	-0,280 ^{NS}	-0,420*	-0,230 ^{NS}	-0,433*
<i>Fusarium</i> spp.		-	0,284 ^{NS}	0,248 ^{NS}	0,278 ^{NS}
<i>Penicillium</i> spp.			-	0,026 ^{NS}	0,596***
<i>Mucor</i> spp.				-	0,115 ^{NS}
<i>Rhizopus</i> spp.					-

Ниво значајности: ^{NS} P ≥ 0.05, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001.

Након испитивања клијавости и здравственог стања семена десет различитих сората и партија луцерке коефицијентима простих корелација (r) утврђена је међузависност између испитиваних особина (табела 14).

Детектоване гљиве на семену луцерке су утицале на смањење укупне клијавости на шта указује негативна корелациона међузависност. Значајну (P ≤

0,05) и негативну међузависност са клијавошћу су оствариле гљиве на клијанцима: *Rhizopus* spp. ($r = - 0,444$) и *Penicillium* spp. ($r = - 0,415$), док су негативну међузависност али не и статистички значајну ($P \geq 0,05$) са клијавошћу оствариле гљиве: *Alternaria* spp. ($r = - 0,130$), *Fusarium* spp. ($r = - 0,274$), и *Mucor* spp. ($r = - 0,225$).

Такође значајну ($P \leq 0,05$) и негативну корелацију остварила је *Alternaria* spp. са *Penicillium* spp. ($r = - 0,420$) и са *Rhizopus* spp. ($r = - 0,433$).

Најјача муђузависност ($P \leq 0,001$) и то позитивна остварена је између *Penicillium* spp. и *Rhizopus* spp. ($r=0,596$).

Оцена здравственог стања испитиваног семена луцерке урађена је на основу прегледа клијанаца. После седам дана инкубације, на семенима су биле уочљиве мицелије више врста гљива, али присуство ексудата у виду ситних капи није примећено, тако да је евентуално присуство фитопатогених бактерија искључено. Детерминација присутних гљива извршена је на основу морфолошких одлика, посматрањем под микроскопом.

Након седам дана развоја на семену луцерке различитих сората утврђено је присуство гљива следећих родова: *Mucor* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. и *Fusarium* spp., што је потврђено сазнањима ранијих истраживања. Резултати испитивања присуства врста гљива на семену различитих сората луцерке у значајној су сагласности са подацима других аутора (Крнјаја и сар., 2011).

Ови аутори су поред наведених врста утврдили и присуство представника родова *Cladosporium* spp. и *Stemphylium* spp., што у нашим истраживањима није био случај. Овај резултат би се могао објаснити различитим локалитетима из којих семе потиче, али и старошћу испитиваног семена.

Гљива *Mucor* spp. испољила је највећу заступљеност на семену луцерке. Процент појаве износио је од 5 до 12 %. Међутим, семе луцерке на којима је било запажено присуство ове гљиве клијало је у високом проценту и клијанци су били добро развијени испуњавајући захтеване критеријуме. Иако широко распрострањена, гљива се не сматра економски штетним патогеном. Постоје подаци да неке врсте овог рода могу проузроковати значајније штете на ускладиштеним плодовима јабуке и крушке (Jones and Sutton, 1996).

Приликом анализе здравственог стања семена луцерке утврђено је и присуство гљиве *Alternaria* spp. Семена на којима је утврђено присуство ове гљиве није клијало и меке је конзистенције („труло“). На површини семена се појављује добро развијена, зелено сива мицелија, што је карактеристична одлика представника *Alternaria* spp. На основу структуре изгледа микроскопираних конидија, у питању је врста *Alternaria alternata*, која је такође широко распрострањена у природи, али се не сматра економски штетним патогеном. Веома често је присутна на лишћу зељастих биљака не проузрокујући значајне штете. Често је удружена са другим врстама овог рода (Blagojević i sar., 2013).

На основу резултата истраживања не може се утврдити да ли је ова гљива онемогућила клијање семена или оно није било физиолошки подобно за даљи развој.

Спорадично су се на семену луцерке појављивале и врсте рода *Penicillium* spp. Та семена такође нису клијала, износила су од 1-2 %.

Ова гљива је такође широко распрострањена, али штете углавном наноси на ускладиштеним плодовима воћака (Jones and Sutton, 1996).

Присуство гљиве *Fusarium* spp. такође је утврђено у ниском проценту на испитиваном семену различитих сората и партија луцерке. Заражена семена почињу да клијају, али клијанци врло брзо заустављају развој и “труле”. И у овом случају проценат оболелих клијанаца износио је од 0-2 %.

