



## Primena genetičkih markera u oplemenjivanju višegodišnjih leguminoza

Gordana Šurlan-Momirović · Slobodan Katić · Sanja Vasiljević · Zorica Nikolić ·  
Gordana Branković · Irena Čalić · Dragan Milić · Aleksandar Mikić

primljeno / received: 14.04.2010. prihvaćeno / accepted: 21.05.2010.  
© 2010 IFVC

**Izvod:** Oplemenjivanje višegodišnjih leguminoza za mnoge agronomski značajne osobine kao što su prinos semena, perzistentnost, dugovečnost, otpornost na bolesti i štetočine, otpornost na limitirajuće abiotičke uslove i pojavu poliploidije efikasnije je i preciznije ako se u radu primenjuju i genetički markeri. Polimorfizam genotipova zasnovan na profilima izoenzima može da potceni ukupan nivo genetičke varijanse jer se odnosi na kodirajuće regione DNK koji su bili konzervirani kroz evoluciju da bi se očuvala funkcija enzima. Kompletna pokrivenost genoma može se ostvariti samo primenom pokazatelja molekularne varijabilnosti (DNK polimorfizam) tj. molekularnim markerima. Pored toga, molekularni markeri ne zavise od uslova spoljašnje sredine i mogu se detektovati u svim stadijumima fazama razvika biljaka. Glavni aspekti primene genetičkih markera u oplemenjivanju višegodišnjih leguminoza se odnose na: karakterizaciju germplazme, mapiranje vezanih gena, QTL analizu, selekciju uz pomoć markera (MAS), identifikaciju sorata i zaštitu prava oplemenjivača.

**Cljučne reči:** genetički markeri, oplemenjivanje, višegodišnje leguminoze

### Uvod

Korišćenje molekularno-genetičkih tehnika zajedno sa konvencionalnim oplemenjivanjem povećalo je efikasnost i preciznost oplemenjivanja mnogih poljoprivrednih biljaka (Collard & Mackill 2008).

Trenutno sve komercijalno dostupne sorte višegodišnjih krmnih leguminoza (lucerka, crvena detelina, bela detelina, žuti zvezdan) jesu sintetički, stvoreni putem međukrštanja odabranih roditelja tokom četiri do šest generacija (Woodfield & Brummer 2001). S tim u vezi su metode oplemenjivanja višegodišnjih krmnih leguminoza zasnovane isključivo na metodama selekcije u polusrodstvu, uključujući *intercrossing* odabranih roditelja u cilju proizvodnje sintetičkih sorti (Hill et al. 1988). Prisustvo heterozisa kod krmnih leguminoza dovelo je do značajne diskusije o mogućnostima razvoja hibridnih sorti. Primena hibridnog sistema oplemenjivanja zahteva poboljšanje najmanje dve nezavisne i komplemen-

tarne populacije koje u kombinaciji proizvode heterozis (Sengupta-Gopalan et al. 2007, Katić i sar. 2010). Da bi se postigla hibridna snaga tj. bujnost krmnih leguminoza kao što je lucerka neophodne su nove strategije oplemenjivanja u kojima bi bila naglašena karakterizacija i evaluacija genetičkih resursa, a posebno identifikovanje heterotičnih grupa, koristeći i klasične i molekularne metode (Woodfield & Brummer 2001).

Oplemenjivački rad na višegodišnjim krmnim leguminozama, kako u svetu tako i u Republici Srbiji, započeo je relativno kasno, posle Drugog svetskog rata (Katić et al. 2008) Oplemenjivanje lucerke u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, saglasno postavljenim ciljevima vršilo se u nekoliko ciklusa (Katić i sar. 2002). Za više od 50 godina rada na oplemenjivanju lucerke u Odeljenju za krmno bilje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, stvoreno je 14 sorti lucerke. Aktuelni ciljevi u oplemenjivanju lucerke u Institutu fokusirani su na stvaranje sorti visoke produkcije biomase (zelene krme i sena), namenjenih za različite sisteme iskorišćavanja sa četiri i pet otkosa godišnje, kao i proučavanje dugovečnosti – trajnosti ovih sorti (Katić i sar. 2007). Ispitivanje parametara kvaliteta posebno hranljive vrednosti novih sorti, kao i njihove svarljivosti, novi je pravac rada na parametrima kvaliteta u Institutu.

G. Šurlan-Momirović (✉) · G. Branković · I. Čalić  
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Nemanjina 6, 11080  
Beograd · Zemun, Srbija  
e-mail: surlang@agrif.bg.ac.rs

S. Katić · S. Vasiljević · Z. Nikolić · D. Milić · A. Mikić  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi  
Sad, Srbija

