

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija S. Kostadinović

**SELEKCIJA LINIJA KUKURUZA SA
POBOLJŠANIM KVALITETOM
PROTEINA I ADAPTIRANIH NA
UMERENO KLIMATSKO PODRUČJE
UPOTREBOM MOLEKULARNIH
MARKERA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija S. Kostadinović

**MARKER ASSISTED SELECTION FOR
QUALITY PROTEIN MAIZE INBRED
LINES ADAPTED TO TEMPERATE
REGIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

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

dr Dragana Ignjatović-Mičić, naučni savetnik,
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

Član komisije za ocenu doktorske disertacije:

dr Jelena Vančetović, naučni savetnik,
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ što mi je omogućio izradu ove doktorske disertacije.

Želim od srca da se zahvalim svom mentoru u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ dr Dragani Ignjatović-Micić na velikoj podršci, pomoći, usmeravanju, stručnim savetima i svemu što me je oblikovalo u mom istraživačkom radu i omogućilo izradu doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svom mentoru sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu prof dr Marini Stamenković Radak na izuzetnoj profesionalnosti i pristupačnosti, kao i na veoma korisnim sugestijama tokom doktorskih studija i izrade ove disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem dr Jeleni Vančetović na dragocnim stručnim savetima, idejama i predlozima, kao i na podršci i zalaganju pri izradi disertacije.

Veliko hvala kolegama iz Laboratorije za molekularnu genetiku i fiziologiju, a naročito dr Danijeli Ristić na nesebičnoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dela disertacije kako u laboratoriji, tako i u polju, kao i Snežani Mladenović Drinić, rukovodiocu projekta „Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim oplemenjivanjem“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru koga je izrađena ova disertacija.

Zahvaljujem se dr Sofiji Božinović na organizacionoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnog dela disertacije u poljskim ogledima, kao i pri statističkoj obradi rezultata.

Hvala članovima istraživačke grupe dr Jelene Vančetović i mr Gorana Stankovića na tehničkoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnog dela disertacije u poljskim ogledima.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na ogromnoj podršci i ljubavi. Ovu disertaciju posvećujem mami koja je najzaslužnija za sve ono što jesam danas.

SELEKCIJA LINIJA KUKURUZA SA POBOLJŠANIM KVALITETOM PROTEINA I ADAPTIRANIH NA UMERENO KLIMATSKO PODRUČJE UPOTREBOM MOLEKULARNIH MARKERA

REZIME

Hranljiva vrednost kukuruza je niska zbog niskog sadržaja dve esencijalne aminokiseline - lizina i triptofana. Poboljšanje hranljive vrednosti kukuruza predstavlja jedan od glavnih ciljeva savremenih programa oplemenjivanja zbog sve značajnijih klimatskih promena i rasta ljudske populacije, odnosno sve veće potrebe za hranom. Najveći uspeh postignut je 60-ih godina prošlog veka otkrićem *opaque2 (o2)* mutanta sa superiornim hranljivim svojstvima. Međutim, plejotropni efekti *o2* mutacije čine endosperm zrna kukuruza mekim, a samo zrno osetljivim na pucanje, trulež i štetočine. Istraživači Međunarodnog centra za poboljšanje pšenice i kukuruza u Meksiku (eng. *International Maize and Wheat Improvement Center - CIMMYT*) su metodama konvencionalnog oplemenjivanja stvorili kukuruz visokog kvaliteta proteina (eng. *Quality Protein Maize – QPM*), koji istovremeno ima visoku hranljivu vrednost proteina endosperma i dobre agronomske performanse.

Iako je QPM razvijen klasičnim metodama selekcije, poslednjih godina se sve više primenjuje selekcija upotrebom molekularnih markera (eng. *Marker Assisted Selection - MAS*) sa ciljem poboljšanja elitnih linija za kvalitet proteina. Unutar sekvence *o2* gena identifikovana su tri različita SSR markera – phi057, phi112 i umc1066, koji se koriste za utvrđivanje polimorfizma inbred linija i kao selekциони markeri za *o2* gen (eng. *foreground selection*). Molekularni markeri se koriste i radi utvrđivanja procenta genoma rekurentnog roditelja u potomstvima povratnih ukrštanja (eng. *background selection*). Primena *foreground* i *background* selekcije smanjuje broj generacija potrebnih za stvaranje željenog genotipa klasičnim metodama selekcije koje se zasnivaju na fenotipskom odabiru biljaka.

Osnovni cilj ovog rada bio je dobijanje linija kukuruza poboljšanog kvaliteta proteina adaptiranih na umereno klimatsko područje, korišćenjem specifičnih molekularnih markera za *opaque2* gen, kao i da se održe dobre agronomske osobine i kombinaciona sposobnost poboljšanih linija. Za poboljšanje kvaliteta proteina korišćene

su, kao rekurentni roditelji (recipijenti *o2* recesivne mutacije), elitne linije standardnog kvaliteta zrna ZPL 3 i ZPL 5. Kao izvor povećanog sadržaja triptofana i lizina (donor *o2* recesivne mutacije) korišćena je tropska QPM linija CML 144. Identifikacija i potvrda rezultata QPM selekcije podrazumevala je biohemijske analize (određivanje sadržaja proteina, triptofana i izračunavanje indeksa kvaliteta - procenta triptofana u proteinu), kao i evaluaciju agronomski važnih osobina u poljskim ogledima.

Kao rezultat ovog rada dobijeno je trinaest linija povećanog sadržaja triptofana (od 37-50% u odnosu na početnu vrednost roditeljske standardne linije), povećanog indeksa kvaliteta (42-56% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), očuvane genetičke sličnosti sa rekurentnom linijom (93% genoma rekurentnog roditelja), visokog stepena modifikacije endosperma zrna (100% zrna tvrdog endosperma), povećanog prinosa zrna (11-31% u odnosu na roditeljsku liniju) i očuvanih odličnih kombinacionih sposobnosti. Biohemijski parametri su pokazali pozitivne korelacije sa prinosom zrna, što ukazuje na mogućnost paralelne selekcije na povećani prinos i poboljšanje kvaliteta zrna u ispitivanom materijalu. Na osnovu dobijenih korelacija između ispitivanih biohemijskih i fenotipskih osobina, za dobijanje genotipova sa većim sadržajem triptofana i indeksa kvaliteta mogla bi se preporučiti selekcija na visinu biljke, dužinu klipa i broj redova zrna. Između hibrida sa roditeljskom linijom ZPL 5 i hibrida sa odabranim BC₂F₃ potomstvima, za većinu ispitivanih fenotipskih osobina nisu utvrđene statistički značajne razlike, što je ukazalo da su kod sub-linija poboljšanog kvaliteta očuvane dobre kombinacione sposobnosti roditeljske linije ZPL 5. Mali procenat zrna sa mekim endospermom kod ispitivanih hibrida potvrdio je prisustvo gena modifikatora za tvrdoću endosperma.

Kombinacijom konvencionalnog i molekularnog oplemenjivanja dobijene su linije poboljšanog kvaliteta proteina, koje su adaptirane na uslove umerenog klimatskog područja i mogu se preporučiti za programe stvaranja QPM hibrida.

Ključne reči: hranljiva vrednost kukuruza, selekcija upotrebom molekularnih markera - MAS, *opaque2*, QPM (*Quality Protein Maize*)

Naučna oblast: BIOLOGIJA

Uža naučna oblast: MOLEKULARNA GENETIKA BILJAKA

UDK broj: [[631.527:633.15]:577.112.387]:551.581.22(043.3)

MARKER ASSISTED SELECTION FOR QUALITY PROTEIN MAIZE INBRED LINES ADAPTED TO TEMPERATE REGIONS

SUMMARY

Maize nutritional quality is poor due to the low levels of two essential aminoacids - lysine and tryptophan. Because of the climatic changes and increased food demands due to the human population growth, improvement of the maize nutritional quality is one of the main goals of many breeding programs. A major breakthrough has been the isolation of the *opaque2* (*o2*) mutant with superior nutritional properties in the 1960s. However, pleiotropic effect of the *o2* mutation makes the maize endosperm soft and susceptible to cracking, ear rots, and storage pests. Using conventional breeding methodologies, interdisciplinary research team in the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico, created the new, agronomically acceptable and nutritionally improved *opaque2* types by the name of Quality Protein Maize (QPM).

Although QPM was created through conventional breeding, marker assisted selection (MAS) is becoming increasingly used approach for improvement of protein quality in maize. Three simple sequence repeats (*phi057*, *phi112* and *umc1066*), located as internal repetitive sequences within the *o2* gene, are being utilized as foreground selection markers for the *o2* gene. Molecular markers are also effectively employed for identification of the genotypes with the highest proportion of recurrent parent genome (background selection). Both foreground and background selection decrease the number of the generations required to create desirable genotype through conventional breeding based on the phenotypic selection.

The main objective of this research was to create high quality protein maize lines adapted to temperate regions using *opaque2* specific molecular markers, while maintaining their good agronomic performances and combining abilities. Two elite inbred lines - ZPL 3 and ZPL 5 were selected as the recurrent parents, to be the recipients of the *o2* allele and to improve the tryptophan content. CML 144, a QPM tropical inbred line, was selected as the donor line of *o2*. Identification and confirmation of the QPM selection results involved biochemical analysis (determination of protein

content, tryptophan content and quality index - tryptophan to protein ratio) and evaluation of the agronomically important traits in the field trials.

As the result of this research, 13 lines were created that have 37-50% increased tryptophan content compared to their normal version, 42-56% increased quality index, 93% recovery of the recurrent parent genome, 100% kernels with hard endosperm, 11-31% increase in grain yield and preserved combining abilities. Positive correlations were found between grain yield and biochemical parameters, indicating potential simultaneous selection and improvement for these traits. Based on the correlations found between biochemical and phenotypic parameters, selection for the plant height, ear length and kernel row number could be recommended for development of high quality maize genotypes. Significant differences were not found for the majority of the agronomic traits between hybrids created with ZPL 5 and hybrids with selected BC₂F₃ progenies, what has confirmed that combining abilities of the parental line ZPL 5 are preserved. Also, small percentage of the soft endosperm kernels of the analyzed hybrids confirmed the presence of the modifier genes that cause the formation of a hard, vitreous endosperm.

Using the integrated conventional and molecular breeding approach, we created high protein quality maize lines adapted to temperate regions, that can be considered as candidate parents for developing QPM hybrids.

Key words: maize nutritional value, marker assisted selection (MAS), *opaque2*, quality protein maize (QPM)

Scientific field: BIOLOGY

Special topic: MOLECULAR GENETICS OF PLANTS

UDK number: [[631.527:633.15]:577.112.387]:551.581.22(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Značaj i poreklo kukuruza	1
1.2. Kvalitet zrna kukuruza.....	2
1.3. Kvalitet proteina kukuruza.....	4
1.3.1 Značaj kukuruza visokog kvaliteta proteina.....	6
1.4. Molekularno genetički pristup u oplemenjivanju biljaka	8
1.4.1. Genetički markeri.....	8
1.4.1.1. Molekularni markeri.....	10
1.4.2. Selekcija pomoću molekularnih markera - MAS.....	12
1.4.3. Primena molekularnih markera u procesu stvaranja kukuruza visokog kvaliteta proteina.....	15
1.4.3.1. <i>Opaque2</i> gen.....	15
1.4.3.2. Geni modifikatori sadržaja aminokiselina.....	15
1.4.3.3. Geni modifikatori tvrdoće endosperma	16
1.4.3.4. Stvaranje genotipova visokog kvaliteta proteina.....	17
2. CILJ RADA	21
3. MATERIJAL I METODE.....	22
3.1. Biljni materijal	22
3.2. Molekularne analize.....	24
3.2.1. Izolacija DNK	24
3.2.1.1. Izolacija DNK iz lista	24
3.2.1.2. Izolacija DNK iz zrna.....	25
3.2.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK.....	26
3.2.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK	26
3.2.2.2. Elektroforetsko određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK na agaroznom gelu	27
3.2.3. SSR analiza	27

3.2.3.1. Analiza <i>opaque2</i> specifičnim SSR markerima.....	27
3.2.3.2. Genetička karakterizacija SSR markerima	28
3.2.4. Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata	34
3.2.4.1. Agarozna elektroforeza	34
3.2.4.2. Poliakrilamidna elektroforeza	34
3.2.5. Statistička analiza podataka dobijenih molekularnim markerima.....	35
3.2.5.1. Genetička sličnost.....	35
3.2.5.2. Klaster analiza	35
3.3. Biohemijske analize	36
3.3.1. Priprema uzoraka.....	36
3.3.2. Sadržaj triptofana	36
3.3.3. Sadržaj proteina.....	38
3.3.4. Indeks kvaliteta	39
3.3.5. Statistička analiza biohemijskih osobina.....	39
3.4. Stepen modifikacije endosperma zrna kukuruza	40
3.5. Analiza morfoloških i agronomskih osobina	40
3.5.1. Statistička analiza fenotipskih osobina	44
4. REZULTATI.....	45
4.1. Genetička i biohemijska karakterizacija roditeljskih linija.....	45
4.1.1. Analiza roditeljskih linija <i>opaque2</i> specifičnim markerima	45
4.1.2. Određivanje genetičke sličnosti između roditeljskih linija	46
4.1.3. Biohemijska analiza roditeljskih linija.....	46
4.2. Genetička karakterizacija potomstava povratnih ukrštanja (BC ₁ i BC ₂)	47
4.2.1. Analiza biljaka BC ₁ i BC ₂ generacija <i>opaque2</i> specifičnim markerima	47
4.2.2. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC ₂ generacije.....	49
4.3. Genetička, fenotipska i biohemijska karakterizacija potomstava dobijenih samooplodnjom povratnih ukrštanja (BC ₂ F ₂ , BC ₂ F ₃ i BC ₂ F ₄).....	54
4.3.1. Analiza biljaka BC ₂ F ₂ generacije <i>opaque2</i> specifičnim markerima	54
4.3.2. Genetička i fenotipska karakterizacija BC ₂ F ₃ generacije.....	54

4.3.2.1. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC ₂ F ₃ generacije	54
4.3.2.2. Analiza fenotipskih osobina BC ₂ F ₃ generacije	57
4.3.3. Genetička, fenotipska i biohemijska karakterizacija BC ₂ F ₄ generacije	61
4.3.3.1. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC ₂ F ₄ generacije	61
4.3.3.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna BC ₂ F ₄ generacije..	63
4.3.3.3. Biohemijska evaluacija BC ₂ F ₄ generacije	64
4.3.3.4. Izbor sub-linija za fenotipsku i biohemijsku evaluaciju.....	65
4.4. Fenotipska i biohemijska evaluacija odabranih sub-linija	67
4.4.1. Analiza fenotipskih osobina odabranih sub-linija.....	67
4.4.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna odabranih sub-linija....	71
4.4.3. Biohemijska analiza odabranih sub-linija	71
4.4.4. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i sub-linija povećanog sadržaja triptofana	76
4.5. Fenotipska evaluacija hibrida	78
4.5.1. Analiza fenotipskih osobina hibrida.....	78
4.5.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna hibrida	82
5. DISKUSIJA.....	83
6. ZAKLJUČCI.....	99
7. LITERATURA	101

1.UVOD

1.1. Značaj i poreklo kukuruza

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jedna od najvažnijih gajenih žitarica na svetu, a u Srbiji se po proizvodnji nalazi na prvom mestu. Veći deo (oko 78%) svetske proizvodnje, sa preko 800 miliona tona godišnje, usmeren je na proizvodnju stočne hrane. Međutim, potreba za korišćenjem kukuruza u ljudskoj ishrani se stalno povećava, naročito u sub-saharskom delu Afrike i Latinskoj Americi, sa procenjenom godišnjom stopom rasta od 1,3% do 2020. godine (Ortiz i sar., 2010). Globalna predviđanja ukazuju da će do 2025. godine kukuruz postati usev sa najvećom proizvodnjom, kao i da će se u zemljama u razvoju do 2050. potreba za ovom kulturom udvostručiti (Rosegrant i sar., 2008).

Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agriculture Organisation* - FAO) iz 2013. godine, kukuruz je u Srbiji zauzimao površinu od 1,31 milion ha, sa prosečnim prinosom od 4,94 t/ha i ukupnom proizvodnjom od 6,48 miliona tona. Kukuruz je takođe i glavni izvozni proizvod srpske poljoprivrede i, prema FAO, 2011. godine izvezeno je više od 1,6 miliona tona. Kukuruz može da se koristi u ljudskoj ishrani, kao hrana za stoku i kao sirovina u industriji. U našoj zemlji kukuruz se najviše koristi u ishrani životinja, gde se za potrebe silaže koristi cela biljka, kao i u ljudskoj ishrani i proizvodnji skroba. Od kukuruza se dobija brašno, griz, skrob, ulje i sirup, čest je sastavni deo mnogih namirnica (hleb, kolači, keks, supe, sosovi, kaše, kokice). U industrijskoj proizvodnji, procesima fermentacije i destilacije dobija se alkohol (čak i neki tipovi viskija), a kukuruz se sve više koristi i za proizvodnju bioetanolu i biorazgradive plastike (Torney i sar., 2007; Schgiwietzke i sar., 2008). Pored agronomskog značaja, kukuruz služi i kao model organizam za osnovna istraživanja. Najdetaljnije je istražen genetički sistem među žitaricama i genom je sekvenciran i mapiran 2009. godine (Schnable i sar., 2009).

Kukuruz je domestifikovan od divlje trave teozinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*) u Centralnoj Americi pre oko 9000 godina (Matsuoka i sar., 2002). U vreme otkrića Novog Sveta posebno je bio rasprostranjen kod Asteka i Inka, odakle se širio do Severne Amerike i Kanade, kao i prema Južnoj Americi, do Čilea. Kukuruz je prvi put u

Evropu, odnosno na jug Španije, sa Karipskih ostrva doneo Kolumbo 1493. godine. Od tada je nastao veliki broj lokalnih populacija kukuruza u Evropi, putem prirodne selekcije i oplemenjivanja, što je dovelo do adaptacije na različite ekološke uslove i lokalnu upotrebu (Camus-Kulandaivelu i sar., 2006).

Različiti tipovi kukuruza na prostoru bivše Jugoslavije vode poreklo od kukuruza iz Severne Amerike, Južne Amerike i Meksika, a njihova introdukcija je trajala od XVI do XX veka. Pojavljivanje kukuruza na prostoru bivše Jugoslavije zabeleženo je 1572. godine u Dalmaciji, gde je stigao iz Italije, dok je u Srbiji njegovo gajenje počelo 1576. (Radić, 1872). Prve introdukovane sorte kukuruza bile su pretežno tvrduci nedovoljno adaptirani na tipove zemljišta i klimatske uslove, dok je druga introdukcija donela tvrduce iz Meksika i sa Anda, što je povećalo varijabilnost postojeće germplazme. Treća introdukcija se dogodila u XVIII veku i obuhvatala je tvrduce poreklom iz Kanade i Nove Engleske (SAD) koji su u naše krajeve stigli preko Slovenije i Hrvatske. Ovo je doprinelo formiranju sorti jedinstvene genetičke osnove koje su bolje adaptirane na hladnije klimatske uslove. Poslednja introdukcija se desila krajem XIX i početkom XX veka. Introdukovani su zubani iz Severne Amerike, a najznačajni za proizvodnju su bili zubani kukuruznog pojasa SAD-a. Spontanom ukrštanjem ovih zubana sa prethodno introdukovanim tvrdućima nastao je tip evropskog kukuruznog pojasa, što je bila poslednja veća prirodna hibridizacija značajna za evoluciju kukuruza u Evropi (Trifunović, 1978).

1.2. Kvalitet zrna kukuruza

U zrnju kukuruza su prisutni i makro- i mikronutrijenti. U makronutrijente spadaju ugljeni hidrati (skrob), lipidi i proteini, a u mikronutrijente minerali, vitamini i fitohemikalije. U zavisnosti od hemijskog sastava pojedinih genotipova kukuruz se koristi kao hrana za ljude, za ishranu životinja, ili kao sirovina za proizvodnju namirnica, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Sastav makro- i mikronutritijenata zrna je bio predmet mnogih istraživanja sa ciljem poboljšanja hranljive vrednosti kukuruza (Kurlich i Juvik, 1999; Shewry, 2007; Žilić i sar., 2011; Ignjatović-Micić i sar., 2015).

Kukuruz je bogat izvor energije. Zrno kukuruza prosečno sadrži 71,7% skroba, 9,5% proteina, 4,3% ulja, 1,4% pepela i 2,6% šećera (Watson, 2003). Skrob se sastoji od dva glukozna polimera - amilaze (21%) i amilopektina (79%). Ova dva polimera imaju različite fizičke karakteristike i oplemenjivanje za određena svojstva skroba uključuju promenu njihovih relativnih proporcija. Skrob je glavni izvor energije i glavna komponenta prinosa, a u industriji se koristi za dobijanje pasta i zaslađivača, proizvoda za apsorpciju vlage, zgušnjavanje (povećanje viskoziteta) različitih proizvoda, kao i za proizvodnju bioetanola.

Proteini kukuruza imaju nisku hranljivu vrednost zbog niskog sadržaja esencijalnih aminokiselina lizina, triptofana i metionina (Gernah i sar., 2011). Ljudi i monogastrične životinje ne mogu da sintetišu lizin i triptofan, već moraju da ih unose hranom. Prosečna vrednost sadržaja lizina od 2% u zrnu kukuruza je manja od polovine vrednosti preporučene od strane FAO za ljudsku ishranu. Dok je u razvijenim zemljama, u kojima je hrana raznovrsna, ovo zanemarljivo, u zemljama u kojima je kukuruz glavni izvor hranjivih materija ova činjenica predstavlja veliki problem. Prema procenama svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organisation* - WHO) iz 2005. godine, u zemljama u razvoju oko 32% predškolske dece je zakržljalo i nerazvijeno zbog nedovoljnog unosa proteina (Black i sar., 2008). Zato je kukuruz sa poboljšanim kvalitetom proteina neophodan za ishranu ljudi čiji je glavni izvor proteina upravo kukuruz. Takođe, nedostatak esencijalnih aminokiselina u ishrani životinja nadoknađuje se dodavanjem aditiva i proteinskih suplemenata, što znatno poskupljuje hranu za životinje. Kukuruz sa povećanim sadržajem ovih aminokiselina značajno bi doprineo smanjenju troškova za proizvodnju stočne hrane veće nutritivne vrednosti.

Kukuruzno ulje predstavlja koncentrovani izvor energije za životinje, a povećanje saržaja ulja u zrnu dovodi do povećanja kalorijske vrednosti kukuruznog zrna. Pored sadržaja ulja, veoma velika pažnja se obraća i na sastav masnih kiselina ulja. Upotreba kukuruznog ulja u ishrani ljudi se smatra poželjnom, zbog visokih sadržaja mononezasićenih ili polinezasićenih masnih kiselina. Stvaranje genotipova sa određenim sastavom masnih kiselina ima za cilj poboljšanje zdravlja ljudi (Lands, 2005). Kukuruzno ulje se koristi i u proizvodnji sapuna, melema, mastila, tekstila, nitroglicerina i insekticida. Takođe je i sirovina za proizvodnju biodizela.

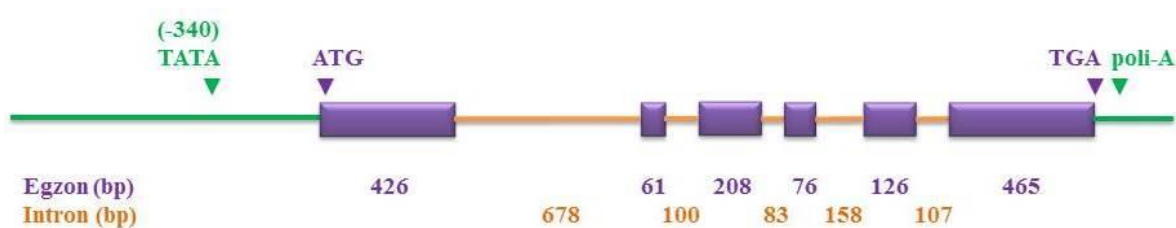
Kukuruz se takođe može upotrebiti i za proizvodnju funkcionalne hrane. To je hrana koja, pored uobičajenih nutritivnih efekata, utiče blagotvorno na jednu ili više zdravstvenih funkcija tela, poboljšavajući stanje zdravlja ili/i smanjujući rizik od bolesti (Diplock i sar., 1999). Tako, na primer, fitohemikalije kao što su karotenoidi, antocijanini i fenolna jedinjenja imaju visoku antioksidativnu aktivnost (Lopez-Martinez i sar., 2009). U većem broju eksperimenata je ukazano da umereno i dugotrajno unošenje nekih sekundarnih metabolita ima značajan efekat na smanjenje incidence kancera i mnogih hroničnih bolesti (Kutchen i Dixon, 2005). Funkcionalna hrana sadrži jednu ili više bioaktivnih komponenti. Stvorene su linije i hibridi kukuruza od kojih se dobijaju proizvodi koji imaju potencijalno značajne blagotvorne efekte, kao što su kukuruz s visokim sadržajem esencijalne aminokiseline lizina, i kukuruz sa visokim sadržajem β -karotena i antocijanina koji imaju antioksidativno dejstvo. Primer funkcionalne hrane je i hladno ceđeno ulje kukuruza koje smanjuje holesterol u krvi smanjujući njegovu apsorpciju (Ostlund i sar., 2002).

1.3. Kvalitet proteina kukuruza

Endosperm zrna kukuruza čine oko 90% skroba i 10% proteina. Proteini endosperma se prema rastvorljivosti mogu klasifikovati u albumine (rastvorljivi u vodi), globuline (rastvorljivi u solima), zeine ili prolamine (rastvorljivi u alkoholu) i gluteline (rastvorljivi u bazama). U endospermu zrna kukuruza standardnog kvaliteta, proporcije proteinskih frakcija iznose 3% albumina, 3% globulina, 60% zeina (prolamina) i 34% glutelina (Xu i sar., 2009). Zeini, dominantna frakcija proteina, su na osnovu strukture podeljeni u četiri familije: α -, β -, γ - i δ -zeini (Esen, 1986; Kirihara i sar., 1988; Thompson i Larkins, 1989). α -zeini su polipeptidi molekularne težine 19 kDa i 22 kDa i čine oko 60% ukupnih zeina (Larkins i sar., 1989). β -zeini, polipeptidi od 15kDa, predstavljaju 5 - 10% zeina i sadrže manje prolina, ali više cisteina i metionina nego α -zeini. γ -zeini su druga najzastupljenija grupa zeina sa oko 25%, mada mogu biti prisutni i do 50% ukupnih zeina (Ortega i Bates, 1983). To su polipeptidi od 16 kDa, 27 kDa i 50 kDa i veoma su bogati prolinom i cisteinom. δ -zeini su najmanje zastupljena frakcija zeina (5%), molekularne težine od 10 kDa i 18kDa, koji su jako bogati aminokiselinama koje sadrže sumpor.

Zeini imaju nizak sadržaj nekoliko esencijalnih aminokiselina – treonina, histidina, cisteina, metionina i lizina, dok su u potpunosti lišeni triptofana (Sofi i sar., 2009). Lizin i triptofan su najdeficitarnije esencijalne aminokiseline. S druge strane, ne-zeinski proteini imaju izbalansiran i visok sadržaj lizina i triptofana (Vasal, 2000). Poboljšanje kvaliteta proteina kukuruza podrazumeva povećanje ne-zeinske frakcije i represiju sinteze zeina.