Од морфолошких одлика гљива *Fusarium* spp. пореклом са луцерке, може се издвојити следеће: мицелија брзо расте при 25 °С, беличасте је боје са пурпурним нијансама, конидије су незнатно савијене до скоро праве са 3-5 попречних преграда, дужине од 20-50 микрометара и ширине 2,5-4 микрометара. Патоген се одржава у земљишту и проузрукује увелост биљака. На семенима крмних трава може се наћи присуство патогена *Fusarium poae* који се такође веома брзо развија при температури од 25 °С, мицелија је бело ружичасте боје, конидије су димензија од 13-56 микрометара дужине са 2-5 попречних преграда. Космополитска је врста у областима умереног и тропског климата (Lević, 2008).

Као паразити семена луцерке потврђене су врсте *F.oxysporum* fsp. *oxysporum* и *F.oxysporum* fsp. *medicaginis* (Krnjaja, 2003, 2005).

Због велике штетности које врсте овог рода могу нанети гајеним биљкама различитих фамилија и родова, присуству овог патогена на семену луцерке треба посветити већу пажњу. Пре свега радити на поузданим методама њене детекције, укључујући и молекуларне методе, али и пратити њен развој и ширење у усевима луцерке. У усеву луцерке *Fusarium* spp. проузрокује њено већење што даљим развојем патогена доводи до сушења читавих биљака (Lević, 2008).

Статистичком обрадом података утврђено је да појачано присуство *Alternaria* spp. на семену луцерке умањује присуство других утврђених гљива. Ова појава се може објаснити изузетном адаптивношћу *Alternaria* spp. на услове средине и она вероватно доминира у конкурентивном односу према другим утврђеним микроорганизмима.

Статистичка анализа је такође показала да је у узорцима са вишим интензитетом појаве *Penicillium* spp. и *Rhizopus* spp. утврђена слабија клијавост семена. Ово би се могло објаснити евентуалним продукцима метаболизма ових гљива који могу деловати токсично на клијанце луцерке.

Резултат да је у понављањима са већим процентуалним присуством *Alternaria* spp. запажено смањење процента *Penicillium* spp., је на основу добијених података тешко објашњиво. Ипак, једна од претпоставки је да конкурентивност врста рода *Alternaria* spp. доминира у односу на метаболичку активност присутне врсте *Penicillium* spp.

Приликом анализе здравственог стања семена луцерке није утврђена статистички значајна разлика између сората у погледу присуства поменутих гљива.

Без обзира на присуство ових гљива, проценат клијавости испитиваних сората луцерке задовољава законске критеријуме, прописане Правилником о здравственом стању семена и садног материјала.

На основу резултата анализе здравственог стања закључено је да утврђене присутне гљиве не утичу значајно на клијавост семена испитиваних сората луцерке у условима “ин витро”.

Најзаступљенији патогени крмних трава и легуминоза у земљишту при ницању су *Phythium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. који паразитирају клијанце, изазивајући њихово изумирање, проређивање усева и

неуједначен пораст биљака. Од наведених патогена семеном се преносе *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. Нашим истраживањима је потврђено да су гљиве из родова *Penicillium* spp. и *Fusarium* spp. присутне на семену различитих сората и партија луцерке.

Поред ових патогена на семену крмних врста се повремено детектује и гљива из рода *Alternaria* spp., али такође у малом проценту (Štrbanović i sar., 2013).

7. ЗАКЉУЧАК

На основу постављених циљева, спроведеног истраживања и добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- На гелу на коме се налазе различите сорте луцерке са прајмером OPB 10, могу се уочити разлике између сората луцерке. Јасно се види да се сорта луцерке Зајечарска 83 која се налази у колони 4 разликује од свих осталих сората луцерке. Такође се уочава постојање заједничких трака од 300 bp код свих сората осим код сорте Зајечарска 83. Сорте Осјечка 99, Осјечка 88 и Осјечка 66 показују висок ниво међусобне сличности, као и сорте Крушевачка 22 и Крушевачка 28.
- На основу резултата добијених молекуларном методом *ISSR* и коришћењем прајмера (GACA)₄ и (TGTC)₄ потврђене су разлике између испитиваних сората луцерке. Овом методом је утврђено да су сорте у великој мери сличне, али да постоје траке које су карактеристичне за сваку од њих.
- Генетичке дистанце између десет проучаваних генотипова луцерке кретале су се у интервалу од 0,097 до 0,310. Најмања генетичка дистанца забележена је између сората НС-Банат и Крушевачка 22 (0,097), као и између сората Крушевачка 22 и Чачанка 10 (0,107), док је највећа генетичка дистанца забележена између сората Зајечарска 83 и Бањалучанка (0,308), као и између сората Зајечарска 83 и НС-Банат (0,310).
- У анализи главних координата прве и друге осе објасниле су укупно 63,1 % генетичке варијабилности садржане у оригиналном сету података. Јасно се може видети да је генотип Зајечарска 83 генетички најудаљенији од осталих проучаваних генотипова луцерке.

