

Milovanović J., Šijačić-Nikolić M. 2008. *Molecular markers applying in forest trees gene pool conservation*. Bulletin of the Faculty of Forestry 98: 101-113.

Јелена Миловановић
Мирјана Шијачић-Николић

UDK: 630*165:*174/176
Оригинални научни рад

ПРИМЕНА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА У КОНЗЕРВАЦИЈИ ГЕНОФОНДА ШУМСКОГ ДРВЕЋА

Извод: Бројна истраживања спроведена претходних година показала су ефикасност и важност примене неутралних молекуларних маркера у области конзервационе и популационе генетике шумских дрвенастих врста, нарочито за разумевање миграционих процеса при стварању садашњег генетичког и географског диверзитета, као и за одређивање битних параметара као што је ефективна величина популације, проток гена и „bottleneck“. У наредном периоду, примена молекуларних маркера омогућиће прикупљање веома великог броја података на нивоу маркер локуса или секвенци, који ће бити одлична статистичка основа за процену њихове биолошке и еволуционе вредности.

Кључне речи: генофонд, шумско дрвеће, конзервација, молекуларни маркери

MOLECULAR MARKERS APPLYING IN FOREST TREES GENE POOL CONSERVATION

Abstract: Many studies performed during the last years demonstrated the usefulness of neutral molecular markers in the field of conservation and population genetics of forest trees, in particular to understand the importance of migration patterns in shaping current genetic and geographic diversity and to measure important parameters such as effective population size, gene flow and past bottleneck. During the next years, a large amount of data at marker loci or at sequence level is expected to be collected, and to become excellent statistical power for the assessment of biological and evolutionary value.

Key words: forest trees, gene pool, conservation, molecular markers

*мр Јелена Миловановић, асистент, Универзитет „Синигунум“ у Београду - Факултет у примењеној екологији „Фушуре“, Београд
др Мирјана Шијачић-Николић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд*

1. УВОД

Шуме карактерише широк спектар производних и општекорисних функција које задовољавају различите потребе човечанства. Шумско дрвеће и остале дрвенасте биљке обезбеђују животни простор многим организмима, градећи комплексне механизме генетичког диверзитета. Генетичка варијабилност, како између, тако и унутар врста, има вишеструку фундаменталну вредност. Захваљујући њој дрвеће и жбуње се прилагођава новонасталим условима средине који често могу бити под негативним утицајем климатских промене, штеточина или болести. Неопходно је да газдовање шумама буде усклађено са концептом конзервације на различитим нивоима: локалном, националном и регионалном. Конзервација шумског биодиверзитета, који укључује и генофонд шумског дрвећа, је од есенцијалног значаја за одрживо коришћење вредности шуме, као и за побољшање здравственог стања и виталности шумских екосистема и унапређење и развој њихових заштитних, естетских и културних функција (Шијачић-Николић, Миловановић, 2007).

Конзервација шумских генетичких ресурса, најчешће, се не односи на статичну презервацију или максимализацију генетичког диверзитета директно, већ на покушаје презервације механизма, који креирају и одржавају генетички диверзитет, путем разумевања како различите компоненте међусобно реагују (Gregorius, 1992). Основни задатак и циљ генетичке конзервације одређене врсте је обезбеђивање постојаности генетичке информације. Ову информацију могу чинити појединачни гени или генотипови, чија експресија даје пожељне фенотипове, најчешће од економске вредности. Такође, циљ конзервације је очувати што више генетичких информација, присутних у популацији, како би се на основу њих основале нове, виталне популације у којима ће постојати експресија жељене информације. Имајући у виду да губитак генетичког диверзитета представља највећу претњу очувању адаптабилног потенцијала врсте (Milovanović, Šijačić-Nikolić, 2006/a, 2006/b, 2007), неопходно је улагати велике напоре у покушаје његове конзервације.

За реализацију конзервационих циљева могућност идентификовања генетичке варијабилности је од изузетног значаја. Поуздана информација о дистрибуцији генетичке варијабилности је предуслов за адекватно спровођење процеса селекције, оплемењивања и конзервације шумског дрвећа. Популациони генетичари су развили различите теоријске моделе, који омогућују процену тренутног генетичког диверзитета унутар и између популација или других хијерархијских нивоа генетичке организације. Последице дрифта и протока гена путем полена и семена данас могу бити квантификоване, као што је омогућен и увид у системе укрштања шумског дрвећа. Изузетан допринос сазнањима о оваквим процесима дало је откриће (адаптивно неутралних) молекуларних маркера.

