

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana S. Nikolić

**IDENTIFIKACIJA GENSKIH LOKUSA  
(*QTL*) UKLJUČENIH U KONTROLU  
ODGOVORA KUKURUZA (*ZEAMAYS* L.)  
NA STRES SUŠE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana S. Nikolić

**IDENTIFICATION OF QUANTITATIVE  
TRAIT LOCI (*QTLs*) FOR DROUGHT  
TOLERANCE RESPONSE IN MAIZE  
(*ZEA MAYS* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**MENTORI:**

**Vanredni profesor dr Marina Stamenković - Radak,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet**

**Viši naučni saradnik dr Dragana Ignjatović - Micić,  
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd**

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Gostujući profesor dr Steve A. Quarrie  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet**

**Viši naučni saradnik dr Violeta Anđelković,  
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd**

**Datum odbrane:**

Eksperimentalni deo ovog rada je realizovan na Institutu za kukuruz, Zemun Polje.

Zahvaljujem se svom mentoru dr Dragani Ignjatović - Micić na svesrdnoj pomoći, interesovanju, veoma korisnim savetima, usmeravanju, uloženom vremenu, trudu i pokazanom razumevanju u svim fazama izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr Violeti Anđelković na veoma korisnim savetima iz oblasti fiziologije suše, na kontinuiranom praćenju mog rada, pomoći i naporima da se izrada doktorata dovede do kraja.

Zahvaljujem se dr Steve Quarrie-u za ideju, praćenje mog rada, korisne savete i usmeravanje tokom izrade doktorata, što će biti od velikog značaja za moj budući naučno- istraživački rad.

Dr Marini Stamenković Radak se zahvaljujem na pokazanoj izuzetnoj profesionalnosti, brzini i pristupačnosti u rešavanju svih pitanja vezanih za izradu disertacije, od stručnih do tehničkih.

Hvala dr Vesni Lazić Jančić, naučnom savetniku Instituta za kukuruz kao i dr Sofiji Pekić Quarrie profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, na idejama, svakoj vrsti pomoći i doprinosu izradi doktorata. Takođe, zahvaljujem se članovima Katedre za botaniku Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu za pomoć u toku izrade eksperimentalnog dela doktorata, koji se odnosi na ispitivanje fizioloških osobina.

Dr Dejanu Dodigu hvala na ukazanoj pomoći tokom statističke obrade podataka i korisnom usmeravanju prilikom njihove interpretacije.

Hvala svim kolegama Instituta za kukuruz koji su na bilo koji način doprineli izradi ovog doktorata. Posebno se zahvaljujem svim članovima laboratorije za biotehnologiju Instituta za kukuruz koji su bili zaposleni u njoj u periodu izrade doktorske disertacije na pruženoj pomoći u toku rada na eksperimentu, velikom razumevanju i podršci.

Hvala dipl. ing. elektrotehnike Slaviši Nikoliću na pomoći prilikom statističke obrade podataka.

Hvala mojoj porodici i mojim prijateljima zbog čije ljubavi, podrške i svake vrste pomoći koju su mi pružili nisam odustala onda kad mi se činilo da su prepreke nesavladive.

# IDENTIFIKACIJA GENSKIH LOKUSA (*QTL*) UKLJUČENIH U KONTROLU ODGOVORA KUKURUZA (*ZEAMAYS L.*) NA STRES SUŠE

## SAŽETAK

Suša je jedan od najvažnijih ograničavajućih faktora u proizvodnji kukuruza, pa je poboljšanje tolerantnosti na sušu od veoma velikog značaja u programima oplemenjivanja. Stvaranje genotipova tolerantnih na sušu je veliki izazov zbog variranja u pojavljivanju, intenzitetu i trajanju stresa suše, zbog genetičke kompleksnosti ovog stresa i izraženih interakcija genotip-sredina. Identifikacija kvantitativnih lokusa vezanih za tolerantnost na sušu je važno sredstvo za indirektnu selekciju pomoću molekularnih markera. Istovremena primena konvencionalnog sa molekularnim oplemenjivanjem, marker-asistiranom selekcijom i genetičkim inženjeringom može doprineti bržem načinu za poboljšanje tolerantnosti na sušu kod gajenih biljaka.

Identifikacija lokusa za kvantitativna svojstva (*QTL*) za tolerantnost na sušu kod kukuruza je urađena na genetičkom materijalu dobijenom ukrštanjem linija DTP79 (izvor tolerantnosti na sušu) i B73 (linija osetljiva na sušu). Za konstruisanje molekularne mape neophodne za identifikaciju *QTL*-ova, korišćena je  $F_2$  generacija (*John Innes Centre (JIC), Norwich, United Kingdom*). Podaci o vrednostima svojstava potencijalno uključenih u odgovor kukuruza na stres suše su dobijeni analizom  $F_3$  familija u poljskim ogledima. Molekularna mapa i dobijene vrednosti za ispitivana svojstva su korišćene za detekciju *QTL*-ova. Na osnovu informacija o *QTL*-ovima je vršeno utvrđivanje postojanja uzročne povezanosti između dva ili više svojstava.

Fenotipske korelacije su izračunate primenom *Pearson*-ovog koeficijenta i bile su visoko značajne za izvestan broj ispitivanih osobina. Identifikacija *QTL*-ova je urađena primenom ANOVA metode i metoda statističkog programa WinQTL karotgrafera, v 2.5. Prikazani su samo rezultati dobijeni primenom CIM (WinQTL karotgrafer, v 2.5) i ANOVA metode. Za ispitivanih 26 osobina primenom CIM metode je detektovano 147 *QTL*-ova, od kojih je 93 detektovano i primenom ANOVA metode. Ukupna fenotipska varijabilnost objašnjena identifikovanim *QTL*-ovima za sva analizirana svojstva je bila u opsegu od 11.85% (RSV) do 91.16% (ŠL3). Detektovani

su hromozomski regioni u kojima se preklapaju QTL-ovi za pojedine osobine, koje su istovremeno pokazale i značajnu međusobnu fenotipsku korelaciju, što ukazuje na moguće postojanje vezanih gena ili plejotropnih efekata koji utiču na ove osobine. Neki od detektovanih QTL-ova su identifikovani i u radovima drugih autora, na istoj poziciji u genomu kukuruza, što znači da su oni zajednički različitom genetičkom materijalu. Ovi QTL-ovi mogu biti od značaja u ekspresiji ispitivanih svojstava, ukazujući na mogućnost njihovog uspešnog korišćenja u marker - asistiranoj selekciji.

**Ključne reči:** kukuruz, tolerantnost na sušu, QTL-ovi

**Naučna oblast:** BIOLOGIJA

**Uža naučna oblast:** MOLEKULARNA GENETIKA BILJAKA

**UDK broj:** 575.22::582.522.5]:633.15]:551.38(075.8)

## **IDENTIFICATION OF QUANTITATIVE TRAIT LOCI (*QTLs*) FOR DROUGHT TOLERANCE RESPONSE IN MAIZE (*ZEA MAYS* L.)**

### **ABSTRACT**

Drought is one of the most important limiting factors in maize production. Improving drought tolerance is therefore of outmost importance for breeding. Achieving this goal is a big challenge due to the variability in timing, intensity and duration of drought, genetic complexity of drought tolerance and large genotype by environment interactions. Identification of quantitative loci for drought tolerance is very important for indirect selection using molecular markers. Conventional breeding together with molecular breeding, marker-assisted selection and genetic engineering could contribute to drought tolerance improvement of cultivated plants.

Quantitative trait loci (*QTLs*) for drought tolerance were identified in a maize population derived from a cross between two lines - DTP79 (drought tolerant) and B73 (drought sensitive). Map construction (*John Innes Centre (JIC), Norwich, United Kingdom*) was done using  $F_2$  generation and the corresponding  $F_3$  progenies were evaluated for the traits potentially related to drought tolerance in field trials. Phenotypic and marker data were used for *QTL* detection. Possible causal relationships between two or more traits were determined according to information about *QTLs*.

Phenotypic correlations calculated using Pearson's coefficients were highly significant for some of the analyzed traits. ANOVA and methods of Win*QTL* Cartographer 2.5 were employed to identify *QTLs*. Results of ANOVA and CIM option in Win*QTL* cartographer, v 2.5 are presented. A total of 147 *QTLs* were detected using CIM for the analyzed traits. Out of this number, 93 were also detected using ANOVA. Percent of phenotypic variability determined for the identified *QTLs* for all of the traits ranged from 11.85% (RWC) up to 91.16% (LW3). Mapping analysis identified genomic regions associated with two or more traits in a manner that was consistent with phenotypic correlation between traits, supporting the possible existence of linked genes or pleiotrophy that influence these traits. Some of the *QTLs* mapped herein, were also identified in the works of other authors, at the same position in the maize genome, indicating that they could represent regions that are common to various populations.

These QTLs may be important in the expression of the traits, indicating the possibility of their successful use in marker-assisted selection.

**Key words:** maize, drought tolerance, QTLs

**Scientific field:** BIOLOGY

**Special topic:** MOLECULAR GENETICS OF PLANTS

**UDK number:** 575.22::582.522.5]:633.15]:551.38(075.8)



## SADRŽAJ

<b>SKRAĆENICE</b>	<b>I</b>
<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Klimatske promene</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Suša</b>	<b>2</b>
1.2.1. Adaptivni mehanizmi odgovora biljke na stres suše	4
1.2.2. Stres suše kod kukuruza	6
<b>1.3. Molekularno genetički pristupi u ispitivanju tolerantnosti na sušu</b>	<b>9</b>
1.3.1. Genetički markeri	10
1.3.2. Molekularni markeri	11
1.3.3. RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) markeri	11
1.3.4. PCR molekularni markeri	13
1.3.4.1. RAPD ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ) markeri	13
1.3.4.2. SSR ( <i>Simple Sequence Repeat</i> ) markeri	14
1.3.4.3. AFLP ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> ) markeri	15
1.3.4.4. SNP ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ) markeri	16
1.3.5. Molekularni markeri u oplemenjivanju	17
<b>1.4. Identifikacija QTL-ova</b>	<b>18</b>
1.4.1. Kvantitativne osobine i mapiranje QTL-ova	18
1.4.2. Konstrukcija molekularnih mapa	19
1.4.3. Metode za detekciju QTL-ova	20
1.4.4. Identifikacija QTL-ova za tolerantnost na sušu kod kukuruza	22
<b>1.5. Indirektna selekcija i suša</b>	<b>26</b>
<b>1.6. Izgledi za budućnost</b>	<b>28</b>
<b>2. Cilj rada</b>	<b>30</b>
<b>3. Materijal i metode</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Biljni materijal</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Agroekološki uslovi i fenotipska merenja</b>	<b>31</b>
3.2.1. Sadržaj vlage u zemljistu	32

3.2.2. Sadržaj azota u zemljestu	33
3.2.3. Fenotipska merenja	33
<b>3.3. Molekularne analize</b>	38
3.3.1. Izolacija DNK	38
3.3.2. Određivanje koncentracije i proveravanje kvaliteta DNK	39
3.3.3. RFLP analiza	40
3.3.3.1. Restrikcija DNK	40
3.3.3.2. Elektroforeza digestovanih fragmenata	40
3.3.3.3. <i>Southern blot</i>	40
3.3.3.4. Mini-prep	41
3.3.3.5. Radioaktivno obeležavanje DNK proba	42
3.3.3.6. Hibridizacija i detekcija	43
3.3.4. SSR analiza	44
3.3.5. AFLP analiza	45
3.3.6. DNK <i>dot blot</i>	47
<b>3.4. Statističke metode za fenotipska svojstva</b>	48
<b>3.5. Konstrukcija molekularne mape</b>	48
<b>3.6. Identifikacija QTL-ova</b>	48
 <b>4. Rezultati</b>	 50
4.1. Agroekološki uslovi	50
4.1.1. Osnovni meteorološki parametri	50
4.1.2. Vлага u zemljištu u toku vegetacione sezone	50
4.1.3. Sadržaj azota u zemljištu u toku vegetacione sezone	51
4.1.4. Kontrole	53
4.2. Analiza fenotipskih podataka	53
4.2.1. Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti ispitivanih osobina	53
4.3. Fenotipske korelacije	56
4.3.1. Fenotipske korelacije između prinosa i komponenti prinosa	56
4.3.2. Fenotipske korelacije između komponenti prinosa	56
4.3.3. Fenotipske korelacije između morfoloških osobina	56
4.3.4. Fenotipske korelacije između ASI i DS	57

4.3.5. Fenotipske korelacije između fizioloških osobina	57
4.3.6. Fenotipske korelacije između morfoloških, ASI, DS i fizioloških osobine	58
<b>4.4. Molekularna mapa</b>	60
<b>4.5. QTL analiza</b>	62
4.5.1. Identifikacija QTL-ova za tolerantnost na sušu	62
4.5.2. Kolokacije QTL-ova za osobine sa signifikantnim fenotipskim korelacijama	76
 <b>5. Diskusija</b>	 80
 <b>6. Zaključci</b>	 94
 <b>7. Literatura</b>	 96

#### **Prilozi:**

**Prilog 1** Rezultati statističkih analiza za nekoliko ispitivanih svojstava sa i bez vrednosti za dve familije čija je srednja vrednost za prinos značajno odstupala od srednje vrednosti za ostale ispitivane familije

**Prilog 2** Distribucija učestalosti vrednosti  $F_3$  familija za sva ispitivana svojstva

**Prilog 3** Prikaz rezultata za QTL-ove identifikovane primenom ANOVA metode

**Prilog 4** Prikaz rezultata za QTL-ove identifikovane primenom SMA i IM metode za dve ispitivane osobine

**Prilog 5** Prikaz kolokacija QTL-ova za ispitivane osobine primenom CIM metode - prinos i ostala svojstva

**Prilog 6** Prikaz kolokacija QTL-ova za ispitivane sve ispitivane osobine primenom CIM metode

## SKRAĆENICE

<b>AFLP</b>	-polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata
<b>ANOVA</b>	- analiza varijanse
<b>ASI</b>	- period između metličanja i svilanja
<b>BGM</b>	- broj grana metlice
<b>BL</b>	- broj listova
<b>BR</b>	- broj redova na klipu
<b>BZ</b>	- broj zrna u redu
<b>CIM</b>	- kompozitno intervalno mapiranje
<b>DEZ</b>	- debljina zrna
<b>DK</b>	- dužina klipa
<b>DM</b>	- dužina metlice
<b>DS</b>	- ocena odgovora na sušu
<b>DTP</b>	- populacija tolerantna na sušu
<b>DUZ</b>	- dužina zrna
<b>IM</b>	- intervalno mapiranje
<b>MAS</b>	- marker - asistirana selekcija
<b>MZ</b>	- masa zrna
<b>OP</b>	- osmotski potencijal
<b>PK</b>	- prečnik klipa
<b>PR</b>	- prinos
<b>QTL</b>	- lokus odgovoran za ekspresiju kvantitativnog svojstva
<b>RCB</b>	- dizajn ogleda po slučajanom blok sistemu
<b>RFLP</b>	- polimorfizam restrikcionih fragmenata različite dužine
<b>RSV</b>	- relativni sadržaj vode
<b>SMA</b>	- analiza pojedinačnog markera
<b>SSR</b>	- jednostavne ponavljajuće sekvence
<b>SŠ</b>	- sadržaj šećera
<b>ŠL3</b>	- širina trećeg lista
<b>ŠL4</b>	- širina četvrtog list

<b>ŠZ</b>	- širina zrna
<b>VB</b>	- visina biljke
<b>VK</b>	- visina do klipa

## 1. UVOD

Kukuruz (*Zea mays*, L.) je biljna vrsta koja se gaji već 7000 godina. Nalazi se na trećem mestu po površini gajenja među usevima, odmah posle pšenice i pirinča.

Usled povećanja potreba za hranom u zemljama u razvoju, kao i povećanja potreba u prerađivačkoj industriji, a u poslednje vreme sve više i korišćenja za proizvodnju tzv. biogoriva (Torney i sar., 2007; Schgiwietzke i sar., 2008), organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organisation* - FAO) predviđa da će biti potrebno proizvesti dodatnih 60 miliona tona kukuruza godišnje do 2030.

### 1. 1. Klimatske promene

Porast broja stanovnika, dostupnost obradivog zemljišta i klimatske promene imaju veliki uticaj na sposobnost poljoprivrede da zadovolji potrebe za hranom i gorivom u ovom veku. Naučnici predviđaju da će broj stanovnika na zemlji dostići broj od 9 milijardi do sredine 21-og veka. U budućnosti, biće sve manje plodnog zemljišta usled urbanizacije, salinizacije i pretvaranja zemljišta u pustinje, a nestašica vode je već ozbiljan problem u nekim delovima sveta (Godfray i sar. 2010).

U dvadesetom veku prosečni porast temperature na globalnom nivou je iznosio 0.8°C, što veoma zabrinjava, s obzirom na činjenicu da je za tih 100 godina brzina porasta temperature veća nego za prethodnih 10 000 godina. U naučnom izveštaju o proceni klimatskih promena Prve radne grupe Međuvladinog panela za promenu klime (IPCC, 2007) ističe se da će dalji porast emisije gasova sa efektom staklene bašte uzrokovati dodatno prosečno globalno zagrevanje atmosfere, od 1.9-4.6 °C do 2100 godine, sa brzinom promene temperature od 0.3 °C po deceniji.

Trend rasta temperature vazduha i smanjenja količine padavina u drugoj polovini 20-og veka zabeležen je i na većem delu teritorije Srbije. U periodu od 1950-2000 godine najveće smanjenje padavina registrovano je u Negotinskoj krajini (oko 120 mm na godišnjem nivou). U slučaju da se samo delimično primene mere za smanjenje emisije štetnih gasova, predviđa se da će prosečna temperatura u Srbiji do kraja 21. veka

porasti za 3-4 °C. Za navedeni scenario, smanjenje količine padavina u Jugoistočnoj Evropi, gde se nalazi i Srbija, iznosilo bi oko 22% krajem ovog veka (IPCC, 2007).

Prinos žitarica i voća u svetu u 2003. godini (prosečna godišnja temperatura bila je samo za 3.5 °C veća od prosečne) bio je 20 do 36% manji u odnosu na prosečne vrednosti (Fedoroff i sar. 2010). Prinos najznačajnijih useva naglo pada na temperaturama mnogo višim od 30°C. Do ovoga dolazi, zbog toga što je između ostalog, za glavne useve umerenih područja optimalna temperatura za fotosintezu od 20°C - 25°C stepeni, te sa porastom temperature dolazi do ubrzanog razvića biljaka i ostaje manje vremena za akumulaciju ugljenih hidrata, masti i proteina, koji čine glavninu ploda i zrna. Ukoliko se i dalje nastavi ovakav trend (povećanje temperature i smanjenje količine padavina), biće vrlo teško održati i povećati prinos najvažnijih useva (Fedoroff i sar. 2010).

U cilju prevazilaženja problema koji nastaju usled povećanja temperature, suše u nekim, a poplava u drugim regionima sveta, povećanja saliniteta i povećanja otpornosti patogena, među istraživačima se danas najviše govori o korišćenju i poboljšavanju konvencionalnog i molekularnog oplemenjivanja, kao i stvaranju genetički izmenjenih organizama.

## **1. 2. Suša**

Stres se sa fiziološkog aspekta definiše kao izmenjeno fiziološko stanje uzrokovano faktorima koji nastoje da naruše ravnotežu (homeostazis) u organizmu (Jaleel i sar. 2009). Prilagodljivost metabolizma omogućava odgovor na promene uslova spoljašnje sredine, ukoliko te promene osciluju po određenom pravilu i predvidive su u toku dana ili sezone. Međutim, kada stres predstavlja prepreku za održavanje normalnog metabolizma on izaziva povrede, bolesti ili poremećaj u fiziološkim procesima. Stres može biti izazvan biotičkim (živi organizmi) ili abiotičkim faktorima (vetar, temperatura, svetlost, voda i vlažnost, zemljište, nadmorska visina, itd.).

Jedan od najznačajnijih abiotičkih stresova koji uzrokuje smanjenje prinosa kod useva je suša. Javlja se kada je u zemljištu smanjena količina vode koja je dostupna biljci, a atmosferski uslovi uzrokuju kontinuirano gubljenje vode transpiracijom i

evaporacijom (Jaleel i sar. 2009). Tolerantost na sušu prisutna je kod svih biljaka, ali je ona u različitoj meri izražena od vrste do vrste, a varira i u okviru vrste.

Suša najpre dovodi do promena vodnog balansa staništa, a zatim i do deficita vode u biljkama. Stoga se sa ekofiziološke tačke gledišta može reći da su biljke u stanju vodnog deficita (suše) kada je turgidnost njihovih tkiva manja od maksimalne (Pekić, 1989). Ovakvo stanje nastaje kada transpiracija nadjača usvajanje vode iz zemljišta, a može nastati i smanjivanjem vlage u zemljištu (zemljišna suša), povećanjem temperature vazduha (temperaturni šok), smanjenjem vlažnosti vazduha i povećanjem intenziteta strujanja vazduha (vazдушna suša).

Poboljšanje tolerantnosti na sušu bilo je ograničeno slabim poznavanjem genetičke i fiziološke osnove faktora koji uzrokuju gubitak sposobnosti biljke da se izbori sa ovim stresom, kao i niskom heritabilnošću prinosa i njegovih komponenti u slučaju nepovoljnih uslova (Tuberosa i Salvi 2004). Više složenosti ovom problemu daje prisutnost drugih tipova abiotičkog stresa koji obično pojačavaju negativni uticaj suše na rast i metabolizam (Passioura i sar., 2002; Mittler, 2005).

U novije vreme sve više se proučava kompleksna priroda ovog abiotičkog faktora pri čemu je potrebno razdvojiti produktivnost useva u uslovima suše od mehanizama za preživljavanje. Veoma je važno da usevi opstanu pod ovakvim uslovima i ostvare visok prinos. Stoga se, u kontekstu poljoprivredne proizvodnje, tolerantnost na sušu može definisati kao optimizacija prinosa useva u odnosu na ograničeno snabdevanje vodom (Wright i Rachaputi, 2004).

Efekti suše uočljivi su na svim nivoima počevši od morfoloških do molekularnih, i mogu se videti u svim fenološkim fazama rasta biljke. Tolerantnost na sušu (Mitra i sar., 2001) vezana je za veći broj morfoloških (ranostasnost, smanjena lisna površina, uvijanje listova, prisustvo razgranatog korenovog sistema, redukovano bokorenje), fizioloških (smanjenje transpiracije, visoka efikasnost u iskorišćavanju vode i osmotsko prilagođavanje), i biohemijskih osobina (akumulacija prolina i poliamina, smanjena aktivnost nitrata-reduktaze, povećana akumulacija ugljenih hidrata). Pod uticajem suše dolazi do smanjenja vodnog potencijala i gubitka turgora, zatvaranja stoma i smanjenja rasta i izduživanja ćelija. Poremećaji u mitozu, ćelijskom izduživanju i ekspanziji koji nastaju u uslovima suše mogu dovesti do smanjenja visine biljke i lisne površine (Taiz i Zeiger, 2006; Hussain i sar., 2008). Intenzivan stres izazvan sušom



može uzrokovati prestanak fotosinteze, poremećaj metabolizma i konačno smrt biljke (Jaleel i sar., 2008).

Na osnovu navedenog može se zaključiti da je odgovor na sušu složen, i to ne iznenađuje, imajući u vidu činjenicu da biljka mora da bude spremna da podnese značajne varijacije u temperaturi i vodnom potencijalu u toku razvića. Takođe, reakcije biljaka na sušu drugačije su na različitim nivoima organizacije u zavisnosti od intenziteta i trajanja stresa. Bolje razumevanje morfološke, anatomske i fiziološke osnove promena koje se događaju u biljci da bi omogućile tolerantnost na sušu, mogu se koristiti za selekciju ili kreiranje useva koji će pokazati bolju produktivnost u uslovima suše (Nam i sar., 2001).

### **1.2.1. Adaptivni mehanizmi odgovora biljke na stres suše**

Prema Turner-u (1979) adaptivni mehanizmi biljaka na vodni stres mogu se podeliti u tri osnovne grupe reakcija: izbegavanje suše, odlaganje suše (dehidratacija) i tolerantnost prema dehidrataciji.

Ove tri kategorije široko su prihvaćene i nastavljaju da, u nešto izmenjenoj formi, daju okvir za ocenjivanje potencijalnih svojstava koja se mogu koristiti u programima oplemenjivanja. Odgovor biljaka na deficit vode u tkivu odražava nivo njihove tolerantnosti na sušu.

Izbegavanje dehidratacije (suše) definiše se kao sposobnost biljke da završi svoj razvojni ciklus pre nego što dođe do značajnog deficita vode u zemljištu i biljci. Brzo se završava fenološki razvoj biljke (rano cvetanje i sazrevanje plodova) i izražena je plastičnost u fazi razvića (npr. dužina perioda rasta varira u zavisnosti od obima vodnog deficita).

Odlaganje dehidratacije je sposobnost biljke da zadrži relativno visok vodni potencijal tkiva, iako je vlažnost zemljišta smanjena. Procesi koji omogućavaju povećano uzimanje vode, njeno skladištenje u ćelijama i smanjenje gubljenja vode omogućavaju postojanje ovog mehanizma. Odlaganje suše postiže se održavanjem turgora kroz povećanje dužine korena, povećanje hidraulične provodljivosti, smanjenje gubitka vode kroz redukovanu epidermalnu (stomaterna i lenticelarna) provodljivost, redukovanu apsorpciju zračenja uvijanjem i savijanjem listova i smanjenje površine za

evaporaciju (manja lisna površina). U uslovima suše, biljke preživljavaju postižući ravnotežu između održavanja turgora i smanjenja gubitka vode. Smatralo se da abscisinska kiselina (ABA) utiče na regulisanje odavanja vode zatvaranjem stoma, kao i na održavanje turgora kod nekih žitarica. Iako ABA nesumnjivo ima značajnu ulogu u odgovoru biljke na stres, još uvek nije jasan njen značaj u kontekstu oplemenjivanja za povećanje tolerantnosti na sušu (Blum, 2005).

Tolerantnost na dehidraciju se definiše kao sposobnost ćelija biljke da održe metaboličke procese u uslovima niskog vodnog potencijala i podrazumeva održavanje turgora kroz *osmotsko prilagođavanje* (proces koji omogućava nagomilavanje materija u ćeliji), povećanje elastičnosti ćelije, smanjenje veličine ćelije i tolerantost na isušivanje (desikaciju). Osmotsko prilagođavanje omogućava održavanje provodljivosti stoma, fotosintezu i izduživanje listova u uslovima niskog vodnog potencijala (Jones i Rawson, 1979), kao i sprečavanje propadanja cvetova (Morgan i King, 1984) i pospešivanje usvajanja vode iz zemljišta uprkos smanjenju količine koja je dostupna (Morgan i Condon, 1986). Istraživanja su potvrdila da je ovo svojstvo vezano za povećanje prinosa kod gajenih biljaka kao što su npr. pšenica (Morgan, 1983) i sirak (Santamaria i sar., 1990). Takođe, zaštita od letalnih oštećenja u semenu povezana je sa akumulacijom šećera i proteina u ćeliji (Close i sar., 1993), a smatra se i da prolin ima značajnu ulogu u preživljavanju vodnog deficita i osmotskom prilagođavanju (Hanson i sar., 1982), mada mehanizmi delovanja još uvek nisu utvrđeni.

Međutim, većina ovih adaptacija na sušu ima nedostatke. Mehanizmi koji omogućavaju tolerantnost na sušu smanjenjem odavanja vode (zatvaranje stoma i smanjenje lisne površine) obično uzrokuju smanjeno usvajanje CO<sub>2</sub>, tj. smanjeno fotosintezu. Osmotsko prilagođavanje povećava tolerantnost na sušu održavanjem turgora biljke, ali povećanje koncentracije materija u ćeliji zahteva dodatnu količinu energije. Imajući sve navedeno u vidu, adaptacija useva na stres podrazumevala bi ravnotežu između svih opisanih mehanizama, uz zadržavanje adekvatne produktivnosti (Mitra, 2001).

### 1.2.2. Stres suše kod kukuruza

Uslovi za proizvodnju kukuruza u našoj zemlji analizirani su od strane velikog broja autora, i skoro svi su naveli nedostatak vodenog taloga u vegetacionom periodu kukuruza kao ograničavajući faktor za postizanje većih prinosa. Podaci o idealnim i stvarnim padavinama u Zemun Polju (44° 52' 14" severna geografska širina, 20° 19' 48" istočna geografska dužina, nadmorska visina 82m) za period od 10 godina izneti su u radu Trifunović (1960). U cilju postizanja ekonomski stabilnih prinosa u ovakvim uslovima neophodna je primena određenih agrotehničkih mera i korišćenje genotipova koji poseduju određeni stepen tolerantnosti na stres suše.

Konvencionalno oplemenjivanje zasnovano je na empirijskoj selekciji za prinos, ali je ovaj pristup daleko od idealnog s obzirom da je prinos kvantitativno svojstvo koje se karakteriše niskom heritabilnošću i visokim stepenom interakcije genotip-sredina (Babu i sar., 2003). Materijal odabran za selekciju mora da daje dobre rezultate i u uslovima kada ima dovoljno vode i u uslovima suše. Smatra se da je razumevanje fiziološke i molekularne osnove suše od ključnog značaja u identifikaciji svojstava koja ograničavaju prinos. Ovakav pristup može da se primeni zajedno sa klasičnim oplemenjivanjem i tako ubrza proces poboljšanja prinosa. Međutim, čak i mogućnosti molekularne biologije za lociranje važnih gena kao i za selekciju ili genetičku transformaciju lokusa za kvantitativna svojstva u velikoj meri zavise od razumevanja fizioloških procesa koji utiču na prinos (Araus i sar., 2002; Kirigwi i sar., 2007).

Idealan genotip za sušne uslove trebao bi da ima sledeće karakteristike (CIMMYT-ov program za kukuruz, Anđelković, 2000)

- korenov sistem koji poseduje sposobnost zadržavanja pristupačne vode u zemljištu
- rano cvetanje i rano sazrevanje zrna, ako je kišna sezona izvesna i kratka (nedostatak je relativno nizak prinos zbog kraće vegetacije)
- kasno sazrevanje sa relativno visokim prinosom u optimalnim uslovima i u uslovima suše (prinos je stabilan usled smanjenog efekta suše na broj i veličinu zrna)
- kratak preiod (mali broj dana) između metličenja i svilanja (ASI - *anthesis silking interval*)

- odloženo starenje (engl. *senescence*) listova
- tolerantnost na visoke temperature
- odsustvo uvijenosti lista
- odsustvo oštećenja površine lista
- jedan klip po biljci
- veliki broj zrna
- veliku masu zrna

Klasična selekcija se zasniva na testiranju potomstva na različitim lokacijama u uslovima sredine sa različito izraženim stepenom stresa suše (Babu i sar., 2003). Modifikacija ove strategije uključuje selekciju za potencijalna tzv. sekundarna svojstva koja omogućavaju adaptaciju na sušu (Ludlow i Muchow, 1990).

Sekundarna svojstva koja se mogu koristiti u ovu svrhu treba da poseduju sledeće karakteristike: 1) da su genetički vezana za prinos u uslovima suše 2) da su visoko heritabilna 3) da poseduju genetičku varijabilnost 4) da su stabilna i pogodna za merenje 5) da nisu vezana za gubitak prinosa u optimalnim uslovima gajenja (Edmeades i sar., 2001).

Sekundarna svojstva koja su značajna za tolerantnost kukuruza na stres suše (Edmeades i sar., 1997b) obuhvataju:

- komponente prinosa
- broj dana između metličanja i svilanja (ASI)
- relativno izduživanje lista u uslovima suše
- koncentraciju hlorofila u listu
- ocenu odgovora na sušu -uvijenost, položaj u odnosu na stablo i starenja listova (engl. *stay green*)- *drought score* (DS)
- veličinu i razgranatost metlice
- osmotsku koncentraciju u listu
- poleganje stabla
- temperaturu useva

Komponente prinosa imaju veću heritabilnost od prinosa (Austin i Lee 1996; Messmer i sar., 2009), tako da se njihovim poboljšanjem može postići povećanje prinosa (Gupta i sar., 2006). Brojnim studijama pokušana je da se rasvetli priroda odnosa između prinosa i komponenti prinosa (broj zrna po redu, broj redova po klipu,

dužina klipa, prečnik klipa, težina 100 zrna), sa ciljem da se ove osobine koriste za efikasniju selekciju i dobijanje većeg prinosa kako u uslovima normalne snabdevenosti vodom, tako i uslovima stresa suše.

Visina biljke, jedno od najvažnijih svojstva u programima oplemenjivanja kukuruza (Veldboom i Lee, 1996b), značajno je korelisano sa prinosom i ima važnu ulogu u obezbeđivanu otpornosti biljke na poleganje (Beavis i sar., 1991).

Dužina metlice i broj grana metlice su važna svojstva prilikom selekcije genotipova za tolerantnost na sušu, s obzirom na to da pokazuju zadovoljavajuću heritabilnost i korelaciju sa prinosom. Geraldi i sar. (1985) su isptivali nasleđivanje osobina vezanih za metlicu kod kukuruza i ustanovili negativnu korelaciju između prinosa i broja grana metlice. Kao odgovor na stres suše smanjuju se i dužina metlice i broj grana metlice. S obzirom na postojanje značajne korelacije između svojstava vezanih za metlicu i prinos, brojni autori su radili na identifikaciji QTL-ova za ova svojstva kod kukuruza (Berke i sar., 1999; Mickelson i sar. 2002; Gao i sar., 2007).

Ustanovljeno je da neki genotipovi sirka koji su tolerantni na sušu imaju razvijeniji i dublji korenov sistem (Ludlow i sar., 1990; Santamaria i sar., 1990), veći prinos i koriste manje vode (Wright i Smith, 1983). Produkcija manjeg broja listova omogućava zadržavanje vode u zemljištu u toku faze vegetacije koja bi mogla biti korišćena u fazi nalivanja zrna. S obzirom na navedeno, bilo bi interesantno posmatrati broj listova kod kukuruza u cilju definisanja njegovog uticaja na tolerantnost na sušu. Quarrie i sar. (2006a) identifikovali su glavni lokus za prinos kod pšenice na poziciji 7AL i utvrdili da je vezan za varijacije u biomasi biljke i širini lista (utvrđena je povezanost SQ1 alela na ovoj poziciji sa 20% većim prinosom i značajno širim vršnim listovima kod pšenice).

U poređenju sa ostalim usevima kukuruz je naročito osetljiv na stres suše u vreme metličanja i svilanja. Kod kukuruza, suša uzrokuje i po dva do tri puta veću redukciju prinosa za vreme polinacije, u odnosu na sušu u toku drugih faza razvića (Grant i sar., 1989). Prisustvo ovog stresa u vreme cvetanja odlaže svilanje i utiče na produžavanje intervala između metličanja i svilanja (*anthesis-silking interval* - ASI) što je povezano sa smanjenjem prinosa (Ribaut i sar., 1996a; Edmeades i sar., 1997a, 2000). ASI, starenje i uvijanje listova predloženi su od strane Bolanos i Edmeades (1993a) i Edmeades i sar. (1999) kao sekundarna svojstva za poboljšanje prinosa u sredinama sa

izraženom sušom. Quarrie i sar. (2005) koristili su ocenu odgovora na sušu (*dorught score*) - stepen uvijenosti lista, položaj listova u odnosu na stablo i starenje listova kao sekundarno svojstvo u cilju identifikacije lokusa za kvantitativna svojstva za tolerantnost na sušu kod kukuruza. Heritabilnost ovih svojstava ostaje ista i u uslovima suše, dok se heritabilnost prinosa obično smanjuje (Bolanos i Edmeades 1996), a genetička korelacija ovih svojstava sa prinosom raste (Bazinger i Lafitte, 1997).

Poznato je da održavanje relativnog sadržaja vode na određenom nivou i osmotsko prilagođavanje utiču na povećanje i održavanje stabilnosti prinosa u uslovima suše kod žitarica (Clarke i McCaig, 1982; Morgan, 1983; Schonfeld i sar., 1988; Blum, 1989; Matin i sar., 1989). Osmotsko prilagođavanje koje predstavlja aktivno nakupljanje materija u biljnim tkivima u odgovoru na smanjenje vodnog potencijala u zemljištu, je karakteristika biljaka sa potencijalom za tolerantnost na stres suše (Morgan, 1995). Definiše se kao smanjenje osmotskog potencijala u ćelijama, usled aktivnog nakupljanja materija posle smanjenja vodnog potencijala u odgovoru na stres suše (Blum, 1988). Ono može nastati kao rezultat povećanja količine materija usled aktivnog nakupljanja u ćeliji ili usled smanjenja sadržaja vode. Opadanje osmotskog potencijala omogućava održavanje turgora ćelije, ili u širem smislu omogućava održavanje procesa zavisnih od turgora, tako da ova osobina predstavlja značajno fiziološko svojstvo koje može biti korišćeno u oplemenjivanju za tolerantnost na sušu. Tokom osmotskog prilagođavanja dolazi do aktivnog nakupljanja materija u ćeliji: neorganski katjoni, organske kiseline, slobodne amino kiseline i ugljeni hidrati (Turner i Jones, 1980). Sadržaj ugljenih hidrata rastvorljivih u vodi može takođe biti korišćen u proučavanju tolerantnosti na stres suše.

### **1.3. Molekularno-genetički pristupi u ispitivanju tolerantnosti na sušu**

Razviće molekularne genetike otvorilo je nove mogućnosti za postizanje bolje tolerantnosti na sušu kod kukuruza. Veliki broj tehnika molekularnih markera koje su sada dostupne omogućava unapređivanje oplemenjivanja kada je u pitanju ovo svojstvo (Bruce i sar., 2002). Identifikacija kvantitativnih lokusa vezanih za tolerantnost na sušu je važno sredstvo za indirektnu selekciju pomoću markera. Jasno je da istovremena

primena konvencionalnog sa molekularnim oplemenjivanjem, marker-asistiranom selekcijom (MAS) i genetičkim inženjeringom može doprineti bržem poboljšanju tolerantnosti na sušu kod gajenih biljaka (Chaves i Oliveira, 2004).

### **1.3.1. Genetički markeri**

Genetički markeri predstavljaju delove genoma koji oslikavaju genetičke razlike između različitih organizama ili vrsta, a na osnovu kojih se indirektno dobija informacija o genima (ili delovima genoma) koji se odnose na određene osobine koje se ispituju. Oni predstavljaju polimorfizam u strukturi DNK ili produkata ekspresije koji je moguće detektovati.

Svrstavaju se u tri velike grupe: oni koji su zasnovani na osobinama koje se mogu vizuelno uočiti (morfološka ili agronomska svojstva), zatim markeri bazirani na genskim produktima (biohemijski markeri) i najzad oni čiju osnovu čine DNK sekvence (molekularni markeri).

Morfološki markeri su obično vizuelno ocenjene fenotipske karakteristike kao što su npr. boja cveta, oblik semena, pigmentacija, itd. Međutim, ovi markeri imaju brojne nedostatke, kao što su ograničena dostupnost, nemogućnost razlikovanja heterozigota od homozoigota, asocijacija sa štetnim fenotipskim efektima. Biohemijske markere predstavljaju proteini (strukturni, rezervni) kao i izoenzimi (različiti alelni vidovi jednog enzima). Glavni nedostatak ovih markera je nedovoljan broj kao i moguće posttranslacione modifikacije (Staub i sar., 1982).

Idealan marker trebalo bi da ispunjava sledeće kriterijume: visok stepen polimorfizma, ravnomerna raspoređenost po genomu, kodominantno nasleđivanje, odsustvo uticaja na ispoljavanje osobina koje se ispituju, odsustvo uticaja faktora spoljašnje sredine na njihovu detekciju, mogućnost da se lokus lako i brzo uoči u ranim fazama razvića (Smith, 1987).

### 1.3.2. Molekularni markeri

Molekularni markeri su fragmenti DNK molekula, koji mogu biti deo gena ili nekodirajućih delova genoma. Osnovna karakteristika ovih markera je visok stepen polimorfizma (varijacija u određenoj DNK sekvenci prisutnih u populaciji). Većina ovih varijacija prisutna je u nekodirajućim delovima genoma, imaju veoma mali ili nikakav efekat na fenotip i funkcije organizma, a mogu se lako detektovati na nivou DNK. Ovi markeri najviše ispunjavaju zahteve idealnog genetičkog markera.

Molekularni markeri se mogu podeliti na:

1. RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfizam Dužine Restrikcionihih Fragmenta) - markeri zasnovani na hibridizaciji
2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) markeri - markeri zasnovani na lančanoj reakciji polimeraze
  - RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*- nasumično umnožena polimorfna DNK) - markeri koji koriste nasumične prajmere
  - SSR (*Simple Sequence Repeat*- ponovci jednostavnih sekvenci) - markeri koji koriste specifične prajmere
3. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata) - markeri zasnovani na PCR-u i restrikcijom „sečenju“
4. STS (*Sequence Tagged Site*) - markeri poznate sekvence i lokacije u genomu, zasnovani na PCR-u
5. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – polimorfizam pojedinačnih nukleotida) - markeri zasnovani na tačkastim mutacijama u DNK molekulu

### 1.3.3. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) markeri

Primena RFLP markera zasniva se na korišćenju genskih ili genomskih proba poznate ili nepoznate strukture, funkcije i pozicije u genomu, komplementarne ispitivanoj DNK (Sambrook i sar., 1989). Razvoj biblioteke DNK fragmenata (RFLP proba) čini osnovu za primenu ove metode. Ova metoda obuhvata digestiju DNK molekula sa jednim ili više restrikcionihih enzima, elektroforetsko razdvajanje dobijenih



restrikcionih fragmenata na gelu (agarozni ili poliakrilamidni) i transfer fragmenata sa gela na odgovarajuću membranu. Detekcija individualnih fragmenata se izvodi hibridizacijom sa obeleženom probom (klonirani fragmenti DNK), a vizualizacija dobijenih rezultata hibridizacije putem autoradiografskog ( $^{32}\text{P}$ ), fluorescentnog ili hemiluminiscentnog obeležavanja proba (dioksigenin).

Restrikcioni enzimi su endonukleaze koje proizvode različite vrste prokariota, čija je uloga uništavanje stranih DNK molekula putem prepoznavanja i sečenja specifičnih sekvenci DNK, koje se uglavnom sastoje od 4, 5 ili 6 baza. Svaki enzim prepoznaje specifičnu, palindromsku sekvencu. Digestija određenog DNK molekula specifičnim restrikcionim enzimom rezultira u nastajanju seta fragmenata definisane dužine. Tačkaste mutacije unutar sekvence koju prepoznaju restrikcioni enzimi kao i insercije i delecije u ovim regionima DNK, rezultiraju u nastajanju izmenjenih restrikcionih fragmenata. Broj i veličina fragmenata koji se dobijaju na ovaj način odražavaju raspored restrikcionih mesta u DNK molekulu i specifični su za svaku kombinaciju ciljne DNK i restrikcionog enzima (Weising i sar., 1995).

Probe koje se koriste za hibridizaciju sa dobijenim fragmentima DNK su uglavnom karakteristične za vrstu i dužine su 500 do 3000 bp (Staub i Serquen, 1996). Postoje dva tipa proba: genomski klonovi (fragmenti jedarne DNK) i cDNK klonovi (DNK kopije iRNK molekula).

Ovi markeri se koriste za preciznu analizu genotipova, kodominantni su, reproducibilni i informativni u identifikaciji jedinstvenih lokusa, pokazuju izuzetnu stabilnost kroz generacije, sa nivoom mutacije nižim od  $10^{-4}$  po nukleotidu/generaciji, lako se detektuju obzirom na velike razlike u veličini fragmenata.

Primenom ovih markera kod biljaka razvijene su genetičke mape za više vrsta žitarica, kao što su kukuruz, pšenica, pirinač. Identifikovani su mnogi RFLP markeri blisko vezani za gene koji kontrolišu ekonomski značajne osobine različitih biljnih vrsta (Helentjaris i sar., 1985; Edwards i sar., 1992; Ajmone-Marsan i sar., 1994; Ragot i sar., 1995; Veldboom i Lee 1994).

Iako je i dalje u širokoj upotrebi, nedostaci ove tehnike uslovlili su razvoj više alternativnih marker-tehnologija. Dva osnovna nedostatka su velika količina visoko kvalitetne DNK (50-200 $\mu\text{g}$ ) po pojedinačnoj biljci potrebna za RFLP analizu, kao i

složena, dugotrajna i skupa eksperimentalna procedura. Zbog toga nije najefikasnija metoda u projektima oplemenjivanja koji zahtevaju analizu velikog broja jedinki.

#### **1.3.4. PCR molekularni markeri**

Otkriće PCR metode napravilo je revoluciju u metodološkom repertoaru molekularne biologije. Metoda je zasnovana na enzimatskoj *in vitro* amplifikaciji DNK, tako da omogućava dobijanje velikog broja kopija željene sekvence, bez potrebe za molekularnim kloniranjem.

U cilju amplifikacije željenog fragmenta DNK, dizajniraju se dva jednolančana oligonukleotidna prajmera, koja su komplementarna ciljnoj sekvenci DNK molekula i hibridizuju na njenim suprotnim stranama. Dodavanje termostabilne DNK polimeraze u odgovarajući puferski sistem, a zatim serija ciklusa koji uključuju korake denaturacije dvolančanog molekula DNK, vezivanje prajmera i ekstenziju vezanih prajmera, rezultira u eksponencijalnoj amplifikaciji specifičnih fragmenata. Polimorfizam koji se detektuje na ovakav način zasniva se na različitim dužinama amplifikovanih fragmenata.

Neke od danas široko korišćenih PCR zasnovanih tehnika su RAPD, SSR, AFLP, STS, SNP.

##### **1.3.4.1. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) markeri**

RAPD tehnika predstavlja PCR umnožavanje genomske DNK sa jednim oligonukleotidnim prajmerom koji ima arbitrarno (nasumično) izabranu sekvencu pri čemu nastaju multipli produkti amplifikacije sa lokusa koji su razasuti po genomu (Innis i sar., 1990). Pojedinačni prajmeri mogu da hibridizuju sa nekoliko stotina mesta u ciljnoj DNK. Da bi došlo do stvaranja PCR produkata, neophodno je da se prajmer veže za dve sekvence na suprotnim lancima DNK koje nisu međusobno udaljene više od 2 kb, što približno odgovara maksimalnoj veličini PCR fragmenta koji *Taq* DNA polimeraza može efikasno da amplifikuje (Edwards i sar., 1998). RAPD profil uzorka, se obično sastoji od 1-20 traka.

Uglavnom se koriste prajmeri dužine 10 bp. Postoje dve modifikacije RAPD markera koje se razlikuju po dužini prajmera koji se koriste. To su: *DNA amplification fingerprinting* (DAF) koja koristi kraće prajmere (5-8 bp) i *Arbitrarily primed PCR* (AP-PCR) koja koristi duže prajmere. Vizualizacija rezultata vrši se elektroforezom na agaroznim gelovima koji se boje etidijum bromidom, a zatim fotografišu.

Ova metoda je jednostavna i ekonomična, a njen glavni nedostatak je to što su RAPD markeri dominantni, pa se njima ne mogu prepoznati heterozigotne jedinke (Williams i sar., 1993). Drugi problem kod ove metode je što nije savršeno reproducibilna. Vrlo male promene u uslovima reakcije (varijacije u čistoći DNK, koncentracija magnezijum hlorida, temperatura vezivanja prajmera, odnos prajmera i uzorka DNK) mogu značajno uticati na RAPD profil. Sve ovo može da ugrozi pouzdanost rezultata, i znatno otežava njihovu razmenu između laboratorija (Penner i sar., 1993; Jones i sar., 1998). RAPD metoda je dosta korišćena u oplemenjivanju biljaka i selekciji pomoću markera.

#### **1.3.4.2. SSR (*Simple Sequence Repeat*) markeri**

SSR markeri, poznati još kao *mikrosateliti*, sastoje se od tandemski ponovljenih kratih sekvenci DNK molekula. Ove sekvence sastoje se od 2 do 6 bp (Chambers i MacAvoy, 2000). Prisutne su u genomima svih eukariota, a detektovane su i kod prokariotskih organizama. Varijacije u broju ponavljanja ovih sekvenci rezultuju u PCR produktima različitih dužina. Regioni koji ograničavaju ove sekvence koriste se za dizajniranje parova prajmera specifičnih za neki lokus. Razlika u veličini alela od samo jednog baznog para može biti detektovana primenom ove tehnike. Vizuelizacija rezultata dobijenih ovom tehnikom vrši se elektroforezom na agaroznim i poliakrilamidnim gelovima. Po završetku elektroforeze, gelovi se boje etidijum bromidom (agarozni i poliakrilamidni), srebro – nitratom (poliakrilamidni) a sve češće se primenjuje fluorescentno bojenje (poliakrilamidni). Nakon toga rezultati se dokumentuju fotografisanjem.

Ovi markeri su veoma polimorfni, informativni, kodominantni (omogućavaju detekciju heterozigota), brojni i ravnomerno raspoređeni po genomu. Glavni njihov

nedostatak je što je neophodno dosta vremena i ulaganja za njihov razvoj, jer prvo moraju da se identifikuju regioni koji ih nose.

#### **1.3.4.3. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) markeri**

AFLP tehnika zasnovana je na selektivnom umnožavanju digestijom dobijenih restrikcionih fragmenata genomske DNK uz pomoć PCR-a. Ova metoda omogućava kombinovanje pouzdanosti RFLP tehnike i pogodnosti tehnika koje su zasnovane na PCR-u. Sastoji se iz tri koraka: digestija DNK restrikcionim enzimima i ligacija oligonukleotidnih adaptera, selektivno umnožavanje i analiza amplifikovanih fragmenata na gelu. Posle restrikcije DNK sa jednim ili više enzima, za krajeve restrikcionih fragmenata se ligiraju dvolančni adapteri, koji se sastoje od „core“ sekvence (enzim-specifične sekvence) i 1-3 selektivna nukleotida. Samo fragmenti u kojima nukleotidi koji okružuju restrikciono mesto odgovaraju selektivnim nukleotidima se amplifikuju PCR-om. Tehnika omogućava specifičnu koamplifikaciju velikog broja restrikcionih fragmenata, obično 50 do 100, koji se detektuju na poliakrilamidnom gelu bojenjem srebro-nitratom ili fluorescentnim bojama. Polimorfizam se detektuje kroz prisustvo/odsustvo produkata amplifikacije, što ih svrstava među dominantne markere, iako se na osnovu intenziteta „razvijenih“ traka mogu klasifikovati i kao kodominantni. AFLP metoda je moćna, pouzdana, brza, stabilna, visoko reproducibilna i omogućava istovremenu analizu velikog broja polimorfnih lokusa pomoću samo jednog para prajmera. Reproducibilnost tehnike omogućena je zahvaljujući korišćenju adaptera specifičnih za restrikciona mesta i adapter-specifičnih prajmera sa varijabilnim brojem selektivnih nukleotida (Vos i sar., 1995). Ovi markeri se često nasleđuju kao blisko vezani klasteri u regionu centromere ili telomere na hromozomu, ali se nasumično raspoređeni AFLP markeri mogu naći i van takvih klastera.

Ova PCR tehnika omogućava identifikaciju polimorfizama na velikom broju lokusa za kratko vreme uz upotrebu veoma male količine DNK što je čini idealnim marker sistemom za različita istraživanja (Maughan i sar., 1996).

#### 1.3.4.4. SNP (*Single Nucleotid Polymorphism*) markeri

SNP markeri predstavljaju varijacije u sekvenci DNK koje nastaju usled izmene samo jednog nukleotida u genomu. SNP lokus može imati dva, tri ili četiri alela u populaciji, ali bialelni lokusi preovlađuju. U do sada analiziranim biljnim vrstama pokazalo se da je jedan SNP prisutan na 200 do 500 bp. Gustina ovih markera je veća u intergenskim i intronskim reginima nego u egzonima (Weising i sar., 2005).

Identifikacija SNP-ova obuhvata dva pristupa. Jedan od njih podrazumeva pretraživanje sekvenci iz baze podataka, kada su oni označeni kao *in silico* ili elektronski SNP-ovi. Kod model-organizama i glavnih žitarica ovaj pristup u identifikaciji SNP-ova najviše obećava. U eksperimentalnom pristupu geni kandidati ili genomski regioni od značaja, ispituju se na prisustvo SNP-ova nizom tehnika kao što je "mikročip-hibridizacija", direktno sekvenciranje ili elektroforeza PCR fragmenata koji sadrže kandidat sekvence na SSCP (engl. *single-strand conformation polymorphism*) ili DGGE gelovima (engl. *denaturing gradient gel*). Drugi pristup je konvertovanje ostalih tipova molekularnih markera u SNP-ove, kao npr. AFLP markera.

SNP markeri u genomu formiraju različite haplotipove, odnosno blokove DNK. SNP aleli u haplotipovima se zajedno nasleđuju. Identifikacija nekoliko pažljivo odabranih SNP-ova u target regionima definisana određenim haplotipovima obezbeđuje dovoljno informacija da se može predvideti konstitucija ostatka SNP-ova u regionu.

Iako se hiljade SNP-ova koriste u analizi humanog i životinjskih genoma, njihovo korišćenje u analizi biljnih genoma je još uvek u začetku (Ganal i sar., 2009). Trenutno, identifikacija SNP-ova velikih razmera kod žitarica je još uvek veliki izazov nezavisno od toga da li se kodirajući deo ili čitav genom pretražuju za prisustvo SNP-ova. U budućnosti, potpuno sekvencirani genomi postaće postepeno dostupni, s obzirom na to da je potrebno još vremena da genomi mnogih žitarica budu sekvencirani. Npr., iako je gruba sekvenca genoma kukuruza sada dostupna (URL: <http://www.maizesequence.org>), očekuje se da će biti potrebna još jedna do dve godine dok ne bude dobijena sekvenca genoma kukuruza visokog kvaliteta. Za druge žitarice (useve) kao što su na primer pšenica i ovas, koji imaju velike genome (5 pg ili više), biće potrebno još nekoliko godina za dobijanje samo nacrta sekvence genoma.

Velika prednost ovih markera u odnosu na ostale sisteme je što su prisutni u praktično neograničenom broju u genomu, kao i dostupnost pouzdanih testova za karakterizaciju velikog broja biljaka.

### **1.3.5. Molekularni markeri u oplemenjivanju**

Molekularni markeri su u širokoj upotrebi u istraživanjima na biljkama. Njihova primena danas predstavlja nezamenljivi deo selekcije i oplemenjivanja. Korišćenje molekularnih markera omogućava određivanje stepena genetičkog diverziteta između različitih useva, unutar populacija, između srodnih vrsta, itd. Dobijeni podaci mogu se koristiti za "otisak" genotipova (engl. fingerprinting), u cilju njihove identifikacije i zaštite, razumevanja veza između jedinki koje se ispituju, efikasnog upravljanja genetičkim resursima, olakšavanja unošenja hromozomskih segmenata iz različitih vrsta, čak i u cilju obeležavanja specifičnih gena. Koriste se i za utvrđivanje filogenetskih i evolutivnih odnosa populacija i vrsta.

Molekularni markeri se koriste i za mapiranje gena koji kontrolišu ekspresiju različitih ekonomski značajnih agronomskih svojstava. Kada su vrlo blisko vezani za gen od interesa, mogu se koristiti za indirektnu selekciju svojstva od interesa, i ovaj postupak predstavlja najjednostavniji vid selekcije pomoću molekularnih markera - *Marker Assited Selection* (MAS). Zahvaljujući njima, poligena svojstva mogu biti razložena na pojedinačne komponente, tzv. lokuse za kvantitativna svojstva (engl. *Quantitative Trait Loci* - QTL), što doprinosi boljem razumevanju nasleđivanja ovih svojstava i omogućava korišćenje MAS-a zajedno sa metodama klasične selekcije.

## 1.4. Identifikacija QTL-ova

### 1.4.1. Kvantitativne osobine i mapiranje QTL-ova

Kvantitativne osobine su one osobine čije je ispoljavanje kontrolisano od strane većeg broja gena. Segregacija gena, uticaj spoljašnje sredine i njihova međusobna interakcija uzrokuje neprekidno variranje svojstva (Falconer i Mackay, 1996). Veliki broj ekonomski značajnih osobina gajenih biljaka (npr. prinos, komponente prinosa, tolerantnost na sušu, komponente kvaliteta, itd.) klasifikovane su kao kvantitativne osobine.

Poboljšanje ovih osobina dugo je bilo zasnovano samo na metodama klasične selekcije (fenotipska ekspresija). Obzirom da ove osobine kontroliše veći broj gena i da na fenotipsko ispoljavanje utiče sredina, za izučavanje njihove genetičke determinacije nije moguće primenjivati jednostavno predviđanje prema mendelovskim očekivanim verovatnoćama, koja se sa uspehom primenjuju u analizi kvalitativnih osobina.

Ideja o korišćenju genetičkih markera u cilju identifikacije lokusa za kvantitativna svojstva javila se početkom dvadesetog veka. Naime, u istraživanjima na pasulju (*Phaseolus vulgaris* L.) uočeno je da je nekoliko faktora veličine semena povezano sa faktorima pigmentacije smeštenim na istom hromozomu (Sax i sar. 1923). Iako su korišćeni i u drugim istraživanjima u cilju proučavanja genetičke osnove kvantitativnih svojstava, morfološki markeri se nisu pokazali kao najbolje rešenje za postizanje postavljenog cilja (Rasmusson, 1935; Qualset i sar., 1965; Edwards i sar., 1987). Usledilo je korišćenje izoenzimskih marker gena u ovu svrhu, ali bez željenog rezultata, pre svega zbog malog broja izoenzimskih lokusa (Stubber, 1989; Tanksley i Orton, 1983).

Glavni napredak u karakterizaciji QTL-ova započeo je razvićem DNK markera krajem prošlog veka. Osnovna ideja u ovom pristupu je praćenje korelacije između pojave ispitivane osobine i markera. Ukoliko se utvrdi korelacija, to znači da su regioni genoma gde se markeri nalaze uključeni u ispoljavanje ispitivane osobine.

Za QTL analizu potrebne su dve grupe podataka: podaci o markerima koji nemaju uticaja na ispitivano kvantitativno svojstvo, a sadrže informaciju o segregaciji

gena koji utiču na njegovo ispoljavanje i podaci o varijacijama datog svojstva u analiziranoj populaciji. Sastoji se iz dva osnovna koraka: mapiranje markera i uspostavljanja veze između markera i svojstva. Oba koraka zahtevaju precizne podatke i odgovarajući statistički program. Cilj ovog postupka je da se povezivanjem variranja kvantitativnog svojstva i variranja genetičkih markera pomoću statističkih metoda utvrdi pozicija, broj i efekat gena koji utiču na ispoljavanje datog svojstva.

#### **1.4.2. Konstrukcija molekularnih mapa**

Prvi korak u QTL analizi predstavlja mapiranje markera, tj. razviće molekularnih (DNK) mapa. Uz njihovu pomoć utvrđuje se pozicija i relativna genetička distanca između markera duž hromozoma. Konstrukcija mape zasniva se na analizi eksperimentalne biljne populacije. Poželjno je da se roditelji koji se odabiraju za mapirajuću populaciju značajno razlikuju u jednom ili u više svojstava od interesa, da imaju što veći broj homozigotnih lokusa, kao i što više polimorfnih lokusa koji se koriste za mapiranje.

Tipovi populacija koje se obično koriste u ove svrhe su  $F_2$ ,  $F_3$ , populacija povratnog ukrštanja (engl. *backcross*-BC), rekombinantne inbred linije (engl. *recombinant inbred lines*-RIL), dupli haploidi (engl. *double haploids* - DH) i populacija skoro potpuno izogenih linija (*near isogenic lines* - NIL) nastale od  $F_1$  ukrštanja između dve inbred linije koje se međusobno razlikuju prema svojstvu od interesa (Tanksley, 1993; Lee, 1995; Quarrie i sar. 1996; Prioul i sar., 1997). Veličina populacije koja se koristi za mapiranje je takođe značajna i broj biljaka koji se analizira kreće se od 100 (Lebreton i sar., 1995; Agrama i Moussa, 1996; Tuberosa i sar., 1998a) do 400 (Openshaw i Frascaroli, 1997; Melchinger i sar., 1998).

U cilju što preciznije identifikacije QTL-ova, potrebno je postići odgovarajuću pokrivenost genoma markerima. Za većinu vrsta, dovoljno je 100-150 markera, ravnomerno raspoređenih duž hromozoma. Kada se postigne gustina od jednog markera na 20 cM, da bi se povećala tačnost sa kojom se detektuju QTL-ovi isplativije je povećati broj biljaka u populaciji nego broj markera (Darvasi i sar., 1993). Identifikovani markeri koji su polimorfni za roditelje daju tzv. „marker klase“ u



mapirajućoj populaciji. Na primer, kodominantni markeri formiraju tri tipa marker klasa: homozigotni genotip jednog roditelja, heterozigot i homozigotni genotip drugog roditelja. Ovi podaci se obrađuju odgovarajućim statističkim programom u cilju dobijanja mape, što omogućava utvrđivanje međusobne vezanosti markera izračunavanjem učestalosti rekombinacije. Na taj način dobija se informacija o međusobnoj udaljenosti markera. Najčešće korišćen program za pravljenje mapa je MAPMAKER (Lander i Bonstein, 1989; Lincoln i sar., 1992). Za dobijanje genetičkih mapa kukuruza markeri kao što su RFLP i SSR korišćeni su u raznim laboratorijama još od osamdesetih godina prošlog veka i velika količina podataka je sada dostupna na sajtu <http://www.maizegdb.org>.

#### **1.4.3. Metode za detekciju QTL-ova**

Sledeći korak u identifikaciji QTL-ova podrazumeva povezivanje podataka iz odgovarajuće mape i podataka o varijabilnosti ispitivanog kvantitativnog svojstva. Ovaj korak predstavlja povezivanje genotipa i fenotipa odgovarajućeg markera. Posle razvrstavanja ispitivanih jedinki populacije u odgovarajuće marker klase, na osnovu prisustva/odsustva određenog marker-lokusa, ispituje se značajnost razlika između ovih klasa uzimajući u obzir izmerene vrednosti posmatranog svojstva. Ukoliko se za neki marker detektuje značajna razlika između srednjih vrednosti fenotipskog svojstva odgovarajućih parova marker klasa, znači da je vezan za QTL koji utiče na ispoljavanje tog svojstva. Suština je u tome da se blisko vezani marker i QTL neće razdvojiti rekombinacijom (manja je verovatnoća rekombinacije) pa će srednja vrednost fenotipskog svojstva kod marker klase blisko vezane za QTL biti značajno različita od srednje vrednosti klase koja nije vezana za marker.

U poslednje dve decenije statističke metode za detekciju QTL-ova razvile su se od jednostavnih do vrlo sofisticiranih. Tri metode za detekciju QTL-ova (utvrđivanje broja, pozicije i efekta) koje su u širokoj upotrebi obuhvataju tzv. analize zasnovane na pojedinačnim markerima (engl. *single marker analysis*), jednostavno intervalno mapiranje (engl. *simple interval mapping analysis* - SIM) i kompozitno intervalno mapiranje (engl. *composite interval mapping* - CIM), (Tanksley, 1993; Liu, 1998).

Najjednostavnija od ovih metoda je analiza pojedinačnog markera, a statističke metode koje se koriste uključuju *t*-test, analizu varijanse (ANOVA) i linearnu regresiju. Mogućnost pronalaženja veze između markera i QTL-a od interesa zavisi od veličine efekta QTL-a na izučavanu osobinu, veličine ispitivane populacije i učestalosti rekombinacije između markera i QTL-a. Glavni nedostatak ove metode je da što je QTL udaljeniji od markera to ga je teže detektovati, zato što može da dođe do rekombinacije između markera i QTL-a. Ovo ukazuje na mogućnost precenjivanja, odnosno potcenjivanja efekta QTL-a identifikovanog primenom ove metode. Kompjuterski programi koji koriste ovu metodu za identifikaciju QTL-ova su QGene i MapManager QTX (Nelson, 1997; Manly i sar., 2001).

Metoda intervalnog mapiranja zasniva se na analizi intervala između dva markera, umesto analize samo jednog markera (Lander i Botstein, 1989). Na ovaj način omogućeno je identifikovanje QTL-ova ne samo u intervalima između markera već i na samim marker lokusima. Intervalno mapiranje koristi maksimalnu verovatnoću (Lander and Botstein, 1989) ili multiplu regresiju (Haley i Knott, 1992) u svrhu detekcije QTL-ova. Ovaj pristup omogućava eliminaciju pogrešne procene usled rekombinacije, kao i utvrđivanje verovatne pozicije i efekta QTL-a što nije moguće u slučaju pristupa pojedinačnim markerom. Kompjuterski programi koji se koriste za intervalno mapiranje su MapMaker/QTL (Lincoln i sar., 1993) i QGene (Nelson, 1997).

Danas je u širokoj upotrebi kompozitno intervalno mapiranje. Ova metoda kombinuje intervalno mapiranje sa linearnom regresijom i pored markera koji ograničavaju ispitivani interval, u statistički model uključuje dodatne markere (Jansen, 1993; Jansen i Stam, 1994; Zeng, 1993, 1994). Glavna prednost u odnosu na prethodno opisane metode je veća preciznost u detekciji i proceni efekta ciljnih QTL-ova. Razvijeno je nekoliko kompjuterskih programa za potrebe kompozitnog intervalnog mapiranja. QTL Cartographer (Zeng, 1993, 1994; Basten i sar., 1994, 2001) koristi metodu maksimalne verovatnoće, a MapManager QTX (Manly i sar., 2001) i PLABQTL (Utz i Melchinger, 1996) su zasnovani na multiploj regresiji.

Metode intervalnog (SIM, CIM) mapiranja daju profil verovatnoće za nalaženje QTL-a u određenom regionu. Rezultati statističkih testova ovih metoda obično su predstavljeni uz pomoć LOD (engl. *logarithm of odds*) ili LRS (engl. *likelihood ratio statistic*) zapisa. Odnos između ova dva zapisa je  $LRS=4.6 \times LOD$ . Grafički prikaz ovog

zapisa daje nam podatak o „intervalu poverenja“ (engl. *confidence interval*), ograničavajući na taj način opseg u kome se najverovatnije nalazi QTL. Najveća verovatnoća za nalaženje QTL-a je maksimum zapisa. Pored toga, maksimum profila verovatnoće mora preći određeni prag značajnosti, da bi se moglo pouzdano tvrditi da se tu nalazi QTL. Da bi se izbeglo detektovanje tzv. lažnih pozitivnih rezultata, obično se uzima da je prag verovatnoće veći od 2 ( $LOD > 2$ ). U ovu svrhu se u poslednje vreme koriste permutacioni testovi (Churchill i Doerge, 1994) koji se izvode u 500 do 1000 ponavljanja i na taj način program sam utvrđuje najpogodniji nivo značajnosti.