Značajna istraživanja na poboljšanju kvaliteta proteina kukuruza su započeta 60-ih godina prošlog veka, nakon otkrića prirodnih mutanata koji imaju veći sadržaj lizina i triptofana - *opaque2* (*o2*), *floury2* (*fl2*), *opaque7* (*o7*), *opaque6* (*o6*) i *floury3* (*fl3*) (Mertz i sar., 1964; Nelson i sar., 1965; McWhirter, 1971; Ma i Nelson, 1975). Recesivna mutacija *o2* se pokazala kao najpogodnija za genetičke manipulacije u programima oplemenjivanja radi stvaranja visoko lizinskog kukuruza. Genotipovi kukuruza koji su recesivno homozigotni (*o2o2*) imaju značajno veći sadržaj lizina i triptofana nego genotipovi koji su heterozigotni (*O2o2*) ili dominantno homozigotni (*O2O2*) za *opaque2* lokus (Crow i Kermicle, 2002).



Slika 1. Šematski prikaz strukture *opaque2* gena (modifikovano iz Hartings i sar., 1989). Na slici su označeni TATA blok, start kodon (ATG), stop kodon (TGA) i poli-(A)-rep. Otvoreni okvir čitanja je podeljen na egzone (pravougaonik) i introne (linija), čije su veličine u baznim parovima (bp) označene ispod svakog od njih.

Opaque2 gen je kloniran (Schmidt i sar., 1987; Motto i sar., 1988) i identifikovane njegove glavne strukturne karakteristike (Hartings i sar., 1989). Region sa najvećom homologijom TATA bloku (5'-CTATTTG-3') počinje 339 bp „uzvodno“ od početka gena. Otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame* - ORF) obuhvata 1362 bp i sastoji se od šest egzona veličine od 465 do 61 bp, kao i pet introna, smeštenih u centralnom delu gena, veličine od 678 bp do 83 bp. Stop kodon TGA nalazi se na poziciji 2490, a poli-(A)-rep počinje 34 baza nakon poliadenilacijskog signala (Slika 1).

Opaque2 gen se nalazi na kraćem kraku hromozomu 7 (bin 7.01) i njegova ekspresija se odvija specifično u endospermu zrna deset dana nakon polinacije (Gallusci i sar., 1994). Izolacija i karakterizacija *opaque2* gena pokazala je da on kodira transkripcioni faktor koji reguliše sintezu zeina, a koji pripada grupi „basic leucine zipper (bZIP)“ aktivatora (Schmidt i sar., 1990). O2 protein aktivira transkripciju gena koji pripadaju različitim metaboličkim putevima - 22 kDa α -zeina (Schmidt i sar., 1992) i 15 kDa β -zeina (Cord Neto i sar., 1995), *b-32* (Lohmer i sar., 1991) i *cyPpdk1* (jedan od dva citosolna izoforma piruvat-ortofosfat-kinaze) (Maddaloni i sar., 1996).

Ovaj gen redukuje produkciju zeina, čime se povećava količina lizina i triptofana (Damerval i Devienne, 1993), a utiče i na sintezu enzima koji je u vezi sa razgradnjom lizina (Brochettobraga i sar., 1992). Nekoliko studija je pokazalo da je dejstvo ključnih enzima u metabolizmu aminokiselina izmenjeno kod *o2* kukuruza, povećavajući sadržaj lizina i triptofana. Aktivnost aspartat-kinaze, važnog enzima u sintezi lizina, je kod *o2* povećana (Brennecke i sar., 1996), dok je aktivost lizin-ketogluterat-reduktazo-dehidrogenaze smanjena (Kemper i sar., 1999), što dovodi do visokog sadržaja lizina u endospermu.

1.3.1 Značaj kukuruza visokog kvaliteta proteina

Pleiotropni efekat *opaque2* gena je uzrokovao da njegova inkorporacija u visoko prinodne komercijalne hibride bude neuspešna zbog brojnih agronomskih nedostataka i problema u preradi – smanjenog prinosa, mekog endosperma, brašnjavog i nepopunjenog izgleda zrna, kao i osetljivosti na trulež klipa i skladišne štetočine (Bjarnason i Vasal, 1992; Vasal, 2001). Ovi problemi su izazvali obustavljanje većine

istraživanja, a među institutima koji su nastavili rad najviše uspeha postigli su istraživači Međunarodnog centra za poboljšanje pšenice i kukuruza u Meksiku (eng. *International Maize and Wheat Improvement Center - CIMMYT*). Metodama konvencionalnog oplemenjivanja uspeali su da meki endosperm zrna konvertuju u tvrdi, povećaju prinos zrna do nivoa najprinosnijeg kukuruza standardnog kvaliteta zrna i učine ga otpornijim na bolesti i štetočine (Vivek i sar., 2008). Dobijeni kukuruz visokog kvaliteta proteina (eng. *Quality Protein Maize – QPM*) istovremeno ima visoku nutritivnu vrednost proteina endosperma i dobre agronomske performanse.

Iako je QPM stvoren prvenstveno za korišćenje u regionima u kojima je, zbog siromaštva, kukuruz glavna ljudska hrana, postoje mnogi razlozi za njegovu proizvodnju i korišćenje i u ostalim regionima sveta. Nekoliko studija (Bressani, 1991; Akuamo-Boateng, 2002; Krivanek i sar., 2007; Mbuya i sar., 2011) je pokazalo pozitivne efekte prilikom ishrane ljudi i životinja ovim kukuruzom. Zbog visokog kvaliteta proteina (80 - 90 % vrednosti proteina mleka) i visoke biološke vrednosti, QPM može zameniti proteine animalnog porekla u ishrani ljudi i monogastričnih životinja. Pored kvalitetnijih proteina, QPM ima i povećan sadžaj niacina (vitamin B₃) i poboljšano iskorišćavanje kalcijuma i karotena (Prassana i sar., 2001). Takođe je bogatiji u sadržaju gvožđa i cinka (Agrawal i sar., 2010). Značaj gajenja QPM hibrida postaje sve veći kada se ima u vidu uticaj klimatskih promena (povećanje temperature vazduha i smanjenje količine padavina) na smanjenje prinosa kukuruza. Zbog dvostruko bržeg prirasta telesne težine životinja i boljeg iskorišćavanja pripremljenog obroka od QPM kukuruza (Burgoon i sar., 1992), deo proizvedenog standardnog kukuruza bi se mogao preusmeriti za druge potrebe, kao što je proizvodnja etanola.

Značaj QPM kukuruza potvrđuje i činjenica da se 1977. godine ovaj kukuruz gajio samo na teritoriji četiri države, a u 2003. godini u 23 države na površini od 3,5 miliona hektara (Sofi i sar., 2009). CIMMYT je proizveo širok spektar QPM germplazme adaptirane na uslove tropskih i subtropskih predela. Među zemljama u razvoju izdvajaju se nacionalni istraživački programi stvaranja QPM genotipova u Južnoj Africi, Brazilu, Kini, Gani i Indiji. Prema Gill (2008), očekuje se da 2020. godine u Kini 30 % područja na kome se gaji kukuruz bude pod QPM kukuruzom. U 17 država sub-saharske Afrike QPM se gaji na otprilike 200,000 ha, od čega 70,000 pripada Gani. Međutim, nešto veći izazov je stvaranje QPM genotipova adaptiranih na

uslove umerenih klimatskih područja. Prvi pokušaj adaptacije QPM genotipova na uslove severnoameričkog kontinenta učinjen je na Univerzitetu Severne Dakote (eng. *The North Dakota State University - NDSU*), gde je stvoreno 50 QPM genotipova (Carena, 2013).

U Institutu za kukuruz "Zemun Polje" istraživanja na *opaque2* mutaciji i poboljšanju kvaliteta kukuruza započeta su 70 - ih godina prošlog veka (Denić i sar., 1979). Poslednjih nekoliko godina razvijen je program stvaranja genotipova kukuruza visokog kvaliteta proteina adaptiranih na umereno klimatsko područje (Ignjatović-Micić i sar., 2009; Ignjatović-Micić i sar., 2010; Ignjatović-Micić i sar., 2013). Pored konvencionalnih metoda oplemenjivanja, deo programa se odnosi na upotrebu specifičnih molekularnih markera u procesu stvaranja QPM linija (Kostadinović i sar., 2014).

1.4. Molekularno genetički pristup u oplemenjivanju biljaka

1.4.1. Genetički markeri

Genetički markeri predstavljaju delove genoma koji odražavaju genetičke razlike između različitih vrsta ili jedinki iste vrste, a na osnovu kojih se indirektno dobija informacija o genima (ili delovima genoma) uključenih u ekspresiju ispitivane osobine. Oni predstavljaju polimorfizam u strukturi DNK ili produkata ekspresije, koji je moguće detektovati (Sunnucks, 2000). Idealan marker mora da ispunjava sledeće kriterijume: 1) visok stepen polimorfizma (da postoji u različitim oblicima tako da se mogu razlikovati različite varijante alela), 2) ravnomerna raspoređenost po genomu, 3) kodominantno nasleđivanje, 4) mogućnost da se lokus lako i brzo uoči u ranim fazama razvića, 5) odsustvo uticaja faktora spoljašnje sredine na njihovu detekciju (Smith, 1987). Markeri igraju važnu ulogu u proučavanju varijabilnosti, konstrukciji mapa i detektovanju povezanih gena kod različitih genotipova i mogu se svrstati u grupe: morfološki, biohemijski i molekularni.

Morfološki markeri su vezani za morfološke i agronomske osobine čije se nasleđivanje prati posmatranjem pojave određenog fenotipa (Tanksley, 1983). Oni su pod uticajem spoljašnje sredine, varijabilnost koja se kod njih procenjuje ne odgovara uvek varijabilnosti na nivou genoma usled interakcije genotipa i sredine na fenotipsko ispoljavanje osobine i njihovom upotrebom nije moguće razlikovati heterozigote od homozigota. Zbog toga je ova vrsta markera nepouzdana i subjektivna.

Biohemijski markeri se zasnivaju na polimorfizmu proteina i obuhvataju strukturne proteine, rezervne proteine semena i izoenzime. Izoenzimi predstavljaju različite molekulske forme jednog enzima sa istom katalitičkom funkcijom, a razlikuju se u pH vrednosti i koncentraciji supstrata pri kojoj pokazuju enzimski efekat. Izoenzimi su alelne varijante enzima kodirane od strane istih strukturnih gena. Osnovni nedostatak izoenzima je njihov relativno mali broj i nizak nivo polimorfizma.

Molekularni markeri su fragmenti DNK molekula, koji mogu biti deo gena ili nekodirajućih delova genoma. Upotreba molekularnih markera je zasnovana na DNK polimorfizmu, koji čini osnovu u dizajniranju strategija za njihovo korišćenje u određene svrhe. DNK markeri nisu pod uticajem spoljašnje sredine, lako se izoluju iz biljnog materijala, a analize su relativno jednostavne i efikasne.

Različite vrste molekularnih markera mogu se podeliti u dve grupe:

- 1) markeri zasnovani na hibridizaciji:
 - RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata)
- 2) markeri zasnovani na lančanoj reakciji polimeraze:
 - AFLP (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata)
 - RAPD (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA* - nasumično umnožena polimorfna DNK)
 - SSR (eng. *Simple Sequence Repeat* - ponovci jednostavnih sekvenci)
 - STS (eng. *Sequence Tagged Site* - markeri poznate sekvence i lokacije u genomu)
 - SNP (eng. *Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfizam pojedinačnih nukleotida).

1.4.1.1. Molekularni markeri

Molekularni markeri imaju značajnu primenu u istraživanjima genoma biljaka. Koriste se za utvrđivanje filogenetskih i evolutivnih odnosa vrsta i populacija, određivanje stepena genetičkog diverziteta između udaljenih i srodnih vrsta, unutar populacija, kao i za efikasno upravljanje genetičkim resursima (Andersen i Lübberstedt, 2003). Dobijeni podaci se mogu koristiti za "otisak" genotipova (eng. *fingerprinting*) radi njihove identifikacije i zaštite, razumevanja veza između jedinki koje se ispituju, olakšavanja unošenja hromozomskih segmenata iz drugih vrsta, kao i za mapiranje gena koji kontrolišu ekspresiju različitih agronomski značajnih osobina (Larson, 2002).

Među različitim tipovima molekularnih markera, SSR markeri se smatraju najboljim izborom u oplemenjivanju biljaka zbog mogućnosti efikasne karakterizacije velikih populacija i visokog stepena ponovljivosti. Sastoje se od tandemski ponovljenih kratkih sekvenci molekula DNK, dužine 2 - 6 bp (Chambers i MacAvoy, 2000). Varijacije u broju ponavljanja ovih sekvenci daju amplifikovane produkte različitih dužina. Regioni koji ograničavaju ove sekvence se koriste za dizajniranje parova specifičnih prajmera. Prednosti SSR markera su visok nivo polimorfizma, kodominantnost alela i ravnomerna distribucija duž genoma (Morgante i sar., 2002; Barcaccia i sar., 2006). Iako su ovo kodominantni markeri, mutacije na mestima vezivanja prajmera mogu dovesti do pojave „*null*“ alela (nema umnožavanja fragmenta), što može da dovede do grešaka u oceni genotipa.

SSR markeri predstavljaju dobar izbor za mapiranje genoma, genotipizaciju i evaluaciju germplazme (Smith i sar., 1997; Senior i sar., 1998). Sekvence ovih markera su, zbog visokog stepena varijabilnosti, posebno pogodne za razlikovanje srodnih genotipova i zato se često koriste u analizama varijabilnosti populacija (Smith i Devey, 1994), kao i za identifikaciju srodnih sorti (Vosman i sar., 1992). SSR markeri vezani za gene poznate funkcije mogu biti testirani za povezanost sa fenotipskim varijacijama i nekim drugim biološkim funkcijama (Ayers i sar., 1997).

