

GENETIČKA VARIJABILNOST POPULACIJA TATARSKE HELJDE (*FAGOPYRUM TARTARICUM* (L.) GAERTN.) NA PODRUČJU BOSNE I HERCEGOVINE

Jasmin Grahić¹, Silvio Šimon², Arnela Okić¹, Almira Konjić¹, Fuad Gaši¹

Originalni naučni rad - *Original scientific paper*

Rezime

Cilj ovog rada bio je ispitati genetičku varijabilnost populacije tatarske heljde (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) sa područja Bosne i Hercegovine (BiH). Molekularna ispitivanja su provedena na ukupno 25 uzoraka, odnosno na po 5 uzoraka iz pet populacija tatarske heljde. Prikupljeni biljni materijal je prvobitno liofiliziran, a potom je podvrgnut postupku ekstrakcije DNK primjenom peqGOLD plant DNA pribora hemikalija (marka, država). Uspješna amplifikacija DNK je ostvarena kod sedam od ukupno 10 korištenih oligonukleotidnih početnica (prajmera). Rezultati istraživanja su pokazali da su svi analizirani lokusi polimorfni, te su dokazane značajne genetičke razlike između populacija tatarske heljde iz različitih proizvodnih regija ove poljoprivredne vrste na području BiH.

Ključne riječi: *tatarska heljda, mikrosatelitni markeri, genetički odnosi, analiza molekularne varijanse, analiza genetičke strukture*

UVOD

Taksonomski, heljda spada u red *Polygonales*, porodicu *Polygonaceae*, potporodicu *Polygonoideae*, te rod *Fagopyrum*. Rod *Fagopyrum* obuhvata 16 vrsta, koje su na temelju svoje morfologije klasificirane u dvije grupe; *urophyllum*, sa 14 vrsta, i *cymosum* grupu, koja obuhvata 4 vrste. Prema posljednjoj filogenetičkoj analizi provedenoj i objavljenoj od strane Ohsako *et al.* (2001), dodijeljene i dvije genetski udaljenije vrste, *Fagopyrum megacarpum* i *Persicaria hydropiper*. Najznačajnije vrste roda *Fagopyrum* su iz *urophyllum* grupe, obična heljda (*Fagopyrum esculentum* Moench.), koja je stranooplodna, i tatarska heljda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) koja je uglavnom samooplodna. Zbog pomenute osobine, tatarska heljda ima nisku prirodnu stopu hibridizacije (Li *et al.*, 2007).

U periodu od 2005. do 2014. godine, izvršena je inventarizacija lokalno korištenih populacija heljde sa ciljem očuvanja domaće germplazme ove poljoprivredne vrste i njenog održivog iskorištavanja. Pomenuti naponi su rezultirali uspostavljanjem prve *ex-situ* kolekcije lokalnih populacija heljde, i to u sklopu Gen banke

¹ Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet

² Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Uprava za stručnu podršku razvoju poljoprivrede
Korespondencija: j.grahic@ppf.unsa.ba

Poljoprivprehrambenog fakulteta u Sarajevu. Pored periodične regeneracije sjemenskog materijala nad primkama obične i tatarske heljde provedena su i mnoga istraživanja u cilju njihove evaluacije, od ispitivanje utjecaja vremena sjetve na prinos zrna (Gadžo *et al.*, 2008), utjecaja organo-mineralnog đubriva na komponente prinosa obične i tatarske heljde (Grahić *et al.*, 2016a; Gavrić i Gadžo, 2011), do analiziranja agronomске prakse proizvođača heljde na području Bosne i Hercegovine (BiH) (Grahić *et al.*, 2016b). Međutim, kada je u pitanju molekularno-genetička karakterizacija heljde sa područja BiH, do sada su objavljena samo dva rada u kojima su analizirane isključivo primke obične heljde (Grahić *et al.*, 2018; Grahić *et al.*, 2017).

Kako bi se dobio bolji uvid u karakteristike kolekcije sjemena primki tatarske heljde, neophodno je bilo ispitati genetičku varijabilnost populacija tatarske heljde na području BiH.