Pored navedenih postoje i druge procedure za mapiranje QTL-ova kao što su: metode koje analiziraju interakcije QTL-ova i faktora spoljašnje sredine (Jiang i Zeng, 1995; Korol i sar., 1998; Vargas i sar., 2006), neparametarski pristup mapiranju QTL-ova (Kruglyak i Lander, 1995), Bayesian mapiranje (Silanpaa i Arjas, 1998), kao i metode za razlikovanje plejotropskih efekata od bliske vezanosti QTL-ova (Lebreton i sar., 1998). Najviše korišćena metoda u mapiranju QTL-ova je CIM, mada ima sve više radova koji ukazuju na prednosti metoda kao što je Bayesian mapiranje višestrukih interagujućih QTL-ova (Yi i Shriner, 2008).

Postoji mnogo faktora koji mogu uticati na detekciju QTL-ova u segregirajućoj populaciji (Tanksley, 1993; Asins, 2002). Neki od najznačajnijih su genetičke karakteristike QTL-ova koji kontrolišu svojstva (samo QTL-ovi sa velikim efektom mogu biti detektovani), uticaj faktora sredine, eksperimentalne greške i veličina populacije. U cilju prevazilaženja ovih problema neki autori predlažu korišćenje meta-analize (kombinovanje rezultata iz više studija o QTL-ovima) i njihovo povezivanje sa podacima iz baza podataka za ispitivanu biljnu vrstu (Goffinet i Gerber, 2000).

#### **1.4.4. Identifikacija QTL-ova za tolerantnost na sušu kod kukuruza**

Prvi rezultati u identifikaciji QTL-ova za željena svojstva kod kukuruza prezentovani su još kasnih osamdesetih godina prošlog veka (Stuber i Edwards, 1986; Stuber i sar., 1987; Edwards i sar., 1987). Od tada, identifikovano je više od 2000 QTL-ova vezanih za različita agronomski važna svojstva kod kukuruza, uključujući prinos,

komponente prinosa, morfološka i fiziološka svojstva kao i QTL-ovi za odgovor na biotički i abiotički stres (Xu i sar., 2009).

Lebreton i sar. (1995) su prvi objavili rezultate primene analize QTL-ova u cilju dobijanja jasnije slike o genetičkoj osnovi odgovora na stres suše kod kukuruza. Od tada do danas identifikovan je veliki broj QTL ova koji regulišu morfo-fiziološka svojstva i prinos u uslovima suše kod kukuruza. Sva ova istraživanja obuhvataju analize različitih ukrštanja, različitih tipova i veličina populacija, efekata faktora spoljašnje sredine, korišćenje različitih tipova molekularnih markera i metoda za detekciju QTL-ova.

Kod kukuruza je period pre i za vreme cvetanja najosetljiviji na sušu (Jones i Setter, 2000; Saini i Westgate, 2000). Suša dovodi do kašnjenja u svilanju, tako da se produžava period između metličenja i svilanja (*ASI-anthesis silking interval*) i do opadanja prinosa (Bolanos i Edmeades, 1993b, 1997; Chapman i Edmeades, 1999). Ribaut i sar. (1996, 1997a, b) identifikovali su pet QTL-ova za ovo svojstvo, koji su kasnije korišćeni u procesu indirektno selekcije pomoću markera (Ribaut i sar., 2002). U ovim istraživanjima identifikovani su QTL-ovi za parametre vezane za cvetanje (svilanje, metličenje, mušku sterilnost, period između metličenja i svilanja) i QTL-ovi za prinos i komponente prinosa (broj klipova, broj zrna, i težina 100 zrna) u tri različite sredine (dobra snabdevenost vodom, stres suše srednjeg intenziteta i veoma izražena suša). Ustanovljeno je da se četiri regiona genoma na kojima su identifikovali QTL-ove za prinos poklapaju sa regionima za QTL-ove za ASI. Zaključeno je da bi najbolja strategija za indirektnu selekciju pomoću markera bila korišćenje kombinacije tzv. najboljih QTL-ova za različita svojstva. Ovi QTL-ovi trebalo bi da budu stabilni u različitim sredinama, da opisuju veliki deo fenotipske varijabilnosti, i da budu uključeni u ekspresiju svojstava značajno korelisanih sa prinosom, kao npr. ASI.

Agrama i Moussa (1996) ispitivali su prisustvo QTL-ova za prinos, period između metličenja i svilanja i broj klipova po biljci u uslovima suše kod kukuruza. Genomski regioni koji značajno utiču na ispoljavanje tolerantnosti na sušu kod kukuruza identifikovani su na hromozomima 1, 3, 5, 6 i 8. Neki od QTL-ova za različite osobine detektovani su na istim pozicijama na istim hromozomima, što ukazuje na mogućnost postojanja epistatičkih ili plejotropnih interakcija.

Frova i sar. (1999) identifikovali su QTL-ove za komponente prinosa u uslovima dobre snabdevenosti vodom i u uslovima suše. Više od 50% detektovanih QTL-ova bilo

je isto u dve različite sredine, a konzistentni su bili i doprinosi alela. Pored toga, u nekoliko slučajeva, QTL-ovi za dve i više osobina nađeni su na istim pozicijama na odgovarajućim hromozomima. Slične rezultate su dobili i Veldboom i Lee (1996b) i Ribaut i sar. (1997b) kada je u pitanju broj detektovanih QTL-ova i fenotipska varijabilnost ( $R^2$ ) za iste ispitivane osobine. Međutim, u sva tri istraživanja detektovani su i QTL-ovi koji su se razlikovali od eksperimenta do eksperimenta. Razlog za detektovanje različitih QTL-ova može biti korišćenje različitog genetičkog materijala u ovim istraživanjima. Rezultati navedenih istraživanja pokazuju stabilnost nekih QTL-ova u različitim sredinama kao i postojanje genetičkih faktora specifičnih za tolerantnost.

Sari-Gorla i sar. (1999), ispitivali su prisustvo QTL-ova za visinu biljke i parametre vezane za cvetanje kukuruza kao i u prethodnom istraživanju u dve različite sredine (suša i optimalna snabdevenost vodom). Cilj je bio da se utvrde pozicije na hromozomima koje nose tolerantnost na sušu za ispitivana svojstva i da se uporede sa regionima koji nose QTL-ove za ova svojstva, da bi se dobila indirektna informacija o genetičkoj i fiziološkoj osnovi odgovora kukuruza na stres suše. Analizom je utvrđeno da je većina detektovanih QTL-ova za metličenje i visinu biljke ista u kontrolnim i uslovima stresa suše. Kada su u pitanju svilanje i ASI, različiti QTL-ovi bili su iskpirirani u dve različite sredine. Identifikacija QTL-ova za parametre cvetanja kod kukuruza bila je predmet istraživanja i u radovima drugih autora (Veldboom i Lee, 1996a). Iako ispitivanje nije vršeno u uslovima suše, a i drugi tipovi molekularnih markera su korišćeni za mapiranje, oba istraživanja detektovala su iste hromozomske pozicije za QTL-ove za neka svojstva: za metličenje i visinu biljke na hromozomu 2; jedan lokus vezan za metličenje, svilanje i ASI na hromozomu 7, i jedan QTL za ASI na hromozomu 8. Na istoj poziciji Ribaut i sar. (1996) su takođe identifikovali QTL za ASI. Zatim, QTL za metličenje na hromozomu 1 identifikovan u oba istraživanja odgovara QTL-u detektovanom u radu Ribaut i sar. (1996). U sve tri studije, reč je o genetički različitom materijalu, kao i o različitim uslovima eksperimenta, te identifikacija istih lokacija za QTL-ove za pojedine ispitivane osobine uprkos razlikama u eksperimentima, ukazuje na mogući značaj ovih faktora kao genetičkih komponenti ispitivanih svojstava.

Veliki broj radova odnosi se na identifikaciju QTL-ova za koncentraciju abscisinske kiseline u listu (*leaf* ABA- L-ABA) i njenog efekta na prinos i druga svojstva vezana za tolerantnost na sušu (Leberton i sar., 1995; Tuberosa i sar., 1998a, 1998b, Sanguineti i sar., 1999). Od 16 QTL-ova detektovanih za ovo svojstvo, kao najznačajniji i najkonzistentniji pokazao se QTL mapiran blizu markera *csu133*, na bin 2.04 (Tuberosa i sar. 1998b). Lebreton i sar. (1995) identifikovali su nekoliko QTL-ova koji utiču na koncentraciju ABA-e analizom ukrštanja Polj17xF2. Jedan od ovih QTL-ova detektovan je na poziciji *csu133* kao i u radu Tuberosa i sar. (1998b). Quarrie i sar. (1999) pokazali su da je rekurentna selekcija za prinos zrna u uslovima suše značajno promenila frekvenciju alela na poziciji *csu133* u dvema populacijama („*Tuxpeno Sequia*“ i „*Drought Tolerant Population*“) dobijenim u CIMMYT-u (Bolanos i Edmeades, 1993a; Bolanos i sar., 1993b). Ovi rezultati dodatno potvrđuju značaj ovog regiona u kontroli svojstava vezanih za sušu i prinos kod kukuruza.

Hao i sar. (2010) su identifikovali neke važne konstitutivne i adaptivne QTL-ove za tolerantnost na sušu kod kukuruza koristeći princip meta-analize, kao i specifične gene i njihove familije koji učestvuju u odgovoru biljke na ovaj stres. Detektovano je i upoređeno ukupno 239 QTL-ova u uslovima suše i 160 u kontrolnim uslovima, u eksperimentima sa ukupno 12 populacija testiranih u 22 eksperimenta. Na osnovu ovako dobijenih podataka, identifikovano je 39 konsenzusnih QTL-ova za uslove suše i 32 konsenzusna QTL za kontrolne uslove. QTL-ovi na hromozomima 1, 2, 3, 5, 6 i 9 za nekoliko različitih osobina preklapali su se, i identifikovani su na istim pozicijama u različitim sredinama, a većina je pokazala visok stepen fenotipske varijabilnosti.

U cilju ispitivanja stabilnosti QTL-ova u različitim sredinama i interakcija QTL-sredina u uslovima suše za prinos, komponente prinosa, metličenje, ASI, broj zrna, težine 100 zrna i visine biljke Messmer i sar. (2009) radili su istraživanje na RIL populaciji u sedam različitih eksperimenata u polju, u četiri različite sredine: uslovi stresa u fazi cvetanja kukuruza i uslovi dobre snabdevenosti vodom (Meksiko i Zimbabve). QTL-ovi su identifikovani za svako svojstvo u svakom pojedinačnom eksperimentu, zatim za određeni tip vodnog režima (svi QTL-ovi u uslovima suše i svi QTL-ovi u uslovima dobre snabdevenosti vodom), zatim za određenu lokaciju (svi QTL-ovi detektovani u Meksiku i svi QTL-ovi detektovani u Zimbabveu), a urađena je i uporedna analiza za sve sredine i tipove vodnog režima. U četiri navedena tipa analiza

identifikovano je 81, 57, 51 i 34 QTL-a respektivno. Oko 80%, 60% i 6% QTL-ova detektovanih u analizama različitih sredina, vodnih režima i u svim eksperimentima zajedno nije pokazalo značajne interakcije QTL-ova i sredine. Ekspresija QTL-ova bila je stabilna u različitim godinama eksperimenta i na različitim lokacijama, a u uslovima istog vodnog režima. Stabilnost QTL-ova bila je drastično manja kada su upoređeni rezultati za različite vodne režime, ukazujući na različitu genetičku osnovu ciljnih svojstva u uslovima suše i dobre snabdevenosti vodom. Nekoliko grupacija QTL-ova za različita svojstva identifikovano je uporednom analizom: regioni na hromozomima 1 i 8 za uslove dobre snabdevenosti vodom, regioni na hromozomima 1, 3 i 5 za uslove stresa suše i region na hromozomu 1, ako se u obzir uzmu različiti vodni režimi. Messmer i sar. (2009) zaključuju da bi navedeni regioni mogli bi biti ciljni za marker-asistiranu selekciju, kao i da je najbolji pristup za postizanje tolerantnosti na sušu selekcija u uslovima suše.

### **1.5. Indirektna selekcija i suša**

Jedna od najočiglednijih primena analize QTL-ova je indirektna selekcija pomoću markera. Ovo je metoda koja podrazumeva selekciju poželjnih svojstava pomoću molekularnih markera blisko vezanih za gen(e) koji determinišu dato svojstvo.

Odabiranje biljaka sa odgovarajućim kombinacijama gena je suštinska komponenta oplemenjivanja (Ribaut i Betran, 1999; Weeden i sar., 1994). Selekcija na nivou genotipa omogućava prevazilaženje nedostataka metoda klasične selekcije kao što su nepouzdanost, nemogućnost izvođenja, složenost i cena fenotipskih testova, te se na ovaj način može značajno povećati uspešnost u opemenjivanju biljaka u poređenju sa konvencionalnim metodama.

Prednosti MAS-a su: 1) ušteda vremena zamenom složenih ogleda u polju (koje je moguće izvesti samo u određenom periodu u toku godine ili na specifičnim lokacijama ili su tehnički složeni) marker testovima, 2) eliminacija neopouzdatih fenotipskih procena vezanih za poljske ogleda nastalih usled uticaja sredine, 3) selekcija genotipova u ranim fazama razvika, 4) istovremena selekcija nekoliko osobina ili nekoliko gena jedne osobine, 5) sprečavanje unošenja nepoželjnih gena (engl. LD -

*linkage drag*), 6) selekcija svojstava sa niskom heritabilnošću, 7) testiranje za specifična svojstva u slučajevima kada fenotipsko ocenjivanje nije izvodljivo.

Postoji veliki broj studija na temu mapiranja QTL-ova, za različite osobine kod velikog broja biljnih vrsta, ali svega nekoliko je pokazalo mogućnost korišćenja molekularnih markera za poboljšanje kvantitativnih svojsta (Tanskley i sar., 1996; Mohan i sar., 1997; Shen i sar., 2001; Ribaut i sar., 2002, 2004). Mnogi markeri pokazali su se kao nepouzdati u predviđanju željenog fenotipa. U velikom broju slučajeva, razlog za ovo je nedovoljna preciznost u mapiranju QTL-ova (Young, 1999; Sharp i sar., 2001). Metode i marker sistemi koji se koriste u ovim istraživanjima su skupi i to je još jedan od ograničavajućih faktora u primeni MAS-a.

Primena indirektne selekcije - selekcije pomoću molekularnih markera za poboljšanje tolerantosti na sušu kod kukuruza ostvarena je u projektima CIMMYT-a (*International Maize and Wheat Improvement Centar*, Mexico) koji su započeti 1994. godine. Cilj ovih istraživanja bio je poboljšanje karakteristika elitnih linija i populacija slobodne oplodnje korišćenjem dveju linija. Jedna od njih je bila donor tolerantan na sušu, a druga elitna visokoprinosna linija, osetljiva na sušu. Istraživanje je bilo usmereno na unošenje QTL-ova za skraćenje intervala između metličanja i svilanja (*ASI-anthesis-silking interval*). Dostupnost molekularnih markera vezanih za QTL-ove za ASI omogućava efikasniju selekciju u uslovima suše, posebno kada je suša izražena u periodu cvetanja (Ribaut i sar., 1997c, 2002, 2004). Linije dobijene ovim postupkom ukrštene su sa dva *testera* i testirane su u polju tokom tri godine u različitim vodnim režimima. U uslovima izražene suše koja je uticala na smanjenje prinosa od čak 80 procenata, izabrane linije pokazale su bolje karakteristike u odnosu na kontrolne. U uslovima stresa koji dovodi do smanjenja prinosa od 40 procenata, razlike u karakteristikama ispitivanih linija nisu bile uočljive. Nekoliko genotipova pokazivalo je bolje rezultate u odnosu na kontrolne genotipove u svim vodnim režimima. U uslovima odsustva stresa suše odabrane linije nisu pokazale veći prinos u poređenju sa kontrolnim. Ribaut i saradnici su zaključili da primena QTL-ova u cilju poboljšanja germplazme ima brojna ograničenja, a jedno od najznačajnijih je nemogućnost predviđanja fenotipa na osnovu alelne kompozicije genotipa. Ovo je naročito važno kada epistatičke interakcije utiču na svojstva od interesa (Podlich i sar., 2004). Druga ograničenja odnose se na visoku cenu identifikacije i validacije QTL-ova, kao i razvoja



linija sa poboljšanim svojstvima. U cilju prevazilaženja ovih nedostataka u CIMMYT-u je razvijena nova strategija (engl. *single large-scale MAS* – SLS MAS), koja kombinuje konvencionalno oplemenjivanje sa korišćenjem MAS-a (Ribaut i Bertran, 1999). Glavna karakteristika ove strategije je primena MAS-a samo jednom i to u ranim generacijama u cilju fiksiranja željenih alela na ciljnim QTL-ovima.

### 1.6. Izgledi za budućnost

Iako je malo primera praktične primene MAS-a, ipak postoji optimizam kada je u pitanju korišćenje ove metode u budućnosti. Nekoliko faktora može povećati efikasnost i efektivnost indirektno selekcije pomoću markera: poboljšanja postojećih i razviće novih marker tehnika, integracija mapiranja QTL-ova sa funkcionalnom genomikom i razviće većeg broja mapa velike gustine (Collard i sar., 2005).

Najnovije trendove upravo predstavlja kombinovanje mapiranja QTL-ova sa funkcionalnom genomikom koja omogućava proučavanje ekspresije gena. Strategija funkcionalne genomike povezuje fiziološka i fenotipska istraživanja sa informacijama o genima, transkripciji i transkriptima, proteinima, proteinskim kompleksima i metaboličkim putevima.

Novi tipovi molekularnih markera imaju značajnu ulogu u razviću molekularnih mapa druge generacije. Korišćenje treće generacije molekularnih markera, SNP-ova, i razviće savršenijih metoda za njihovu detekciju ukazuje na to da će oni imati veoma značajnu ulogu u istraživanjima vezanim za mapiranje i MAS (Rafalski, 2002; Koebner i Summers, 2003).

Metode funkcionalne genomike uključuju korišćenje EST-ova (engl. *expressed sequence tag*), kao i *microarray* tehnika. Korišćenje genskih sekvenci dobijenih iz EST-ova ili analognih gena, tzv. „kandidat gena“ obećava dalji napredak u identifikaciji gena koji kontrolišu željena svojstva. Marker dobijeni iz EST-ova kao i SNP markeri integrišu se u već postojeće mape sa identifikovanim pozicijama QTL-ova (Hayashi i sar., 2004; Skiba i sar., 2004; Zhang i sar., 2004). Pored navedenog, broj dostupnih EST-ova i genomskih sekvenci u bazama podataka veoma brzo raste.

Razviće zasićenih molekularnih mapa sa inkorporiranim SNP-ovima, markerima razvijenim iz EST-ova, STS markerima, obezbeđuju moćno oruđe istraživačima za dalje mapiranje QTL-ova i MAS. Komparativno mapiranje takođe zauzima sve značajnije mesto. Raspolaganje unapređenim molekularnim mapama omogućava izolaciju gena tzv. poziciono kloniranje. Marker koji su blisko vezani za određeni gen koriste se kao probe za pretraživanje genomskih biblioteka i na taj način omogućavaju izolaciju gena ovom metodom (Tanksley i sar., 1995; Meyer i sar., 1996). U cilju poboljšanja efikasnosti MAS-a poznavanje sekvence gena omogućava dizajniranje idealnog markera koji su locirani unutar sekvence gena od interesa. Na taj način eliminiše se mogućnost rekombinacije između gena i markera (Ogbonnaya i sar., 2007; Ellis i sar., 2002).

Sve veći broj studija o QTL-ovima za tolerantnost na sušu i QTL-ovima za prinos identifikovanim u usevima u uslovima suše ukazuje na povećano interesovanje za ovaj pristup. Osim toga, sekvenciranje i bioinformatika daju novu dimenziju dešifrovanju i manipulisanju genetičkom osnovom tolerantnosti na sušu. Uprkos svim najnovijim tehnološkim dostignućima, ukupan doprinos genomikom-asistiranoj oplemenivanju u stvaranju genotipova tolerantnih na sušu do sada je bio marginalan (Tuberosa i Salvi, 2006).

Međutim, najveće komercijalne kompanije (MONSANTO, SAD i BASF, Nemačka) najavljuju plasiranje transgenog kukuruza tolerantnog na sušu na tržištu u bliskoj budućnosti. Pored pomenutih komercijalnih kompanija, Bayer (Nemačka), Syngenta (Švajcarska), Dow (Nemačka) i DuPont (Francuska) imaju opsežna istraživanja u ovoj oblasti. ([www.biosafety-info.net/file\\_dir/4871488837158955b.pdf](http://www.biosafety-info.net/file_dir/4871488837158955b.pdf)). U junu 2009 godine MONSANTO je zajedno sa BASF kompanijom objavio postojanje gena koji utiče na održavanje odgovarajućeg nivoa prinosa u uslovima suše. Ovaj gen, nazvan cspB (engl. *cold shock protein*), najpre je identifikovan u bakteriji *Bacillus subtilis* podvrgnutoj stresu niskih temperatura, a u kasnijim istraživanjima pokazano je da ovaj gen pomaže višim organizmima i u borbi protiv stresa suše. Korišćenje transgenog pristupa u industriji (komercijalnim kompanijama) ograničeno je na jedan ili nekoliko gena. Ovakav pristup dovodi samo do ograničenog genetičkog poboljšanja, ali daje značajnu mogućnost za povećanje profita. Paralelno sa pokušajima da se dobiju transgene biljke, danas je u svetu velika pažnja posvećena traženju prirodnih izvora tolerantnosti na sušu (Carena i sar., 2009).

## 2. CILJ RADA

Stvaranje hibrida kukuruza koji daju visok prinos u uslovima suše je veoma važno u programima oplemenjivanja, ali je ovaj proces komplikovan i skup zbog izražene interakcije genotipa i sredine i zbog niske heritabilnosti prinosa. Suša utiče na smanjenje genetičke varijanse i povećanje varijanse greške usled čega dolazi do redukcije heritabilnosti prinosa, pa se favorizuje selekcija na sekundarna svojstva (agronomska, morfološka, fiziološka), koja su u korelaciji sa prinosom i imaju veću heritabilnost. Većina ovih svojstava se nasleđuje kvantitativno i njihovo adekvatno korišćenje u procesu selekcije zavisi od dostupne, relevantne genetičke informacije o broju i značaju gena koji utiču sa različitim doprinosom na ispoljavanje odabranog svojstva.

Cilj ovog rada je identifikacija lokusa za kvantitativna svojstva (QTL) za tolerantnost na stres suše kod kukuruza, kao i utvrđivanje postojanja uzročne povezanosti između dva ili više svojstava korišćenjem informacija o detektovanim QTL-ovima. Mapiranje se radi na genetičkom materijalu dobijenom ukrštanjem linija DTP79 (izvor tolerantnosti na sušu) i B73 (linija osetljiva na sušu). F<sub>2</sub> generacija se koristi za konstrukciju mape pomoću RFLP i SSR molekularnih markera, kao i sušom indukovanih cDNK proba koje su dobijene iz roditeljskog para primenom AFLP metode. Treća (F<sub>3</sub>) generacija navedenog ukrštanja koristi se za ocenjivanje agronomskih, morfoloških, fizioloških svojstava, ASI i ocene odgovora na sušu u polju.

Primenom odgovarajućih statističkih metoda utvrdiće se broj, pozicija i efekat QTL-ova za posmatrane osobine. Na osnovu dobijenih podataka identifikovaće se moguća uzajamna uzročna povezanost između ispitivanih osobina. Takođe, da bi se utvrdilo da li su isti QTL-ovi detektovani u različitim sredinama i kod genetički drugačijeg materijala, uporediće se njihove pozicije sa pozicijama odgovarajućih QTL-ova objavljenim u radovima drugih autora.

Genetička disekcija tolerantnosti na sušu kao ekonomski jedne od najznačajnijih osobina kukuruza, odnosno identifikacija potencijalnih gena uključenih u ekspresiju ovog svojstva ima značaja kako za osnovna tako i za primenjena istraživanja. Rezultati ovog rada bi mogli da nađu primenu u marker-asistiranoj selekciji za povećanu tolerantnost na sušu.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

Za konstruisanje molekularne mape neophodne za identifikaciju QTL-ova za tolerantnost na sušu kod kukuruza korišćena je F<sub>2</sub> populacija (176 biljaka) ukrštanja DTP79xB73 (tolerantna x osetljiva linija). Linija osetljiva na sušu (DTP79) izvedena je iz DTP populacije (*Drought Tolerant Population*) poreklom iz CIMMYT-a. Mapa je konstruisana korišćenjem RFLP, SSR markera i sušom indukovanih cDNK proba dobijenih iz roditeljskog para primenom iRNK AFLP metode u *John Innes Centre (JIC), Norwich, United Kingdom*.

Podaci o vrednostima fenotipskih svojstava potencijalno uključenih u odgovor kukuruza na stres suše, dobijeni su analizom F<sub>3</sub> familija u poljskim ogledima. Određene fenotipske vrednosti su korišćene, zajedno sa markerima, za QTL detekciju.

#### 3.2. Agroekološki uslovi i fenotipska merenja

Poljski ogledi na 116 F<sub>3</sub> familija (od 176 korišćenih za konstruisanje molekularne mape) bili su postavljeni u Zemun Polju (44° 52' 14" severna geografska širina, 20° 19' 48" istočna geografska dužina, nadmorska visina 82m) 2007. godine. Ogledi su izvedeni po RCB (*Randomized Complete Block*) dizajnu u tri ponavljanja, sa razmakom između redova od 70 cm. Posejano je 60 biljaka po familiji (20 biljaka po ponavljanju). Posle svakih deset familija posejan je po jedan red kontrole (hibrid ZP 434). Nicanje biljaka bilo je veoma neujednačeno za veliki broj posejanih familija, a jedan deo nije uopšte nikao. Usled navedenih okolnosti, nije proizvedena dovoljna količina semena za ponavljanje ogleda u narednoj godini. Zbog neujednačenog nicanja, za analizu je odabrano ukupno 10 biljaka po familiji iz sva tri ponavljanja, koje su bile u sličnoj fazi rasta u vreme kada su merenja započeta. Na odabranih 10 biljaka po familiji, merena su morfološka i agronomska svojstva, ASI i DS. Po 5 od ovih 10 biljaka odabrano je za merenje širina trećeg i četvrtog lista od vrha metlice, kao i fizioloških svojstava.

Za 2007. godinu je karakteristična veoma izražena vazdušna i zemljišna suša u toku aprila, jula i avgusta. U julu je bilo devetnaest dana sa ekstremno visokim

temperaturama vazduha (maksimalna dnevna temperatura od 35 °C do 45 °C) i to je jedan od najtoplijih meseci ikada od kako se u Srbiji beleži temperatura. Uslovi vlage su takođe bili nepovoljni za kukuruz, sa veoma malom količinom padavina za april (3.8mm) i jul (17.5mm).

### **3.2.1. Sadržaj vlage u zemljištu**

U toku vegetacionog perioda, uzimani su uzorci zemljišta, na tri mesta u svakom ponavljanju (na rubnim delovima i u središnjem delu svakog ponavljanja) u cilju određivanja vlage u zemljištu. Uzorci su uzimani po jedanput u toku maja i septembra, dva puta u junu, a u julu i avgustu približno na po deset dana. Uzorci zemljišta uzimani su na sledećim dubinama, u centimetrima: 0-30, 30-60 i 60-90 (celi segmenti uzimani su za analize). Vлага u zemljištu određivana je po termogravimetrijskoj metodi. Za određivanje vlage bio je korišćen sledeći pribor: električna sušilica, gvozdena štipaljka, aluminijumske posude sa poklopcima, analitička vaga, eksikator.

Postupak određivanja sadržaja vlage u zemljištu sastoji se od nekoliko koraka. Aluminijumske posude sa poklopcem za analizu su očišćene, osušene i izmerene na vagi sa dve decimale, zatim su korišćene za uzimanje uzoraka zemljišta u polju. Po donošenju iz polja, uzorci su stavljeni u električnu sušilicu na sušenje u trajanju od 12 sati na temperaturi od 105°C. Nakon isteka 12 sati posude sa osušenim uzorcima izvađene su iz sušilice gvozdenom štipaljkom i stavljene u eksikator da se ohlade. Nakon hlađenja uzorci u aluminijumskim posudama su ponovo izmereni na vagi. Na osnovu izvršenih merenja izračunat je procenat vlage u zemljištu.

Razlika u masi uzorka pre i posle sušenja predstavlja gubitak vlage u zemljištu. Izračunavanje udela vlage vrši se na osnovu sledeće formule:

$$W = (M_{pw} - M_{ps}) / (M_{ps} - M_p) \times 100$$

W - Vлага u zemljištu

$M_p$  - Masa prazne posude sa poklopcem

$M_{pw}$  - Masa posude sa uzorkom pre sušenja

$M_{ps}$  - Masa posude sa uzorkom posle sušenja

Porocenat vlage u zemljištu prikazan je odgovarajućim dijagramima (prikaz procenta vlage na sve tri dubine po ponavljanjima).

### 3.2.2. Sadržaj azota u zemljištu

Dva puta u toku vegetacionog perioda, jednom u fazi cvetanja (24. jul 2007., dan sa maksimalnom izmerenom temperaturom vazduha od kako se vrše merenja u Srbiji), a drugi put u vreme berbe ogleda određena je količina azota u zemljištu ( $\text{NH}_4\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  – forme azota koje biljke mogu da usvoje). Uzorci su uzimani na pet mesta na oglednoj parceli, na uglovima (na rubnim delovima u prvom i trećem ponavljanju) i u centralnom delu (u drugom ponavljanju), na tri dubine, u centimetrima (0-30, 0-60 i 0-90). Količina  $\text{NH}_4\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  u zemljištu određena je standardnom kolorimetrijskom metodom po Scharpf i Wehrmann (1975). Po 150 g zemljišta svakog uzorka je izmereno na vagi, a zatim je urađena ekstrakcija sa 1M NaCl i 0.1M  $\text{CaCl}_2$  u trajanju od jednog sata. Nakon toga izvršeno je filtriranje uzorka i iz filtrata je određivan sadžaj  $\text{NO}_3\text{-N}$  dodavanjem 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i očitavanjem na spektrofotometru na  $\lambda = 210 \text{ nm}$ . Sadržaj  $\text{NH}_4\text{-N}$  je određen nakon ubacivanja kompleksnog reagensa (22 g Na-salicilata, 7 g NaOH i 9 g Na-citrata rastvoreni u 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) i 1% Na-hipohlorita i očitavanja na spektrofotometru na  $\lambda = 652 \text{ nm}$  nakon razvijanja plavo-zelene boje. Količina azota prikazana je kao zbir dve izmerene forme azota. Rezultati su prikazani odgovarajućim dijagramima.

### 3.2.3. Fenotipska merenja

Za sva analizirana svojstva (morfološka, fiziološka, agronomska), korišćena je srednja vrednost odabranih biljaka za svaku familiju. Izračunate su i srednje vrednosti odgovarajućih kontrola, u cilju utvrđivanja ujednačenosti uslova u oglednom polju i eventualnog prilagođavanja izmerenih vrednosti ispitivanih osobina (ukoliko postoje značajne razlike između odgovarajućih kontrola). Spisak svih merenih svojstava dat je u tabeli 1.

U fazi cvetanja biljke, u polju su izmerene vrednosti morfoloških svojstava i izražene kao prosečna vrednost na deset biljaka po familiji. Širina trećeg i četvrtog lista (ŠL3, ŠL4) od vrha biljke izmerena je u središnjem delu lista gde dostiže maksimalnu vrednost. Visina biljke - VB merena je od tla do vrha metlice, a visina klipa - VK od tla do primarnog klipa. Dužina metlice - DM merena je od nodusa koji se nalazi neposredno ispod najniže primarne grane pa do vrha osovine metlice. Određen je i

ukupan broj listova - BL (u fazi izdanka, obeležen je treći list kao marker za određivanje broja listova) kao i broj grana metlice - BGM.

Pored navedenih svojstava, izmerene su i vrednosti sekundarnih morfoloških svojstava: period između metličenja i svilanja - ASI i ocena odgovora na sušu - DS.

Period između metličenja i svilanja određivan je tako što je beležen datum pojavljivanja polena i svile kod više od 50 % biljaka odabranih za analizu po familiji, a zatim je računata razlika između ove dve vrednosti.

Zajednička ocena za stepen uvijenosti lista, položaj listova u odnosu na stablo i starenje listova (ocena odgovora na sušu) - DS je vizuelno određivana korišćenjem skale od 1 do 5. Jedinicom su ocenjivane biljke sa uvelim, žutim i uvijenim, uspravnim listovima (ugao između stabla i lista blizu 0°), dok je petica dodeljivana biljkama sa potpuno zelenim i neuvijenim, horizontalnim (ugao između stabla i lista 90°) listovima. Ovo svojstvo beleženo je prvi put 24 jula (DS1) u pet časova poslepodne, kada je u Zemun Polju registrovana najviša temperatura vazduha od kada se merenja vrše (44.6°C). Beleženje je nastavljeno u naredne dve nedelje u isto vreme poslepodne. Četiri merenja u toku ovog perioda izvršena su posle kiše i njihova srednja vrednost data je kao DS2 (30-og i 31-og jula, kao i 2-og i 5-og avgusta). Za ostatak ovog perioda srednje vrednosti ovog svojstva prikazane su kao DS3.

Fiziološka svojstava kao što su relativni sadržaj vode -  $RSV_L$ , osmotski potencijal - OP i sadržaj šećera - SŠ izmereni su na 5 od 10 odabranih biljaka po familiji, u fazi cvetanja biljke.

Diskovi listova (prečnika 1cm) neophodni za određivanje  $RSV_L$  -a uzimani su dva puta, 17-og ( $RSV_{L1}$ ) i 24-og jula ( $RSV_{L2}$ ) sa trećeg i četvrtog lista od vrha biljke. Sveža masa uzoraka izmerena je neposredno posle uzimanja u polju za svaku populaciju (ukupno deset diskova lista po familiji). Uzorci su zatim stavljeni u petri kutije sa destilovanom vodom i inkubirani su tri sata u frižideru na 4°C. Po isteku ovog vremena, diskovi su osušeni filter papirom i izmerena je turgidna masa. Uzorci su zatim ostavljeni u sušnici na 80°C preko noći, da bi se posle sušenja ponovo izmerila masa uzoraka (suva masa).

Relativan sadržaj vode u listovima (Barrs i Weatherley, 1962) je izračunat na osnovu formule:

$$RSV_L (\%) = (sveža\ masa - suva\ masa / turgidna\ masa - suva\ masa) \times 100$$

Uzorci listova za određivanje osmotskog potencijala i sadržaja šećera uzeti su istovremeno sa uzorcima za izračunavanje relativnog sadržaja vode u listovima (diskovi listova prečnika 1cm) i čuvani na -20°C. Pre merenja ova dva svojstva, uzorci su odmrznuti, ceđenjem je iz njih istisnut sok (Quarrie i Henson, 1982), i uz pomoć osmometra (Roebeling, Camlab, Cambrige, UK) izmerena je koncentracija ćelijskog soka. Osmotski potencijal lista izračunat je po formuli:

$$OP \text{ (MPa)} = c \times R \times T$$

gde je c (mosmol) koncentracija soka, R univerzalna gasna konstanta ( $8.32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), a T apsolutna temperatura i za nju je korišćena vrednost 298K.

Iscedeni sok listova koji je upotrebljen za određivanje osmotskog potencijala korišćen je i za određivanje relativnog sadržaja šećera (%) pomoću optičkog refraktometra.

Prinos za svaku biljku izračunat je bez određivanja vlage množenjem broja redova na klipovima sa brojem zrna u redu i prosečnom težinom zrna u uzorcima. Zatim je određena prosečna vrednost prinosa po familiji (za deset odabranih biljaka) i izražena po biljci (g/b). Izmerene su vrednosti osam komponenti prinosa (prosečna vrednost na deset primarnih klipova po familiji). Ispitivane su komponente prinosa: broj redova po klipovima - BR, broj zrna po redu - BZ, masa zrna - MZ, dužina klipa - DK, prečnik klipa - PK), dužina zrna - DUZ, širina zrna - ŠZ. Obeleženi klipovi ispitivanih familija brani su ručno, obeleženi i spakovani u vreće, a zatim transportovani u laboratoriju.



**Tabela 1 Opis svih ispitivanih osobina (prinos, komponente prinosa, morfološke i fiziološke) potencijalno uključenih u odgovor biljke na stres suše**

Tip osobina	Osobina	Skraćenica	Opis osobine
Agronomske osobine	Prinos	PR (g/biljci)	Prinos po biljci
Komponente prinosa	Broj redova po klipu	BR	Prosečan broj redova na klipu za 10 primarnih klipova po familiji
	Broj zrna u redu	BZ	Prosečan broj zrna u redu za 10 primarnih klipova po familiji
	Masa 100 zrna	MZ (g)	Prosečna masa 1000 zrna za 10 primarnih klipova po familiji
	Dužina klipa	DK (cm)	Prosečna dužina 10 primarnih klipova po familiji
	Prečnik klipa	PK (cm)	Prosečan dijametar 10 primarnih klipova po familiji
	Dužina zrna	DUZ (cm)	Prosečna dužina 10 zrna iz središnjeg dela 10 primarnih klipova po familiji
	Širina zrna	ŠZ (cm)	Prosečna širina 10 zrna iz središnjeg dela 10 primarnih klipova
Morfološke osobine	Debljina zrna	DEZ (cm)	Prosečna debljina 10 zrna iz središnja dela 10 primarnih klipova
	Visina biljke	VB (cm)	Visina biljke od tla do vrha metlice
	Visina do klipa	VK (cm)	Visina biljke od tla do primarnog klipa
	Broj listova	BL	Ukupan broj listova na biljci
	Broj grana metlice	BGM	Broj primarnih grana metlice
	Dužina metlice	DM (cm)	Od nodusa ispod najniže primarne grane pa do vrha osovine metlice
	Širina trećeg lista	ŠL3 (cm)	Treći list od vrha metlice - širina u središnjem delu gde dostiže maksimalnu vrednost
	Širina četvrtog lista	ŠL4 (cm)	Četvrti list od vrha metlice - širina u središnjem delu gde dostiže maksimalnu vrednost

**Tabela 1 Nastavak**

<b>Tip osobina</b>	<b>Osobina</b>	<b>Skraćenica</b>	<b>Opis osobine</b>
	Period između metličenja i svilanja	ASI (dani)	Razlika između pojave polena i svile kod više od 50% biljaka odabranih za analizu po porodici
	Ocena odgovora na sušu 1	DS1	24. jul - max temperatura 44°C
	Ocena odgovora na sušu 2	DS2	Posle kiše -srednja vrednost četiri merenja
	Ocena odgovora na sušu 3	DS3	Srednja vrednost u toku 10 dana
Fiziološke osobine	Relativni sadržaj vode u listu merenje 1	RSV1 (%)	Relativni sadržaj vode u listu, 17. 7. 2007.
	Relativni sadržaj vode u listu merenje 2	RSV2 (%)	Relativni sadržaj vode u listu, 24. 7. 2007.
	Sadržaj šećera 1	SŠ1(%)	Relativan sadržaj ukupnih šećera u listu, 17. 7. 2007.
	Sadržaj šećera 2	SŠ2(%)	Relativan sadržaj ukupnih šećera u listu, 24. 7. 2007.
	Osmotski potencijal 1	OP1	Osmotski potencijal lista, 17. 7. 2007.
	Osmotski potencijal 2	OP2	Osmotski potencijal lista, 24. 7. 2007.

### 3.3. Molekularne analize

Molekularna mapa je konstruisana primenom RFLP, SSR markera i sušom indukovanih cDNK proba dobijenih iz roditeljskog para primenom iRNK AFLP metode u *John Innes Center, Norwich, UK*. U daljem tekstu opisani su standardni protokoli za metode korišćene u ovom postupku.

#### 3.3.1. Izolacija DNK

Izolacija DNK radi se iz listova roditeljskih linija i F<sub>3</sub> familija. Biljke se gaje u fitotronu (kontrolisani uslovi) do faze tri lista. Svaki genotip se predstavlja sa po 10 biljaka. Od svake biljke izmeri se 0.4g tkiva i naprave grupni uzorci (4g) koji se do upotrebe čuvaju na -80°C.

Opisan je postupak izolacije DNK primenom izmenjene metode po Murrey i Thompson (1980).

Tkivo lista (4g) samelje se u tečnom azotu do finog praha. Pufer za izolaciju (2% CTAB, 1.4 M NaCl, DTT 0.2%, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH=8.0) zagreje se na 60°C, a zatim se doda po 20 mL pufera u epruvete sa samlevenim tkivom. Sledi inkubacija tkiva sa puferom jedan sat na 60°C u vodenom kupatilu, uz pažljivo lagano mešanje sadržaja u tubama na svakih 15 minuta. Posle inkubacije uzorci se ostavljaju da se ohlade 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se dodaje jedna zapremina smeše hloroform-izoamilalkohol (24:1). Tube se lagano mešaju do momenta kad se boja u fazama ustali, a zatim se njihov sadržaj centrifugira 15 minuta na 3000 obrtaja u minutu. Gornja, vodena faza prebacuje se u čiste tube, a hloroform faza se odbacuje. U uzorke se zatim dodaje 50µl RNA-aze (10mg/mL) i inkubiraju se na sobnoj temperaturi 30 minuta. Posle inkubacije, dodaju se 2/3 zapremine hladnog izopropanola i sadržaj u tubama se meša laganim okretanjem do izdvajanja molekula DNK u vidu končastih niti. DNK se izvuče iz tuba namotavanjem na stakleni štapić i prenese u 4mL pufera za ispiranje (76% etanol, 10 mM NaOAc), a zatim se uzorci mešaju na rotirajućoj mešalici u trajanju od 20 minuta. Ponovnim namotavanjem na štapić DNK se prenosi iz pufera za ispiranje u nove tube i suši na vazduhu dok ne dobije staklast izgled. Prosušena DNK se rastvara u odgovarajućoj zapremini (200-500µL u zavisnosti od veličine taloga)

1xTE pufera (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0) i ostavi da se rastvori preko noći na +4°C.

### 3.3.2. Određivanje koncentracije i proveravanje kvaliteta DNK

Koncentracija i kvalitet DNK određuju se na dva načina:

#### 1) spektrofotometrijski

Izmeri se apsorbancija 300x razblaženog uzorka u 0.1xTE puferu na talasnim dužinama  $\lambda = 260$  i  $\lambda = 280$  nm (spektrofotometar Shimadzu UV-1601).

Koncentracija DNK se izračunava po formuli:

$$\text{conc.}(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{OD}_{260} \times R \times 50/1000$$

gde je

OD<sub>260</sub> - apsorbancija na talasnoj dužini  $\lambda = 260$ ;

R - razblaženje uzorka;

50 - koncentracija 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  koja ima apsorbancu OD=1.

Čistoća uzorka se procenjuje preko odnosa OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> i ako je ovaj odnos u opsegu 1.8 - 2.0 DNK je dovoljno čista za marker analizu.

#### 2) gel-kvantifikacijom

Genomska DNK analizira se na 0.8% agaroznom gelu. Kao standard za poređenje koncentracija koriste se različita razblaženja  $\lambda$  DNK (5, 10, 50, 100, 250 ng/ $\mu\text{L}$  odn. količine 10, 20, 100, 200, 500 ng). Koncentracija DNK uzoraka određuje se vizuelnim poređenjem sa koncentracijama standarda. Kvalitet DNK, odnosno stepen razgradnje pri ekstrakciji procenjuje se po tome da li su dobijene jasno izražene trake visokomolekulske genomske DNK (dobar kvalitet) ili razvučene trake (loš kvalitet).

Po utvrđivanju koncentracije i kvaliteta, izolovana DNK se do upotrebe čuva na -20°C.

### **3.3.3. RFLP analiza**

#### **3.3.3.1. Restrikcija DNK**

Restrikcija izolovane DNK iz roditeljskih linija i F<sub>3</sub> biljaka radi se sa odgovarajućim restrikcionim enzimima. Za konstrukciju mape u ovom radu korišćeni su EcoRI, EcoRV, DraI, HindIII i BamHI - endonukleaze koje prepoznaju i seku sekvence od šest nukleotida.

Reakciona smeša za digestiju sadrži DNK uzorak (15µg), odgovarajući enzim (2.5U), 1x enzimski pufer (komercijalni pufer 10 puta koncentrovan) i sterilnu destilovanu vodu. Smeša za digestiju inkubira se na 37°C preko noći u vodenom kupatilu, nakon čega se digestovani uzorci čuvaju na -20°C do upotrebe.

#### **3.3.3.2. Elektroforeza digestovanih fragmenata**

Posle digestije, razdvajanje i provera kvaliteta fragmenata DNK vrši se metodom agarozne elektroforeze. Za pravljenje odgovarajućeg agaroznog gela (0.8%) koristi se 1xTAE pufer (stok rastvor: 10xTAE- 40mM TRIS, 5mM NaOAc, 0.77mM EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8.0). Na gel se nanosi po 15µg DNK uzoraka pomešanih sa 1/3 zapremine pufera za uzorke (0.025% bromfenil plavo u 30% glicerolu). Elektroforeza se odvija preko noći pri konstantnom naponu od 35V. Posle elektroforeze gel se inkubira u rastvoru etidijum bromida (0.5 µg/mL) 20 minuta, a zatim se proverava kvalitet restrikcije prosvetljivanjem na UV transiluminatoru.

#### **3.3.3.3. Southern blot**

Elektroforetski razdvojeni fragmenti DNK prenose se sa gela na pozitivno naelektrisanu najlonsku membranu. Ovaj korak u RFLP analizi sastoji se od pripreme, prenošenja i fiksiranja DNK fragmenata na membranu.

Priprema gela obuhvata depurinaciju i denaturaciju DNK u gelu. Depurinacija se postiže inkubiranjem gela u 0.25M HCl-u 10 minuta na rotirajućoj mešalici. Zatim se vrši denaturacija DNK inkubiranjem gela u 0.4M NaOH 10 minuta, takođe na rotirajućoj mešalici. Ovo je način da se fragmenti DNK veći od 10 kb iseku na manje fragmente i na taj način obezbedi njihov lakši prenos sa gela na membranu.

Da bi se obezbedilo kapilarno prenošenje kratkih jednolančanih sekvenci DNK na najlonsku membranu formira se tzv. „sendvič“ koji se sastoji od:

- dva sloja *Whatman* filter papira, ivica uronjenih u 0.4M NaOH (alkalni transfer)
- gela postavljenog preko filter papira, gornjom stranom okrenutog prema dole
- pozitivno naelektrisane najlonske membrane stavljene preko gela
- dva sloja *Whatman* filter papira koja pokrivaju membranu
- sloja upijajućeg papira debljine 8 cm postavljenog preko filter papira.

Na ovako napravljen „sendvič“ postavi se staklena ploča i opterećenje od 400g, a kapilarni transfer obavlja se preko noći.

Po završenom transferu, izvrši se fiksiranje DNK, odnosno stvaranje kovalentnih veza između DNK i membrane. To se postiže tako što se membrane prosuše na vazduhu, a zatim peku na 100°C u trajanju od tri sata. Membrane se čuvaju u 2xSSC (0.3M NaCl, 0.03M Na citrat, pH 7.0) puferu, na +4°C, do upotrebe.

#### 3.3.3.4. Mini-prep

Sekvence DNK označene kao RFLP probe izoluju se iz klonova bakterije *E. coli* koje nose plazmide sa insertima. Klonovi bakterija održavaju se kao glicerol stokovi u LB medijumu (1% tripton, 0.5% kvasac, 0.5% NaCl, pH 7.5) i čuvaju na -80°C. Umnožavanje klonova vrši se po standardnoj proceduri na tečnoj LB podlozi sa 100µg ampicilina/1L, na 37°C, uz intenzivnu aeraciju.

Plazmidi se izoluju po modifikovanoj metodi alkalne lize (Birnboim i Doly, 1979). Po 1 mL bakterijske kulture centrifugira se u „ependorf“ centrifugi (12000 rpm) 1 minut. Bakterijski talog se resuspenduje u 1xTE (25mM TRIS, 10mM EDTA, pH 8.0) pufera, posle čega se dodaje 200µL sveže napravljenog 0.2M NaOH/1% SDS. Zatim sledi bakterijska liza koja traje 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se dodaje po 150µL 3M NaOAc, pH 5.2 i uzorci se inkubiraju 10 minuta na -20°C. DNK se prečišćuje od proteina pomoću 500µL smeše fenol:hloroform:izoamilalkohol (25:24:1) vorteksovanjem i centrifugiranjem 5 minuta, a zatim sa istom količinom smeše hlороform:izoamilalkohol (24:1), takođe centrifugiranjem 5 minuta u ependorf centrifugi. Gornji sloj prebacuje se u nove ependorfice i dodaje se po 950µL 95% etanola (1:2). Nakon inkubiranja 5 minuta na sobnoj temperaturi uzorci se centrifugiraju 10 minuta, a zatim se ispiraju 80% etanolom. Kada se talog prosuši na sobnoj

temperaturi, rastvara se u 50  $\mu$ L 1xTE pufera (10mM TRIS, 1mM EDTA pH 8.0). Uzorci se čuvaju na -20°C do upotrebe. Koncentracija i čistoća izolovanih plazmida se određuje spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na  $\lambda$  260nm i 280 nm. Dobijeni plazmidi su spremni za digestiju inserata koji sadrže željene klonove.

Digestija se izvodi korišćenjem 20  $\mu$ g plazmidne DNK i 20 jedinica restrikcionog enzima, 25mM spermidina u odnosu 1:10, "slanog pufera" u odnosu 1:10, 10 000 RN-aze A+T<sub>1</sub> u odnosu 1:10 i destilovane vode do željene zapremine sa inkubacijom na 37°C u trajanju od najmanje 2-3 sata, a reakcija se zaustavlja agaroznim zrnima u odnosu 1:3. Posle digestije radi se agarozna gel elektroforeza na 0.8% gelu sa agarozom topljivom na niskim temperaturama u 1xTAE puferu. Sledi bojenje i fotografisanje gela, a zatim se insert seče i izoluje korišćenjem postupka Genaclean „glassmilk“ za prečišćavanje plazmidne DNK. Posle prečišćavanja plazmidna DNK čuva se na 4°C do dalje upotrebe.

### 3.3.3.5. Radioaktivno obeležavanje DNK proba

Većina korišćenih RFLP markera koja je testirana pripada "core" kolekciji gDNK i cDNK proba za kukuruz sa *University of Missouri* i *University of California, USA* (UMC i CSU), kao i iz *NPI (Native Plants Incorporated)*.

Inserti se obeležavaju korišćenjem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP "nick" translacijom, a zatim se vrši njihova hibridizacija sa fragmentima genomske DNK vezane za najlonsku membranu (Hybond N-Amersham International). Obeleženi dezoksiribonukleotidi ugrađuju se u dvolančanu DNK tzv. *nick* translacijom. Za ovaj način obeležavanja proba koriste se niske koncentracije DNaze I da bi stvorile jednolančane prekide (engl. *nicks*) u DNK fragmentu koji treba da bude obeležen. *E. coli* DNK polimeraza I prepoznaje ove prekide u molekulu DNK. Uz pomoć svoje kombinovane 5'-3'-egzonukleazne i polimerazne aktivnosti, ovaj enzim zamenjuje postojeće dezoksiribonukleotide u 3'-pravcu, što rezultira u pomeranju jednolančanog prekida duž molekula DNK. Unošenjem radioaktivno obeleženih nukleotida u reakciju nastaju efikasno obeleženi dvolančani cDNK molekula.

Pre obeležavanja, DNK probe se konvertuju u jednolančane DNK molekule što se postiže denaturacijom na 95°C u trajanju od 10 minuta. Denaturisanoj DNK (0.5  $\mu$ L) dodaju se 10 x pufer za *nick* translaciju (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M MgSO<sub>4</sub>, 0.1M

dithiothreitol, 500 µg/mL BSA, rastvor DNKaze I (10 ng/mL u 1 x puferu za „nick“ translaciju i 50% glicerolu), DNK polimeraza I (5U/µL), neobeleženi dNTP-ovi (1mM dATP, dGTP i dTTP) i  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10µCi/µL) i sterilna dva puta destilovana voda. Sve komponente se pažljivo izmešaju i smeša inkubirana 60 minuta na temperaturi od 16 °C. Dodavanjem rastvora za zaustavljanje obeležavanja nukleotida (1% SDS 10 mM EDTA, 0.25% ksilen cijanol i 0.25% bromfenolblu) reakcija se prekida.

### 3.3.3.6. Hibridizacija i detekcija

Ovaj korak podrazumeva vezivanje obeležene probe za homologi fragment genomske DNK.

Za efikasnu hibridizaciju neophodno je najpre izvršiti pripremu membrana prehibridizacijom. Ona obuhvata inkubiranje membrana u 15 mL po membrani prehibridizacionog/hibridizacionog rastvora visoke jonske jačine.

Prehibridizacioni/hibridizacioni rastvor se sastoji od 5x SSPE razblaženog rastvora (stok rastvor 20xSSPE - 3M NaCl, 200mM natrijum fosfat, 20mM EDTA) i 5x Denhardt blokirajućeg agensa (stok rastvor 100x Denhardt reagens - 2g BSA, 2g fikal, 2g PVP, do 100mL ddH<sub>2</sub>O, da bi se sprečilo nespecifično vezivanje probe za površinu membrane), 500µg/mL denaturisane salmon sperm DNK i 0.5% SDS deterdženta visoke čistoće i sterilna bidestilovana voda.

Nakon dodavanja prehibridizacione smeše, membrana se ostavlja preko noći u plastičnoj kesi na rotirajućoj mešalici na sobnoj temperaturi. Sledi inkubiranje membrane u vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od najmanje tri sata. Radioaktivno (<sup>32</sup>P) obeležena proba dodaje se kroz otvor napravljen u uglu kese. Hibridizacija se vrši preko noći mućkanjem u vodenom kupatilu na 65°C. Koriste se tri tipa rastvora da bi se uklonio višak obeležene probe sa membrane. Membrane se najpre ispiraju u rastvoru koji je sadrži 2xSSPE i 0.1% SDS niskog stepena čistoće, dva puta po 10 minuta na sobnoj temperaturi, zatim u drugom rastvoru (1xSSPE, 0.1% SDS) jedanput u toku 15 minuta na 60°C, i trećem (0.1xSSPE, 0.1% SDS) takođe jednom 15 minuta na 60°C. Posle uklanjanja viška probe, membrana se ispira u destilovanoj vodi i suši. Membrana se uvija u transparentnu foliju, a uz pomoć Gajgerovog brojača utvrđuje se radioaktivno emitovanje radi određivanja dužine izlaganja na autoradiografskom filmu. Rendgenološke kasete sadrže intenzivirajuće ploče koje pojačavaju signale emitovanja.



Koriste se Kodak XAR-5 filmovi. Autoradiografija se izvodi na -80°C. Hibridizovane radioaktivne probe se izlažu autoradiografskim filmovima u trajanju od 3 - 6 dana. Filmovi se razvijaju i fiksiraju u odgovarajućim Kodak rastvorima u mračnoj komori, a zatim se čitaju trake koje su ovom metodom dobijene kod roditeljskog para i segregirajuće populacije.

Da bi se ponovo koristile membrane se ispiraju u dva rastvora: rastvor I (0.1M NaOH, 0.2% SDS) i rastvor II (0.2M Tris pH 7.5, 0.1xSSC, 0.2% SDS) u trajanju od po 20 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim se ispiraju u destilovanoj vodi i ostavljaju da se osuše. Čuvaju se na +4°C do sledeće hibridizacije.

### 3.3.4. SSR analiza

Za dobijanje molekularne mape pored RFLP markera korišćeni su i SSR markeri. Prikazana je metoda SSR analize zasnovana na umnožavanju genomske DNK PCR tehnikom po Edwards i sar. (1991).

Smeša za PCR reakciju sastoji se od komercijalnog pufera, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTP-ova, 20μM prajmera (*forward* i *reverse*), 1U *Taq* polimeraze, 20ng/μL DNK uzorka i sterilne vode kojom se smeša dopunjuje do finalne zapremine.

PCR program se sastoji od sledećih koraka: inicijalne denaturacije na 94°C u trajanju od 2 minuta, denaturacije na 94°C u trajanju od 1 minuta, vezivanja prajmera za ciljne sekvence na 61°C u trajanju od 1 minuta i elongacije na 72°C u trajanju od 1 minuta. Završni korak elongacije traje 4 minuta. Denaturacija, vezivanje prajmera za ciljne sekvence i elongacija ponavljaju se u 30 ciklusa.

Posle PCR-a, produkti se razdvajaju na 6% poliakrilamidnom gelu, a vizualizacija se radi bojenjem srebro-nitratom (Bassam i sar., 1991). Staklene ploče za poliakrilamidnu elektroforezu se dobro operu i isperu destilovanim vodom, a zatim obrišu 70% etanolom. Na veću od dve ploče nanosi se Repelcote, a na manju silan (da bi se obezbedilo prijanjanje gela na manju ploču posle završene elektroforeze i razdvajanja ploča). Sastavlja se "sendvič", pričvršćuje se štipaljkama i postavlja u kalup da bi se izbeglo curenje gela. Za elektroforezu se koristi 6% poliakrilamidni gel (6% akrilamid/bisakrilamid - 40% akrilamid/bisakrilamid 19:1, 5xTBE, 480g urea, destilovana voda do zapremine od 1L, 10% amonijumpersulfat i TEMED). Gel se naliva u prethodno pripremljen kalup, a zatim se ostavlja da se polimerizuje sat i 30 minuta. U

kadicu za elektroforezu sipa se 1x TBE pufer (napravljen razblaženjem 5xTBE pufera - 54g Trisa, 27.5g borne kiseline, 0.5M EDTA, pH 8.0, destilovane vode do finalne zapremine od 1L) do određene visine, i u njega se postavlja sendvič sa polimerizovanim gelom. Prethodno se izvuče češalj, koji je postavljen da bi se napravili džepići u gelu u koje se nanose uzorci. Džepići se ispraju destilovanom vodom da bi se izbegao uticaj naknadne polimerizacije gela na dnu bunarčića što bi moglo da utiče na razdvojenost fragmenata. Doda se preostali pufer u gornju kadicu aparata za elektroforezu a zatim se nanesu uzorci u koje je prethodno sipan odgovarajući pufer (10mL formamida, 10mg ksilen cijanola, 10mg bromfenol blu, 0.5M EDTA, pH 8.0) i koji se denaturišu 3 minuta na 100°C. Elektroforeza na 90W traje 1 sat i 15 minuta.

Posle završene elektroforeze, ploče se razdvajaju špatulom. Ploča na kojoj je gel ostao potapa se u kadicu sa rastvorom (10% glacijalna sirćetna kiselina) za fiksaciju. Rastvor se mućka na rotacionoj mešalici 30 minuta. Gel se zatim ispira destilovanom vodom tri puta, a zatim potapa u rastvor za bojenje (3g srebro-nitrat, 3ml 37%-nog formaldehida, destilovana voda do finalne zapremine od 2L) i ostavlja na mešalici 30 minuta. Po isteku ovog vremena, rastvor srebra nitrata se odliva, i ploča sa gelom stavlja se u prethodno pripremljeni razvijač (60g anhidrovanog  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  rastvara se u 2L dva puta destilovane  $\text{H}_2\text{O}$  na mešalici i neposredno pre stavljanja gela dodaje se 3mL 37%-nog formaldehida i 400 $\mu\text{L}$  natriumtiosulfata). Da bi se ovaj proces zaustavio kada se ukažu trake na gelu koje se nalaze blizu njegove donje ivice, gel se ponovo stavlja u rastvor za fiksiranje. Po razvijanju boje srebra nitrata, gelovi se skeniraju i profili traka se određuju vizuelnim putem.

### **3.3.5. AFLP analiza**

Pored RFLP i SSR tehinka za dobijanje mape korišćena je i metoda AFLP iRNK otiska. Ova metoda se zasniva na selektivnoj PCR amplifikaciji određenih fragmenata cDNK koji su dobijeni reverznom transkripcijom iRNK i omogućava poređenje velikog broja uzoraka radi detekcije razlika u ekspresiji gena specifičnih za genotip, ali i promena u populacijama iRNK izazvanih dejstvom faktora spoljašnje sredine. Ova metoda primenjena je za analizu ekspresije gena kod roditeljskih genotipova (DTP79 i B73). Korišćeno je 29 kombinacija AFLP prajmera za analizu 6 uzoraka (po jedna kontrola i po dva tretmana stresom suše za svaki genotip).

Metoda AFLP iRNK otiska obuhvata sintezu cDNA, restrikciju digestiju, ligaciju adaptera i preamplifikaciju (Money i sar., 1996). Ukupna RNK izoluje se iz lista biljaka koje rastu u uslovima suše i u uslovima dobre snabdevenosti vodom korišćenjem odgovarajućeg komercijalnog kita (mRNA Quickprep kit (Pharmacia) za izolaciju i RNeasy kit (Qiagen) za prečišćavanje). Sinteza dvolančane cDNK iz RNK vrši se prema uputstvima dobijenim sa reverznom transkriptazom (Superscript reverse transcriptase, Life Technologies). Mešavina tri oligonukleotidne sekvence (prajmeri) 5'-AGTCTGCAGT<sub>12</sub>V-3' (gde V označava A, C ili G nukleotide), koristi se za sintezu jednog lanca cDNK. Ovi prajmeri kreiraju PstI restrikciono mesto posle sinteze drugog lanca cDNA, s obzirom da sadrže sekvencu koju prepoznaje PstI restrikcioni enzim. Varijabilni 3' nukleotid koji se nalazi do T<sub>12</sub> kraja obezbeđuje početak sinteze na spoju poli-A kraja i sekvence na 3' kraju iRNK. Sinteza prvog lanca cDNK izvodi se na 42°C u reakcionoj smeši koja se sastoji od 0,5µg oligonukleotidnog miksa, nekoliko µg ukupne RNK, 200U reverzne transkriptaze, i inhibitora RNK-aze. Posle sinteze drugog lanca, cDNK se digestuje sa po 5 U svake od restrikcioni endonukleaza (PstI i MseI). cDNK se zatim ligira sa MseI adapterom i biotiniziranim PstI dvolančanim adapterom da bi se kreirala ciljna mesta za vezivanje prajmera u reakciji umnožavanja fragmenata cDNK. Fragmenti koji sadrže biotinizirane PstI adaptore izdvajaju se uz pomoć streptavidin-vezanih paramagnetnih perlica (Dynal).

Preamplifikacija (PCR reakcija) se izvodi uz pomoć neselektivnih prajmera u cilju konzerviranja prečišćenih cDNK proba. Selektivna amplifikacija vrši se korišćenjem prajmera koji sadrže 3' kraj sa selektivnim nukleotidima koji omogućavaju sintezu DNK samo na određenim restrikcionim mestima.

Amplifikuju se samo cDNK fragmenti kod kojih nukleotidi koji ograničavaju mesto restrikcije odgovaraju selektivnim nukleotidima. Uslovi PCR reakcije su isti kao i za AFLP reakciju genomske DNK (Vos i sar., 1995). Smeša za amplifikaciju se sastoji od preamplifikacionog produkta, po 50 ng/µL neobebeženog i obebeženog prajmera, dNTP-ova (2.5mM), *Taq* polimeraze (0.5U/µL), 1xPCR pufera i sterilne destilovane vode.

Za obeležavanje prajmera koristi se smeša koja se sastoji od prajmera (50 ng/µL), <sup>33</sup>P dATP, T<sub>4</sub> polinukleotidnog kinaznog pufera, T<sub>4</sub> polinukleotidne kinaze (PNK), sterilne destilovane vode. Obeležavanje traje dva sata na 37°C. Uslovi

amplifikacije su: denaturacija na 94°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera u trajanju od 30 sekundi na 65°C, elongacija na 72°C u trajanju od jednog minuta. Denaturacija, vezivanje prajmera za ciljne sekvence i elongacija ponavljaju se u 20 ciklusa.

Produkti amplifikacije obeleženi sa  $^{33}\text{P}$  razdvajaju se na standardnim 6% poliakrilamidnim gelovima. Gelovi se suše vakuumom na Whatman filter papiru (3MM) i analiziraju dva do tri dana posle autoradiografije. cDNK fragmenti od interesa isecaju se iz gela, ekstrahuju sa vodom ili TE puferom i reamplifikuju korišćenjem parova prajmera primenjenih u reakciji selektivne amplifikacije. Reamplifikovani cDNK fragmenti se kloniraju u PCR vektor za kloniranje (Amersham). Karakterizacija kloniranih cDNK fragmenata vrši se DNA *dot-blot* i *Southern blot* hibridizacijom.

### 3.3.6. DNK *dot blot*

Amplifikovani klonirani cDNK fragmenti koriste se kao probe za *dot-blot* hibridizacionu analizu cDNK uzoraka iz svih genotipova i tretmana dobijenih selektivnom amplifikacijom ali bez ugrađivanja radioaktiviteta. Samo klonovi koji ispunjavaju kriterijum da su njihovi hibridizacioni profili identični profilima traka od kojih vode poreklo, biraju se za dalju karakterizaciju.

Membrana (HybondN<sup>+</sup>) se seče u trake (1cm<sup>2</sup> po uzorku). PCR amplifikacioni produkti, cDNK uzorci (2 µL svaki) dobijeni specifičnim parom prajmera nanose se na trake. Napravi se odgovarajući broj replika (koji zavisi od broja klonova poreklom od određene kombinacije prajmera koji se testiraju), a trake se obeležavaju imenom odgovarajućeg prajmera i imenom odgovarajuće replike. cDNK se fiksira za membranu izlaganjem 0.4 M NaOH u trajanju od 20 minuta i onda ispira 2xSSC rastvorom, 30mM (Natrijum citrat, pH 7.0, 0.3 M NaCl). Višak tečnosti uklanja se Whatman 3MM filter papirom, uzorci se čuvaju na -20°C. cDNK fiksirana za membranu se hibridizuje sa odgovarajućim klonovima (klonovi amplifikovani sa istim prajmerom koji je korišćen za umnožavanje AFLP cDNK uzoraka) kao hibridizacionim probama (ove probe su neradioaktivno obeležene). Intenzitet obeležavanja determiniše se denzitometrijom i proporcionalan je koncentraciji ciljnog molekula u uzorku.