Intenzivniji rad na kolekcionisanju crvene deteline (*Trifolium pretense* L.), druge po značaju višegodišnje krmne leguminoze u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu započeo je pre 20 godina, kako bi se obezbedila što šira genetička varijabilnost, neophodna za početak oplemenjivačkog rada na ovoj biljnoj vrsti (Tomić i sar. 2010). Primenom metoda selekcije u polusrodstvu (masovna selekcija, rekurentna fenotipska selekcija) do sada su stvorene tri sorte: Kolubara, Una i Avala. Osnovni cilj u oplemenjivanju crvene deteline je stvaranje dugovečnih sorti (do tri godine života) koje daju visok prinos kvalitetne krme i koje su tolerantne na ekonomski značajnije bolesti (Vasiljević et al. 2005). Za uspeh u oplemenjivačkom radu osim pravilno odabranih metoda oplemenjivanja (Vasiljević i sar. 2003) veoma je važno sakupiti materijal sa što većom genetičkom varijabilnošću (Vasiljević i sar. 2001). U skorije vreme započeto je izučavanje genetičke varijabilnosti kolekcionisanog materijala crvene deteline posredstvom polimorfizma izoenzima (Nikolić et al. 2010), a saglasno utvrđenoj metodologiji i stečenom iskustvu stranih autora (Yu et al. 2001, Mosjidis & Klingler 2006).

#### Aspekti upotrebe genetičkih markera u oplemenjivanju višegodišnjih leguminoza

##### Karakterizacija germplazme

Proteinski i molekularni markeri mogu da pruže brzu procenu genetičkog diverziteta (Karp et al. 1996, Powell et al. 1996, Mueller & Wolfenbarger 1999). Dobro analizirani genetički resursi višegodišnjih leguminoza, na molekularnom nivou, mogu da unaprede oplemenjivački proces i doprinesu očuvanju i obnovi biodiverziteta.

Polimorfizam genotipova zasnovan na profilima izoenzima može da potceni ukupan nivo genetičke varijanse, jer se odnosi na kodirajuće regione DNK koji su bili konzervirani kroz evoluciju da bi se očuvala funkcija enzima (Gottlieb et al. 1981). Kompletan pokrivenost genoma može da se ostvari samo primenom pokazatelja molekularne varijabilnosti (DNK polimorfizam) tj. molekularnim markerima (Galović et al. 2006). Pored toga, molekularni markeri ne zavise od uslova spoljne sredine i mogu se detektovati u svim stadijumima razvoja biljaka. Tehnike molekularnih markera se ubrzano razvijaju i postoji veliki izbor različitih metoda, koje mogu biti apsolutni pokazatelj distanci, stabilnosti i sličnosti različitih genotipova ako se pravilno primene (Zlokolica et al. 1999).

Tehnike molekularnih markera (RAPD, AFLP, SSR, RFLP) su korišćene za karakterizaciju genetičkog diverziteta i genetičkih odnosa germplazme gajene lucerke i divljih srodnika u cilju identifikacije najrepresentativnijih populacija određenog regiona pružajući mogućnost za eliminaciju genotipova duplikata iz kolekcije germplazme (Brummer et al. 1991, Skinner 2000, Yu & Pauls 1993, Jenczewski et al. 1999, Torricelli et al. 2000, Zacardelli et al. 2003, Kölliker et al. 2003).

**Nasumično umnožena polimorfna DNK (RAPD)** su dominantni markeri koji utvrđuju polimorfizam DNK primenom kratkih arbitrarnih prajmera. Koristi i jedarnu i citoplazmatsku DNK kao templet za umnožavanje. Korisni su za istraživanja koja uključuju veliki broj polimorfnih lokusa kao što su mape vezanosti, ka i za pozicioniranje gena (Michelmores et al. 1992).

RAPD markeri su korišćeni za utvrđivanje nivoa genetičke varijabilnosti i genetičke sličnosti 16 elitnih roditelja crvene deteline organizovanih u četiri podgrupe od po četiri roditelja (Campos de Quiroz & Ortega Klose 2001), a niže vrednosti polimorfnih lokusa i prosečne heterozigotnosti utvrđene su u podgrupi roditelja selekcionisanih za otpornost na nematode stabljike.

Grupni uzorci 20 jedinki po sorti *Trifolium pratense* koriste se kada se žele dobiti RAPD profili sa uklonjenom intrasortnom varijansom (Kongkiatngam et al. 1996), 7 jedinki za *Medicago sativa* (Yu & Pauls, 1993), 30 jedinki za *Lolium perenne* (Sweeney & Danneberger 1994). Kongkiatngam et al. (1996) su preporučili da se koriste klijanci crvene deteline umesto listova za DNK ekstrakciju grupnih uzoraka jer je potrebna mala količina DNK za test. Utvrđeno je da manji broj RAPD markera pokazuje kodominantnost i u slučaju da se to zanemari svaka traka markera se označava kao različiti lokus umesto kao različiti aleli istog lokusa, što može dovesti do precenivanja broja polimorfnih lokusa i potcenjivanja prosečnog broja alela po lokusu (Kongkiatngam et al. 1995).

**Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (AFLP)** su dominantni markeri kao i RAPD ali su tehnički bolji u sposobnosti da razlikuju homozigote od heterozigota, kao i da detektuju veliki broj lokusa u pojedinačnom testu. Koriste se za svrhe QTL analize na osnovu genetičkih mapa vezanih gena i dobre rezultate su pokazali kod crvene deteline za mogućnost primene selekcije uz pomoć markera (MAS) za perzistentnost (Herrman et al. 2007).