MATERIJAL I METODE RADA

Pet uzoraka tatarske heljde, koji su analizirani u ovom radu, sakupljeni su iz različitih regija u BiH (Travnik, Breza, Ustikolina, Bosanska Krupa i Doboj). Uzorkovanje je provedeno na po pet biljaka iz svake populacije (ukupno 25 uzoraka). Pojedinačni uzorak predstavljao je količinu od četiri mlada, neoštećena lista, uzetih sa jedne biljke. Hladno sušenje lisnog tkiva (liofilizacija) obavljeno je u uvjetima podpritiska, upotrebom liofilizatora (Christ, model Alpha 1-2 LDplus). Navedena metoda sušenja biljnog materijala je korištena iz razloga što sprječava degradaciju DNK molekule. Osušeni uzorci heljde su vakumirani u aluminijskim vrećicama i čuvani na -80 °C do izolacije DNK. Ekstrakcija DNK iz biljnog tkiva provedena je primjenom peqGOLD plant DNA kit-a (Peqlab Biotechnologie, Njemačka), pri čemu se u potpunosti slijedio protokol proizvođača.

Za amplifikaciju DNK korišteno je 10 mikrosatelitnih prajmera, objavljenih od strane Iwata *et al.* (2005), Ma *et al.* (2009) i Kishore *et al.* (2012) (Tabela 1). Protokol amplifikacije identičan je onome korištenom od Grahić *et al.* (2017) na običnoj heljdi. PCR reakcije umnožavanja mikrosatelitnih sekvenci provedene su u Veriti TM Thermal Cycleru (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Za analizu PCR produkta korišten je ABI 3130 Genetic Analyzer sa četiri kapilare. Produkt je razrijeđen sa ddH₂O u odnosu 1:50, te dodan u smjesu od 8,75 µl HiDi i 0,25 µl Genescan 500 LIZ size standarda. Nakon centrifugiranja uzorci su denaturirani u Thermocycler-u. Podaci su analizirani upotrebom softverskog paketa GeneMapper 4.0.

Tabela 1. Nazivi i sekvence lokusa koji su analizirane tokom istraživanja
Table 1. Microsatellite markers used in this study

Naziv	Sekvenca
GB-FE-043	F: TGTAACGACGGCCAGTTTCAGCACCTGGATGGAC R: TGTCCCAATGTGAAAGG
GB-FE-191	F: TGTAACGACGGCCAGTAATCAATGACCAGCACGC R: CTGATGGAGGATGCCAAA
Fem1303	F: TGTAACGACGGCCAGTAGGAGACGGGAGAGAAGCAG R: GGATGTTTGGGTGATTTTCAG
Fem1840	F: TGTAACGACGGCCAGTACGACGAAGACAAATGAGGA R: ATATGGACGGCCTGGATTAT
Fes1094	F: TGTAACGACGGCCAGTGAAGCCTTGGAAGAAGTGAAAT R: TAAAGCTCATCCCAATATGCAA
Fes1368	F: TGTAACGACGGCCAGTCAACCACTCAAAGCCTCATC R: CTTTCATATCCCTAACACAC
Fes1497	F: TGTAACGACGGCCAGTGTTGGCTGACGAAGACCGAC R: AAAGAGAGCGAGAGGCACTG

Karakteristike analiziranih SSR lokusa ispitane su upotrebom softvera za populacijsku genetiku, SPAGeDI ver. 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). Upotrebom računarskog programa GenoType (Meirmans i Van Tienderen, 2004) izračunata je AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) korištenjem SMM modela (Ohta i Kimura, 1973). Navedeni pristup je podrazumijevao da se nedostajeće alelne varijante zamjenjuju sa prosječnom alelnom dužinom za dati lokus. Sve analize su napravljene uz bootstrap sa 1000 permutacija. Vizualizacija genetske udaljenosti je obavljena u računarskom programu MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), a bazirana je na UPGMA algoritmu (engl. *Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic average*). Priprema podataka za analizu urađena je u računarskom programu MADC v 1.5 (Grahic i Grahic, 2017).