Neradioaktivno obeležavanje, hibridizacija i detekcija rade se po uputstvima komercijalnog Amersham-ovog ECL kita.

Ovako odabrani cDNK fragmenti su sekvencirani i locirani na mapi.

### **3.4. Statističke metode za fenotipska svojstva**

Da bi se utvrdilo odstupanje od normalne raspodele testirana je distribucija vrednosti izmerenih za svako svojstvo (prikazani su dijagrami raspodele za sve ispitivane osobine, Prilog 2). Izračunate su srednje vrednosti, minimum, maksimum, standardne devijacije i varijansa ispitivanih osobina. Za testiranje distribucije i izračunavanje navedenih vrednosti korišćen je program WinQTL kartografer, verzija 2.5 (<http://statgen.ncsu.edu>).

Fenotipske korelacije su izračunate između 26 ispitivanih fenotipskih osobina primenom Pearson-ovog koeficijenta (Microsoft Office, 2003).

### **3.5. Konstrukcija molekularne mape**

Molekularna mapa dobijena je u *JIC, Norwich, UK*, korišćenjem statističkog programa MAPMARKER (Lander i sar., 1987) na osnovu rezultata dobijenih RFLP, SSR i AFLP markerima. Distanca između markera (cM) određena je iz učestalosti rekombinacija korišćenjem Haldane-ove funkcije (Haldane, 1919). Segregacija na svakom marker lokusu proverena je  $\chi^2$ -kvadrat testom za očekivani mendelovski odnos razdvajanja.

### **3.6. Identifikacija QTL-ova**

U cilju detekcije QTL-ova koji potencijalno regulišu određeno svojstvo, inicijalno je korišćena analiza varijanse (jednosmerna ANOVA, Microsoft Office, 2003). Ispitivane jedinice iz populacije razvrstane su u odgovarajuće marker klase. Na osnovu prisustva/odsustva određenog marker lokusa, ispitivana je značajnost razlika (F test) između ovih klasa uzimajući u obzir izmerene vrednosti posmatranog svojstva. Detektovanje značajne razlike između srednjih vrednosti fenotipskog svojstva odgovarajućih parova marker klasa za ispitivani marker značilo je da je taj marker vezan za QTL koji utiče na ispoljavanje datog svojstva. Prag značajnosti je bio  $P < 0.1$ .

Za dobijanje profila verovatnoće za nalaženje QTL-ova korišćen je WinQTL kartografer, verzija 2.5 (<http://statgen.ncsu.edu>). Korišćene su metode analize pojedinačnog markera, jednostavnog intervalnog i kompozitnog intervalnog mapiranja

(Zeng, 1993, 1994). Prag značajnosti za nalaženje QTL-ova bio je  $LOD > 2$  za IM i CIM metodu (Sanguineti i sar., 1999). Kompozitno intervalno mapiranje uključuje dodatne „background“ markere u statistički model pored markera koji ograničavaju ispitivani interval. Ovi markeri izabrani su automatski od strane softvera. Maksimalna vrednost LOD na profilu verovatnoće uzimana je kao pozicija QTL (pik QTL-a). Interval poverenja za svaki QTL definisan je kao interval sa obe strane QTL maksimuma do opadanja LOD za 1. Pored određivanja broja i pozicije QTL-ova, WinQTL kartografer korišćen je za utvrđivanje njihovog efekta-aditivni (a) i dominantni (d) efekat, kao i za određivanje procenta fenotipske varijabilnosti koji svaki od identifikovanih QTL-ova opisuje ( $R^2$ ).

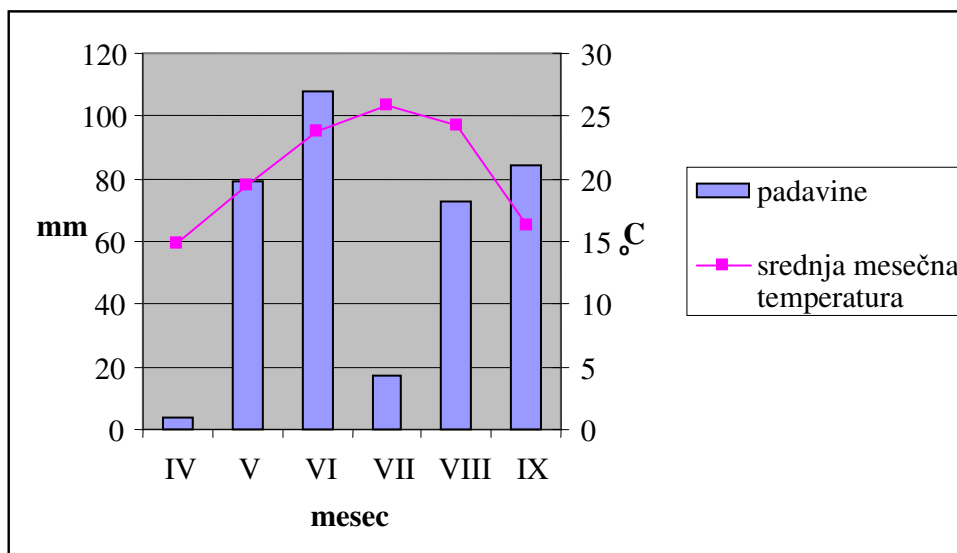
Prosečna vrednost dominantnog efekta izračunata je kao odnos  $ld/lal$ . Delovanje gena određeno je na osnovu prosečne vrednosti dominantnog efekta prema kriterijumima Stuber i sar., (1987): aditivni efekat (A)=0 do 0.20, delimično dominantni (PD)=0.21 do 0.80, dominantni (D)=0.81 do 1.20 i overdominantnost (OD)>1.20.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Agroekološki uslovi

#### 4.1.1. Osnovni meteorološki parametri

Godina 2007., u kojoj je izveden eksperiment je jedna od izrazito sušnih godina u Srbiji sa najvišom ikad izmerenom dnevnom temperaturom u Beogradu od 43.6 °C na dan 24. jula. Srednje mesečne temperature i suma padavina u Zemun Polju u toku vegetacione sezone 2007. godine kada je eksperiment izveden, prikazani su na slici 1. Iz dijagrama se može uočiti da je količina padavina bila veoma nepovoljna u vreme setve (april, 3.8 mm), kao i u vreme metličenja i svilanja (jul, 17.5 mm).



Slika 1 Srednje mesečne temperature i sume padavina

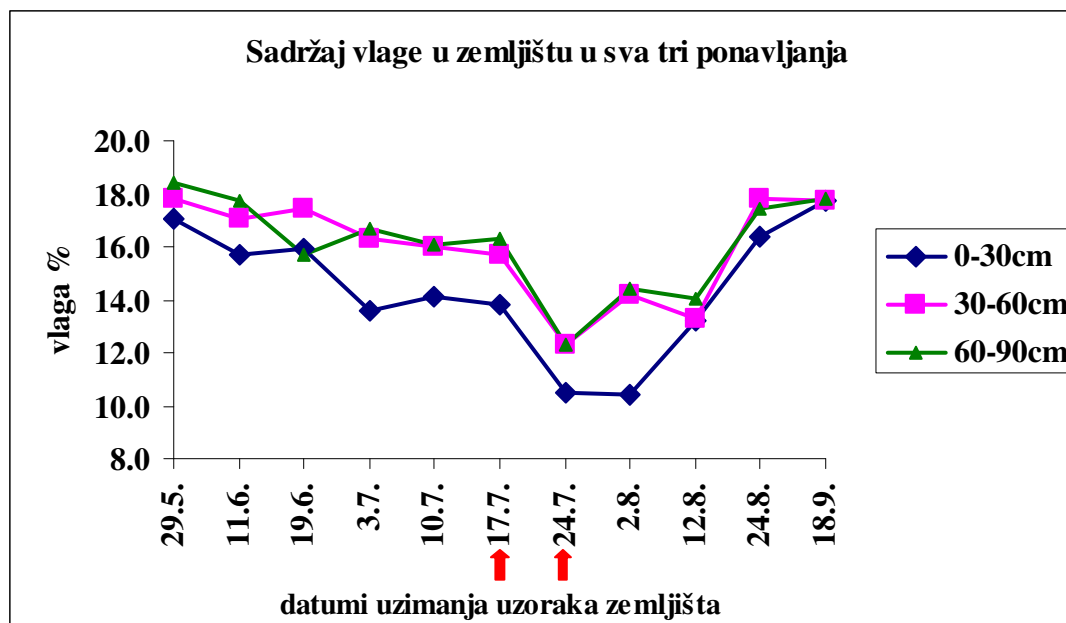
#### 4.1.2. Vлага u zemljištu u toku vegetacione sezone

Prosek sadržaja vlage u zemljištu na tri različite dubine sa kojih su uzimani uzorci prikazan je na slici 2. Na osnovu slike se može zaključiti da se sadržaj vlage u prvom sloju do 30 cm značajno razlikovao (vrednosti sadržaja vlage bile su manje) od sadržaja u druga dva ispitivana sloja (30 cm - 60 cm i 60 cm - 90 cm), a razlika se povećavala sa odmicanjem vegetacione sezone dostižući svoj maksimum drugog avgusta.

Uzorci listova za merenje fizioloških osobina su uzimani 17. i 24. jula (na dijagramu su strelicama obeleženi ovi datumi). Na početku i kraju vegetacione sezone

količina vlage u prvom sloju se skoro izjednačila se vrednostima u druga dva sloja. Rezultati ukazuju na izrazitu zemljišnu sušu u gornjem sloju zemljišta u vreme izvođenja ogleda.

Na slici se uočava da su najniže vrednosti vlage u sva tri sloja u odnosu na ceo period tokom koga su uzimani uzorci zabeležene 24. jula.



↑ strelicama su obeleženi datumi uzimanja uzoraka za fiziološke osobine

**Slika 2 Prosečne količine vlage u zemljištu u sva tri ponavljanja na tri različite dubine (30cm, 60cm i 90cm)**

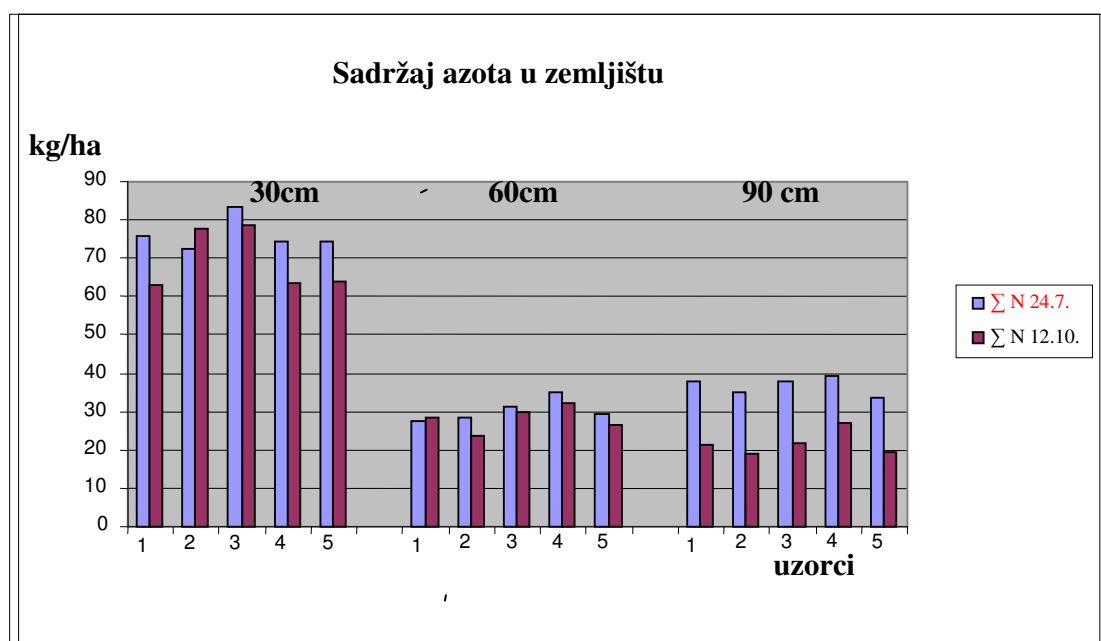
#### 4.1.3. Sadržaj azota u zemljištu u toku vegetacione sezone

Merenja su vršena dva puta u toku vegetacione sezone, u vreme cvetanja i berbe (24. jula i 12. oktobra), na tri različite dubine (0 cm - 30 cm, 30 cm - 60 cm, 60 cm - 90 cm). Uzorci su uzimani na pet mesta na oglednoj parceli - na rubnim delovima u prvom (uzorci 1 i 2) i trećem ponavljanju (uzorci 4 i 5), kao i u centralnom delu drugog ponavljanja (uzorak 3). Na slici 3 prikazani su rezultati ovih merenja.

Određivanjem količine azota u zemljištu može se utvrditi da li je ogledna parcela uniformna (da li je jednaka količina azota dostupna svim posejanim familijama u sva tri ponavljanja). Može se uočiti da je količina azota bila ujednačena na čitavoj površini ogledne parcele u oba merenja. Najveća količina azota izmerena je u sloju 0-30 cm



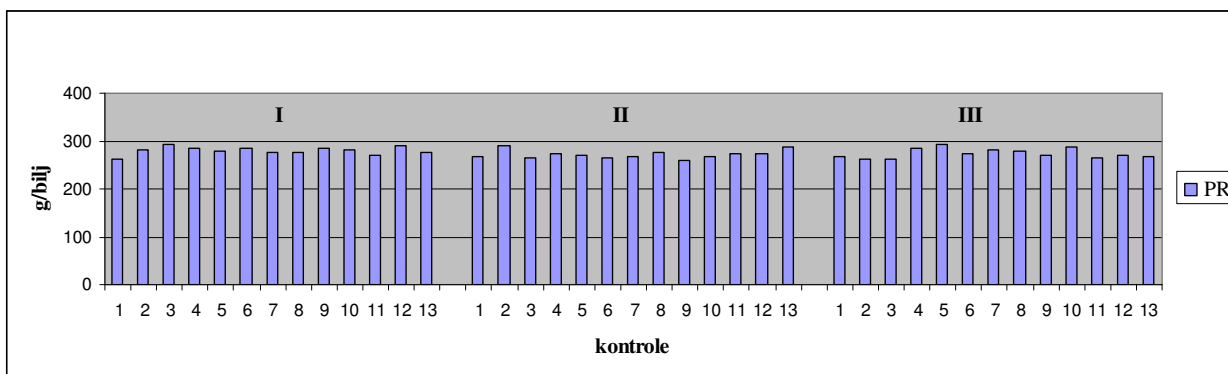
dubine u svim ponavljanjima. Manja količina azota na većim dubinama (30 cm - 60 cm, 60 cm - 90 cm) može ukazivati na to da se koren biljaka najverovatnije razvijao u dubinu, što je uslovalo veću ekstrakciju azota iz tih slojeva. Na slici 3 se takođe može uočiti da je nešto veća količina azota izmerena u vreme cvetanja u odnosu na vreme berbe, što ukazuje na to da je deo azota iskorišćen od strane biljaka do kraja vegetacione sezone.



**Slika 3 Sadržaj azota u zemljištu u sva tri ponavljanja na tri različite dubine (30cm, 60cm i 90cm)**

#### 4.1.4. Kontrole

Pored  $F_3$  familija, posejana je i kontrola (hibrid ZP 434) na svakih deset redova familija, u sva tri ponavljanja. Ukupno je bilo 13 redova kontrola. Na slici 4 su prikazane vrednosti kontrola za prinos, za sva tri ponavljanja. Ujednačene vrednosti ovih kontrola ukazuju na uniformne uslove u polju u kome je izveden ogled, pa nije bilo potrebe za ekstrapolacijom prinosa familija.



**Slika 4 – Vrednosti prinosa kontrola (ZP434) po ponavljanjima (I, II i III)**

#### 4.2. Analiza fenotipskih podataka

Za prinos i neke ispitivane osobine utvrđeno je odstupanje od normalne raspodele (Prilog 1). S obzirom da je normalna raspodela preduslov za pouzdanu QTL analizu primenom WinQTL kartografera, u dalju analizu nisu uključene dve  $F_3$  familije koje su narušavale normalnu raspodelu (na primer, njihove vrednosti prinosa su bile dvostruko veće od maksimalnih vrednosti izmerenih za ostale familije). Primeri promena normalne raspodele i rezultata QTL analiza nekoliko osobina su prikazani u Prilogu 1.

##### 4.2.1. Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti ispitivanih osobina

Za sve ispitivane osobine testirana je distribucija učestalosti  $F_3$  familija. Izmerene vrednosti svih analiziranih svojstava pokazale su normalnu distribuciju (Prilog 2).

U tabeli 2 prikazane su srednje vrednosti i parametri varijabilnosti analiziranih fenotipskih svojstava. Najveći koeficijent varijacije od 0.37 dobijen je za prinos, a najmanji za relativni sadržaj vode - RSV1 (0.06) i RSV2 (0.05). Iz podataka o

koeficijentu varijacije prikazanih u tabeli može se zaključiti da je većina ispitivanih svojstava (20 od ukupno analiziranih 26) imala malu varijabilnost - koeficijent varijacije bio je manji od 0.15. Veći stepen varijabilnosti (preko 0.20) pokazali su broj zrna u redu - BZ, ASI i DS1.

**Tabela 2 Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti ispitivanih osobina**

<b>Osobina</b>	<b>Srednja vrednost</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Standardna devijacija</b>	<b>Koeficijent varijacije</b>	<b>Varijansa</b>
<b>PR (g/bilj)</b>	73.15	13.83	135.72	27.35	0.37	748.261
<b>BR</b>	14.10	8.00	20.20	2.14	0.15	4.589
<b>BZ</b>	17.50	4.00	31.00	5.04	0.29	25.391
<b>MZ (g)</b>	315.0	235.00	395.00	30.83	0.10	950.507
<b>DK (cm)</b>	13.69	8.63	18.75	1.95	0.14	3.784
<b>PK (cm)</b>	4.03	3.10	4.95	0.40	0.10	0.156
<b>DUZ (cm)</b>	1.03	0.80	1.26	0.08	0.07	0.006
<b>ŠZ (cm)</b>	0.76	0.65	0.86	0.04	0.05	0.002
<b>DEZ (cm)</b>	0.52	0.40	0.63	0.05	0.10	0.003
<b>VB (cm)</b>	174.52	136.90	212.14	15.50	0.09	240.093
<b>VK (cm)</b>	63.19	39.38	87.00	11.32	0.18	128.168
<b>DM (cm)</b>	38.94	27.00	50.88	4.51	0.12	20.374
<b>BGM</b>	14.05	8.30	19.80	2.78	0.20	7.747
<b>BL</b>	19.02	15.40	22.63	1.55	0.08	2.407
<b>ŠL3 (cm)</b>	7.82	6.13	9.52	0.72	0.09	0.512
<b>ŠL4 (cm)</b>	8.15	6.50	9.80	0.66	0.08	0.429
<b>ASI (dani)</b>	6.17	2.00	10.33	1.82	0.29	3.299
<b>DS1</b>	3.00	1.00	5.00	0.74	0.25	0.545
<b>DS2</b>	2.89	1.72	4.06	0.42	0.14	0.176
<b>DS3</b>	2.94	2.00	3.87	0.37	0.13	0.138
<b>RSV1 (%)</b>	83.42	72.15	94.69	5.39	0.06	29.000
<b>RSV2 (%)</b>	86.22	74.56	97.87	4.67	0.05	21.835
<b>OP1</b>	1.42	1.05	1.79	0.15	0.10	0.021
<b>OP2</b>	1.60	1.25	1.95	0.13	0.08	0.018
<b>SŠ1 (%)</b>	11.90	8.80	15.00	1.13	0.10	1.265
<b>SŠ2 (%)</b>	13.40	10.20	16.60	1.33	0.10	1.761

1. PR-prinos; 2. BR- broj redova; 3. BZ - broj zrna; 4. MZ - masa zrna; 5. DK - dužina klipa; 6. PK - prečnik klipa; 7. DUZ - dužina zrna; 8. ŠZ - širina zrna; 9. DEZ - debljina zrna; 10. VB - visina biljke; 11. VK - visina do klipa; 12. DM - dužina metlice; 13. BGM - broj grana metlice; 14. BL - broj listova; 15. ŠL3 - širina trećeg lista; 16. ŠL4 - širina četvrtog lista; 17. ASI - period između metličenja i svilanja; 18., 19. i 20. DS1, DS2 i DS3 - ocena odgovora na sušu; 21. i 22. RSV1, RSV2 - relativni sadržaj vode; 23. i 24. OP1, OP2 - osmotski potencijal; 25. i 26. SŠ1, SŠ2 - sadržaj šećera.

### **4.3. Fenotipske korelacije**

Fenotipske korelacije između svih ispitivanih osobina prikazane su u tabeli 3.

#### **4.3.1. Fenotipske korelacije između prinosa i komponenti prinosa**

Značajna fenotipska korelacija identifikovana je između prinosa (PR) i šest od ukupno osam ispitivanih komponenti prinosa.

Visoka pozitivna korelacija ( $P < 0.001$ ) ustanovljena je između prinosa i pet ispitivanih komponenti prinosa - broj redova - BR, broj zrna - BZ, dužina klipa - DK, prečnik klipa - PK, i dužina zrna - DUZ.

Visoka negativna korelacija ( $P < 0.001$ ) utvrđena je između prinosa - PR i debljine zrna - DEZ.

Masa zrna - MZ i širina zrna - ŠZ nisu pokazale značajne korelacije sa prinosom - PR.

#### **4.3.2. Fenotipske korelacije između komponenti prinosa**

Visoke značajne pozitivne fenotipske korelacije ustanovljene su između komponenti prinosa koje su pokazale značajne pozitivne korelacije sa prinosom ( $P < 0.001$ ). Masa zrna - MZ pokazala je značajnu fenotipsku korelaciju samo sa širinom zrna - ŠZ ( $P < 0.001$ ).

Debljina zrna - DEZ pokazala je visoko značajnu negativnu korelaciju ( $P < 0.001$ ) sa brojem redova BR, brojem zrna - BZ, prečnikom klipa - PK, dužinom zrna - DUZ, kao i sa dužinom klipa - DK ( $P < 0.05$ ).

#### **4.3.3. Fenotipske korelacije između morfoloških osobina**

Neke od ispitivanih morfoloških osobina su ispoljile značajne korelacije sa prinosom i komponentama prinosa.

Visina biljke - VB ispoljila je značajnu pozitivnu korelaciju sa prinosom ( $P < 0.05$ ) i nekim komponentama prinosa (brojem redova - BR ( $P < 0.01$ ), kao i brojem zrna - BZ, dužinom klipa - DK, prečnikom klipa - PK, dužinom zrna - DUZ ( $P < 0.05$ )).

Broj grana metlice - BGM ispoljio je negativnu korelaciju sa prinosom - PR i dužinom zrna - DUZ ( $P < 0.05$ ), kao i širinom zrna - ŠZ ( $P < 0.001$ ).

Broj listova - BL bio je pozitivno korelisan sa prinosom - PR, brojem redova - BR, brojem zrna - BZ, prečnikom klipa - PK i dužinom zrna - DUZ ( $P < 0.001$ ). Pozitivna korelacija je ustanovljena i sa dužinom klipa - DK ( $P < 0.05$ ),

Širina četvrtog lista - ŠL4 pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju sa prinosom - PR ( $P < 0.01$ ) i skoro svim ispitivanim komponentama prinosa (broj zrna - BZ, dužina klipa - DK, prečnik klipa - PK, dužina zrna - DUZ, širina zrna - ŠZ). Negativna korelacija utvrđena je samo sa debljinom zrna - DEZ ( $P < 0.05$ ).

Širina trećeg lista - ŠL3 bila je pozitivno korelisana samo sa dužinom klipa - DK ( $P < 0.05$ ) i širinom zrna - ŠZ ( $P < 0.001$ ).

#### **4.3.4. Fenotipske korelacije između ASI i DS**

Značajna pozitivna korelacija detektovana je između ASI i debljine zrna - DEZ ( $P < 0.05$ ).

ASI je bio visoko negativno korelisan ( $P < 0.001$ ) sa prinosom - PR, brojem redova - BR, brojem zrna - BZ i dužinom zrna - DUZ, kao i sa prečnikom klipa - PK ( $P < 0.01$ ).

DS2 i DS3 ispoljili su pozitivnu korelaciju sa prinosom - PR ( $P < 0.01$ ) i nekim komponentama prinosa (broj zrna - BZ, masa zrna - MZ, dužina klipa - DK i prečnik klipa - PK). Između DS2 i širine zrna - ŠZ takođe je utvrđena pozitivna korelacija ( $P < 0.05$ ).

#### **4.3.5. Fenotipske korelacije između fizioloških osobina**

Nije ustanovljena nijedna značajna korelacija između prinosa - PR i ispitivanih fizioloških osobina. Samo u dva slučaja ispoljene su značajne korelacije između komponenti prinosa i fizioloških osobina. Relativni sadržaj vode - RSV2 je bio pozitivno korelisan sa dužinom zrna - DUZ ( $P < 0.05$ ), a osmotski potencijal - OP1 je bio negativno korelisan sa dužinom klipa - DK ( $P < 0.05$ ).

#### **4.3.6. Fenotipske korelacije između morfoloških, ASI, DS i fizioloških osobina**

Visina biljke - VB je bila značajno pozitivno korelisana sa tri morfološke osobine (visina do klipa - VK i dužina metlice - DM ( $P < 0.001$ ), kao i broj listova - BL ( $P < 0.05$ )).

Visina do klipa - VK je bila pozitivno korelisana sa dužinom metlice - DM ( $P < 0.01$ ) i brojem grana metlice - BGM ( $P < 0.05$ ), a negativno sa širinom trećeg lista - ŠL3 ( $P < 0.05$ ). Značajne korelacije ustanovljene su između visine do klipa - VK i samo jedne fiziološke osobine, tj. osmotskog potencijala - OP1 ( $P < 0.01$ ).

Broj grana metlice - BGM ispoljio je značajnu negativnu korelaciju sa širinom lista - ŠL (za ŠL3  $P < 0.01$ , a za ŠL4  $P < 0.05$ ).

Negativna fenotipska korelacija uočena je između dužine metlice - DM i relativnog sadržaja vode - RSV1 ( $P < 0.05$ ), a pozitivna između dužine metlice - DM i sadržaja šećera - SŠ1 ( $P < 0.05$ ).

Broj listova - BL je ispoljio pozitivnu korelaciju sa širinom četvrtog lista - ŠL4 i DS3 ( $P < 0.05$ ).

Širina trećeg lista - ŠL3 je bila negativno korelisana sa osmotskim potencijalom - OP1 ( $P < 0.01$ ), dok je širina četvrtog lista - ŠL4 bila pozitivno korelisana sa DS2 i sadržajem šećera - SŠ2 ( $P < 0.05$ ).

Značajna negativna korelacija utvrđena je između ASI i DS2 ( $P < 0.01$ ) i DS3 ( $P < 0.05$ ).

Značajne korelacije detektovane su i između nekoliko fizioloških svojstava. Ustanovljena je značajna negativna korelacija relativnog sadržaja vode - RSV1 sa osmotskim potencijalom (OP1 ( $P < 0.001$ ), OP2 ( $P < 0.01$ )) i sadržajem šećera - SŠ1 ( $P < 0.01$ ), kao i značajna pozitivna korelacija između osmotskog potencijala - OP1, OP2 i sadržaja šećera - SŠ1, SŠ2. Između osmotskog potencijala - OP1 i sadržaja šećera - SŠ1 i SŠ2 verovatnoća je iznosila  $P < 0.001$  i  $P < 0.01$  respektivno, a između osmotskog potencijala - OP2 i sadržaja šećera - SŠ1 i SŠ2 iznosila je  $P < 0.001$ .

**Tabela 3 Koeficijenti fenotipskih korelacija ispitivanih osobina**

	PR	BR	BZ	MZ	DK	PK	DUZ	ŠZ	DEZ	VB	VK	DM	BGM	BL	ŠL3	ŠL4	ASI	DS1	DS2	DS3	RSV1	RSV2	OP1	OP2	SŠ1	SŠ2
PR	1																									
BR	0.736	1																								
BZ	0.895	0.702	1																							
MZ	0.124	-0.035	0.075	1																						
DK	0.532	0.281	0.580	0.164	1																					
PK	0.757	0.711	0.719	0.164	0.442	1																				
DUZ	0.701	0.581	0.543	0.003	0.237	0.532	1																			
ŠZ	0.157	-0.148	0.034	0.436	0.141	0.125	0.225	1																		
DEZ	-0.612	-0.508	-0.725	0.094	-0.264	-0.518	-0.502	-0.050	1																	
VB	0.259	0.385	0.269	-0.124	0.268	0.245	0.253	-0.089	-0.102	1																
VK	0.071	0.182	-0.042	-0.092	0.070	-0.012	0.131	-0.130	0.140	0.645	1															
DM	0.232	0.188	0.267	0.085	0.286	0.108	0.160	-0.014	-0.155	0.438	0.348	1														
BGM	-0.248	0.005	-0.127	-0.134	0.010	-0.203	-0.292	-0.547	0.192	0.229	0.266	0.048	1													
BL	0.475	0.446	0.467	0.037	0.248	0.427	0.335	0.097	-0.225	0.298	0.033	0.211	-0.098	1												
ŠL3	0.198	-0.032	0.207	0.138	0.240	0.165	0.103	0.434	-0.200	-0.225	-0.235	-0.006	-0.320	0.110	1											
ŠL4	0.376	0.198	0.371	0.166	0.375	0.321	0.260	0.416	-0.258	-0.021	-0.074	0.105	-0.266	0.236	0.836	1										
ASI	-0.508	-0.470	-0.429	-0.151	-0.130	-0.349	-0.431	-0.084	0.292	-0.177	-0.095	-0.049	0.169	-0.225	0.000	-0.109	1									
DS1	0.135	0.074	0.074	-0.017	0.182	0.059	0.146	0.098	0.101	0.111	0.149	0.098	0.070	-0.042	0.082	0.168	-0.188	1								
DS2	0.349	0.166	0.300	0.337	0.402	0.337	0.215	0.335	-0.070	-0.032	-0.089	0.027	-0.112	0.211	0.221	0.241	-0.348	0.465	1							
DS3	0.332	0.185	0.312	0.286	0.419	0.364	0.216	0.190	-0.017	0.028	-0.051	0.046	-0.001	0.253	0.179	0.228	-0.299	0.496	0.898	1						
RSV1	-0.029	0.030	-0.067	0.087	-0.047	0.026	0.041	0.171	-0.029	-0.031	-0.168	-0.281	-0.209	-0.012	0.140	0.083	0.036	-0.063	0.024	-0.091	1					
RSV2	0.089	0.149	0.085	-0.036	0.063	0.111	0.235	0.079	-0.146	-0.021	-0.067	-0.147	0.123	-0.082	-0.023	0.032	-0.099	0.172	0.174	0.132	0.338	1				
OP1	0.004	0.127	-0.044	-0.037	-0.235	-0.012	-0.003	-0.088	0.100	0.129	0.336	0.115	0.005	0.139	-0.319	-0.177	-0.033	0.081	-0.094	-0.085	-0.398	-0.211	1			
OP2	-0.149	-0.073	-0.111	-0.170	-0.108	-0.181	-0.014	-0.116	0.105	0.218	0.213	0.189	0.102	0.147	0.005	0.069	0.124	-0.093	-0.280	-0.228	-0.332	-0.183	0.388	1		
SŠ1	0.170	0.165	0.160	-0.067	0.057	0.019	0.151	-0.234	-0.027	0.095	0.208	0.237	0.068	0.164	-0.093	0.096	-0.091	0.027	-0.039	0.054	-0.354	-0.186	0.540	0.508	1	
SŠ2	-0.003	0.099	0.041	-0.120	-0.059	-0.044	0.112	-0.113	-0.058	0.191	0.120	0.221	0.092	0.223	0.111	0.281	0.054	-0.103	-0.255	-0.208	-0.204	-0.176	0.341	0.853	0.563	1

**P<0.05; P<0.01; P<0.001**

1. PR-prinos; 2. BR- broj redova; 3. BZ - broj zrna u redu; 4. MZ - masa 1000 zrna; 5. DK - dužina klipa; 6. PK - prečnik klipa; 7. DUZ - dužina zrna; 8. ŠZ - širina zrna; 9. DEZ - debljina zrna; 10. VB - visina biljke; 11. VK - visina do klipa; 12. DM - dužina metlice; 13. BGM - broj grana metlice; 14. BL - broj listova; 15. ŠL3 - širina trećeg lista; 16. ŠL4 - širina četvrtog lista; 17. ASI - period između metličenja i svilanja; 18., 19. i 20. DS1, DS2 i DS3 - ocena odgovora na sušu; 21. i 22. RSV1, RSV2 - relativni sadržaj vode; 23. i 24. OP1, OP2 - osmotski potencijal; 25. i 26. SŠ1, SŠ2 - sadržaj šećera.



#### 4.4. Molekularna mapa

Molekularna mapa dobijena je u *JIC, Norwich, UK*, korišćenjem  $F_2$  populacije ukrštanja DTP79xB73. Sadrži 200 markera (RFLP, SSR i sušom indukovane AFLP probe), a procenjena pokrivenost genoma je 1640 cM sa prosečnom udaljenošću između markera od 7 cM.

Identifikovano je 160 polimorfnih RFLP proba, sa bar jednim od pet restrikcionih enzima.

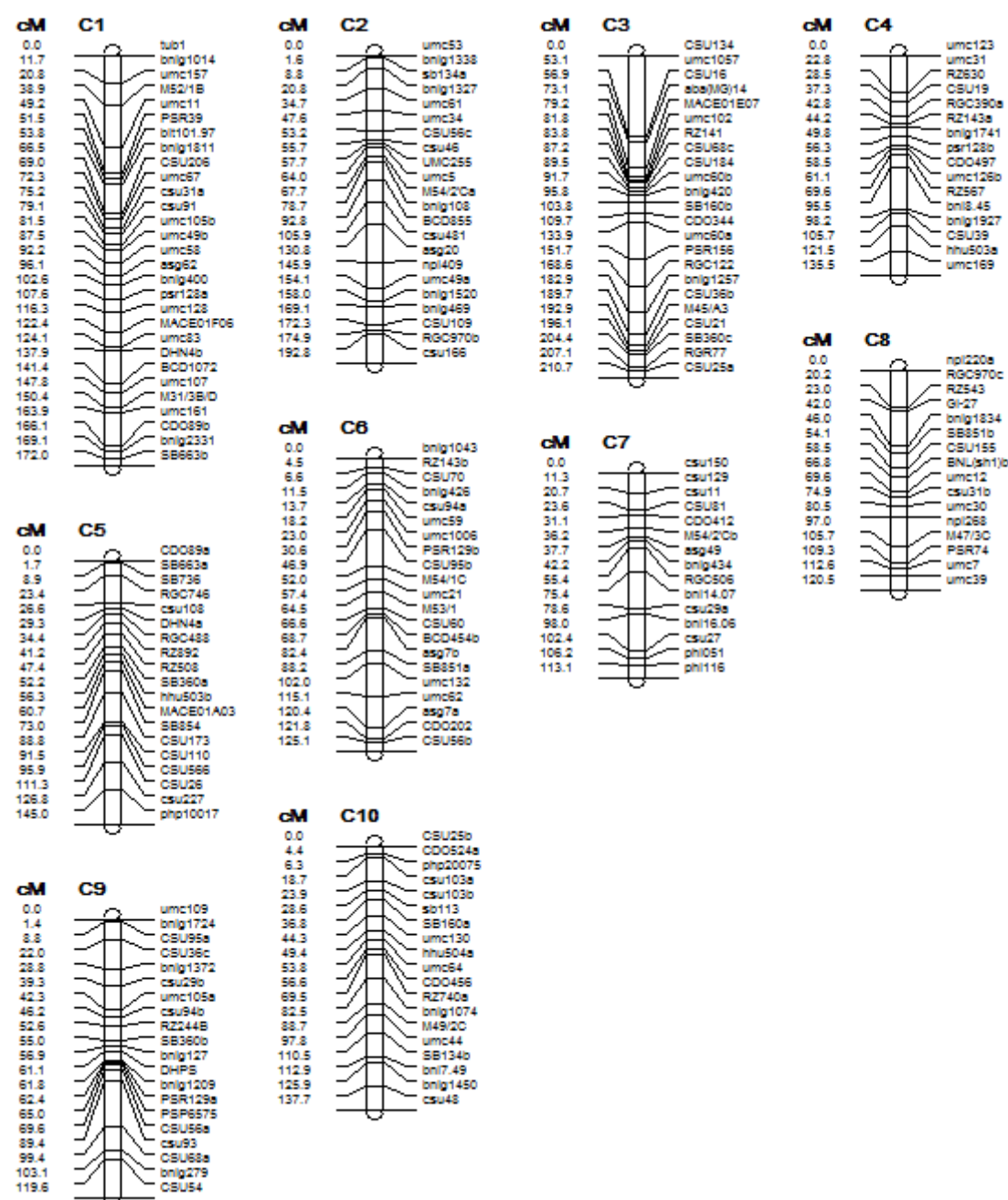
Trideset jedan par SSR prajmera za testiranje roditeljskog para ukrštanja DTP79xB73 dao je dobar amplifikacioni profil, pokazao polimorfizam između roditeljskih linija i izabran je za dalja istraživanja.

Pored neutralnih RFLP i SSR markera za dobijanje molekularne mape korišćeno je i devet sušom indukovanih cDNK proba (Tabela 4), koje su dobijene iz roditeljskog para primenom AFLP metode.

Na slici 5 prikazana je molekularna mapa dobijena pomoću RFLP, SSR i AFLP markera.

**Tabela 4 Sušom indukovane cDNK AFLP probe**

Proba	Hromozom	Bin
M52/1B	1	1.01-1.02
M31/3B/D	1	1.09
M54/2'Ca	2	2.07
M45/A3	3	3.09
M54/1C	6	6.01-6.05
M53/1	6	6.01-6.05
M54/2'Cb	7	7.02
M47/3C	8	8.07
M49/2C	10	10.04



Slika 5 Molekularna mapa ukrštanja DTP79 x B73

## 4.5. QTL analiza

### 4.5.1. Identifikacija QTL-ova za tolerantnost na sušu

U cilju utvrđivanja eventualnih razlika posle odbacivanja vrednosti za dve familije, pored prinosa, testirana je distribucija frekvencija vrednosti za još nekoliko osobina (broj redova – BR, dužina klipa - DK i DS2). Za navedene osobine urađene su ANOVA i CIM analiza. Rezultati dobijeni pre i posle odbacivanja spornih familija za sve naveden analize prikazani su u Prilogu 1.

Uporedna QTL analiza izvedena je primenom jednofaktorijalne ANOVA metode kao i primenom metoda programa WinQTL kartografer (SMA, IM i CIM metoda), verzija 2.5. Kao prag značajnosti za nalaženje QTL-a korišćen je  $LOD > 2.0$  za IM i CIM metodu. Od ukupno četiri metode koje su korišćene za detekciju QTL-ova prikazani su rezultati za ANOVA (Prilog 3) i CIM metodu za sve ispitivane osobine, dok su za metode pojedinačnog markera i IM metodu prikazani rezultati za po dve osobine (prinos - PR i visinu biljke - VB) u Prilogu 4.

Ukupan broj detektovanih signifikantnih QTL-ova za 26 ispitivanih svojstva kukuruza primenom CIM metode, njihove pozicije na hromozomima, maksimalne LOD vrednosti, aditivni i dominantni efekti, procenat fenotipske varijabilnosti  $R^2$  (pojedinačnih i svih detektovanih QTL-ova za posmatrano svojstvo), roditeljska linija koja doprinosi povećanju vrednosti svojstva, odnos dominantnog i aditivnog efekta  $ld/lal$ , kao i prosečni dominantni efekat, prikazani su u Tabeli 5.

Primenom CIM metode za ispitivanih 26 osobina detektovano je ukupno 147 QTL-ova na svih 10 hromozoma. Najveći broj lokusa mapiran je na hromozomu 2 (ukupno po 25). Na ovom hromozomu detektovani su QTL-ovi za 16 ispitivanih osobina. Najmanji broj QTL-ova identifikovan je na hromozomu 9, samo pet. Najveći broj QTL-ova mapiran je za DS2 (ukupno 10), a najmanji za broj listova - BL i dužinu metlice - DM (detektovana su samo po dva QTL-a za svaku od navedenih osobina).

Najveća maksimalna LOD vrednost od 7.93 nađena je za DS3 QTL na hromozomu 10. Devet QTL-ova pokazalo je najmanju maksimalnu vrednost LOD-a od 2.01 za visinu biljke - VB na hromozomima 3 i 8, za visinu do klipa - VK na hromozomu 2, za broj grana metlice - BGM na hromozomu 3, za širinu trećeg lista -

ŠL3 na hromozomu 4, za ASI na hromozomu 3, za DS2 na hromozomu 2, za DS3 na hromozomu 6) i za sadržaj šećera - SŠ2 na hromozomu 10.

Najveći doprinos fenotipskoj varijabilnosti koju je opisivao pojedinačni QTL iznosio je 56.23% za broj listova - BL, a najmanji svega 0.1% za četiri osobine - za dužinu klipa - DK (dva QTL-a), debljinu zrna - DEZ, DS3 i osmotski potencijal - OP2. Ukupna objašnjena fenotipska varijabilnost bila je najveća za širinu trećeg lista - ŠL3 (91.16%), a najmanja za relativni sadržaj vode - RSV2 (11.85%).

Za većinu osobina donori alela za povećanje vrednosti svojstva bili su poreklom od obe roditeljske linije.

Jedino su za sve identifikovane QTL-ove broja listova - BL i DS1 isključivo aleli poreklom od DTP79, odnosno od B73, povećavali vrednost datog svojstva.

Skoro svi QTL-ovi detektovani za sva ispitivana svojstva (82.3%) ispoljili su dominantan efekat (pod pojmom dominantan podrazumevaju se sve varijante ovog efekta). Od ukupno 147 identifikovanih QTL-ova, 37.41% je ispoljilo parcijalno dominantan, 12.24% dominantan, 32.65% superdominantan, a 17.69% aditivan genski efekat. Prosečan efekat gena za sve identifikovane QTL-ove bio je aditivan za jednu, parcijalan dominantan za 19, dominantan za dve i super dominantan za četiri osobine.

U Tabeli 6 predstavljeni su QTL-ovi svojstava koji su detektovani i CIM i ANOVA metodom (naveden je marker interval QTL-ova identifikovanih CIM-om kao i nivo značajnosti QTL-ova potvrđenih ANOVA-om). Za sve ispitivane osobine primenom obe metode detektovani su zajednički QTL-ovi.

Od ukupno 147 QTL-a mapiranih primenom CIM metode, 93 je takođe identifikovano primenom ANOVA-e. Za tri osobine (za širinu zrna - ŠZ, dužinu metlice - DM i broj listova - BL) identifikovani su QTL-ovi na istim pozicijama primenom obe metode. Više od polovine QTL-ova potvrđeno je primenom obe metode za 18 osobina, a samo po jedan zajednički QTL detektovan je za dve osobine DS1 i osmotski potencijal - OP2.

**Tabela 5 Broj, pozicija i efekat QTL-ova identifikovanih primanom CIM metode**

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R <sup>2</sup> (%)	Genotip koji doprinosi	ldl/ a	Efekat gena
<b>PR</b>	<b>5</b>	1	umc161-SB663b	3.17	15.60	-8.86	13.32	B73	0.56	PD
		5	SB360a-SB854	3.56	-11.09	-6.22	7.57	DTP79	0.56	PD
		7	csu150-CSU81	3.5	11.13	5.43	8.31	B73	0.49	PD
		8	RZ543-SB851b	2.20	-12.01	2.75	8.36	DTP79	0.23	PD
		10	M49'2C-umc44	3.52	22.34	4.41	22.64	B73	0.2	A
						<b>total</b>	<b>60.2</b>	<b>total</b>	<b>0.37</b>	<b>PD</b>
<b>BR</b>	<b>7</b>	3	CSU16-MACE01E07	2.35	-0.94	1.14	7.84	DTP79	0.82	D
		3	UMC60a-rgc122	2.14	-1.32	0.77	14.66	DTP79	0.58	PD
		4	RZ567-bnl8.45	3.57	-0.98	-0.86	9.12	DTP79	0.88	D
		4	bnlg1927-hhu503a	3.12	-0.92	-0.72	7.95	DTP79	0.78	PD
		5	RZ508-SB854	3.08	-0.4	-1.07	1.48	DTP79	2.68	OD
		7	csu150-CSU81	3.24	0.41	1.05	1.56	B73	2.56	OD
		7	CSU81-M54/2'Cb	2.57	0.17	1.14	0.2	B73	6.7	OD
						<b>total</b>	<b>42.81</b>	<b>total</b>	<b>0.9</b>	<b>D</b>
<b>BZ</b>	<b>6</b>	1	DHN4b-BCD1072	3.14	2.86	-0.54	14.37	B73	0.21	PD
		1	umc107-umc161	4.53	3.28	0.07	17.38	B73	0.02	A
		2	asg20-umc49a	2.69	3.03	-1.16	13.2	B73	0.38	PD
		5	RGC488-RZ508	4.2	-3.61	0.29	19.95	DTP79	0.08	A
		6	umc21-asg7b	2.18	1.45	0.88	3.26	B73	0.6	PD
		10	bnl7.49-csu48	3.59	2.38	1.73	9.84	B73	0.73	PD
						<b>total</b>	<b>78</b>	<b>total</b>	<b>0.25</b>	<b>PD</b>

Tabela 5 *Nastavak*

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	d / a	Efekat gena
<b>MZ</b>	<b>6</b>	1	tub1-umc157	2.6	-16.3	16.43	12.05	DTP79	1.01	D
		5	SB736-DHN4a	2.23	-2.79	14.94	0.2	DTP79	5.35	OD
		5	RGC488-RZ508	2.86	-10.59	18.6	2.91	DTP79	1.76	OD
		5	MACE01A03-SB854	2.06	-11.73	15.28	2.67	DTP79	1.3	OD
		5	SB854-CSU26	2.18	-6.98	18.71	1.1	DTP79	2.68	OD
		10	CDO456-bnlgl1074	4.84	31.84	14.72	33.6	B73	0.46	PD
						<b>total</b>	<b>52.53</b>	<b>total</b>	<b>0.78</b>	<b>PD</b>
<b>DK</b>	<b>8</b>	1	umc83-BCD1072	2.31	0.87	-0.29	9.35	B73	0.33	PD
		2	BCD855-asg20	3.85	1.25	0.96	15.94	B73	0.77	PD
		3	CSU134-umc1057	2.21	-0.1	1.04	0.1	DTP79	10.4	OD
		3	CDO344-PSR156	3.63	0.72	0.52	5.37	B73	0.72	PD
		8	umc12-npi268	2.77	-1.07	0.02	10.48	DTP79	0.02	A
		9	CSU95a-bnlgl1372	2.91	-0.07	1.13	0.1	DTP79	16.14	OD
		10	RZ740a-bnlgl1074	2.05	1.73	0.32	23.89	B73	0.18	A
		10	M49/2C-umc44	3.6	1.6	0.38	23.3	B73	0.24	PD
						<b>total</b>	<b>88.53</b>	<b>total</b>	<b>0.46</b>	<b>PD</b>
<b>PK</b>	<b>3</b>	5	RZ508-hhu503b	4.82	-0.25	-0.02	18.33	DTP79	0.09	A
		5	hhu503b-SB854	4.23	-0.22	-0.08	13.94	DTP79	0.37	PD
		6	bnlg1043-csu94a	2.09	0.16	0.004	5.44	B73	0.03	A
						<b>total</b>	<b>37.71</b>	<b>total</b>	<b>0.18</b>	<b>A</b>

**Tabela 5 Nastavak**

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	ldl/lal	Efekat gena
<b>DUZ</b>	<b>6</b>	4	bnlg1927-hhu503a	3.2	-0.05	0.01	17.49	DTP79	0.2	A
		5	RZ508-SB360a	3.07	-0.04	-0.01	12.11	DTP79	0.25	PD
		5	hhu503b-SB854	4.77	-0.05	-0.01	17.63	DTP79	0.2	A
		6	CSU70-csu94a	3.14	0.03	0.02	7.01	DTP79	0.67	PD
		6	umc59-umc1006	4.75	0.04	0.01	7.77	B73	0.25	PD
		6	umc1006-PSR129b	2.87	0.05	-0.01	13.18	B73	0.2	A
						<b>total</b>	<b>75.19</b>	<b>total</b>	<b>0.26</b>	<b>PD</b>
<b>ŠZ</b>	<b>4</b>	2	bnlg108-BCD855	3.69	0.02	0.01	6.54	B73	0.5	PD
		5	RGC746-RZ892	3.68	-0.03	0.02	21.43	DTP79	0.67	PD
		6	umc132-CDO202	2.31	-0.02	0.004	9.07	DTP79	0.2	A
		8	SB851b-csu31b	2.68	-0.02	0.01	14.16	DTP79	0.5	PD
						<b>total</b>	<b>51.2</b>	<b>total</b>	<b>0.52</b>	<b>PD</b>
<b>DEZ</b>	<b>7</b>	1	BCD1072-umc161	2.38	-0.02	0.01	10.14	DTP79	0.3	PD
		2	umc61-UMC255	2.40	-0.02	-0.022	0.1	DTP79	1.1	D
		2	bnlg108-npi409	2.13	-0.02	-0.003	6.22	DTP79	0.15	A
		5	RZ508-SB854	3.89	0.02	0.012	6.53	B73	0.6	PD
		7	csu129-CDO412	2.33	-0.006	-0.021	0.7	DTP79	3.5	OD
		8	PSR74-umc39	4.51	-0.01	-0.03	1.71	DTP79	3	OD
		10	csu103a-SB160a	3.87	0.03	0.01	17.79	B73	0.33	PD
						<b>total</b>	<b>43.49</b>	<b>total</b>	<b>0.49</b>	<b>PD</b>

**Tabela 5 Nastavak**

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	ldl/lal	Efekat gena
<b>VB</b>	<b>7</b>	2	umc53-bnlg1327	2.37	-0.37	-6.77	6.88	DTP79	18.30	OD
		3	bnlg420-SB160b	2.25	-8.06	6.69	2.76	DTP79	0.83	D
		3	PSR156-CSU36b	2.01	-3.04	9.48	8.86	DTP79	3.12	OD
		5	SB854-CSU566	3.4	-9.62	9.34	15.81	DTP79	0.97	D
		5	CSU26-php10017	3.18	6.13	2.68	7.57	B73	0.44	PD
		6	bnlg1043-bnlg426	4.45	9.5	-2.01	17.08	DTP79	0.21	PD
		8	PSR74-umc39	2.01	3.62	-8.85	3.18	B73	2.44	OD
						<b>total</b>	<b>62.14</b>	<b>total</b>	<b>2.99</b>	<b>OD</b>
<b>VK</b>	<b>7</b>	2	umc53-sb134a	2.67	-1.53	-4.73	1	DTP79	3.09	OD
		2	umc61-csu46	4.57	-5.57	-3.55	10.57	DTP79	0.64	PD
		2	umc5-bnlg108	2.01	12.95	-2.63	15.85	B73	0.2	A
		2	bnlg1520-csu166	2.20	-3.56	-1.12	4.85	DTP79	0.31	PD
		3	csu134-umc1057	2.1	-4.77	6.15	6.98	DTP79	1.29	OD
		5	CDO89a-SB736	2.84	-3.24	6.87	3.89	DTP79	2.12	OD
		6	bnlg1043-csu94a	3.95	8.39	-1.11	16.05	B73	0.13	A
						<b>total</b>	<b>59.19</b>	<b>total</b>	<b>0.55</b>	<b>PD</b>
<b>DM</b>	<b>2</b>	2	M54/2'Ca-BCD855	3.27	-3.08	-0.36	19.96	DTP79	0.12	A
		3	PSR156-bnlg1257	3.71	0.38	2.65	0.32	B73	6.97	OD
						<b>total</b>	<b>20.28</b>	<b>total</b>	<b>0.23</b>	<b>PD</b>



Tabela 5 Nastavak

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R <sup>2</sup> (%)	Genotip koji doprinosi	d / a	Efekat gena
BGM	9	1	tub1-bnlg1014	3.23	1.69	-0.55	16.24	B73	0.33	PD
		1	blt101.97-umc67	2.63	-1.01	-0.04	5.16	DTP79	0.04	A
		2	umc53-bnlg1327	7.2	-0.92	-1.55	5.46	DTP79	1.68	OD
		3	csu16-MACE01E07	2.26	1.07	0.11	5.29	B73	0.1	A
		3	umc60a-RGC122	3.86	1.78	-0.31	16.7	B73	0.17	A
		3	bnlg1257-SB360c	2.01	-0.93	1.25	4.84	DTP79	1.34	OD
		5	SB663a-RGC746	3.54	1.44	-0.28	11.29	B73	0.19	A
		6	bnlg1043-RZ143b	2.3	0.88	0.16	4.02	B73	0.18	A
		8	csu31b-umc30	3.94	2.11	-1.31	20.05	B73	0.62	PD
						total	89.05	total	0.32	PD
BL	2	3	MACE01E07-umc60b	2.98	-2.47	1.05	20.95	DTP79	0.43	PD
		10	csu103b-SB160a	4.85	-1.92	0.77	56.23	DTP79	0.40	PD
				total	77.18	total	0.41	PD		
ŠL3	8	1	BCD1072-umc161	2.44	0.38	-0.34	11.72	B73	0.89	D
		2	umc53-bnlg1327	2.79	0.40	-0.13	15.08	B73	0.33	PD
		4	umc123-umc31	2.01	0.36	-0.24	12.94	B73	0.67	PD
		4	psr128b-bnl8.45	2.1	0.32	-0.1	9.17	B73	0.31	PD
		5	SB663a-RGC746	2.75	-0.39	-0.08	11.95	DTP79	0.21	PD
		6	umc132-CDO202	2.57	-0.36	0.27	12.24	DTP79	0.75	PD
		7	csu129-CDO412	2.58	0.4	-0.3	13.99	B73	0.75	PD
		7	bnlg434-bnl14.07	2.48	0.37	-0.38	4.07	B73	1.03	D
						total	91.16	total	0.58	PD

Tabela 5 Nastavak

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	d / a	Efekat gena
ŠL4	5	2	umc53-bnlg1327	2.4	0.32	-0.101	11.22	B73	0.32	PD
		2	bnlg108-csu481	2.49	-0.14	0.39	1.73	DTP79	2.79	OD
		3	CSU184-SB160b	2.37	0.34	-0.06	10.08	B73	0.18	A
		5	SB736-csu108	6.1	-0.63	0.17	36.03	DTP79	0.27	PD
		6	bnlg1043-CSU70	2.19	-0.29	0.39	6.62	DTP79	1.34	OD
						<b>total</b>	<b>65.68</b>	<b>total</b>	<b>0.44</b>	<b>PD</b>
ASI	7	2	umc34-UMC255	3.36	-0.37	-0.52	1.35	DTP79	1.41	OD
		2	BCD855-asg20	3.07	0.51	-1.13	2.97	B73	2.22	OD
		3	CSU134-umc1057	2.01	-0.16	-1.6	0.3	DTP79	10	OD
		4	CSU39-hhu503a	2.63	0.99	0.13	11.27	B73	0.13	A
		5	SB854-CSU173	2.14	0.72	0.53	6.33	B73	0.74	D
		6	PSR129b-M54/1C	2.22	-0.41	-0.54	1.75	DTP79	1.32	OD
		7	csu150-cau129	4.52	-1.21	0.34	22.6	DTP79	0.28	PD
						<b>total</b>	<b>46.57</b>	<b>total</b>	<b>0.56</b>	<b>PD</b>
DS1	3	4	umc123- umc31	2.82	0.38	-0.34	12.47	B73	0.89	D
		5	CSU110-CSU26	3.87	0.34	0.29	10.06	B73	0.85	D
		8	umc12-umc30	2.35	0.44	-0.25	12.16	B73	0.57	PD
						<b>total</b>	<b>34.69</b>	<b>total</b>	<b>0.77</b>	<b>PD</b>

**Tabela 5 Nastavak**

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	ldl/ a	Efekat gena
DS2	10	1	bnlg1811-csu31a	4.83	0.27	-0.11	16.37	B73	0.41	PD
		2	M54/2'Ca-csu481	2.01	-0.05	0.23	0.6	DTP79	4.6	OD
		2	CSU109-csu166	2.36	0.15	-0.26	4.66	B73	1.73	D
		3	CSU134-CSU16	3.03	0.21	-0.17	10.45	B73	0.81	D
		4	RZ143a-bnlg1741	3.85	0.15	0.08	5.95	B73	0.53	PD
		4	bnlg1741-psr128b	3.12	0.12	0.12	3.37	B73	1	D
		4	RZ567-CSU39	2.15	-0.24	0.12	11.23	DTP79	0.5	PD
		5	SB736-DHN4a	2.23	0.14	0.05	4.12	B73	0.36	PD
		9	CSU95a-bnlg1372	2.19	-0.09	0.21	1.65	DTP79	2.33	OD
		10	RZ740a-umc44	6.67	0.31	0.06	25.01	B73	0.19	A
						total	83.41	total	0.58	PD
DS3	7	1	CSU206-csu91	4.5	0.21	-0.08	12.61	B73	0.38	PD
		2	sb134a-umc61	2.45	0.13	-0.16	6.18	B73	1.23	OD
		4	RZ630-psr128b	3.65	0.14	0.03	6.53	B73	0.21	PD
		6	umc1006-CSU95b	2.01	-0.15	0.19	5.90	DTP79	1.27	OD
		8	umc12-umc30	7.58	-0.22	-0.02	18.46	DTP79	0.09	A
		9	CSU95a-csu94b	3.01	-0.01	0.19	0.1	DTP79	19	OD
		10	bnlg1074-umc44	7.93	0.27	0.11	24.5	B73	0.41	PD
								total	74.28	total

Tabela 5 Nastavak

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	d / a	Efekat gena
RSV1	5	1	bnlg1014-M52/1B	3.48	-0.38	3.39	0.24	DTP79	8.92	OD
		2	umc53-bnlg1327	3.83	3.27	-0.41	19.43	B73	0.13	A
		5	hhu503b-CSU173	2.78	-0.32	3.88	0.12	DTP79	12.13	OD
		5	CSU26-php10017	2.37	-2.46	2.19	11.74	DTP79	0.89	D
		9	csu94b-bnlg127	2.57	-3.15	2.59	14.02	DTP79	0.82	D
						<b>total</b>	<b>45.55</b>	<b>total</b>	<b>0.62</b>	<b>PD</b>
RSV2	4	1	bnlg1014-M52/1B	2.71	1.04	1.74	2.27	B73	1.67	OD
		7	csu29a-phi051	2.24	-1.63	3.46	5.23	DTP79	2.12	OD
		8	npi220a-RGC970c	5.54	0.97	3.61	1.79	B73	3.72	OD
		8	RZ543-GI-27	4.45	1.15	3.09	2.56	B73	2.67	OD
						<b>total</b>	<b>11.85</b>	<b>total</b>	<b>2.39</b>	<b>OD</b>
OP1	6	2	npi409-bnlg1520	2.16	-0.02	0.08	0.56	DTP79	4	OD
		2	RGC970b-csu166	2.14	-0.038	0.108	2.77	DTP79	2.84	OD
		3	MACE01E07-CSU68c	2.21	-0.084	0.07	13.78	DTP79	0.83	D
		3	umc60b-SB160b	2.35	-0.12	0.083	7.11	DTP79	0.69	PD
		7	bnl16.06-ph116	2.80	-0.04	0.1	3.74	DTP79	2.5	OD
		9	CSU95a-umc105a	2.03	0.05	0.03	4.65	B73	0.6	PD
						<b>total</b>	<b>32.61</b>	<b>total</b>	<b>1.18</b>	<b>OD</b>

Tabela 5 Nastavak

Osobina	Broj QTL-ova	Hromozom	Interval (markeri)	LOD	a	d	R2 (%)	Genotip koji doprinosi	d / a	Efekat gena
<b>OP2</b>	<b>5</b>	1	M31/3B/D-SB663b	2.04	-0.033	-0.041	2.32	DTP79	1.24	OD
		3	CSU134-aba(MG)14	2.31	0.01	0.06	0.1	B73	6	OD
		3	aba(MG)14-CSU184	2.15	-0.07	0.01	9.77	DTP79	0.14	A
		10	umc64-RZ740a	2.69	0.01	-0.09	0.3	B73	9	OD
		10	umc44-bnlg1450	2.24	-0.02	-0.07	0.5	DTP79	3.5	OD
						<b>total</b>	<b>12.99</b>	<b>total</b>	<b>0.72</b>	<b>PD</b>
<b>SŠ1</b>	<b>5</b>	1	umc161-SB663b	2.54	0.49	-0.71	6.76	B73	1.45	OD
		2	umc53-umc61	2.52	-0.71	0.42	18.87	DTP79	0.59	PD
		2	bnlg1520-RGC970b	2.97	-0.29	0.76	3.11	DTP79	2.62	OD
		3	CSU134- aba(MG)14	2.56	0.42	0.27	4.57	B73	0.64	PD
		7	bnlg434-bnl14.07	2.86	0.67	-0.56	16.28	B73	0.84	D
						<b>total</b>	<b>49.59</b>	<b>total</b>	<b>0.92</b>	<b>D</b>
<b>SŠ2</b>	<b>3</b>	1	umc161-SB663b	4.33	0.72	-1.05	11.49	B73	1.46	OD
		3	CSU134-CSU16	2.01	0.22	0.46	11.52	B73	2.09	OD
		10	csu103a-sb113	4.14	-1.02	-0.77	15.05	DTP79	0.75	PD
						<b>total</b>	<b>38.06</b>	<b>total</b>	<b>1.37</b>	<b>OD</b>

**Tabela 6 Identifikovani QTL-ovi za ispitivane osobine CIM i ANOVA metodama**

<b>Osobina</b>	<b>Hromozom (CIM )</b>	<b>Marker interval (CIM)</b>	<b>Nivo značajnosti QTL-a (ANOVA)</b>
<b>PR</b>	1	umc161-SB663b	P<0.05
	7	csu150-CSU81	P<0.01
	8	RZ543-SB851b	P<0.1
<b>BR</b>	3	umc60a-rgc122	P<0.05
	4	RZ567-bnl8.45	P<0.05
	4	bnlg1927-hhu503a	P<0.05
	5	RZ508-SB854	P<0.1
	7	csu150-CSU81	P<0.05
	7	CSU81-M54/2'Cb	P<0.1
<b>BZ</b>	5	RGC488-RZ508	P<0.05
	10	bnl7.49-csu48	P<0.1
<b>MZ</b>	1	tub1-umc157	P<0.01
	5	SB736-DHN4a	P<0.05
	5	MACE01A03-SB854	P<0.1
	5	SB854-CSU26	P<0.1
	10	CDO456-bnlg1074	P<0.05
<b>DK</b>	1	umc83-BCD1072	P<0.05
	2	BCD855-asg20	P<0.05
	3	CDO344-PSR156	P<0.1
	8	umc12-npi268	P<0.05
	9	CSU95a-bnlg1372	P<0.05
	10	RZ740a-bnlg1074	P<0.05
	10	M49/2C-umc44	P<0.1
<b>PK</b>	5	RZ508-hhu503b	P<0.05
	5	hhu503b-SB854	P<0.05
<b>DUZ</b>	4	bnlg1927-hhu503a	P<0.05
	5	hhu503b-SB854	P<0.05
	6	CSU70-csu94a	P<0.1
	6	umc59-umc1006	P<0.1
	6	umc1006-PSR129b	P<0.1

Tabela 6 *Nastavak*

Osobina	Hromozom (CIM)	Marker interval (CIM)	Nivo značajnosti QTL-a (ANOVA)
<b>ŠZ</b>	2	bnlg108-BCD855	P<0.05
	5	RGC746-RZ892	P<0.01
	6	umc132-CDO202	P<0.1
	8	SB851b-csu31b	P<0.05
<b>DEZ</b>	5	RZ508-SB854	P<0.05
	8	PSR74-umc39	P<0.05
	10	csu103a-SB160a	P<0.05
<b>VB</b>	2	umc53-bnlg1327	P<0.05
	3	PSR156-CSU36b	P<0.05
	5	CSU26-php10017	P<0.05
	6	bnlg1043-bnlg426	P<0.001
<b>VK</b>	2	umc53-sb134a	P<0.1
	2	umc61-csu46	P<0.001
	2	umc5-bnlg108	P<0.05
	6	bnlg1043-csu94a	P<0.05
<b>DM</b>	2	M54/2'Ca-BCD855	P<0.001
	3	PSR156-bnlg1257	P<0.01
<b>BGM</b>	1	tub1-bnlg1014	P<0.05
	2	umc53-bnlg1327	P<0.001
	3	umc60a-RGC122	P<0.05
	5	SB663a-RGC746	P<0.05
	6	bnlg1043-RZ143b	P<0.1
<b>BL</b>	3	MACE01E07-umc60b	P<0.001
	10	csu103b-SB160a	P<0.01
<b>ŠL3</b>	1	BCD1072-umc161	P<0.1
	2	umc53-bnlg1327	P<0.05
	5	SB663a-RGC746	P<0.05
<b>ŠL4</b>	3	CSU184-SB160b	P<0.05
	5	SB736-csu108	P<0.01
<b>ASI</b>	2	umc34-UMC255	P<0.01
	2	BCD855-asg20	P<0.05
	7	csu150-cau129	P<0.001

Tabela 6 *Nastavak*

Osobina	Hromozom (CIM)	Marker interval (CIM)	Nivo značajnosti QTL-a (ANOVA)
<b>DS1</b>	5	CSU110-CSU26	P<0.05
<b>DS2</b>	1	bnlg1811-csu31a	P<0.05
	2	M54/2'Ca-csu481	P<0.1
	3	CSU134-CSU16	P<0.1
	4	RZ143a-bnlg1741	P<0.01
	4	bnlg1741-psr128b	P<0.1
	9	CSU95a-bnlg1372	P<0.1
	10	RZ740a-umc44	P<0.01
<b>DS3</b>	1	CSU206-csu91	P<0.1
	4	RZ630-psr128b	P<0.05
	6	umc1006-CSU95b	P<0.05
	9	CSU95a-csu94b	P<0.05
	10	bnlg1074-umc44	P<0.001
<b>RSV1</b>	1	bnlg1014-M52/1B	P<0.1
	2	umc53-bnlg1327	P<0.001
	5	hhu503b-CSU173	P<0.01
	9	csu94b-bnlg127	P<0.05
<b>RSV2</b>	8	npi220a-RGC970c	P<0.01
	8	RZ543-GI-27	P<0.05
<b>OP1</b>	2	RGC970b-csu166	P<0.001
	3	MACE01E07-CSU68c	P<0.05
	3	umc60b-SB160b	P<0.05
	7	bnl16.06-ph116	P<0.05
	9	CSU95a-umc105a	P<0.05
<b>OP2</b>	10	umc64-RZ740a	P<0.05
<b>SŠ1</b>	1	umc161-SB663b	P<0.1
	2	umc53-umc61	P<0.1
	3	CSU134- aba(MG)14	P<0.05
	7	bnlg434-bnl14.07	P<0.1
<b>SŠ2</b>	1	umc161-SB663b	P<0.1
	10	csu103a-sb113	P<0.01



#### **4.5.2. Kolokacije QTL-ova za osobine sa signifikantnim fenotipskim korelacijama**

Podaci o preklapanju QTL-ova za svih 26 ispitivanih svojstava na svim hromozomima prikazani su u Prilogu 6. Poklapanje QTL-ova za prinos, kao ciljne osobine stvaranja genotipova tolerantnih na sušu i QTL-ova za ostale ispitivane skupine svojstava prikazano je u Prilogu 5. Kolokacija je utvrđena samo za QTL-ove identifikovane CIM metodom, pošto je ova metoda, od svih korišćenih, najpouzdanija za QTL analizu.