Činjenica da je u mnogim organizmima polimorfizam uglavnom rezultat promene u jednom nukleotidu (tačkaste mutacije) dovela je do razvoja SNP tehnika za proučavanje ove vrste varijabilnosti. Najčešće je jedan SNP prisutan na 200 - 500 bp, a njihova gustina je veća u intergenskim i intronskim regionima nego u egzonima

(Weising i sar., 2005). Analitičke procedure zahtevaju informacije o sekvenci za dizajniranje specifičnih PCR prajmera ili oligonukleotidnih proba. Detekcija ovih markera se ne zasniva na gel elektroforezi, što predstavlja značajnu prednost kod obimnih genotipizacija u selekciji, pošto tehnologije zasnovane na gel elektroforezi mogu biti suviše zahtevne i dugotrajne. Velika gustina SNP markera povećava verovatnoću pronalaženja polimorfizma u ciljnom genu, što obezbeđuje veliku prednost u odnosu na ostale markere, koji su najčešće blisko povezani sa lokusom od interesa. Iako je upotreba SNP markera kod biljaka još uvek u razvoju, očekuje se da će u bliskoj budućnosti postati najčešće korišćeni markeri, posebno kada cele sekvence genoma biljaka postanu dostupne (Ganal i sar., 2011). Pošto predstavljaju najčešći tip genetičkih varijacija u biljkama, SNP markeri mogu imati značajnu ulogu u proučavanju otpornosti na bolesti, abiotičke i biotičke stresove i ekonomski važnih osobina. Kukuruz poseduje visoku učestalost SNP markera, od 1/31bp u nekodirajućim do 1/124bp u kodirajućim regionima (Tenailon i sar., 2001; Ching i sar., 2002; Vroh Bi i sar., 2006). Razvoj SNP markera kod kukuruza nudi primenu u savremenim istraživanjima populaciono genetičkim, identifikaciji gena, oplemenjivanju i karakterizaciji germplazme.

Razvoj novih tehnologija molekularne genetike omogućio je precizniju identifikaciju gena odgovornih za poželjne osobine. Primena molekularnih markera danas predstavlja nezamenljivi deo različitih programa selekcije i oplemenjivanja. Kada su vrlo blisko vezani za gen od interesa ili se nalaze unutar gena, mogu se koristiti za indirektnu selekciju željenog svojstva, i ovaj postupak predstavlja najjednostavniji vid selekcije pomoću molekularnih markera (eng. *Marker Assisted Selection* - MAS). Zahvaljujući molekularnim markerima, poligena svojstva mogu biti razložena na pojedinačne komponente, tzv. lokuse za kvantitativna svojstva (eng. *Quantitative Trait Loci* - QTL), što doprinosi boljem razumevanju nasleđivanja ovih svojstava i omogućava korišćenje MAS-a zajedno sa metodama klasične selekcije.

1.4.2. Selekcija pomoću molekularnih markera - MAS

Za uspešan program stvaranja hibrida kukuruza najvažnije je stvoriti elitne inbred linije i rekombinacijama povećati broj novih alela i njihovih kombinacija (Lee and Tracy, 2009). Za inkorporaciju poželjnih svojstava (alela) u elitne inbred linije osnovni metod kod konvencionalnog oplemenjivanja je kombinacija povratnih ukrštanja i samooplodnje uz fenotipsku selekciju. Sa svakom generacijom povratnog ukrštanja elitne linije u koju se ugrađuje željena osobina (rekurentni roditelj) iz linije koja poseduje željeni gen (donor) dobija se veći procenat genoma rekurentnog roditelja. Proces povratnog ukrštanja se odvija onoliko dugo koliko je potrebno da se stvori linija koja je genetički identična rekurentnom roditelju uz dodato željeno svojstvo. Taj proces može da traje i do deset generacija. Stoga je neophodna efikasnija selekcija kako bi se ovaj proces skratio.

Konvencionalno oplemenjivanje se oslanja na fenotipsku selekciju i u manjoj meri razlikuje uticaj spoljašnje sredine od uticaja gena. Kod selekcije upotrebom molekularnih markera selekcija željene osobine se vrši markerima koji mogu biti direktno vezani za gen ili deo genoma koji utiče na ekspresiju te osobine. Markerima se direktno prati prisustvo poželjnih alela, nezavisno od uticaja faktora spoljašnje sredine. MAS ima za cilj da poveća genetičku dobit u odnosu na klasične metode selekcije i oplemenjivanja, i ta razlika bi trebalo da bude utoliko veća ukoliko je veći stepen fenotipske varijabilnosti, a niža heritabilnost ciljne osobine.

MAS se pokazao kao odličan pristup koji upotpunjuje i znatno povećava efikasnost konvencionalnog oplemenjivanja (Balding i sar., 2003; Ribaut i Hoisington, 1998). DNK se može izolovati iz listova mladih biljaka, što omogućava selekcionerima da pre polinacije odbace biljke koje nemaju gen od interesa (Vivek i sar., 2008). Pomoću molekularnih markera se mogu odrediti biljke sa najvećim procentom genoma rekurentnog roditelja nakon povratnog ukrštanja i smanjiti broj biljaka koje treba testirati, kao i broj generacija potrebnih za stvaranje željenog genotipa.

Postoji velika razlika u postignutim rezultatima primene MAS za kvalitativne (regulisane dejstvom jednog ili nekoliko gena) i kvantitativne (regulisane dejstvom velikog broja gena/QTL) osobine. Mnogo manje je postignuto kod kvantitativnih osobina, kao što su prinos i tolerantnost na sušu, pošto je manipulacija QTL otežana

zbog malog fenotipskog doprinosa svakog od pojedinačnih gena, epistatičkih interakcija između njih i uticaja faktora spoljašnje sredine. Mnogi markeri pokazali su se kao nepouzdana u predviđanju željenog fenotipa. U velikom broju slučajeva, razlog za ovo je nedovoljna preciznost u mapiranju QTL-ova (Young, 1999; Sharp i sar., 2001), a još jedan ograničavajući faktor u primeni MAS-a je cena metoda i marker sistema koji se koriste u ovim istraživanjima. Različite roditeljske kombinacije i/ili različiti eksperimentalni uslovi dovode do identifikacije delimično ili potpuno nepreklapajućih setova QTL (Rong i sar., 2007). U cilju prevazilaženja ovog problema, poslednjih nekoliko godina se koristi pristup meta analize koji kombinuje rezultate iz različitih, nezavisnih eksperimenata (Glass, 1976; Chardon i sar., 2004; Wang i sar., 2006).

Koristeći princip meta analize, Hao i sar. (2010) su identifikovali neke važne konstitutivne i adaptivne QTL-ove za tolerantnost na sušu kod kukuruza, kao i specifične gene i njihove familije koji učestvuju u odgovoru biljke na ovaj stres. Uporedili su rezultate QTL mapiranja iz 12 populacija testiranih u 22 eksperimenta koji su obuhvatali 160 QTL-ova detektovanih u optimalnim uslovima i 239 QTL-ova u uslovima suše. Na osnovu ovih podataka, identifikovano je 39 QTL-ova u uslovima suše i 36 QTL-ova u optimalnim uslovima, od kojih su 32 bila adaptivna a ostali konstitutivni. Takođe su uradili i *in silico* mapiranje i identifikovali 48 potencijalnih gena kandidata uključenih u odgovor kukuruza na stres suše. Predviđa se da će se na ovaj način identifikovati specifični geni i metabolički putevi uključeni u tolerantnost na stres suše, što će dovesti do efikasnijeg stvaranja komercijalnih genotipova tolerantnih na ovaj stres.

Najveći napredak u oplemenjivanju primenom molekularnih markera je postignut kod osobina koje su regulisane dejstvom jednog gena i jasno su fenotipski definisane. Monogene osobine kod kukuruza, kao što su citoplazmatična muška sterilnost i otpornost na neke štetočine i bolesti, su mnogo ređe od poligenih. Kvalitativne osobine su posebno značajne kod tipova kukuruza za specifične namene (šećerac, kokičar, kukuruz sa visokim sadržajem proteina).

Tamilkumar i sar. (2014) objavili su rezultate uspešne upotrebe molekularnih markera za poboljšanje nutritivne vrednosti kukuruza. Fitinska kiselina (eng. *Phytic Acid* - PA) sadrži fosfor čvrsto vezan u svom molekulu. Takav fosfor nije biodostupan i nije iskoristiv za ljude, kao ni za monogastrične životinje. Molekul fitinske kiseline vrlo

lako gradi soli fitate, vezujući minerale koji su veoma važni: kalcijum, kalijum, magnezijum, cink i gvožđe, čineći ih na taj način nedostupnim i neiskoristivim. Mutacija (*lpa2-2*) (eng. *low phytic acid*) smanjuje sadržaj fitinske kiseline za 30% i trostruko povećava prisustvo neorganskog fosfora (Shi i sar., 2003). Selekcijom na *lpa2-2* mutaciju pomoću SSR markera umc2230 stvorene su linije sa sniženim sadržajem fitinske kiseline i očuvanim dobrim agronomskim osobinama, koje će se koristiti za dobijanje visoko prinostnih hibrida poboljšane nutritivne vrednosti.

Dugo vremena su sekundarni metaboliti biljaka smatrani sporednim produktima bez nutritivne vrednosti, ali su poslednjih godina studije pokazale da jedinjenja kao što su karotenoidi i antocijanini utiču na prevenciju pojave kancera i mnogih hroničnih oboljenja (Kutchan i Dixon, 2005). Njihovo antioksidativno dejstvo je važno jer neutralizuju slobodne radikale koji izazivaju oštećenja biomolekula (DNK, lipidi i proteini) i na taj način smanjuju rizik od degenerativnih bolesti (Ames, 1979; Temple, 2000). Najzastupljeniji karotenoidi u biljnom svetu β - karoteni, su prekursori vitamina A i doprinose smanjenju rizika pojave katarakte i bolesti koronarnih arterija. Nedostatak vitamina A u ishrani ljudi u zemljama u razvoju doveo je do brojnih pokušaja povećanja sadržaja β - karotena u najvažnijim gajenim biljkama, uključujući i kukuruz (Welch i Graham, 2004). Muthusamy i sar. (2015) su stvorili linije kukuruza koje su imale do 12 puta povećani sadržaj β - karotena selekcijom pomoću markera specifičnog za gen koji kodira β - karoten hidroksilazu 1 (*crtR1*). Hibridi dobijeni ukrštanjem ovih linija su imali do 10 puta veći sadržaj β - karotena i mogu se koristiti širom sveta u programima biofortifikacije, važne strategije za rešavanje nedostatka mikronutritijenata u ishrani ljudi u siromašnim zemljama u razvoju.

Antocijanini su pigmenti koji biljnom tkivu daju crvenu, plavu i ljubičastu boju i imaju anti-inflamatorno, anti-kancerogeno i hipoglikemičko dejstvo (Hagiwara i sar., 2001). Selekcijom pomoću molekularnih markera sadržaj antocijanina povećan je kod kukuruza kokičara (Lago i sar., 2013), kao i kod kukuruza šećerca (Lago i sar., 2014). Za selekciju korišćena su dva SSR markera - nc009 (deo *purple plant1* - *pl1* gena) i umc1776, odnosno bnlg1064 (deo *colored plant1* - *bl* gena). Zbog antioksidativnog potencijala antocijanina kojim su bogate, ovako stvorene linije kokičara i šećerca mogu se smatrati novom funkcionalnom hranom.

1.4.3. Primena molekularnih markera u procesu stvaranja kukuruza visokog kvaliteta proteina

Stvaranje kukuruza visokog sadržaja lizina i triptofana obuhvata manipulacije sa tri posebna genetička sistema:

1. *opaque2* recesivni alel (*o2o2*)
2. geni modifikatori ("enhanseri" *o2* gena; eng. *to enhance* - pojačati; nakon vezivanja regulatornih proteina dovode do naglog porasta aktivnosti gena) koji "pojačavaju" sadržaj lizina i triptofana u endospermu
3. geni modifikatori koji transformišu mekani u tvrdi endosperm.

1.4.3.1. *Opaque2* gen

Osnovni preduslov za proces stvaranja kukuruza sa povećanim sadržajem lizina i triptofana je prisustvo *opaque2* gena u homozigotnom recesivnom stanju.

Unutar sekvence *opaque2* gena identifikovana su tri različita interna repetitivna elementa (SSR markera) – phi057, phi112 i umc1066, koji se koriste za utvrđivanje polimorfizma inbred linija i kao selekcionni markeri za *opaque2* gen. Markeri phi057 i umc1066 se nasleđuju kodominantno, što omogućava identifikaciju kako homozigotnih tako i heterozigotnih *opaque2* genotipova u dobijenom potomstvu. Marker phi112 pokazuje dominantni polimorfizam, pa se ne može koristiti za razlikovanje recesivnih homozigota, ali se može koristiti za kontrolu čistoće semena tokom rutinskog održavanja *opaque2* i QPM linija. Kod svakog ukrštanja, neophodno je markere primeniti na roditeljskim linijama da bi se potvrdila njihova polimorfnost (Vivek i sar., 2008).

1.4.3.2. Geni modifikatori sadržaja aminokiselina

Modifikatori/enhanseri se sastoje od lokusa koji utiču na nivo sadržaja lizina i triptofana u endospermu. Diskriminacija genotipova nosioca gena modifikatora od genotipova kukuruza standardnog kvaliteta koji se fenotipski ne razlikuju vrši se biohemijskim analizama. Sadržaj lizina i triptofana u zrnu kukuruza su visoko

korelisani (Nurit et al., 2009). Prosečan sadržaj lizina i triptofana kod standardnog kukuruza je oko 2% i 0,4%, redom, a kod QPM oko 4% i 0,8%, redom. Vrednosti kod standardnog kukuruza variraju od 1,6 - 2,6% za lizin i od 0,2 - 0,6% za triptofan, kao i od 2,7 – 4,5% za lizin i 0,5 - 1,1% za triptofan kod njihovih prevedenih *o2* verzija (Vivek i sar., 2008). Ukoliko se sadržaj lizina i triptofana ne prati tokom stvaranja linija i hibrida može se desiti da se dobiju *o2o2* genotipovi sa istim sadržajem kao kod standardnog kukuruza.