У овом раду дат је преглед најчешће коришћених техника молекуларног маркера у конзервацији шумског дрвећа, са оценом и поређењем њихових главних карактеристика.

2. ИДЕНТИФИКОВАЊЕ ГЕНЕТИЧКОГ ПОЛИМОРФИЗМА

Постојање генетичког полиморфизма (унутарврсног диверзитета) је круцијално за процес адаптације и сматра се једним од основних фактора опстанка популација и врста. Унутарврсна варијабилност представља потенцијал популација врсте за стварање различитости, као што је диференцијација између фамилија, варијетета или различитост у односу на друге популације. Проучавање унутарврсне варијабилности са циљем утврђивања степена генетичке контроле фенотипске експресије значајних особина представља основу за ефикасно оплемењивање врсте и адекватно креирање стратегије генетичке конзервације. Информације о генетичком полиморфизму унутар врсте су основа за доношење исправних одлука о управљању генетичким ресурсима.

Генофонд шумског дрвећа - шумски генетички ресурси могу се дефинисати као сваки, кодирајући или не кодирајући, функционални генетички материјал (ДНК) шумског дрвећа, који је од актуелне или потенцијалне вредности за будуће генерације људи (Geburek, Turok, 2006). Генетичке карактеристике ресурса могу бити познате или процес разоткривања специфичне генетичке информације и дефинисања генетичке варијабилности може бити у току. У строгом смислу речи, генетички ресурс представља сваки, изолован и клониран, део ланца дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК), док се у пракси генетичким ресурсом сматрају полен, семе, четине, пупољци, појединачна стабла, групе стабала или популације (Ziehe *et al.*, 1989). Кључна карактеристика генетичког ресурса је његова вредност и њена процена од стране корисника (човека).

Варијабилност врсте се данас посматра као комплекс двеју категорија: адаптивне варијабилности, која је под утицајем фактора средине и неутралне варијабилности, која не подлеже овом утицају. Проучавање адаптивне варијабилности подразумева упознавање распона еколошких услова станишта врсте и морфолошко-анатомско-фенолошких својстава индивидуа на различитим стаништима, док неутрална варијабилност, која може бити измерена применом техника ДНК профилисања, не укључује адаптивне разлике између индивидуа. Опште је прихваћено мишљење да ниво неутралне варијабилности указује на ниво адаптабилне варијабилности врсте. Применом молекуларних маркера елиминишу се бројне недоумице, које су последица утицаја средине, нарочито приликом анализирања квантитативних особина биљака, чија експресија знатно више подлеже утицају интеракције генетске основе и променљивих услова средине, чак и у контролисаним експерименталним условима (Ш и ј а ч и ћ - Н и к о л и ћ *et al.*, 2008) или за утврђивање појава алтернирајуће или одложене доминантности (Ш и ј а ч и ћ - Н и к о л и ћ, 2006), те се технике молекуларне генетике данас примењују као допунски вид истраживања традиционалним приступима карактеризације генетичких ресурса.

3. МОЛЕКУЛАРНИ МАРКЕРИ И ЊИХОВА ИНФОРМАТИВНОСТ

Молекуларни маркери су специфични фрагменти ДНК који се могу идентификовати у геному. Молекуларни маркери нису гени у класичном смислу. Они могу имати, али најчешће немају, биолошку функцију. Настају као последица мутација, које изазивају промене ДНК структуре, обично штетне за организам, те се зато маркери углавном идентификују у ДНК, која нема кодирајућу, биолошку функцију. Да би маркер нашао примену у конзервационој генетици мора поседовати одређени степен варијабилности (полиморфизма) на маркер локусу. Треба имати у виду да варијабилност на молекуларном нивоу не мора бити у вези са варијабилношћу биолошке функције.

Идентификација молекуларним маркерима се обавља захваљујући многобројним техникама молекуларног маркирања. Велики број различитих техника анализе генетичке варијабилности је развијен и унапређен у току последње две деценије. Успешност примене молекуларних генетичких маркера може се оценити са неколико важних параметара, као што су доступност, ниво полиморфизма, репродуктивност, технички захтеви и трошкови. Сходно томе, не постоји супериорна техника, која задовољава све наведене услове, али је кључно питање који маркер употребити у које сврхе (Gillet, 1999).