Radi bolje interpretacije kolokacija izdvojena su preklapanja QTL-ova za osobine za koje je utvrđena visoko signifikantna fenotipska korelacija. Na ovaj način je moguće pretpostaviti postojanje blisko vezanih gena ili plejotropnog efekta jednog gena na nekoliko osobina. Aditivni efekti za svojstava za koja su istovremeno utvrđene i značajne fenotipske korelacije i kolokacija QTL-ova u nekim slučajevima su bili saglasni, a u nekim ne.

Visoko signifikantne fenotipske korelacije utvrđene su između prinosa i šest komponenti prinosa (broj redova - BR, broj zrna u redu - BZ, dužina klipa - DK, prečnik klipa - PK, dužina zrna - DUZ i debljina zrna - DEZ), prinosa i dve morfološke osobine (broj listova - BL i širina četvrtog lista - ŠL4), prinosa i ASI, kao i prinosa i DS2 i DS3. Između prinosa i fizioloških osobina nisu utvrđene značajne fenotipske korelacije. Za jedan broj signifikantno korelisanih svojstava detektovani su koincidentni QTL-ovi za prinos i sledeće osobine:

- za prinos (umc161-SB663b) i broj zrna u redu - BZ (umc107-umc161), na hromozomu 1, sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za prinos (SB360a-SB854) i četiri komponente prinosa (broj redova - BR (RZ508-SB854), prečnik klipa - PK (RZ508-hhu503b i hhu503b-SB854), dužina zrna - DUZ (RZ508-SB360a i hhu503b-SB854) i debljina zrna - DEZ (RZ508-SB854) na hromozomu 5. Aditivni efekti navedenih QTL-ova su bili istog predznaka za prinos - PR, broj redova - BR, prečnik klipa - PK, dužinu zrna - DUZ, a suprotnog za debljinu zrna - DEZ.

- preklapanje regiona za prinos - PR (csu150-CSU81), broj redova - BR (csu150-CSU81) i debljinu zrna - DEZ (csu129-CDO412) nađeno je i na hromozomu 7. Aditivni efekti za prinos - PR i broj redova - BR su bili istog predznaka, a suprotnog za debljinu zrna - DEZ. U regionu u kome je detektovano poklapanje QTL-ova za prinos -

PR i broj redova - BR, identifikovan je i QTL za ASI (csu150-csu129). Aditivni efekat QTL-a za ASI bio je suprotnog predznaka u odnosu na aditivne efekte QTL-ova za prinos - PR i broj redova - BR,

- za prinos – PR (M49/2C-umc44) i dužinu klipa - DK (M49/2C-umc44) na hromozomu

10. Sa ovim QTL-ovima su se poklopila i dva QTL-a za DS2 (RZ740a-umc44) i DS3 (bnlg1074-umc44). Aditivni efekti za navedene QTL-e su bili istog predznaka.

U daljem tekstu navedene su kolokacije QTL-ova za osobine koje su ispoljile značajnu međusobnu fenotipsku korelaciju, ali koji nisu koincidentni sa prinosom.

Za komponente prinosa detektovani su sledeći koincidentni QTL-ovi:

- za broj redova – BR (UMC60a-rgc122) i dužinu klipa – DK (CDO344-PSR156) na hromozomu 3, a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka,

- za broj redova – BR (bnlg1927-hhu503a) i dužinu zrna - DUZ (bnlg1927-hhu503a) na hromozomu 4, sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za broj redova – BR (RZ508-SB854), prečnik klipa - PK (RZ508-hhu503b i hhu503b-SB854), dužinu zrna - DUZ (RZ508-SB360a i hhu503b-SB854) i debljinu zrna - DEZ (RZ508-SB854) na hromozomu 5. Aditivni efekti navedenih QTL-ova su bili istog predznaka za broj redova – BR, prečnik klipa - PK, dužinu zrna - DUZ, a suprotnog za debljinu zrna - DEZ. Pored koincidentnih QTL - ova za prečnik klipa - PK i dužinu zrna - DUZ na hromozomu 5, za ove dve osobine detektovana je kolokacija QTL-ova i na hromozomu 6 (bnlg1043-csu94a, odnosno CSU70-csu94a). Aditivni efekti QTL-ova su bili istog predznaka,

- za broj zrna u redu – BZ i dužinu klipa - DK na hromozomu 1 (DHN4b-BCD1072, odnosno umc83-BCD1072), sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za broj zrna u redu – BZ i debljinu zrna - DEZ na hromozomu 1 (umc107-umc161, odnosno BCD1072-umc161) i hromozomu 2 (asg20-umc49a, odnosno bnlg108-npi409), sa aditivnim efektima suprotnog predznaka.

Za morfološke osobine detektovani su sledeći koincidentni QTL-ovi:

-za visinu biljke - VB i visinu biljke do klipa - VK na hromozomu 2 (umc53-bnlg1327, odnosno umc53-sb134a) i hromozomu 6 (bnlg1043-bnlg426, odnosno bnlg1043-csu94a), sa aditivnim efektima istog predznaka,

-za broj grana metlice - BGM i širinu trećeg lista - ŠL3 na hromozomu 2 (umc53-bnlgl1327, odnosno umc53-bnlgl1327) i hromozomu 5 (SB663a-RGC746, odnosno SB663a-RGC746), a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka.

- za dužinu metlice - DM (M54/2'Ca-BCD855) i visinu biljke do klipa - VK (umc5-bnlgl108) na hromozomu 2, a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka.

- za dužinu metlice - DM (PSR156-bnlgl1257) i visinu biljke - VB (PSR156-CSU36b) na hromozomu 3, a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka.

- za širinu četvrtog lista – ŠL4 i širinu zrna – ŠZ na hromozomu 2 (bnlg108-csu481, odnosno bnlgl108-BCD855) i hromozomu 5 (SB736-csu108, odnosno RGC746-RZ892), a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka,

- za širinu trećeg lista – ŠL3 i širinu zrna – ŠZ na hromozomu 5 (SB663a-RGC746, odnosno RGC746-RZ892) i hromozomu 6 (umc132-CDO202, odnosno umc132-CDO202), sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za visinu biljke – VB (PSR156-CSU36b) i broj redova - BR (UMC60a-rgc122) na hromozomu 3, sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za širinu četvrtog lista - ŠL4 (bnlg108-csu481) i dužinu klipa - DK (BCD855-asg20) na hromozomu 2, a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka.

Za ASI i *drought score* detektovani su sledeći koincidentni QTL-ovi:

- za DS2 i dužinu klipa - DK na hromozomu 2 (M54/2'Ca-csu481, odnosno BCD855-asg20), hromozomu 9 (CSU95a-bnlgl1372, odnosno CSU95a-bnlgl1372) i hromozomu 10 (RZ740a-umc44, odnosno RZ740a-bnlgl1074 i M49/2C-umc44). Aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka,

- za DS3 i dužinu klipa - DK na hromozomu 8 (umc12-umc30, odnosno umc12-npi268), hromozomu 9 (CSU95a-csu94b, odnosno CSU95a-bnlgl1372) i hromozomu 10 (bnlg1074-umc44,odnosno M49/2C-umc44), sa aditivnim efektima istog predznaka,

- za DS2 i širinu zrna – ŠZ na hromozomu 2 (M54/2'Ca-csu481, odnosno bnlgl108-BCD855) i hromozomu 5 (SB736-DHN4a, odnosno RGC746-RZ892). Aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka,

- za DS2 i masu 1000 zrna – MZ na hromozomu 5 (SB736-DHN4a, odnosno SB736-DHN4a) i hromozomu 10 (RZ740a-umc44, odnosno CDO456-bnlg1074).

Aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka,

- za ASI (BCD855-asg20) i DS2 (M54/2'Ca-csu481) na hromozomu 2, a aditivni efekti za navedene QTL-ove bili su suprotnog predznaka,

- za ASI (PSR129b-M54/1C) i DS3 na hromozomu 6 (umc1006-CSU95b), a aditivni efekti za navedene QTL-ove bili su istog predznaka,

- za ASI i broj redova - BR na hromozomu 4 (CSU39-hhu503a, odnosno bnlg1927-hhu503a), hromozomu 5 (SB854-CSU173, odnosno RZ508-SB854) i hromozomu 7 (csu150-cau129, odnosno csu150-CSU81). Na hromozomu 4, u istom regionu istovremeno je detektovan i QTL za dužinu zrna - DUZ (bnlg1927-hhu503a). Aditivni efekti za navedene QTL-ove bili su suprotnog predznaka.

Za fiziološke osobine detektovani su sledeći koincidentni QTL-ovi:

- za osmotski potencijal - OP2 i sadržaj šećera - SŠ1 i SŠ2 na hromozomu 1 (M31/3B/D-SB663b, umc161-SB663b, odnosno umc161-SB663b) i hromozomu 3 (CSU134-aba(MG)14, odnosno CSU134-CSU16). Na hromozomu 1 aditivni efekti su bili suprotnog, a na hromozomu 3 istog predznaka za ove dve osobine,

- za relativni sadržaj vode - RSV1 (umc53-bnlg1327) i sadržaj šećera - SŠ1 (umc53-umc61) na hromozomu 2, a aditivni efekti za navedene QTL-ove bili su suprotnog predznaka,

- za osmotski potencijal - OP1 (RGC970b-csu166) i sadržaj šećera - SŠ1 (bnlg1520-RGC970b) na hromozomu 2, a aditivni efekti za navedene QTL-ove bili su istog predznaka.

## 5. DISKUSIJA

Suša je uz neplodnost tla jedan od najčešćih abiotičkih stresova u svetu koji uzrokuje značajno smanjenje prinosa žitarica. Zbog genetičke kompleksnosti, tolerantnost na sušu je verovatno jedno od svojstava koje je najteže postići konvencionalnim oplemenjivanjem. Razumevanje mehanizma tolerantnosti ima ključnu ulogu u povećanju produktivnosti kukuruza.

Stvaranje hibrida koji daju visok prinos u uslovima suše je najvažniji cilj u programima oplemenjivanja kukuruza, ali su evaluacija i poboljšanje genotipova komplikovani i skupi zbog složene biologije kukuruza, interakcija genotipa i sredine i niske heritabilnosti (Austin i Lee, 1998). Jaka suša redukuje heritabilnost prinosa što je posledica smanjenja genetičke varijanse i povećanja varijanse greške (Blum i sar., 1988). Neki od efekata suše na kukuruz mogu biti prevaziđeni korišćenjem postojeće genetičke varijacije u tolerantnosti na sušu čime se dobijaju bolje adaptirani genotipovi.

U cilju stvaranja tolerantnih genotipova, neophodno je prevazići ograničenja koja se susreću u ovom procesu. Veoma je važno pravilno izabrati svojstva za selekciju kako bi se postigla tolerantnost na sušu. Ova svojstva je teško odabrati zbog složenosti kreiranja ideotipa tolerantnog na sušu. Stvaranje ovakvog ideotipa zahteva znanje o potencijalnom kapacitetu biljke, njenim konstitutivnim osobinama i adaptivnom odgovoru na nivo i trenutak delovanja stresa, a sve u cilju ostvarivanja zadovoljavajućeg prinosa (Blum, 1996). Poboljšanje ciljnih svojstava treba postići bez narušavanja genetičke arhitekture drugih adaptivnih svojstava. Različite studije sugerišu da su različiti setovi alela i različiti lokusi eksprimirani pod različitim uslovima sredine (Veldboom i Lee, 1996a, b) i nije poznato da li tolerantost na sušu nastaje usled prisustva specifičnih favorizujućih alela koji kontrolišu svojstvo od interesa, ili su različiti geni koji nisu direktno uključeni u kontrolu određenog svojstva odgovorni za tolerantnost.

Indirektna selekcija preko sekundarnih svojstava povezanih sa prinosom može da poboljša efikasnost oplemenjivanja genotipova tolerantnih na sušu. Genetička disekcija svojstava vezanih za prinos doprinosi razumevanju složenog biološkog puta stvaranja i poboljšanja prinosa (Ribaut i sar., 1997b; Wen i Zhu, 2005). Mnoga od sekundarnih svojstava koja možda obezbeđuju tolerantnost na sušu preporučena su za

indirektnu selekciju i korišćena su za genetičku analizu (Ludlow i Muchow, 1990; Edmeades i sar., 2000).

U procesu oplemenjivanja za tolerantnost na sušu, potencijal za prinos je od velikog značaja, zato što biljka mora da zadrži zadovoljavajuće karakteristike i u optimalnim uslovima gajenja. Oblasti u kojima suša izaziva smanjenje prinosa kukuruza, obično imaju dve do tri godine sa jakim stresom suše, nekoliko sa umerenim, i niz godina sa veoma slabim stresom ili bez njega (Edmeades i sar., 1990). Zbog toga genotip kukuruza tolerantan na sušu mora zadržati sposobnost za iskorišćavanje povoljnih uslova gajenja.

Razumevanje genetičke osnove tolerantnosti na sušu kod kukuruza je neophodno da bi se omogućilo da se razviju nove metode za selekciju. Sa dostupnošću sve većeg broja molekularnih markera omogućeno je dobijanje saturisanih molekularnih mapa tako da je mapiranje lokusa za kvantitativna svojstva (QTL-ove) postalo standardna procedura za proučavanje genetičke arhitekture kvantitativnih svojstava (Doerge, 2002). Poslednjih nekoliko decenija uvedene su i unapređene brojne metode molekularne genetike koje ne omogućavaju samo identifikaciju QTL-ova koji determinišu fenotipsku vrednost određenog svojstva već i analizu i interpretaciju uzročne povezanosti između njih. Razvojem novih metoda omogućeno je razlikovanje plejotropnih efekata od blisko vezanih QTL-ova u genomskim regionima gde je na istim pozicijama mapirano više od jednog svojstva (Jiang i Zeng, 1995; Kao i sar., 1999; Zeng i sar., 1999).

Korišćenje metode marker-asistirane selekcije otvara mnoge mogućnosti za nove strategije u oplemenjivanju. Marker-asistirana selekcija koja omogućava direktno razlikovanje genotipova može biti bolji pristup za razvijanje germplazme tolerantne na sušu.

U ovom radu utvđene su međusobne fenotipske korelacije i identifikovani su QTL-ovi za 26 različitih svojstava kukuruza ukrštanja DTP79xB73 u uslovima suše. Detektovani su QTL-ovi za agronomska, morfološka, ASI, DS i fiziološka svojstva, sa ciljem da se dobije indirektna informacija o genetičkoj i fiziološkoj osnovi odgovora kukuruza na deficit vode. Primenom RFLP, SSR, i AFLP molekularnih markera konstruisana je molekularna mapa. Za utvrđivanje pozicije, broja i efekata QTL-ova kod ispitivanih osobina korišćeni su ANOVA i statistički program WinQTL kartografer v 2.5.

Visoke značajne fenotipske korelacije utvrđene su između prinosa i skoro svih ispitivanih komponenti prinosa. Izuzetak su bile masa zrna i širina zrna, koje nisu bile korelisane sa drugim komponentama prinosa i prinosom, ali je između njih detektovana visoka značajna pozitivna korelacija. Visoke korelacije između prinosa i komponenti prinosa se uobičajeno detektuju zbog njihove međuzavisnosti (Blum, 1988). Komponente prinosa imaju veću heritabilnost od prinosa (Austin i Lee, 1996; Messmer i sar., 2009), tako da se njihovim poboljšanjem može postići povećanje prinosa (Gupta i sar., 2006) i u uslovima suše.

Korelaciona analiza u ovom radu pokazala je da su osobine broj redova po klipu i broj zrna u redu mnogo značajnije determinante prinosa (visoka pozitivna korelacija između ovih komponenti prinosa i prinosa) nego masa zrna (odsustvo korelacije između prinosa i mase zrna). Neka istraživanja pokazala su da je masa zrna imala značajniju ulogu u determinisanju prinosa u uslovima dobre snabdevenosti vodom nego u uslovima suše (Bolanos i Edmeades, 1996).

Dužina klipa je pokazala pozitivnu i značajnu korelaciju sa većinom ispitivanih komponenti prinosa u uslovima stresa suše. Što je dužina klipa veća, biće veći broj zrna po redu, tako da je i korelacija između ovih osobina signifikantna i pozitivna. Veći broj zrna po redu znači veći ukupan broj zrna, što će usloviti povećanje prinosa. Sa povećanjem prečnika klipa povećavao se i broj redova na klipu (visoka pozitivna korelacija), što takođe utiče na povećanje prinosa.

Dužina zrna je bila značajno pozitivno korelisana sa većinom komponenti prinosa, dok je debljina zrna pokazala značajne negativne korelacije (uključujući i korelaciju sa dužinom zrna). Sa povećanjem broja zrna po klipu, smanjuje se debljina, a povećava dužina zrna. Slične rezultate vezane za ove parametre zrna dobili su Nemati i sar. (2009) i Bo Peng i sar. (2011).

Između prinosa, komponenti prinosa i morfoloških osobina generalno nisu uočene visoke i značajne korelacije. Izuzetak predstavljaju širina četvrtog lista i broj listova. Obe osobine ispoljile su značajnu pozitivnu korelaciju sa prinosom i većinom komponenti prinosa. Quarrie i sar. (2006) identifikovali su alel (SQ1) kod pšenice koji je bio povezan sa 20% većim prinosom i značajno širim vršnim listovima.

Smanjenje potrebe drugih organa (kao što su stablo, metlica, koren) za asimilatima, favorizuje njihovo preusmeravanje ka formiranju klipova. Između prinosa i

visne biljke je detektovana slaba pozitivna korelacija, što je u suprotnosti sa rezultatima koje su dobili Bolanos i Edmeades (1993a) u uslovima suše gde je detektovana značajna negativna korelacija između navedenih osobina. Mala, ali ipak značajna negativna korelacija ustanovljena je između prinosa i broja grana metlice. Veličina i razgranatost metlice pokazale su visoku heritabilnost u brojnim ogledima, a na ove karakteristike metlice može se lako uticati u procesu selekcije (Fischer i sar., 1987). Selekcija za tolerantnost na sušu populacije Tuxpenio Sequia (CYMMIT, lokalni tropski materijal) vodila je ka redukciji veličine metlice (Bolanos i Edmeades, 1993c), iako nije vršena selekcija na to svojstvo. Fenotipska korelacija između prinosa i broja grana metlice možda je rezultat kompeticije između klipova i metlice za raspoložive izvore nutritijenata u vreme cvetanja (Bolanos i Edmeades, 1996).

Sekundarna morfološka svojstva kao što su period između metličanja i svilanja (ASI) i ocena odgovora na sušu (DS) pokazala su značajne fenotipske korelacije sa prinosom. ASI je pokazao visoko značajnu negativnu korelaciju sa prinosom i tri komponente prinosa (broj redova, broj zrna i dužina zrna). U brojnim eksperimentima pokazano je da je u toku vegetacije kukuruza, kad je u pitanju smanjenje prinosa izazvano sušom, najosetljiviji period između metličanja i svilanja (Westgate i Boyer, 1985; Artlip i sar., 1995; Saini i Westgate, 2000). Takođe, utvrđeno je da ASI i prinos pokazuju značajnu negativnu korelaciju u uslovima suše (Westgate i Boyer, 1985; Artlip i sar., 1995; Jones i Setter, 2000; Saini i Westgate, 2000) i da se ovo svojstvo može koristiti kao pouzdan i lako merljiv indikator nivoa stresa suše kod biljke kukuruza. DS2 i DS3 pokazali su visoke i značajne pozitivne korelacije sa prinosom i nekim komponentama prinosa (broj zrna, masa zrna, dužina klipa, prečnik klipa). Prisustvo odloženog starenja i manja uvijenost listova (veća vrednost DS) u uslovima stresa suše sugerisani su kao adaptivna svojstva u prethodnim istraživanjima (Bolanos i Edmeades, 1996). Kao što je navedeno, dobijeni rezultati su u skladu sa navedenim istraživanjima.

Između prinosa, komponenti prinosa i fizioloških osobina uglavnom nisu utvrđene značajne fenotipske korelacije. U sekundarna svojstva koja su značajna za tolerantnost kukuruza na stres suše pored komponenti prinosa, ASI, ocene odgovora na sušu, dužine metlice i broja grana metlice ubrajaju se i fiziološki parametri (relativni sadržaj vode, osmotski potencijal i sadržaj šećera) koji su mereni u ovom radu.



Odsustvo značajnih fenotipskih korelacija između navedenih fizioloških svojstava i prinosa možda je posledica efekta ASI koji maskira njihov mogući doprinos povećanju prinosa, što znači da će njihov značaj biti mali sve dok se ASI smanjuje i time doprinosi stabilizaciji prinosa u uslovima suše (Bolaños i Edmeades, 1996).

Metode mapiranja QTL-ova uključuju analize u kojima se traže QTL-ovi vezani za sam marker, kao i intervalno mapiranje gde se prisustvo QTL-a detektuje u intervalu između dva markera. U ovom radu identifikacija lokusa za kvantitativne osobine urađena je prvo primenom ANOVA metode, a zatim metodama WinQTL kartografera: SMA, IM i CIM. Analiza varijanse identifikovala je markere koji su pokazali signifikantne razlike između genotipova za svako mereno svojstvo, ukazujući na moguće QTL-ove za ispitivana svojstva. Primenom programa WinQTL kartografer verzija 2.5 identifikovani su QTL-ovi za svih 26 ispitivanih osobina (SMA, IM i CIM metodama). Po završetku analiza, upoređeni su rezultati dobijeni primenom svih korišćenih, a za sve osobine prikazani su rezultati ANOVA i CIM metoda. ANOVA i SMA (zasnovana na linearnoj regresiji) su najjednostavnije metode za nalaženje QTL-ova. Pomenute metode omogućavaju pronalaženje veze između markera i QTL-a, ali njihov nedostatak je mogućnost precenjivanja, odnosno potcenjivanja efekta identifikovanog lokusa za željeno kvantitativno svojstvo. Metoda intervalnog mapiranja – IM zasniva se na analizi intervala između dva markera, umesto analize samo jednog markera, dok kompozitno intervalno mapiranje - CIM predstavlja intervalno mapiranje sa primenom dodatnih markera između graničnih markera ispitivanog intervala, kao kofaktora u analizi.

Broj i pozicija QTL-ova detektovanih pomoću navedenih metoda nije bio identičan u velikom broju slučajeva. Primenom ANOVA metode detektovan je veći broj QTL-ova nego SMA metodom. Iako je većina QTL-ova nađena primenom obe metode locirana na istim pozicijama na hromozomu, CIM metoda omogućila je identifikaciju većeg broja QTL-ova od IM metode. Ovakvi rezultati uslovili su prikazivanje podataka koji su dobijeni primenom ANOVA i CIM metode. Iako se najpouzdaniji rezultati dobijaju korišćenjem CIM metode, ova metoda zahteva odgovarajuće markere i velike populacije sa dovoljnim brojem rekombinanata. Ovo je razlog zbog koga se QTL-ovi najpre detektuju primenom jednostavnijih metoda. Iako QTL-ovi koji su identifikovani primenom obe metode mogu imati najveći uticaj na ekspresiju analiziranih svojstava,

QTL-ovi detekovani primenom bar jedne od metoda mogu, usled male veličine populacije, imati značajan uticaj na svojstvo i ne treba ih isključiti iz daljih eksperimenata.

Za primenu marker-asistirane selekcije u programima oplemenjivanja, striktniji uslovi za pronalaženje QTL-ova -  $P < 0.01$  i  $LOD > 2.4$ , (Lander and Botstein, 1989) mogu biti primenjeni u cilju smanjenja dobijanja lažno pozitivnih rezultata (greške tipa I). Naravno, ovo može rezultirati u gubljenju potencijalnih QTL-ova kroz dobijanje takozvanih lažno negativnih QTL-ova (greška tipa II). U ovom radu korišćen je nivo verovatnoće od  $P < 0.1$  za nalaženje QTL-va primenom ANOVA metode i  $LOD > 2$  za detektovanje QTL-ova pomoću kompozitnog intervalnog mapiranja. Na taj način je omogućeno potpunije poređenje sa već objavljenim rezultatima za QTL-ove za tolerantnost na sušu kod kukuruza gde je korišćen isti nivo verovatnoće. Takođe, pokazano je da greške tipa II (odsustvo detekcije stvarno prisutnog QTL-a) predstavljaju veći problem od grešaka tipa I (Beavis i sar., 1994; Sanguineti i sar., 1999). Greške tipa II su naročito veliki problem kad se razmatra populacija male veličine kao što je slučaj u ovom radu. Istraživanja na paradajzu pokazala su da su neki QTL-ovi detektovani pod manje striktnim uslovima ( $P < 0.1$ ) identifikovani u različitim sredinama, dok neki QTL-ovi koji su detektovani primenom strožijih uslova ( $P < 0.01$ ) nisu pronađeni u svim ispitivanim sredinama.

Lokusi za kvantitativna svojstva dobijeni pod manje strogim uslovima mogu se tretirati kao potencijalni QTL-ovi pogodni za dalje testiranje i potvrdu. U istraživanjima brojnih autora na različitim biljnim vrstama (Lebreton i sar., 1995; Prioul i sar., 1997; Simko i sar., 1997; Davies i sar., 1999; Thumma i sar., 2001) korišćeni su manje striktni uslovi verovatnoće ( $P < 0.1$ ) u cilju identifikovanja QTL-ova i utvrđivanja mogućeg uzrocnog odnosa između ispitivanih osobina. Kada je u ovom radu nivo verovatnoće za nalaženje QTL-ova primenom ANOVA metode smanjen na  $P < 0.1$  povećan je ukupan broj identifikovanih QTL-ova. Tako je, na primer, detektovano dodatnih 21 zajedničkih QTL-ova sa CIM metodom.

Visok maksimum profila verovatnoće za nalaženje QTL-a veći od pet ( $LOD > 5$ ) detektovan je za pet svojstva i ukazuje da su identifikovani QTL-ovi sa velikim uticajem na ispoljavanje datog svojstva. QTL-ovi sa ovakvom LOD vrednošću detektovani su za neke osobine unutar svake skupine ispitivanih svojstava, izuzev prinosa i komponenti

prinosa. Maksimum profila verovatnoće za nalaženje QTL-a veći od pet nađen je za neka morfološka svojstva (broj grana metlice i širinu četvrtog lista, DS2 i DS3) i fiziološka svojstva (relativni sadržaj vode).

Pošto u ovom radu genom kukuruza nije u potpunosti bio pokriven markerima (npr. hromozom 8), može se desiti da nisu identifikovani svi QTL-ovi vezani za ispitivano svojstvo. Usled nedovoljne pokrivenosti hromozoma markerima, nije postignuta zadovoljavajuća preciznost u mapiranju QTL-ova. Populacije male veličine neminovno vode preceanjivanju veličine varijabilnosti opisane jednim QTL-om, ali ove analize daju makar približnu procenu QTL-ova koji nisu detektovani (Thumma i sar., 2001). Procenat ukupne objašnjene fenotipske varijabilnosti detektovan svim QTL-ovima za različita ispitivana svojstva u ovom radu bio je veći od 50% u slučaju velikog broja osobina. Mali deo ukupne fenotipske varijabilnosti mapiranim QTL-ovima objašnjen je samo za dve osobine: relativni sadržaj vode - RSV2 (11.85%) i osmotski potencijal - OP2 (12.99%).

QTL-ovi koji su do sada identifikovani za visinu biljke i visinu do klipa ispoljavali su ili aditivni ili parcijalno dominantni efekat. Efekat gena zavisi od genotipova i korišćenih eksperimentalnih uslova (Sibov i sar., 2003). U ovom radu dobijeni rezultati za efekat gena kod visine biljke (dominantan i super dominantan efekat gena za većinu detektovanih QTL-ova za ovu osobinu, kao i superdominantan prosečan efekat gena) nije u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u dosadašnjim istraživanjima. Za visinu do klipa takođe su detektovani QTL-ovi sa superdominantnim efektom (tri od ukupno sedam identifikovanih QTL-ova), mada je prosečan efekat gena bio parcijalno dominantan. Ovakvi rezultati dobijeni su zbog QTL-ova koji su ispoljili nekoliko puta veći dominantni efekat u odnosu na odgovarajući aditivni efekat i mogu odražavati efekat nekoliko QTL-ova u jednom regionu genoma, što može dovesti do preceanjivanja superdominantnog efekta gena.

Individualni QTL-ovi opisivali su veliki deo fenotipske varijabilnosti u opsegu od 25% do 35% u radovima velikog broja autora (Ragot i sar., 1995; Ajmone-Marson i sar., 1995; Veldboom i Lee, 1994; Beavis, 1994b; Jiang i sar., 1999). U ovom radu, neki QTL-ovi za različita ispitivana svojstva opisivali su sličan procenat fenotipske varijabilnosti (npr. 22.64% za prinos, 33.6 % za masu zrna, 20.95% i 56.23% za broj listova, 36.03% za širinu četvrtog lista). Za 24 svojstava detektovan je najmanje jedan

QTL koji je opisivao fenotipsku varijabilnost veću od 10 %. Takođe, za 14 analiziranih osobina (prinos, broj zrna, masa zrna, dužina klipa, dužina zrna, širina zrna, visina biljke, visina do klipa, broj grana metlice, broj listova, širinu trećeg lista, širinu četvrtog lista, DS2, DS3) fenotipska varijabilnosti opisana svim QTL-ovima bila je veća od 50%. Deo fenotipske varijabilnosti koji nije objašnjen identifikovanim QTL-ovima, može nedostajati iz više razloga: 1) greška usled uticaja sredine i greška usled merenja, 2) prisustvo lokusa sa malim fenotipskim efektom, 3) interakcija između QTL-ova koji ne mogu biti detektovani zbog njihovog malog efekta, ali ipak doprinose fenotipskoj varijabilnosti i 4) interakcija  $F_3$  familija sa varijacijama u spoljašnjoj sredini (Paterson i sar., 1991; Reiter i sar., 1991).

Značajne korelacije između različitih svojstava dobijene korišćenjem fenotipskih podataka i poklapanje regiona QTL-ova za ova svojstva daje posredan dokaz da su dva svojstva uzročno povezana. Takođe, postojanje regiona QTL-ova koji se preklapaju za više svojstava istovremeno trebalo bi da smanji verovatnoću za lažno detektovane QTL-ove. Izolacija gena koji kontrolišu određena svojstva može dati konačan dokaz da postoji uzročan odnos između dve osobine (Thumma i sar., 2001).

Prema Aastveit i Aastveit (1993) i Sanguineti i sar. (1999) postoje tri primarna uzroka korelacije među različitim osobinama: plejotropni efekat, vezanost gena i faktori sredine. U ovom radu mapiranjem su identifikovani regioni genoma vezani za dva ili više svojstava između kojih su istovremeno postojale značajne korelacije, podržavajući na taj način teoriju o postojanju plejotropnog efekta ili vezanosti QTL-ova. Indirektan i empirijski način za procenu da li vezanost ili plejotropija uzrokuju povezanost svojstava koja imaju koincidentne QTL-ove je utvrđivanje saglasnosti njihovih aditivnih efekata (Tuberosa i sar., 2002). Naime, mala je verovatnoća da je vezanost gena uzrok korelacije među svojstvima ukoliko se za sve detektovane koincidentne QTL-ove za dva svojstva ustanove i saglasni aditivni efekti. Ako je plejotropija primarni uzrok asocijacije među svojstvima, mnogo je verovatnije da se sličan odnos (saglasni aditivni efekti) nađe među svim QTL-ovima koji se preklapaju za dve osobine (Tuberosa i sar., 2002). Međutim, prisustvo nesaglasnih aditivnih efekata za koincidentne QTL-ove za dva svojstva ne isključuje mogućnost postojanja plejotropnog efekta, zato što znak asocijacije među svojstvima može da varira u zavisnosti od faze rasta biljke kao i uslova sredine u vreme ekspresije gena vezanog za posmatrano svojstvo.

U ovom radu detektovani su regioni potpunog ili delimičnog preklapanja QTL-ova za različite osobine. Grupacije QTL-ova za različita svojstva identifikovani su na skoro svim hromozomima. Na hromozomu 9 identifikovano je samo pet QTL-ova za 26 ispitivanih osobina, ali su bili grupisani, i delimično ili potpuno se preklapali. Za jedan broj osobina za koje su detektovani koincidentni QTL-ovi uočena je istovremeno i značajna fenotipska korelacija.

Preklapanje QTL-ova za prinos i komponente prinosa detektovano je na svim hromozomima izuzev na hromozomu 9. Izrazito grupisanje QTL-ova za navedena svojstva (13 QTL-ova za pet komponenti prinosa i prinos) uočeno je na hromozomu 5. Ovi QTL-ovi su se delimično ili potpuno preklapali. Na ostalim hromozomima poklapali su se QTL-ovi za po dva ili tri svojstva (komponenta prinosa i prinos).

Na hromozomu 5 detektovani su koincidentni QTL-ovi za prinos i nekoliko komponenti prinosa koje su istovremeno pokazale međusobne značajne fenotipske korelacije. To su broj redova zrna, prečnik klipa, dužina zrna i debljina zrna. Pored navedenih kriterijuma i aditivni efekti su bili saglasni, što ukazuje na mogućnost postojanja gena sa plejotropnim efektom na navedena svojstva. Obzirom da se plejotropni efekat može ispoljiti na dva načina – kao kaskadni efekat i istovremenim direktnim dejstvom gena na više osobina, moguće je pretpostaviti postojanje gena koji utiču na prečnik klipa, a time i na broj redova kao i na dužinu i debljinu zrna (što pretpostavlja veći broj zrna po redu/klipu). Sve ovo ukazuje na moguć pozitivan uticaj QTL-ova navedenih komponenti prinosa na prinos. Visoko signifikantne fenotipske korelacije, kolokacija QTL-ova i saglasni aditivni efekti za prinos i broj redova uočeni su i na hromozomu 7, što govori u prilog gore navedenom, dok je za debljinu zrna utvrđena visoko signifikantna ali negativna fenotipska korelacija sa prinosom i svim navedenim komponentama prinosa.

QTL-ovi za ASI, prinos i broj redova zrna su koincidirali na hromozomu 7. Takođe, QTL-ovi za ASI i broj redova su detektovani na još dva hromozoma (4 i 5). Značajne fenotipske korelacije i saglasni aditivni efekti su detektovani za sve tri navedene osobine, na sva tri hromozoma, pa se i ovde može govoriti o mogućem plejotropnom efektu gena. U radu Gemenet i sar. (2010) na hromozomima 1 i 2 detektovana je kolokacija QTL ova za prinos, ASI i broj redova, a Guo i sar. (2008) navode podatak iz MGDB (*Maize Genome Database*) o koincidentnim QTL-ovima za

prinos i ASI na hromozomu10. Sve navedeno potvrđuje značaj primene ASI kao sekundarnog svojstva u programima selekcije kukuruza u cilju poboljšanja prinosa.

Za broj grana metlice i širinu trećeg lista detekovana je značajna negativna fenotipska korelacija, kolokacija QTL-ova na hromozomima 2 i 5, a aditivni efekti za navedene QTL-ove su bili suprotnog predznaka, što možda ukazuje na kompeticiju za asimilatima između ova dva svojstva.

Na hromozomu 2 poklapali su se QTL-ovi za relativni sadržaj vode (RSV1) i sadržaj šećera (SŠ1), a između ovih osobina detektovana je značajna negativna korelacija. Smanjenje relativnog sadržaja vode i povećanje sadržaja šećera kod biljaka koje su izložene stresu suše pokazano je u radovima Valentovic i sar. (2006); Thomas i James (1999); Dekanova i sar. (2004). Valentovic i sar. (2006) pokazali su da je relativni sadržaj vode u listovima koji su tokom 24 sata bili izloženi uslovima niskog vodnog potencijala ( $-1.4$  MPa) opadao značajno i kod genotipova kukuruza osetljivih i tolerantnih na sušu u odnosu na njihove kontrole, dok je istovremeno detektovano povećanje sadržaja šećera. U radovima Thomas i James (1999) i Dekanova i sar. (2004). takođe je detektovano povećanje sadržaja šećera kod biljaka u uslovima suše. Ovo je u saglasnosti sa značajnom negativnom fenotipskom korelacijom koja je detektovana u ovom radu između navedenih osobina.

Preklapanje QTL-ova za različite osobine uočeno je i u radovima drugih autora (Lebreton i sar., 1995; Simko i sar., 1997; Sanguineti i sar., 1999; Thumma i sar., 2001).

Kod većine istraživanja vezanih za identifikaciju QTL-ova, ispituje se istovremeno više svojstava koja su u korelaciji, i rezultati često ukazuju da je veći broj osobina pod uticajem istog lokusa ili pod uticajem vezanih lokusa. Nalaženje ovakvih QTL-ova može povećati efikasnost marker asistiranе selekcije i poboljšati genetički progres.

U cilju pouzadnijeg odgovora na pitanje da li se radi o plejotropnom efektu ili vezanim genima trebalo bi koristiti nove metode analize genoma, koje obuhvataju izolaciju gena, određivanje njegove sekvence i funkcije.

Poklapanje rezultata za QTL-ove identifikovane u različitim studijama je teško iz više razloga: zbog razlika u metodologiji, veličini i tipu mapirajuće populacije, odsustvu zajedničkih marker lokusa, kao i zbog različitih sredina (Lee, 1995). I pored svega navedenog, poređenje identifikovanih QTL-ova u različitim eksperimentima

može dovesti do ustanovljavanja zajedničkih regiona za neke od njih. Identifikacija istog QTL-a za tolerantnost na stres, uprkos razlici među eksperimentima, može ukazivati na to da nađeni faktori predstavljaju genetičke komponente sa značajnim uticajem na ekspresiju ispitivanog svojstva.

U cilju provere dobijenih QTL-ova u ovom istraživanju, da bi se utvrdilo da li su isti QTL-ovi identifikovani u različitim sredinama i kod genetički drugačijeg materijala, upoređene su njihove pozicije sa pozicijama odgovarajućih QTL-ova objavljenim u radovima drugih autora.

Isti QTL-ovi za prinos, ocenu odgovora na sušu, relativni sadržaj vode, osmotski potencijal i sadržaj šećera su identifikovani i u radu (Quarrie i sar., 2005), u kojem su takođe korišćene  $F_3$  familije ukrštanja DTP79 x B73. U oba rada detektovani su zajednički hromozomski regioni uključeni u ekspresiju navedenih svojstava. Tako su QTL-ovi za prinos nađeni u istim regionima na hromozomima 5, 7 i 10 u oba eksperimenta. Međutim, donori alela koji su povećavali vrednost ispitivanog svojstva nisu bili poreklom od istog roditelja - aleli poreklom od linije B73 doprinosili su povećanju vrednosti prinosa u radu Quarrie i sar. (2005), a aleli poreklom od linije DTP79 u ovom radu. Prisustvo različitih roditeljskih linija kao donora alela koji su povećavali vrednost istih svojstava ispitivanih u dva različita eksperimenta na istom genetičkom materijalu, ukazuje na moguć uticaj uslova spoljašnje sredine.

QTL-ovi za ocenu odgovora na sušu u oba istraživanja su detektovani u istom regionu na hromozomu 1, a favorizujući aleli bili su poreklom od linije B73. Region za QTL za ocenu odgovora na sušu identifikovan u radu Quarrie i sar. (2005) poklapao se sa regionima za četiri QTL-a (jedan QTL za DS2 i tri QTL-a za DS3) detektovana u ovom radu na hromozomu 4. Za jedan QTL detektovan u oba rada DTP79 aleli su bili superiorni. U ostalim slučajevima superiorni aleli bili su poreklom od različitih roditelja.

Nekoliko zajedničkih pozicija nađeno je za relativan sadržaj vode. QTL za RSV1 na hromozomu 2 nađen je na istoj poziciji kao QTL za RSV u prethodnom istraživanju. Takođe, QTL za RSV1, odnosno RSV identifikovan je na hromozomu 9. Delimično su se preklapali i regioni QTL-a za RSV2 i RSV na hromozomu 8. U svim navedenim slučajevima superiorni aleli su bili poreklom od različitih roditeljskih komponenti.

Zajednički region za QTL-ove za OP1 u ovom radu i OP (Quarrie i sar. 2005) detektovan je na hromozomu 1. Superiorni aleli bili su poreklom od linije DTP79 u ovom radu, a aleli poreklom od linije B73 u prethodnom radu.

Quarrie i sar. (2006a) utvrdili su da je lokus za prinos kod pšenice na poziciji 7AL vezan za varijacije u biomasi biljke i širini lista. Ogledi u polju sa NIL kod pšenice pokazali su da je SQ1 alel povezan sa 20% većim prinosom i značajno širim vršnim listovima kod pšenice. Isti autori su utvrdili postojanje homologog lokusa kod kukuruza koji takođe utiče na širinu lista kod ukrštanja DTP79xB73. U drugom radu, širina lista (Quarrie i sar., 2006b) merena je na biljkama kukuruza koje su rasle u staklari u periodu od šest nedelja u uslovima suše kao i u uslovima dobre snabdevenosti vodom. QTL-ovi za širinu lista (od prvog do sedmog lista) uvek su bili identifikovani na hromozomskom regionu 9.04, blizu markera psr129 i sbp4. Veća signifikantnost za ove QTL-ove dobijana je uvek u uslovima suše u odnosu na uslove dobre snabdevenosti vodom. Međutim, nije utvrđeno da li je ovaj lokus kod kukuruza (9.04) asociran sa variranjem biomase i prinosa kod pomenutog ukrštanja.

U ovom radu, za razliku od istraživanja Quarrie i sar. (2006b) na kukuruza, detektovani su QTL-ovi samo za širinu trećeg i četvrtog lista u uslovima suše. Poređem rezultata ovog i prethodnog istraživanja (Quarrie i sar., 2006b), utvrđeno je da je nekoliko QTL-ova za ovu osobinu detektovano na istim hromozomima i u istim regionima hromozoma. QTL-ovi su detektovani na istim pozicijama na drugom (regioni QTL-ova za širinu četvrtog lista u prethodnom istraživanju poklapali su se sa QTL-ovima za širinu trećeg i četvrtog lista u ovom) i sedmom hromozomu (regioni QTL-ova za širinu trećeg lista i za širinu četvrtog lista u prethodnom istraživanju poklapali su se sa QTL-ovima za širinu trećeg lista). Favorizujući aleli bili su poreklom od linije DTP79 u radu Quarrie i sar. (2006b). U ovom radu samo za jedan QTL donor favorizujućeg alela bio je poreklom od linije DTP79, dok su svi ostali aleli koji su doprinosili povećanju vrednosti ovog svojstva bili poreklom od linije B73. U radu Quarrie i sar. (2006b), koincidentni QTL-vi za širinu lista i prinos kod kukuruza nađeni su na hromozomu 9. Međutim, u ovom istraživanju kolokacija QTL-ova za ove osobine nije detektovana na hromozomu 9, ali jeste na drugim hromozomima - na hromozomu 1 QTL za ŠL3 detektovan je blizu QTL-a za prinos, a regioni QTL-ova za širinu trećeg



lista (jednog od dva detektovana na ovom hromozomu) i prinos preklapali su se na hromozomu 7.

Neki od QTL-ova identifikovanih u ovom radu, takođe su detektovani i od strane drugih autora.

QTL-ovi za prinos detektovani na hromozomu 5 nađeni su na istoj poziciji u radu Agrama i Moussa (1996), a na hromozomu 8 u radovima niza autora (Beavis i sar., 1994b; Agrama i Moussa, 1996; Austin i Lee, 1996; Ribaut i sar., 1997b; Melchinger i sar., 1998, Sibov i sar., 2003). QTL za ovo svojstvo na hromozomu 7 detektovan je na poziciji 7.01 - 7.02 bin, dok su različiti autori detektovali QTL-ove za PR u regionu 7.04 - 7.05 (Stuber i sar., 1987; Beavis, 1994b; Austin i Lee, 1996; Ribaut i sar., 1997b; Melchinger i sar., 1998).

QTL-ovi za broj redova na hromozomima 3 (bin 3.06), 4 (bin 4.08) i 5 (bin 5.05), kao i za dužinu klipa na hromozomima 2 (bin 2.08), 3 (bin 3.06) i 9 (bin 9.02) detektovani su u istim regionima i u radovima autora Austin i Lee (1996), Veldboom i Lee (1994) i Beavis i sar. (1994b). U radu Frova i sar. (1999) QTL za broj redova takođe je detektovan na poziciji 2.08. QTL-ovi za dužinu klipa nađeni su u radu Austin i Lee (1998) na hromozomima 2 i 3, na istoj poziciji kao u ovom radu. Beavis i sar. (1994b) identifikovali su QTL za prečnik klipa u istom regionu hromozoma 5. Takođe, QTL-ovi za širinu zrna i dužinu zrna detektovani na hromozomima 1 i 5 respektivno, nađeni su u istim regionima u radu Bo Peng i sar. (2011).

Pozicije QTL-ova za visinu biljke bile su iste kao i pozicije QTL-ova detektovanih na hromozmu 3 (Lima i sar., 2006; Guo i sar., 2008), na hromozmu 5 (Beavis i sar., 1991; Ajmone Marsan i sar., 1994-5; Schon i sar., 1994; Melchinger i sar., 1998; Zhang i sar., 2006; Lima i sar., 2006; Ji-hua i sar., 2007) i na hromozomu 6 (Lima i sar., 2006). Regioni QTL-ova identifikovanih za visinu do klipa na hromozomu 2, poklapali su se sa regionima QTL-ova za ovo svojstvo kod Lima i sar. (2006).

QTL-ovi za ASI detektovani na hromozomu 2 identifikovani su i u drugim istraživanjima (Velboom i Lee, 1996a; Ribaut i sar., 1996; Guo et al., 2008; Hao i sar., 2010). U ovom radu QTL za ASI detektovan je na poziciji 4.08-4.09, blizu QTL-a za ovo svojstvo (bin 4.07) detektovanog u radu Messmer i sar. (2009) u uslovima stresa suše. Na istoj poziciji na hromozomu 4 detektovan je QTL za ASI u radu Fu i sar. (2008).

Prikazani rezultati potvrđuju činjenicu da su QTL-ovi prisutni u klasterima koji sadrže gene koji kontrolišu razviće biljke (Khavkin i Coe, 1998). QTL-ovi mapirani u ovom radu predstavljaju regione koji su zajednički različitim populacijama., što ukazuje da mogu biti uspešno korišćeni u marker asistiranoj selekciji. Bitno je napomenuti i to da su ovi QTL-ovi stabilni, što još više potvrđuje njihov značaj za MAS. Mapirani QTL-ovi se mogu koristiti u marker asistiranoj selekciji u cilju kreiranja efektivnijih programa oplemenjivanja, a identifikacija QTL-ova je samo prvi korak veoma dugog procesa.

Stabilnost prinosa u uslovima suše je najznačajnija stavka u razvijanju novih hibrida kukuruza sa boljim performansama kada je izložen ovom stresu. Uzimajući u obzir nisku heritabilnost i visoku interakciju genotipa i sredine, kao i ograničenu mogućnost za povećanje prinosa kukuruza u uslovima suše uz pomoć direktne selekcije, treba koristiti druga svojstva (npr. ASI) u procesu kreiranja genotipova kukuruza tolerantnih na sušu. U ovom kontekstu, QTL-ovi identifikovani u ovom radu, a posebno oni detektovani takođe i u radovima drugih autora, kao i dalja istraživanja, trebalo bi da pomognu u rasvetljavanju genetičke osnove tolerantnosti na sušu i da omoguće efektivnije oplemenjivanje u cilju dobijanja genotipova tolerantnih na uticaj ovog stresa.

Identifikacija QTL-ova je samo prvi korak u dugom procesu identifikacije i izolovanja molekularne osnove funkcionalne varijacije utvrđene primenom QTL analize. Posle identifikacije glavnih QTL-ova, sledeći korak je identifikacija najpogodnije sekvence gena kandidata. Identifikacija gena kandidata i rasvetljavanje njihove uloge mogu biti značajno olakšani kombinovanjem QTL analize sa različitim izvorima informacija i tehnoloških platformi (Pflieger i sar., 2001; Tuberosa i sar., 2002a; Wayne i McIntyre, 2002; Sharp i sar., 2004). U tom pogledu, napredak u oblasti tehnologije transkriptoma, proteoma i metaboloma omogućava ispitivanje usaglašene ekspresije hiljada gena i merenje nivoa njihove aktivnosti. S obzirom na to, rezultati ovog rada mogu biti korišćeni u ispitivanju i detekciji mogućih kandidat gena za tolerantnost na sušu kod kukuruza.

## 6. ZAKLJUČCI

- Visoke i značajne fenotipske korelacije ustanovljene su između prinosa i većine ispitivanih komponenti prinosa, kao i između prinosa, ASI i DS, što ukazuju na to da bi ova svojstva mogla biti važna u procesu selekcije za tolerantnost na sušu.
- Povezivanjem podataka iz molekularne mape i podataka dobijenih fenotipskim ocenjivanjem familija F3 generacije ukrštanja DTP79xB73 u uslovima stresa suše identifikovani su QTL-ovi za svih 26 ispitivanih osobina.
- ANOVA i CIM metode pokazale su se kao najpogodnije za identifikaciju QTL-ova. Prva metoda je omogućila identifikaciju najvećeg broja QTL-ova, a druga dobijanje najpouzdanijih rezultata.
- Visok maksimum profila verovatnoće za nalaženje QTL-a ( $LOD > 5$ ) detektovan je za pet svojstava (za širinu četvrtog lista, DS2 i DS3 (za dva QTL-a) i relativni sadržaj vode) što ukazuje da su identifikovani QTL-ovi sa velikim uticajem na ispoljavanje datog svojstva.
- Procenat ukupne fenotipske varijabilnosti objašnjen QTL-ovima kod većeg broja ispitivanih svojstava bio je veći od 50% što ukazuje na identifikaciju QTL-ova sa značajnim doprinosom ekspresiji navedenih svojstava.
- Većina QTL-ova detektovana CIM metodom (82.3%) ispoljila je dominantan efekat, od kojih je 32.65% pokazalo superdominantan efekat. Ako se zna da je superdominantan efekat gena veoma redak ili možda i ne postoji, može se smatrati da se ovde zapravo ne radi o superdominantnom efektu već da je ovakav efekat posledica prisustva većeg broj QTL-ova od kojih svaki ispoljava samo parcijalan dominantan efekat.
- Utvrđeno je postojanje hromozomskih regiona u kojima se preklapaju QTL-ovi za pojedine osobine koje su istovremeno pokazale i značajnu međusobnu fenotipsku korelaciju, što ukazuje na moguće postojanje vezanih gena ili plejotropnih efekata koji utiču na ove osobine.

- Utvrđeno je postojanje QTL-ova u istim regionima hromozma za iste osobine u drugim eksperimentima vršenim na istom genetičkom materijalu. Ustanovljeno je da su u velikom broju slučajeva različiti roditelji donori alela koji su povećavali vrednost svojstva, što može biti rezultat uticaja sredine u kojoj su eksperimenti vršeni.
- Neki od QTL-ova detektovani za prinos, broj redova, dužina klipa, prečnik klipa, širina zrna, dužina zrna, visina biljke, visina do klipa i ASI, u ovom radu identifikovani su i u radovima drugih autora na istoj poziciji i na istim hromozomima što znači da su oni zajednički različitom genetičkom materijalu. Ovo ukazuje na moguć značaj ovih QTL-ova u ekspresiji svojstava pa mogu biti uspešno korišćeni u marker asistiranoj selekciji.
- Isti QTL-ovi detektovani u ovom radu i radovima drugih autora smatraju se stabilnim QTL-ovima. Takvi QTL-ovi mogu biti još značajniji za marker-asistiranu selekciju u cilju stvaranja efikasnijih programa oplemenjivanja.
- QTL-ovi identifikovani u ovom radu, a posebno oni detektovani takođe i u radovima drugih autora, kao i dalja istraživanja, trebalo bi da pomognu u rasvetljavanju genetičke osnove za tolerantnost na sušu i da omoguće efikasnije oplemenjivanje u cilju dobijanja genotipova tolerantnih na uticaj ovog stresa.
- Identifikacija QTL-ova je samo prvi korak u dugom procesu identifikacije i izolovanja molekularne osnove funkcionalne varijacije utvrđene primenom QTL analize. Sledeći korak je identifikacija najpogodnije sekvence gena kandidata, pa rezultati ovog rada mogu biti korišćeni u ispitivanju i detekciji mogućih kandidat gena za tolerantnost na sušu kod kukuruza.

## 7. LITERATURA

Aastveit A.H. and K. Aastveit (1993): Effects of genotype-environment interactions of genetic correlations. *Theor. Appl. Genet.* 86:1007-1013.

Agrama H.A.S. and M.E. Moussa (1996): Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea Mays* L.). *Euphytica* 91:89-97.

Ajmone Marsan P., G. Monfredini, W. Ludwig *et al.* (1994): RFLP Mapping of QTL for Grain Yield and Agronomic Traits, Maize Genetics Cooperation: New Lett., 68:13–14.

Ajmone-Marsan P., G. Monfredini, W.F. Ludwig, A.E. Melchinger, P. Franceschini, G. Pagnotto and M. Motto (1995): In an elite cross of maize a major quantitative trait locus controls one-fourth of the genetic variation for yield. *Theor. Appl. Genet.* 90:415–424.

Andelković V. (2000): Identifikacija pokazatelja otpornosti kukuruza (*Zea mays* L.) prema suši kod top-cross potomstava sa egzotičnom germplazmom. Doktorska disertacija, poljoprivredni fakultet, Beograd.

Araus J.L., G.A. Slafer, M.P. Reynolds and C. Royo (2002): plant breeding and water relations in C3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* 89:925-940.

Artlip T.S., J.T. Madison and T.L. Setter (1995): Water deficit in developing endosperm of maize: cell division and nuclear DNA endoreduplication. *Plant, Cell and Environment* 18:1034–1040.

Asins M.J. (2002): Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant breed.* 121:281-291.

Austin D.F. and M. Lee (1996): Comparative mapping in F<sub>2:3</sub> and F<sub>6:7</sub> generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theor. Appl. Genet.* 92:817-826.

Austin D.F. and M. Lee (1998): Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. *Crop Sci.* 38:1296-1308.

Babu R.C., B.D. Nguyen, V. Chamarek, P. Shanmugasundaram, P. Chezian., P. Jeyaprakash, S. Ganesh, A. Palchamy, S. Sadasivam, S. Sarkarung *et al.* (2003): Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: Association between secondary traits and field performance. *Crop Sci.* 43:1457-1469.

Bänziger M. and H.R. Lafitte (1997): Efficiency of secondary traits for improving maize for low-nitrogen target environments. *Crop Sci.* 37:1110-1117.

Barrs H.D. and P.E. Weatherley (1962): A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413-428.

Bassam B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. biochem.* 196:80-83.

Basten C.J., B.S. Weir and Z.-B. Zeng (1994): Zmap-a QTL cartographer. In: J.S.G.C. Smith, B.J. Benkel, W.F. Chesnais, J.P. Gibson, B.W. Kennedy and E.B. Burnside (Eds.), *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Computing Strategies and Software*, Guelph, Ontario, Canada. Published by the Organizing Committee, 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.

Basten C., B. Weir and Z.-B. Zeng (2001): *QTL Cartographer*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Beavis W.D., D. Grant, M. Albertsen and R. Fincher (1991): Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with quantitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.* 83:141-145.

Beavis W.D. (1994a): The power and deceit of QTL experiments: lesson from comparative QTL studies. In: Wilkinson DB, ed. *Proceedings of the 49th annual corn and sorghum research conference*, Chicago, Illinois. Washington DC, USA: American Seed Trade Association, 250-266.

Beavis W.D., O.S. Smith, D. Grant and R. Fincher (1994b): Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F4 progeny. *Crop Sci.* 34:882-896.

Berke T.G. and T.R. Rocheford (1999): Quantitative Trait Loci for Tassel Traits in Maize. *Crop Sci.* 39:1439-1443.

Birnboim H. and Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7:1513-1525.

Blum A. (1988): Plant breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, R.L.

Blum A. (1989): Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci.* 29:230-233.

Blum A. (1996): Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul.* 20:135-148.

Blum A. (2005): Drought resistance, water use efficiency and yield potential are they compatible, dissonant or mutually exclusive? *Aust. J. Agr. Res.* 56:1159-1168.

Bolaños J. and G.O. Edmeades (1993a): Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization. *Field Crops Res.* 31:233-252.

Bolaños J., G.O. Edmeades and L. Martinez (1993b): Eight cycles of selection of drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought adaptive physiological and morphological traits. *Field Crops Res.* 31:269-286.

Bolaños, J. and Edmeades, G.O. (1993c): Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Res.*, 31:253-268.

Bolanos J. and Edmeades G.O. (1996): The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.* 48:65-80.

Bo Peng, Yongxiang Li, Yang Wang, Cheng Liu, Zhizhai Liu, Weiwei Tan, Yan Zhang, Di Wang, Yunsu Shi, Baocheng Sun, et al. (2011): QTL analysis for yield components and kernel-related traits in maize across multi-environments. *Theor. Appl. Genet.* 122:1305-1320.

Bruce W.B., G.O. Edmeades and T.C Barker (2002): Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Jour. Exp. Bot.* 53:13-25.

Carena, M.J., G. Bergman, N. Riveland, E. Eriksmoen, and Halvorson, M. (2009): Breeding maize for higher yield and quality under drought stress. *Maydica* 54:287-296.

Chambers K.G. and E.S. MacAvoy (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol. (Part B).* 126:455-476.



Chapman S.C. and G.O. Edmeades (1999): Selection improves drought tolerance in tropical maize populations II. Direct and correlated responses among secondary traits, *Crop Sci.* 39:1315–1324.

Chaves M.M. and M.M. Oliveira (2004): Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55:2365–2384.

Churchill G.A. and R.W. Doerge (1994): Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971.

Clarke J.M. and T.N. McCaig (1982): Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of Triticum genotypes. *Can. J. Plant Sci.* 62:571-578.

Close T.J., R.D. Fenton, A. Yang, R. Asghar, D. DeMason A., D.E. Crone, N.C. Meyer and F. Moonan (1993): Dehydrin: The Protein, Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress, Close T. J. , Bray E. A. *Amer. Society of Plant Physiology*, pp. 104–118.

Collard B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement:the basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.

Darvasi A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller and M. Soller (1993): Detecting marker-QTL linkaged estimating QTL gene effect and map location using saturated genetic map. *Genetics* 134:943-951.

Davies P.J., I. Simko, S.M. Mueller, G.C. Yencho, C. Lewis, S. McMurry, M.A. Taylor and E.E. Ewing (1999): Quantitative trait loci for polyamine content in an RFLP-mapped potato population and their relationship to tuberisation. *Physiol. Plantarum* 106:210-218.

Dekanova K., M. Luxova, O. Gasparikova and L. Kolarovic (2004): Response of maize plants to water stress. *Biologia*, 59/Suppl. 13:151-155.

Doerge R.W. (2002): Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3:43-52.

Edmeades G.O., J. Bolaños and H.R. Lafitte (1990): Selection for drought tolerance in maize adapted to lowland tropics. *Proceedings of the Fourth Asian Regional Maize Workshop*. Islamabad, Pakistan, September, 21-28:230-265.

Edmeades G.O., M. Bänziger, D.L. Beck, J. Bolaños and A. Ortega (1997a): Development and per se Performance of CIMMYT Maize Populations as Drought-Tolerant Source. *CIMMYT*, El Batán, Mexico, March, 25-29:254-262.

Edmeades G.O., J. Bolaños and S.C. Chapman (1997b): Value of secondary traits in selecting for drought tolerance in tropical maize. In G.O. Edmeades, M. Bänziger, H.R. Mickelson, and C.B. Peña-Valdivia (eds.), *Developing Drought and Low NTolerant Maize*. *Proceedings of a Symposium*, March 25-29, 1996, CIMMYT, El Batán, Mexico, 222-234. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Edmeades G.O., J. Bolaños, S.C. Chapman, H.R. Lafitte and M. Bänziger (1999): Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: I. Gains in biomass, grain yield, and harvest index. *Crop Science* 39(5):1306-1315.

Edmeades G.O., J. Bolaños, A. Elings, J.M. Ribaut, M. Bänziger and M.E. Westgate (2000): The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: M.E. Westgate, K.J. Boote (eds.) *CSSA Special Publication No 29*, Madison, pp. 43.

Edmeades G.O., M. Cooper, R. Lafitte, C. Zinselmeier, J.M. Ribaut, J.E. Habben, C. Löffler and M. Bänziger (2001): Abiotic stresses and staple crops. *Proceedings of the Third International Crop Science Congress*, Hamburg, Germany, August 18–23, 2000. CABI.

Edwards M.D., C.W. Stuber and J.F. Wendel (1987): Molecular-marker-facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution, and types of gene action. *Genetics* 116:113-125.

Edwards A., A. Civitello, H. A. Hammond and C.T. Caskey (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49:746-756.

Edwards M.D., T. Helentjaris, S. Wright and C.W. Stuber (1992): Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl. Genet.* 83:765-774.

Edwards K. (1998): Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs). In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram eds., Chapman and Hall, London.

Ellis M.H., W. Spielmeyer, G.J. Rebetzke and R.A. Richards (2002): „Perfect“ markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105:1038-1042.

Falconer D.C. and T.F.C. Mackay (1996): *Genetic constitution of a population. Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Essex, England; Longman, Scientific and Technical. 1-22.

Fedoroff N.V., D. Battisti, R. Beachy, P. Cooper, D. Fischhoff, C. Hodges, V. Knauf, D. Lobell, B. Mazur, D. Molden, M. Reynold, P. Ronald, M. Rosegrant, P. Sanchez, A. Vonshak and J. Zhu (2010): Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science*. 327(5967):833-834.

Fischer, K.S., E.C. Johnson, and G.O. Edmeades (1987): Recurrent selection for reduced tassel branch number and reduced leaf area density above the ear in tropical maize populations. *Crop Sci.*, 27:1150-1156.

Frova C., P. Krajewski, N. Di Fonzo, M. Villa and M. Sari Gorla. (1999): Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components. Theor. Appl. Genet. 99:280-288.

Fu F.L., Z.L., Feng, S.B.Gao, S.F. Zhou and W.C. Li (2008): Evaluation and quantitative inheritance of several drought-relative traits in maize. Agricultural Sciences in China, 7:280-290.

Ganal M.W., T. Altmann and M.S. Röder (2009): SNP identification in crop plants. Curr. Opin. Plant Biol. 12:211-217.

Gao S.-B., M.-J. Zhao, H. Lan and Z.-M. Zhang (2007): Identification of QTL associated with tassel branch number and total tassel length in maize Hereditas (Beijing) 8, 29(8):1013-1017.

Gemenet D.C., F.N. Wachira, R.S. Pathak and S.W. Munyiri (2010): Identification of molecular markers linked to drought tolerance using bulked segregant analysis in Kenyan maize (*Zea mays* L.) landraces. Journal of Animal and Plant Sciences. 9 (1): 1122-1134.

Geraldi I.O., J.B. Miranda Filho and R. Vencovsky (1985): Estimates of genetic parameters for tassel characters in maize (*Zea mays* L.) and breeding perspectives. Maydica 30:1-14.

Godfray H., J. Beddington, I. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. Thomas and C. Toulmin (2010): Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Science 327:812-818.

Goffinet B. and S. Gerber (2000): Quantitative trait loci: a meta-analysis. Genetics 155:463-4733.

Grant R.F., B.S. Jackson, J.R. Kiniry and G.F. Arkin (1989): Water deficit timing effects on yield components in maize. *Agron. J.* 81:61-65.

Guo JF, G.Q. Su, J.P. Zhang and G.Y. Wang (2008): Genetic analysis and QTL mapping of maize yield and associate agronomic traits under semi-arid land condition. *Afr. J. Biotechnol.* 7:1829-1838.

Gupta P.K., S. Rustgi and N. Kumar (2006): Genetic and molecular basis of grain size and grain number and its relevance to grain productivity in higher plants. *Genome* 49:565–571.

Haldane J.B.S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8:299-309.

Haley C.S. and S.A. Knott (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324.

Hanson A.D. and W.D. Hitz (1982): Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:163–203.

Hao Z., X. Li, X. Liu, C. Xie, M. Li, D. Zhang and S. Zhang (2010): Meta-analysis of constitutive and adaptive QTL for drought tolerance in maize. *Euphytica* 174:165–177.

Hayashi K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa (2004): Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.* 108:1212–1220.