REZULTATI I DISKUSIJA

Genetički profili

Sedam od deset korištenih prajmer parova rezultiralo je uspješnom amplifikacijom PCR proizvoda na cijelom setu uzoraka. Nakon očitavanja alelnih varijanti, polimorfizam je primijećen na svim analiziranim lokusima. Treba napomenuti da je većina do sada publikovanih studija na genetičkoj karakterizaciji obične i tatarske heljde podrazumijevala analizu u prosjeku osam lokusa (Kishore *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2009; Iwata *et al.*, 2005). Samo očitavanje proizvoda PCR amplifikacije je bilo relativno zahtjevno, budući da specifična fenolna jedinjenja, odnosno njihov značajan sadržaj u listu heljde, otežavaju proces ekstrakcije DNK u smislu dobijanja čistog izolata, što stvara određene komplikacije prilikom optimizacije

procesa PCR-a. U tabeli 2 predstavljeni su SSR profili svih uzoraka tatarske heljde za sedam zadržanih mikrosatelitnih markera.

Tabela 2. SSR profili 5 analiziranih populacija tatarske heljde dobivenih upotrebom sedam SSR markera

Table 2. SSR profiles (allele sizes expressed in base pairs) of 5 analyzed Tartary buckwheat populations investigated using 7 SSR markers

Uzorak	Loc1	Loc2	Loc3	Loc4	Loc5	Loc6	Loc7
Pop128-1	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
Pop128-2	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
Pop128-3	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
Pop128-4	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
Pop128-5	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
Pop129-1	200:202	157:157	191:191	240:242	158:158	128:145	100:112
Pop129-2	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:145	100:112
Pop129-3	198:198	157:157	183:183	240:242	158:158	128:145	100:112
Pop129-4	202:202	157:157	183:183	240:242	158:168	128:128	112:116
Pop129-5	200:202	155:157	183:191	240:242	158:173	128:128	100:110
PopB2-1	198:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopB2-2	198:202	155:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopB2-3	198:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopB2-4	198:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopB2-5	198:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopDR-1	200:200	157:157	183:183	240:242	158:173	128:128	100:100
PopDR-2	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
PopDR-3	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
PopDR-4	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:112
PopDR-5	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:128	100:100
PopJG-1	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:147	100:112
PopJG-2	200:202	155:157	183:189	242:242	158:158	128:128	112:114
PopJG-3	200:202	157:157	183:183	240:242	158:158	128:147	100:112
PopJG-4	200:202	157:157	183:189	240:242	158:158	128:147	100:112
PopJG-5	200:202	157:157	185:210	242:244	158:158	128:149	112:114

Alelna varijacija

Na osnovu dobijenih genetičkih profila utvrđen je broj različitih alela dobijen primjenom svakog od korištenih prajmer parova. Očitanjem alela je određen i raspon alela izražen u broju baznih parova najkraće i najduže amplificirane sekvence za pojedini marker (Tabela 3).

Tabela 3. Broj alela, raspon alela, ustanovljena heterozigotnost (Ho), očekivana heterozigotnost (He), PIC vrijednost te prosjeci svih navedenih parametara za sedam SSR lokusa na 25 uzoraka tatarske heljde

Table 3. Number of alleles, allele size range, observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphism information content (PIC), and their average values for 7 SSR loci on 25 samples of Tartary buckwheat

Lokus	Šifra lokusa	Broj alela	Raspon (bp)	Ho	He	PIC
GB-FE-043	(Loc1)	3	198/202	0,875	0,611	0,514
GB-FE-191	(Loc2)	2	155/157	0,120	0,115	0,106
Fem1303	(Loc3)	5	183/210	0,160	0,260	0,246
Fem1840	(Loc4)	3	240/244	0,955	0,532	0,406
Fes1094	(Loc5)	3	158/173	0,120	0,117	0,111
Fes1368	(Loc6)	4	128/149	0,250	0,233	0,219
Fes1497	(Loc7)	5	100/116	0,640	0,534	0,452
Srednja vrijednost		3,6		0,446	0,343	0,293

Sedam SSR prajmer parova primijenjenih na 5 lokalnih populacija tatarske heljde (5 uzoraka po populaciji) amplificiralo je 25 različitih alela, odnosno, prosječno 3,6 alela po lokusu. Broj otkrivenih alela varirao je od 2 alela, za GB-FE-191, do 5 alela za Fem1303 i Fes1497. Prosječan broj od 3,6 alela po lokusu, veći je od 2,28 alela po lokusu detektovanog od strane Kishore *et al.* (2012) koji su analizirali 15 populacija tatarske heljde iz Indije.