**Umnoženi jednostavni ponovci (SSR)** čine kratke tandemske ponovljene sekvence od 1-6 bp. Polimorfizam je zasnovan na broju

ponovaka odnosno ukupnoj dužini sekvence. Predstavljaju kodominantne markere i imaju primenu kod višegodišnjih leguminoza za proučavanje genetičkog diverziteta, QTL mapiranje i sortnu identifikaciju.

**Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (RFLP)** su kodominantni markeri koji se detektuju preko elektroforeze i radioaktivnih proba (*Southern blotting* tehnike). Prikadni su za proučavanje genetičke varijabilnosti hloroplastne DNK (Milligan 1991). Nedostaci vezani za primenu ovih markera su dugotrajnost, povećani troškovi i slaba dostupnost specifičnih proba. Kod crvene deteline je utvrđen visok nivo genetičke varijabilnosti hloroplastne DNK (Milligan 1991) na populacionom nivou primenom RFLP. Ulloa et al. (2003) su proučavali genetički diverzitet 12 čileanskih populacija crvene deteline i osam sorata poreklom iz Čilea, Argentine, Urugvaja i Švajcarske radi utvrđivanja genetičke srodnosti. Herrmann et al. (2005) su sproveli obimno istraživanje genetičkog diverziteta 120 populacija crvene deteline (švajcarskih divljih populacija, švajcarskih ekotipova, "Mattenklee" sorata, "Mattenklee" ekotipova, holandskih divljih populacija i holandskih ekotipova).

Određivanje genetičke divergentnosti, odnosno sličnosti veoma je značajno, kako zbog ispitivanja potencijala za heterozis roditeljskih parova, tako i zbog mogućnosti utvrđivanja inbriding depresije u toku selekcije. Identifikacija heterotičnih grupa je, nažalost, bila gotovo bez pažnje kod krmnih leguminoza. Kidwell et al. (1994) su pokazali da se *M. sativa* subsp. *falcata* i u manjoj meri peruanska germplazma genetički razlikuju u odnosu na subsp. *sativa* pul germplazmu. Riday & Brummer (1999) su potvrdili da *sativa* x *falcata* interpopulacioni hibridi imaju bolje performanse u odnosu na oba unutar populaciona ukrštanja, dok su Ray et al. (1999) izvestili o postojanju heterozisa između nedormantnih i dormantnih izvora germplazme lucerke. Takođe, *M. sativa* subsp. *falcata* je identifikovana kao podvrsta koja pokazuje heterozis u ukrštanjima sa elitnim *M. sativa* subsp. *sativa* oplemenjivačkim materijalom (Riday & Brummer 2002a, Riday & Brummer 2002b; Riday et al. 2002, Riday et al. 2003).

Ispitivanja Kidwell et al. (1999) i Riday et al. (2003) su interesantni primeri korišćenja molekularnih markera u proceni genetičke distance između roditelja, što bi moglo biti važno pri odabiru adekvatnih roditeljskih genotipova pri stvaranju novih sorti. Kidwell et al. (1999) su stvorili sintetičke populacije korišćenjem različitog broja roditelja primenjujući RFLP markere u proceni genetičkih razlika između roditelja. Međutim,

potomstva iz ukrštanja genetički različitih roditelja nisu dosledno imala viši prinos u odnosu na potomstva iz ukrštanja genetički sličnih roditelja. Mogući razlozi su ravnoteža vezanih gena u roditeljskoj populaciji ili nemogućnost da se pomoću korišćenih markera identifikuju regioni genoma koji utiču na prinos. Riday et al. (2003) su kod jednostrukih hibrida *sativa-sativa*, *sativa-falcata* i *falcata-falcata* proučavali heterozis za prinos krme. Procena genetičke udaljenosti između genoma *M. sativa* i *M. falcata* rađena je uz pomoć AFLP i SSR markera, a pošto nije pronađena značajna korelacija između genetičke udaljenosti sa heterozisom i specifičnih kombinacionih sposobnosti, zaključeno je da neutralni i random molekularni markeri nisu dobri za predviđanje heterozisa kod lucerke.

Osim za procenu heterozisa, molekularni markeri su korišćeni i u procenama inbridinga. Mada se dobijanje inbred linija kod lucerke smatra zbog velike inbriding depresije, u takvim eksperimentima molekularni markeri mogu biti korisni jer omogućavaju da se direktno proceni progresija homo/heterozigotnosti na genomskom nivou. U tom smislu su Brouwer & Osborn (1997) koristili RFLP markere kod diploidne lucerke, a Scotti et al. (2000) kod tetraploidne lucerke.

Mapiranje vezanih gena, QTL analiza i selekcija uz pomoć markera (MAS)

Među krmnim leguminozama, mapiranje genoma je najnaprednije kod lucerke (Woodfield & Brummer 2001). Genetičke mape - mape vezanosti gena lucerke dobijene su na osnovu gotovo svih raspoloživih molekularnih markera. Različite grupe istraživača su se bavile genetičkim mapiranjem kod lucerke, a većina genetičkih mapa lucerke su konstruisane kod diploida (Kiss et al. 1993, Echt et al. 1994, Tavoletti et al. 1996, Diwan et al. 1997, Diwan et al. 2000, Kaló et al. 2000, Porcedu et al. 2002). Međutim neke istraživačke grupe su se odlučile da vrše mapiranje tetraploida lucerke (Yu & Pauls 1993, Brouwer & Osborn 1999, Ma et al. 2002, Sledge et al. 2004).