Једна од техника молекуларног маркирања (у ширем смислу речи) јесте анализа изоензима. Мада није у питању техника директног испитивања структуре и функције генома она се и даље успешно примењује јер носи ваљане информације о генетичком полиморфизму шумског дрвећа. Изоензими представљају различите форме једног ензима кодиране са више локуса. Међутим, примена изоензима ограничена је бројем ензим-локуса (који је, генерално, мали), релативно ниским нивоом варијабилности и чињеницом да они указују једино на варијабилност протеин-кодирајућих гена и да само мали део модификација кватернерне структуре протеина може бити регистрован електрофорезом на скробном гелу (техника најчешће коришћена за визуелизацију изоензимске варијабилности). Изоензими су, ипак, успешно примењивани у истраживањима миграционих процеса врста у постгласијалном периоду код: смрче (Lagercrantz, Ryman, 1990, Morgante, Vendramin, 1991), јеле (Konnert, Bergman, 1995) и букве (Gömöry *et al.*, 1998, Comps *et al.*, 2001). Прва истраживања са циљем упознавања параметара система укрштања и процене унутарврсне генетичке варијабилности шумског дрвећа (Миловановић, 2007, Ballian *et al.*, 2006, Ballian *et al.*, 2005, Шијачић-Николић, 2000, Николић, Туцић, 1983, Николић, 1982, Гузина, 1980, Николић, Bergmann, 1974), такође, су била заснована на изоензимским анализама, које су указале на висок степен слободног укрштања код шумског дрвећа, преко 90% код смрче (Boscherini *et al.*, 1993) и букве (Rossi *et al.*, 1996). Наследљивост свих проучаваних изоензимских локуса претходно је одређивана анализама хаплоидног ткива мегагаметофита четинара или у оквиру линија пуних и полусродника скривеносемица.

Развојем ДНК маркера, укључујући RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats или минисателити), SSR (Simple Sequence Repeats или микросателити), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) и SNP (Single Nucleotide Polymorphism), превазиђен је проблем ограниченог броја варијабилних локуса и добијен је алат за проучавање варијабилности у кодирајућим, некодирајућим и високо варијабилним регионима нуклеарног и органелног (хлоропластног и митохондријалног) генома.

Митохондријална и хлоропластна ДНК представљају најчешће коришћене молекуларне маркере за филогеографска истраживања због широког опсега унутарврсног полиморфизма. До сада су успешно коришћене при филогеографским и популационим истраживањима код животиња и у хуманој популацији (Avisé, 1994, Seilstad *et al.*, 1998, Taberlet *et al.*, 1998, Hewitt, 1999), а почињу успешно да се користе и у популацијама шумског дрвећа (у природним популацијама оморике) (Nasri *et al.*, 2008). Митохондријална ДНК се наслеђује искључиво матерински, што значи да се различите варијанте mtDNK преносе преко семена, а не преко полена. Дакле, истраживањем полиморфизма митохондријалних гена ствара се добра основа за упознавање процеса миграције и географске диференцијације популација врсте (Sperisen *et al.*, 2001). MtDNK, као маркер за биљни геном, има више недостатака него код анималног генома, услед слабије субституције нуклеотида, тј. мање унутарврсне варијабилности, хетероплаزمије, ширег опсега рекомбинације међу молекулима и знатно већег mt генома. Међутим, примена mtDNK маркера код четинара је оправдана, јер се хлоропластна ДНК код њих наслеђује патернално. У великом броју истраживања на основу широког сета података, утврђени су релевантни фактори који детерминишу актуелну дистрибуцију унутар и између врста. Тако је утврђена локација глацијалних рефугијума у Италији, на Арапском и Балканском полуострву и утицај миграционих процеса и коридора; улога историјских чинилаца (посебно механизма дисперзије семена и полена) и утицај човека на различите врсте. Посматрана је заједничка историја миграције различитих врста шумског дрвећа и утврђен је филогеографски распоред између врста (Petit *et al.*, 2003). Анализом алелног полиморфизма *nad1* гена митохондријалног генома оморике (Миловановић *et al.*, 2007) утврђено је постојање одређеног степена генетичке контроле фенотипске експресије код различитих феногрупа оморике.