Vrijednost ustanovljene heterozigotnosti (Ho) se kretala u granicama od 0,120 za GB-FE-191 i Fes1094, do visokih 0,955 za Fem1840, sa prosječnih 0,446 za sve analizirane lokuse, dok se vrijednost očekivane heterozigotnosti (He) kretala od 0,115 za GB-FE-191, do 0,611 za GB-FE-043, sa prosječnih 0,343 kada se u obzir uzmu svi analizirani lokusi na 25 uzoraka heljde.

U do sada objavljenim studijama na genetičkoj karakterizaciji heljde, vrijednosti ustanovljene heterozigotnosti su se kretale od 0,220 kod GB-FE-043 do 0,620 kod GB-FE-191 (Song *et al.*, 2011), kada je u pitanju obična heljda, odnosno do 0,210 za tatarsku heljdu (Kishore *et al.*, 2012), dok su se vrijednosti očekivane heterozigotnosti kretale u granicama od 0,350 (GB-FE-043) do 0,901 (Fem1303) (Song *et al.*, 2011; Iwata *et al.*, 2005) kod obične, odnosno do 0,023 kod tatarske heljde (Kishore *et al.*, 2012). Povezanost između samooplodnje i niskih vrijednosti za heterozigotnost je primijećena kod mnogih biljaka. Budući da je *F. tartaricum* samooplodna vrsta, nizak nivo heterozigotnosti je bio očekivan i u ovom slučaju.

Međutim, vrijednosti dobivene u našoj studiji su sličnije vrijednostima dobivenim analizirajući stranooplodnu, običnu heljdu (*F. esculentum*). Relativno visok nivo heterozigotnosti, a samim time i visok nivo genetičkog diverziteta unutar pojedinih, analiziranih populacija, najvjerovatnije su posljedica povremene stranooplodnje u uslovima gdje je križanje različitog genetičkog materijala moguće. Iako se heljda na području BiH proizvodila još u 18. stoljeću (Gadžo *et al.*, 2017), proizvodnja ove kulture poslije II svjetskog rata u potpunosti prestaje, tako da je upitno koja geografska područja su sačuvala ovaj resurs. S druge strane, nepoznato je da li se u proizvodnji nalazila tatarska heljda. Zasigurno se zna da je tatarska heljda na područje BiH došla u kontingentu sjemena obične heljde poslije ratnih dešavanja (1992-1995), kada se ponovo uspostavila proizvodnja ove kulture na poljoprivrednim površinama širom BiH. U nedostatku sjemenskog materijala, isti je, bez postojanja ikakve strategije, nabavljan od različitih dobavljača, nerijetko čak i za pojedinačne proizvođače, pri čemu su, najvjerovatnije, na ovo područje došle i razne populacije tatarske heljde, od kojih se samo neke komercijalno proizvode. Važno je istaći i to da su na proizvodnim parcelama obična i tatarska heljda često zastupljene u vidu kombinovanih usjeva. Dakle, ne može se govoriti o genetičkom diverzitetu tatarske heljde kao rezultatu dugogodišnje interakcije germplazme i okolišnih faktora, jer podaci o introdukciji i proizvodnji ove kulture nisu poznati, nego samo kao posljedici stranooplodnje. Za razliku od surovih uslova u područjima iz kojih su kolekcionisani predstavnici populacija tatarske heljde (Kishore *et al.*, 2012), aktivnost pčela, kao ključnih oprašivača ove vrste, u proizvodnim uslovima kakvi vladaju u BiH je značajno veća, što, najvjerovatnije, utječe i na nivo same stranooplodnje.

Vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC) su se kretale od 0,106 do 0,514, ponovo za lokuse čije alele amplifiriraju prajmer parovi GB-FE-191, odnosno GB-FE-043, sa prosječnom vrijednošću od 0,293 za sve analizirane lokuse. Ustanovljena vrijednost za PIC je mnogo niža od vrijednosti dobijene od strane Kishore *et al.* (2012), gdje se vrijednos PIC-a kretala od 0,84 do 0,99, sa prosječnih 0,93 za sve markere. Treba uzeti u obzir da je u navedenoj studiji analizirano 15 populacija tatarske heljde kolekcionisanih na području Zapadnih Himalaja, pri čemu se nadmorska visina datih područja kretala u granicama od 550 do 3.650 m, kao i činjenicu da se pomenute populacija na ovim prostorima nalaze već stotinama godina.

Genetički odnosi

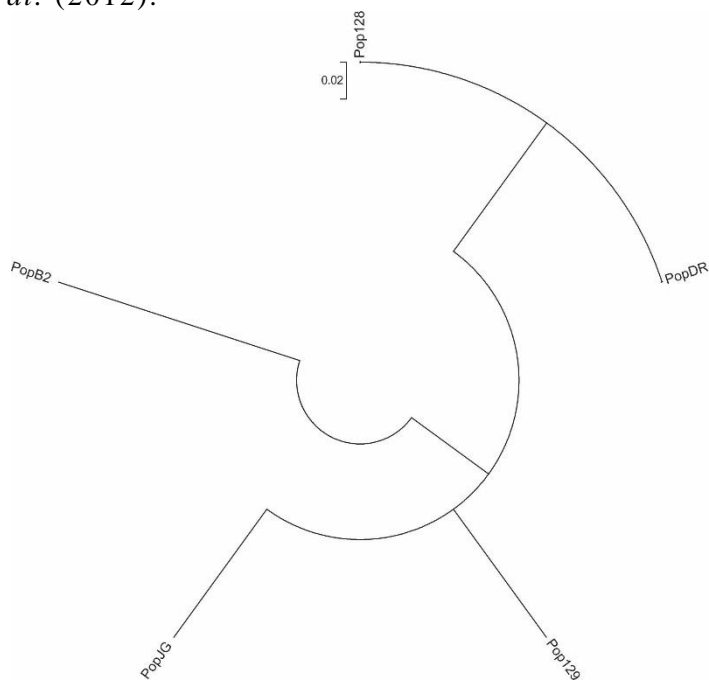
U cilju ispitivanja genetičke diferencijacije između analiziranih populacija tatarske heljde provedena je analiza molekularne varijanse (AMOVA) na podacima dobivenim analizom 7 SSR lokusa (Tabela 4).

Tabela 4. AMOVA za svaki od poređenih parova populacija tatarske heljde
Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for each combination of analyzed Tartary buckwheat populations

Izvori varijacije	SS	Komponente varijanse	Ukupna varijansa (%)	f_{CT}	P
Pop128 i Pop129					
Između skupina	1	9,05	49,2	0,492	0,008
Unutar skupina	8	9,35	50,8		
Pop128 i PopB2					
Između skupina	1	6,80	97,1	0,971	0,008
Unutar skupina	8	0,20	2,9		
Pop128 i PopDR					
Između skupina	1	0,00	0,0	0,000	1,000
Unutar skupina	8	2,90	100,0		
Pop128 i PopJG					
Između skupina	1	12,03	61,4	0,614	0,008
Unutar skupina	8	7,58	38,6		
Pop129 i PopB2					
Između skupina	1	3,69	27,9	0,279	0,008
Unutar skupina	8	9,55	72,1		
Pop129 i PopDR					
Između skupina	1	5,65	31,6	0,316	0,028
Unutar skupina	8	12,25	68,4		
Pop129 i PopJG					
Između skupina	1	0,00	0,0	0,000	1,000
Unutar skupina	8	2,90	100,0		
PopB2 i PopDR					
Između skupina	1	4,36	58,4	0,584	0,008
Unutar skupina	8	3,10	41,6		
PopB2 i PopJG					
Između skupina	1	6,75	46,5	0,465	0,008
Unutar skupina	8	7,78	53,5		
PopDR i PopJG					
Između skupina	1	9,51	47,6	0,476	0,008
Unutar skupina	8	10,47	52,4		