*M. truncatula* je međunarodno priznata model vrsta, ne samo za blisko gajenu *M. sativa*, već i za familiju mahunarki, zbog njenih povoljnih osobina kao što su diploidan broj hromozoma ( $2n = 2x = 16$ ), mala veličina genoma, autogamija i pogodnost za genetičke transformacije (Veronesi et al. 2003). Geni iz *M. truncatula* imaju visok stepen identičnosti sekvenci sa genima lucerke tako da je *M. truncatula* odličan genetički model za lucerke. Dostupnost *M. truncatula* mikronizova (Tessaie et al. 2006) i proteinskih podataka

(Lei et al. 2005) doprineli su identifikaciji agromski značajnih gena.

Konsenzus mapu vezanih gena kod crvene deteline sačinili su Isobe et al. (2009), koja je prva takva mapa za stranooplodnu vrstu krmnog bilja. Stvorena je na osnovu šest mapirajućih populacija, ukupne dužine 836,6 cM sa 1804 lokusa markera i prosečnom distancom dva susedna lokusa od 0,46 cM. Za prinos semena po biljci kod crvene deteline, svojstvo koje je inače teško poboljšati fenotipskom selekcijom, utvrđena su 3 QTL na tri različite grupe vezanih gena koji su objasnili 33,8% ukupne fenotipske varijanse (Herrmann et al. 2006). Izračunati proseci ocena vigora kroz dve zimske i tri uzgojne sezone su utvrđeni kao optimalan metod za prikazivanje perzistentnosti i utvrđen je značajan QTL za ovo svojstvo, koji je objasnio 12,2% ukupne fenotipske varijanse (Herrmann et al. 2008). Markeri povezani sa utvrđenim QTL kod crvene deteline omogućice selekciju uz pomoć markera (MAS) za ova dva važna svojstva.

Jedan od najvažnijih segmenata oplemenjivačkog rada jeste odabiranje biljaka u generacijama razdvajanja svojstava, kojim se izdvajaju potomstva sa odgovarajućom kombinacijom gena. Selekcija uz pomoć markera (MAS - Marker Assisted Selection) može imati dosta prednosti u odnosu na konvencionalne metode oplemenjivanja.

Marker asistirana selekcija (MAS) se zasniva na identifikaciji markera za gene od interesa ili markera koji su blisko vezani sa genima od interesa, a koji se mogu koristiti da se indirektno selektuju osobine čija je procena teška ili skupa (Woodfield & Brummer 2001). Kada se markeri jednom blisko povežu sa genima, odnosno kada se identifikuju QTL markeri za svojstva na koja se vrši selekcija, umesto poljskog ispitivanja velikog broja biljaka oplemenjivači mogu koristiti specifične markere kao dijagnostičko sredstvo za odabiranje jedinki koje su nosioci poželjnih alela (Deletić 2009).

MAS selekcija se primenjuje na genotipskom nivou korišćenjem DNK markera koji su blisko vezani za gene koji determinišu kvalitativna ili kvantitativna svojstva i koji se nasleđuju na isti način kao i geni od interesa. Selekcija uz pomoć markera je naročito korisna za svojstva koja je dugotrajno i teško oceniti fenotipski na polju, kao što su perzistentnost i otpornost na niske temperature. Selekcija uz pomoć markera može da poveća efikasnost oplemenjivanja višegodišnjih leguminoza omogućujući preciznije unošenje specifičnih gena.

Saturisane mape vezanih gena mogu biti veoma korisne u oplemenjivanju višegodišnjih le-

guminoza radi utvrđivanja target gena od agromskog značaja, za primenu selekcije uz pomoć markera i za proučavanje heterozigotnosti i inbreeding depresije.

Iako se MAS primenjuje kod mnogih kultura (Young 1999), stvarna korist od te tehnologije može biti najviše uspešno realizovana kod višegodišnjih krmnih kultura, gde svaki ciklus selekcije traje nekoliko godina. Na primer, selekcija na otpornost na niske temperature kod lucerke traje tri do pet godina. MAS pristup može značajno da smanji vreme ciklusa, ako bi markeri koji su u vezi sa preživljavanjem tokom zime mogli biti identifikovani (Woodfield & Brummer 2001). Tako su Brouwer et al. (2000) uspeli da pronađu nezavisne regione genoma koji kontrolišu otpornost na niske temperature i dormantnost kod tetraploidne lucerke. Oni su predložili mogućnost korišćenja MAS za poboljšanje otpornosti na niske temperature, a bez povećanja dormantnosti.