- Анализом молекуларне варијансе у укупној варијацији знатно веће варирање било је резултат диференцијације у оквиру група (98,22 %), него диференцијације између група (1,78 %), указујући да посматране географске групе углавном поседују генетички сродан материјал, али и да свака група располаже довољном генетичком варијабилношћу која може бити употребљена у будућим програмима оплемењивања луцерке.
- Применом адекватног теста убрзаног старења на семену луцерке могуће је детектовати виталније семе сората, а посебно партија појединих сората. У погледу применљиво развојних истраживања резултати о животној способности партија семена луцерке омогућавају доношење правилне одлуке о томе које ће партије дуже задржати клијавост и које ће се успешније користити у наредним годинама, односно сетвеним роковима.
- Утврђене гљиве на семену луцерке утицале су на смањење укупне клијавости на шта указује негативна корелациона међузависност. Значајну ($P \leq 0,05$) и негативну међузависност са клијавошћу су оствариле гљиве на клијанцима: *Rhizopus* spp. ($r = - 0,444$) и *Penicillium* spp. ($r = - 0,415$). Такође значајну ($P \leq 0,05$) и негативну корелацију је остварила *Alternaria* spp. са *Penicillium* spp. ($r = - 0,420$) и са *Rhizopus* spp. ($r = - 0,433$). Најјача међузависност ($P \leq 0,001$) и то позитивна је остварена између *Penicillium* spp. и *Rhizopus* spp. ($r=0,596$).
- Ова истраживања су потврдила да проучавана колекција сорти луцерке поседује варијабилност неопходну за успешан селекциони процес. Оплемењивачки материјал поседује пожељне особине за оплемењивање нових сорти и уз избор одговарајућег модела оплемењивања могуће је селекционисање сорти за одређене намене.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abass Farah A. and Abdulla I. Shaheed (2012):** Evaluation of mung bean seed viability after exposing to accelerating ageing conditions. Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences/ No.(1)/ Vol.(22).
- Abdul-Aziz A. Al-Askar, Khalid M. Ghoneem, Younes M. Rashad (2012):** Seed-borne mycoflora of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Riyadh Region of Saudi Arabia. Annals of Microbiology. 62, 273-281.
- Adoyan, A. and Liyv, Y. (1974):** Types of Grass Stands at Intensive Grassland Utilization in the Estonian SSR. Proceedings of the XIII International Grassland Congress Leipzig. page 255-258.
- Ahsyee, R. S. (2013a):** Genetic diversity of red clover determined by morphological traits and SSR molecular markers. Doctoral dissertation. University of Belgrade, Faculty of Agriculture. 1-95.
- Ashyee, R. S., Al-Sloge, O., Čalić, I., Branković, G., Zorić, M., Momirović, U., Vasiljević, S. and Šurlan-Momirović, G. (2013b):** Genetic diversity of alfalfa domesticated varietal populations from Libyan genbank revealed by RAPD markers. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 65 (2). 595-602.
- Ahsyee, R. S., Vasiljević, S., Čalić, I., Zorić, M., Karagić, Đ., Šurlan-Momirović, G. (2014):** Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) using SSR markers. Genetika, Vol. 46, No. 3, 949-961.
- Ariss, J. J., Vandemark, G. J. (2007):** Assessment of genetic diversity among nondormant and semidormant alfalfa populations using sequence related amplified polymorphisms. Crop Sci 47:2274–2284.

- Arnau, G., Lallemand, J. and Bourgoïn, M. (2003):** Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129, 69—79.
- Artola, A., Carillo Castaneda G. (2005):** Accelerated aging time estimation for birdsfoot trefoil seed. *Seed Science & Technology*. 33, 493-497.
- Benharrat, H., Veronesi, C., Theodet, C., Thalouarn, P. (2002):** *Orobanch*e species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* 42, 470–475.
- Bennett, M. A., Grassbaugh, E. M., Evans, A. F., Kleinhenz, M. D. (2004):** Saturated salt accelerated aging (SSAA) and other vigor tests for vegetable seeds. *Seed Technology*, 67-74.
- Beyene, Y., Botha, A. M., Myburg, A. A. (2006):** Genetic diversity among traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by simple sequence repeat (SSR) markers. *Genet Resour Crop Evol* 53(8):1579–1588.
- Blagojević, J., Oro, V., Nikolić, I., Popović, T., Aleksić, G., Gavrilović, V., Ivanović, Ž. (2014):** Morfo-fiziološka proučavanja izolata *Alternaria* spp. poreklom sa celera. *Zaštita bilja*. Vol. 65(1), No 287. 15-26.
- Bowley, S. R. (1997):** Breeding Methods for Forage Legumes. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 25-42.
- Brummer, E. C., Bouton, J. H., Kochert, G. (1993):** Development of an RFLP map in diploid alfalfa. *TAG*, 86, 329-332.
- Brummer, E. C., Bouton, J. H., Kochert, G. (1995):** Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*, 38, 362-367.