С обзиром да се хлоропластна ДНК код скривеносеменница наслеђује матернално представља најчешће коришћени молекуларни маркер за упознавање унутарврсне варијабилности ове групе шумског дрвећа. Најопсежнија истраживања вршена су на храстовима применом четири универзална прајмерска пара хлоропластног генома, који су омогућили детектовање 30 хаплотипова у оквиру опсежног истраживања преко 500 популација са подручја читаве Европе (Ballian *et al.*, 2007, Bordács *et al.*, 2002, Fineschi *et al.*, 2002, Petit *et al.*, 2002, Grivet *et al.*, 2001, Ferris *et al.*, 1998, Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997, Petit *et al.*, 1997, Petit *et al.*, 1996, Demesure *et al.*, 1996, Demesure *et al.*, 1995, Dumolin *et al.*,

1995, Kremer, Petit, 1993, Petit *et al.*, 1993/б, Petit *et al.*, 1993/а, Kremer *et al.*, 1991). Универзални прајмерски парови хлоропластне ДНК, такође, показали су висок степен информативности и апликативности у истраживањима генетичке варијабилности храста китњака у Србији при чему је детектовано пет различитих хаплотипова (Шијачић-Николић *et al.*, 2007). Спроведена истраживања послужила су као основа за дефинисање региона провенијенција ове врсте у Србији.

4. ИЗБОР МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА

У конкретном случају, приликом избора маркера за процену варијабилности, неопходно је размотрити следеће параметре:

број доступних локуса - ограничен у случају изоензима, теоретски неограничен у случају свих ДНК маркера, а нарочито AFLP, RAPD и SNP;

ниво варијабилности - низак за изоензиме, веома висок за микросателите, просечан за RFLP;

доминантност - RAPD и AFLP генерално доминантни, самим тим мање ефикасни у истраживањима популационе структуре и мапирању од кодоминантних маркера, као што су изоензими, RFLP и SSR;

присуство нултих алела - високо учешће нултих алела детектовано је на SSR локусима, што за последицу има мању процењену вредност хетерозиготности; нулти алели су детектовани и код изоензима, RFLP и SSR, али са знатно нижом фреквенцијом;

репродуктивност - ниска код RAPD, виша код AFLP, а највиша код изоензима, SSR и SNP.

преносивост - веома висока код изоензима, нижа код нуклеарних SSR, веома висока код хлоропластних SSR; Комигрирајући RAPD и AFLP фрагменти не морају обавезно долазити са истих локуса, чак и код веома сродних врста: секвенционирање је неопходно како би се доказала хомологија RAPD, AFLP и SSR фрагмената;

лакоћа извођења - AFLP, RFLP и SNP су технички најзахтевнији маркери; високо ефикасни системи SNP детекције су скоро развијени.

ефикасност извођења (мултиплексност, тј. симултана анализа мултиплих локуса у једном поступку) - најнижа код RFLP, највиша код AFLP, просечна код RAPD и SSR;

аутоматизација (коришћење аутоматских секвенционера и других уређаја) - сви PCR маркери су подобни за аутоматизацију; супротно томе, изоензими и RFLP су више ручне технике; SNP детекција може бити аутоматизована на високом нивоу.

трошкови - изоензими су најјефтинији, RFLP и SNP су најскупљи; Једноставан закључак може се извести на основу напред изнетог: молекулар-

ни маркери су различити, ниједан од њих није идеалан и неки су бољи у одређене сврхе од других.

5. МЕТОДЕ КОНЗЕРВАЦИЈЕ

Са аспекта очувања генетичке варијабилности можемо говорити о различитим „методама“ конзервације. Термин „метод“ се користи у контексту одређене концепције конзервације генетичких ресурса: *in situ* или *ex situ*, динамична или статична, док се врста, екосистем, популација, индивидуа или део индивидуе сматрају објектом конзервације (Шијачић-Николић, Миловановић, 2007).