Tu su i drugi pokušaji identifikovanja gena lucerke korišćenjem različitih markera. Barcaccia et al. (2000) su pomoću RAPD, ISSR i AFLP markera identifikovali jednu grupu vezanih gena koji deluju na formiranje  $2n$  jajnih ćelija kod jednog diploidnog mutanta *Medicago falcata* označenog kao PG-F9. Tavoletti et al. (2000) su proučavali osobinu džambo polena na diploidnom mejotičkom mutanatu koji proizvodi  $2n$  polen i s tim u vezi uspešno su locirali *džp* gen koji determiniše proizvodnju neredukovanih gameta. Obert et al. (2000) su pronašli dva AFLP markera značajno povezana sa otpornošću na plamenjaču. Sledge et al. (2002) su proučavali toleranciju na aluminijum (Al) i identifikovali i potvrdili postojanje QTL za to svojstvo kod diploidne *M. coerulea*. Utvrđeno je da su dva RFLP markera povezana sa Al tolerancijom kod ukrštanja između tolerantnih i osetljivih biljaka *M. coerulea*, a predlaže se kao podesno korišćenje ta dva RFLP markera za QTL analizu kod tetraploide lucerke. Endre et al. (2002) su primenili mapu molekularnih markera razvijenu na diploidnom nivou za pozicioniranje gena odgovornih za fenotip koji nije u mogućnosti da obrazuje kvržice na korenu tetraploidne lucerke.

Identifikacija sorata i zaštita prava oplemenjivača

Da bi se novostvorena sorta stavila na nacionalne i internacionalne liste sorata, potrebno je da se testira DUS (Distinctness Uniformity Stability) testovima, kako bi se utvrdilo da li se razlikuje od već priznatih, što je osnova zaštite intelektualnih prava oplemenjivača (PBR). Genetički, a posebno molekularni markeri postaju sastavni deo

ovih testiranja, pored morfoloških i biohemijskih metoda, u cilju utvrđivanje pouzdanih genetičkih profila (*fingerprinting*). Identifikacija i kvantifikacija genetičke sličnosti varijeteta višegodišnjih leguminoza je teška zbog velike varijabilnosti jedinki u genetički heterogenim populacijama.

Proučavajući proteinski polimorfizam domaćih sorti crvene deteline u poređenju sa sortama iz zapadne i severne Evrope koje se koriste kao standardni u procesu registracije i zaštite sorti poljoprivrednog bilja prema protokolu UPOV organizacije, pomoći multivarijacione analize posebno se izdvaja podgrupa koja obuhvata NS sorte crvene deteline, što ukazuje na originalnost i autentičnost domaćeg sortimenta, kako u odnosu na morfološko-biološke pokazatelje (Vasiljević i sar. 2006) tako i u odnosu na proteinski polimorfizam (Nikolic et al. 2010).

## Zaključak

U budućem oplemenjivačkom radu na višegodišnjim krmnim leguminozama u našoj zemlji, saglasno savremenim svetskim trendovima, očekuje se veća primena genetičkih a naročito molekularnih markera, prevashodno kao pomoć u oplemenjivanju (marker asistirana selekcija), kao i za analizu genetičke divergentnosti roditelja i tipiziranju varijeteta. Ipak, uprkos mnogim istraživanjima koja koriste molekularne markere, ni jedna sorta lucerke do sada nije stvorena korišćenjem molekularnih markera.

DNK sekvence većine gena za agronomski važne osobine raznih kulturnih biljaka nisu poznate i verovatno će tako ostati neko vreme. Dalja dostupnost obilja informacija o sekvencama olakšaće razvoj velikog broja markera koji bi se mogli dovesti u vezu upravo sa onim regionima genoma koji su bogati genima.

U međuvremenu, naučnicima preostaje dalje korišćenje i usavršavanje QTL mapa i markera. Očekuje se da će dalji razvoj genskih mapa visoke rezolucije omogućiti izolaciju stvarnih gena umesto njihovih mapa, a poznavanje DNK sekvenci gena će omogućiti dizajniranje "savršenih" markera koji bi bili integralni delovi samih gena.

## Literatura

Armstead I P, Turner L B, Farrell M, Skot L, Gomez P, Montoya T, Donnison I S, King I, Humphreys M O (2004): Synteny between a major heading-date QTL in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and the Hd-3 heading-date locus in rice. *Theor. Appl. Genet.* 108: 822-828

Barcaccia G, Albertini E, Rosellini D, Tavoletti S, Falcinelli M, Veronesi F (1999): Inheritance and mapping of 2n egg production in diploid alfalfa. *Genome* 43: 528-537

Boller B, Schubiger F X, Kölliker R (2010): Red Clover. In: B. Boller et al. (eds), *Fodder crops and amenity grasses* 5: 439-455

Brouwer D J, Osborn T C (1997): Molecular marker analysis of the approach to homozygosity by selfing in diploid alfalfa. *Crop Sci.* 37: 1326-1330

Brouwer D J, Osborn T C (1999): A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99: 1194-1200

Brouwer D J, Duke S H, Osborn T C (2000): Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth and freezing injury in autotetraploid alfalfa. *Crop Sci.* 40: 1387-1396

Brunner E C, Kochert G, Bouton J H (1991): RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 83: 89-96

Collard B C Y, Mackill D J (2008): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos. Trans. R.Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363: 557-572

Deletić R N (2009): Uvod u molekularnu genetiku. Poljoprivredni fakultet, Kosovska Mitrovica – Zubin potok, (izd.) Milinko Milenković 214-225

Diwan N, Bagwat A A, Baughan G R, Cregan P B (1997): Simple sequence repeat (SSR): markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40: 887-895