Analizom podataka 7 mikrosatelitnih lokusa populacija tatarske heljde, AMOVA pokazuje jako interesantne rezultate. Naime, pri poređenju populacija Pop128 i PopDR,

kao i populacija Pop129 i PopJG, ustanovljeno je da je ukupna varijansa zadržana unutar analiziranih skupina. Navedeno znači da se u slučaju Pop128 i PopDR, odnosno u slučaju Pop129 i PopJG, radi o istom genetičkom materijalu. Kada je u pitanju populacija PopB2 (iz Ustikoline), ista se razlikuje od Pop128/PopDR ali i od Pop129/PopJG, s tim da je daleko veći f_{CT} zabilježen pri poređenju PopB2 sa populacijom Pop128/PopDR. Važno je istaći i to da je primijećena visoka genetička varijabilnost unutar pojedinih skupina u skoro svim slučajevima, iako su visoke vrijednosti ovoga parametra karakteristične za stranooplodne biljke (Duminil *et al.*, 2007; Nybom, 2004), za razliku od podataka objavljenih u radu Kishore *et al.* (2012), gdje je na varijansu unutar populacija otpadalo u prosjeku 7,77 % od ukupne varijanse. Zanimljivo je da nivo genetičke raznolikosti između analiziranih populacija tatarske heljde raste sa povećanjem geografske udaljenosti između lokacija sa kojih je vršeno uzorkovanje, što je u podudarnosti sa rezultatima studije provedene od strane Kishore *et al.* (2012).



Grafikon 1. UPGMA klaster analiza na osnovu polimorfizma 7 SSR lokusa na 5 populacija tatarske heljde upotrebom Jaccard udaljenosti

Figure 1. UPGMA cluster analysis based on polymorphisms of 7 SSR loci in 5 Tartary buckwheat populations using Jaccards distance

Promatranjem dendrograma iz UPGMA klaster analize se može primijetiti da su 5 analiziranih populacija tatarske heljde formirale tri skupine. Naime, populacije Pop128 i PopDR su grupisane u jedan klaster i između njih ne postoje razlike. U drugi klaster su svrstane populacije Pop129 i PopJG, s tim da je primjetna mala razlika koja je posljedica alelnih varijanti na lokusu Fes1368 (128:145 za Pop129 i 128:147 za PopJG).

Populacija B2 je, kao najdivergentnija od analiziranog materijala, smještena u treći klaster. Rezultati dobiveni ovim pristupom su u velikoj podudarnosti sa rezultatima AMOVA-e.

ZAKLJUČAK

Dokazane su značajne genetičke razlike između populacija tatarske heljde iz različitih proizvodnih regija ove poljoprivredne vrste. Trenutno stanje kada je u pitanju genetički diverzitet analiziranih populacija tatarske heljde na području BiH rezultat je aktivnosti vezanih za reintrodukciju heljde na ovo područje, nestrategičkog pristupa nabavci sjemenskog materijala, nestručnih pristupa samoj proizvodnji (kombinovani usjevi), ali i prisustva djelimične stranooplodnje kod ove poljoprivredne vrste. Bolji uvid u genetičke odnose između populacija tatarske heljde mogao bi se dobiti upotrebom većeg broja SSR markera koji su namjenski dizajnirani za razdvajanje pojedinih populacija unutar vrste *F. tartaricum*.

LITERATURA

- Duminil, J., Fineshi, S., Hampe, A. (2007): Can population genetic structure be predicted from life –history traits? *The American Naturalist*, 169: 662–672.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Gadžo, D., Đikić, M., Hadžić, A., Muminović, Š., Gavrić, T. (2008): Uticaj vremena sjetve na prinos heljde. *Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 59(1): 69-76.
- Gadžo, D., Đikić, M., Oručević-Žuljević, S., Gavrić, T., Grahić, J. (2016): Proizvodnja heljde u brdsko-planinskim područjima - dosadašnja iskustva i budući izazovi. Zbornik radova Simpozija Unapređenje poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede u kraškim, brdskim i planinskim područjima – racionalno korištenje i zaštita, 23. juni 2016, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, pp. 51-59.
- Gavrić, T., Gadžo, D. (2011): Prinos i hemijski sastav zrna obične i tatarske heljde pri različitim tehnologijama uzgoja. *Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 61(1): 7-17.
- Grahić, A., Grahić, J. (2017): MADC – Marker Analysis Data Compiler user's Manual. (www.divisionagro.ba/apps/docs/madc-marker-analysis-data-compiler/user-manual).
- Grahić, J., Đikić, M., Gadžo, D., Kurtović, M., Šimon, S., Lazarević, B., Vranac, A., Gaši, F. (2016a): Ispitivanje utjecaja organskih peletiranih đubriva na hemijski sastav i parametre prinosa heljde. *Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 66(2): 31-47.
- Grahić, J., Đikić, M., Gadžo, D., Šimon, S., Kurtović, M., Pejić, I., Gaši, F. (2018): Assessment of genetic relationships among Common Buckwheat (*Fagopyrum*