In situ (на месту) конзервација подразумева конзервацију шумских генетичких ресурса у гајеним састојинама, дивљим, природно обновљеним популацијама у заштићеним подручјима или ређе у вештачки обновљеним састојинама, без усмерене селекције, на подручјима са којих сакупљено семе изворно потиче. Овакав концепт захтева процену генетичке варијабилности унутар и између популација у циљу идентификовања популација које је потребно укључити у програм конзервације. Осим тога, потребно је успоставити и адекватан систем за праћење промена генетичке варијабилности током времена, што се најбоље може постићи применом различитих молекуларних маркера (Karp *et al.*, 1997).

Ex situ конзервација представља вид конзервације шумских генетичких ресурса изван њиховог природног станишта (ван места), при чему се разликују: ботаничке баште, арборетуми, живи архиви, семенске плантаже, провенијенични тестови, тестови потомства, клонски архиви, банке семена, полена, ДНК, *in vitro* конзервација и криопрезервација. Њихово успостављање и одржавање обухвата четири основне категорије активности: успостављање, одржавање, карактеризацију и коришћење, при чему се свака од њих на одређени начин ослања на примену молекуларних маркера (Bretting, Widrlechner, 1995, Brown, Kresowich, 1996, Karp *et al.*, 1997).

6. ЗАКЉУЧНА РАЗМАТРАЊА

Конзервација генофонда шумског дрвећа базира на генетичкој варијабилности природних популација, која је резултат различитих генетичких процеса: мутација, рекомбинација, флукутације гена, селекције и генетичког дрефта. За евидентирање и утврђивање степена генетичке варијабилности користе се методе класичне и молекуларне генетике. Методе класичне генетике углавном базирају на анализи квантитативних својстава на макроскопском и микроскопском нивоу уз примену различитих статистичких метода за анализу добијених података. Међутим, морфолошке карактеристике често могу бити подложне утицају фактора спољашње средине, што умањује експресију самог генотипа. За прецизније проучавање генетичке

варијабилности данас се примењују методе молекуларне генетике, познатије као молекуларни маркери, помоћу којих се открива варијабилност која је под директном генетском контролом. Молекуларни маркери су различити, ниједан од њих није идеалан и неки су бољи у одређене сврхе од других, односно могу се добро допуњавати.

Бројна истраживања спроведена претходних година показала су ефикасност и важност примене неутралних молекуларних маркера у области конзервационе и популационе генетике шумских дрвенастих врста, нарочито за разумевање миграционих процеса при стварању садашњег генетичког и географског диверзитета, као и за одређивање битних параметара као што је ефективна величина популације, проток гена и „bottleneck“. У наредном периоду, примена молекуларних маркера омогућиће прикупљање већег броја података на нивоу маркер локуса или секвенци, који ће бити одлична статистичка основа за процену њихове биолошке и еволуционе вредности.

ЛИТЕРАТУРА

- Avice J.C. (1994): *Molecular markers*, Natural History & Evolution, Chapman & Hall, New York
- Ballian D., Gömöry D., Longauer R., Микић Т., Paule L. (2005): *Изоензимска анализа укључујући проблем репродукције и конзервације, популација Панчићеве оморике (Picea omorika Panč./Purk.) са вишеградској погачи*, Гласник Шумарског факултета Универзитета у Бањој Луци, Бања Лука (23-34)
- Ballian D., Longauer R., Mikić T., Paule L., Kajić D., Gömöry D. (2006): *Genetic structure of a rare European conifer, Serbian spruce (Picea omorika Panč./Purk.)*, Plant Systematics and Evolution 260(1) (53–63)
- Ballian D., Иванковић М., Slade D. (2007): *Раздиоба популација храсћа китњака (Quercus petraea (Matt.) Liebl) у Босни и Херцеговини помоћу кlorоиласинне ДНК (цпДНК) и њезина примјена у шумарству*, Гласник Шумарског факултета у Бањој Луци 7, Бања Лука (97-111)
- Bordács S., Popescu F., Slade D., Csaikl U.M., Lesue I., Borovics A., Kézdy P., König A.O., Gömöry D., Brewer S., Burg K., Petit R.J. (2002): *Chloroplast DNA variation of white oaks in northern Balkans and in the Carpathian Basin*, For. Ecol. Mgmt. 156 (197-209)
- Boscherini G., Vendramin G.G., Giannini R. (1993): *Mating system analysis in two Italian populations of Norway spruce*, J. Genet. Breed. 47 (45-48)
- Bretting P.K., Widrlechner M.P. (1995): *Genetic markers and plant genetic resources*, Pl. Breed. Rev. 13 (11-86)
- Brown S.M., Kresowich S. (1996): *Molecular characteriyation for plant genetic resources conservation*, „Genome Mapping of Plants” (ed. Paterson H.), Academic Press, San Diego (85-93)
- (1999): *Which DNA marker for which purpose?*, Final Compendium of the Forest Project in the EU Biotechnology FW IV Programme „Molecular Tools for Biodiversity” (ed. Gillet M.), <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>