Helentjaris T., K. Gretchen, M. Slocum, C. Siedenstrang and S. Wegman (1985): Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol. Biol.* 5:109-118.

Hussain M., M.A. Malik, M. Farooq, M.Y. Ashraf and M.A. Cheema (2008): Improving drought tolerance by exogenous application of glycine betaine and salicylic acid in sunflower. *J. Agron. Crop Sci.* 194:194-199.

Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Snisky and T.J. White (1990): PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA, USA, Academic press, pp. 482.

IPCC (2007): Intergovernmental Panel on Climate Change. Working Group II: "Impacts, Adaptation and Vulnerability". Fourth Assessment Report.

Jaleel, C.A., P. Manivannan, G.M.A. Lakshmanan, M. Gomathinayagamand and R. Panneerselvam (2008): Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61:298–303.

Jaleel C.A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, R. Somasundaram and R. Panneerselvam (2009): Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11:100–105.

Jansen R.C. (1993): Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211.

Jansen R. and P. Stam (1994): High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447-1455.

Ji-hua T., T. Wen-Tao, Y. Jian-Bing, M. Xi-Qing, M. Yi-Jiang, D. Jin-Rui and Jian-Sheng Li (2007): Genetic dissection of plant height by molecular markers using a population of recombinant inbred lines in maize. *Euphytica* 155:117–124.

Jiang C. and Z.B. Zeng (1995): Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111–1127.

Jiang C., G.O. Edmeades, I. Armstead *et al.* (1999): Genetic analysis of adaptation differences between highland and lowland tropical maize using molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:1106–1119.

Jones M.M. and H.M. Rawson (1979): Influence of the rate of the development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency and osmotic potential in sorghum. *Physiol. Plant.* 45:103-111.

Jones C. J., K.J. Edwards, S. Castiglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van der Wiel, B.L. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, N. Marmioli, R.L. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, A. Vasquez and A. Karp (1998): Reproducibility testing of RAPDs by a network of European laboratories. In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. A. Karp, P.G. Isaac and D.S. Ingram eds., Chapman and Hall, London.

Jones R.J. and T.L. Setter (2000): Hormonal regulation of early kernel development. In: M.E. Westgate, K.J. Boote (eds.) *Physiology and modeling kernel set in maize*, Crop Science Society of America, Madison, pp. 25-42.

Kao C.H., Z.B. Zeng, and R.D. Teasdale (1999): Multiple interval mapping for QTL. *Genetics* 139:1203-1216.

Khavkin E. and E.H. Coe (1998): The major quantitative trait loci for plant stature, development and yield are general manifestations of developmental gene clusters. *Maize Newslett.*, 72:60-66.

Kirigwi F.M., M. van Ginkel, G.B. Guedira, B.S. Gill, G.M. Paulsen and A.K. Fritz (2007): markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Mol. Breed.* 20:401-413.

Koebner R.M.D. and R.W. Summers (2003): 21st century wheat breeding: Plot selection or plate detection? *Trends Biotechnol.* 21:59–63.

Korol A.B., Y.I. Ronin and E. Nevo (1998): Approximate analysis of QTL-environment interaction with no limits on the number of environments. *Genetics* 148:2015-2018.

Kruglyak L. and E.S. Lander (1995): A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* 139:1421-1428.

Lander E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg (1987): Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.

Lander E.S. and Botstein D. (1989): Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics* 121:185-199.

Lebreton C., V. Lazić-Jančić, A. Steed, S. Pekić and S.A. Quarrie (1995): Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J. Exp. Bot.* 46:853-865.

Lebreton C.M., P.M. Visscher, C.S. Haley, A. Semikhodskii and S.A. Quarrie (1998): A nonparametricbootstrap method for testing close linkage vs. pleiotropy of coincident quantitative trait loci. *genetics* 150:931-943.

Lee M. (1995): DNA markers and plant breeding programs. *Adv. Agron.* 55:265-344.

Lima M., C. Souza, D. Bento, A. Souza and L. Carlini-Garcia (2006): Mapping QTL for Grain Yield and Plant Traits in a Tropical Maize Population. *Mol. Breed.* 17:227-239.

Lincoln S., M. Daly and E. Lander (1992): Constructing genetic maps with Mapmaker/exp 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3rd edition.



Lincoln S., M. Daly and E. Lander (1993): Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 3rd Edn.

Liu B. (1998): Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis CRC Press, Boca Raton.

Ludlow M., J.M. Santamaria, and S. Fukai (1990): Contribution of osmotic adjustment to grain-yield in *Sorghum bicolor* (L) Moench under water-limited conditions. 2. Water-stress after anthesis. Aus. J. Agron. Res. 41:67-78.

Ludlow M.M. and R.C. Muchow (1990): A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. Adv. Agron. 43:107-153.

Manly K.F., H. Cudmore Robert, Jr. and J.M. Meer (2001): Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. Mamm. Genome 12:930–932.

Maughan P.J., M.A. S. Maroof, G.R. Buss and G.M. Huestis (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance and nearisogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93:392-401.

Matin M.A., J.H. Brown and H. Ferguson (1989): Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. Agron. J. 81:100–105.

Melchinger A.E., H. Utz and C.C. Schon (1998): Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. Genetics 149:383-403.

Messmer R., Y. Fracheboud, M. Banziger, M. Vargas, P. Stamp and J.M. Ribaut (2009): Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and

stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. *Theor. Appl. Genet.* 119:913-930.

Meyer K., G. Benning and E. Grill (1996): Cloning of plant genes based on genetic map position. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome mapping in plants*, pp. 137–154. R G Landes Company, San Diego, California Academic Press, Austin, Texas.

Mickelson S.M., C.S. Stuber, L. Senior and S.M. Kaeppler (2002): Quantitative trait loci controlling leaf and tassel traits in a B73xMol7 population in maize. *Crop Sci.* 42(6):1902–1909.

Mitra J. (2001): Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr. Sci.* 80:758-763.

Mittler R. (2005): Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11:15–19.

Mohan M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, and T. Sasaki (1997): Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3:87-103.

Money T., S. Reader, L.J. Qu, R.P. Dunford and G. Moore (1996): AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 24:2616-2617.

Morgan J.M. (1983): Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 31:655-665.

Morgan J.M. (1995): growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at high soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Res.* 40:143-152.

Morgan J.M. and R.W. King (1984): Association between loss of leaf turgor, abscisic acid levels and seed set in two wheat cultivars. *Aust. J. Plant Physiol.* 11:143-150.

Morgan M.J. and A.G. Condon (1986): Water-use, grain yield and osmoregulation in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:523- 532.

Murrey M.G. and W.F. Thompson (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.

Nam N.H., Y.S. Chauhan and C. Johansen (2001): Effect of timing of drought stress on growth and grain yield of extra-short-duration pigeon pea lines. *J. Agr. Sci.* 136:179–189.

Nelson J.C. (1997): QGene: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol. Breed.* 3:239-245.

Nemati A., M. Sedghi, R.S. Sharifi and M.N. Seiedi (2009): Investigation of correlation between traits and path analysis of corn (*Zea mays* L.) grain yield at the climate of Ardabil region (Northwest Iran). *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 37:194-198.

Ogbonnaya F., F. Dreccer, G. Ye, R.M. Trethowan, D. Lush *et al.* (2007): Yield of synthetic backcross-derived lines in rainfed environments of Australia. *Euphytica* 157:321-336.

Openshaw S. and E. Frascaroli (1997): QTL detection and marker-assisted selection for complex traits in maize. In: *Proc. 52th Annual Corn and Sorghum Research Conference*, ASTA, Washington, D.C.

Passioura J.B. (2002): Environmental biology and crop improvment. *Funct. Plant Biol.* 29:537-546.

Paterson A.H., S. Damon, J.D. Hewitt, D. Zamir, H.D. Rabinowitch, S.E. Linkoln, S.E. Lander and S.D. Tanksley (1991): Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generations and environments. *Genetics* 127:181-197.

Pflieger S., V. Lefebvre and M. Causse (2001): the candidate gene approach in plant genetics: A review. *Mol. Breed.* 7:275-291.

Pekić S. (1989): Kukuruz i suša: ekofiziološke osnove otpornosti kukuruza prema suši, Naučna knjiga.

Penner G.A., J.A. Stebbing. and B. Legge (1995): Conversion of an RFLP marker for the barley stem rust resistance gene *Rpg1* to a specific PCR-amplifiable polymorphism. *Mol. Breed.* 1:349-354.

Podlich D.W., C.R. Winkler and M. Cooper (2004): Mapping as you go: an effective approach for marker-assisted selection of complex traits. *Crop Science* 44:1560–1571.

Prioul J.L., S.A. Quarrie, M. Causse and D. De Vienne (1997): Dissecting complex physiological functions into elementary components through the use of molecular quantitative genetics. *J. Exp. Bot.* 48:1151-1163.

Qualset C.O., C.W. Schaller and J.C. Williams (1965): Performance of isogenic lines of barley as influenced by awn length, linkage blocks and environment. *Crop Sci.* 5:489-494.

Quarrie S.A. and I.E. Henson (1982): Measurement of abscisic acid content of cereal leaves using expressed sap. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 108:365-373.

Quarrie S.A., V. Lazić-Jančić, M. Ivanović, S. Pekić, A. Heyl, P. Landi, C. Lebreton and A. Steed (1996): Molecular marker methods to dissect drought resistance in

maize. The Proceedings of the XVIIth Conference on Genetics, Biotechnology and Breeding of Maize and Sorghum held at the Aristotelian University of Thessaloniki, Greece on 20-25 October, 52-58.

Quarrie A.S., V. Lazić-Jančić, D. Kovačević, A. Steed and S. Pekić (1999): Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J. Exp. Bot.* 50:1299-1306.

Quarrie S.A., V. Lazić-Jančić, M. Ivanović, V. Andjelković, S. Pekić Quarrie, D. Ignjatović-Micić, K. Marković (2005): Molecular markers and QTL analysis of drought responses at the Maize Research Institute: past achievements, problems and prospects. 60th Anniversary of Maize Research Institute, October.

Quarrie S.A., V. Lazić-Jančić, V. Andjelković, D. Ignjatović-Micić, S. Pekić Quarrie, V. Conde-Martinez, A. Kaminska and J.D. Barnes (2006b): A candidate gene for yield in wheat acting through effects on leaf width has a possible homologue in maize. 5th Plant GEM meeting, Venice, Italy, October.

Quarrie S., S. Pekić Quarrie, R. Radošević, D. Rancic, A. Kaminska *et al.* (2006a): Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *J. Exp. Bot.* 57:2627–2637.

Ragot M., P.H. Sisco, D.H. Hoisington *et al.* (1995): Molecular-marker-mediated characterization of favorable exotic alleles at quantitative trait loci in maize. *Crop Sci.* 35:1306–1315.

Rafalski A. (2002): Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:94–100.

Rassmusson J. (1935): Studies on the inheritance of quantitative characters in *Pisum*. I. Preliminary note on the genetics of time of flowering. *Hereditas* 20:161-180.

Reiter H.S., J.G. Coors, M.R. Sussman and W.H. Gabelman (1991): Genetic analysis of tolerance to low phosphorus stress in maize using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 82:561-568.

Ribaut J.M., D.A. Hoisington, J.A. Deutsch, C. Jiang, and D. Gonzales-de-Leon (1996): identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92:905-914.

Ribaut J.M., D. Gonzalez de Leon, C. Jiang, G.O. Edmeades and D. Hoisington (1997a): Identification and transfer of ASI quantitative trait loci (QTL): a strategy to improve drought tolerance in maize lines and populations. In: G.O. Edmeades, M. Bänziger, H.R. Mickelson, C.B. Peña Valdivia (eds.) *Proc Symp Developing Drought- and Low N-tolerant Maize*, CIMMYT, pp. 396-400.

Ribaut J.M., C. Jiang, D. Gonzalez-de-Leon, G. Edmeades and D.A. Hoisington (1997b): Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 94:887-896c.

Ribaut J.M., X. Hu, D. Hoisington, and D. Gonzales-de-Leon (1997c): Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection backcross scheme. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 15:156-164.

Ribaut J.M. and J. Betran (1999): Single large-scale marker-assisted selection (SLS-MAS). *Mol. Breed.* 5:531-541.

Ribaut J.M., C. Jiang, and D. Hoisington (2002): Simulation Experiments on Efficiencies of Gene Introgression by Backcrossing. *Crop Sci.* 42:557-565.

Ribaut J.M. *et al.* (2004): Genetic dissection of drought tolerance in maize: a case study. In Physiology and Biotechnology Integration for Plant Breeding (Nguyen, H.T. and Blum, A., eds.), pp. 571–609, Dekker.

Saini H.S. and M.E. Westgate (2000): Reproductive development in grain crops during drought. In Spartes DL, (ed) Advances in Agronomy Vol. 68 Academic Press, San Diego, pp. 59-96.

Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989): Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Santamaria J.M., M.M. Ludlow and S. Fukai (1990): Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Shorgum bicolor* (L.) Moench under water limited conditions. I. Water stress before anthesis. Aust. J. Agric. Res. 41:51-65.

Sanguineti M.C., R. Tuberosa, P. Landi, S. Salvi, M. Maccaferri, E. Casarini and S. Conti (1999): QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize. J. Exp. Bot. 337:1289-1297.

Sari-Gorla M., P. Krajewski, N. Di Fonzo, M. Villa and C. Frova (1999): Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering. Theor. Appl. Genet. 99:289-295.

Sax K. (1923): The Association of Size Differences with Seed coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics 8:552-560.

Scharp J.H.C. und J. Wehrmann (1975): Die Bedeutung des Mineralstickstoffvorrates des Bodens zu Vegetationsbeginn für die Bemessung der N-Düngung zu Winterweizen. Landw. Forsch. 324:100-114.

Schgiwietzke S., Y. Kim, E. Ximenez, N. Mosier and M. Ladisch (2008): *Ethanol production from maize*. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement (book), part VI, 347-364.

Schon C.C., A.E. Melchinger, J. Boppenmaizer, E. Brunklaus-Jung, R.G. Herrmann and J.F. Seitzer (1994): RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting testcross performance of elite European flint lines. *Crop Sci* 34:378–389.

Schonfeld M.A., B.F. Johnson, B.F. Craver and D.W. Morhinweg (1988): Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci*. 28:526-531.

Sharp P.J., S. Johnston, G. Brown, R.A. McIntosh, M. Pallotta, M. Carter, H.S. Bariana, S. Khartkar, E.S. Lagudah, R.P. Singh, M. Khairallah, R. Potter and M.G.K. Jones (2001): Validation of molecular markers for wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52:1357–1366.

Sharp R.E., V. Poroyoko, L.G. Hejlek, W.G. Spollen, G.K. Springer, H.J. Bohnert and H.T. Nguyen (2004): Root growth maintenance during water deficits: Physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55:2343-2351.

Shen L., B. Courtois, K.L. McNally, S.Robin and Z. Li. (2001): Evaluation of near isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl. Genet.* 103:75-83.

Sibov S.T., C.L. De Souza, A.A. Garcia, A.R. Silva., A.F. Garcia and C.A. Mangolin (2003): Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. *Hereditas* 139:107-115.

Simko I., S. McMurry, H.M. Yang, A. Manscho, P.J Davies and E.E. Ewing (1997): Evidence from polygene mapping for a causal relationship between potato tuber dormancy and abscisic acid content. *Plant Physiol.* 115:1453-1459.



Silanpaa M.J. and E. Arjas (1998): Bayesian mapping of multiple quantitative trait loci from incomplete inbred line cross data. *Genetics* 148:1373-1388.

Skiba B., R. Ford and E.C.K. Pang (2004): Construction of a linkage map based on a *Lathyrus sativus* backcross population and preliminary investigation of QTLs associated with resistance to ascochyta blight. *Theor. Appl. Genet.* 109:1726–1735.

Smith J.S.C. (1987): Gene Markers and Their Uses in the Conservation, Evaluation and Utilization of Genetic Resources of Maize (*Zea mays* L.). International Training Session on Scientific Management of Gene Banks, Raleigh, N.C.

Staub J.E., L.J. Kuhns, B. May and P. Grun (1982): Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *J. Am. Sci.* 107:405-408.

Staub J.E. and F.C. Serquen (1996): Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort. Science* 31:729-740.

Stuber C.W. and M.D. Edwards (1986): Genotype selection for improvement of quantitative traits in corn using molecular marker loci. p. 70-83. In D. Wilkinson (ed.) *Proc 41st Annu. Corn and Sorghum Industry Res. Conf.*, Chicago, IL. 10-11 Dec. Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC.

Stuber C.W., M.D. Edwards and J.F. Wendel (1987): Molecular marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27:639-648.

Stuber C.W. (1989): Isozymes as Markers for Studying and Manipulating Quantitative Traits. In: "Isozymes in Plant Breeding Biology". D. Soltis and P. Soltis (eds.), Dioscorides Press, Portland, Oregon.

Tanksley S.D. and T.J. Orton, Eds. (1983): *Isozymes in plant genetics and breeding.* Elsevier Science Publishing Co. New York, USA.

Tanksley S.D. (1993): Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27:205-233.

Tanksley S.D., M.W. Ganal and G.B. Martin (1995): Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11:63-68.

Tanksley S. and J. Nelson (1996): Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.* 92:191-203.

Taiz L. and E. Zeiger (2006): *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.

Thomas H. and A.R. James (1999): Partitioning of sugar in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and rewatering. *New Phytol.* 142:295-305.

Thumma B.R., N.P. Bodapati, C. Amaresh, C.F. Don, B.M. Len and L. Chunji (2001): Identification of causal relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. *J. Exp. Bot.* 52:203-214.

Torney F., L. Moeller, A. Scarpa, and K. Wang (2007): Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:193–199.

Trifunović V. (1960): Neki problemi selekcije i semenarstva kukuruza. *Hibridi kukuruza Jugoslavije*. 12,7.

Tuberosa R., S. Parentoni, T.S. Kim, M.C. Sanguineti and R.L Phillips. (1998b): Mapping QTLs for ABA concentration in leaves of a maize cross segregating for anthesis date. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 72:72-73.

Tuberosa R., M.C. Sanguineti, P. Landi, S. Salvi, E. Casarini and S. Conti (1998a): RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought stressed maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:744-755.

Tuberosa R., S. Salvi, M.C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri and S. Conti (2002): Mapping QTLs Regulating Morpho-physiological Traits and Yield: Case Studies, Shortcomings and Perspectives in Drought-stressed Maize. *Ann. Bot.* 89:941-963.

Tuberosa R., B.S. Gill and S.A. Quarrie (2002a): Cereal genomic: Ushering a brave new world. *Plant Mol. Biol.* 48:445-449.

Tuberosa R. and S. Salvi (2004): QTLs and genes for tolerance to abiotic stress in cereals. In: R. Varshney, P.K. Gupta (eds).

Tuberosa R. and S. Salvi (2006): Genomics-based approaches to improve drought tolerance in crops. *Trends Plant Sci.* 11:415-412.

Turner N.C. (1979): In *Stress Physiology in Crop Plants* (eds. Mussell, H. and Staples, R. C.), Wiley, New York, pp. 343–372.

Turner N.C. and M.M. Jones (1980): Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In: *Adaptation of Plants to Water and High Temperature stress*, Ed. Turner, N.C. and P.J. Kramer, pp. 89-103, Wiley Interscience, New York.

Utz H.F. and A.E. Melchinger (1995): PLABQTL. manual version1 and 1.1. Stuttgart.

Valentovic P., M. Luxova, L. Kolarovic and O. Gasparikova (2006): effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil Environ.*, 52(4):186-191.

Vargas M., F. van Eeuwijk, J. Crossa and J.M.Ribaut (2006): Mapping QTLs and QTL-environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theor. Appl. Genet* 112:1009–1023.

Veldboom L.R. and M. Lee (1994): Molecular marker facilitated studies of morphological traits in maize. II: Determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theor. Appl. Genet.* 89:451–458.

Veldboom L.R. and M. Lee (1996b): Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I. grain yield and yield components. *Crop Sci.* 36:1310–1319.

Veldboom L.R. and M. Lee (1996a): Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments. II. Plant height and flowering. *Crop Sci.* 36:1320–1327.

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid Res.* 23(21):4407-4414.

Wayne M.L. and L. McIntyre (2002): Combining mapping and arraying : An approach to candidate gene identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:14903-14906.

Weeden N., G. Timmerman and J. Lu (1994): Identifying and mapping genes of economic significance. *Euphytica* 73:191–198.

Weising K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer (1995): Applications of DNA Fingerprinting in Plants and Fungi *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*, CRC Press, Boca Raton.

Weising K, H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications, 2nd edn. Boca Raton.

Wen Y.X. and J. Zhu (2005): Multivariable conditional analysis for complex trait and its components. *Acta Gen. Sin.* 32:289-296.

Westgate M.E. and J.S. Boyer (1985): Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta* 164:540-549.

Williams J.G.K., M.K. Hemafey, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic markers. *Methods Enzymol.* 218:704-740.

Wright G.C. and N.C. Rachaputi (2004): Drought and drought resistance. In 'Encyclopedia of plant and crop science'. Ed. R.M. Goodman, pp. 386-390. (Marcel Dekker, Inc.: New York).

Wright G.C. and R.C.G. Smith (1983): Differences between two grain-sorghum genotypes in adaptation to drought stress. 2. Root water-uptake and water-use. *Aus. J. Agric. Res.* 34:627-636.

Xu H.-L., F. Qin, F. Du, R. Xu, Q. Xu *et al.* (2009): Photosynthesis in different parts of a wheat plant. *J. Food Agric. Environ.* 7:399-404.

Yi N. and D. Shriner (2008): Advances in Bayesian multiple QTL mapping in experimental 11 designs. *Heredity* 100:240-252.

Young N.D. (1999): A Cautiously Optimistic Vision for Marker Assisted Breeding. *Mol. Breed.* 5:505-510.

Zeng Z.B. (1993): Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10972-10976.

Zeng Z.B. (1994): Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.

Zeng Z.B., C.H. Kao and C.J. Basten (1999): Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genet. Res.* 74:279–289.

Zhang M., L. Duan, Z. Zhai, J. Li, X. Tian, B. Wang, Z. He and Z. Li. (2004): Effects of plant growth regulators on water deficit-induced yield loss in soybean, Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia.

Zhang Z. M., M.J. Zhao, H.P. Ding, T.Z. Rong, and G.T. Pan (2006): Quantitative trait loci analysis of plant height and ear height in maize. *Russ. J. Genet.* 42:306–310.

## **PRILOZI**

# PRILOG 1

**REZULTATI STATISTIČKIH ANALIZA ZA NEKOLIKO ISPITIVANIH SVOJSTAVA SA I BEZ  
VREDNOSTI ZA DVE FAMILIJE ČIJA JE SREDNJA VREDNOST ZA PRINOS ZNAČAJNO  
ODSTUPALA OD SREDNJE VREDNOSTI ZA OSTALE ISPITIVANE FAMILIJE**

- 1      Distribucija učestalosti vrednosti  $F_3$  familija (prinos - PR, broj redova - BR, broj zrna po redu - BZ, dužina klipa - DK i DS2).**
- 2.              ANOVA (prinos - PR, broj redova - BR, broj zrna u redu - BZ i DS2)**
- 3.              CIM (prinos - PR, broj redova - BR, broj zrna u redu - BZ i DS2)**

- A - *Prikaz rezultata sa vrednostima za dve familije čija je srednja vrednost za prinos značajno odstupala od srednje vrednosti za ostale ispitivane familije***
- B - *Prikaz rezultata bez vrednosti za dve familije čija je srednja vrednost za prinos značajno odstupala od srednje vrednosti za ostale ispitivane familije***



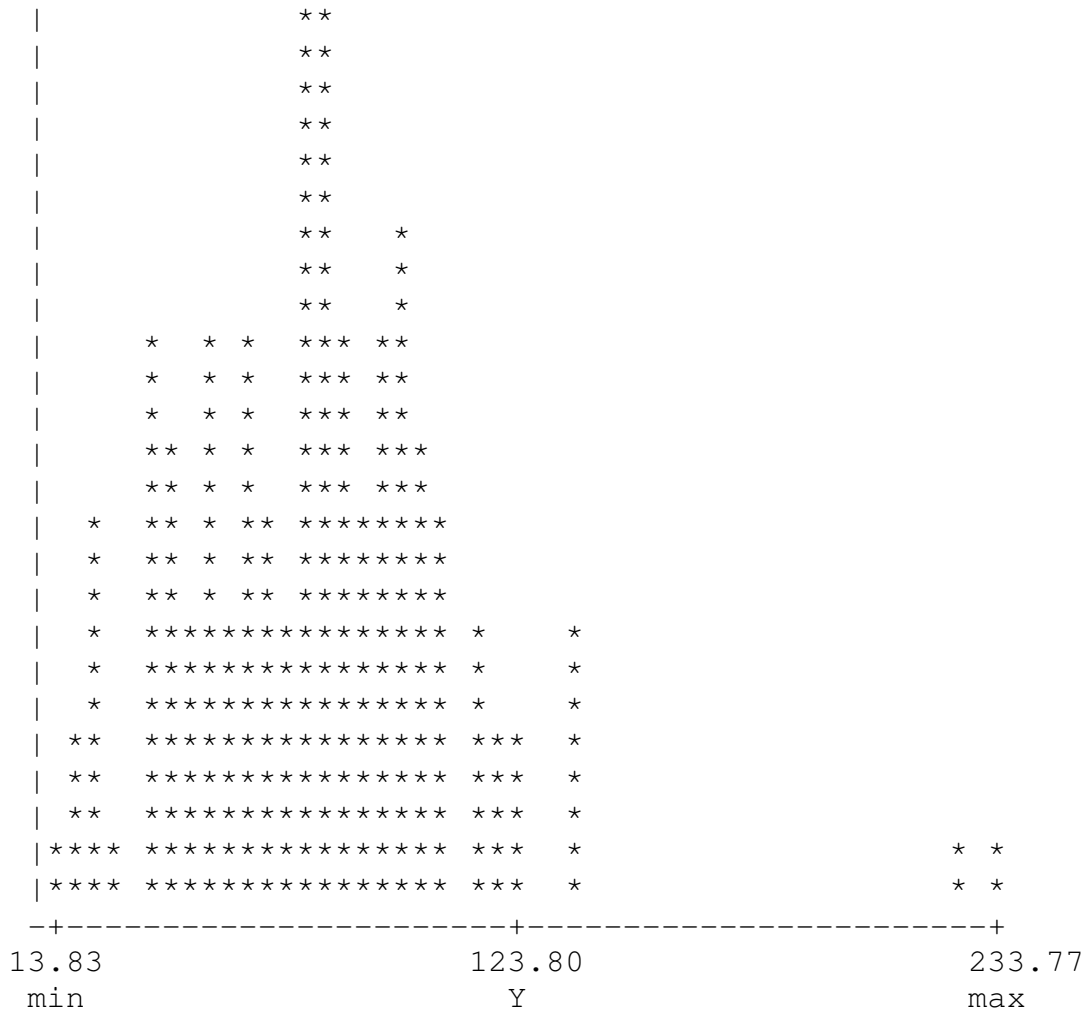
# PRINOS - PR

## 1. DISTRIBUCIJA UČESTALOSTI

A

Srednja vrednost: 76.06  
 Varijansa: 1179.862  
 Standardna devijacija: 34.35  
 koeficijent varijacije: 0.45  
 koeficijent asimetrije: 1.53  
 koeficijent spljoštenosti: 5.76  
 $\chi^2$  statistika: 188.29 S (5: 5.99, 1: 9.21)

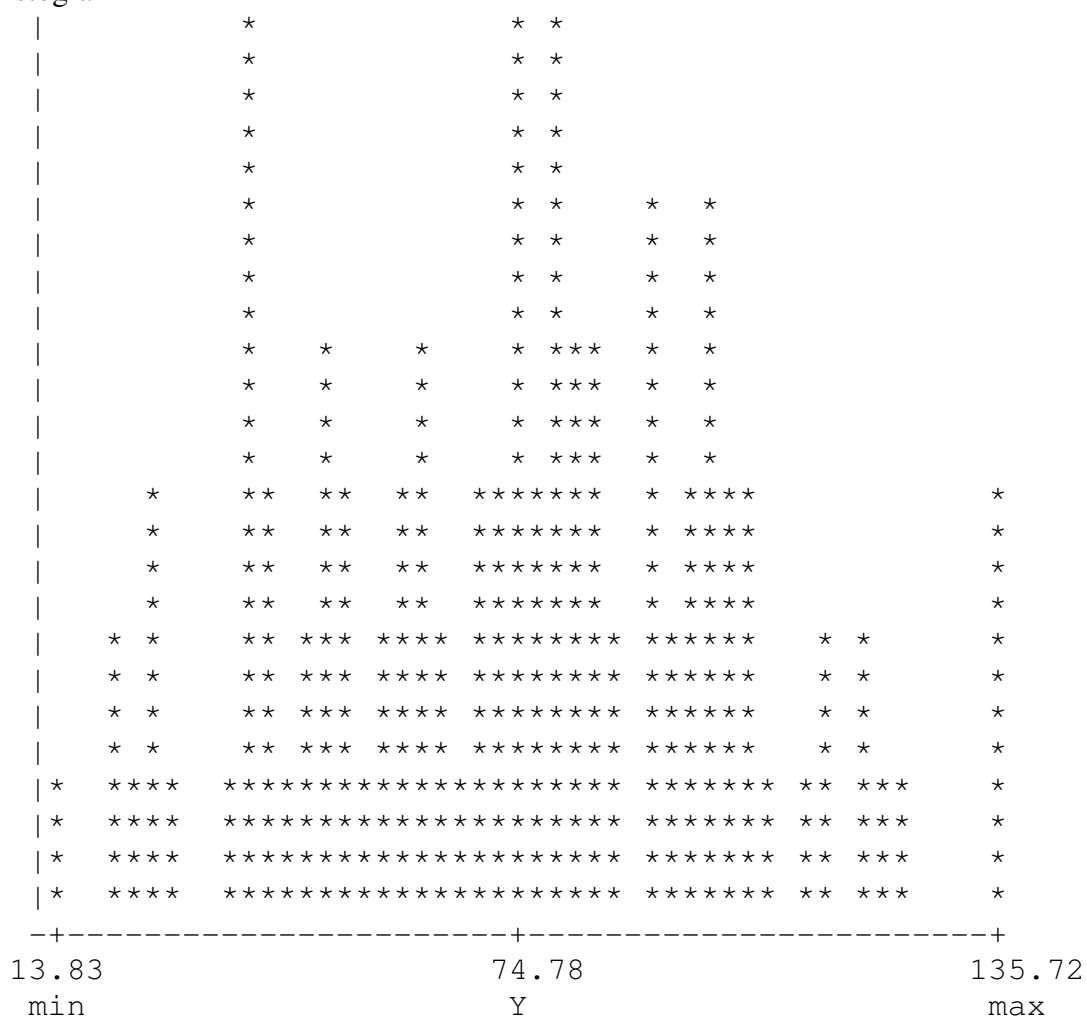
histogram



**B**

Srednja vrednost: 73.15  
Varijansa: 748.261  
Standardna devijacija: 27.35  
Koeficijent varijacije: 0.37  
Koeficijent asimetrije: 0.05  
Koeficijent spljoštenosti: -0.34  
 $\chi^2$  statistika: 0.5321 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



## 2. ANOVA

### A

hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
1	blt101.97	P<0.05	53.8
2	bnlg1327	P<0.1	20.8
2	bnlg1520	P<0.1	158.0
4	bnlg426	P<0.01	11.5
4	umc126b	P<0.001	61.1
5	rz892	P<0.05	41.2
5	csu110	P<0.01	91.5
7	csu150	P<0.05	0.0
7	csu11	P<0.1	20.7
7	csu81	P<0.05	23.6
7	M542Cb	P<0.1	36.2
7	bnlg434	P<0.05	42.2
9	DHPS	P<0.05	61.1
10	umc44	P<0.05	97.8
10	bnl7.49	P<0.1	112.9
10	bnlg1450	P<0.05	125.9

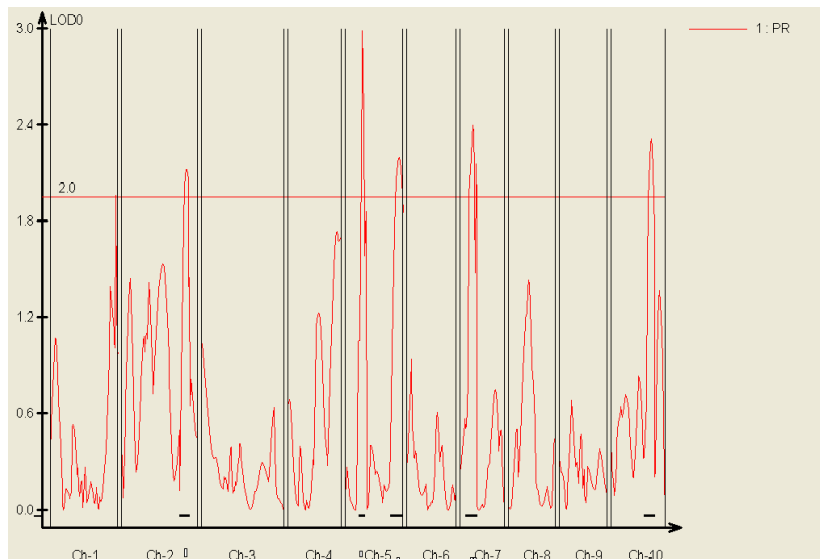
### B

hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
1	umc161	P<0.1	163.9
1	CDO89b	P<0.05	166.1
1	bnlg2331	P<0.05	169.1
1	SB663b	P<0.1	172.0
4	umc169	P<0.1	135.5
5	RZ892	P<0.05	41.2
5	MACE01A03	P<0.05	60.7
6	PSR129b	P<0.1	30.6
7	csu150	P<0.01	0.0
7	csu129	P<0.05	11.3
7	csu11	P<0.1	20.7
7	CSU81	P<0.05	23.6
7	bnlg434	P<0.05	42.2
7	bnl16.06	P<0.1	98.0
8	RZ543	P<0.1	23.0
9	bnlg1209	P<0.1	61.8
10	RZ740a	P<0.05	69.5
10	bnlg1450	P<0.1	125.9

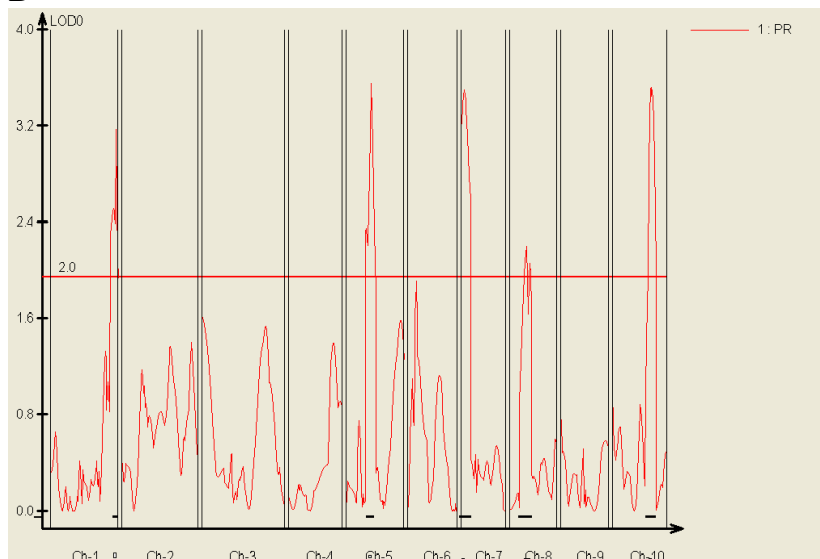
### 3. CIM

- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Puna linija crvene boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

**A**



**B**

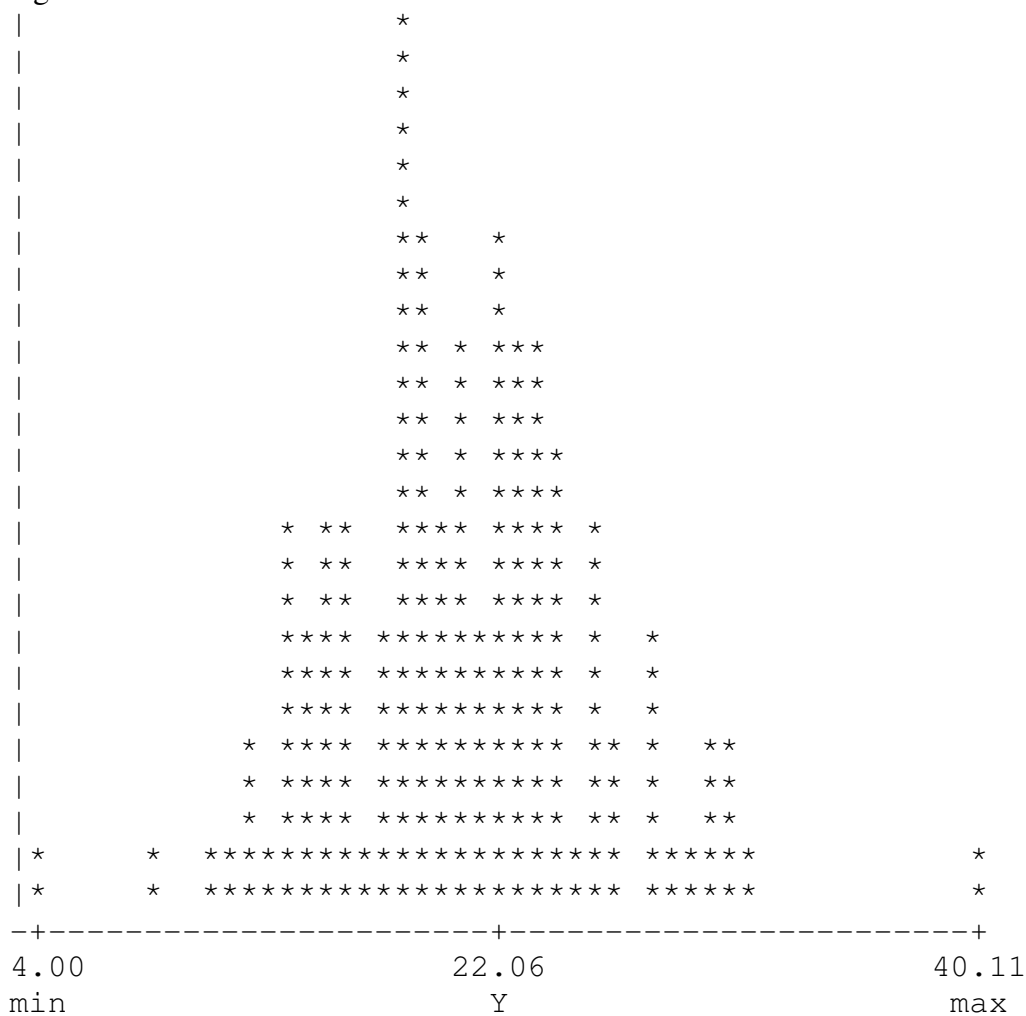


**BROJ ZRNA U REDU - BZ**  
**1. DISTRIBUCIJA UČESTALOSTI**

**A**

Srednja vrednost: 20.40  
 Varijansa: 28.964  
 Standardna devijacija: 5.38  
 Koeficijent varijacije: 0.26  
 Koeficijent asimetrije: 0.27  
 Koeficijent spljoštenosti: 1.61  
 $\chi^2$  statistika: 11.6880 S (5: 5.99, 1: 9.21)

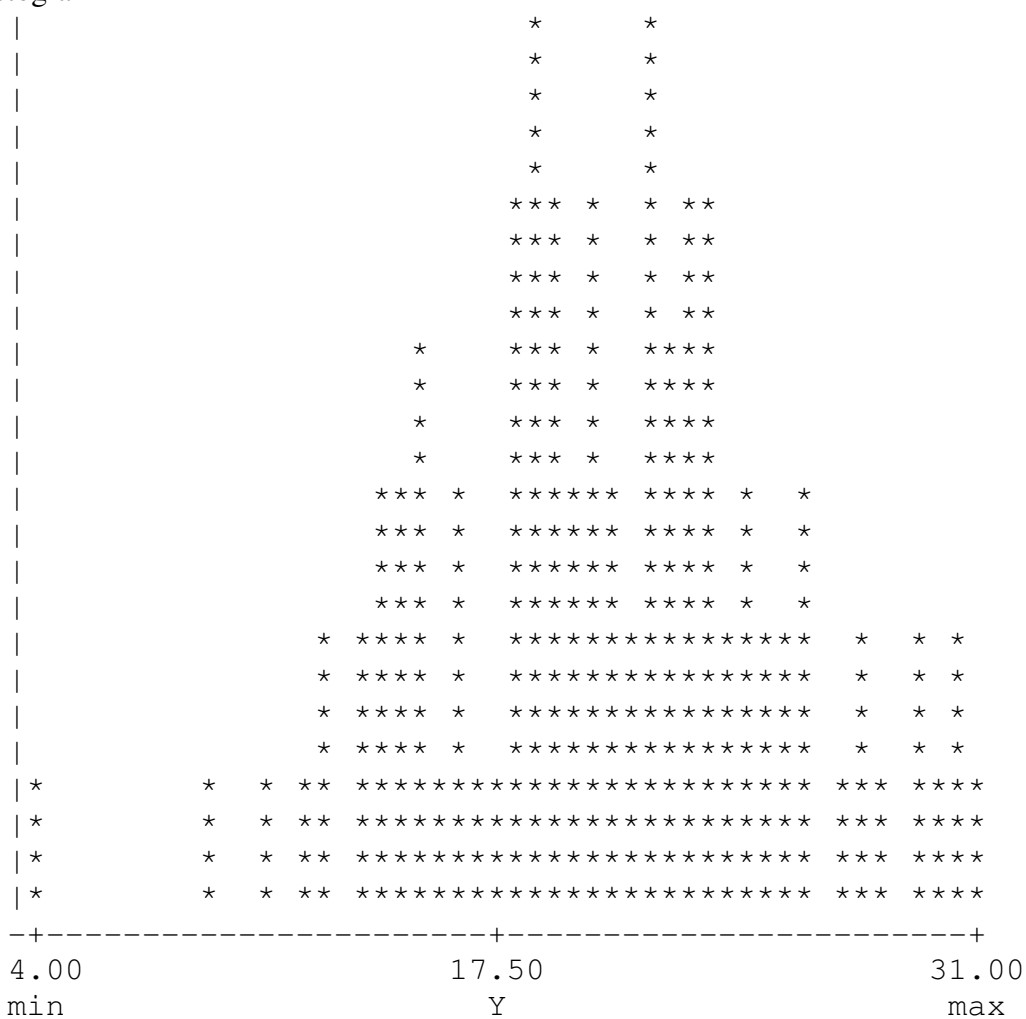
histogram



**B**

Srednja vrednost: 20.20  
Varijansa: 25.391  
Standardna devijacija: 5.04  
Koeficijent varijacije: 0.25  
Koeficijent asimetrije: -0.19  
koeficijent spljoštenosti: 0.44  
 $\chi^2$  statistika: 1.3569 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



## 2. ANOVA

**A**

hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
1	umc157	P<0.1	20.8
1	psr128a	P<0.05	107.6
1	bcd1072	P<0.05	141.4
2	bnlg1338	P<0.1	1.6
3	rz141	P<0.1	83.8
4	bnlg426	P<0.1	11.5
4	rz143a	P<0.1	44.2
5	dhn4a	P<0.1	29.3
5	rz892	P<0.05	41.2
5	csu110	P<0.05	91.5
7	csu150	P<0.1	0.0
7	csu11	P<0.01	20.7
7	csu81	P<0.05	23.6
7	cdo412	P<0.1	31.1
7	M542Cb	P<0.1	36.2
9	csu95a	P<0.1	8.8
9	csu94b	P<0.01	46.2
10	bnl7.49	P<0.1	112.9
10	bnlg1450	P<0.01	125.9
10	csu48	P<0.05	137.7

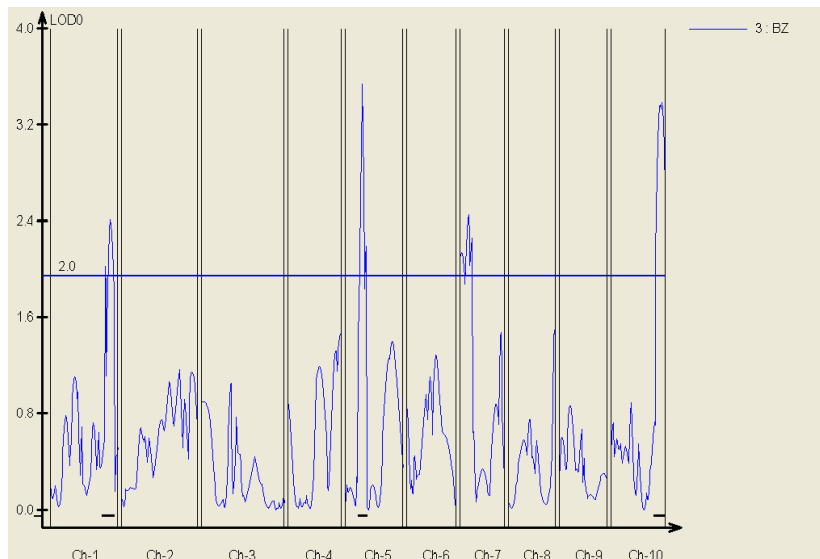
**B**

hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
1	psr128a	P<0.05	107.6
1	CDO89b	P<0.1	166.1
3	RZ141	P<0.01	83.8
5	RZ892	P<0.05	41.2
6	CSU95b	P<0.1	46.9
7	csu150	P<0.1	0.0
7	csu11	P<0.05	20.7
7	CSU81	P<0.1	23.6
10	bnlg1450	P<0.1	125.9

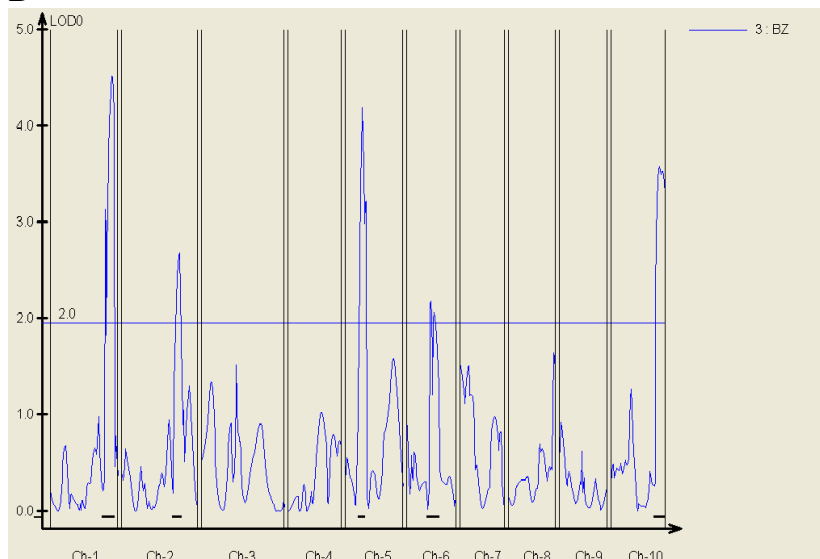
### 3. CIM

- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Puna linija plave boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

**A**



**B**



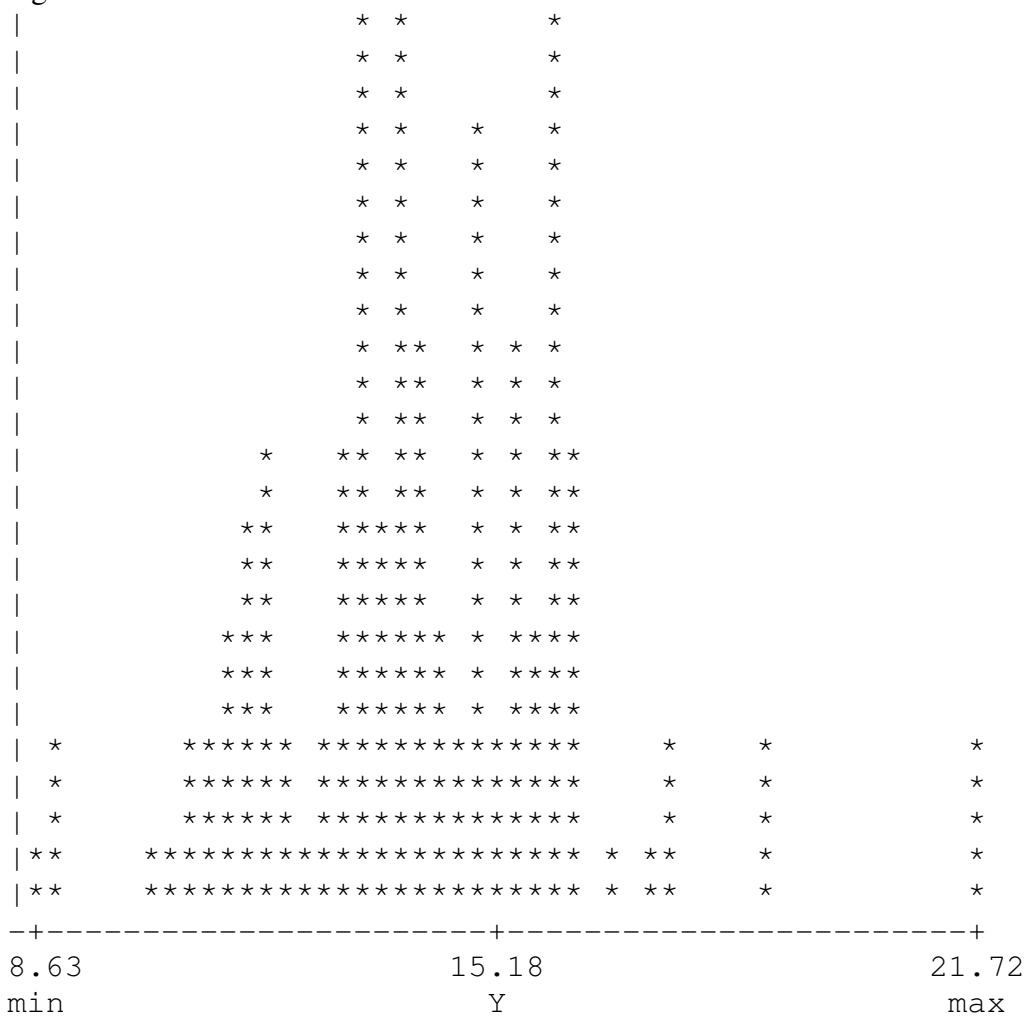


**DUŽINA KLIPA - DK**  
**1. DISTRIBUCIJA UČESTALOSTI**

**A**

Srednja vrednost: 14.02  
 Varijansa: 4.857  
 Standardna devijacija: 2.20  
 Koeficijent varijacije: 0.16  
 Koeficijent asimetrije: 0.52  
 Koeficijent spljoštenosti: 1.98  
 $\chi^2$  statistika: 21.8731      S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



## B

Srednja vrednost: 13.87

Varijansa: 3.784

Standardna devijacija: 1.95

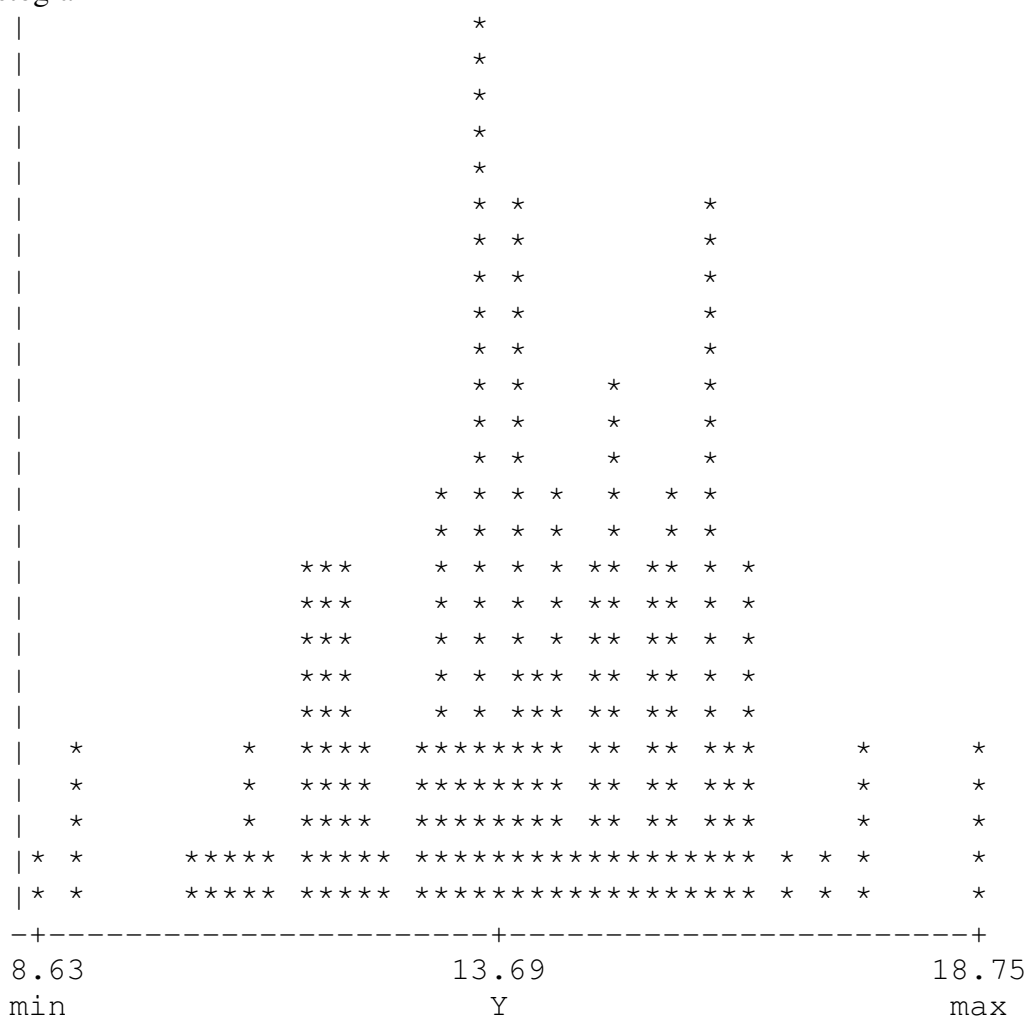
Koeficijent varijacije: 0.14

Koeficijent asimetrije: -0.21

Koeficijent spljoštenosti: 0.30

$\chi^2$  statistika: 1.1273 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



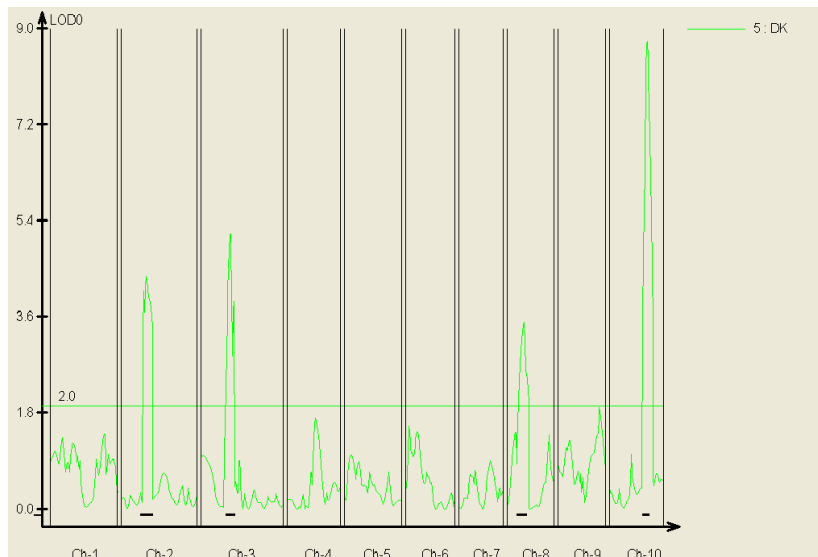
## 2. ANOVA

<b>A</b>			
<b>hromozom</b>	<b>marker</b>	<b>nivo značajnosti</b>	<b>pozicija na mapi (cM)</b>
1	csu31a	P<0.1	75.2
1	bcd1072	P<0.1	141.4
2	umc255	P<0.1	57.7
2	umc5	P<0.01	64.0
2	M542Ca	P<0.1	67.7
2	csu481	P<0.05	105.9
2	umc102	P<0.1	81.8
2	csu184	P<0.1	89.5
<b>B</b>			
<b>hromozom</b>	<b>marker</b>	<b>nivo značajnosti</b>	<b>pozicija na mapi (cM)</b>
1	bcd1072	P<0.05	141.4
2	UMC255	P<0.1	57.7
2	umc5	P<0.05	64.0
2	M54/2'Ca	P<0.1	67.7
2	csu481	P<0.05	105.9
3	umc102	P<0.05	81.8
3	CSU184	P<0.1	89.5
3	umc60a	P<0.1	133.9
4	umc169	P<0.1	135.5
5	RZ892	P<0.1	41.2
7	CSU81	P<0.1	23.6
8	CSU155	P<0.1	58.5
8	umc30	P<0.05	80.5
9	CSU36c	P<0.05	22.0
9	bnlg127	P<0.1	56.9
9	CSU68a	P<0.1	99.4
10	RZ740a	P<0.05	59.5
10	bnlg1074	P<0.1	82.5
10	M49/2C	P<0.1	88.7
10	bnl7.49	P<0.05	112.9

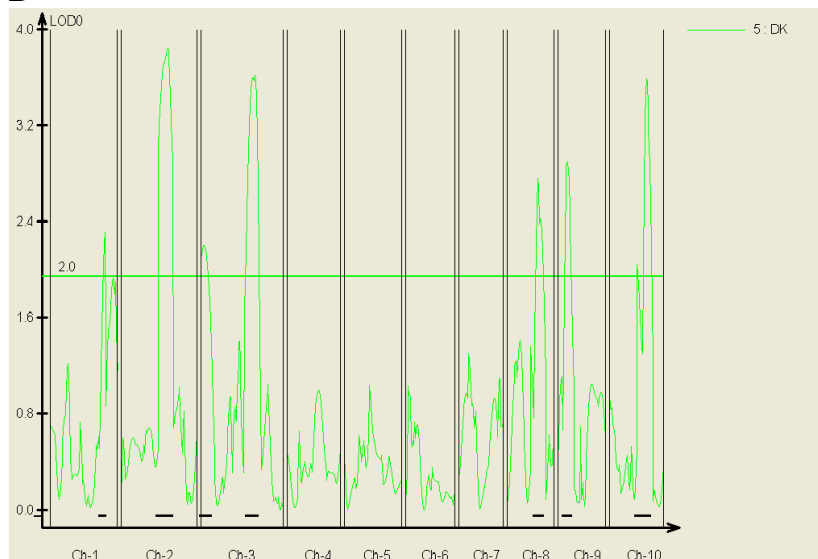
### 3. CIM

- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Puna linija zelene boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

**A**



**B**



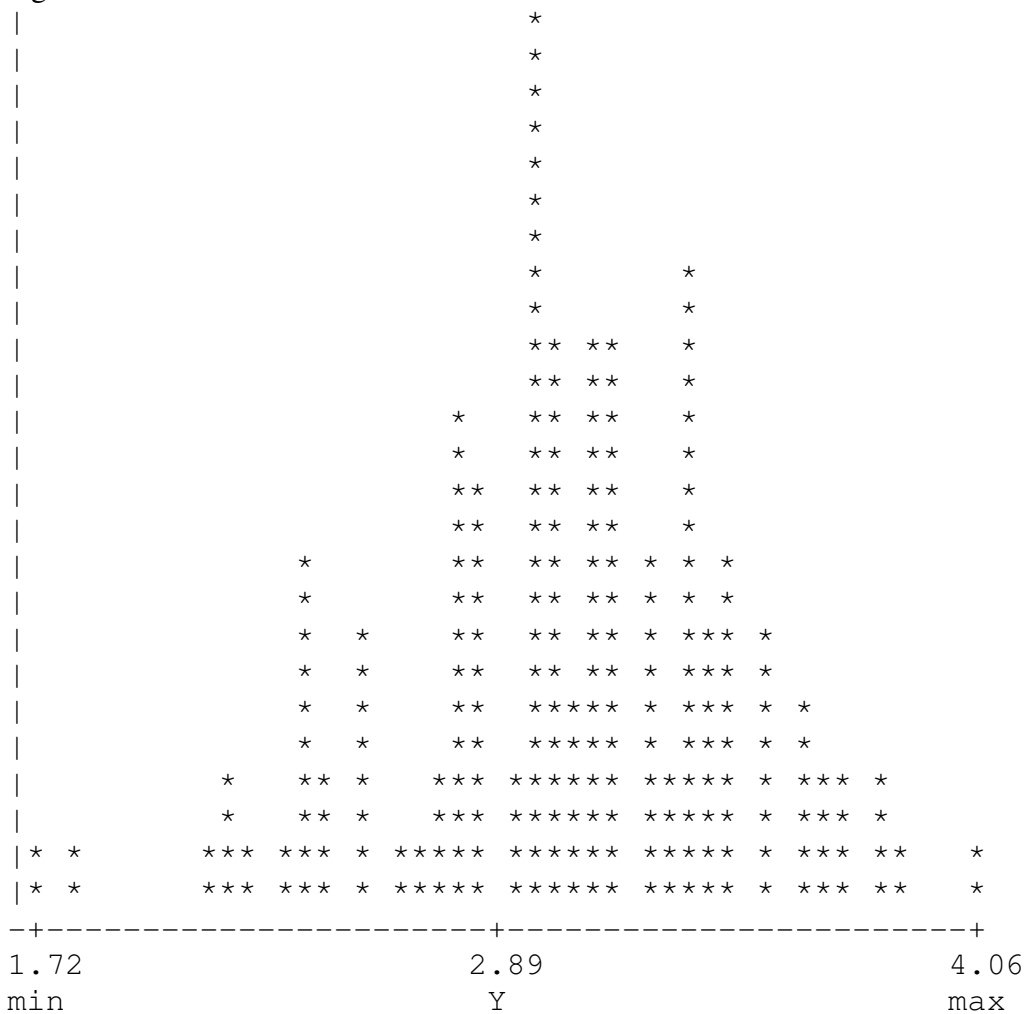
## DS2

### 1. DISTRIBUCIJA UČESTALOSTI

A

Srednja vrednost:	3.03
Varijansa:	0.177
Standardna devijacija	0.42
Koeficijent varijacije	0.14
Koeficijent asimetrije:	-0.44
Koeficijent spljoštenosti:	0.56
$\chi^2$ statistika: 5.2440	S (5: 5.99, 1: 9.21)

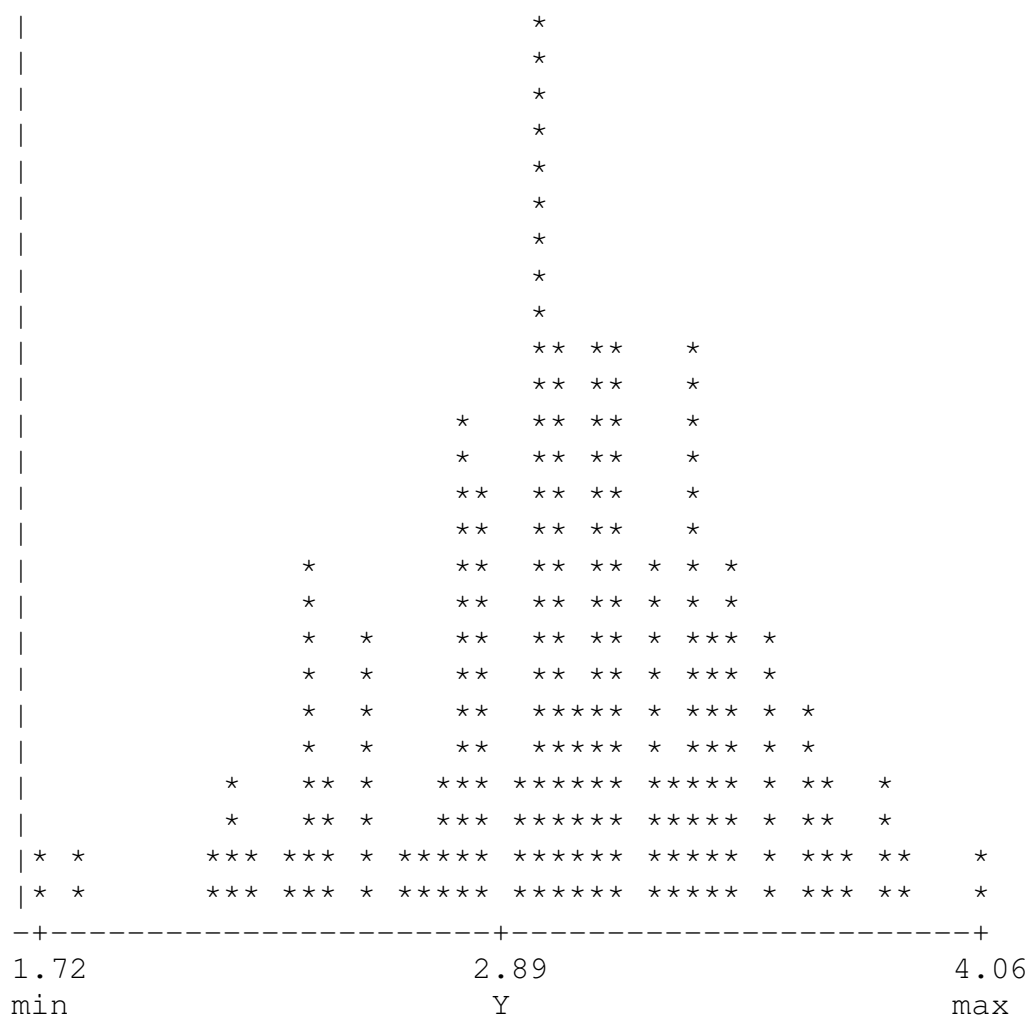
histogram



## B

Srednja vrednost: 3.03  
Varijansa: 0.176  
Standardna devijacija: 0.41  
Koeficijent varijacije: 0.14  
Koeficijent asimetrije: -0.43  
Koeficijent spljoštenosti: 0.59  
 $\chi^2$  statistika: 5.2648 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