- Cavalli-Sforza, L. L., W. F. Bodmer (1971):** The genetics of human populations. W.H. Freeman, San Francisco. XVI+965
- Chatterjee, J., A. K. A. Mandal, S. A. Ranade, J. A. Teixeira da Silva, S. K. Datta, (2006):** Molecular systematics in *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. *Scientia Hort.* 110, 373—378.
- Chen, Y., Nelson, R. L. (2005):** Relationship between Origin and Genetic Diversity in Chinese Soybean Germplasm, *Crop Sci.* 45(4): 1645-1653.
- Chhetri, S. (2009):** Identification of accelerated aging conditions for seed vigor test in rice (*Oryza sativa* L.). D. Thesis, 115 PP.
- Chozin, M. (2007):** Characterization of sorghum accessions and choice of parents for hybridization. *Journal Akta Agrosia Edisi Khusus No. 2* hlm 227-232.
- Cockerham, C. C. (1969):** Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- Cooke, R. J. (1995):** Variety identification: modern techniques and applications. In: Basra SA ed. *Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications.* New York, Food Products Press, 279-318.
- Copeland, L. O. and McDonald, M. B. (1995.):** *Principle of Seed Science and Technology.* Chapman & Hall, New York.
- Čupić, T., Popović, S., Grljušić, S., Tucak, M., Andrić, L., Šimic, B. (2005):** Effect of storage time on alfalfa seed quality. *Journal of Central European Agriculture*, 6, 65-68.
- Dehghan-Shoar, M., Hampton, J. G., Haslett, S. J. (1998):** Identification of, and discrimination among, lucerne (*Medicago sativa* L.) varieties using seed image analysis. *Plant Varieties and Seeds* 11, 107-127.

- Dehghan-Shoar, M., Hampton, J. G., Hill, M. J. (2005):** Identifying and discriminating among lucerne cultivars using morphological characters. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 48, 271-276.
- Demir, I., Celikkol, T., Sarıkamış, G., Eksi, C. (2011):** Vigor tests to estimate seedling emergence potential and longevity in viola seed lots. *HortScience*, 46: 405-405.
- Deshwall RPS, Singh R, Malik K, Randhawa GJ (2005):** Assessment of genetic diversity and genetic relationships among 29 populations of *Azadirachta indica* A. Juss. using RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol* 52:285–292.
- Dice, L. R. (1945):** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Diwan N, Bhagwat AA, Bauchan GR, Cregan PB (1997):** Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40:887–895.
- Djordjević, N., Dinić, B. (2007):** Hrana za životinje. Cenzone tech-Europe, d.o.o., Arandjelovac.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990):** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Ellis, R.H; T.D. Hong & E.H. Roberts (1985.):** Handbook of seed Technologies for Gene Banks. Vol. 1 TBPGR ROME, P.P. 518-537.
- Excoffier, L., P. Smouse, J. Quattro (1992):** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Falconer, D. S. and Mackay, F. C. (1996):** Introduction to Quantitative Genetics.
- Felsenstein, J. (1993):** Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5.
University of Washington, Seattle.
- Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Barre Ph., Huguet Th., Huyghe Ch., Julier B. (2005):** Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theor. Appl. Genet. 111: 1420–1429.
- Frankel, O. H. (1984):** Genetic Perspectives of Germplasm Conservation. U: W. Arber, K. Llimensee, W.J. Peacock, P. Starlinger (ed): Genetic manipulation: Impact on man and society. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 161-170.
- Gallais, A. (2003):** Quantitative genetics and breeding methods in autopolyploid plants.
INRA France.
- Giancola, S. S., M. Poltri, P. Lacaze, H. E. Hopp (2002):** Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. Euphytica, 127:95-113.
- Goulaõ, L., and C. M. Oliveira, 2001:** Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122, 81—89.
- Guo, J., Y. Liu, Y. Wang, J. Chen, Y. Li, H. Huang, L. Qiu, Y. Wang (2012):** Population structure of the wild soybean (*Glycine soja*) in China: implications from microsatellite analyses. Ann. Bot. 110 (4): 777-785.
- Gupta PK and Varshney RK (2000):** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breed-ing with emphasis on bread wheat. Euphytica 113:163-185.

- Habibi, B., Farshadfar, M., Safari, H. (2012):** Evaluation of Genetic Diversity in 18 Genotypes of Alfalfa (*Medicago Sativa*) Using of Molecular ISSR Markers. Intl J Agri Crop Sci. Vol., 4 (21), 1573-1578.
- Hanckok, J. G. (1983):** Seedling diseases of alfalfa in California. Plant Disease 67: 1203-1208.
- Hartl, D. L., A. G. Clark (1997):** Principles of population genetics. 3rd edition, Sunerland, MA: Sinauer Associates.
- Hill, R. R. (1987):** Alfalfa. In Principles of cultivar development, Edited by Crop Science Society of America. Chapter two, 11-39.
- Hyatt, J. E.; Tekrony, D. M. 2008.:** Factors influencing the saturated salt accelerated aging test in tomato and onion. Seed Science and Technology. 36(3): 534-545.
- Ivanov, A. I. (1980):** Lucerna, Kolos, Moskva, 349 s.
- ISTA (2004):** International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association, Switzerland.
- ISTA (2015):** International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association, Switzerland.
- Iwata H, Imon K, Tsumura Y, Ohsawa R (2005):** Genetic diversity among Japanese indigenous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) cultivars as determined from amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers and quantitative agronomic traits. Genome 48:367–37.
- Jones A. L. and Sutton B. T. (1996):** Disease of tree Fruits in the east. Michigan State University. 1-95.