- Gömöry D., Hůnek V., Paule L. (1998): *Delineation of seed zones for European beech (Fagus sylvatica L.) in the Czech Republic based on isozyme gene markers*, Ann. Sci. For. 55 (425-436)
- Gregorius H.-R. (1992): *Gene conservation and the preservation of adaptability*, Species Conservation: A Population-Biological Approach (eds. Seitz A., Loeschke V.), Birkhäuser, Basel (31-47)
- Grivet D., Heinze B., Vendramin G.G., Petit R.J. (2001): *Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA*, Mol. Ecol. Notes 1. (345-349)
- Гузина В. (1980): *Процена генетичке варијабилности јасике (Populus tremula L.) помоћу полиморфизма изохероксидаза*, Радови Института за тополарство, Књига 9, Нови Сад (1-126)
- Demesure B., Comps B., Petit R.J. (1996): *Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (Fagus sylvatica L.) in Europe*, Evolution 50 (2515-2520)
- Demesure B., Sodji N., Petit R.J. (1995): *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants*, Molecular Ecology 4 (129-131)
- Dumolin S., Demesure B., Petit R.J. (1995): *Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method*, Theor. Appl. Genet. 91 (1253-1256)
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., LeCorre V., Petit R.J. (1997): *Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent*, Genetics 146 (1475-1487)
- Eriksson G., Ekberg I. (2001): *An Introduction to Forest Genetics*, SLU, Repro, Uppsala (1-166)
- Ziehe M., Gregorius H.-R., Glock H., Hattmer H.H., Herzog S. (1989): *Gene resources and gene conservation in forest trees: general concepts*, „Genetic Effect of Air Pollutants in Forest Tree Populations” (eds. Scholz, F., Gregorius H.-R., Rudin D.), Springer, Berlin (173-185)
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G., Hodgkin T. (1997): *Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies*, IPGRI technical bulletin № 2, International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Konnert M., Bergmann F. (1995): *The geographical distribution of genetic variation of silver fir (Abies alba, Pinaceae) in relation to its migration history*, Plant Syst. Evol. 196 (19-30)
- Kremer A., Petit R.J. (1993): *Gene diversity in natural populations of oak species*, Ann. Sci. For. 50: Suppl. 1, (186-202)
- Kremer A., Petit R.J., Zanetto A., Fougère V., Ducousso A., Wagner D., Chauvin C. (1991): *Nuclear and organelle diversity in Quercus robur and Q. petraea*, „Genetic variation in European populations of forest trees“ (eds. G. Müller-Starck, M. Ziehe), Sauerländer s Verlag, Frankfurt
- Lagercrantz U., Ryman N. (1990): *Genetic structure of Norway spruce (Picea abies): concordance of morphological and allozymic variation*, Evolution 44 (38-53)
- Milovanović J. (2005): *Serbian spruce genetic resources development trends in Serbia*, MendelNet 2005 „Contemporary state and development trends of forests in cultural landscape“ Proceedings of International Postgraduate Students Conference, Brno (77 – 81)