## 2. ANOVA

<b>A</b>			
<b>hromozom</b>	<b>marker</b>	<b>nivo značajnosti</b>	<b>pozicija na mapi (cM)</b>
1	umc67	P<0.05	72.3
1	csu91	P<0.05	79.1
1	umc105b	P<0.05	81.5
1	psr128a	P<0.1	107.6
1	bcd1072	P<0.05	141.4
2	umc34	P<0.1	47.6
2	csu56c	P<0.1	53.2
2	csu46	P<0.05	55.7
2	bnlg108	P<0.1	78.7
2	csu481	P<0.1	105.9
3	umc1057	P<0.1	53.1
3	csu25a	P<0.05	210.7
4	rz630	P<0.05	28.5
4	rz143a	P<0.05	44.2
4	umc126b	P<0.1	61.1
4	csu39	P<0.05	105.7
5	psr129b	P<0.1	30.6
5	rz892	P<0.05	41.2
7	csu81	P<0.1	23.6
7	M542Cb	P<0.05	36.2
7	bnlg434	P<0.05	42.2
7	bnl16.06	P<0.05	98.0
8	csu155	P<0.001	58.5
10	csu36c	P<0.1	22.0
10	hhu504a	P<0.05	49.4
10	umc64	P<0.05	53.88
10	cdo456	P<0.05	56.6
10	rz740a	P<0.05	69.5
10	bnlg1074	P<0.01	82.5
10	M492C	P<0.01	88.7
10	umc44	P<0.01	97.8
10	sb134b	P<0.01	110.5
10	bnl7.49	P<0.01	112.9

**B**

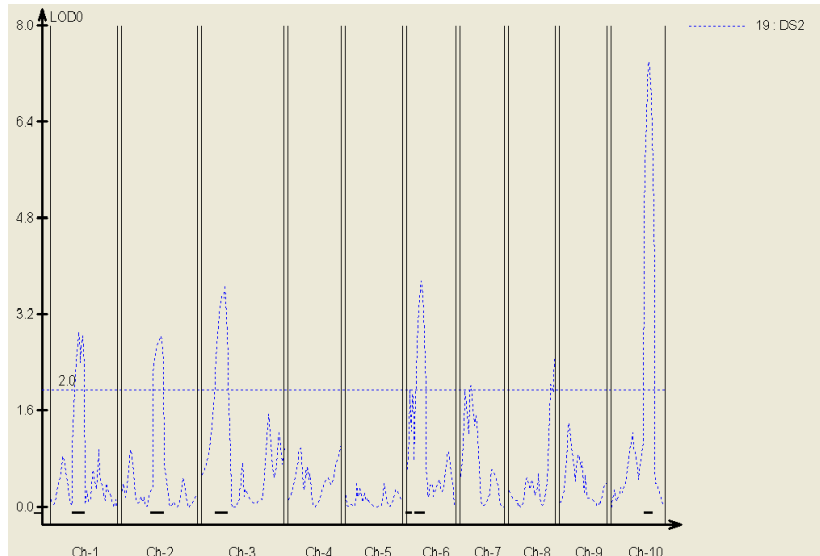
<b>hromozom</b>	<b>marker</b>	<b>nivo značajnosti</b>	<b>pozicija na mapi (cM)</b>
1	CSU206	P<0.05	69.0
1	umc67	P<0.05	72.3
1	csu31a	P<0.1	75.2
1	csu91	P<0.05	79.1
1	umc105b	P<0.05	81.5
1	psr128a	P<0.1	107.6
1	BCD1072	P<0.05	141.4
1	bnlg2331	P<0.1	169.1
2	CSU56c	P<0.1	53.2
2	csu46	P<0.1	55.7
2	csu481	P<0.1	105.9
3	umc1057	P<0.1	53.1
3	CSU16	P<0.1	56.9
3	CSU25a	P<0.05	210.7
4	RZ630	P<0.05	28.5
4	RGC390a	P<0.1	42.8
4	RZ143a	P<0.01	44.2
4	bnlg1741	P<0.1	49.8
4	CSU39	P<0.05	105.7
5	RZ892	P<0.05	41.2
6	PSR129b	P<0.1	30.6
6	SB851a	P<0.1	88.2
7	CSU81	P<0.1	23.6
7	M542Cb	P<0.05	36.2
7	bnlg434	P<0.01	42.2
7	bnl16.06	P<0.05	98.0
6	SB851b	P<0.1	88.2
8	CSU155	P<0.001	58.5
9	CSU36c	P<0.1	22.0
9	bnlg127	P<0.1	56.9
10	hhu504a	P<0.05	49.4
10	umc64	P<0.05	53.88
10	CDO456	P<0.05	56.6
10	RZ740a	P<0.01	69.5
10	bnlg1074	P<0.01	82.5
10	M492C	P<0.01	88.7
10	umc44	P<0.01	97.8
10	SB134b	P<0.01	110.5
10	bnl7.49	P<0.01	112.9
10	csu48	P<0.1	137.7



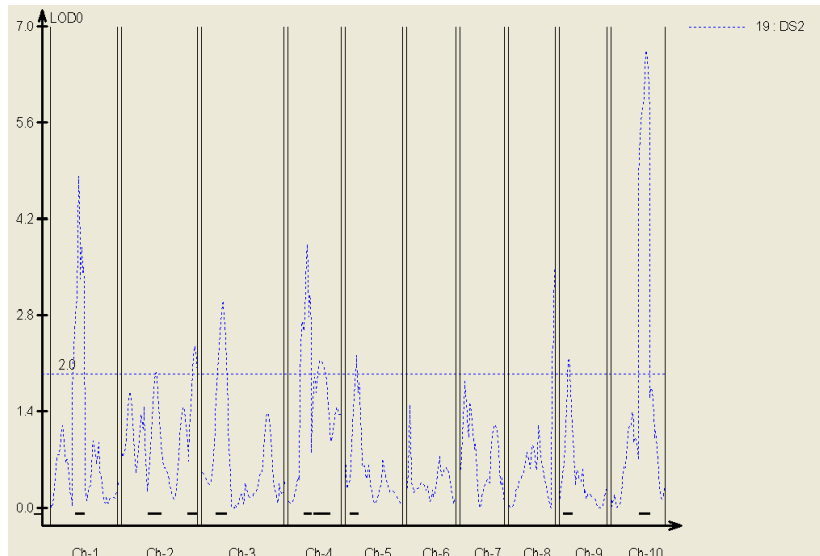
### 3. CIM

- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Tačkasta linija plave boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

**A**



**B**



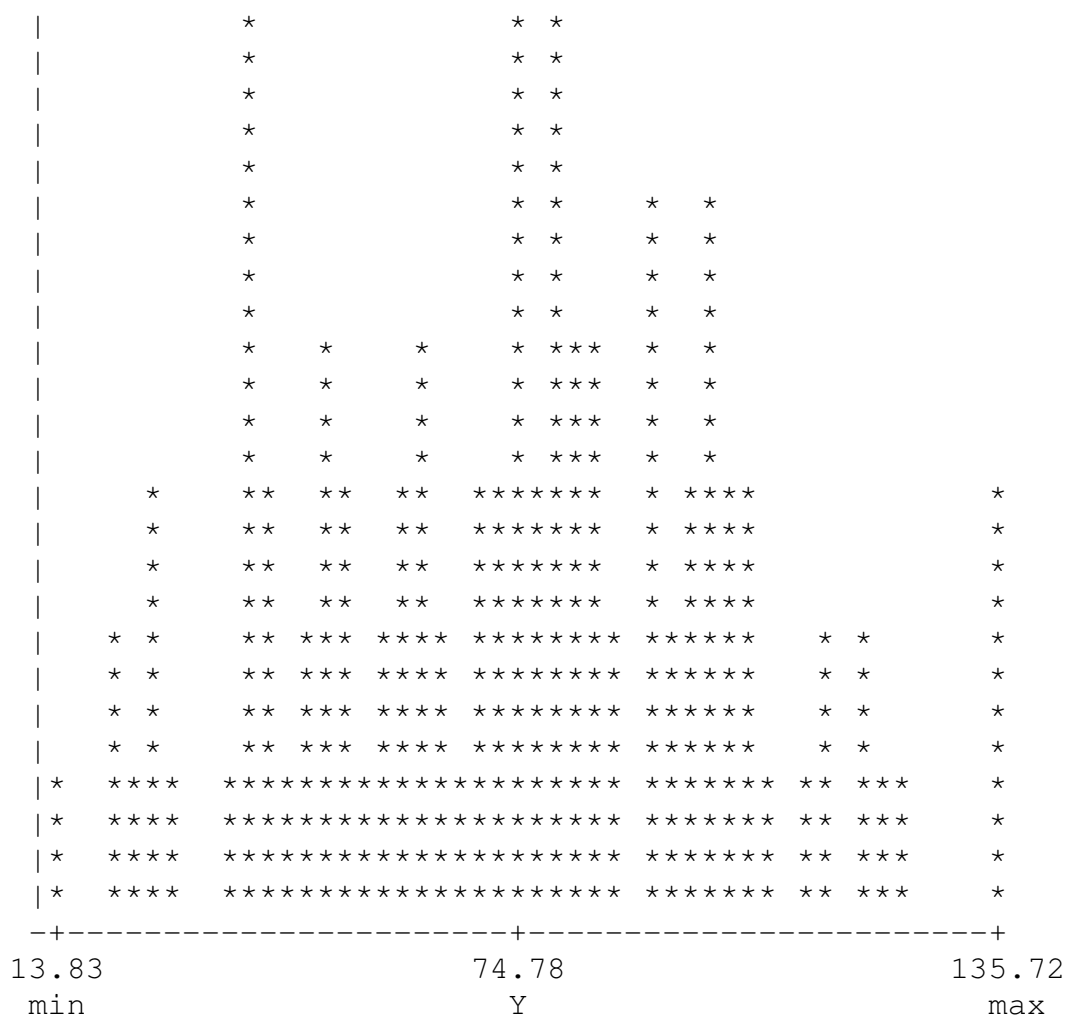
## PRILOG 2

### DISTRIBUCIJA UČESTALOSTI VREDNOSTI F<sub>3</sub> FAMILIJA ZA SVA ISPITIVANA SVOJSTVA

#### PRINOS - PR

koeficijent asimetrije: 0.0487  
 koeficijent spljoštenosti: -0.3366  
 $\chi^2$  statistika: 0.5321 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

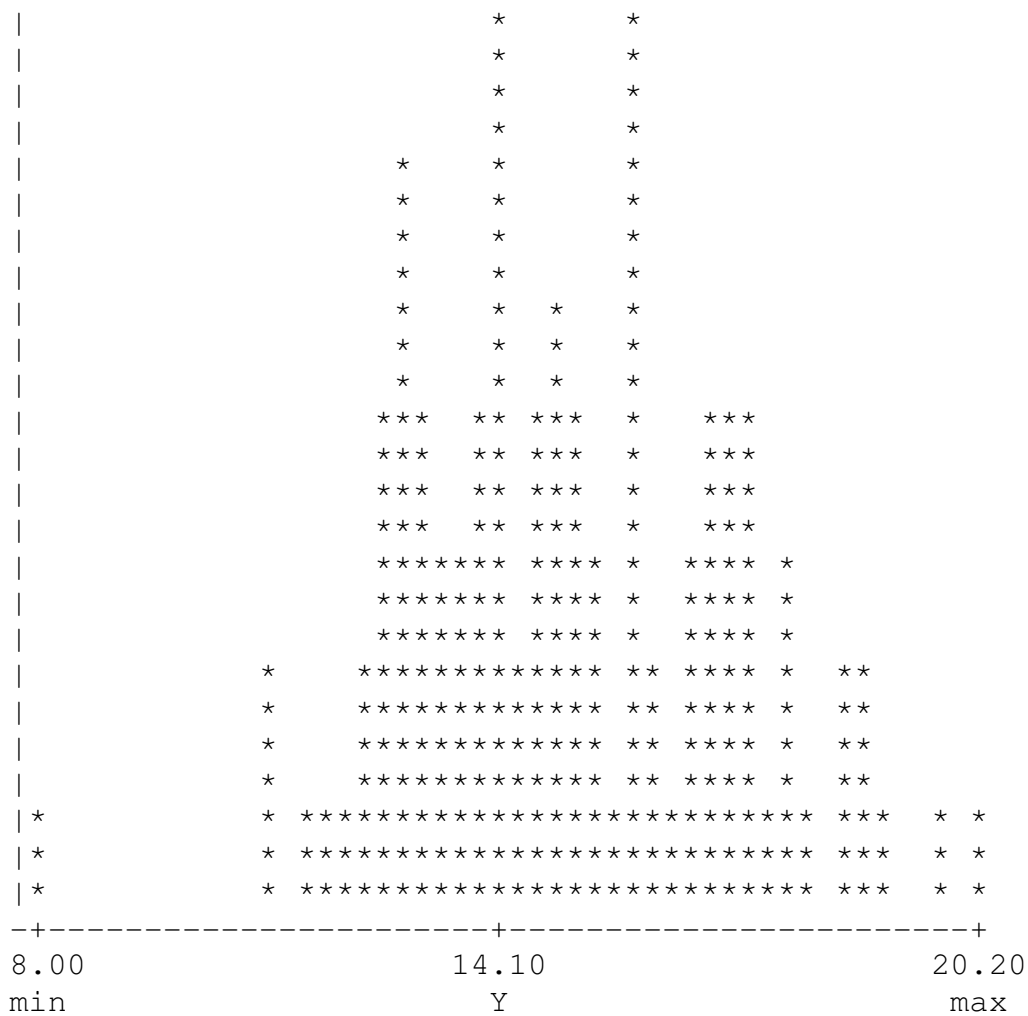
histogram



# BROJ REDOVA – BR

koeficijent asimetrije: -0.0084  
 koeficijent spljoštenosti: 0.3083  
 $\chi^2$  statistika: 0.3774 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

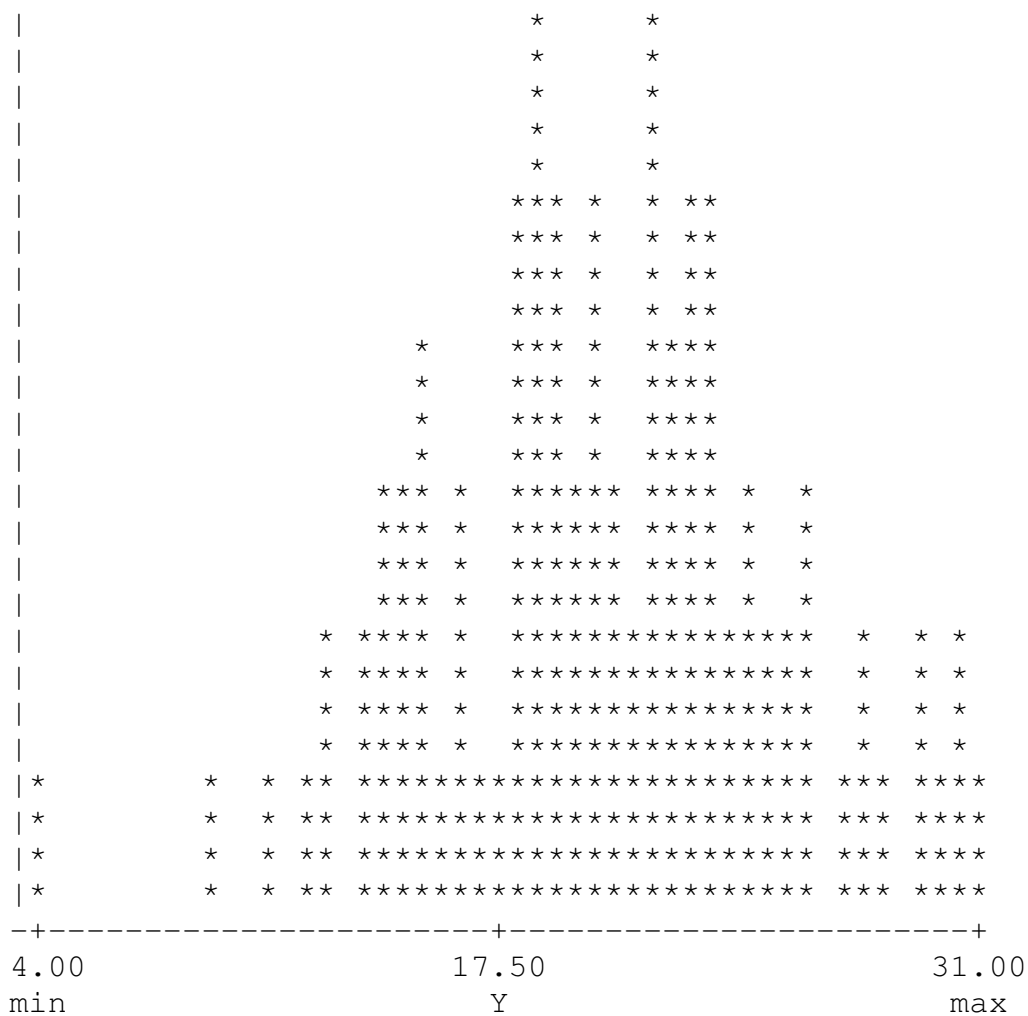
histogram



# BROJ ZRNA - BZ

koeficijent asimetrije: -0.1939  
 koeficijent spljoštenosti: 0.4387  
 $\chi^2$  statistika: 1.3569 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

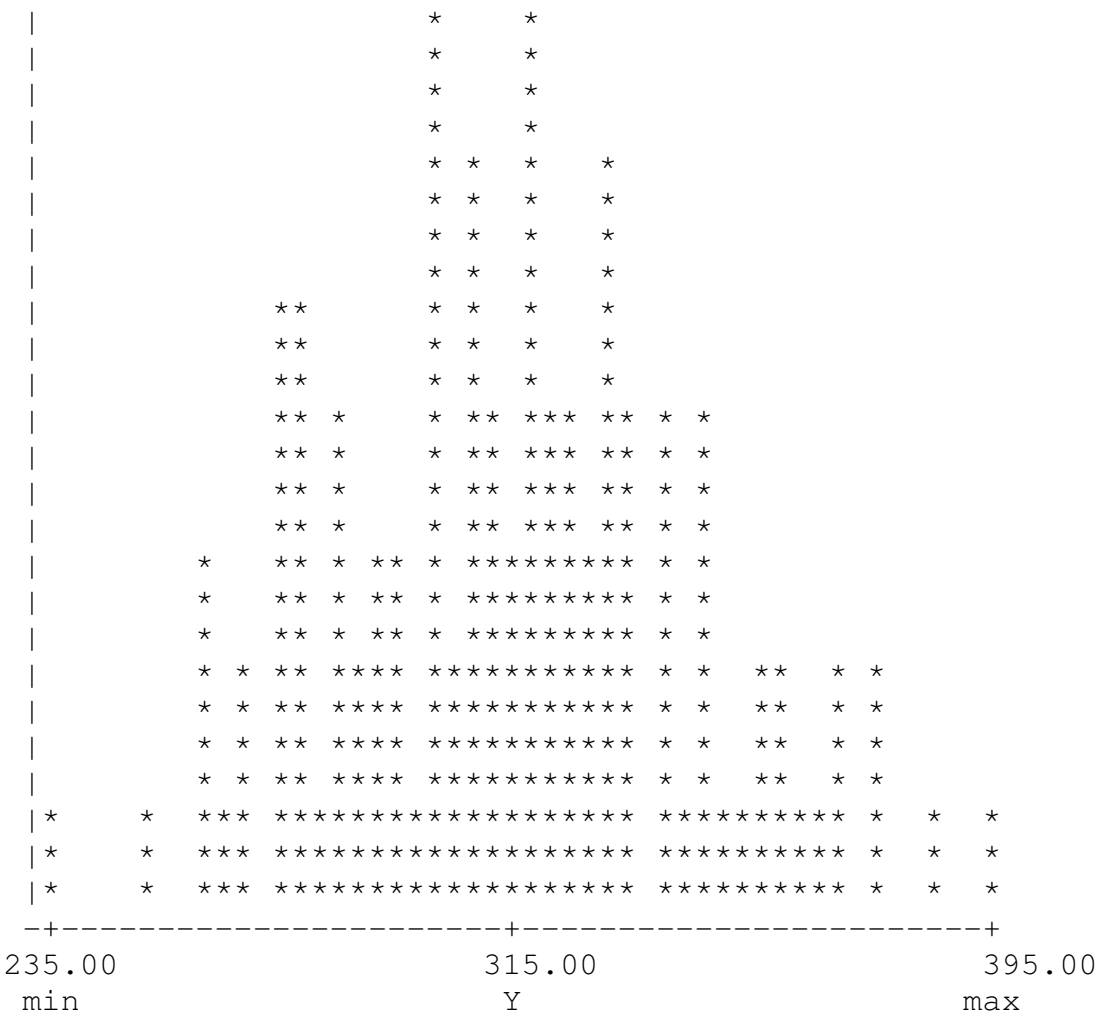
histogram



MASA ZRNA - MZ

koeficijent asimetrije: 0.1841  
koeficijent spljoštenosti: -0.0589  
 $\chi^2$  statistika: 0.6081 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

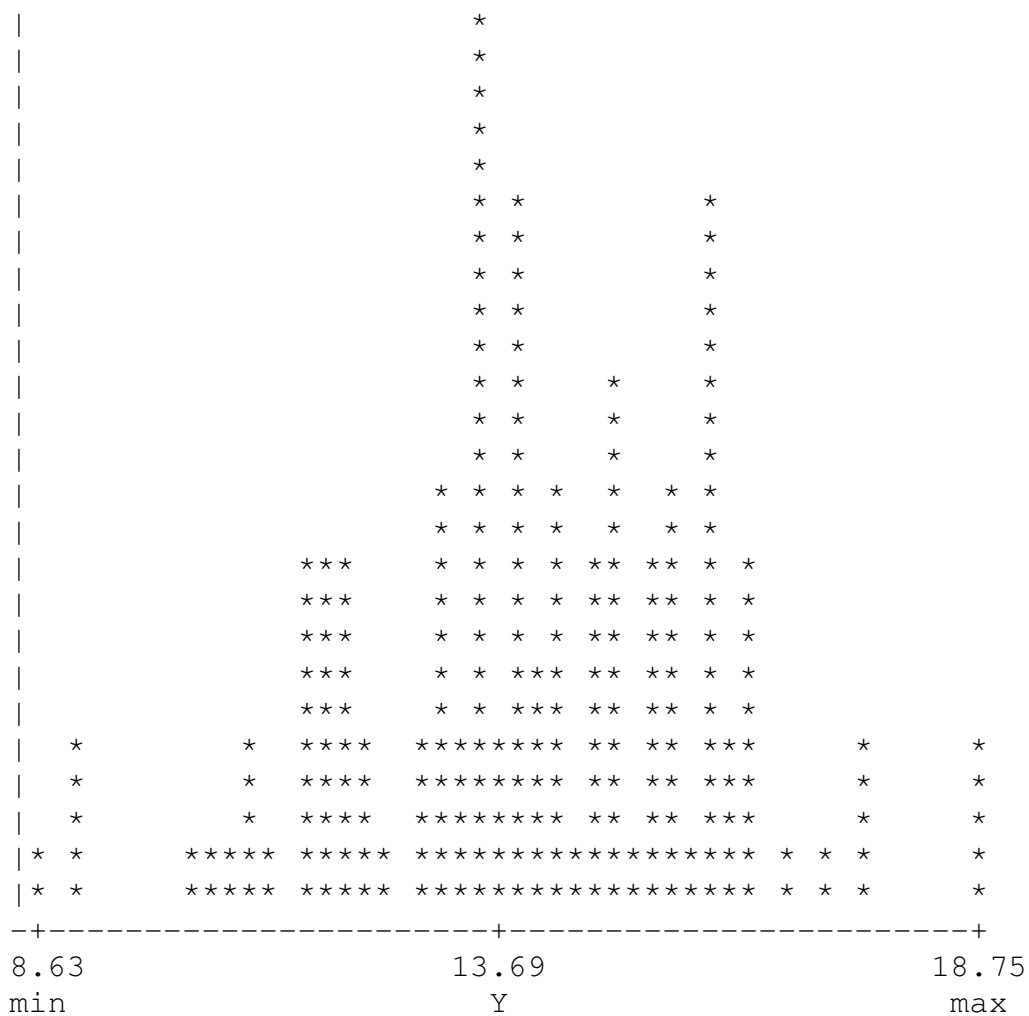
histogram



# DUŽINA KLIPA - DK

koeficijent asimetrije: -0.2063  
 koeficijent spljoštenosti: 0.3041  
 $\chi^2$  statistika: 1.1273 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

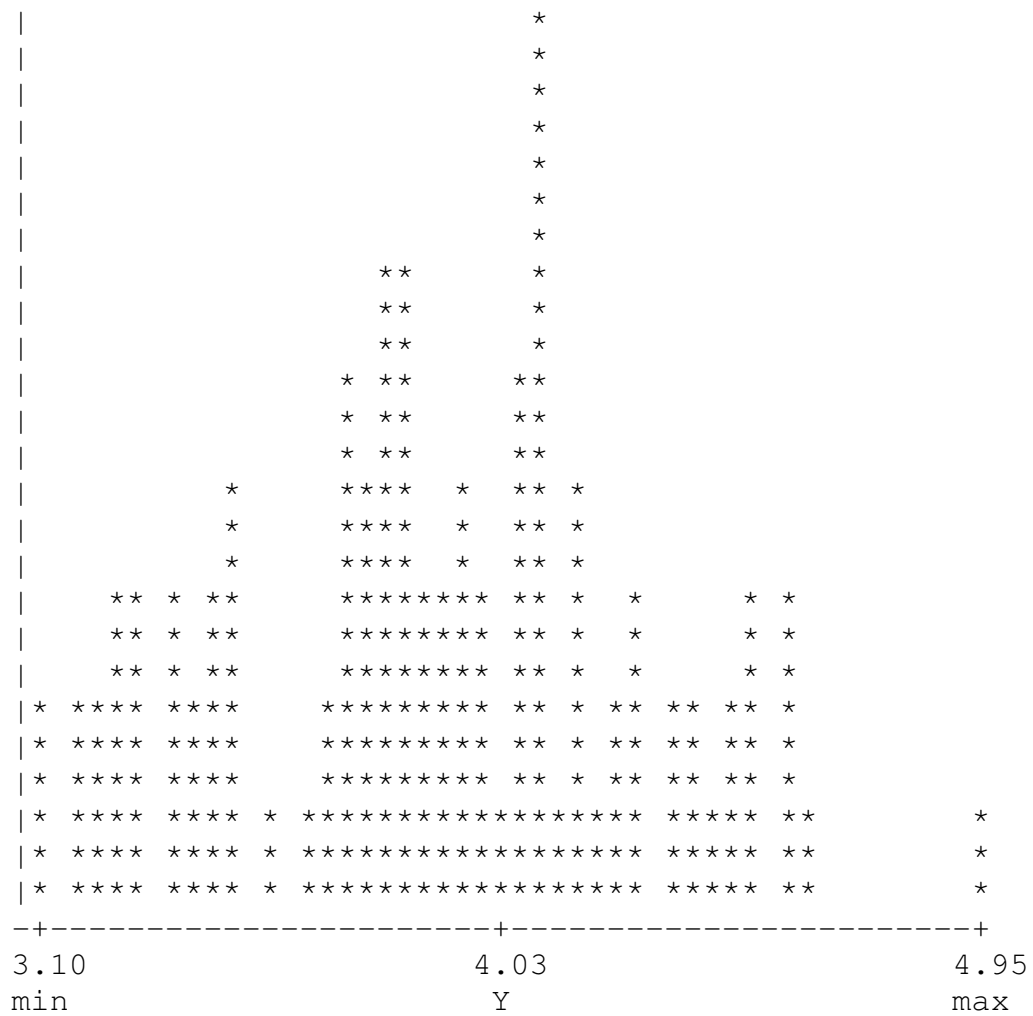
histogram



# PREČNIK KLIPA - PK

koeficijent asimetrije: 0.0654  
 koeficijent spljoštenosti: -0.3606  
 $\chi^2$  statistika: 0.6255 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

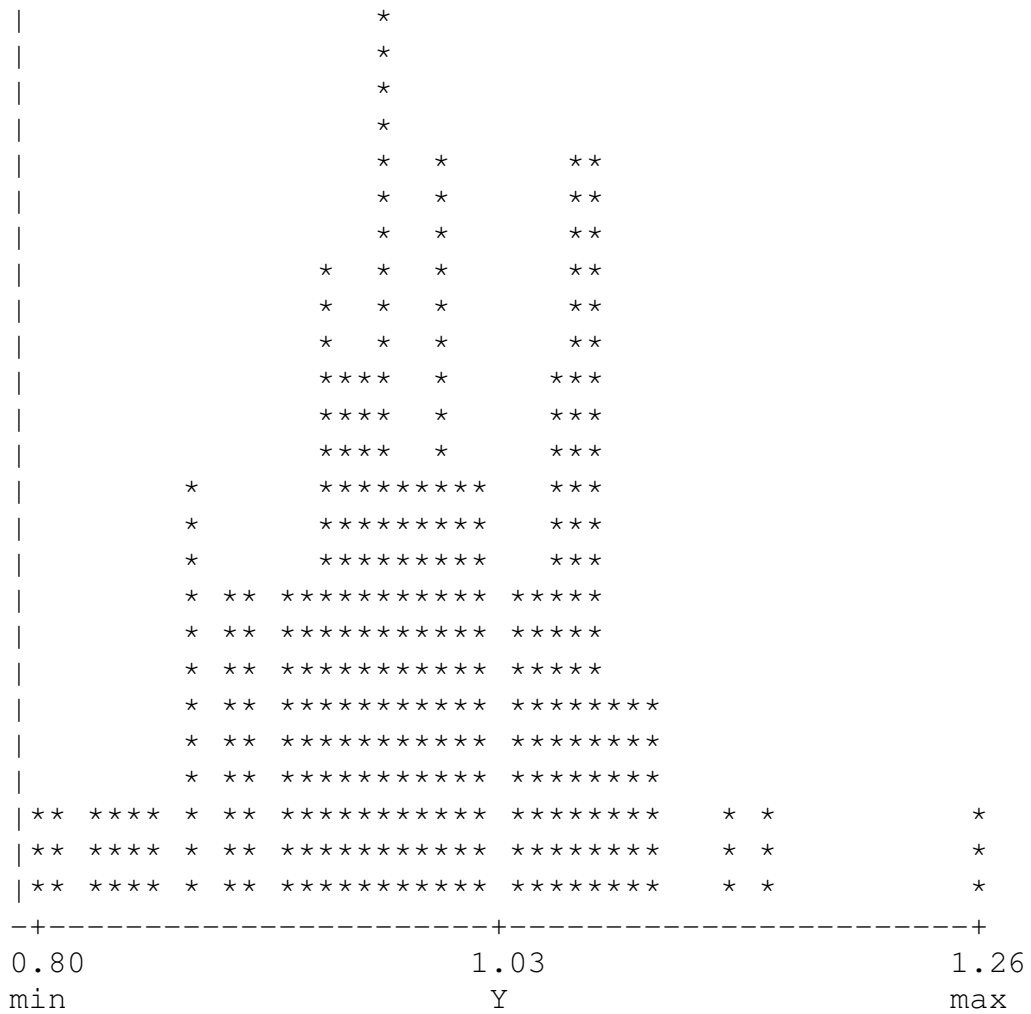
histogram



# DUŽINA ZRNA - DUZ

koeficijent asimetrije: 0.1151  
 koeficijent spljoštenosti: 0.9048  
 $\chi^2$  statistika: 3.7411 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram

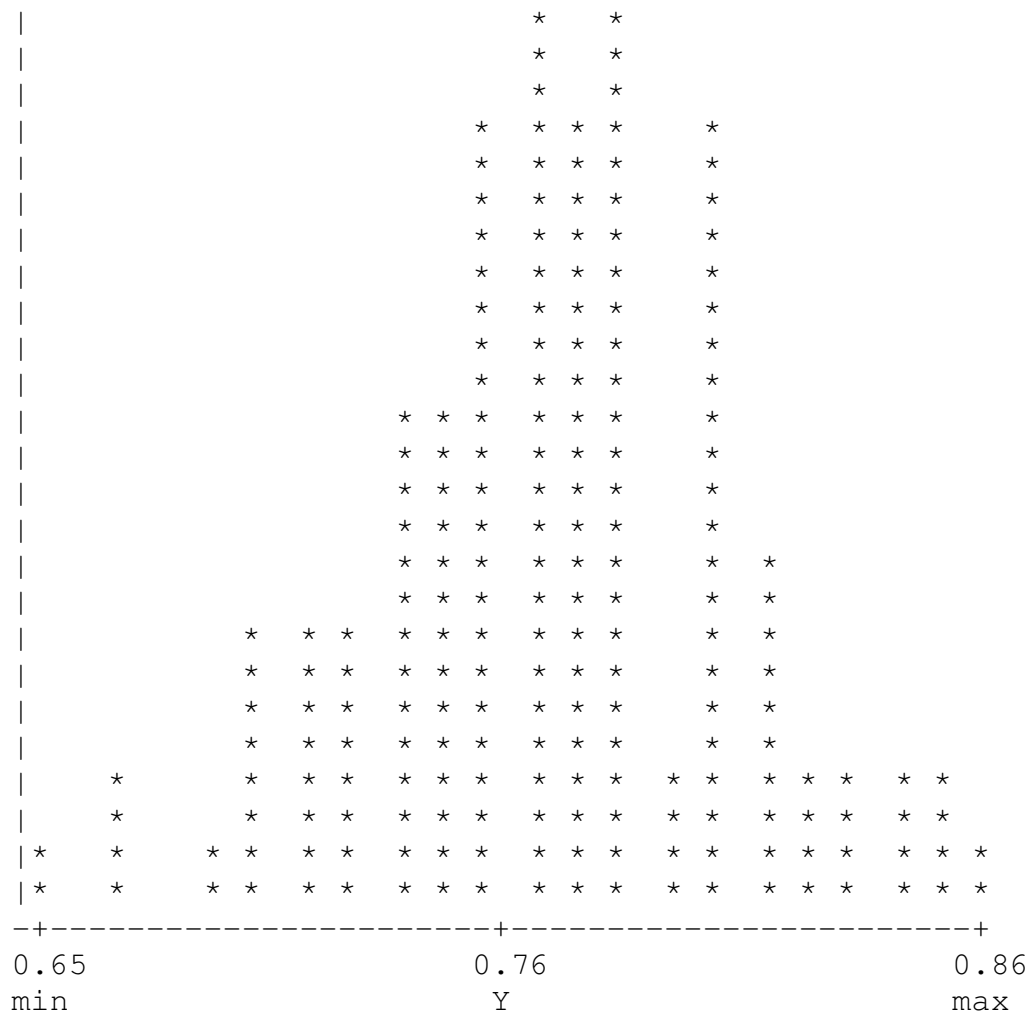




# ŠIRINA ZRNA - ŠZ

koeficijent asimetrije: -0.1162  
 koeficijent spljoštenosti: 0.2875  
 $\chi^2$  statistika: 0.5866 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

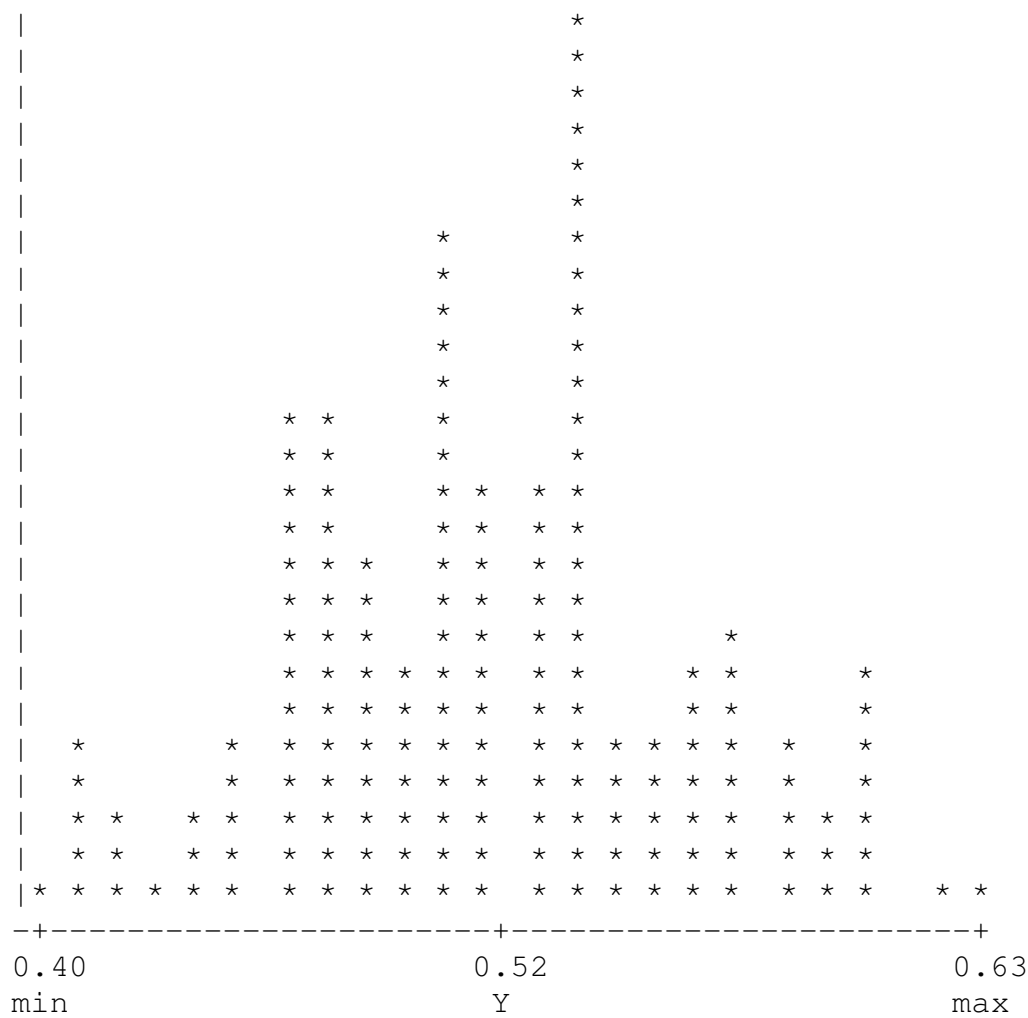
histogram



DEBLJINA ZRNA - DEZ

koeficijent asimetrije: 0.0877  
koeficijent spljoštenosti: -0.2312  
 $\chi^2$  statistika: 0.3615 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

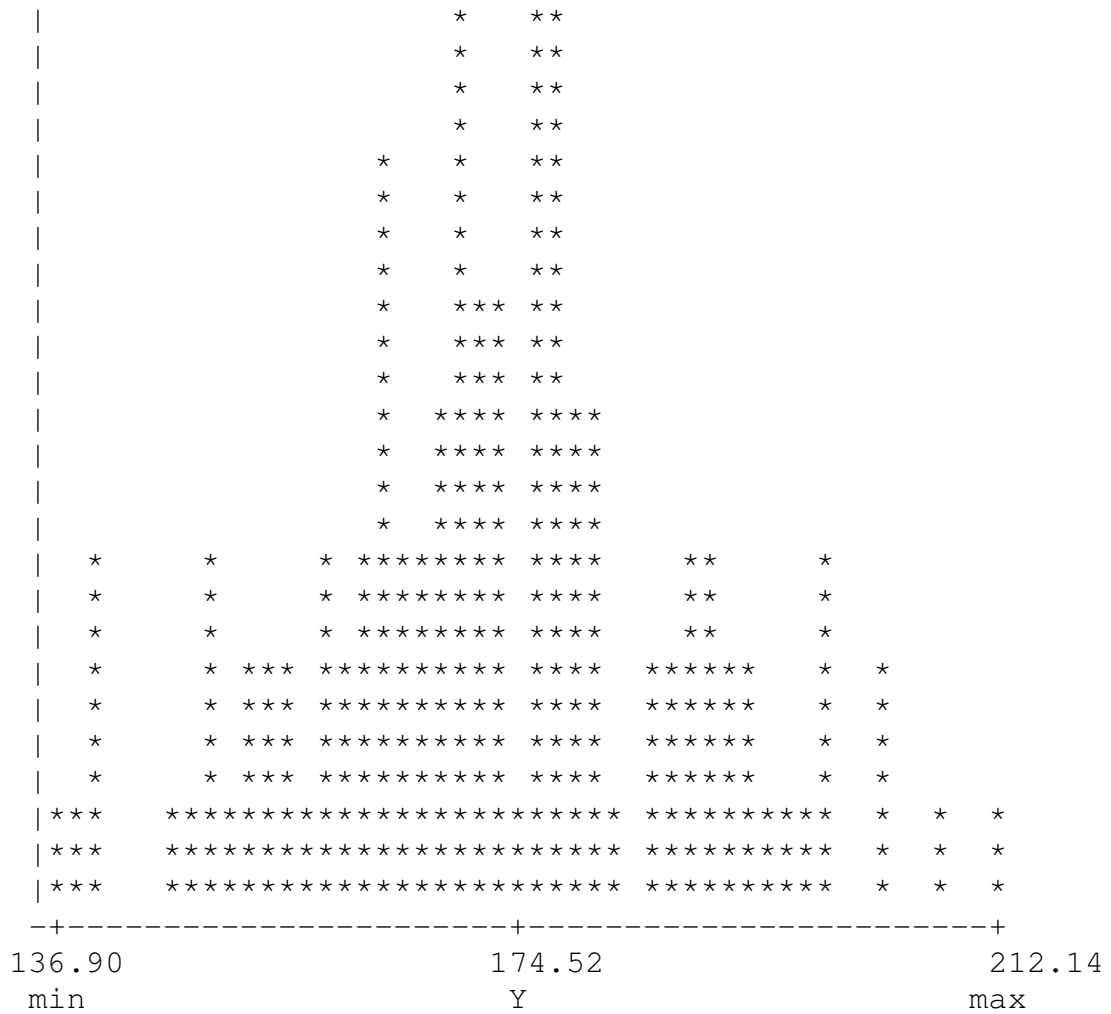
histogram



# VISINA BILJKE -VB

koeficijent asimetrije: 0.0531  
 koeficijent spljoštenosti: 0.0077  
 $\chi^2$  statistika: 0.0505 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

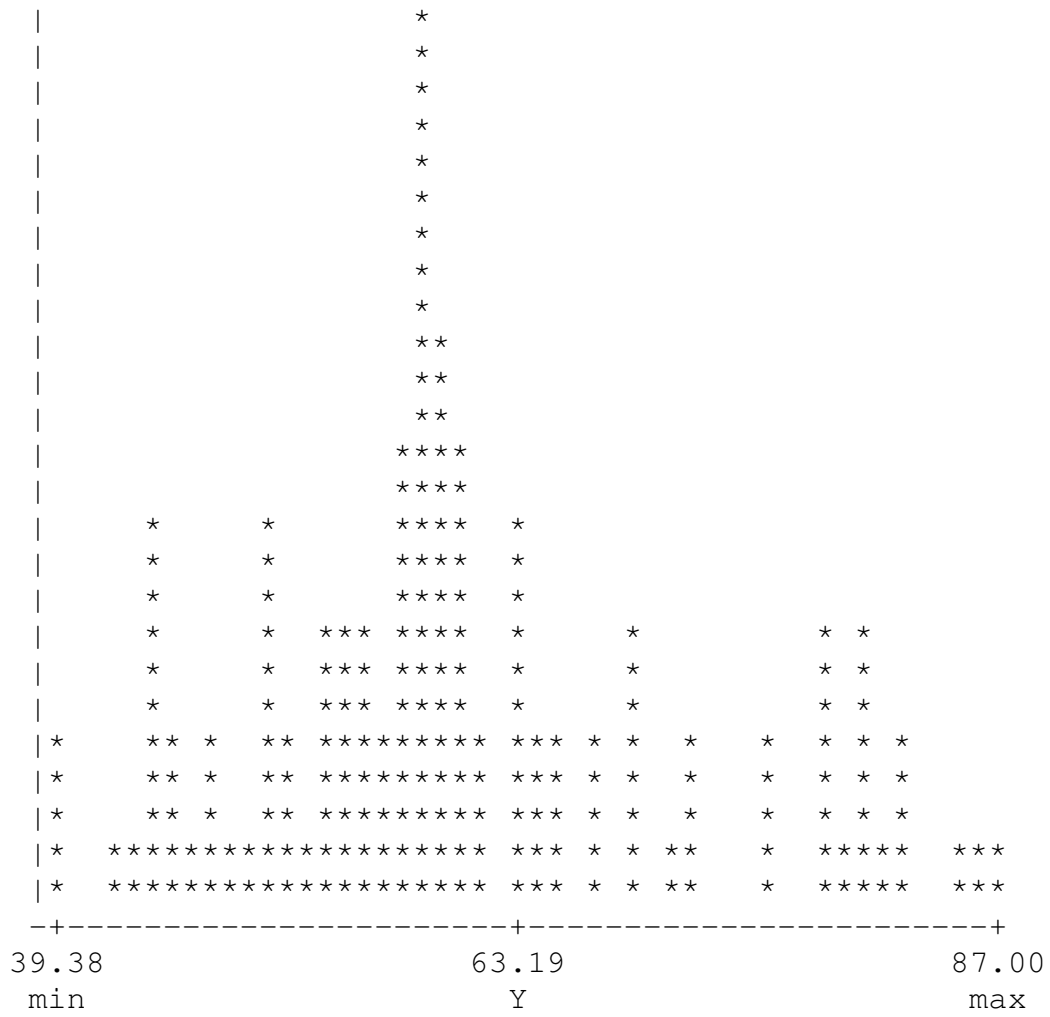
histogram



# VISINA DO KLIPA -VK

koeficijent asimetrije: 0.5690  
 koeficijent spljoštenosti: -0.1471  
 $\chi^2$  statistika: 4.9929 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

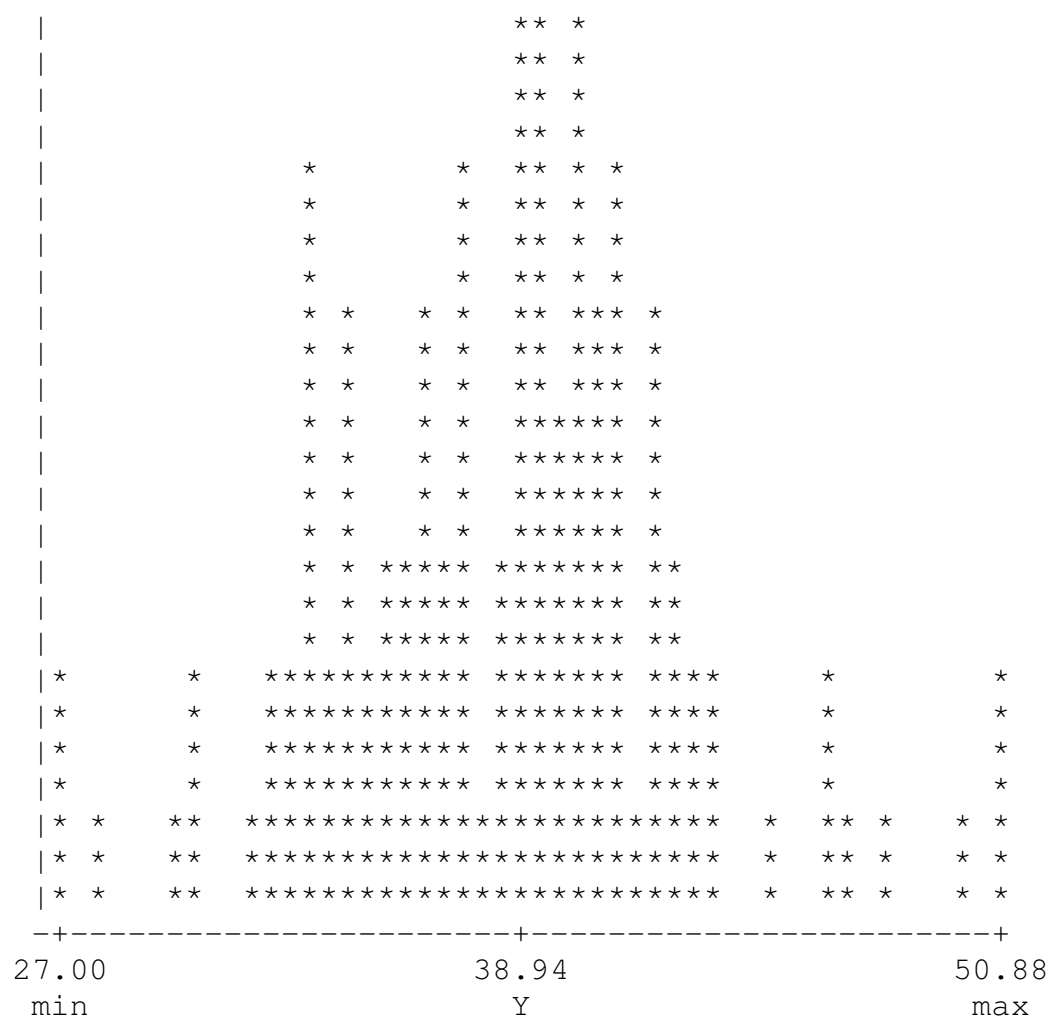
histogram



# DUŽINA METLICE - DM

koeficijent asimetrije: 0.1876  
 koeficijent spljoštenosti: 0.8065  
 $\chi^2$  statistika: 3.5276 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

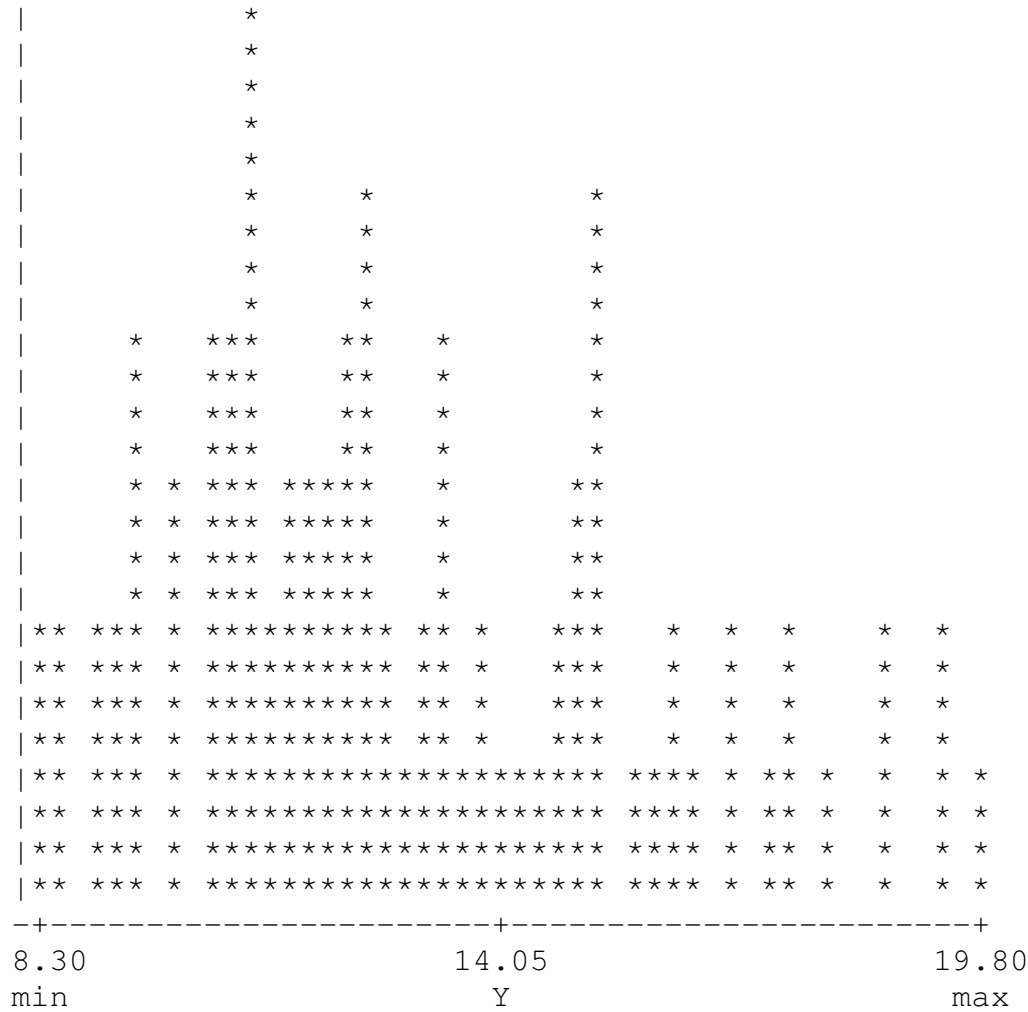
histogram



**BROJ GRANA METLICE - BGM**

koeficijent asimetrije: 0.6006  
koeficijent spljoštenosti: -0.2415  
 $\chi^2$  statistika: 5.6286 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

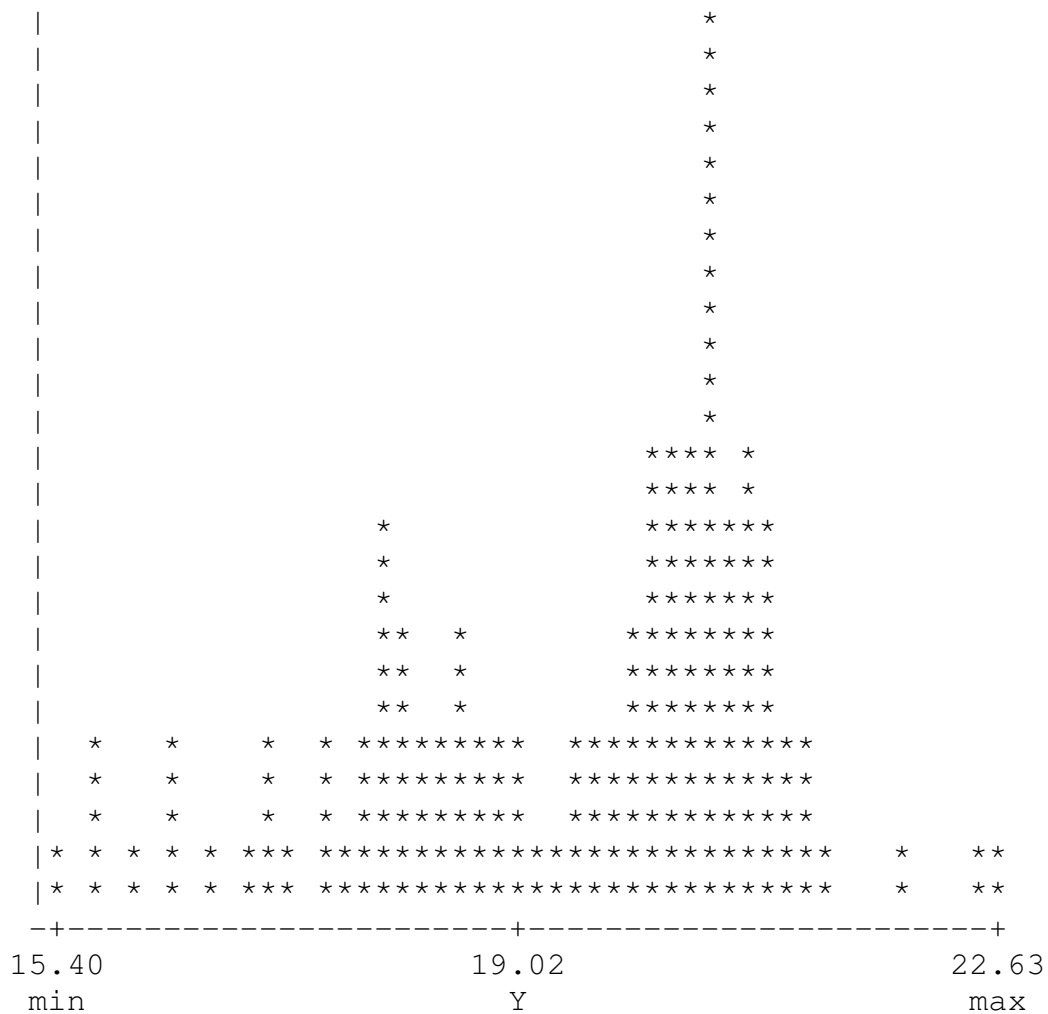
histogram



# BROJ LISTOVA - BL

koeficijent asimetrije: -0.5767  
 koeficijent spljoštenosti: -0.0849  
 $\chi^2$  statistika: 5.1280 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

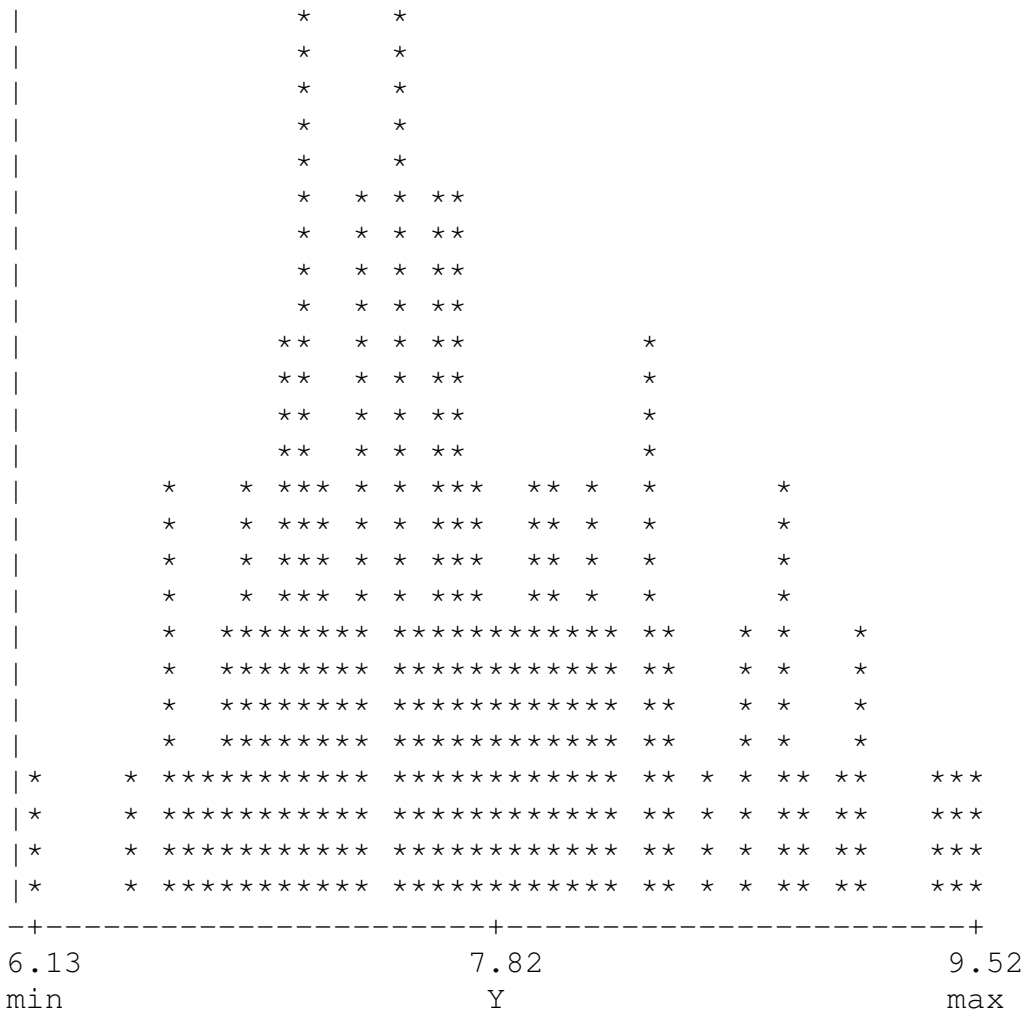
histogram



### ŠIRINA TREĆEG LISTA - ŠL3

koeficijent asimetrije: 0.5310  
 koeficijent spljoštenosti: -0.0075  
 $\chi^2$  statistika: 4.2771 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram

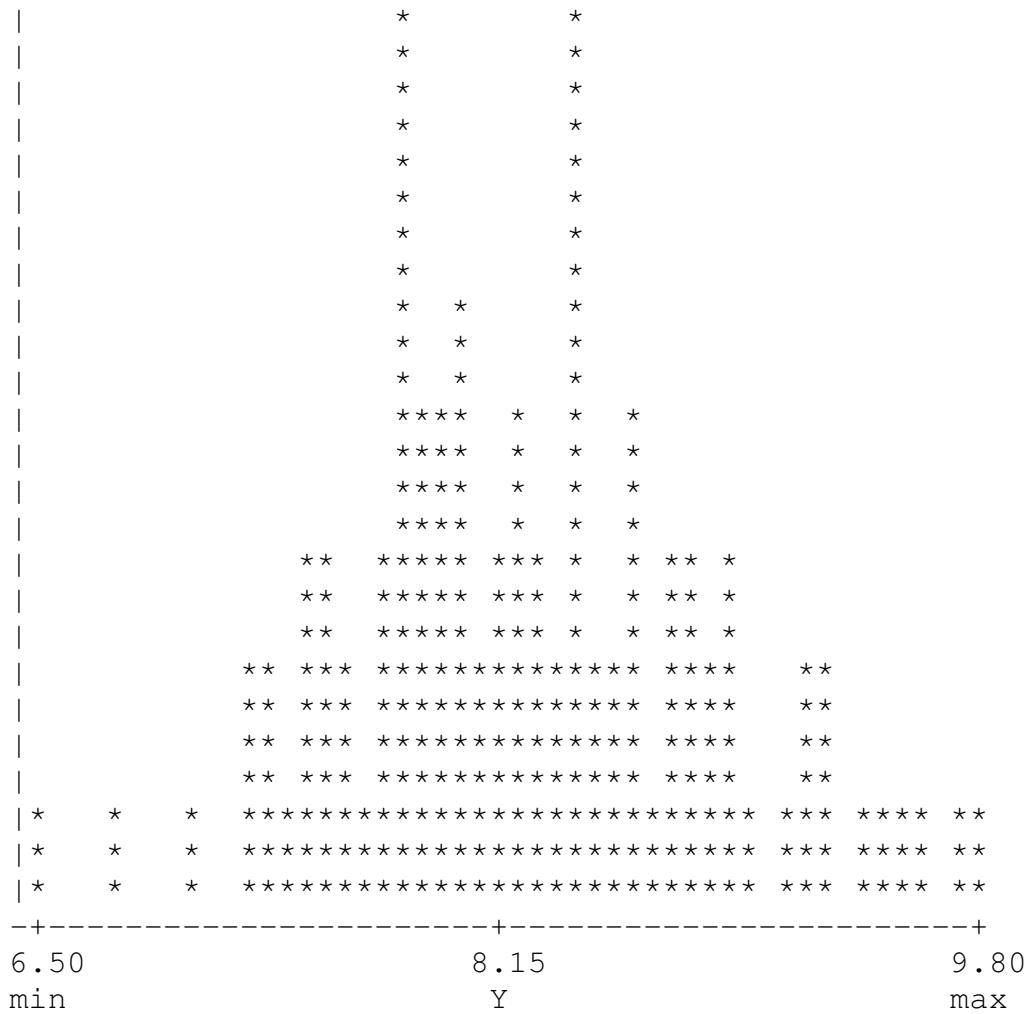




# ŠIRINA ČETVRTOG LISTA - ŠL4

koeficijent asimetrije: 0.1978  
 koeficijent spljoštenosti: 0.0556  
 $\chi^2$  statistika: 0.6187 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

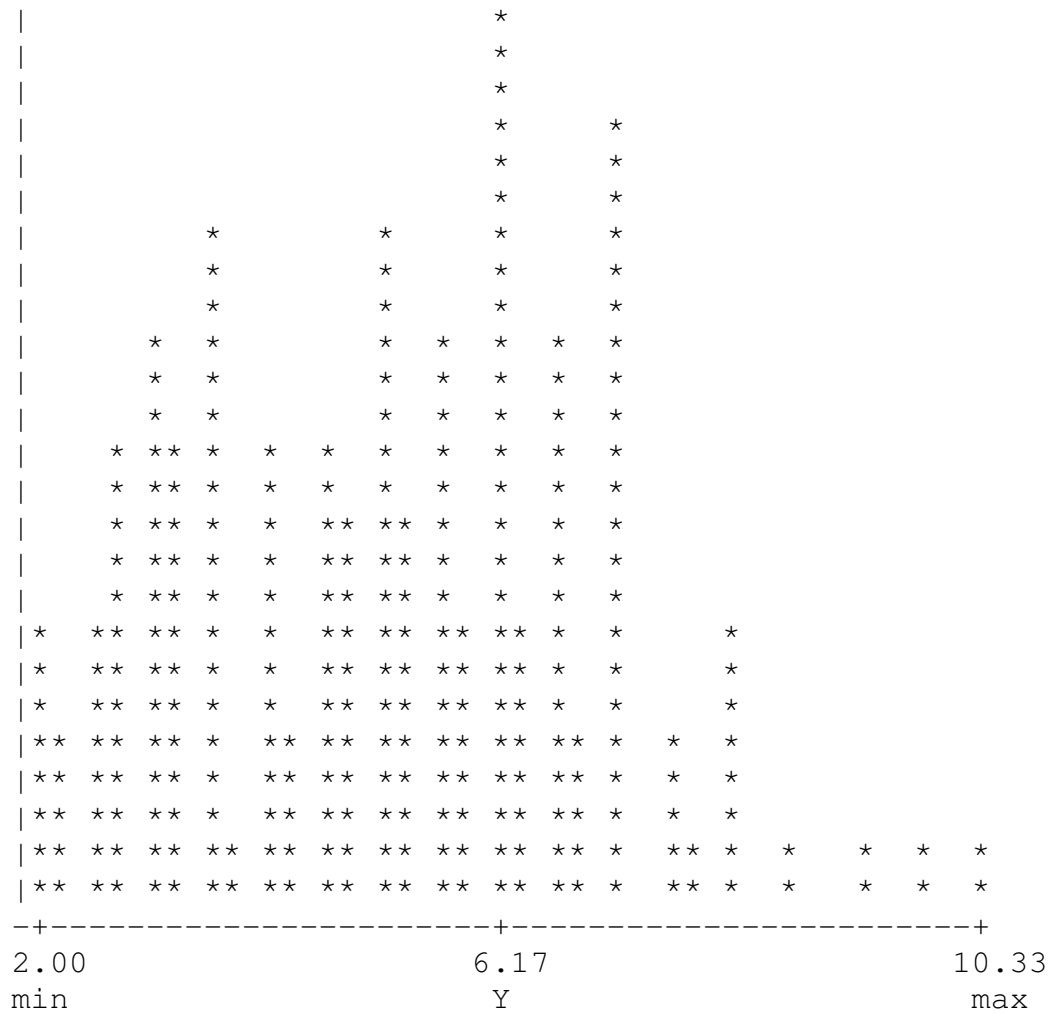
histogram



# PERIOD IZMEĐU METLIČENJA I SVILANJA - ASI

koeficijent asimetrije: 0.3646  
 koeficijent spljoštenosti: -0.1496  
 $\chi^2$  statistika: 2.4468 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