Identifikovana su tri gena modifikatora, na hromozomima 2, 4 i 7, koji kontrolišu nivo faktora sinteze proteina i tako utiču na sadržaj aminokiselina (Wang i sar., 2001; Wu i sar., 2002). SSR markeri za sadržaj aminokiselina se uvode u programe oplemenjivanja kukuruza na visok kvalitet proteina, ali se njihova efikasnost u ovim programima još uvek ispituje. Babu i sar. (2012) su identifikovali 24 SSR markera za gene kandidate za metabolizam lizina i triptofana, kao i *o2* modifikatore. Ovi markeri imaju potencijal za primenu kod finog mapiranja gena modifikatora, kao i za selekciju linija kukuruza visokog sadržaja lizina i triptofana upotrebom molekularnih markera.

1.4.3.3. Geni modifikatori tvrdoće endosperma

Prisustvo gena modifikatora koji transformišu mekani u tvrdi endosperm se lako može utvrditi projektovanjem svetla vidljivog dela spektra kroz zrno, korišćenjem prosvetljivača (Vivek i sar., 2008). Zrna koja su neprozirna ukazuju na prisustvo *opaque2* gena, a stepen modifikacije se određuje vizuelno, na osnovu stepena transparentnosti, skalom od 1 (potpuno prozirna) do 5 (potpuno neprozirna).

Wallace i sar. (1990) su utvrdili da povećani nivo γ -zeina doprinosi nastanku fenotipa tvrdog endosperma pošto QPM zrna u endospermu imaju otprilike duplo veći sadržaj ovih proteina u odnosu na *o2* mutante. Visoka korelacija između stepena modifikacije endosperma zrna i povećanog nivoa γ -zeina jasno ukazuje da ovi proteini učestvuju u nastanku prozirnog endosperma kod *o2* i da geni modifikatori utiču na njihov sadržaj (Lopes i Larkins, 1991; 1995; Holding i Larkins, 2006).

Dva gena odgovorna za tvrdoću endosperma su mapirana na hromozomu 7. Jedan od njih je lociran pored gena (*gzm1*) (eng. *gamma zein modifier1*) (Lopes i sar., 1995). Takođe, mapirano je i nekoliko QTL - ova za γ -zeine na hromozomima 1, 7 i 9

(Holding i sar., 2008). Efikasnost primene SSR markera za tvrdoću endosperma u programima oplemenjivanja kukuruza na visok kvalitet proteina se još uvek ispituje.

Institut za kukuruz "Zemun Polje" poseduje kolekciju *opaque2* inbred linija razvijenih tokom sedamdesetih godina prošlog veka. Sa ciljem detaljnijeg opisa ovih linija urađena je analiza sadržaja triptofana i SSR analiza sa *opaque2* specifičnim markerima (phi057, umc1066 i phi112), markerom za gen modifikator tvrdoće endosperma (umc1216) i šest markera za gene modifikatore sadržaja aminokiselina (bnlg2248, phi072, bnl1633, bnl1382, phi075 i mmc0241) (Ignjatović i sar., 2009). Utvrđene su značajne razlike u sadržaju triptofana između standardnih i *opaque2* linija. Svi SSR prajmeri korišćeni za razlikovanje normalnih i *opaque2* linija su dali pozitivne rezultate. Prajmeri za modifikatore aminokiselina i tvrdoću endosperma nisu razlikovali standardne i *opaque2* linije, kao ni *opaque2* linije sa različitim sadržajem triptofana. Ovakvi rezultati se mogu objasniti mehanizmom regulacije gena na koje utiče *o2* alel i/ili nedovoljno bliskom vezanošću SSR markera i ciljnih gena za rutinski skrining genotipova sa različitim sadržajem triptofana. U svakom slučaju, ovi markeri nisu pogodni za MAS.

1.4.3.4. Stvaranje genotipova visokog kvaliteta proteina

Osnovni zadatak u selekciji QPM hibrida je istovremeno ostvarivanje visokog sadržaja esencijalnih aminokiselina i visokog prinosa zrna. Identifikacija i potvrda rezultata QPM selekcije podrazumeva biohemijske analize (određivanje sadržaja proteina, triptofana i izračunavanje indeksa kvaliteta - procenta triptofana u proteinu), kao i poljske ogledne (praćenje agronomski važnih osobina). Prilikom stvaranja QPM germplazme prati se samo sadržaj triptofana, pošto je metoda brža i jednostavnija od metode za utvrđivanje sadržaja lizina. Procenat triptofana bi trebalo da bude veći od 0,075 u celom zrnu, odnosno od 0,070 u endospermu. Indeks kvaliteta proteina (% triptofana u proteinu) bi trebalo da bude veći od 0,80 u celom zrnu, odnosno 0,70 u endospermu.

Selekcija upotrebom molekularnih markera povećava pouzdanost, efikasnost, uštedu novca i vremena u procesu stvaranja linija i hibrida kukuruza poboljšanog kvaliteta (Babu i sar., 2004). Babu i sar. (2005) objavili su rezultate konverzije

standardne inbred linije V25 u QPM verziju koristeći QPM donor liniju CML176. Gupta i sar. (2013) su pomoću MAS stvorili QPM roditeljske linije Vivek-9 hibrida i dobili QPM hibrid za duplo kraće vreme u odnosu na konvencionalno oplemenjivanje. Kombinujući konvencionalno oplemenjivanje i MAS, Zhang i sar. (2010) su dobili linije sa povećanim sadržajem lizina koristeći kao roditeljske komponente *o2* i *o16* kukuruz.

Korišćenje treće generacije molekularnih markera kao što su SNP-ovi i razvoj savršenijih metoda za njihovu detekciju dovešće do njihove sve značajnije uloge u istraživanjima vezanim za MAS (Babu i sar., 2005). Sekvenciranje i bioinformatika daju novu dimenziju dešifrovanju i manipulisanju genetičkom osnovom poželjnih osobina. Metode funkcionalne genomike koja omogućava proučavanje ekspresije gena ukuljučuju korišćenje EST-ova (engl. *Expressed Sequence Tag*) 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.

Jedan od načina za dobijanje QPM genotipova je pomoću genetičkih modifikacija (GM). Pošto je visok nivo lizina i triptofana kod *opaque2* i QPM kukuruza povezan sa velikom redukcijom zeina učinjeni su pokušaji da se genetičkim inženjeringom smanji sadržaj ovih rezervnih proteina koristeći konstrukte tako dizajnirane da se redukuje proizvodnja zeina u znu (Segal i sar., 2003; Huang i sar., 2005, 2006). Ovaj pristup je takođe doveo do stvaranja *opaque* fenotipa (Segal i sar., 2003), što ukazuje da je taj fenotip direktno povezan sa redukcijom zeina.

Druga strategija podrazumeva modifikaciju strukture proteina insercijom kodona za deficitarne esencijalne aminokiseline u određene regione genske sekvence ili menjajući postojeće kodone kako bi kodirali ove aminokiseline. Tako su radi poboljšanja kvaliteta proteina kukuruza kodoni za lizin i triptofan insertovani na specifičnu poziciju cDNK za 19 kDa α -zein (Wallace i sar., 1988). Slično tome, kodoni za lizin dodati su genu za γ -zein (Torrent i sar., 1997) i u proteinskim telima transgenih biljaka kukuruza došlo je do velike akumulacije γ -zeina bogatih lizinom, međutim kasnije studije su pokazale nestabilnost tih proteina i njihovo otežano skladištenje u semenu.

Genetičke modifikacije vezane za ekspresiju gena za heterologne proteine su dale obećavajuće rezultate u poboljšanju hranljive vrednosti kukuruza. Metodom

mikrobombardovanja gen za 22 kDa kafirin, rezervni protein iz sirka (*Sorghum bicolor*), prenet je u genom kukuruza gde je došlo do ekspresije i značajne sinteze ovog proteina (Song i sar., 2004). Ekspresija gena za amarantin, rezervni protein iz semena amarantusa (*Amaranthus hypochondriacus*) u kukuruza dovela je do povećanja sadržaja proteina i esencijalnih aminokiselina (Rascon-Cruz i sar., 2004). Takođe, gen koji kodira protein bogat lizinom iz polena paradajza (*Solanum berthaultii*) - SB401 je uspešno integrisan u genom kukuruza i njegova ekspresija je dovela do značajnog povećanja sadržaja lizina od 16,1% do 54,8% i ukupnih proteina od 11,6% do 39% u zrnu kukuruza (Yu i sar., 2004). Analize semena transgenog kukuruza su pokazale da je nivo lizina i ukupnih proteina ostao visok u šest narednih generacija, što ukazuje na stabilnost transformacije.

Iako molekularna biotehnologija ima isti cilj kao i klasično oplemenjivanje, odnosno dobijanje biljaka sa poboljšanim svojstvima, ključna razlika je što se klasičnim metodama oplemenjivanja ne prenosi samo jedan ili dva željena gena već dolazi do rekombinacije genoma roditelja. Takođe, tradicionalne metode oplemenjivanja zasnivaju se na prenosu genetičkog materijala polnim putem između jedinki iste ili veoma bliskih vrsta, za razliku od molekularne biotehnologije kojom se vrši transfer jednog ili više poželjnih gena iz bilo koje evolucione kategorije u istu ili drugu kategoriju organizama. Na taj način se vrši kreiranje genetički modifikovanih organizama sa željenim osobinama.

Molekularna biotehnologija je relativno nova nauka i ne postoji dovoljno naučnih podataka o bezbednosti korišćenja njenih rezultata u praksi. Kompleksnost ekosistema i višećelijskih organizama otežava predviđanje potencijalnog negativnog efekta genetički modifikovanih organizama na zdravlje ljudi i životinja, biodiverzitet i ekološke procese u celini. U odnosu na GM useve čija je upotreba ograničena velikim otporom javnosti i zakonskim regulativama, MAS je daleko perspektivniji pristup. Primenom molekularnih markera direktno se prati prisustvo željenih alela koji se tradicionalnim metodama prenose u ciljane genotipove radi poboljšanja određene osobine. Takođe, pomoću molekularnih markera se mogu odrediti biljke sa najvećim procentom genoma rekurentnog roditelja nakon povratnog ukrštanja i smanjiti broj biljaka koje treba testirati. Za kraće vreme moguće je stvoriti linije i hibride poboljšanog kvaliteta proteina, pri čemu je važno da promene kvaliteta ne utiču na prinos zrna i

ostale agronomske performanse. Njihovim gajenjem obezbedila bi se proizvodnja potrebnih količina biljnih proteina visokog kvaliteta, veće hranljive i biološke vrednosti za ishranu ljudi i domaćih životinja.

2. CILJ RADA

Poboljšanje hranljive vrednosti kukuruza predstavlja jedan od glavnih ciljeva savremenih programa oplemenjivanja zbog sve značajnijih klimatskih promena i rasta ljudske populacije, odnosno sve veće potrebe za hranom. Razvoj metoda molekularne genetike doveo je do upotrebe molekularnih markera u procesima selekcije. Selekcija pomoću molekularnih markera upotpunjuje i znatno povećava efikasnost konvencionalnog oplemenjivanja. Upotrebom molekularnih markera može se smanjiti broj povratnih ukrštanja potrebnih za unošenje određenog alela u liniju recipijenta.

Osnovni cilj ovog rada je dobijanje linija kukuruza poboljšanog kvaliteta proteina adaptiranih na umereno klimatsko područje, korišćenjem specifičnih molekularnih markera za *opaque2* (*o2*) gen. Osim toga, cilj je da se održe dobre agronomske osobine, kao i kombinaciona sposobnost poboljšanih linija u odnosu na njihove izogene linije. Za poboljšanje kvaliteta proteina koristiće se, kao rekurentni roditelji (recipijenti *o2* recesivne mutacije), linije standardnog kvaliteta zrna ZPL 3 i ZPL 5. Kao izvor povećanog sadržaja triptofana i lizina (donor *o2* recesivne mutacije) koristiće se linija visokog kvaliteta proteina CML 144.

Osnovna pretpostavka rada je da se korišćenjem specifičnih molekularnih markera za *opaque2* gen mogu direktno birati heterozigotne i recesivno homozigotne biljke tokom procesa selekcije. Istovremeno, analizom odabranih *O2o2* i *o2o2* biljaka SSR markerima vršiće se izbor biljaka sa najvećim procentom genoma rekurentne linije. Na ovaj način bi trebalo povećati efikasnost selekcije, odnosno stvoriti poželjni genotip za manji broj generacija. Takođe, ocena fenotipskih osobina poboljšanih genotipova je neophodna kako bi se očuvale dobre agronomske performanse.

Rezultati ovog rada mogu proširiti dosadašnja znanja o genetičkom poboljšanju elitnih linija i hibrida kukuruza na kvalitativna svojstva i tako dati doprinos savremenim genetičkim i molekularnim istraživanjima. Očekuje se da će dobijeni rezultati dati potpuniju sliku o prednostima selekcije upotrebom molekularnih markera kod kukuruza, čime bi se mogla povećati efikasnost selekcije. Gajenjem linija i hibrida visokog kvaliteta proteina obezbedila bi se proizvodnja biljnih proteina veće hranljive i biološke vrednosti u ishrani ljudi i domaćih životinja.