Diwan N, Bouton J H, Kochert G, Cregan P B (2000): Mapping of simple sequence repeat (SSR). DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 101: 165-172

Echt C S, Kidwell K K, Osborn T C, Knapp S J, Mc-Coy T J (1994): Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37: 61-71

Endre G, Kaló P, Kevei Z, Kiss P, Mihacea S, Szakal B, Kereszt A, Kiss GB (2002): Genetic mapping of the non-nodulation phenotype of the mutant MN-1008 in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Mol. Gen. Genom.* 266: 1012-1019

Galović V, Drinić-Mladenović S, Navalusić J, Zlokolica M (2006): Characterization methods and fingerprinting of agronomically important crop species. *Genet.* 38: 83-97

Gottlieb L D (1981): Gene numbers in species of *Asteraceae* that have different chromosome numbers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3726-3729

Hayward M D, Breese E L (1993): Population structure and variability. In: Hayward M D et al. (eds.), *Plant Breeding: Principles and Prospects*, Chapman & Hall, London, 17-29

Herrmann D, Boller B, Widmer F, Kölliker R (2005): Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. *Genome* 48: 474-486

Herrmann D, Boller B, Studer B, Widmer F, Kölliker R (2006): QTL analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112: 536-545

Herrmann D, Boller B, Studer B, Widmer F, Kölliker R (2007): Genetic characterization of persistence in red clover (*Trifolium pratense* L.). Proceedings of the XXVIIth Eucarpia symposium on improvement of fodder crops and amenity grasses, August 19-23, 2007, Copenhagen, Denmark

Herrmann D, Boller B, Studer B, Widmer F, Kölliker R (2008): Improving persistence in red clover: Insights from QTL analysis and comparative phenotypic evaluation. *Crop Sci.* 48: 269-277

Hill R R, Shenk J S, Barnes R F (1988) Breeding for yield and quality. In: Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement* (Agron. Monogr. 29) American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, Madison, 809-825

Isobe S, Klimenko I, Ivashuta S, Gau M, Kozlov N N (2003): First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 108: 105-112