- esculentum* Moench) varieties from Western Balkans using morphological and SSR molecular markers. *Genetika*, 50(3): 791-802.
- Grahić, J., Đikić, M., Gadžo, D., Uzunović, M., Okić, A., Kurtović, M., Gaši, F. (2016b): Analiziranje agronomske prakse proizvođača heljde na području Bosne i Hercegovine. *Radovi Poljoprivredno-prehrambenog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 66(2): 21-30.
- Grahić, J., Kurtović, M., Đikić, M., Šimon, S., Gaši, F. (2017): Genetic purity assessment of common buckwheat variety 'Darja' with the use of SSR molecular markers. *Genetics & Applications*, 1(2): 8-13.
- Hardy, O. J., Vekemans, X. (2002): A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population level. *Molecular Ecology Notes*, 2: 618-620.
- 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: 367-377.
- Kishore, G., Gupta, S., Pandey, A. (2012): Assessment of population genetic diversity of *Fagopyrum tataricum* using SSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43: 32-41.
- Li, Y.Q., Shi, T.L., Zhang, Z.W. (2007): Development of microsatellite markers from tartary buckwheat. *Biotechnology Letters*, 29(5): 823-827.
- Ma, K.H., Kim, N.S., Lee, G.A., Lee, S.Y., Lee, J.K., Yi, J.Y., Park, Y.J., Kim, T.S., Gwag, J.G., Kwon, S.J. (2009): Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(7): 1247-54.
- Meirmans, P., Van Tienderen, P., (2004): Genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4(4): 792-794.
- Nybom, H. (2004): Comparison of different nuclear DNA markers for estimating genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143-1155.
- Ohsako, T., Fukuoka, S., Bimb, H.P., Baniya, B.K., Yasui, Y., Ohnishi, O. (2001): Phylogenetic analysis of the genus *Fagopyrum* (*Polygonaceae*), including the Nepali species *F. megacarpum*, based on nucleotide sequence of the *rbcL-accD* region in chloroplast DNA. *Fagopyrum*, 18: 9-14.
- Ohta, T., Kimura, M., (1973): A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Resources*, 22(2): 201-204.
- R Core Team (2016): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Song, Y.J., Lee, G.A., Yoon, M.S., Ma, K.H., Choi, Y.M., Lee, J.R., Jung, Y., Park, H.J., Kim, C.K., Lee, M.C. (2011): Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.)

Landraces of Korea Using SSR Markers. Korean Journal of Plant Resources, 24(6) : 702-711.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.

GENETIC VARIABILITY OF TATARY BUCKWHEAT POPULATIONS (*FAGOPYRUM TARTARICUM* (L.) GAERTN.) PRESENT IN BOSNIA AND HERZEGOVINA

Summary

This study aimed to examine the genetic variability of tatar buckwheat populations (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) from Bosnia and Herzegovina. Sampling was performed on a total of 25 samples with 5 samples from each population. Collected samples were lyophilized and afterward, DNA extraction was conducted using a peqGOLD plant DNA kit. A total of ten primers were used for DNA amplification, where seven primers pairs resulted in successful amplification. The results showed that polymorphisms were detected on all of the analyzed loci. Also, significant genetic differences between populations of tatar buckwheat from different production regions of this agricultural species have been proven.

Key words: tatar buckwheat, microsatellite markers, genetic relations, analysis of molecular variance, genetic structure analysis