- Julier, B., Porcheron, A., Ecalle, C., Guy, P. (1995):** Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 15, 295-304.
- Julier, B., Barre, P., Hebert, Y., Huguet, T., Huyghe, C. (2003):** Methodology of alfalfa breeding: A review of recent achievements. *Czech J. Genetics and Plant Breeding*, 38,71-81.
- Kandil, A.A, Sharief E.A and Odam, A.M.A. (2012):** Dormancy Overcoming of Some Alfalfa Varieties. *Research Journal of Seed Science*, 5: 19-31.
- Karagić, Đ., Jevtić, G., & Terzić, D. (2010):** Forage legumes seed production in Serbia. *Biotechnology in animal husbandry*, 26, 133-149.
- Karamanos, A., Papastylianou, P., Stavrou, J. & Avgoulas, C., (2009):** Effects of Water Shortage and Air Temperature on Seed Yield and Seed Performance of Lucerne (*Medicago sativa* L.) in a Mediterranean Environment. *J. Agron. & Crop Sci.*, 195: 408-419.
- Krnjaja V., Lević J., Ivanović M., Tomić Z. (2003):** Fusarium species associated with seeds of alfalfa cultivars. *Czech. Genet. Plant Breed.* 39: 275-278.
- Krnjaja V., Lević J., Ivanović M., Tomić Z. (2005):** Virulence of Fusarium species to alfalfa seedlings. *M. Srp. zb. p. n. 108*: 167-171.
- Krnjaja, V., Lević, J., Ivanović, D., Mandić, V., Tomić, Z., Bijelić, Z., Marinkov, G. (2011):** Frequency of Pathogenic Fungi on Alfalfa Seed of Different Age. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 27 (3), p. 1227- 1234.
- Kubik C, Sawkins M, Meyer WA, Gaut BS (2001):** Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci* 41:1565–1572.

- Landjeva, S., Korzun, V., Borner, A. (2007):** Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica*. 156: 271-296.
- Laurentin HE, Karlovsky P (2006):** Genetic relationship and diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *BMC Genet* 7:1–10.
- Lessa, E.P. (1990):** Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology* 39: 242-252.
- Lević J. (2008):** Vrste roda fusarium. Institut za kukuruz, Zemun Polje. 1-1226.
- Лекић, С. (2001):** Утицај температуре на промене показатеља животне способности семена кукуруза. Докторска дисертација, Пољопривредни факултет Земун-Београд.
- Лекић, С. (2003):** Животна способност семена. Друштво семенара и селекционара Републике Србије. Београд.
- Liu, B. H. (1998):** Statistical Genomics. Linkage, mapping and QTL Analysis, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Lugić, Z., Lazarević, D., Erić, P., Mihajlović, V., Vučković, S. (2010):** The state of forage crops production in Serbia. Proceedings of XII international symposium on forage crops of Republic of Serbia, Kruševac, 26-28 May, 29-48.
- Lukić, D., Purar, B. (1996):** Ekonomski značajne bolesti raznih tipova lucerke. *Biljni lekar*, XXIV (4), 334-337.
- Lukić, D. (2000):** Lucerka. Izdavač Naučni Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

- Lopes, R. R., Franke, L. B., Nunes, F. S. (2009):** Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado em sementes de azevém. *Scientia Agrária*, 10, 89-94.
- Marcos Filho J. (2015):** Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, 72(4), 363-374.
- Marković, J., Ignjatović, S., Radović, J., Lugić, Z. (2007):** Uticaj faze razvića na sadržaj makro i mikroelemenata u lucerki i crvenoj detelini. *Zbornik radova, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Vol. 44 (1), 401-406.*
- Matthews S., Beltrami E., El-khadem R., Khajeh-Hosseini M., Nasehzadeh M., Urso G. (2011):** Evidence that time for repair during early germination leads to vigour differences in maize. *Seed Science and Technology*, 39: 501-509.
- Maureira I, Ortega F, Campos H, Osborn T (2004):** Population structure and combining ability of diverse *Medicago sativa* germplasms. *Theor Appl Genet* 109:775–782.
- Mavi K., Demir I., Matthews S. (2010):** Mean germination time estimates the relative emergence of seed lots of three cucurbit crops under stress conditions. *Seed Science and Technology*, 38:14-25.
- McDonald, M. B. (1998):** Seed quality assessment. *Seed Science Research*. 8, 265–275.
- McDonald, M. B. (1999.):** Seed deterioration physiology, repair and assessment. *Seed Sci. and Technol.* 27: 177-237.
- Melton B., Moutray J. B., Bouton J. B. (1988):** Geografic adaptation and cultivar selection. *Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy, USA*, 595-617.