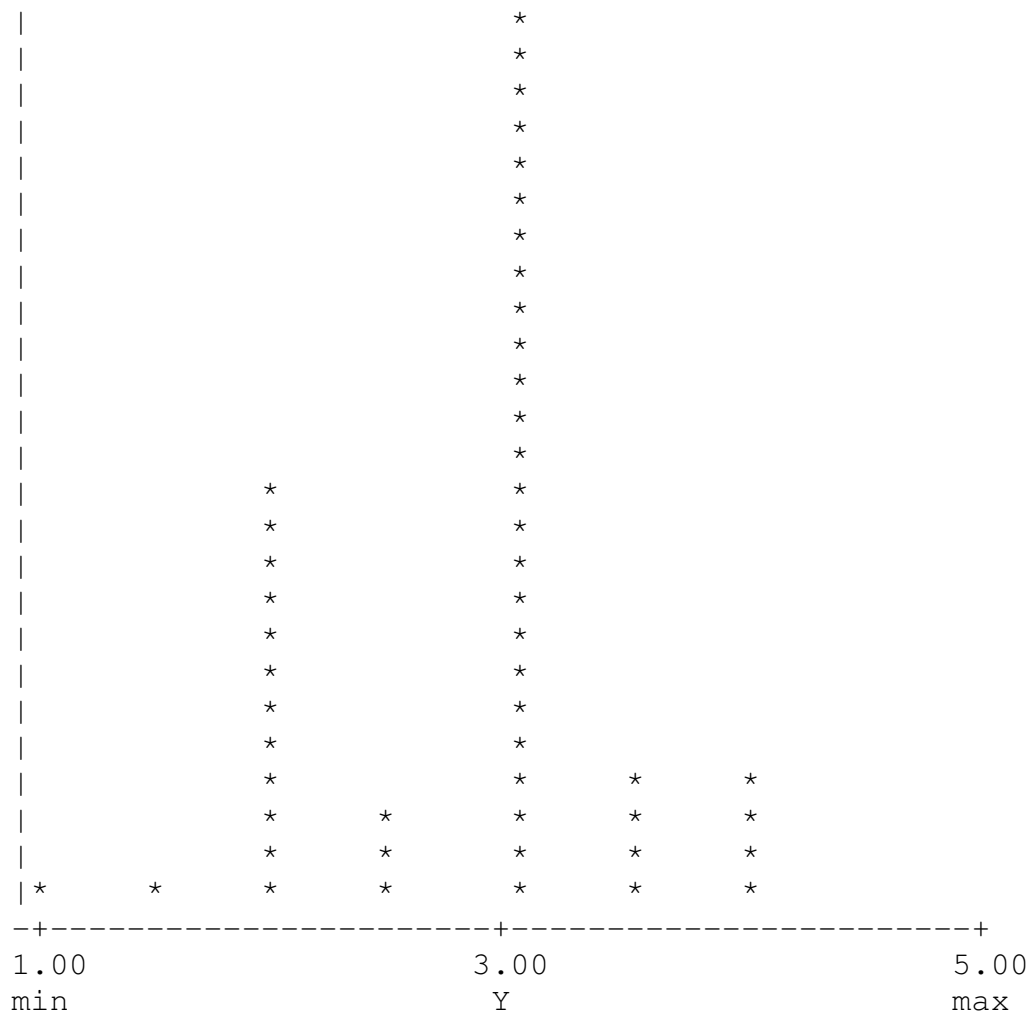
histogram



### OCENA ODGOVORA NA SUŠU - DS1

koeficijent asimetrije: -0.1775  
koeficijent spljoštenosti: 0.3508  
 $\chi^2$  statistika: 1.1831 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

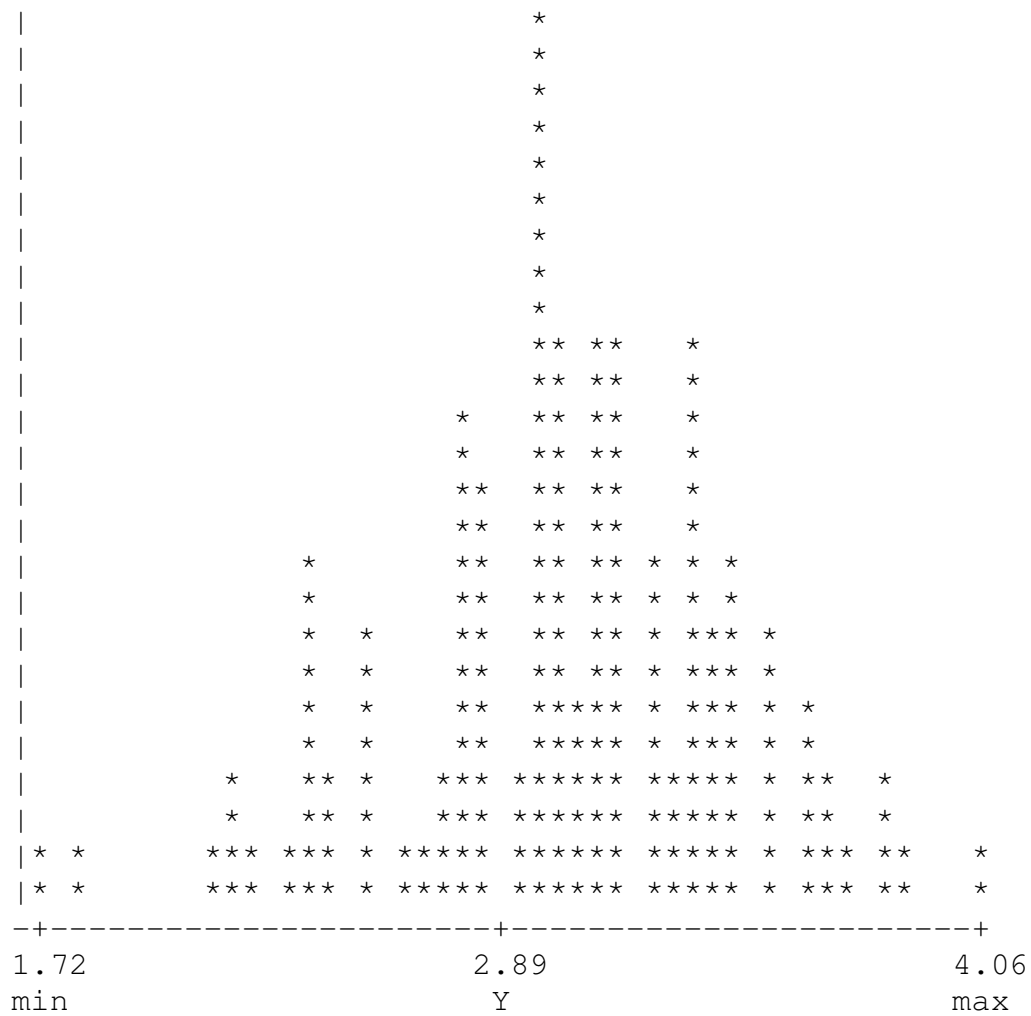
histogram



## OCENA ODGOVORA NA SUŠU - DS2

koeficijent asimetrije: -0.4329  
koeficijent spljoštenosti: 0.5990  
 $\chi^2$  statistika: 5.2648 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

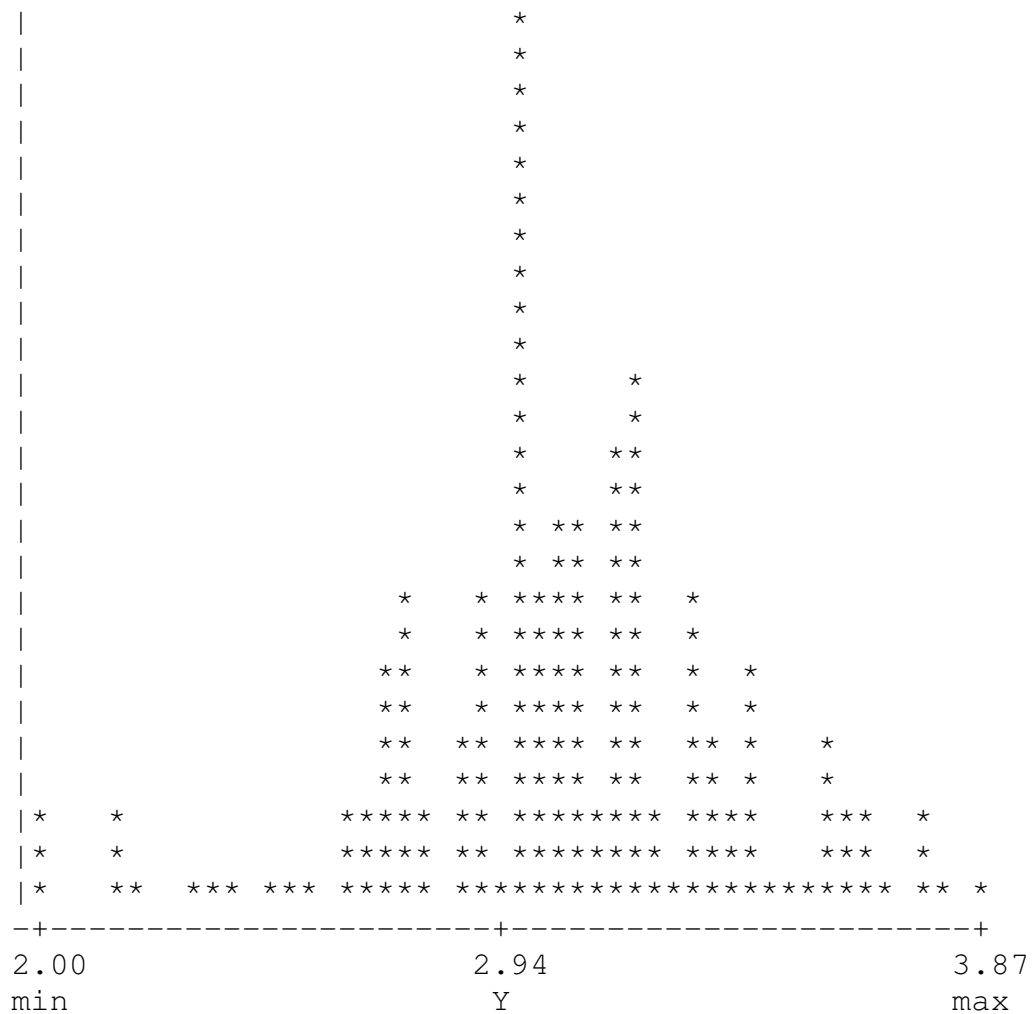
histogram



### OCENA ODGOVORA NA SUŠU - DS3

koeficijent asimetrije: -0.3822  
 koeficijent spljoštenosti: 0.5514  
 $\chi^2$  statistika: 4.2202 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

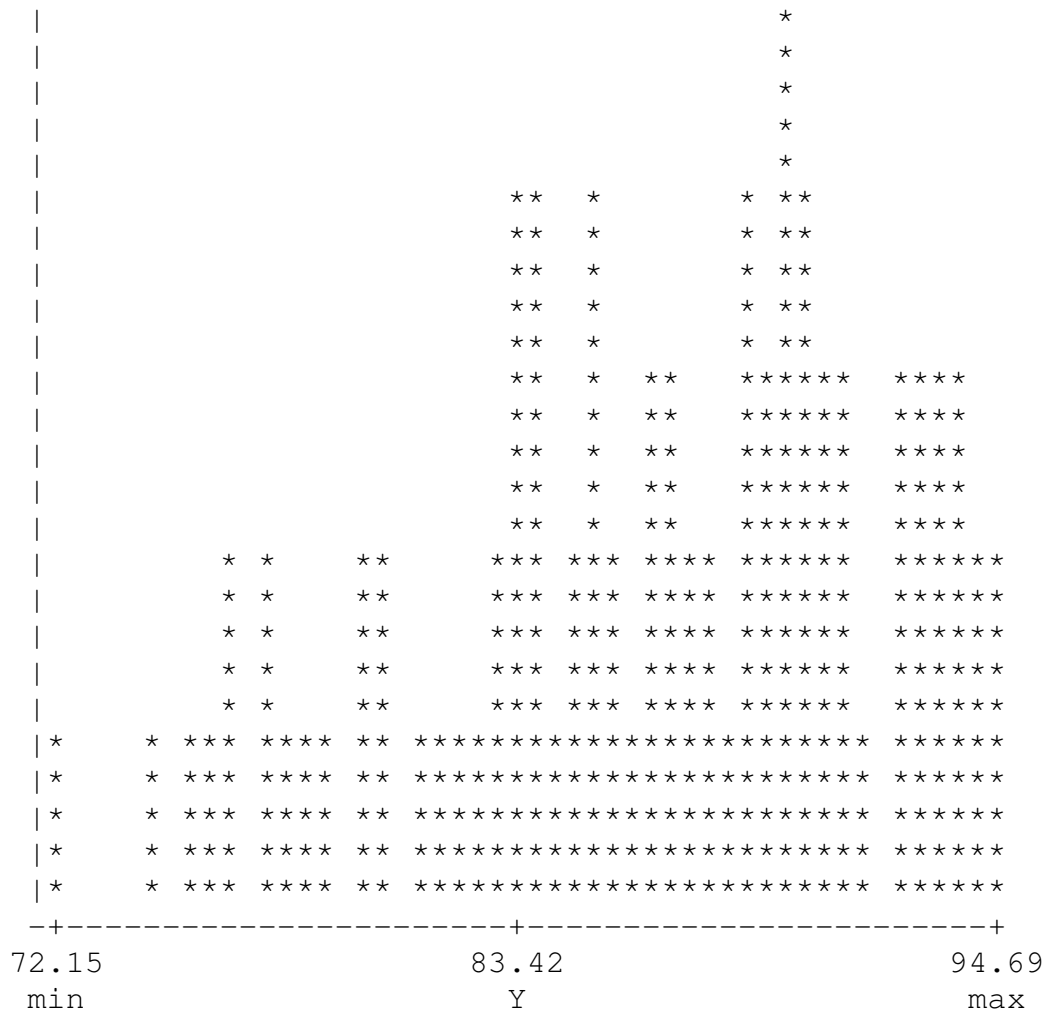
histogram



# RELATIVNI SADRŽAJ VODE - RSV1

koeficijent asimetrije: -0.5246  
 koeficijent spljoštenosti: -0.3479  
 $\chi^2$  statistika: 4.5308 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

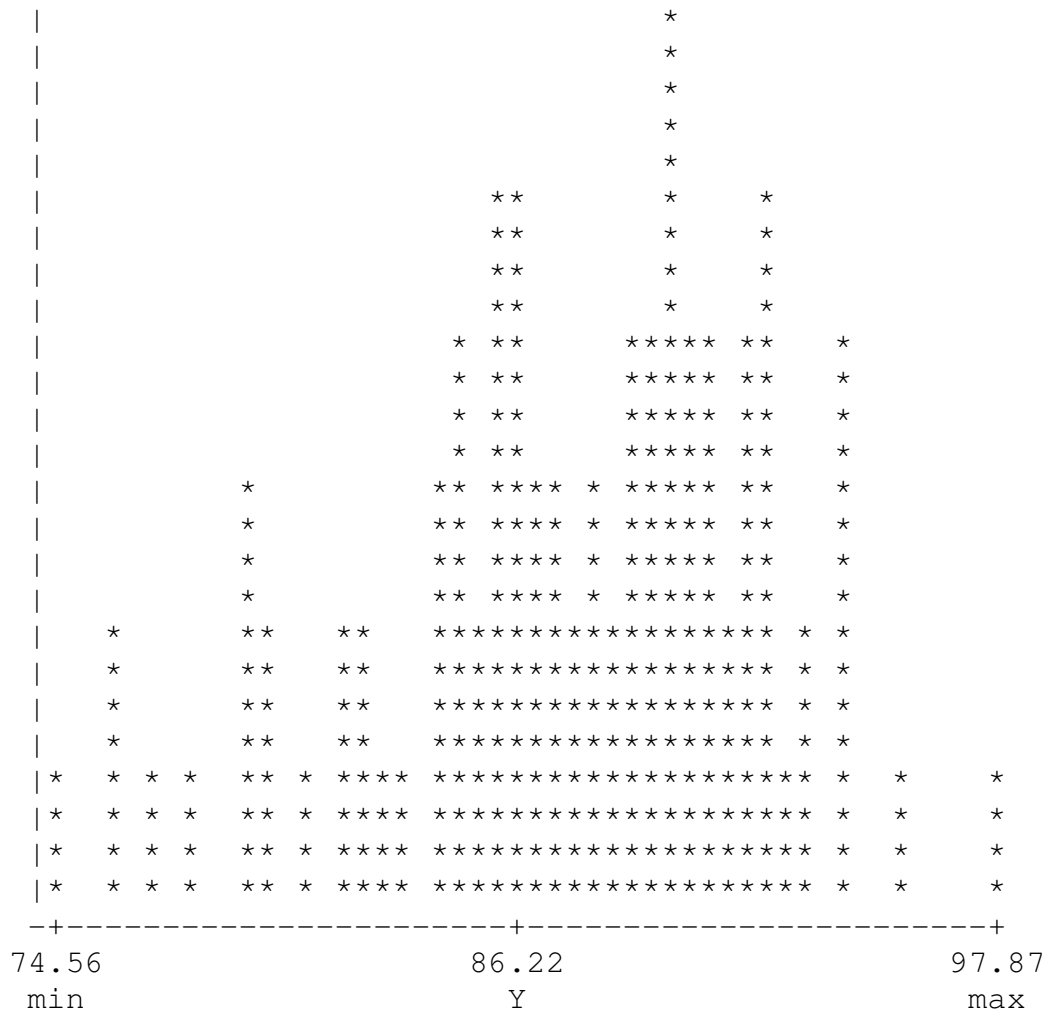
histogram



# RELATIVNI SADRŽAJ VODE - RSV2

koeficijent asimetrije: -0.5671  
 koeficijent spljoštenosti: 0.2015  
 $\chi^2$  statistika: 5.0323 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

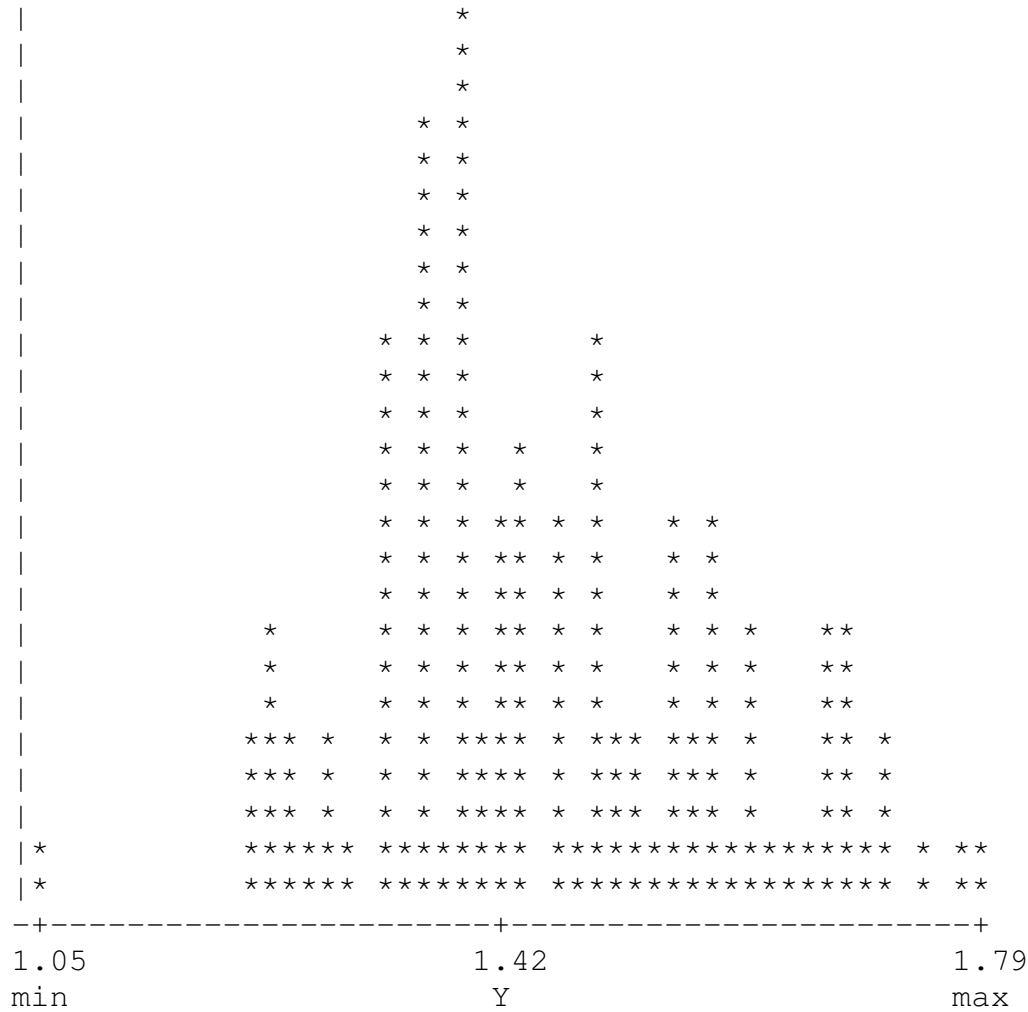
histogram



OSMOTSKI POTENCIJAL - OP1

koeficijent asimetrije: 0.1514  
koeficijent spljoštenosti: -0.1891  
 $\chi^2$  statistika: 0.4941 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram

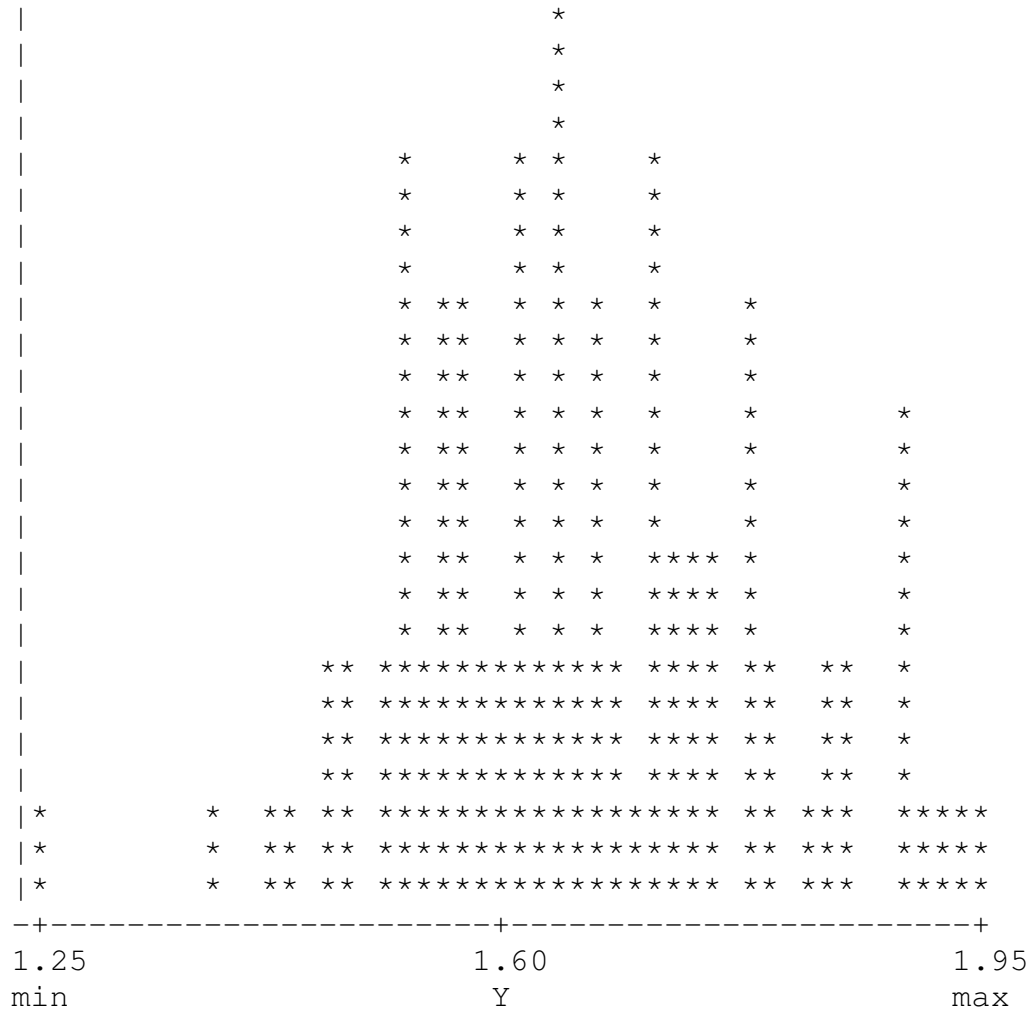




OSMOTSKI POTENCIJAL - OP2

koeficijent asimetrije: 0.0612  
koeficijent spljoštenosti: 0.1555  
 $\chi^2$  statistika: 0.1502 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

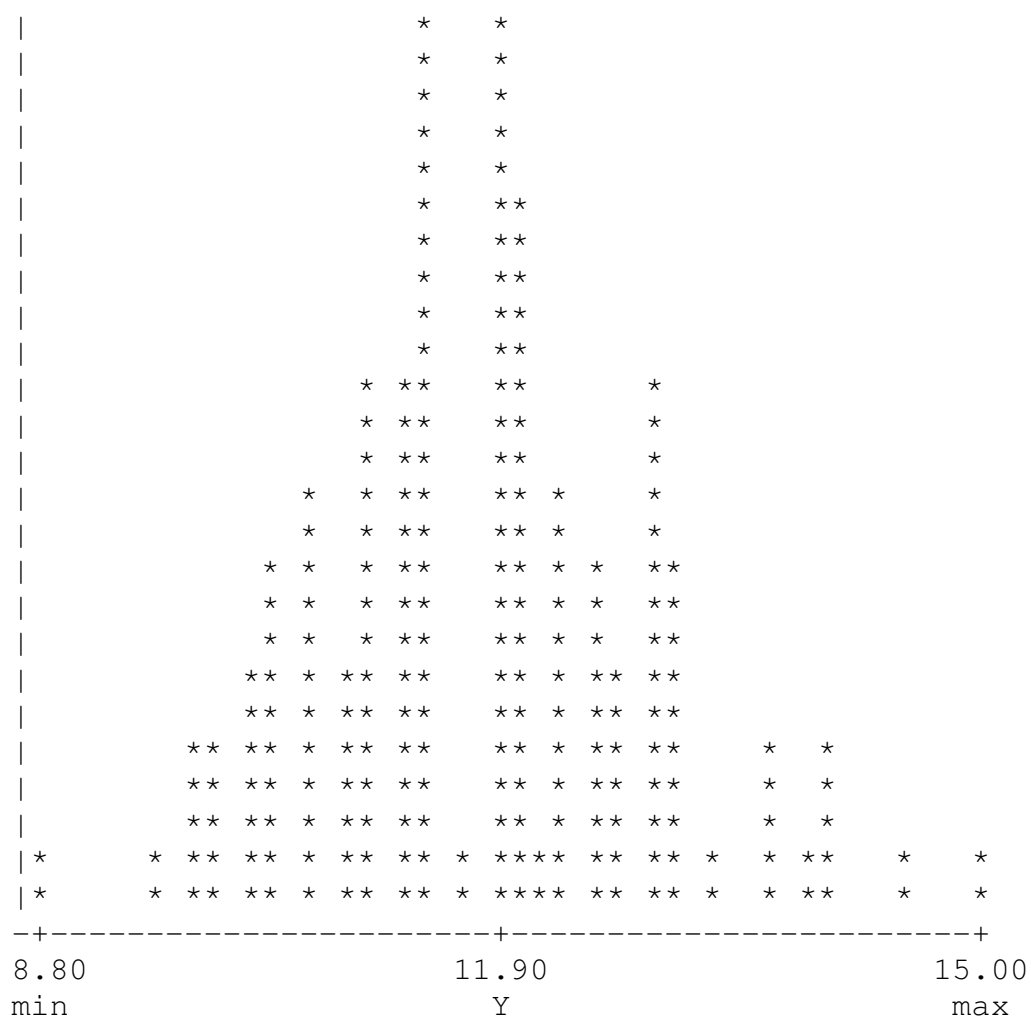
histogram



## SADRŽAJ ŠEĆERA - SŠ1

koeficijent asimetrije: 0.2762  
 koeficijent spljoštenosti: 0.4135  
 $\chi^2$  statistika: 1.8454 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

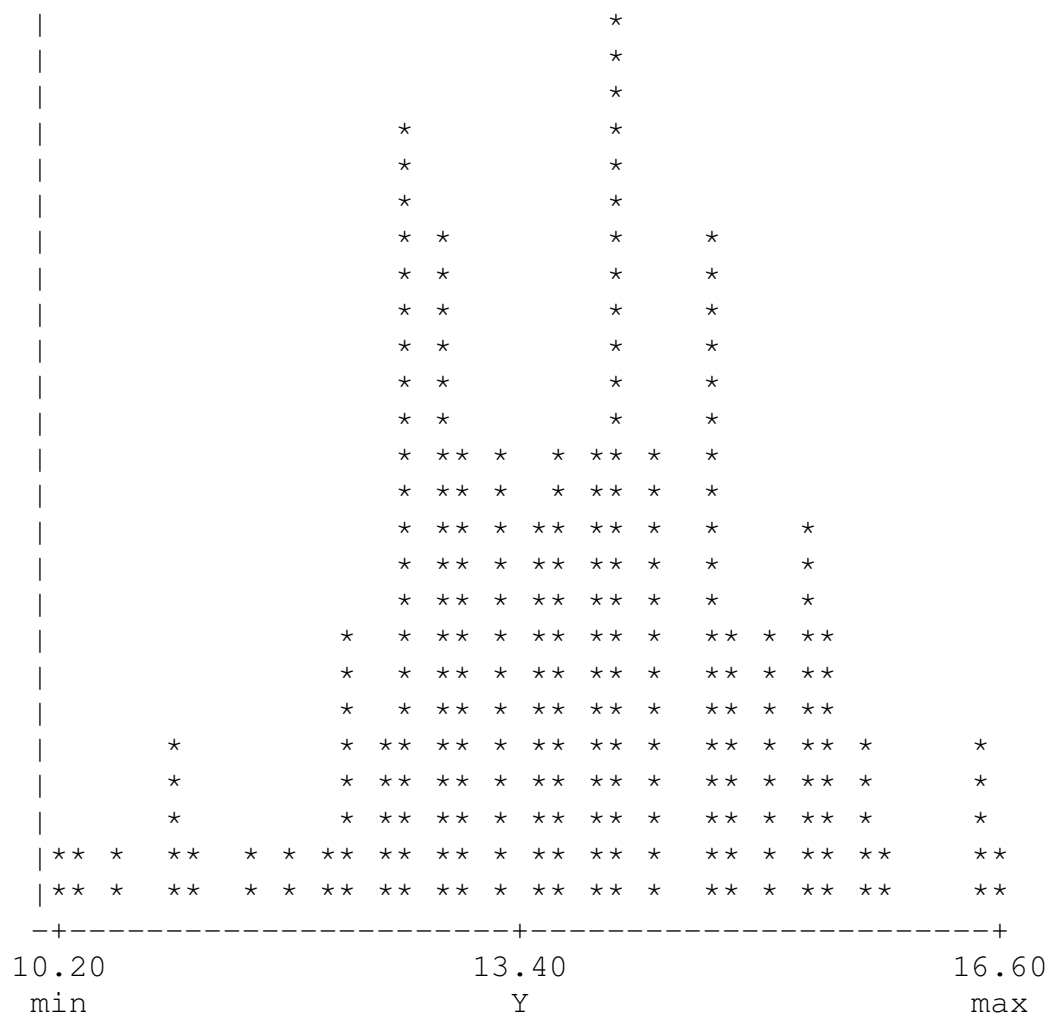
histogram



## SADRŽAJ ŠEĆERA - SŠ2

koeficijent asimetrije: -0.1865  
 koeficijent spljoštenosti: 0.1724  
 $\chi^2$  statistika: 0.6542 S (5%: 5.99, 1%: 9.21)

histogram



### **PRILOG 3**

#### **PRIKAZ REZULTATA ZA QTL-OVE IDENTIFIKOVANE PRIMENOM ANOVA METODE**

PR-prinos; 2. BR- broj redova; 3. BZ - broj zrna u redu; 4. MZ - masa zrna; 5. DK - dužina klipa; 6. PK - prečnik klipa; 7. DUZ - dužina zrna; 8. ŠZ - širina zrna; 9. DEZ - debljina zrna; 10. VB - visina biljke; 11. VK - visina do klipa; 12. DM - dužina metlice; 13. BGM - broj grana metlice; 14. BL - broj listova; 15. ŠL3 - širina trećeg lista; 16. ŠL4 - širina četvrtog lista; 17. ASI-period između metličjenja i svilanja; 18., 19.i 20. DS1, DS2 i DS3 - ocena odgovora na sušu; 21. i 22. relativni sadržaj vode - RSV1, RSV2; 23. i 24. osmotski potencijal - OP1, OP2; 25. i 26. sadržaj šećera - SŠ1, SŠ2.

### QTL-ovi identifikovani ANOVA metodom

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>PR</b>	1	umc161	P<0.1	163.9
	1	CDO89b	P<0.05	166.1
	1	bnlg2331	P<0.05	169.1
	1	SB663b	P<0.1	172.0
	4	umc169	P<0.1	135.5
	5	RZ892	P<0.05	41.2
	5	MACE01A03	P<0.05	60.7
	6	PSR129b	P<0.1	30.6
	7	csu150	P<0.01	0.0
	7	csu129	P<0.05	11.3
	7	csu11	P<0.1	20.7
	7	CSU81	P<0.05	23.6
	7	bnlg434	P<0.05	42.2
	7	bnl16.06	P<0.1	98.0
	8	RZ543	P<0.1	23.0
	9	bnlg1209	P<0.1	61.8
	10	RZ740a	P<0.05	69.5
	10	bnlg1450	P<0.1	125.9
<b>BR</b>	1	psr128a	P<0.1	107.6
	2	BCD855	P<0.05	92.8
	2	npi409	P<0.1	145.9
	3	RZ141	P<0.05	87.2
	3	PSR156	P<0.05	151.7
	3	RGC122	P<0.05	168.6
	4	RZ143a	P<0.05	44.2
	4	bnlg1741	P<0.05	49.8
	4	bnl8.45	P<0.05	95.5
	4	bnlg1927	P<0.05	98.2
	4	CSU39	P<0.05	105.7
	4	hhu503a	P<0.1	121.5
	5	RZ892	P<0.01	41.2
	5	MACE01A03	P<0.1	60.7
	6	umc21	P<0.1	57.4
	7	csu150	P<0.1	0.0
	7	csu129	P<0.05	11.3
	7	csu11	P<0.05	20.7
	7	CSU81	P<0.05	23.6
	7	CDO412	P<0.1	31.1

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>BR</b>	<b>7</b>	bnlg434	P<0.1	42.2
	<b>8</b>	SB851b	P<0.05	54.1
	<b>9</b>	DHPS	P<0.1	61.1
<b>BZ</b>	<b>1</b>	psr128a	P<0.05	107.6
	<b>1</b>	CDO89b	P<0.1	166.1
	<b>3</b>	RZ141	P<0.01	83.8
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>6</b>	CSU95b	P<0.1	46.9
	<b>7</b>	csu150	P<0.1	0.0
	<b>7</b>	csu11	P<0.05	20.7
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6
	<b>10</b>	bnlg1450	P<0.1	125.9
<b>MZ</b>	<b>1</b>	bnlg1014	P<0.01	11.7
	<b>1</b>	umc157	P<0.1	20.8
	<b>1</b>	BCD1072	P<0.05	141.4
	<b>2</b>	UMC255	P<0.05	57.7
	<b>3</b>	bnlg420	P<0.1	95.8
	<b>3</b>	bnlg1257	P<0.1	182.9
	<b>4</b>	CSU39	P<0.1	105.7
	<b>5</b>	RGC746	P<0.05	23.4
	<b>5</b>	MACE01A03	P<0.1	60.7
	<b>5</b>	SB854	P<0.1	73.0
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6
	<b>10</b>	hhu504a	P<0.1	49.4
	<b>10</b>	umc64	P<0.05	53.8
	<b>10</b>	CDO456	P<0.05	58.8
	<b>10</b>	RZ740a	P<0.05	59.5
	<b>10</b>	bnlg1074	P<0.1	82.5
<b>DK</b>	<b>1</b>	bcd1072	P<0.05	141.4
	<b>2</b>	UMC255	P<0.1	57.7
	<b>2</b>	umc5	P<0.05	64.0
	<b>2</b>	M54/2'Ca	P<0.1	67.7
	<b>2</b>	csu481	P<0.05	105.9
	<b>3</b>	umc102	P<0.05	81.8
	<b>3</b>	CSU184	P<0.1	89.5
	<b>3</b>	umc60a	P<0.1	133.9
	<b>4</b>	umc169	P<0.1	135.5
	<b>5</b>	RZ892	P<0.1	41.2
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>DK</b>	<b>8</b>	CSU155	P<0.1	58.5
	<b>8</b>	umc30	P<0.05	80.5
	<b>9</b>	CSU36c	P<0.05	22.0
	<b>9</b>	bnlg127	P<0.1	56.9
	<b>9</b>	CSU68a	P<0.1	99.4
	<b>10</b>	RZ740a	P<0.05	59.5
	<b>10</b>	bnlg1074	P<0.1	82.5
	<b>10</b>	M49/2C	P<0.1	88.7
	<b>10</b>	bnl7.49	P<0.05	112.9
<b>PK</b>	<b>1</b>	psr128a	P<0.1	107.6
	<b>2</b>	umc5	P<0.1	64.0
	<b>2</b>	BCD855	P<0.05	92.8
	<b>2</b>	npi409	P<0.1	145.9
	<b>2</b>	csu166	P<0.1	192.8
	<b>3</b>	PSR156	P<0.1	151.7
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>5</b>	MACE01A03	P<0.05	60.7
	<b>6</b>	PSR129b	P<0.01	30.6
	<b>7</b>	csu150	P<0.05	0.0
	<b>7</b>	bnl16.06	P<0.1	98.0
	<b>9</b>	bnlg1209	P<0.1	61.8
	<b>10</b>	RZ740a	P<0.1	59.5
<b>DUZ</b>	<b>1</b>	bcd1072	P<0.05	141.4
	<b>1</b>	bnlg2331	P<0.1	169.1
	<b>3</b>	csu184	P<0.01	89.5
	<b>3</b>	PSR156	P<0.05	151.7
	<b>4</b>	bnlg1927	P<0.05	98.2
	<b>4</b>	CSU39	P<0.1	105.7
	<b>5</b>	RZ892	P<0.01	41.2
	<b>5</b>	hhu503b	P<0.1	52.2
	<b>5</b>	MACE01A03	P<0.05	60.7
	<b>5</b>	csu173	P<0.1	88.8
	<b>5</b>	csu110	P<0.1	91.5
	<b>6</b>	bnlg426	P<0.1	11.5
	<b>6</b>	umc59	P<0.1	18.2
	<b>6</b>	PSR129b	P<0.1	30.6
	<b>6</b>	SB851a	P<0.1	88.2
	<b>7</b>	bnl16.06	P<0.1	98.0
	<b>9</b>	csu25b	P<0.1	8.8

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>ŠZ</b>	<b>1</b>	tub1	P<0.05	0.0
	<b>2</b>	umc5	P<0.05	64.0
	<b>2</b>	BCD855	P<0.05	92.8
	<b>2</b>	csu481	P<0.05	105.9
	<b>3</b>	MACE01E07	P<0.05	79.2
	<b>3</b>	csu184	P<0.1	89.5
	<b>5</b>	csu108	P<0.05	26.6
	<b>5</b>	RGC488	P<0.01	34.4
	<b>6</b>	bcd454b	P<0.05	68.7
	<b>6</b>	umc62	P<0.1	115.1
	<b>6</b>	CSU56b	P<0.1	125.1
	<b>8</b>	CSU155	P<0.05	58.5
	<b>8</b>	umc30	P<0.1	80.5
<b>DEZ</b>	<b>2</b>	bnlg469	P<0.01	169.1
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>5</b>	RZ508	P<0.1	47.4
	<b>5</b>	MACE01A03	P<0.05	60.7
	<b>6</b>	csu95b	P<0.05	46.9
	<b>8</b>	umc7	P<0.05	112.6
	<b>9</b>	csu95a	P<0.05	8.8
	<b>9</b>	csu29b	P<0.05	39.3
	<b>9</b>	DHPS	P<0.1	61.1
	<b>10</b>	csu25b	P<0.1	0.0
	<b>10</b>	csu103a	P<0.1	18.7
	<b>10</b>	sb113	P<0.05	28.6
	<b>10</b>	SB160a	P<0.05	36.8
	<b>10</b>	umc130	P<0.05	44.3
	<b>10</b>	CDO456	P<0.1	56.6
<b>VB</b>	<b>1</b>	tub1	P<0.05	0.0
	<b>1</b>	bcd1072	P<0.05	141.4
	<b>2</b>	umc53	P<0.1	0.0
	<b>2</b>	bnlg1338	P<0.05	1.6
	<b>2</b>	sb134a	P<0.1	8.8
	<b>2</b>	bnlg108	P<0.05	78.7
	<b>3</b>	CSU184	P<0.1	89.5
	<b>3</b>	bnlg1257	P<0.05	182.9
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.01	44.2
	<b>4</b>	CDO497	P<0.1	58.5
	<b>5</b>	csu227	P<0.05	128.8



*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
VB	6	bnlg1043	P<0.01	0.0
	6	RZ143b	P<0.001	4.5
	6	CSU70	P<0.01	6.6
	6	bnlg426	P<0.05	11.5
	6	csu94a	P<0.1	13.7
	6	umc59	P<0.05	18.2
	6	umc1006	P<0.1	23.0
	6	psr129b	P<0.001	30.6
	6	csu95b	P<0.01	46.9
	6	M54/1C'	P<0.1	52.0
	6	BCD454b	P<0.1	68.7
	6	SB851a	P<0.1	88.2
	9	csu95a	P<0.1	8.8
	10	RZ740a	P<0.001	69.5
VK	1	umc157	P<0.1	20.8
	1	bcd1072	P<0.1	141.4
	2	sb134a	P<0.1	8.8
	2	umc61	P<0.05	34.7
	2	umc34	P<0.05	47.6
	2	csu46	P<0.001	55.7
	2	UMC255	P<0.001	57.7
	2	umc5	P<0.05	64.0
	2	bnlg108	P<0.1	78.7
	2	BCD855	P<0.001	92.8
	2	asg20	P<0.1	130.8
	4	RZ143a	P<0.05	44.2
	4	psr128b	P<0.1	56.3
	4	CDO497	P<0.05	58.5
	4	bnlg1927	P<0.01	98.2
	5	RZ892	P<0.05	41.2
	5	CSU566	P<0.1	95.9
	6	bnlg1043	P<0.05	0.0
	6	RZ143b	P<0.05	4.5
	6	CSU70	P<0.1	6.6
	6	bnlg426	P<0.05	11.5
	6	psr129b	P<0.01	30.6
	6	csu95b	P<0.01	46.9
	6	M54/1C'	P<0.1	52.0
	7	CSU81	P<0.1	23.6
	8	SB851b	P<0.05	54.1

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>VK</b>	<b>9</b>	bnlg1724	P<0.05	1.4
	<b>9</b>	csu95a	P<0.1	8.8
	<b>9</b>	SB160a	P<0.1	36.8
	<b>10</b>	rz740a	P<0.05	69.5
<b>DM</b>	<b>1</b>	tub1	P<0.01	0.0
	<b>2</b>	CSU56c	P<0.05	53.2
	<b>2</b>	csu46	P<0.01	55.7
	<b>2</b>	UMC255	P<0.01	57.7
	<b>2</b>	umc5	P<0.05	64.0
	<b>2</b>	bnlg108	P<0.001	78.7
	<b>2</b>	BCD855	P<0.05	92.8
	<b>2</b>	csu481	P<0.1	105.9
	<b>3</b>	MACE01E07	P<0.05	79.2
	<b>3</b>	RGC122	P<0.01	168.6
	<b>4</b>	bnlg1741	P<0.1	49.8
	<b>6</b>	bnlg1043	P<0.1	0.0
	<b>6</b>	RZ143b	P<0.05	4.5
	<b>6</b>	bnlg426	P<0.05	11.5
	<b>10</b>	RZ740a	P<0.05	59.5
	<b>10</b>	bnlg1450	P<0.1	125.9
<b>BGM</b>	<b>1</b>	tub1	P<0.05	0.0
	<b>1</b>	PSR39	P<0.1	49.2
	<b>1</b>	psr128a	P<0.1	107.6
	<b>1</b>	dhn4b	P<0.1	137.9
	<b>2</b>	umc53	P<0.05	0.0
	<b>2</b>	bnlg1338	P<0.001	1.6
	<b>2</b>	sb134a	P<0.05	8.8
	<b>2</b>	BCD855	P<0.05	92.8
	<b>2</b>	bnlg1520	P<0.1	158.0
	<b>2</b>	bnlg469	P<0.1	169.1
	<b>3</b>	umc1057	P<0.1	53.1
	<b>3</b>	SB160b	P<0.1	103.8
	<b>3</b>	RGC122	P<0.05	168.6
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.05	44.2
	<b>4</b>	CSU39	P<0.05	105.7
	<b>5</b>	SB736	P<0.05	8.9
	<b>5</b>	RGC746	P<0.05	23.4
	<b>5</b>	dhn4a	P<0.1	29.3
	<b>5</b>	SB854	P<0.05	73.0

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>BGM</b>	<b>6</b>	bnlg1043	P<0.1	0.0
	<b>7</b>	bnl16.06	P<0.1	98.0
	<b>9</b>	csu56a	P<0.1	65.0
	<b>10</b>	sb113	P<0.1	28.6
	<b>10</b>	sb160a	P<0.05	36.8
<b>BL</b>	<b>2</b>	bnlg108	P<0.1	78.7
	<b>2</b>	bnlg469	P<0.1	169.1
	<b>3</b>	aba14	P<0.1	73.1
	<b>3</b>	umc102	P<0.1	81.8
	<b>3</b>	RZ141	P<0.001	83.8
	<b>3</b>	CSU184	P<0.05	89.5
	<b>3</b>	umc60b	P<0.05	91.7
	<b>3</b>	bnlg420	P<0.01	95.8
	<b>3</b>	SB160b	P<0.1	103.8
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.05	44.2
	<b>4</b>	umc169	P<0.1	135.5
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>6</b>	bnlg1043	P<0.1	0.0
	<b>6</b>	RZ143b	P<0.05	4.5
	<b>7</b>	csu150	P<0.05	0.0
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6
	<b>7</b>	CDO412	P<0.05	31.1
	<b>8</b>	CSU155	P<0.1	58.5
	<b>8</b>	bnl(sh1)b	P<0.1	66.8
	<b>10</b>	sb113	P<0.01	28.6
	<b>10</b>	SB160a	P<0.05	36.8
	<b>10</b>	umc130	P<0.05	44.3
	<b>10</b>	hhu504a	P<0.05	49.4
	<b>10</b>	umc64	P<0.05	53.8
<b>ŠL3</b>	<b>1</b>	umc49b	P<0.1	87.5
	<b>1</b>	BCD1072	P<0.1	141.4
	<b>1</b>	umc107	P<0.1	147.8
	<b>1</b>	M313B	P<0.1	150.4
	<b>2</b>	sb134a	P<0.05	8.8
	<b>2</b>	umc49a	P<0.05	154.1
	<b>2</b>	bnlg1520	P<0.05	158.0
	<b>2</b>	bnlg469	P<0.1	169.1
	<b>5</b>	SB736	P<0.05	8.9
	<b>5</b>	RGC746	P<0.1	23.4

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
ŠL3	5	RZ892	P<0.05	41.2
	5	MACE01A03	P<0.1	60.7
	6	umc59	P<0.1	18.2
	6	psr129b	P<0.1	30.6
	10	bnl7.49	P<0.05	112.9
ŠL4	1	psr128b	P<0.05	107.6
	1	bcd1072	P<0.1	141.4
	1	umc107	P<0.1	147.8
	1	CDO89b	P<0.1	166.1
	3	bnlg420	P<0.05	95.8
	3	rgc122	P<0.1	168.8
	5	SB736	P<0.01	8.9
	5	RGC746	P<0.01	23.4
	5	csu108	P<0.05	26.6
	5	dhn4a	P<0.05	29.3
	5	rgc488	P<0.1	34.4
	5	RZ892	P<0.01	41.2
	5	rz508	P<0.1	47.4
	5	MACE01A03	P<0.001	60.7
	6	bnlg426	P<0.1	11.5
	6	umc59	P<0.1	18.2
	6	PSR129b	P<0.05	30.6
ASI	1	umc53	P<0.1	92.2
	2	csu56c	P<0.01	53.2
	2	BCD855	P<0.1	92.8
	2	csu481	P<0.05	105.9
	3	aba14	P<0.05	73.1
	4	bnl8.45	P<0.1	95.5
	4	bnlg1927	P<0.1	98.2
	7	csu150	P<0.001	0.0
	7	csu129	P<0.05	11.3
	7	csu11	P<0.05	20.7
	7	CSU81	P<0.05	23.6
	7	CDO412	P<0.1	31.1
	9	csu29b	P<0.05	39.3
DS1	1	tub1	P<0.1	0.0
	1	umc83	P<0.05	124.1
	1	bnlg2331	P<0.05	169.1

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>DS1</b>	<b>3</b>	RZ141	P<0.01	83.8
	<b>3</b>	bnlg420	P<0.1	95.8
	<b>3</b>	umc60a	P<0.1	133.9
	<b>3</b>	CSU25a	P<0.00001	210.7
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.05	44.2
	<b>4</b>	psr128b	P<0.1	56.3
	<b>4</b>	bnlg1927	P<0.05	98.2
	<b>4</b>	DHN4a	P<0.05	29.3
	<b>5</b>	MACE01A03	P<0.05	60.7
	<b>5</b>	CSU173	P<0.1	88.8
	<b>5</b>	CSU566	P<0.05	95.9
	<b>5</b>	CSU26	P<0.1	111.3
	<b>7</b>	CSU81	P<0.05	23.6
	<b>7</b>	bnlg434	P<0.1	42.2
	<b>8</b>	SB851b	P<0.1	54.1
	<b>9</b>	psp6575	P<0.1	69.6
	<b>10</b>	csu103a	P<0.01	18.7
	<b>10</b>	M492C	P<0.1	88.7
	<b>10</b>	SB134b	P<0.05	110.5
<b>DS2</b>	<b>1</b>	CSU206	P<0.05	69.0
	<b>1</b>	umc67	P<0.05	72.3
	<b>1</b>	csu31a	P<0.1	75.2
	<b>1</b>	csu91	P<0.05	79.1
	<b>1</b>	umc105b	P<0.05	81.5
	<b>1</b>	psr128a	P<0.1	107.6
	<b>1</b>	BCD1072	P<0.05	141.4
	<b>1</b>	bnlg2331	P<0.1	169.1
	<b>2</b>	CSU56c	P<0.1	53.2
	<b>2</b>	csu46	P<0.1	55.7
	<b>2</b>	csu481	P<0.1	105.9
	<b>3</b>	umc1057	P<0.1	53.1
	<b>3</b>	CSU16	P<0.1	56.9
	<b>3</b>	CSU25a	P<0.05	210.7
	<b>4</b>	RZ630	P<0.05	28.5
	<b>4</b>	RGC390a	P<0.1	42.8
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.01	44.2
	<b>4</b>	bnlg1741	P<0.1	49.8
	<b>4</b>	CSU39	P<0.05	105.7
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>DS2</b>	<b>6</b>	PSR129b	P<0.1	30.6
	<b>6</b>	SB851a	P<0.1	88.2
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6
	<b>7</b>	M542Cb	P<0.05	36.2
	<b>7</b>	bnlg434	P<0.01	42.2
	<b>7</b>	bnl16.06	P<0.05	98.0
	<b>6</b>	SB851b	P<0.1	88.2
	<b>8</b>	CSU155	P<0.001	58.5
	<b>9</b>	CSU36c	P<0.1	22.0
	<b>9</b>	bnlg127	P<0.1	56.9
	<b>10</b>	hhu504a	P<0.05	49.4
	<b>10</b>	umc64	P<0.05	53.88
	<b>10</b>	CDO456	P<0.05	56.6
	<b>10</b>	RZ740a	P<0.01	69.5
	<b>10</b>	bnlg1074	P<0.01	82.5
	<b>10</b>	M492C	P<0.01	88.7
	<b>10</b>	umc44	P<0.01	97.8
	<b>10</b>	SB134b	P<0.01	110.5
	<b>10</b>	bnl7.49	P<0.01	112.9
	<b>10</b>	csu48	P<0.1	137.7
<b>DS3</b>	<b>1</b>	blt101.97	P<0.1	53.8
	<b>1</b>	umc67	P<0.1	72.3
	<b>1</b>	csu91	P<0.1	79.1
	<b>1</b>	umc105b	P<0.01	81.5
	<b>1</b>	bnlg2331	P<0.05	169.1
	<b>2</b>	bnlg108	P<0.05	78.7
	<b>2</b>	csu481	P<0.1	109.5
	<b>3</b>	CSU25a	P<0.05	210.7
	<b>4</b>	RZ630	P<0.1	28.5
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.05	44.2
	<b>4</b>	bnlg1741	P<0.1	49.8
	<b>4</b>	CSU39	P<0.05	105.7
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>5</b>	SB854	P<0.1	73.0
	<b>6</b>	PSR129b	P<0.05	30.6
	<b>7</b>	CSU81	P<0.1	23.6
	<b>7</b>	CDO412	P<0.1	31.1
	<b>7</b>	M542Cb	P<0.05	36.2
	<b>7</b>	asg49	P<0.05	37.7

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>DS3</b>	7	bnlg434	P<0.001	42.2
	7	bnl16.06	P<0.05	98.0
	8	CSU155	P<0.05	58.5
	8	PSR74	P<0.1	109.3
	8	umc7	P<0.1	112.6
	8	umc39	P<0.05	120.5
	9	CSU36c	P<0.1	22.0
	9	csu94b	P<0.05	46.2
	9	bnlg127	P<0.05	56.9
	10	umc130	P<0.1	44.3
	10	hhu504a	P<0.05	49.4
	10	umc64	P<0.05	53.88
	10	CDO456	P<0.01	56.6
	10	RZ740a	P<0.01	69.5
	10	bnlg1074	P<0.001	82.5
	10	M492C	P<0.001	88.7
	10	umc44	P<0.01	97.8
	10	SB134b	P<0.05	110.5
	10	bnl7.49	P<0.05	112.9
	10	csu48	P<0.05	137.7
<b>RSV1</b>	1	bnlg1014	P<0.1	11.7
	2	umc53	P<0.05	0.0
	2	bnlg1338	P<0.001	1.6
	2	sb134a	P<0.05	8.8
	2	umc61	P<0.01	34.7
	2	UMC255	P<0.05	57.7
	2	bnlg108	P<0.05	78.7
	2	BCD855	P<0.05	92.8
	2	csu481	P<0.01	105.9
	5	SB854	P<0.01	73.0
	8	GI-27	P<0.05	42.0
	9	bnlg1724	P<0.1	1.4
	9	csu29b	P<0.1	39.3
	9	csu94b	P<0.05	46.2
	9	bnlg1209	P<0.05	61.8
	9	csu93	P<0.1	89.4
<b>RSV2</b>	2	bnlg1338	P<0.05	1.6
	2	asg20	P<0.1	130.8

*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
<b>RSV2</b>	<b>2</b>	npi409	P<0.1	145.9
	<b>2</b>	bnlg469	P<0.1	169.1
	<b>3</b>	CSU25a	P<0.1	210.7
	<b>4</b>	RZ143a	P<0.1	44.2
	<b>5</b>	RGC746	P<0.1	23.4
	<b>4</b>	DHN4a	P<0.05	29.3
	<b>5</b>	RGC488	P<0.05	34.4
	<b>5</b>	SB360a	P<0.05	52.2
	<b>5</b>	hhu503b	P<0.05	56.3
	<b>5</b>	SB854	P<0.05	73.0
	<b>7</b>	CDO412	P<0.1	31.1
	<b>8</b>	RGC970c	P<0.01	20.2
	<b>8</b>	RZ543	P<0.01	23.0
	<b>8</b>	GI-27	P<0.05	42.0
	<b>8</b>	bnlg1834	P<0.1	48.0
	<b>8</b>	BNL(sh1)b	P<0.1	66.8
	<b>8</b>	umc12	P<0.1	69.6
	<b>9</b>	CSU95a	P<0.05	8.8
<b>OP1</b>	<b>1</b>	bnlg1014	P<0.1	11.7
	<b>2</b>	csu166	P<0.001	192.8
	<b>3</b>	MACE01E07	P<0.05	79.2
	<b>3</b>	SB160b	P<0.05	103.8
	<b>7</b>	csu27	P<0.05	102.4
	<b>9</b>	csu29b	P<0.05	39.3
<b>OP2</b>	<b>2</b>	bnlg469	P<0.1	169.1
	<b>2</b>	csu166	P<0.1	192.8
	<b>3</b>	RGR77	P<0.1	207.1
	<b>5</b>	RZ892	P<0.05	41.2
	<b>5</b>	php10017	P<0.05	145.0
	<b>10</b>	umc64	P<0.05	53.8
<b>SŠ1</b>	<b>1</b>	bnlg1014	P<0.05	11.7
	<b>1</b>	bnlg2331	P<0.1	169.1
	<b>2</b>	umc53	P<0.1	0.0
	<b>2</b>	bnlg1338	P<0.1	1.6
	<b>2</b>	csu166	P<0.05	192.8
	<b>3</b>	umc1057	P<0.05	53.1
	<b>6</b>	bnlg426	P<0.01	11.5
	<b>6</b>	umc1006	P<0.1	23.0



*Nastavak*

svojstvo	hromozom	marker	nivo značajnosti	pozicija na mapi (cM)
SŠ1	7	RGC506	P<0.1	55.4
	7	phi116	P<0.1	113.1
	9	csu29b	P<0.05	39.3
	9	csu94b	P<0.1	46.2
	9	bnlg127	P<0.05	59.6
	9	PSR129a	P<0.05	62.4
SŠ2	1	tub1	P<0.1	0.0
	1	umc161	P<0.1	163.9
	1	CDO89b	P<0.1	166.1
	1	bnlg2331	P<0.1	169.1
	2	csu166	P<0.1	192.8
	7	phi116	P<0.1	113.1
	9	bnlg1724	P<0.1	1.4
	9	csu29b	P<0.1	39.3
	10	csu103a	P<0.05	18.7
	10	sb113	P<0.01	28.6
	10	umc130	P<0.1	44.3
	10	umc64	P<0.01	53.88
	10	CDO456	P<0.05	56.6
	10	bnlg1074	P<0.05	82.5
	10	csu48	P<0.05	137.7

## PRILOG 4

### PRIKAZ REZULTATA ZA QTL-OVE IDENTIFIKOVANE PRIMENOM SMA I IM METODA ZA DVE ISPITIVANE OSOBINE (PRINOS I VISINU BILJKE)

#### REZULTATI SMA METODE ZA PRINOS - PR

Chrom.	Marker	b0	b1	$-2\ln(L0/L1)$	$F(1, n-2)$	pr (F)
-----						
1	1	73.067	-2.123	0.286	0.283	0.595
1	2	73.158	0.301	0.005	0.005	0.941
1	3	73.116	5.146	1.828	1.816	0.180
1	4	73.183	6.133	2.194	2.183	0.141
1	5	73.198	8.880	4.460	4.465	0.036 *
1	6	73.039	9.513	5.528	5.552	0.020 *
1	7	72.860	8.420	4.063	4.064	0.045 *
1	8	72.870	7.158	2.793	2.783	0.097
1	9	72.879	7.333	2.921	2.912	0.090
1	10	72.724	7.820	3.385	3.379	0.068
1	11	72.567	8.499	3.627	3.623	0.059
1	12	72.828	6.478	2.382	2.370	0.125
1	13	72.906	6.436	2.425	2.414	0.122
1	14	73.007	5.213	1.677	1.665	0.199
1	15	72.990	3.955	1.023	1.014	0.315
1	16	73.083	2.839	0.518	0.513	0.475
1	17	73.124	2.770	0.506	0.501	0.480

1	18	73.174	2.685	0.469	0.465	0.496	
1	19	73.262	4.268	1.151	1.142	0.287	
1	20	73.278	3.421	0.762	0.755	0.386	
1	21	73.252	3.947	0.988	0.979	0.324	
1	22	73.378	7.027	3.363	3.356	0.069	
1	23	73.292	4.524	1.312	1.302	0.256	
1	24	73.307	7.017	3.223	3.216	0.075	
1	25	73.335	8.258	4.503	4.509	0.035	*
1	26	73.225	13.671	11.034	11.257	0.001	***
1	27	72.992	13.675	11.906	12.178	0.001	***
1	28	73.074	12.994	10.411	10.604	0.001	**
1	29	73.006	12.206	9.306	9.448	0.002	**
2	1	73.041	-3.729	1.140	1.131	0.289	
2	2	73.061	-3.982	1.230	1.221	0.271	
2	3	72.997	-2.320	0.413	0.409	0.524	
2	4	73.261	2.008	0.259	0.256	0.613	
2	5	73.082	-3.424	0.805	0.798	0.373	
2	6	73.116	-1.084	0.080	0.079	0.779	
2	7	73.199	1.614	0.176	0.174	0.677	
2	8	73.191	1.110	0.090	0.089	0.766	
2	9	73.187	2.352	0.393	0.389	0.534	
2	10	73.198	2.954	0.620	0.614	0.434	
2	11	73.207	3.528	0.820	0.812	0.369	
2	12	73.225	2.823	0.453	0.448	0.504	
2	13	73.490	4.749	1.332	1.322	0.252	
2	14	73.624	7.849	3.197	3.190	0.076	
2	15	73.307	5.624	1.660	1.649	0.201	
2	16	73.171	7.052	2.561	2.550	0.112	
2	17	73.145	1.317	0.106	0.104	0.747	
2	18	73.136	1.255	0.082	0.081	0.776	
2	19	73.164	-2.504	0.429	0.425	0.515	

2	20	73.133	-2.519	0.400	0.396	0.530	
2	21	73.117	-2.158	0.278	0.275	0.601	
2	22	73.521	9.008	4.060	4.061	0.045	*
3	1	73.118	1.862	0.190	0.188	0.665	
3	2	73.129	-0.394	0.008	0.008	0.927	
3	3	73.148	0.032	0.000	0.000	0.994	
3	4	73.125	-0.663	0.025	0.024	0.876	
3	5	73.141	-0.681	0.030	0.029	0.864	
3	6	73.100	-1.280	0.101	0.099	0.753	
3	7	73.070	-2.253	0.297	0.294	0.588	
3	8	73.078	-2.619	0.406	0.402	0.527	
3	9	73.110	-1.940	0.227	0.225	0.636	
3	10	73.140	-0.678	0.027	0.027	0.870	
3	11	73.159	1.087	0.066	0.066	0.798	
3	12	73.179	-2.075	0.238	0.236	0.628	
3	13	73.254	-1.582	0.097	0.096	0.758	
3	14	73.060	-3.846	0.833	0.826	0.365	
3	15	72.972	-11.150	7.637	7.716	0.006	**
3	16	72.659	-8.010	4.275	4.278	0.040	*
3	17	73.014	-3.548	0.820	0.813	0.369	
3	18	73.040	-2.693	0.512	0.507	0.478	
3	19	73.052	-1.858	0.242	0.239	0.626	
3	20	73.124	-3.799	0.956	0.947	0.332	
3	21	73.131	-0.930	0.059	0.058	0.809	
3	22	73.143	-0.157	0.002	0.002	0.969	
3	23	73.174	0.980	0.059	0.059	0.809	
4	1	73.196	3.753	0.938	0.930	0.336	
4	2	73.104	2.496	0.443	0.438	0.509	
4	3	73.106	3.646	0.892	0.884	0.349	
4	4	73.159	0.298	0.006	0.006	0.940	
4	5	73.141	-0.632	0.027	0.026	0.872	

4	6	73.134	-1.237	0.101	0.100	0.752	
4	7	73.144	-0.126	0.001	0.001	0.975	
4	8	73.180	-2.579	0.429	0.424	0.516	
4	9	73.173	-2.225	0.315	0.311	0.578	
4	10	73.155	-1.448	0.131	0.129	0.720	
4	11	73.165	-1.602	0.144	0.143	0.706	
4	12	72.688	-6.319	2.519	2.508	0.115	
4	13	72.796	-4.833	1.358	1.348	0.247	
4	14	72.528	-7.439	2.951	2.942	0.088	
4	15	72.778	-5.907	1.980	1.969	0.162	
4	16	73.207	-5.733	1.503	1.492	0.224	
5	1	73.133	2.431	0.404	0.400	0.528	
5	2	73.147	2.776	0.538	0.533	0.466	
5	3	73.146	-0.244	0.004	0.004	0.953	
5	4	72.864	-6.797	2.659	2.649	0.105	
5	5	72.823	-5.707	1.812	1.800	0.181	
5	6	72.941	-4.567	1.107	1.098	0.296	
5	7	72.605	-7.953	3.521	3.516	0.062	
5	8	72.515	-12.224	9.388	9.533	0.002	**
5	9	72.715	-10.857	7.732	7.814	0.006	**
5	10	72.811	-10.824	7.965	8.056	0.005	**
5	11	72.573	-11.709	9.293	9.434	0.002	**
5	12	72.228	-12.519	11.123	11.351	0.001	***
5	13	72.591	-4.642	0.982	0.974	0.325	
5	14	72.699	-6.568	3.224	3.216	0.075	
5	15	72.903	-4.305	1.378	1.368	0.244	
5	16	72.841	-4.332	1.311	1.301	0.256	
5	17	73.106	-0.596	0.023	0.023	0.880	
5	18	73.298	3.820	1.150	1.141	0.287	
5	19	73.195	3.903	1.109	1.100	0.296	
6	1	73.185	-2.237	0.327	0.324	0.570	