- Milovanović, J. (2006): *Conservation Management of Endangered Forest Species Genetic Resources in Serbia*, MACE Training Course „Sustainable Forestry - Change of Forest Management: From Man-made towards Natural Forests”, EU Marie Curie Project „Modern Agriculture in Central and Eastern Europe (MACE)”, Brandenburg University of Technology (BTU), Cottbus (1-3)
- Миловановић Ј. (2007): *Проучавање унутарврсној варијабилности оморике (Picea omorika Panč./Purkyně) применом митохондријских маркера*, магистарски рад у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (1-86)
- Milovanović J., Isajev V., Kraјmerová D., Paule L. (2007): *Allele polymorphism of nadl gene of the Serbian spruce mitochondrial genome*, *Genetika* 1, Vol. 39 (79-91)
- Milovanović J., Šijačić-Nikolić M. (2006/a): *Global Climate Changes and Forest Genetic Resources Conservation*, International Scientific Conference „Sustainable use of forest ecosystems - The Challenge of the 21st Century, The Book of Abstracts, Belgrade - Donji Milanovac (142-142)
- Milovanović J., Šijačić-Nikolić M. (2006/b): *MPBS as a Method to Conserve Forest Species Genetic Diversity*, International Scientific Conference „Sustainable use of forest ecosystems - The Challenge of the 21st Century”, The Book of Abstracts, Belgrade - Donji Milanovac (128-128)
- Миловановић Ј., Шијачић-Николић М. (2007): *Модел конзервације митохондријској диверзитету оморике применом МПБС метода*, Гласник Шумарског факултета 95, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (119-126)
- Morgante M., Vendramin G.G. (1991): *Genetic variation in Italian populations of Picea abies L. Karst. and Pinus leucodermis Ant.*, „Genetic Variation in European Populations of Forest Trees” (eds. Müller-Starck G., Ziehe M.), J.D. Sauerländer's Verlag, Frankfurt (205-227)
- Nasri N., Boјović S., Vendramin G.G., Fady B. (2008): *Population genetic structure of the relict Serbian spruce, Picea omorika (Panč.) Purk., inferred from plastid DNA*, *Plan Systematics & Evolution* 271 (1-7)
- Николић Ђ. (1982): *Изозимски полиморфизам црној бора (Pinus nigra Arn.) у Југославији и неким другим деловима његове природне распрострањености*, докторска дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (1-120)
- Nikolić Đ., Bergmann F. (1974): *Genetic variation of leucine aminopeptidase isoenzymes in seed of Pinus nigra Arn.*, *Genetika* 6(3) (361-365)
- Nikolić Đ., Tucić N. (1983): *Isoenzyme variation with and among populations of European black pine (Pinus nigra Arn.)*, *Silva Genetica* 32(3-4) (80-89)
- Petit R.J., Aguinagalde I., DeBeaulieu J.-L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. (2003): *Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity*, *Science* 300 (1563-1565)
- Petit R.J., Wagner D.B., Kremer A. (1993/a): *Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphism in a mixed stand of Quercus robur and Q. petraea*, *Ann. Sci. For.* 50: Suppl. 1 (41-47)

- Petit R.J., Demesure B., Pineau E. (1996): *Genetic differentiation at a local and continental scale in European oaks species: the importance of historical factors*, „Inter- and intraspecific variation in European oaks: evolutionary implications and practical consequences” (eds. A. Kremer, H. Muhs), European Union, Brussels
- Petit R.J., Kremer A., Wagner D.B. (1993/6): *Geographic structure of chloroplast DNA polymorphism in European oaks*, Theor. Appl. Genet. 87 (122-128)
- Petit R.J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducouso A., Kremer A. (1997): *Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (9996-10001)
- Petit R.J., Csaikl U.M., Bordasc S., Burg K., Coart E., Cottrell J., VanDam B., Deans J.D., Dumolin-Lapègue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., König A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Matyas G., Munro R.C., Olalde M., Pemonge M., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Turchini D., DeVries G.M., Ziegenhagen B., Kremer A. (2002): *Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations*, For. Ecol. Mgmt. 156 (5-26)
- Rossi P., Vendramin G.G., Giannini R. (1996): *Estimation of mating system parameters in two Italian natural populations of Fagus sylvatica*, Can. J. For. Res. 26 (1187-1192)
- Seilstad M.T., Minch E., Cavalli-Sforza L. (1998): *Genetic evidence for a higher female migration rate in humans*, Nature Genetics 20 (278-280)
- Sperisen C., Buchler U., Gugerli F., Matyas G., Geburek T., Vendramin G.G. (2001): *Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce*, Molecular Ecology 10, Blackwell Science Ltd. (257-263)
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A-G., Cosson J-F. (1998): *Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe*, Molecular Ecology 7 (453-464)
- Ferris C., King R.A., Vainolat R., Hewitt G.M. (1997): *Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland*, Heredity 80 (584-593)
- Fineschi S., Turchini D., Grossoni P., Petit R.J., Vendramin G.G. (2002): *Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy*, For. Ecol. Mgmt. 156 (103-114)
- (2004): *Forest genetic resources conservation and management: Overview, concepts and some systematic approaches*, № 1, IPGRI, Forest & Landscape, FAO, Rome (106)
- Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J.J. (1995): *The Conservation of Plant Biodiversity*, Cambridge University Press, Cambridge
- Hartl D.L., Clark A.G. (1997): *Principles of population genetics*, 3rd edition, Sinauer Associates, Sunderland
- Hattemer H.H., Ziehe M. (1997): *Genetic Control of Phenotypic Traits with Relevance to Gene Conservation in Trees - A Survey of Methods*, Proceedings of the EUFORGEN Workshop, Sopron
- Hewitt G.M. (1999): *Post-glacial re-colonization of European biota*, Biological Journal of the Linnean Society 68 (87-112)