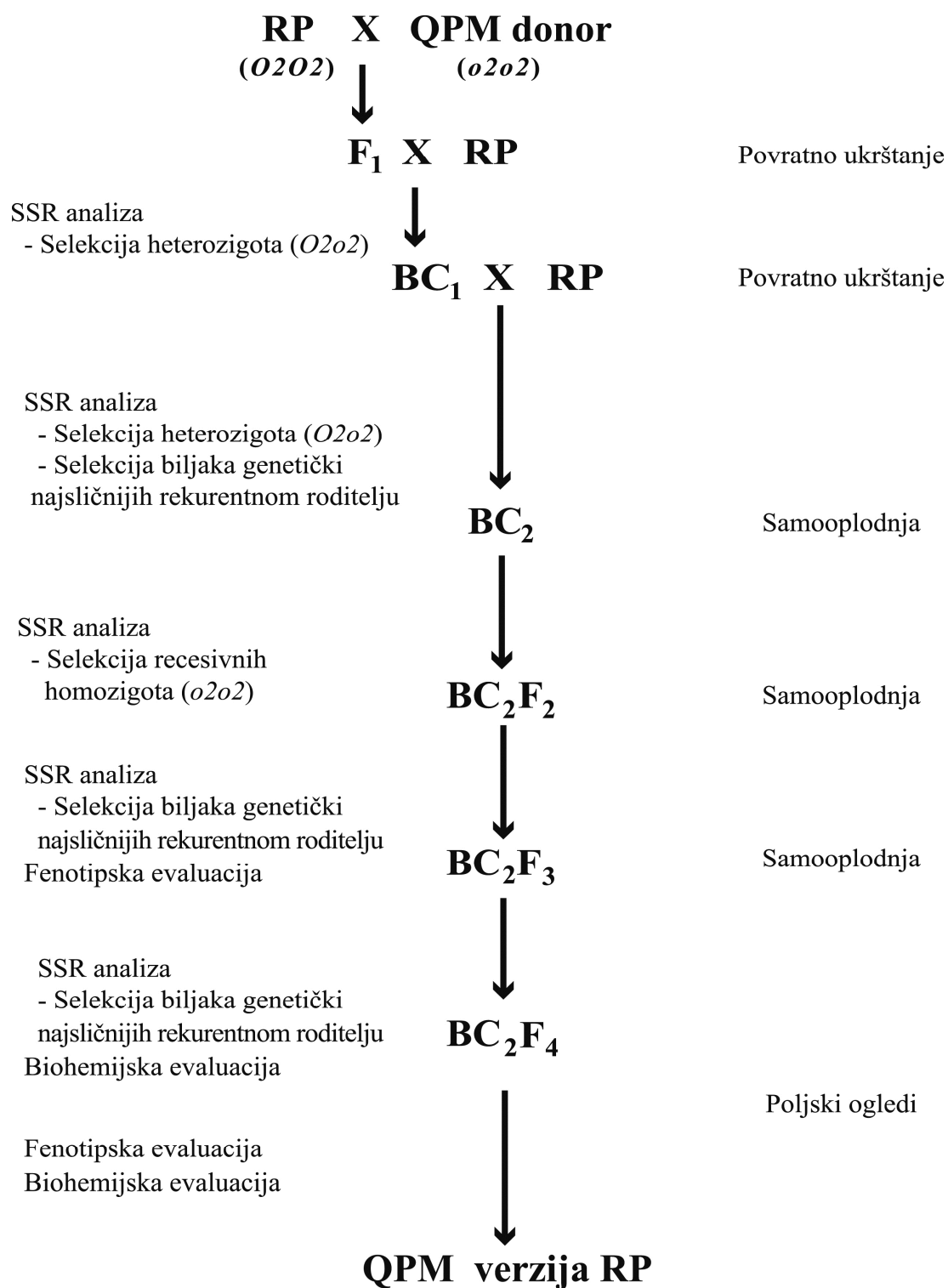
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Za poboljšanje kvaliteta proteina korišćene su, kao rekurentni roditelji, dve linije standardnog kvaliteta zrna (standardne linije) – ZPL 3 i ZPL 5. Ove linije su tipa zubana, imaju narandžasto zrno i adaptirane su na lokalne agroekološke uslove. Zbog odličnih kombinacionih sposobnosti one su komponente vodećih hibrida Instituta za kukuruz „Zemun Polje“.

Kao izvor poboljšanog kvaliteta proteina (povećanog sadržaja triptofana i lizina) korišćena je linija visokog kvaliteta proteina CML 144, poreklom iz CIMMYT-a, Meksiko (eng. *International Maize and Wheat Improvement Center*). CML 144 je QPM (eng. *Quality Protein Maize*) tropska linija tipa tvrdunca, belog zrna i odličnih kombinacionih sposobnosti.

U ovom istraživanju proces konverzije standardne linije u liniju poboljšanog kvaliteta proteina pomoću molekularnih markera se sastojao iz dva ciklusa povratnog ukrštanja i tri ciklusa samooplodnje. Ukrštanjem ZPL 3 x CML 144 i ZPL 5 x CML 144 dobijene su F₁ generacije koje su povratno ukrštene sa rekurentnim roditeljima (standardnim linijama). U dobijenim BC₁ potomstvima odabrane su heterozigotne biljke za *opaque2* gen (*O2o2*) pomoću specifičnih SSR markera, koje su zatim povratno ukrštene sa rekurentnim roditeljima (formiranje BC₂ generacija). Na biljkama BC₂ generacija je ponovo izvršena selekcija na osnovu heterozigotnosti *opaque2* gena, kao i na osnovu najveće genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljima (utvrđene pomoću SSR markera ravnomerno raspoređenih po genomu) i izvršena je njihova samooplodnja (formiranje BC₂F₂ generacija). Među biljkama BC₂F₂ generacija je izvršena selekcija recesivnih homozigota za *opaque2* gen (*o2o2*) koje su zatim samooplodene kako bi se formirala BC₂F₃ generacija. Kod dobijenih biljaka je analizirana genetička sličnost sa rekurentnim roditeljima SSR markerima, a urađene su i odgovarajuće biohemijske i agronomske analize potomstava pojedinačnih klipova iz ove generacije. Iste analize ponovljene su sledeće godine na potomstvima pojedinačnih klipova iz BC₂F₄ generacije dobijene samooplodnjom biljaka BC₂F₃ generacije. Šematski prikaz konverzije standardne inbred linije u QPM verziju koristeći QPM donora dat je na Slici 2.



Slika 2. Šematski prikaz konverzije standardne inbred linije (RP - rekurentni roditelj) u QPM verziju.

3.2. Molekularne analize

Molekularne analize su rađene u BC₁, BC₂ i BC₂F₂ generacijama za utvrđivanje heterozigotnosti/homozigotnosti *opaque2* gena, a u BC₂, BC₂F₃ i BC₂F₄ generacijama, kao i kod poboljšanih linija, za određivanje sličnosti potomstava sa rekurentnim roditeljem.

3.2.1. Izolacija DNK

Za analizu *opaque2* specifičnim SSR markerima, DNK je izolovana iz listova pojedinačnih biljaka. Za određivanje genetičke sličnosti između roditeljskih linija, kao i između rekurentnog roditelja i potomstava, korišćeni su grupni uzorci od listova 10 biljaka (BC₂F₃), odnosno 10 zrna (BC₂F₄) po genotipu.

3.2.1.1. Izolacija DNK iz lista

DNK je izolovana prema metodi datoj u Doyle i Doyle (1987), iz uzoraka biljaka uzetih četiri nedelje nakon nicanja. Tkivo mladih i zdravih listova je samleveno u tečnom azotu do finog praha koristeći tučak i avan. Izmereno je po 100 mg od svakog uzorka i dodato po 900 µL pufera za ekstrakciju (2% CTAB; 100 mM Tris - HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,2% β-mercaptoethanol) prethodno zagrejanog na 65 °C u vodenom kupatilu. Svaki uzorak sa puferom je homogenizovan laganim okretanjem ependorf tube i inkubiran u vodenom kupatilu na 65 °C 60 minuta. Nakon inkubiranja dodato je 900 µL *Sevag*-ovog reagensa (hloroform i izoamil alkohol u odnosu 24:1), i uzorci su mućkani do dobijanja emulzije. Uzorci su zatim centrifugirani 5 minuta na 12000 rpm na sobnoj temperaturi, nakon čega je gornja faza prebačena u novu ependorf tubu, a donja faza je odbačena. Dodato je 0,7 zapremine izopropil alkohola i uzorci su ostavljeni preko noći na - 20 °C radi precipitacije DNK. Sledećeg dana su uzorci centrifugirani 5 minuta na 12000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a u uzorke je dodato po 1 mL 75% etanola. Inkubacija na sobnoj temperaturi je trajala 1 sat. Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 12000 rpm na sobnoj temperaturi, nakon čega je supernatant odbačen.

Ponovo je dodato po 1 mL 75% etanola u uzorke koji su zatim centrifugirani 3 minuta na 12000 rpm, na sobnoj temperaturi. Talog DNK je sušen na sobnoj temperaturi oko sat vremena, a zatim resuspendovan u 30 μ L 0,1 x TE puferu (1 mM TRIS, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) i ostavljen da se rastvori preko noći na 4 °C.

3.2.1.2. Izolacija DNK iz zrna

Izolacija DNK je urađena prema metodi datoj u Rogers i Bendich (1988). Po deset zrna sa svake analizirane biljke je samleveno u mlinu za simultano mlevenje pojedinačnog zrna (Kataskapt). Vreme mlevenja je iznosilo dva puta po tri minuta. Od svakog zrna izmereno je po 100 mg i napravljen je grupni uzorak, od koga je izmereno po 250 mg brašna za izolaciju. U svaki uzorak dodato je 2 x CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 1% PVP; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) pufera za izolaciju, u odnosu tkivo:pufer 1:1 i 1 x CTAB pufer (dva puta razblažen 2 x CTAB pufer) u odnosu tkivo:pufer 1:2. Oba pufera su prethodno zagrejana u vodenom kupatilu na 65 °C. Svaki uzorak sa puferom je homogenizovan laganim okretanjem ependorf tube i inkubiran u vodenom kupatilu na 65 °C 30 minuta. Nakon inkubiranja dodata je jedna zapremina *Sevag*-ovog reagensa (hloroform i izoamil alkohol u odnosu 24:1) radi denaturacije proteina, i uzorci su mućkani do dobijanja emulzije. Zatim su centrifugirani 2 minuta na 12000 rpm na 4 °C. Nakon centrifugiranja gornja faza je prebačena u novu ependorf tubu, a donja je odbačena. U uzorke je zatim dodata 1/10 zapremine 10% CTAB pufera (10% CTAB; 0,7 M NaCl), prethodno zagrejanog u vodenom kupatilu na 65 °C, i jedna zapremina *Sevag*-ovog reagensa, i uzorci su mućkani do dobijanja emulzije. Nakon toga su centrifugirani 2 minuta na 12000 rpm na 4 °C. Posle centrifugiranja, gornja faza je prebačena u novu ependorf tubu, a donja je odbačena. U uzorke je zatim dodata jedna zapremina pufera za precipitaciju (1% CTAB, 50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0). Uzorci su lagano promućkani i inkubirani na sobnoj temperaturi 20 minuta, do taloženja DNK. Nakon precipitacije izvršeno je centrifugiranje 2 minuta na 12000 rpm na 4 °C. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u „*high-salt*“ TE puferu (10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl) i inkubiran u vodenom kupatilu na 65 °C 10 minuta. Nakon inkubacije dodate su dve zapremine hladnog 96% etanola. Sadržaj ependorf epruvete je promućkan i ostavljen 30 minuta na - 20 °C. Uzorci su

centrifugirani 15 minuta na 12000 rpm na 4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a talog ispran dva puta u 1 ml hladnog 75% etanola. Talog DNK je sušen na sobnoj temperaturi oko sat vremena, a zatim resuspendovan u 30 µL 0,1 x TE puferu (1 mM TRIS, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) i ostavljen da se rastvori preko noći na 4 °C.

3.2.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK

Koncentracija i kvalitet DNK su određeni spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu.

3.2.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK

Uzorci su razblaženi u 0,1 x TE puferu 1000 puta. Apsorbancija je merena na talasnim dužinama $\lambda=230$ nm, $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm (spektrofotometar Shimadzu UV-1601). Koncentracija DNK je izračunata po formuli:

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

gde je:

OD_{260} – apsorbancija na talasnoj dužini $\lambda=260$ nm

R – razblaženje uzorka

50 – koncentracija 50 µg/µL koja ima apsorbancu OD = 1 (jedna jedinica optičke gustine odgovara koncentraciji DNK od 50 µg/mL)

Odnosi apsorbanci na $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm, kao i $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 230$ nm se koriste da bi se procenila čistoća DNK. $\lambda = 260$ nm pokazuje koncentraciju nukleinskih kiselina u uzorku, dok proteini apsorbuju svetlost na $\lambda = 280$ nm, a fenoli na $\lambda = 230$ nm. DNK se smatra dovoljno čistom za marker analizu ako je odnos $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ u opsegu 1,8 - 2,0, a odnos $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{230}$ u opsegu 1,8 - 2,2.

3.2.2.2. Elektroforetsko određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK na agaroznom gelu

Genomska DNK je analizirana na 0,8% agaroznom gelu. Na gel je nanošeno po 8 µl DNK uzoraka pomešanih sa 1/3 zapremine pufera (0,25% brom fenol plavo, 30% glicerol u dd H₂O). Kao standardi za određivanje koncentracija korišćena su različita razblaženja λ DNK (5, 10, 50, 100 i 250 ng/µL). Korišćen je aparat za horizontalnu elektroforezu (DNA Sub-Cell™, BioRad). Elektroforeza u 0,5 x TBE (deset puta razblažen 5 x TBE pufer - 445 mM Tris; 445 mM borna kiselina; 0,5 M EDTA, pH 8,0) je trajala 1 h na konstantnoj struji jačine 40 mA. Nakon elektroforeze gelovi su bojani 20 minuta u rastvoru etidijum bromida koncentracije 0,5 µg/µL, a zatim pod UV svetlom transiluminatora fotografisani pomoću sistema za dokumentaciju (*gel documentation system*, BioDocAnalyse, Biometra).

Koncentracija DNK uzoraka je određena vizuelnim poređenjem sa koncentracijama standarda. Kvalitet DNK, odnosno stepen razgradnje pri ekstrakciji, procenjen je poređenjem traka uzoraka sa λ DNK. Razmaz ispod traka ukazuje na mehaničku ili hemijsku degradaciju.

Po utvrđivanju koncentracije i kvaliteta izolovane DNK, uzorci su do upotrebe čuvani na - 20 °C.

3.2.3. SSR analiza

3.2.3.1. Analiza *opaque2* specifičnim SSR markerima

SSR analiza je urađena sa tri prajmera (LKB Vertriebs GmbH) specifična za *opaque2* gen (Tabela 1). Reakcija amplifikacije se odvijala u 20 µL reakcione smeše koja je sadržala DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas), 0,25 µM prajmera (*forward* i *reverse*) i 20 ng DNK.