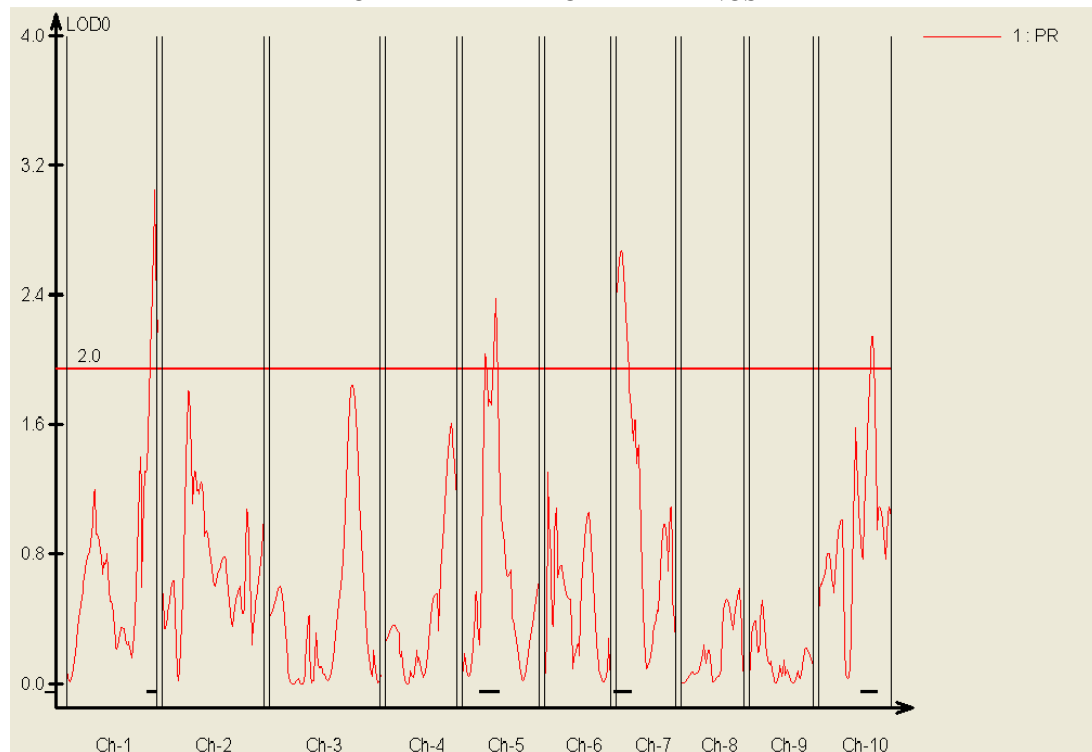
6	2	73.084	1.754	0.155	0.154	0.695	
6	3	73.141	1.086	0.058	0.058	0.810	
6	4	73.149	1.216	0.075	0.074	0.786	
6	5	73.147	0.091	0.000	0.000	0.984	
6	6	73.023	4.712	0.987	0.978	0.324	
6	7	73.061	3.286	0.491	0.486	0.487	
6	8	73.126	4.936	0.998	0.990	0.321	
6	9	73.143	6.922	2.404	2.393	0.124	
6	10	73.083	2.720	0.452	0.448	0.504	
6	11	73.034	3.317	0.646	0.640	0.425	
6	12	73.235	2.690	0.440	0.435	0.510	
6	13	73.207	5.250	1.792	1.780	0.184	
6	14	73.283	6.447	2.596	2.585	0.110	
6	15	73.136	6.819	2.963	2.954	0.087	
6	16	73.267	5.595	1.950	1.939	0.166	
6	17	73.176	2.500	0.436	0.432	0.512	
6	18	73.146	-0.080	0.000	0.000	0.983	
6	19	73.164	2.966	0.627	0.621	0.432	
6	20	73.154	1.257	0.112	0.111	0.739	
6	21	73.140	1.141	0.100	0.099	0.754	
7	1	73.191	12.440	11.075	11.301	0.001	***
7	2	73.850	12.363	12.208	12.497	0.001	***
7	3	73.956	10.168	6.977	7.036	0.009	**
7	4	74.047	10.494	6.872	6.928	0.009	**
7	5	74.350	10.375	6.272	6.312	0.013	*
7	6	74.423	11.232	7.112	7.175	0.008	**
7	7	74.345	10.543	6.231	6.270	0.013	*
7	8	74.592	11.090	6.799	6.854	0.010	**
7	9	73.481	2.700	0.438	0.434	0.511	
7	10	73.482	3.101	0.588	0.583	0.446	
7	11	73.538	3.823	0.883	0.875	0.351	

7	12	73.551	3.935	1.174	1.165	0.282
7	13	73.553	4.768	1.813	1.802	0.181
7	14	73.591	4.529	1.432	1.421	0.235
7	15	73.387	3.488	0.748	0.741	0.390
8	1	73.172	0.728	0.032	0.032	0.858
8	2	73.148	1.189	0.087	0.086	0.769
8	3	73.146	-0.251	0.004	0.004	0.948
8	4	73.110	-4.310	1.092	1.082	0.300
8	5	73.090	-2.664	0.471	0.466	0.496
8	6	73.102	-1.954	0.235	0.233	0.630
8	7	73.139	-0.862	0.043	0.043	0.837
8	8	73.007	-1.939	0.199	0.197	0.658
8	9	73.066	-2.031	0.202	0.200	0.655
8	10	73.147	-2.942	0.465	0.460	0.498
8	11	73.049	-4.919	1.321	1.311	0.254
8	12	73.105	-0.931	0.060	0.059	0.808
8	13	73.059	-2.211	0.384	0.380	0.538
8	14	73.030	-2.298	0.441	0.437	0.510
8	15	73.169	0.824	0.055	0.055	0.815
8	16	73.131	1.456	0.176	0.174	0.677
9	1	73.135	-2.170	0.259	0.256	0.613
9	2	73.121	-4.871	1.314	1.304	0.255
9	3	73.317	-5.908	1.786	1.775	0.184
9	4	73.145	1.824	0.177	0.176	0.676
9	5	73.125	1.284	0.105	0.104	0.748
9	6	73.137	3.336	0.665	0.659	0.418
9	7	73.169	1.932	0.240	0.237	0.627
9	8	73.154	0.561	0.017	0.017	0.897
9	9	73.178	1.336	0.094	0.093	0.760
9	10	73.146	-0.111	0.001	0.001	0.980
9	11	73.251	2.985	0.412	0.408	0.524

9	12	73.203	1.286	0.086	0.085	0.770	
9	13	73.266	2.419	0.301	0.298	0.586	
9	14	73.322	3.592	0.660	0.653	0.420	
9	15	73.279	2.314	0.266	0.263	0.609	
9	16	73.360	2.907	0.355	0.352	0.554	
9	17	73.135	-0.433	0.013	0.013	0.911	
9	18	73.123	-2.945	0.632	0.626	0.430	
9	19	73.137	-2.880	0.607	0.601	0.439	
9	20	72.894	-2.786	0.558	0.553	0.458	
10	1	72.422	-5.754	2.198	2.187	0.141	
10	2	72.041	-6.491	2.837	2.828	0.094	
10	3	72.101	-6.609	2.999	2.991	0.086	
10	4	72.018	-6.241	2.145	2.133	0.146	
10	5	72.244	-4.446	1.099	1.090	0.298	
10	6	72.421	-3.124	0.526	0.521	0.472	
10	7	72.237	-4.465	0.942	0.934	0.335	
10	8	72.608	-2.176	0.223	0.220	0.639	
10	9	73.065	-0.304	0.004	0.004	0.948	
10	10	73.515	1.321	0.079	0.078	0.780	
10	11	73.777	2.175	0.228	0.226	0.635	
10	12	75.177	7.423	2.229	2.218	0.138	
10	13	74.538	5.524	1.684	1.673	0.198	
10	14	75.078	8.498	4.034	4.034	0.046	*
10	15	75.260	12.398	8.573	8.686	0.004	**
10	16	74.354	8.800	4.279	4.282	0.040	*
10	17	74.346	9.193	4.900	4.913	0.028	*
10	18	73.621	5.589	1.898	1.886	0.171	
10	19	73.324	6.363	2.988	2.979	0.086	



### REZULTATI IM METODE ZA PRINOS – PR



- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Puna linija crvene boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

# **REZULTATI SMA METODE ZA VISINU BILJKE - VB**

Chrom.	Marker	b0	b1	$-2\ln(L0/L1)$	$F(1, n-2)$	pr(F)
<hr/>						
1	1	171.806	-3.529	2.563	2.552	0.112
1	2	171.803	-3.229	2.077	2.065	0.153
1	3	171.930	-1.832	0.745	0.738	0.391
1	4	171.923	0.694	0.090	0.089	0.765
1	5	171.923	0.828	0.123	0.122	0.728
1	6	171.910	0.744	0.106	0.105	0.746
1	7	171.844	2.188	0.878	0.870	0.352
1	8	171.913	0.155	0.004	0.004	0.949
1	9	171.949	-0.842	0.124	0.122	0.727
1	10	171.889	0.549	0.053	0.053	0.818
1	11	171.816	1.501	0.364	0.360	0.549
1	12	171.932	-0.277	0.014	0.014	0.907
1	13	171.936	-0.458	0.039	0.039	0.844
1	14	171.947	-1.054	0.221	0.219	0.641
1	15	171.987	-1.721	0.627	0.621	0.432
1	16	171.932	-0.603	0.076	0.075	0.785
1	17	171.927	-1.039	0.231	0.228	0.634
1	18	171.906	-1.302	0.344	0.340	0.561
1	19	171.939	0.746	0.109	0.108	0.743
1	20	171.937	0.469	0.044	0.044	0.834
1	21	171.947	1.072	0.226	0.223	0.637
1	22	171.943	0.733	0.112	0.110	0.740
1	23	171.872	-1.459	0.423	0.419	0.519
1	24	171.897	-0.970	0.188	0.186	0.667

1	25	171.911	-0.332	0.022	0.022	0.883
1	26	171.915	-0.599	0.061	0.061	0.806
1	27	171.927	-1.513	0.431	0.427	0.514
1	28	171.919	-0.791	0.115	0.114	0.737
1	29	171.926	-1.229	0.283	0.280	0.597
2	1	171.830	-3.867	3.960	3.959	0.048 *
2	2	171.852	-4.179	4.391	4.396	0.037 *
2	3	171.695	-3.787	3.576	3.571	0.060
2	4	171.758	-3.125	2.027	2.016	0.157
2	5	171.899	-2.648	1.570	1.559	0.214
2	6	171.900	-1.615	0.590	0.584	0.446
2	7	171.894	-1.672	0.629	0.623	0.431
2	8	171.852	-2.349	1.318	1.308	0.254
2	9	171.909	-2.318	1.244	1.234	0.268
2	10	171.910	-1.520	0.532	0.526	0.469
2	11	171.918	-0.096	0.002	0.002	0.965
2	12	171.881	-2.320	1.006	0.997	0.319
2	13	171.667	-3.492	2.260	2.249	0.136
2	14	171.937	0.329	0.018	0.018	0.895
2	15	171.878	-1.797	0.539	0.534	0.466
2	16	171.915	-1.149	0.220	0.217	0.642
2	17	171.922	-1.789	0.636	0.630	0.428
2	18	171.934	-1.710	0.503	0.498	0.481
2	19	171.937	-2.703	1.633	1.622	0.205
2	20	171.903	-2.788	1.606	1.595	0.208
2	21	171.889	-2.202	0.945	0.936	0.335
2	22	171.908	-0.278	0.012	0.012	0.912
3	1	171.914	0.686	0.083	0.082	0.775
3	2	171.921	0.034	0.000	0.000	0.989
3	3	171.973	0.961	0.174	0.172	0.679
3	4	171.968	0.966	0.173	0.171	0.680

3	5	171.953	1.285	0.351	0.347	0.556
3	6	171.995	1.432	0.415	0.411	0.523
3	7	171.963	0.865	0.145	0.143	0.706
3	8	171.947	0.647	0.082	0.081	0.777
3	9	171.941	0.607	0.074	0.073	0.788
3	10	171.953	1.253	0.307	0.304	0.582
3	11	171.972	1.890	0.670	0.663	0.417
3	12	171.920	0.989	0.181	0.179	0.673
3	13	171.818	1.629	0.334	0.330	0.566
3	14	172.016	2.845	1.489	1.478	0.226
3	15	171.922	0.134	0.003	0.003	0.954
3	16	171.906	-0.191	0.008	0.007	0.931
3	17	171.926	0.171	0.006	0.006	0.939
3	18	171.932	0.283	0.018	0.018	0.894
3	19	171.914	-0.086	0.002	0.002	0.968
3	20	171.920	0.121	0.003	0.003	0.956
3	21	171.944	1.077	0.251	0.248	0.619
3	22	171.940	0.616	0.076	0.075	0.785
3	23	171.944	0.779	0.119	0.118	0.731
4	1	171.932	1.771	0.663	0.657	0.419
4	2	171.910	0.306	0.021	0.021	0.885
4	3	171.921	-0.111	0.003	0.003	0.960
4	4	171.811	-2.363	1.160	1.151	0.285
4	5	171.858	-3.820	3.143	3.135	0.078
4	6	171.848	-4.297	3.968	3.968	0.048 *
4	7	171.753	-4.157	3.536	3.531	0.062
4	8	171.950	-4.333	3.942	3.941	0.049 *
4	9	171.951	-5.276	5.840	5.870	0.016 *
4	10	171.919	-4.744	4.604	4.612	0.033 *
4	11	171.919	-6.080	7.105	7.168	0.008 **
4	12	171.674	-3.118	1.937	1.925	0.167

4	13	171.707	-2.709	1.354	1.344	0.248	
4	14	171.776	-1.602	0.428	0.424	0.516	
4	15	171.958	0.571	0.058	0.057	0.811	
4	16	171.916	0.410	0.024	0.024	0.877	
5	1	171.912	1.176	0.295	0.292	0.590	
5	2	171.919	1.221	0.324	0.321	0.572	
5	3	171.930	2.092	0.826	0.819	0.367	
5	4	172.003	2.028	0.728	0.722	0.397	
5	5	172.072	2.706	1.265	1.256	0.264	
5	6	172.026	2.369	0.928	0.920	0.339	
5	7	172.188	3.955	2.701	2.691	0.103	
5	8	171.983	1.249	0.288	0.285	0.594	
5	9	172.026	2.707	1.436	1.426	0.234	
5	10	172.014	3.066	1.913	1.901	0.170	
5	11	172.040	2.475	1.227	1.217	0.271	
5	12	172.075	2.126	0.935	0.927	0.337	
5	13	172.370	3.757	2.025	2.013	0.158	
5	14	171.987	0.995	0.226	0.224	0.637	
5	15	171.966	0.836	0.161	0.159	0.690	
5	16	172.035	1.790	0.712	0.705	0.402	
5	17	172.185	4.262	3.876	3.875	0.051	
5	18	172.182	6.681	12.165	12.452	0.001	***
5	19	171.947	4.304	4.375	4.379	0.038	*
6	1	171.722	8.746	17.728	18.439	0.000	*****
6	2	171.520	9.577	16.367	16.958	0.000	*****
6	3	171.811	9.461	15.649	16.180	0.000	*****
6	4	171.884	8.799	13.612	13.991	0.000	***
6	5	171.845	7.778	10.076	10.253	0.002	**
6	6	171.686	8.853	11.613	11.868	0.001	***
6	7	171.654	9.344	13.472	13.842	0.000	***
6	8	171.819	10.212	15.009	15.490	0.000	***

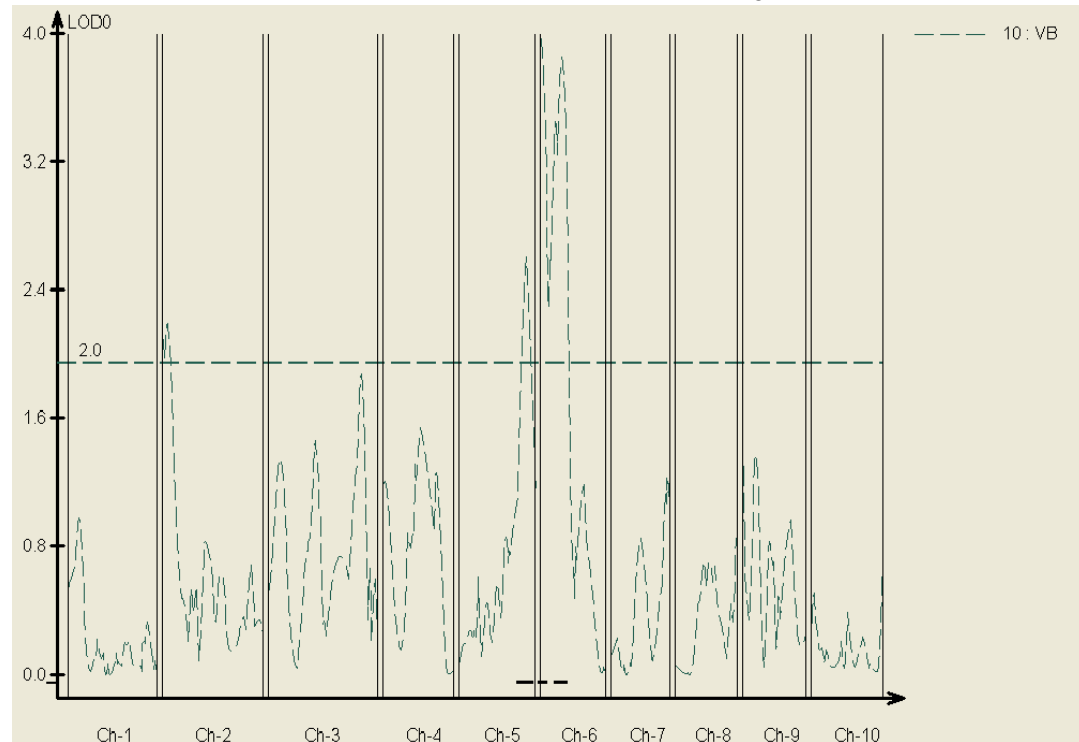
6	9	171.861	9.306	15.041	15.524	0.000	***
6	10	171.754	6.988	9.886	10.053	0.002	**
6	11	171.762	4.595	3.948	3.947	0.049	*
6	12	172.019	3.047	1.775	1.764	0.186	
6	13	171.961	3.757	2.878	2.869	0.092	
6	14	172.004	4.046	3.197	3.190	0.076	
6	15	171.910	5.169	5.386	5.408	0.021	*
6	16	172.031	3.924	3.075	3.067	0.082	
6	17	171.982	2.784	1.762	1.751	0.188	
6	18	171.932	0.595	0.082	0.082	0.776	
6	19	171.923	0.375	0.033	0.032	0.857	
6	20	171.912	-0.572	0.076	0.076	0.784	
6	21	171.919	-0.380	0.036	0.036	0.850	
7	1	171.917	1.200	0.305	0.302	0.583	
7	2	172.014	1.682	0.653	0.647	0.422	
7	3	171.941	0.275	0.015	0.015	0.903	
7	4	171.966	0.546	0.055	0.055	0.815	
7	5	171.869	-0.427	0.032	0.031	0.860	
7	6	171.795	-1.085	0.198	0.196	0.659	
7	7	171.814	-0.923	0.143	0.142	0.707	
7	8	171.595	-2.383	0.958	0.950	0.331	
7	9	171.379	-4.358	3.812	3.810	0.053	
7	10	171.685	-2.161	0.934	0.926	0.337	
7	11	171.845	-0.722	0.102	0.101	0.751	
7	12	172.022	1.134	0.317	0.314	0.576	
7	13	172.047	1.733	0.774	0.767	0.382	
7	14	172.109	2.201	1.106	1.097	0.296	
7	15	172.074	2.710	1.490	1.479	0.226	
8	1	171.920	0.046	0.000	0.000	0.984	
8	2	171.919	0.480	0.046	0.046	0.831	
8	3	171.921	0.538	0.063	0.063	0.802	

8	4	171.861	-3.238	1.991	1.979	0.161
8	5	171.817	-3.098	2.079	2.068	0.152
8	6	171.781	-3.970	3.205	3.198	0.075
8	7	171.843	-3.585	2.465	2.454	0.119
8	8	171.566	-4.208	3.089	3.081	0.081
8	9	171.731	-3.671	2.182	2.171	0.142
8	10	171.898	-3.558	2.197	2.186	0.141
8	11	171.870	-2.461	1.079	1.070	0.302
8	12	171.931	0.247	0.014	0.014	0.907
8	13	171.913	-0.136	0.005	0.005	0.94
8	14	171.920	0.033	0.000	0.000	0.987
8	15	171.941	0.848	0.189	0.187	0.666
8	16	171.899	1.714	0.788	0.781	0.378
9	1	171.941	3.972	2.884	2.875	0.092
9	2	171.935	2.923	1.548	1.538	0.217
9	3	171.846	2.531	1.071	1.062	0.304
9	4	171.929	1.270	0.282	0.279	0.598
9	5	171.916	0.515	0.055	0.054	0.816
9	6	171.921	1.031	0.210	0.208	0.649
9	7	171.929	0.615	0.080	0.080	0.778
9	8	171.916	-0.189	0.006	0.006	0.937
9	9	171.956	1.643	0.469	0.464	0.497
9	10	171.951	1.618	0.450	0.445	0.506
9	11	171.988	1.775	0.468	0.463	0.497
9	12	171.977	1.352	0.314	0.311	0.578
9	13	172.023	2.121	0.762	0.755	0.386
9	14	172.021	2.107	0.746	0.739	0.391
9	15	172.128	3.690	2.252	2.241	0.136
9	16	172.192	3.463	1.625	1.614	0.206
9	17	172.027	3.755	3.170	3.162	0.077
9	18	171.957	2.799	1.825	1.814	0.180

9	19	171.940	2.277	1.209	1.200	0.275
9	20	171.968	0.507	0.058	0.058	0.811
10	1	171.863	-0.424	0.037	0.037	0.848
10	2	171.974	0.316	0.021	0.021	0.886
10	3	171.953	0.208	0.009	0.009	0.924
10	4	172.309	2.090	0.755	0.748	0.388
10	5	172.176	1.231	0.265	0.262	0.609
10	6	172.259	1.429	0.348	0.345	0.558
10	7	172.054	0.629	0.060	0.059	0.809
10	8	171.830	-0.342	0.018	0.017	0.895
10	9	172.024	0.369	0.021	0.020	0.886
10	10	171.961	0.144	0.003	0.003	0.957
10	11	171.983	0.211	0.007	0.007	0.935
10	12	172.551	2.198	0.614	0.608	0.436
10	13	172.106	0.713	0.088	0.087	0.768
10	14	172.361	1.856	0.599	0.593	0.442
10	15	172.288	2.033	0.701	0.694	0.406
10	16	172.066	0.992	0.170	0.168	0.682
10	17	172.118	1.403	0.355	0.352	0.554
10	18	171.959	0.451	0.039	0.038	0.845
10	19	172.000	3.646	3.119	3.111	0.080



### REZULTATI IM METODE ZA VISINU BILJKE - VB

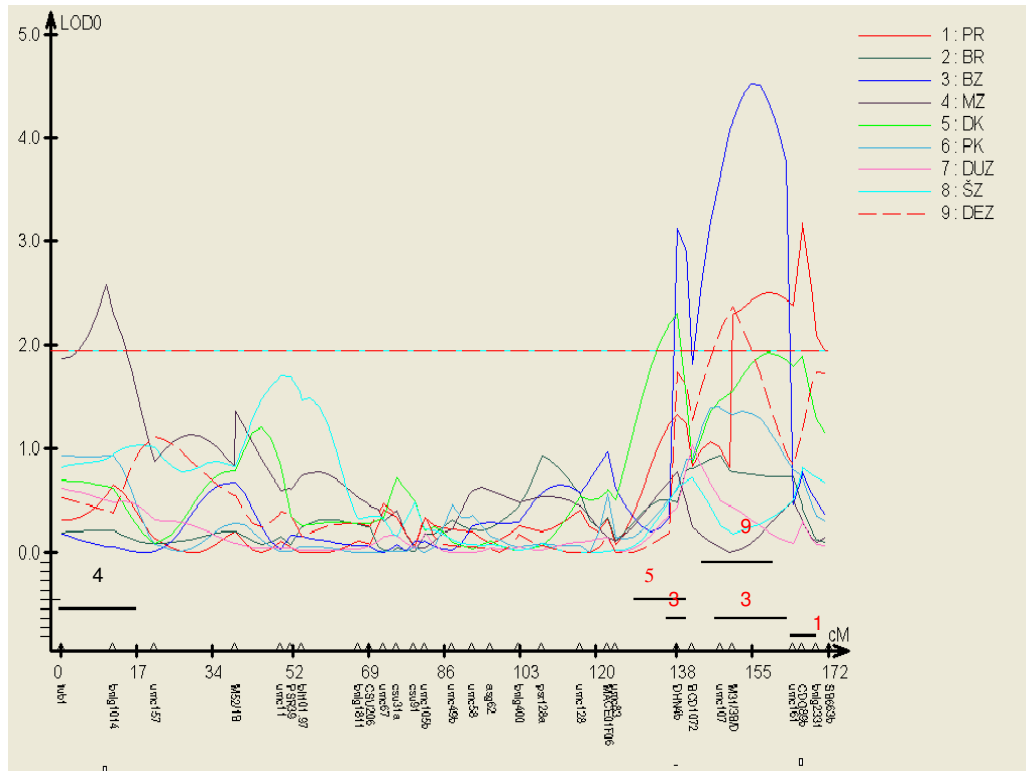


- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
- **Tačkasta linija zelene boje** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

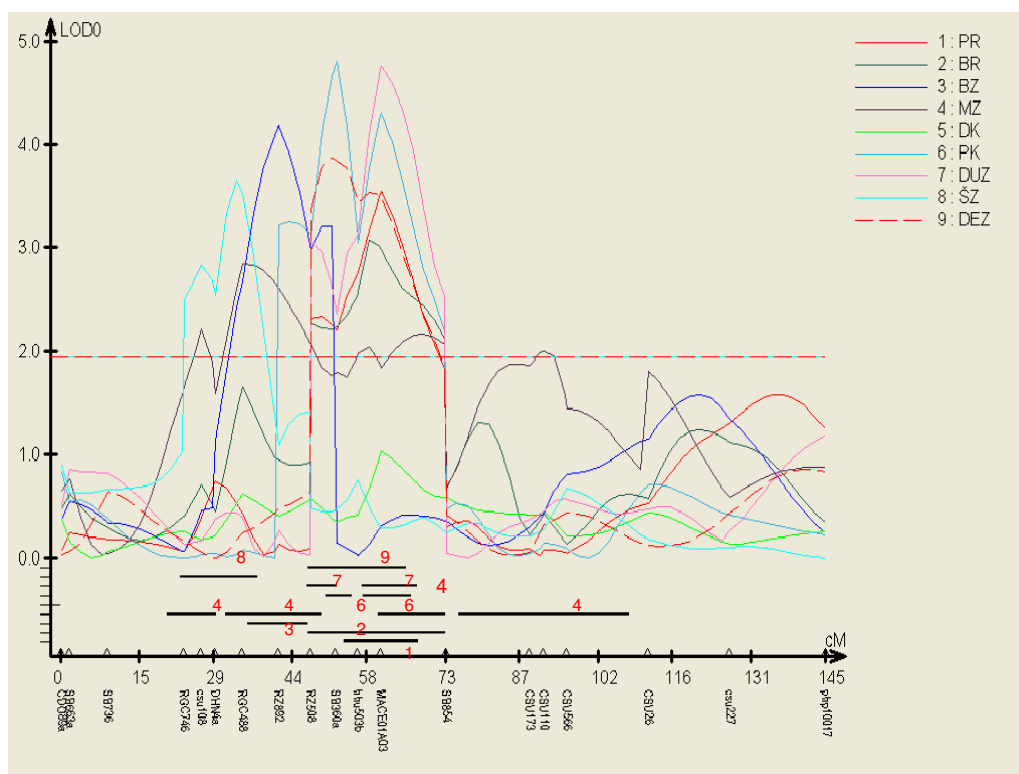
## PRILOG 5

### PRIKAZ KOLOKACIJA QTL-OVA ZA ISPITIVANE OSOBINE PRIMENOM CIM METODE – PRINOS I OSTALA SVOJSTVA

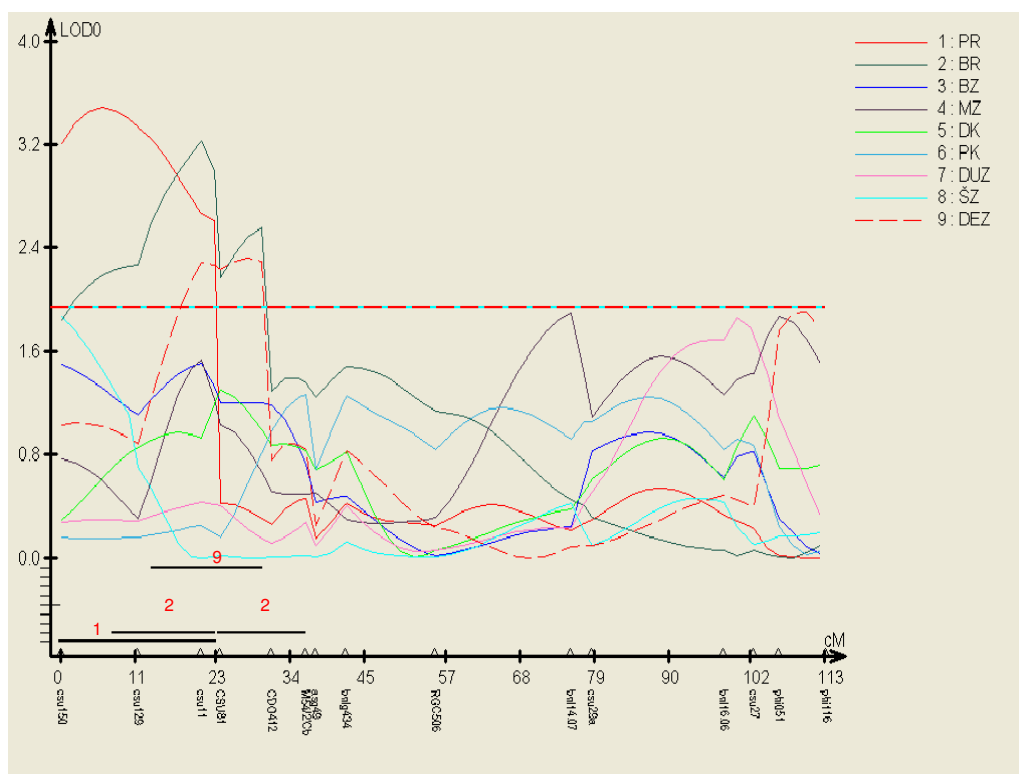
- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće (LOD=2) za nalaženje QTL
  - **Boja i forma linije** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
  - **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćénica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
  - **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova
- 
- *Intervali QTL-ova obeleženi su odgovarajućim brojem (redni broj osobine)*
  - *Na mestima gde su uočene kolokacije, intervali QTL-ova koji se poklapaju obeleženi su odgovarajućim brojem i crvenom bojom*



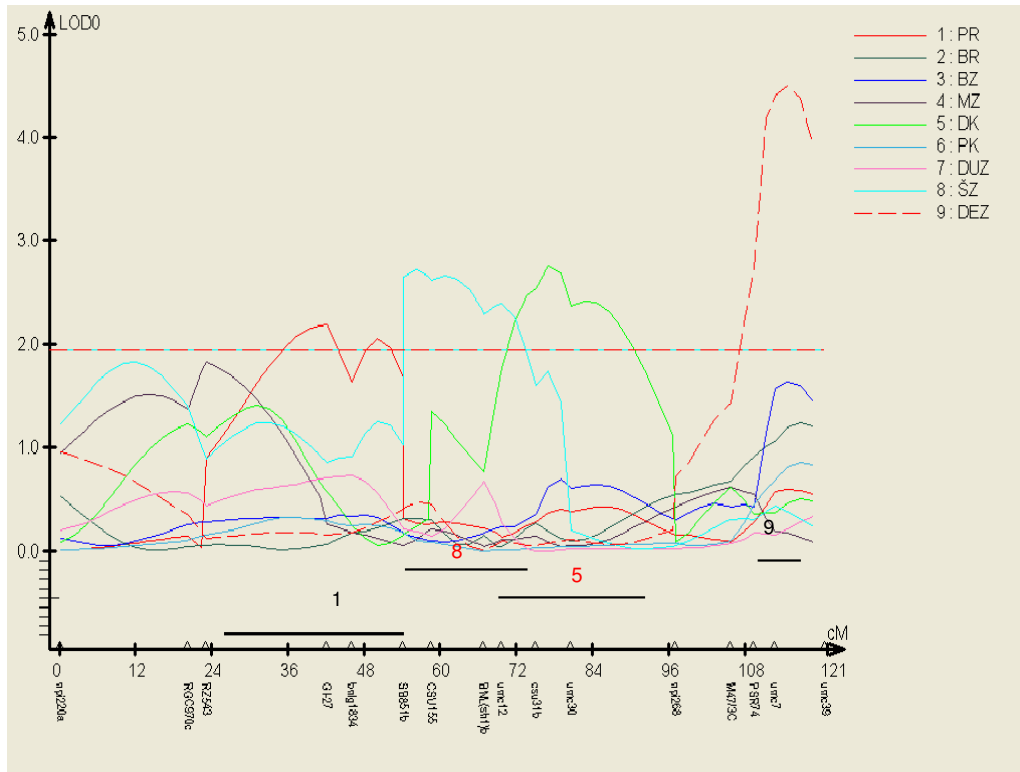
## Hromozom 5



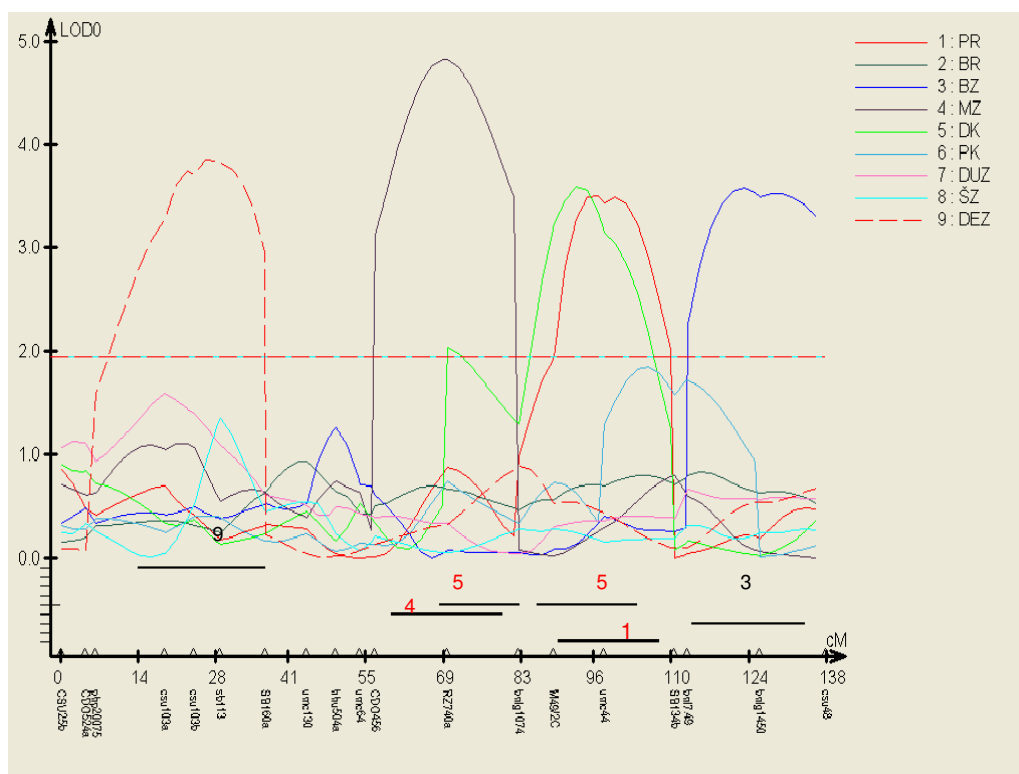
## Hromozom 7



## Hromozom 8

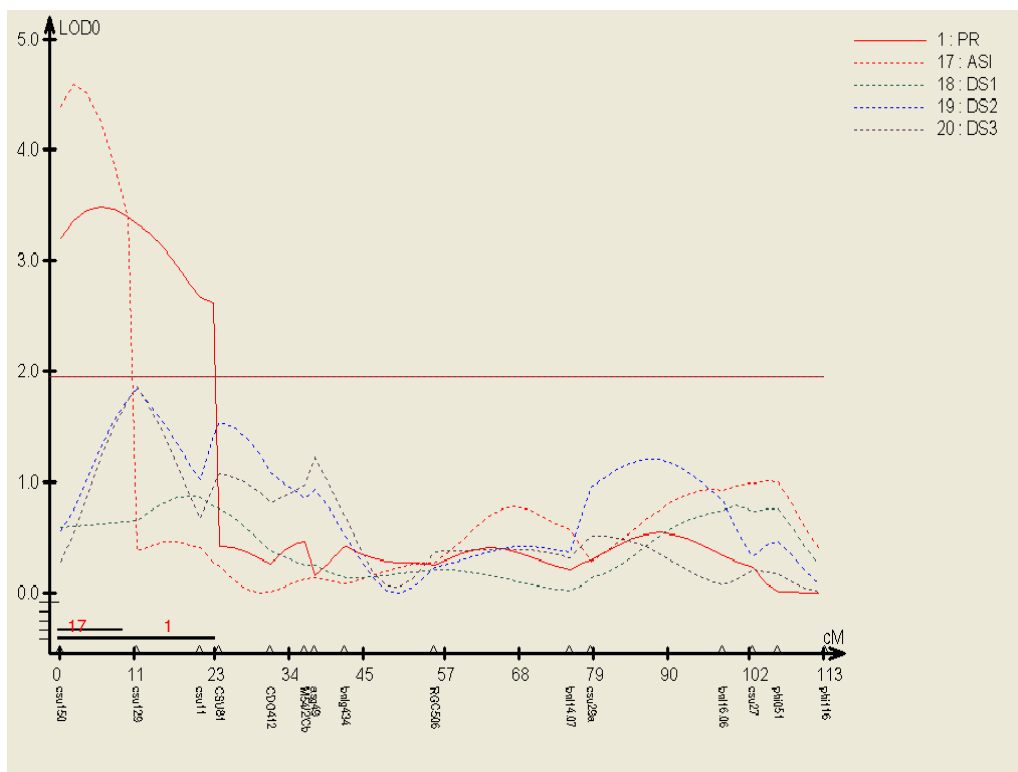


## Hromozom 10



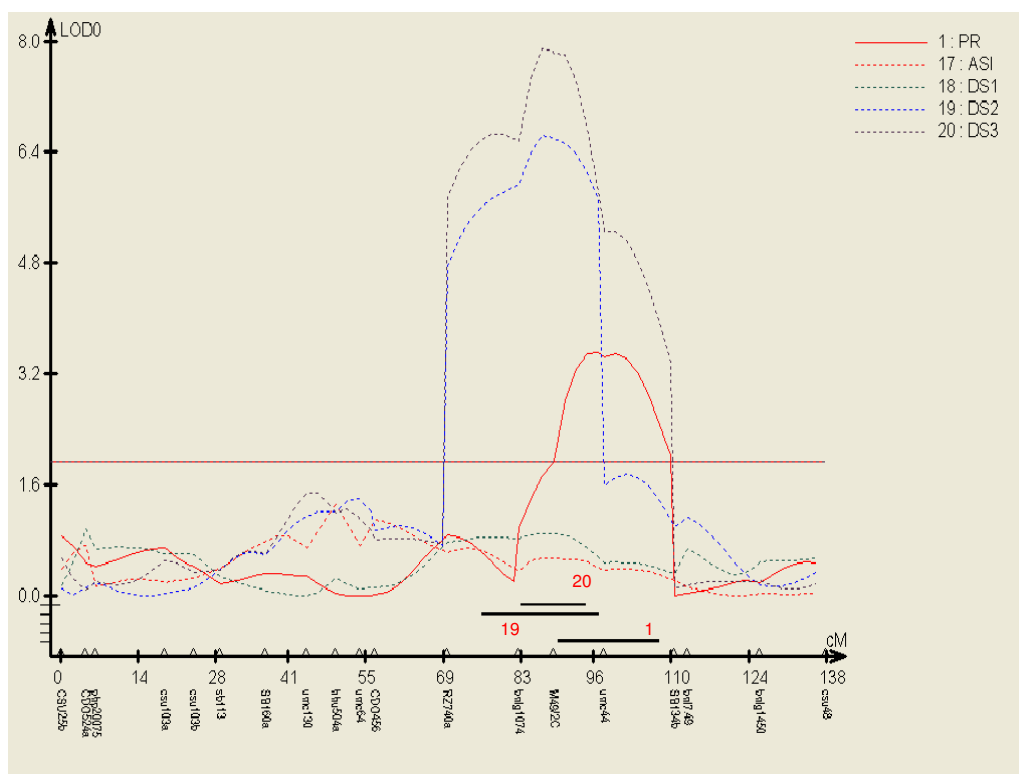
# KOLOKACIJA QTL-ova ZA PRINOS, ASI I DROUGHT SCORE

## Hromozom 7





## Hromozom 10

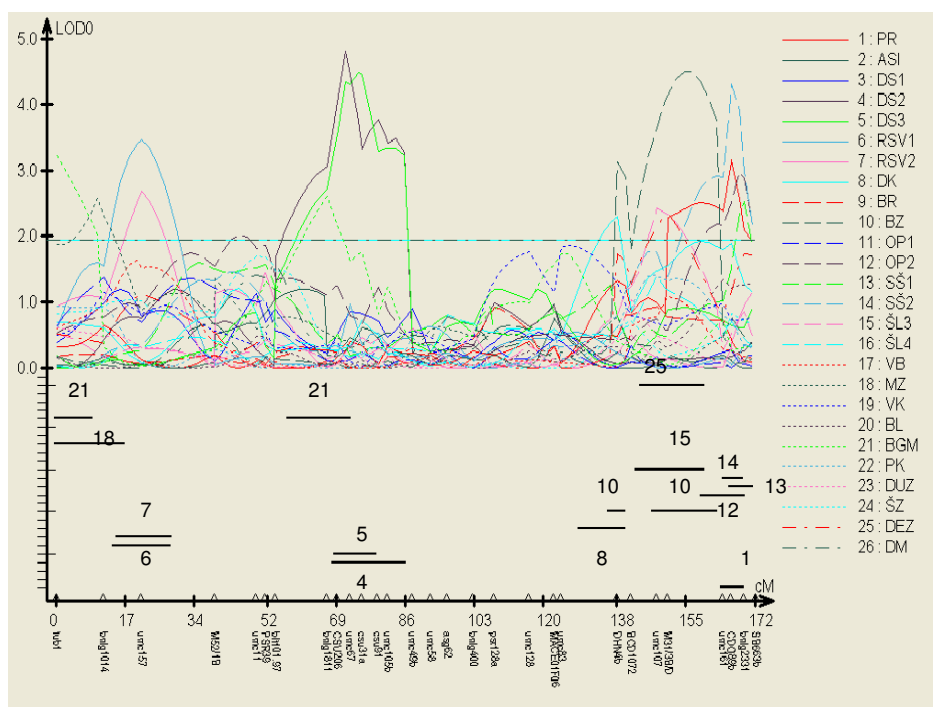


## **PRILOG 6**

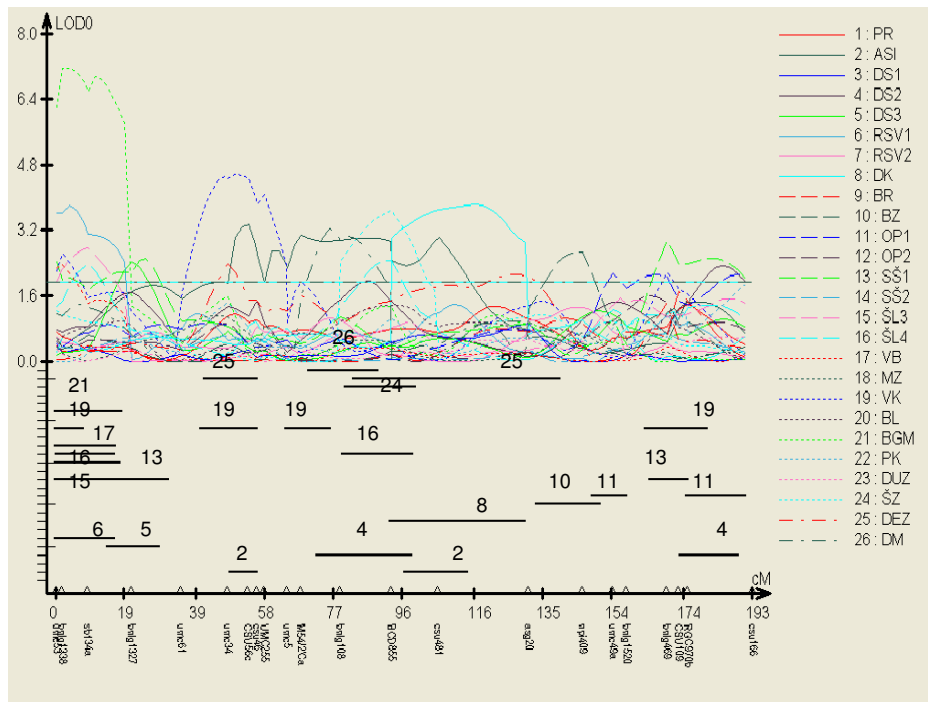
### **PRIKAZ KOLOKACIJA QTL-OVA ZA SVE ISPITIVANE OSOBINE PRIMENOM CIM METODE**

- **Isprekidana horizontalna linija** - prag verovatnoće ( $LOD=2$ ) za nalaženje QTL
- **Boja i forma linije** - profil verovatnoće za nalaženje QTL-ova
- **Legenda sa strane** - redni broj osobine, skraćenica za osobinu, i način na koji je predstavljen profil verovatnoće (boja i forma linije)
- **Horizontalne linije ispod profila verovatnoće** - intervali QTL-ova

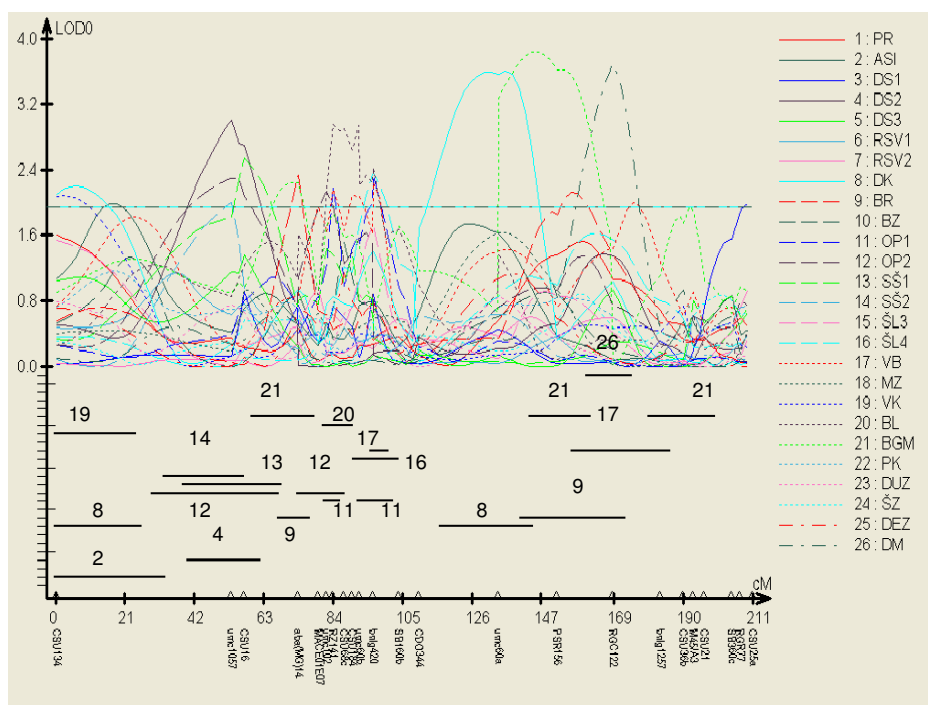
# Hromozom 1



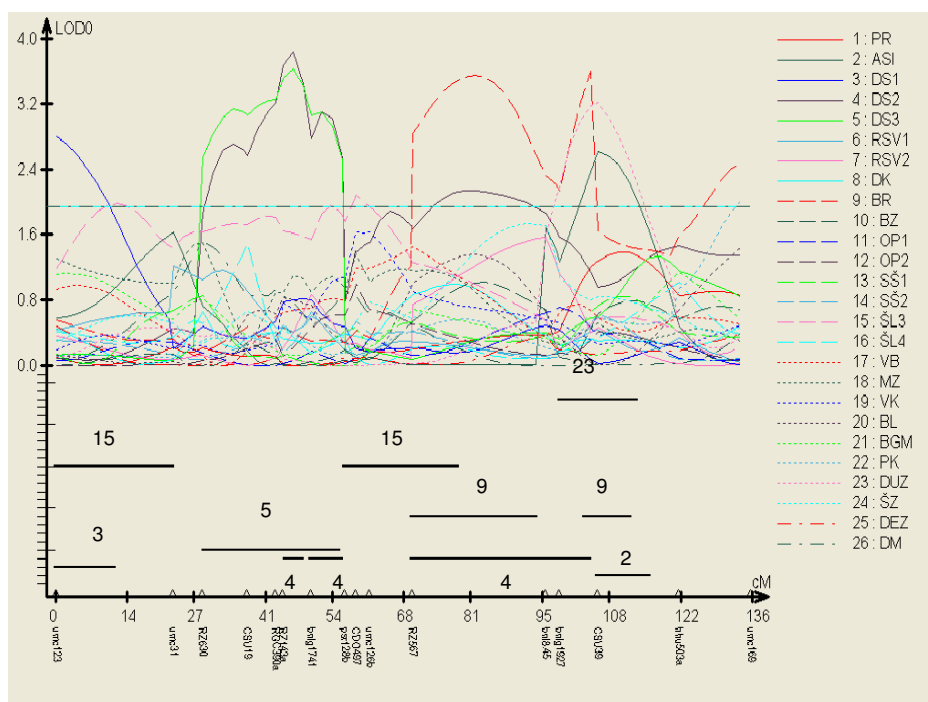
## Hromozom 2



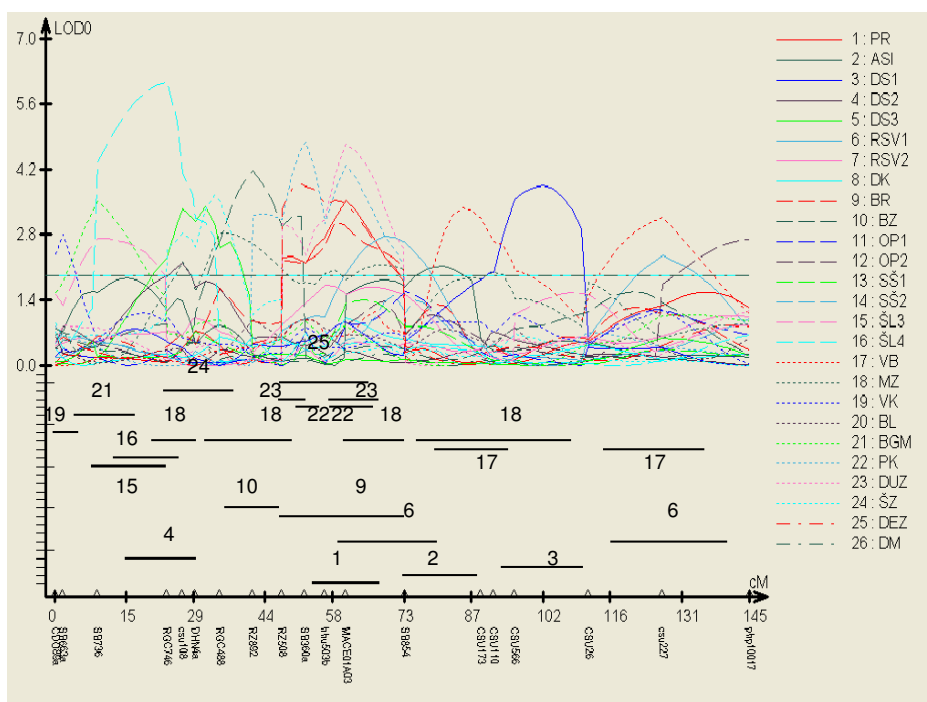
## Hromozom 3



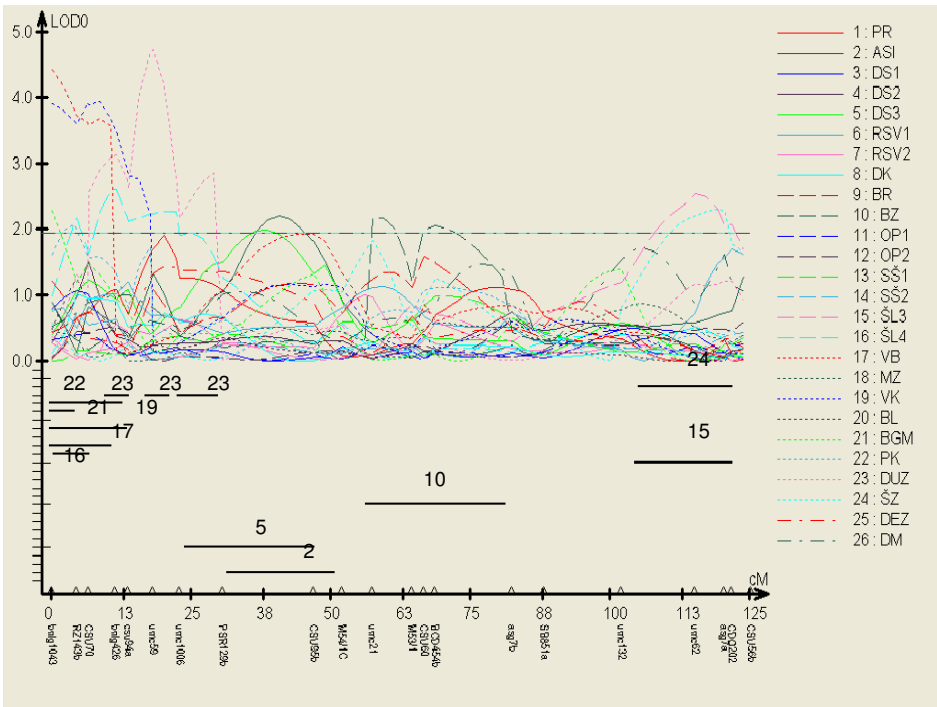
## Hromozom 4



## Hromozom 5

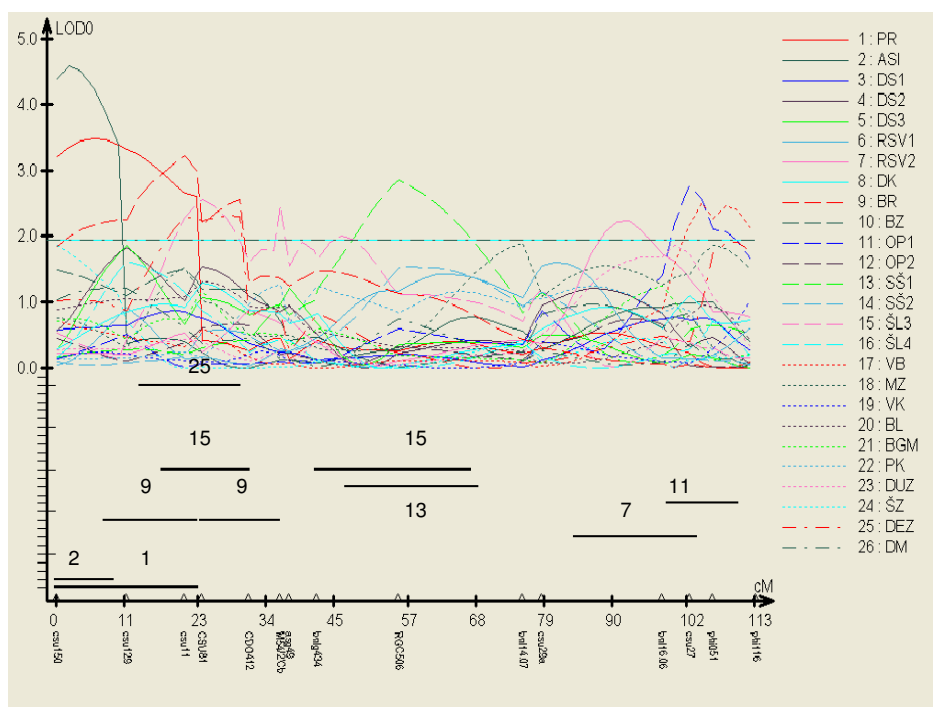


## Hromozom 6

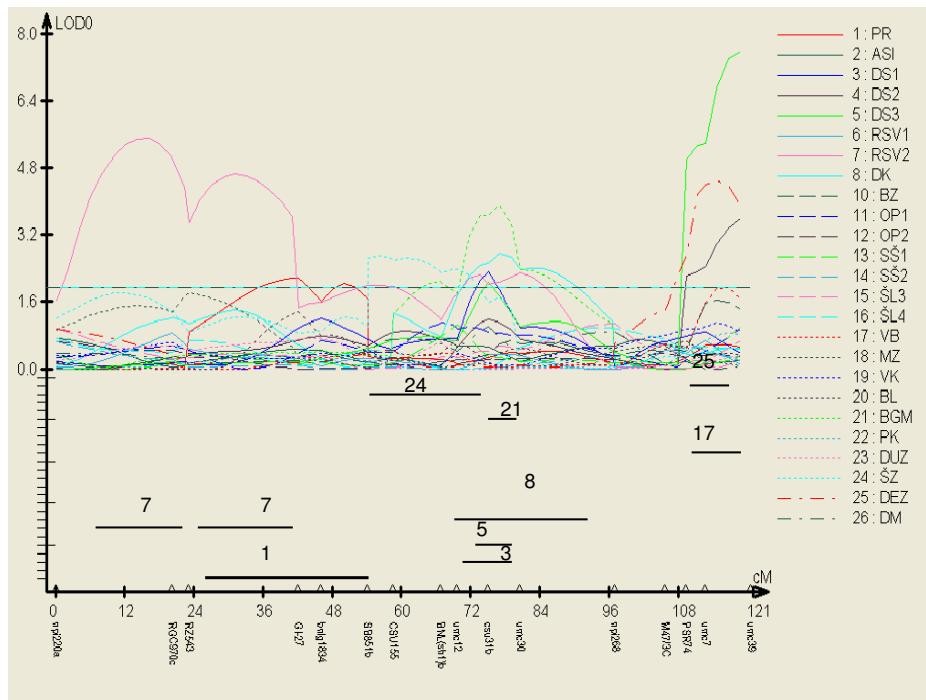




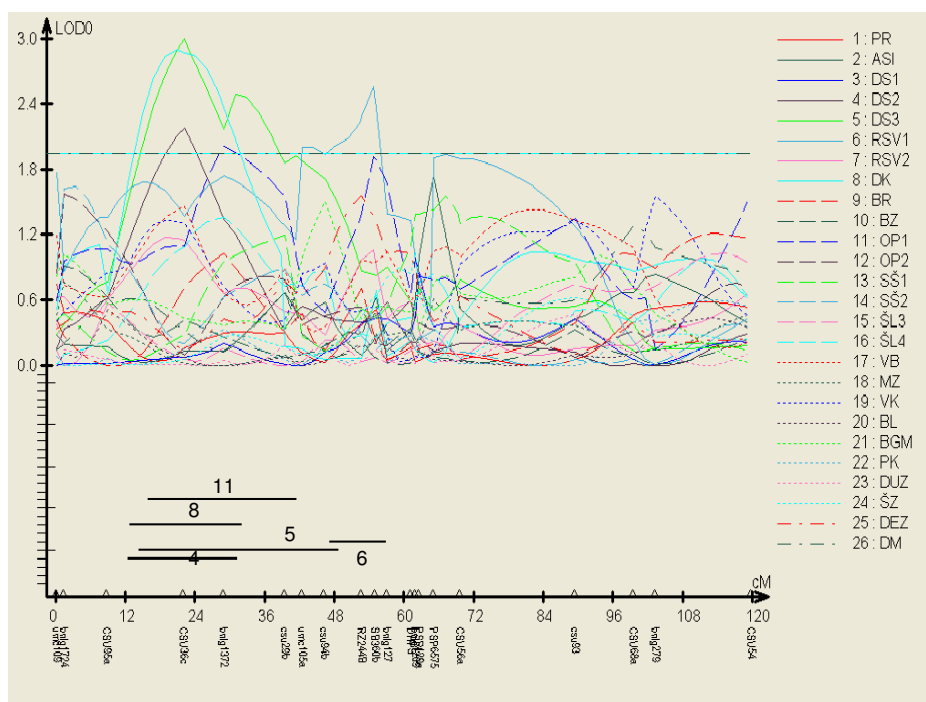
## Hromozom 7



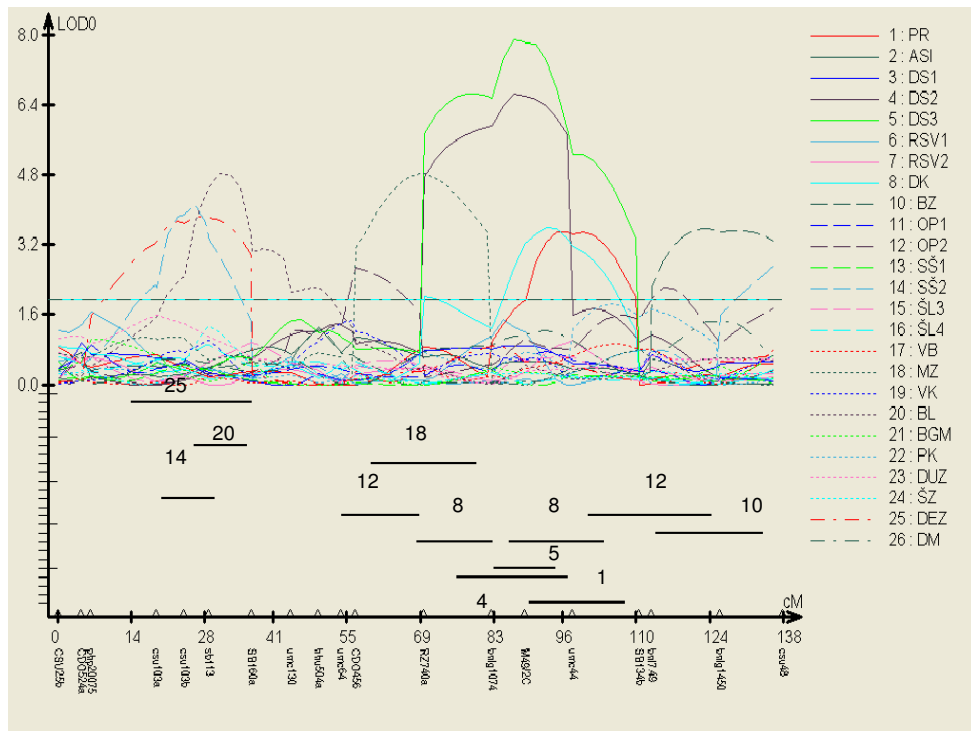
## Hromozom 8



## Hromozom 9



## Hromozom 10



## BIOGRAFIJA

Ana Nikolić je rođena 1975. godine u Prištini, Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Aleksandrovcu. Diplomirala je 2001. godine na odseku Molekularna biologija i fiziologija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Iste godine upisala je posle diplomске studije na Biološkom fakultetu, radi sticanja zvanja magistar bioloških nauka. Kao stipendista Ministarstva za nauku bila je angažovana na projektu „Ispitivanje strukture i funkcije genoma kukuruza“ u laboratoriji za Biotehnologiju Instituta za kukuruz. Magistarski rad pod nazivom „Karakterizacija genotipova soje molekularno-genetičkim metodama“ odbranila je 2005. godine. Iste godine zaposlena je u laboratoriji za Biotehnologiju Instituta za kukuruz i od tada je uključena u istraživanja tolerantnosti kukuruza na stres suše, a bavi se i primenom molekularnih markera u ispitivanju genetičkog diverziteta populacija kukuruza iz banke gena Instituta za kukuruz, kao i u karakterizaciji linija i hibrida kukuruza. Pohađala je jedan međunarodni kurs iz primene biotehnologije u poljoprivredi (The 6<sup>th</sup> International course on Biotechnology and Bioinformatic in Agriculture: Plants and Microorganisms, May 8 – July 6, 2006, The Hebrew University of Jerusalem, The Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, Rehovot) i boravila na kraćem usvršavanju u SAD (Norman E. Borlaug International Agriculture Science and Technology Fellowship Program, Ohio State University, OARDC, Wooster, October 15 – November 18, 2007). Rezultate svojih istraživanja objavila je u preko 20 naučnih radova publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ана Николић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Идентификација генских локуса (QTL) укључених у контролу одговора кукуруза (Zea mays L.) на стрес суше“

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

Потпис докторанда

У Београду, 6.4.2012.

Николет Ана

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ана Николић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада „Идентификација генских локуса (QTL) укључених у контролу  
одговора кукуруза (*Zea mays* L.) на стрес суше“

Ментори: Ванредни професор др Марина Стаменковић Радак, Биолошки  
факултет, Универзитет у Београду

Виши научни сарадник др Драгана Игњатовић-Мицић, Институт за  
кукуруз „Земун Поље“, Београд

Потписани Николић Ана

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 6.4.2012.

Николић Ана

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

„Идентификација генских локуса (QTL) укључених у контролу одговора кукуруза (*Zea mays* L.) на стрес суше“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 6.4.2012.

Николић Ана



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.