- Michaud, R., Lehman, W. F., Rumbaugh, M.P. (1988):** World distribution and historical development. In Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy, USA. 25-82.
- Mišković, B. (1986):** Krmno bilje. "Naučna knjiga", Beograd.
- Mijatović M. (1960):** Morfološke, biološke i proizvodne osobine populacija lucerke (*Medicago sativa* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni Fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Monte-Corvo, L., L. Goulaõo, and C. Oliveira, 2001:** ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126, 517—522.
- Moretti M., Saracchi M., Farina G. (2004):** Morphological, physiological and genetic diversity within a small population of *Cercospora beticola* Sacc. Ann. Microbiol., 54: 129-150.
- Morgante, M., and Olivieri, A. M. (1993):** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3:175-182.
- Nei, M., Li, W. H. (1979):** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:5269–5273.
- Nelson, R. L. (2011):** Managing self-pollinated germplasm collections to maximize utilization. Plant Gen. Resour.: Characterization and Utilization, 9: 123-132.
- Ofori A, Becker HC, Kopisch-ObuchF J (2008):** Effect of crop improvement on genetic diversity in oilseed Brassica rapa (turnip–rape) cultivars, detected by SSR markers. J Appl Genet 49:207–212.

Osborn, C. T., Brouwer, J. D., Kidwell, K. K., Tavoletti, S., Bingham, E. T. (1998): Molecular marker applications to genetics and breeding of alfalfa. Molecular and cellular technologies for forage improvement. Edit by Crop Science Society of America, 25-31.

Panguluri SK (2007): RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. *Genet Resour Crop Evol* 54:1235–1244.

Peñaloza, P., Ramirez-Rosales, G., McDonald, M. B., & Bennett, M. A. (2005): Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8, 299–307.

Pereira, Maria Francisca Soares (2012): Assessing of the physiological potential of coriander seeds by the accelerated aging test. 93f. Doctoral Thesis (MS in Plant Science) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

Perić, V. (2015): Analiza genetičke divergentnosti genotipova soje na osnovu morfoloških i molekularnih markera. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet. 1-239.

Правилник о квалитету семена пољопривредног биља (1987): Службени лист СФРЈ, број 47/87.

Правилник о здравственом прегледу усева и објеката за производњу семена, расада и садног материјала и здравственом прегледу семена, расада и садног материјала (2007): Службени гласник РС, бр. 119.

- Priolli, R.H.G, P.T. Wysmierski, C.P da Cunha, J.S. Pinheiro, N.A. Vello (2013):** Genetic structure and a selected core set of Brazilian soybean cultivars. Genet. Mol. Biol.36: 382-390.
- Qi, X. H., Yang, J. H., Zhang, M. F. (2008):** AFLP-based genetic diversity assessment among Chinese vegetable mustards (*Brassica juncea* (L.) Czern.). Genet Resour Crop Evol 55:705–711.
- Qiu, Li-J., P.Y. Chen, Z.X Liu, Y.H. Li, R.X. Guan, L.H. Wang, R.Z. Chang (2011):** The worldwide utilization of the Chinese soybean germplasm collection. Plant Genet. Resour. : Characterization and Utilization, 9: 109-122.
- Quiros, C. F. (1979):** Origin of alfalfa cultivars as revealed by closely related diploids, Forage Notes, 24, 18.
- Radović, J. (2005):** Genetička varijabilnost produktivnih svojstava i kvaliteta selekcionisane populacije lucerke (*Medicago sativa* L.). Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Beograd.
- Rojc, M., Kozumplik, V. (1996):** Kukuruz (*Zea mays* L.). Oplemenjivanje Bilja. Poljoprivredni fakultet Osijek i Agronomski fakultet Zagreb, 207-236.
- Rumbaugh M.D., Caddel J.L., Rowe D.E. (1988):** Breeding and quantitative genetics. In Alfalfa and Alfalfa improvement. Published by American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 777-805.
- Sako, Y., M. B., McDonald, K., Fujimura, A. F., Evans, M. A. Bennett, (2001):** A system for automatic seed vigor assessment. Seed Science & Technol. 29: 625-636.
- Sikora, I. (1974):** Procena fenotipskih i genotipskih parametara u Panonskoj lucerni i njihovo korišćenje u procesu oplemenjivanja. Doktorska disertacija, Zagreb.