Tabela 1. Naziv, pozicija na hromozomu (bin), ponovak i sekvenca SSR prajmera specifičnih za *opaque2* gen

Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca prajmera (<i>forward</i> i <i>reverse</i>)
phi 057	7.01	GCC	5'-CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT-3' 5'-CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC-3'
phi 112	7.01	AG	5'-TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT-3' 5'-AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC-3'
umc 1066	7.01	(GCCAGA) ⁵	5'-ATGGAGCACGTCATCTCAATGG-3' 5'-AGCAGCAGCAACGTCTATGACACT-3'

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) je rađena na TProfessional Standard Thermocycler-u (Biometra) po sledećem programu: 1) inicijalna denaturacija na 94 °C/2 min, 2) 40 ciklusa denaturacije na 94 °C/1 min, vezivanja prajmera na 60 °C/2 min i elongacije na 72 °C/2 min, 3) finalna elongacija na 72 °C/10 min. PCR produkti su razdvojeni na 2,5% agaroznom gelu, kao i na 8% poliakrilamidnom gelu radi boljeg razdvajanja fragmenata. Približne veličine amplifikovanih produkata za svaki SSR lokus su određene prema poziciji trake na gelu u odnosu na DNK marker od 100 bp.

3.2.3.2. Genetička karakterizacija SSR markerima

SSR analiza je urađena metodom Edwards-a i sar. (1991), sa ukupno 52 prajmera (Tabela 2). Zbog nedostupnosti određenih markera, broj markera se razlikovao po generacijama (roditeljske linije - 40, BC₂ - 34, BC₂F₃ - 32, BC₂F₄ - 32, sub-linije - 32). U svim slučajevima, markeri su bili ravnomerno raspoređeni po genomu.

Reakcija amplifikacije se odvijala u 25 µL reakcione smeše koja je sadržala DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X), 0,5 µM prajmera (*forward* i *reverse*) i 20 ng DNK. Lančana reakcija polimeraze je rađena na TProfessional Standard Thermocycler-u (Biometra) po programu *Touchdown*, koji se sastoji od sledećih koraka: 1) inicijalna denaturacija na 95 °C/5 min, 2) 15 ciklusa denaturacije na 95° C/30 sek, vezivanja prajmera na 63,5 °C/1 min (uz smanjivanje temperature za 0,5 °C po ciklusu) i elongacije na 72 °C/1 min, 3) 22 ciklusa denaturacije na 95 °C/30 sek, vezivanja

prajmera na 56 °C/1 min i elongacije na 72 °C/1 min, 4) finalna elongacija na 72 °C/7 min. PCR produkti su razdvojeni na 8% poliakrilamidnom gelu.

Tabela 2. Naziv, pozicija na hromozomu (bin), ponovak, sekvenca SSR prajmera i generacija u kojoj su korišćeni za analizu

	Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca (forward i reverse)	Generacija u kojoj je korišćen za analizu				
					Roditeljske linije	BC ₂	BC ₂ F ₃	BC ₂ F ₄	Sub-linije
1	umc 1282	1.01	(AT)6	5'-TACACTACACGACTCCCAACAGGA-3' 5'-GCGAGGGTTCTTTCCATAGAGAAT-3'	+	+			+
2	umc 1070	1.02	(TC)7	5'-TTCCAGTAAGGGAGGTGCTG-3' 5'-TAAGCAACATATAGCCGGGC-3'	+	+			
3	umc 1076	1.05	CA	5'-TTGGAAATCACCAATTGATATAGTTTG-3' 5'-TCTATTGCAAACGCCAAAAGTAGC-3'				+	
4	umc 1335	1.06	(AG)24	5'-ATGGCATGCATGTGTTTGTTTTAC-3' 5'-ACAGACGTCGCTAATTCCTGAAAAG-3'				+	+
5	umc 1013	1.08	(GA)9	5'-TAATGTGTCCATACGGTGGTGG-3' 5'-AGCTGGCTAGTCTCAGGCACTC-3'	+	+	+	+	+
6	bnlg 1643	1.08	(AG)24	5'-ACCACCGTCCACCTCCAC-3' 5'-ATTGACCCCGTGACCCTC-3'	+	+	+	+	+
7	umc 2047	1.09	(GACT)4	5'-GACAGACATTCTCGCTACCTGAT-3' 5'-CTGCTAGCTACCAAACATTCCGAT-3'	+	+	+	+	+
8	umc 1605	1.12	(GGC)4	5'-GGAGAAGCACGCCTTCGTATAG-3' 5'-CCAGGAGAGAAATCAACAAAGCAT-3'	+	+			
9	umc 1265	2.02	(TCAC)4	5'-GCCTAGTCGCCTACCCTACCAAT-3' 5'-TGTGTTCTTGATTGGGTGAGACAT-3'	+		+	+	+
10	bnlg 2248	2.03	(AG)30	5'-CCACCACATCCGTTACATCA-3' 5'-ACTTTGACACCGGCGAATAC-3'			+	+	+
11	bnlg 1633	2.07	(AG)16	5'-GTACCTCCAGGTTTACGCCA-3' 5'-TCAACTTCTCATGCACCCAT-3'			+	+	+
12	bnlg198	2.08	-	5'-GTTTGGTCTTGCTGAAAAATAAAA-3' 5'-GCTGGAGGCCTACATTATTATCTC-3'	+	+			
13	bnlg 1520	2.09	(AG)22	5'-TCCTCTTGCTCTCCATGTCC-3' 5'-ACAGCTGCGTAGCTTCTTCC-3'	+	+			

Tabela 2. Nastavak

	Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca (forward i reverse)	Generacija u kojoj je korišćen za analizu				
					Roditeljske linije	BC ₂	BC ₂ F ₃ ,	BC ₂ F ₄	Sub- linije
14	phi 036	3.04	AG	5'-CCGTGGAGAGACGTTTGACGT-3' 5'-TCCATCACCACCTCAGAATGTCAGTGA-3'	+	+	+	+	+
15	bnlg 197	3.06	-	5'-GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA-3' 5'-CGCCAAGAAGAAACACATCACA-3'	+	+			
16	bnlg 1350	3.08	(AG)13	5'-TGCTTCAGCGCATTAAACTG-3' 5'-TGCTCGTGTGAGTTCCTACG-3'	+	+	+	+	+
17	umc 1594	3.09	(TA)10	5'-CACTGCAGGCCACACATACATA-3' 5'-GCCAGGGGAGAAATAAAATAAAGC-3'	+	+	+	+	+
18	phi 072	4.00	AAAC	5'-ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT-3' 5'-GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT-3'			+		
19	umc 2039	4.03	(CAG)5	5'-CATCTCCTACCAGCTCACCCC-3' 5'-GCTCGGGGTAGTAGTGTTCCTT-3'	+		+		+
20	umc 1418	4.08	(GGAAG)4	5'-TCACACACACACTACACTCGCAAT-3' 5'-GAGCCAAGAGCCAGAGCAAAG-3'	+	+			
21	bnlg 589	4.10	-	5'-GGGTCGTTTAGGGAGGCACCTTTGGT-3' 5'-GCGACAGACAGACAGACAAGCGCATTGT-3'	+	+			
22	umc 1109	4.10	(ACG)4	5'-TCACACACACACTACACTCGCAAT-3' 5'-GAGCCAAGAGCCAGAGCAAAG-3'	+	+	+	+	+
23	bnlg 557	5.03	-	5'-TCACGGGCGTAGAGAGAGA-3' 5'-CGAAGAAACAGCAGGAGATGAC-3'	+	+	+	+	+
24	umc 1274	5.03	(TGC)5	5'-TTGAGTCTGGTACTGCGTATGAGG-3' 5'-TAGCACTCCAACAGCAAGAGTTTG-3'	+		+	+	
25	phi 085	5.06	AACGC	5'-AGCAGAACGGCAAGGGCTACT-3' 5'-TTTGGCACACCACGACGA-3'	+	+			
26	phi 087	5.06	ACC	5'-GAGAGGAGGTGTTGTTTGCACAC-3' 5'-ACAACCGACAAGTCAGCAGATTG-3'	+	+	+	+	+

Tabela 2. Nastavak

	Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca (forward i reverse)	Generacija u kojoj je korišćen za analizu				
					Roditeljske linije	BC ₂	BC ₂ F ₃	BC ₂ F ₄	Sub- linije
27	phi 075	6.00	CT	5'-GGAGGAGCTCACCGGCGCATAA-3' 5'-AAAGGTTACTGGACAAATATGCGTAACTCA-3'			+	+	
28	umc 1006	6.02	(GA)19	5'-AATCGCTTACTTGTAACCCACTTG-3' 5'-AGTTTCCGAGCTGCTTTCTCT-3'	+	+	+	+	+
29	mmc 0241	6.05	(TA)4N13 (TG)15	5'-TATATCCGTGCATTTACGTTT-3' 5'-CATCGCTTGTCTGTCTGA-3'			+	+	+
30	bnlg 1443	6.05	(AG)25	5'-TACCGGAATCCTCTTTGGTG-3' 5'-TTTGACAACCTCTTCCAGGG-3'	+	+	+	+	+
31	umc 1695	7.00	(CA)8	5'-CAGGTAATAACGACGCAGCAGAA-3' 5'-GTCCTAGGTTACATGCGTTGCTCT-3'	+	+	+	+	+
32	umc 1036	7.02	GA	5'-CTGCTGCTCAAGGAGATGGAGA-3' 5'-GACACACATGCACGAGCAGACT-3'				+	+
33	umc 1393	7.02	(GTC)4	5'-CCTTCTTCTTATTGTCACCGAACG-3' 5'-GCCGATGAGATCTTTAACAACCTG-3'	+	+			
34	27-kDa γ-zein	7.02	-	5'-CGGTTTCTCCTAAATACTCCCC-3' 5'-CTATACCTACGTCCCCACCCTT-3'				+	
35	umc 1015	7.03	(GA)45	5'-CAGACACAAGCAGCAAAGCAAG-3' 5'-TCCGACTCCAAGAAGAGGAGAA-3'			+	+	
36	umc 1324	7.03	(AGC)5	5'-ATCCATCATCATCATCATTGCTTG-3' 5'-ATGTCATCATGTACCAGGTGTTGG-3'	+	+			+
37	umc 1782	7.04	(GAC)4	5'-CGTCAACTACCTGGCGAAGAA-3' 5'-TCGCATACCATGATCACTAGCTTC-3'	+		+		+
38	umc 1799	7.04	(TG)12	5'-GTGATGAATAATGTCCCCAATTCC-3' 5'-GGACAGATGTCTGGAGATTGCTTT-3'	+	+	+	+	+
39	umc 1944	7.04	-	5'-GAAGAAGGATCGCACACATGG-3'- 5'-AGACTGTGCGCTGTACTATACCC-3'	+	+			

Tabela 2. Nastavak

	Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca (forward i reverse)	Generacija u kojoj je korišćen za analizu				
					Roditeljske linije	BC ₂	BC ₂ F ₃ ,	BC ₂ F ₄	sub-linije
40	phi 116	7.06	ACTG/ACG	5'-GCATACGGCCATGGATGGGA-3' 5'-TCCCTGCCGGGACTCCTG-3'	+	+	+		+
41	bnlg 2235	8.02	(AG)23	5'-ATCCGGAGACACATTCTTGG-3' 5'-CTGCAAGCAACTCTCATCGA-3'	+	+	+	+	+
42	umc 1858	8.04	(TA)8	5'-GTTGTTCTCCTTGCTGACCAGTTT-3' 5'-ATCAGCAAATTAAGCAAAGGCAG-3'	+		+	+	+
43	phi 080	8.08	AGGAG	5'-CACCCGATGCAACTTGCGTAGA-3' 5'-TCGTCACGTTCCACGACATCAC-3'	+	+			+
44	phi 033	9.01	AAG	5'-ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC-3' 5'-ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT-3'	+	+			+
45	umc 1040	9.01	(CT)11	5'-CATTCACTCTCTTGCCAACTTGA-3' 5'-AGTAAGAGTGGGATATTCTGGGAGTT-3'	+	+	+		+
46	bnlg 127	9.03	-	5'-CATGTATACGAGAAGCACCCCTAT-3' 5'-ATCGTAACTCAGCGGTTTGTG-3'				+	
47	umc 1492	9.04	(GCT)4	5'-GAGACCCAACCAAACTAATAATCTCTT-3' 5'-CTGCTGCAGACCATTTGAAATAAC-3'	+	+	+	+	+
48	umc 1771	9.04	(CGTC)4	5'-GTGAAATGTTGTTTCCAATGCAAG-3' 5'-CATCAGGAAGGAAGACGACTAGGA-3'				+	
49	umc 1507	10.04	(CACAA)4	5'-GATTCAAACCAAACACTTTTCCCA-3' 5'-CGAACCTTGCTGTGTGTTTATCAG-3'	+	+			
50	bnlg 1526	10.04	(AG)15	5'-ACGAGCGAGTGGAGAATAGG-3' 5'-AGCCCAGTACGTGGGGTC-3'	+	+	+	+	
51	umc 1506	10.05	(AACAA)4	5'-AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG-3' 5'-ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT-3'	+	+	+	+	+
52	umc 1827	10.05	(GAC)6	5'-GCAAGTCAGGGAGTCCAAGAGAG-3' 5'-CCACCTCACAGGTGTTCTACGAC-3'	+		+	+	+

- podaci nisu dostupni

3.2.4. Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata

3.2.4.1. Agarozna elektroforeza

Produkti PCR reakcije sa *opaque2* specifičnim markerima su razdvojeni na 2,5% agaroznom gelu. Na gel je nanošeno po 8 μ L PCR smeše. Kao standardi korišćeni su 20 bp i 100 bp DNK markeri (Fermentas). Korišćen je aparat za horizontalnu elektroforezu (DNA Sub-Cell™, BioRad). Elektroforeza u 0,5 x TBE puferu (deset puta razblažen 5 x TBE pufer - 445 mM Tris; 445 mM borna kiselina; 0,5 M EDTA, pH 8,0) je trajala 1,5 h na konstantnoj struji jačine 40 mA. Nakon elektroforeze gelovi su bojani 20 minuta u rastvoru etidijum bromida koncentracije 0,5 μ g/ μ L, a zatim pod UV svetlom transiluminatora fotografisani pomoću sistema za dokumentaciju (*gel documentation system*, BioDocAnalyze, Biometra).