- Comps B., G6m6ry D., Letouzey J., Thiebaut B., Petit R.J. (2001): *Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech*, Genetics 157 (389-397)
- (2006): *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*, eds. Geburek T., Turok J., Arbora Publishers, Zvolen (1-720)
- Шијачић-Николић М. (2000): *Анализа јенетској појтенцијала јенеративне семенске јланшјаже оморике (Picea omorika Рапс./Purkyine) јрименом конјролисане хибридизације линија јолусродника*, докторска дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (1-163)
- Шијачић-Николић М., Кнежевић Р., Миловановић Ј. (2008): *Прилој јознавању јувенилне ејтаје развића америчкој којривића (Celtis occidentalis L.)*, Гласник Шумарског факултета 97, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (57-68)
- Ѕјајачић-Николић М., Milovanović J. (2006): *Inheritance Level of Leaf Reverse Color in Acer pseudoplatanus L. cv. „Atropurpureum”*, IUFRO Division 2 Joint Conference: Low input breeding and genetic conservation of forest tree species, Antalya (184-187)
- Шијачић-Николић М., Миловановић Ј. (2007): *Конзервација и усмерено коришћење шумских јенетичких ресурса*, Гласник Шумарског факултета 95, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (7-21)
- Шијачић-Николић М., Миловановић Ј., Кнежевић Р. (2006): *Ујврђивање фенојтипске стабилности једнојодишних садница различитих јровенијенција букве*, Гласник Шумарског факултета Универзитета у Бањој Луци 6, Шумарски факултет Универзитета у Бањој Луци, Бања Лука (61-71)
- Шијачић-Николић М. et al. (2007): *Дефинисање рејона јровенијенција храсћа кићњака (Quercus petraea agg. Ehrendorfer 1967) у Србији*, завршни извештај пројекта, Универзитет у Београду, Шумарски факултет, Београд (1-74)

Jelena Milovanović
Mirjana Šijačić-Nikolić

MOLECULAR MARKERS APPLAYING IN FOREST TREES GENE POOL CONSERVATION

Summary

Genetic conservation is any maintenance of genetic diversity or specific genetic material harbored in a forest genetic resource for a limited period of time until the genetic resource is utilized. Forest genetic conservation usually does not aim at the static preservation or maximization of genetic diversity as such, but rather tries to preserve the mechanisms that create and maintain diversity by understanding how different components interplay. The main task and aim of species genetic conservation is saving of genetic information, valuable for specific purpose or endangered. The ability to identify genetic variation is a precondition for adequate realization of selection, improvement and conservation processes. Genetic diversity is, nowadays, estimated by analysis of morphological and metrical traits on field, which define adaptive variability affected by environmental conditions, and molecular markers in laboratories, or neutral variability of species

independent of these influences. Molecular markers avoid many of the complications of environmental effects and for this reason, molecular genetic techniques are nowadays being applied as a complementary strategy to traditional approaches for characterizing forest genetic resources for in situ and ex situ conservation.

Many studies performed during the last years demonstrated the usefulness of neutral molecular markers in the field of conservation and population genetics of forest trees, in particular to understand the importance of migration patterns in shaping current genetic and geographic diversity and to measure important parameters such as effective population size, gene flow and past bottleneck. During the next years, a large amount of data at marker loci or at sequence level is expected to be collected, and to become excellent statistical power for the assessment of biological and evolutionary value.