- Jenczewski E, Proserpi J M, Ronfort J (1999): Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Mol. Ecol.* 8: 1317-1330
- Jones E S, Mahoney N L, Hayward M D, Armstead I P, Jones J G, Humphreys M O, King I P, Kishida T, Yamada T, Balfourier F, Charmet C, Forster J W (2002): An enhanced molecular marker-based map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae species. *Genome* 5: 282-295
- Julier B, Guines F, Hackett C, Huguet T, Huyghe C (2002): Genetic mapping and identification of QTL for stem morphogenesis in tetraploid alfalfa. In: Rep. 38th North American Alfalfa Improvement Conf. Sacramento, CA, July 27-30, 25
- Kaló P, Endre G, Zimányi L, Csanádi G, Kiss GB (2000): Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 641-657
- Katić S, Lukić D, Đukić D (2002): Morfološke osobine, prinosi i hranljiva vrednost lucerke. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 36: 103-114
- Katić S, Mihailović V, Milić D, Vasiljević S, Karagić Đ (2007): Uticaj učestalosti košenja na prinosi i trajnost polusrodnih populacija lucerke. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 44: 21-27
- Katić S, Vasiljević S, Lugić Z, Radović J, Milić D (2008): Previous and future directions of perennial legumes selection in Serbia. *Proceedings of the International Conference: Conventional and Molecular Breeding of Field and Vegetable Crops*, 24-27 November, Novi Sad, Serbia, 557-563
- Katić S, Milić D, Mihailović V, Vasiljević S, Karagić Đ (2010): Efekti heterozisa za prinosi i komponente prinosa dobijen ukrštanjem divergentnih populacija lucerke. *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.* 47: 203-208
- Karp A, Seberg O, Buiatti M. (1996): Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 143-149
- Kidwell K K, Austin D F, Osborn T C (1994) RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources of North American alfalfa cultivars. *Crop Sci.* 34: 230-236
- Kidwell K K, Hartweck L M, Yandell B S, Crump P M, Brummer J E, Moutray J, Osborn T C (1999): Forage yields of alfalfa populations derived from parents selected on the basis of molecular marker diversity. *Crop Sci.* 39: 223-227
- King J, Armstead I P, Donnison I S, Thomas H M, Jones R N, Kearsey M J, Roberts L, Thomas A, King I (2002): Introgression mapping in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Plant Alien Introgression Workshop W241*, PAG X, San Diego, California, USA
- Kiss G B, Csanadi G, Kalman K, Kaló P, Okresz L (1993): Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Gen.* 90: 1119-1127
- Kölliker R, Herrmann D, Boller B, Widmer F (2003): Swiss Mattenkleef landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 306-315
- Kongkiatngam P, Waterway M J, Coulman B E, Fortin M G (1996): Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica* 89: 355-362
- Lei Z, Elmer A M, Watson B S, Dixon R A, Mendes P J, Sumner L W (2005): A two dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 proteins from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Mol. Cell. Proteomics.* 4: 1812-1825
- Ma C, Casella G, Shen Z, Osborn T C, Wu R (2002): A unified framework for mapping quantitative trait loci in bivalent tetraploids using single-dose restriction fragments: A case study from alfalfa. *Genome Res.* 12: 1974-1981
- McKenzie J S, Paquin R, Duke S H (1988) Cold and heat tolerance. In: Hanson A A et al. (eds), *Alfalfa and alfalfa improvement*. (Agron Monogr 29) American Society of Agronomy/ Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, Madison, 259-302
- Michelmore R W, Paran I, Kessel R V (1992): Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828-9832
- Milligan B G (1991): Chloroplast DNA diversity within and among populations of *Trifolium pratense*. *Curr. Genet.* 19: 411-416
- Moore G A, Collins G B (1983): New challenges confronting plant breeders. In: Tanksley S D & Orton T J (eds), *Isozymes in Plant Breeding and Genetics, (Part A)*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands, 25-58
- Moreno-Gonzales J, Cubero J L (1993): Selection strategies and choice of breeding materials. In: Hayward M D et al. (Eds), *Plant Breeding: Principles and prospects*, Chapman & Hall, London, 281-313
- Mosjidis J A, Klingler K A (2006): Genetic diversity in the core subset of the U.S. Red Clover Germplasm. *Crop Sci.* 46: 758-762
- Mueller U G, Wolfenbarger L L (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389-394
- Nikolić Z, Vasiljević S, Karagić Đ, Vujaković M, Jovičić D, Katić S, Šurlan-Momirović G (2010): Genetic diversity of red clover cultivars (*Trifolium pratense* L.) based on protein polymorphism (in press, *Genet.* 42)
- Obert D E, Skinner D Z, Stuteville D L (2000): Association of AFLP markers with downy mildew resistance in autotetraploid alfalfa. *Mol. Breed.* 6: 287-294
- Powell W, Mogante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Marconi G, Bertoli F B, Veronesi F (2002): Development of an S-SAP technique based on a LTR-like sequence of *Medicago sativa* L. *Mol. Gen. Genom.* 267: 107-114
- Ray I M, Segovia-Lerma A, Murray L W, Townsend M S (1999) Heterosis and AFLP marker diversity among nine alfalfa germplasms. In: Bingham E (ed), *The Alfalfa Genome*. CSSA, Madison, WI
- Riday H, Brummer E C (1999) Heterosis in alfalfa: *Medicago sativa* subsp. *sativa* x subsp. *falcata*. In: Bingham ET (ed.) *The Alfalfa Genome*. CSSA, Madison, WI
- Riday H, Brummer E C (2002a) Forage yield heterosis in alfalfa. *Crop Sci.* 42: 716-723
- Riday H, Brummer E C (2002b) Heterosis of agronomic traits in alfalfa. *Crop Sci.* 42: 1081-1087
- Riday H, Brummer E C, Moore K J (2002) Heterosis of forage quality in alfalfa. *Crop Sci.* 42: 1088-1093
- Riday H, Brummer E C, Campbell T A, Luth D E, Cazcarro P M (2003): Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*. *Euphytica* 131: 37-45
- Roderick H W, Thorogood D, Adomako B (2000): Temperature-dependent resistance to crown rust infection in perennial ryegrass, *Lolium perenne*. *Plant Breed.* 119: 93-95
- Roderick H W, Humphreys M O, Turner L B, Armstead I P, Thorogood D (2003): Isolate specific trait loci for resistance to crown rust in perennial ryegrass. In: Posselt U K, Greef J M (eds): 24th EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Meeting, FAL, Braunschweig, Germany. *Vortr. Pfl.-Zucht.* 59: 244-247