- Singhabumrung, V. and Juntakool, S. (2004):** Vigour test results for prediction of field emergence for sweet corn. Proceedings of the 42nd Conference, 3-6 February, Kasetsart University Annual, Kasetsart, Thailand, 291-299.
- Sinskaja, E. N. (1950):** Kulturna flora SSSR, Lucerna M. L. t. XIII, s. 3-344.
- Stanford, E. H. and Clement, W. M. (1958):** Cytology and crossing behavior of a haploid alfalfa plant. Agron. J., 50, 10, 589-592.
- Станисављевић, Р. (2006):** Утицај густине усева на принос и квалитет крме и семена лучерке (*Medicago sativa* L.). Докторска дисертација. Пољопривредни Факултет, Универзитет у Новом Саду, 1-127.
- Stanisavljević, R., Milenković, J., Djokić, D., Terzić, D., Petrović, M., Đukanović, L., Dodig, D. (2013):** Drying of meadow fescue seeds of different moisture contents: Changes in dormancy and germination. Plant Soil and Environment. Vol. 59, No. 1: 37-43.
- Stewart CN Jr and Via LE (1993):** A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. BioTechniques 14: 748–758.
- Soranzo, N, Provan, J. & Powel, W. (1999):** An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42, 158–161.
- Štrbac P., Konstatinović B., Klokočar-Šmit Z., Dražić D. (1996):** Zaštita lucherke od štetočina, bolesti i korova. Forum, Novi Sad.
- Štrbanović, R. (2010):** Genetička varijabilnost agronomskih osobina različitih genotipova lucherke (*Medicago sativa* L.). Magistarska teza, Poljoprivredni Fakultet Zemun, Univerz u Beogradu. 1-99.

- Štrbanović R., Gavrilović V., Stanisavljević R., Poštić D., Marković J., Trkulja N., Dolovac N. (2013):** Ispitivanje zdravstvenog stanja različitih genotipova semena lucerke. *Zaštita bilja*. Vol. 64(4), No 286. 212-217.
- Štrbanović, R., Stanisavljević, Đukanović, L., Poštić, D., Marković, J., Đokić, D., Dolovac, N. (2014):** Primena različitih koncentracija *Polyethylene Glycola* i ocena različitih metoda na klijavost semena lucerke. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi*. Vol. 18, br. 5. 229-231.
- Sun, B., C. Fu, C. Yang, Q. Ma, D. Pan, H.Nian (2013):** Genetic Diversity of Wild Soybeans from Some Regions of Southern China Based on SSR and SRAP Markers. *Am. J. Plant Sci.* 4: 257-268.
- Talhinhas, P., J. Neves-Martins, and J. Leitaõ, 2003:** AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breed.* 122, 507—510.
- Tantasawat, P., J. Trongchuen, T. Prajongjai, S. Jenweerawat, W. Chaowiset (2011):** SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. *AJCS* 5(3): 283-290.
- Teklewold, A., Becker, H. C. (2006):** Geographic pattern of genetic diversity among 43 Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun) accessions as revealed by RAPD analysis. *Genet Resour Crop Evol* 53:1173–1185.
- Tiryaki, I., Kizilsimsek, M., & Kaplan, M. (2009):** Rapid and enhanced germination at low temperature of alfalfa and white clover seeds following osmotic priming. *Tropical Grasslands*, 43 (3), 171-177.
- Tomer, R. P. S., and J. D. Maguire (1990):** Seed vigour studies in wheat. *Seed Science and Technology*, 18: 383-392.

- Torres, S. B., & Marcos Filho, J. (2003):** Accelerated aging of melon seeds. *Scientia agrícola*, 60(1), 77-82.
- Torres, R.M., R.D. Vieira and M. Panobianco. (2004):** Accelerated aging and seedling field emergence in soybean. *Scientia Agrícola*. 61(5): 476-480.
- Torres, B. S., Silva F. G., Gomes M. D., Benedito P. K., Pereira F. C., Silva E. C. (2014):** Differentiation of seeds lots of okra by accelerated aging test. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.12, p.2103-2110.
- Truong C, Palme´AE, Felber F, Naciri-Graven Y (2004):** Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa*. *Molecular Ecology Notes* 5:96–98.
- Tucak, M., Popović S., Čupić T., Grljušić S., Bolarić S., Kozumlink V. (2008):** Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. *Periodicum Biologorum*. Vol. 110, No. 3, 243–249.
- Tucak, M., Popović S., Čupić T., Grljušić S., Meglič V., Jurković Z. (2010):** Efficiency of Phenotypic and DNA Markers for a Genetic Diversity Study of Alfalfa. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 46, No. 11, pp. 1314–1319.
- Uysal H, Fu YB, Kurt O, Peterson GW, Diederichsen A, Kusters P (2010):** Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and its wild progenitor pale flax (*Linum bienne* Mill.) as revealed by ISSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 57(7):1109–1119.
- Vance, C. P., Heichel G. H., Phillips D. A. (1988):** Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. In alfalfa and alfalfa improvement. Published by American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 229.257.

- Varshney, R. K., J. M. Ribaut, E. S. Buckler, R. Tuberosa, J. A. Rafalski, and P. Langridge, (2012):** Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nat. Biotechnol.* 30, 1172—1176.
- Veronesi, F., Roselini, D., Albertini, E. (2003):** The use of molecular markers in alfalfa breeding. *Czech J. Genetics and Plant Breeding*, 104-111.
- Vieira, J. F., Villela, F. A., Lucca Filho, O. A., & Campelo, R. S. (2013):** Physiological and Phytosanitary Potentials of Coriander and Radish Seeds. *Journal of Agricultural Science and Technology. A*, 3(2), 126-1130.
- Vučković, S. (1999):** Krmno bilje. Institut za istraživanja u poljoprivredi “Srbija”, Nova Pazova “Bonart”.
- Wang, R. Y., Yu L., Nan Z.B., Liu Y.L. (2004):** Vigor tests used to rank seed lot quality and predict field emergence in four forage species. *Crop Science*, 44: 535–541.
- Wang, Z., Weber JL, Zhang G and Tanksley SD (1994):** Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 88:1-6.
- Wang Z, Kenworthy KE, Wu YQ (2010a):** Genetic diversity of common carpetgrass revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Crop Sci* 50:1366–1374.
- Wang, Z., Wu YQ, Martin DL, Gao HW, Samuels T, Tan CC (2010b):** Identification of vegetatively propagated turf bermudagrass cultivars using simple sequence repeat markers. *Crop Sci* 50:2103–2111.
- Weir, B. S. and Cockerham C. C. (1984):** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Weir, B. S. (1996): Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 445pp.

Xavier, R. J., Kumar, J., Srivastava, R. B. (2011): Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) from trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers. African Journal of Biotechnology. Vol.10(42), pp. 8176-8187.

Yang GS, Wang Y, Sun ChY, Jlang SC, Zhang MP (2010): SSR analysis of genetic diversity of *Panax ginseng*. Med Plant 1(7):50–53.

Yates, J. L., H. R. Boerma, V. A. Fasoula (2012): SSR-Marker Analysis of the intracultivar phenotypic variation discovered within 3 soybean cultivars. J. Hered. 103: 570–578.

Živković, B., Radović, J., Sokolović, D., Šiler, B., Banjanac, T., Štrbanović, R. (2012): Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. Industrial Crops and Products, vol. 40, str. 285-291.

<http://www.ikbks.com/?portfolio=lucerka>

<http://www.ikbks.com/?portfolio=lucerka>

<http://www.nsseme.com/products/?opt=forage&cat=products>

<http://www.nsseme.com/products/?opt=forage&cat=products>

<http://www.afc.kg.ac.rs/index.php/sr/>

<http://www.poljinstrs.org/sr-YU/zavodzakrmnobilje/zkb-sorta/zkb-banjalucanka.html>

<http://www.poljinos.hr/pdf/katalogOKB2012.pdf>

9. БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Ратибор Т. Штрбановић рођен је 06. фебруара 1979. године у Александровцу, где је завршио основну и средњу школу. Уписао је Пољопривредни факултет у Земуну, Универзитет у Београду, смер ратарство. Дипломски рад је одбранио 2005. године са оценом 10 (десет) и просечном оценом 8.22 у току студија. Последипломске студије на групи Генетика и оплемењивање ратарских и повртарских биљака на Пољопривредном факултету у Земуну – Београду уписао је школске 2005/06 године. Од 16. јануара 2006. године је запослен у Институту за крмно биље у Крушевцу. Ради на месту истраживача – приправника из области селекција и оплемењивање вишегодишњих легуминоза.

Магистарску тезу под насловом „Генетичка варијабилност агрономских особина различитих генотипова луцерке (*Medicago sativa* L.)“ је одбранио 16. јула 2010. године на Пољопривредном факултету у Земуну.

Од 01. јануара 2012. године запошљава се у Институт за заштиту биља и животну средину у Београду, где ради као истраживач – сарадник у акредитованој лабораторији за испитивање квалитета семена и садног материјала.

У звање истраживач – сарадник изабран је одлуком Научног већа Института за крмно биље у Крушевцу на 18. седници одржаној 19. новембра 2010. године.

Члан је друштва генетичара и оплемењивача Републике Србије, и друштва селекционера и семенара Републике Србије.

До сада је као аутор или коаутор објавио 45 радова на међународним и националним скуповима и научним часописима. Говори енглески језик.

Мр Ратибор Штрбановић је до сада активно учествовао у пројектима које је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја и Министарство пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ратибор Штрбановић _____

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____ 61206-2149/2-14 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

_____ “Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним
_____ фазама развића биљака” _____

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска 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/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора _____ Ратибор Штрбановић _____

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____ 61206-2149/2-14 _____

Студијски програм _____ Докторске студије по старом програму _____

Наслов докторске дисертације _____ ”Идентификација сората луцерке применом _____

_____ молекуларних маркера у почетним фазама развића биљака” _____

Ментор _____ др Томислав Живановић, редовни професор _____

Потписани/а _____ Ратибор Штрбановић _____

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације 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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Идентификација сората луцерке применом молекуларних маркера у почетним
фазама развића биљака”

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 крају).

Потпис докторанда

У Београду, _____