- Scotti C, Pupilli F, Salvi S, Arcioni S (2000): Variation in vigour and in RFLP-estimated heterozygosity by selfing tetraploid alfalfa: new perspectives for the use of selfing in alfalfa breeding. *Theor. Appl. Genet.* 101: 120-125
- Sengupta-Gopalan C, Bagga S, Potenza C, Ortega J L (2007): Alfalfa. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 61 *Transgenic Crops VI* (ed. by E.C. Pua and M.R. Davey). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 321-335
- Skinner D Z (2000): Non random chloroplast DNA hypervariability in *Medicago sativa*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1242-1249
- Sledge M K, Bouton J H, Dall' Agnoli M, Parrott W A, Kochert G (2002): Identification and confirmation of aluminium tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *Coerulea*. *Crop Sci.* 42: 1121-1128
- Sledge M, Ray I, Rouf Mian M A (2004): EST-SSRs for genetic mapping in alfalfa. In: Hopkins A et al. (eds) *Molecular breeding of forage and turf*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 239-243
- Sweeney P M, Danneberger T K (1994): Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: A comparison of bulk sample vs. individuals. *HortSci.* 29: 624-626
- Tavoletti S, Veronesi F, Osborn T C (1996): RFLP linkage map in an alfalfa diploid mutant based on F1 populations. *J Hered.* 87: 167-170
- Tavoletti S, Pesaresi P, Barcaccia G, Albertini E, Veronesi F (2000): Mapping the *jp* (jumbo pollen) gene and QTLs involved in multinucleate microspore formation in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 10: 372-378
- Tesfaye M, Silverstein K A T, Bucciarelli B, Samac D, Vance C P (2006): The affymetrics *Medicago* genechip array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Funct. Plant Biol.* 33: 783-788
- Thorogood D, Laroche S (2001): QTL analysis of chlorophyll retention during leaf senescence in perennial ryegrass. *Plant Breeding: Sustaining the Future. Abstr. 16th EUCARPIA Congr.*, Edinburgh, Scotland, 12
- Tomić Z, Sokolović D, Lugić Z, Radović J, Vasiljević S, Milić D, Mikić A (2009): Genetički resursi krmnog bilja u Srbiji. SANU, Naučni skupovi, Knjiga CXXVII, Odeljenje hemijskih i bioloških nauka 3: 35-46
- Torricelli R, Negri V, Silveri D D, Veronesi F (2000): Collection, evaluation and conservation of forage legumes in Abruzzo (Italy). In: Maggioni L, Marum P, Sackville Hamilton NR, Hulden M, Limpan E (comp.): *Report of a Working group on Forages. Proc. 7th Meet.*, Elvas, Portugal, 18-20 Nov. 1999. IPGRI, Rome, Italy, 170-175
- Ulloa O, Ortega F, Campos H (2003): Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome* 46: 529-535
- Vasiljević S, Šurlan-Momirović G, Lukić D, Mihailović V, Katić S (2001): Iskorišćavanje genetičkog biodiverziteta kolekcionisanih genotipova crvene deteline u Naučnom institutu za ratarstvo i povrtarstvo – Novi Sad. *Zbornik radova 1. Međunarodnog simpozijuma »HRANA U 21. VEKU«*, 14-17 novembar 2001, Subotica, 167-172
- Vasiljević S, Šurlan-Momirović G, Lukić D, Živanović T, Katić S, Mihailović V, Milić D, Mikić A (2003): Efikasnost različitih metoda selekcije u oplemenjivanju crvene deteline (*Trifolium pratense* L.). *Sel. Semen.* 9: 77-85
- Vasiljević S, Pataki I, Šurlan-Momirović G, Živanović T (2005): Production potential and persistence of red clover varieties. *Grassland Sci. Eur.* 10: 577-580
- Vasiljević S, Mikić A, Mihailović V, Katić S, Lugić Z, Šurlan Momirović G, Živanović T, Milić D, Pataki I (2006): Osobine domaćih sorti crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) prema protokolu UPOV-a. *Trećeg simpozijuma Sekcije za oplemenjivanje organizama Društva genetičara Srbije i Četvrtog naučno-stručnog simpozijuma iz selekcije i semenarstva Društva selecionara i semenara Srbije, Zlatibor, Srbija i Crna Gora*, 16-20. maj, 2006, 97
- Veronesi F, Rosellini D, Albertini E (2003): The use of molecular markers in alfalfa breeding. *Czech. J. Genet. Plant Breed.* 39: 104-111
- Woodfield D, Brummer E C (2001): Integrating molecular techniques to maximise the genetic potential of forage legumes. In: Spangenberg G. (ed.), *Molecular Breeding of Forage Crops. Proc. 2nd Int'l Symp., Molecular Breeding of Forage Crops*, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, Nov. 19-24, 2000, Dordrecht: Kluwer, 51-65
- Young N D (1999): A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol. Breed.* 5: 505-510
- Yu K F, Pauls K P (1993a): Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86: 788-794
- Yu K F, Pauls K P (1993b): Segregation of random amplified polymorphic DNA markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. *Genome* 36: 844-851
- Yu J, Mosjidis J A, Klingler K A, Woods F M (2001): Isozyme diversity in North American cultivated red clover. *Crop Sci.* 41: 1625-1628
- Zaccardelli M, Gnocchi S, Carelli M, Scotti C (2003): Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. *Plant Breed.* 122: 61-65
- Zlokolica M, Milošević M, Nikolić Z, Balešević-Tubić S, Galović V, Vujaković M (1999): Primena metoda biotehnologije u identifikaciji i genetskoj oceni kvaliteta semena. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 31: 369-378

## Use of Genetic Markers in Breeding of Perennial Legumes

Gordana Šurlan-Momirović<sup>1</sup> · Slobodan Katić<sup>2</sup> · Sanja Vasiljević<sup>2</sup> · Zorica Nikolić<sup>2</sup> · Gordana Branković<sup>1</sup> · Irena Čalić<sup>1</sup> · Dragan Milić<sup>2</sup> · Mikić Aleksandar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Nemanjina 6, 11080 Beograd – Zemun, Serbia

<sup>2</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

**Summary:** Breeding of perennial legumes for many agronomic important traits like grain yield, persistence, longevity, resistance to diseases and pests, resistance to limiting abiotic conditions and polyploidy is more efficient and precise if genetic markers are used. Estimates based on isozyme polymorphism may underestimate overall levels of genetic variation because they are sampling only coding regions of DNA that may be conserved to maintain the function of the enzymes. The complete coverage of a genome can be achieved only by the use of molecular variability indicators (DNA polymorphism), i.e. molecular markers. Molecular markers are independent of environmental influences and can be detected in all plant development stages. The main aspects of genetic markers use in perennial legumes breeding are: germplasm characterisation, genetic linkage mapping, QTL analysis, marker assisted selection (MAS), variety identification and protection of plant breeders' rights.

**Key words:** breeding, genetic markers, perennial legumes