3.2.4.2. Poliakrilamidna elektroforeza

Amplifikovani produkti dobijeni *opaque2* specifičnim markerima koji se nisu jasno razdvojili na agaroznom gelu, kao i produkti SSR analize za utvrđivanje genetičke sličnosti sa roditeljskim linijama, razdvojeni su na 8% poliakrilamidnom gelu (akrilamid/bis-akrilamid 19:1, 5 x TBE, 10% amonijum-persulfat i TEMED). Na gel je nanošeno po 8 μ L PCR smeše. Kao standardi korišćeni su 20 bp i 100 bp DNK markeri (Fermentas). Za izvođenje elektroforeze je korišćen Mini Protean Tetra-cell (BioRad), četvero-komorni aparat za vertikalnu poliakrilamidnu elektroforezu. Elektroforeza u 1 x TBE (pet puta razblažen 5 x TBE pufer - 445 mM Tris; 445 mM borna kiselina; 0,5 M EDTA, pH 8,0) je trajala 1,5 h pri konstantnom naponu od 80 V. Nakon elektroforeze gelovi su bojani 20 minuta u rastvoru 0,5 μ g/ μ L etidijum bromida, a zatim pod UV svetlom transiluminatora fotografisani pomoću sistema za dokumentaciju (*gel documentation system*, BioDocAnalyze, Biometra).

3.2.5. Statistička analiza podataka dobijenih molekularnim markerima

3.2.5.1. Genetička sličnost

Prisustvo/odsustvo traka u SSR analizi je pretvoreno u binarne podatke (1 i 0) koji su korišćeni kao osnovna matrica za izračunavanje genetičke sličnosti (GS) između ispitivanih genotipova kukuruza, po metodi Dice-a (1945):

$$GS_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

gde je:

- a - prisustvo trake u oba genotipa (*ij*)
- b - prisustvo trake kod genotipa *i*, a odsustvo kod genotipa *j*
- c - prisustvo trake kod genotipa *j*, a odsustvo kod genotipa *i*

3.2.5.2. Klaster analiza

Na osnovu matrica genetičkih sličnosti ispitivanih genotipova kukuruza urađena je klaster analiza primenom UPGMA metode (eng. *Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean*) u SAHN programu (eng. *Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering Method*; Sneath i Sokal, 1973), pomoću NTSYS-pc2.1 softvera (Rohlf, 2000). Rezultati su prikazani grafički u formi dendrograma. Za svaki dendrogram je izračunat ko-fenetički koeficijent korelacije između matrica genetičkih sličnosti po Dice-u, a njegova značajnost je testirana *Mantel*-ovim testom (Mantel, 1967).

3.3. Biohemijske analize

Utvrđivanje kvaliteta zrna kukuruza podrazumeva određivanje sadržaja triptofana i ukupnih proteina, kao i izračunavanje indeksa kvaliteta (procenat triptofana u proteinu).

3.3.1. Priprema uzoraka

Od svakog genotipa odabrana su dva reprezentativna uzorka od po 30 zrna. Zrno je sušeno 16-18 sati na 65 °C u termostatu, zatim samleveno u ciklonskom mlinu (Cyclotec 1093 lab mill, Foss Tecator) do čestica veličine 500 µm. Brašno je odmašćeno heksanom u Sokslet ekstraktoru (Inkolab) u trajanju od 4 h.

3.3.2. Sadržaj triptofana

Sadržaj triptofana određen je po metodi datoj u Nurit i sar. (2009). Ova kolorimetrijska metoda se zasniva na *Hopkins-Cole* reakciji, u kojoj jedan molekul gliksilne kiseline i dva molekula triptofana formiraju obojeno jedinjenje sa maksimumom apsorbancije na 560 nm.

Izmereno je po 80 mg brašna od svakog uzorka i od dve kontrole (kukuruz standardnog kvaliteta zrna i QPM) i dodato po 3 mL sveže napravljenog rastvora papaina (1 mg papaina/1 mL 0,165 M CH₃COONa, pH 7,0). Rastvor papaina, bez uzorka, je korišćen kao slepa kontrola. Papain je protein koji sadrži veliku količinu triptofana (jedan molekul papaina sadrži 7 jedinica triptofana). Pri finalnom računanju sadržaja triptofana, vrednosti dobijene za slepu probu se oduzimaju od vrednosti dobijene za uzorke. Uzorci su kratko promešani na vorteksu i inkubirani u termostatu na 65 °C 16 sati (preko noći). Jedan sat nakon početka i jedan sat pre završetka hidrolize uzorci su ponovo na kratko promešani na vorteksu. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi, promešani na vorteksu i centrifugirani 10 minuta na 3600 rpm. Po 1 mL supernatanta je prebačeno u nove tube i dodato po 3 mL kolorimetrijskog reagensa (0,46% gliksilna kiselina, jednake zapremine 30 N H₂SO₄ i 1,25% FeCl₃·6H₂O u 7 N H₂SO₄), a zatim su uzorci inkubirani 30 minuta na 65 °C. Nakon hlađenja

uzoraka na sobnoj temperaturi apsorbancija je očitana na spektrofotometru na 560 nm. Procenat triptofana je izračunat pomoću standardne (kalibracione) krive dobijene na osnovu apsorpcija poznatih količina triptofana, opsega od 0 do 30 µg/mL (Tabela 3) prema formuli:

$$\% \text{ trp} = \text{OD}_{560} \text{ korigovano} \times \text{Faktor}$$

gde je:

$$\text{OD}_{560} \text{ korigovano} = \text{OD}_{560} \text{ uzorak} - \text{OD}_{560} \text{ papain blank}$$

$$\text{Faktor} = \frac{0,00375}{\text{Nagib krive}}$$

$$0,00375 = \frac{\text{Zapremina hidrolizata (3 ml)}}{\text{Težina uzorka (80000 µg)}} * 100(\%)$$

Tabela 3. Priprema razblaženja triptofana poznatih koncentracija za izradu standardne krive

	Koncentracija triptofana (µg/mL)	Triptofan 100 µg/ml (mL)	NaH ₃ CCOOH, 0,165 M, pH 7,0 (mL)	Ukupna zapremina (mL)
1	0,0	0,0	10,0	10,0
2	10	1,0	9,0	10,0
3	15	1,5	8,5	10,0
4	20	2,0	8,0	10,0
5	25	2,5	7,5	10,0
6	30	3,0	7,0	10,0

3.3.3. Sadržaj proteina

Ukupan sadržaj proteina u celom zrnju određen je po Kjeldal (*Kjeldahl*) metodi (Vivek i sar., 2008). Po ovoj metodi sadržaj proteina se određuje indirektno, na osnovu koncentracije azota (N) u uzorku dobijene odgovarajućom titracionom tehnikom.

Od svakog uzorka odmereno je približno 0,2 g brašna i preneto u staklene tubuse za razaranje. Zatim je dodat katalizator (Kjeltalos Cu / 3,5, koji sadrži 3,5g K₂SO₄ i 0,4g CuSO₄ x 5H₂O, na vrh špatule), 5 mL smeše koncentrovane H₂SO₄ i H₃PO₄ (50:1) i 2,5 mL 30% H₂O₂. Uzorci su sagorevani u tekatoru (Digestion System 20, 1005 Heating Unit) na 420 °C u trajanju od 60 minuta (dok se uzorak ne obezboji). Nakon sagorevanja uzorci su ostavljeni u digestoru dok se ne ohlade (oko 30 minuta). U odgovarajuće rezervoare aparata za destilaciju (FOSS, 2200 Kjeltac Auto Destillation) su sipani 40% NaOH i destilovana voda, a u erlenmajere po 25 mL 4% H₃BO₃, koja sadrži indikatore (brom krezol zeleno i metil rot). Tubusi i erlenmajeri su postavljeni u odgovarajuća ležišta u aparatu. Uključivanjem aparata automatski je dodato po 70 mL destilovane vode i 50 mL NaOH, nakon čega je otpočeo proces destilacije u trajanju od tri minuta. Tokom destilacije, crvena boja borne kiseline postaje zelena. Pomoću aparata za titraciju (METROHM) u erlenmajere je dodavana 0,1 N HCl, a titracija je vršena do pojave početne crvene boje.

Ukupni proteini (P) su izračunati po formuli:

$$P = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{blank}}) * C_{\text{HCl}} * 1,4007}{m_{\text{uzorka}}} * F * 100\%$$

gde je:

V_{HCl} (mL) - zapremina HCl utrošene za titraciju uzoraka

V_{blank} (mL) - zapremina HCl utrošene za titraciju slepe probe

C_{HCl} (mol/L) - koncentracija HCl

m_{uzorka} (g) - težina uzorka

F - faktor za izračunavanje sadržaja proteina za kukuruz = 6,25

3.3.4. Indeks kvaliteta

Indeks kvaliteta (QI – *quality index*) proteina (% triptofana u proteinu) izračunat je prema formuli:

$$QI = \frac{\% \text{triptofana}}{\% \text{proteina}} * 100$$

3.3.5. Statistička analiza biohemijskih osobina

Sve analize su obavljene u dva ponavljanja i za sve parametre je urađena jednofaktorijalna analiza varijanse (eng. *Analysis of Variance* - ANOVA) po kompletno slučajnom blok sistemu u MSTAT-C statističkom programu. Značajnosti razlika između srednjih vrednosti genotipova za različite osobine su utvrđene na osnovu *Fisher*-ovog LSD (eng. *Least Significant Difference*) testa, na nivou značajnosti od 0,05. Fenotipske korelacije između posmatranih parametara su izračunate primenom *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije (r):

$$r = \frac{\Sigma(X - \bar{X})\Sigma(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\Sigma(X - \bar{X})^2}\sqrt{\Sigma(Y - \bar{Y})^2}}$$

gde je:

$\Sigma(X - \bar{X})$ - suma odstupanja vrednosti parametra X od njegove srednje vrednosti

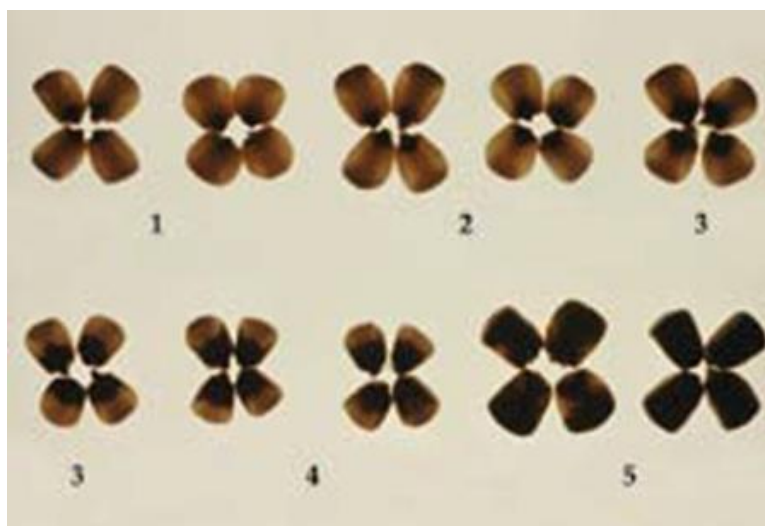
$\Sigma(Y - \bar{Y})$ - suma odstupanja vrednosti parametra Y od njegove srednje vrednosti

$\sqrt{\Sigma(X - \bar{X})^2}$ - kvadratni koren iz sume kvadrata odstupanja vrednosti parametra X od njegove srednje vrednosti

$\sqrt{\Sigma(Y - \bar{Y})^2}$ - kvadratni koren iz sume kvadrata odstupanja vrednosti parametra Y od njegove srednje vrednosti

3.4. Stepen modifikacije endosperma zrna kukuruza

Prema Vivek i sar. (2008) zrna kukuruza su prema stepenu modifikacije endosperma definisana od zrna tipa 1 (potpuno prozirna) do tipa 5 (potpuno neprozirna). Zrna sa $\leq 25\%$ neprozirnosti su tip 2, sa $\leq 50\%$ tip 3, a sa $\leq 75\%$ tip 4 (Slika 3). Određivanje stepena modifikacije endosperma rađeno je na prosvetljivaču, projektovanjem svetla vidljivog dela spektra, vizuelnom ocenom transparentnosti zrna. Birana su zrna tipa 1, 2 i 3, nakon što je marker analizom bilo utvrđeno prisustvo *o2* alela.



Slika 3. Zrna kukuruza na prosvetljivaču grupisana prema stepenu modifikacije endosperma (Vivek i sar., 2008)

3.5. Analiza morfoloških i agronomskih osobina

Pošto u BC₂F₂ generaciji ukrštanja ZPL 3 x CML 144 nije detektovana ni jedna recesivno homozigotna biljka, sva dalja ispitivanja su rađena samo na potomstvu ukrštanja ZPL 5 x CML 144.

Recesivno homozigotna (*o2o2*) potomstva BC_2F_3 generacije iz ukrštanja ZPL 5 x CML 144 dobijene 2012. godine, zajedno sa linijom ZPL 5, posejana su 2013. godine u polju po slučajnom blok sistemu (eng. RCBD - *Randomized Complete Block Design*) u dva ponavljanja na dve lokacije. Sejan je po jedan red od svakog genotipa, u 10 kućica. Razmak između redova iznosio je 0,7 m, a između kućica u redu 0,4 m. Posejano je po tri zrna u svakoj kućici, a nakon nicanja biljaka, u fazi od pet do sedam listova, izvršeno je raščupavanje na po dve biljke u kućici.

Četiri nedelje nakon nicanja uzeti su uzorci za SSR analizu, identifikovano je pet potomstva sa najvećim procentom genoma rekurentnog roditelja i na njima su dalje merene fenotipske osobine. Spisak svih fenotipskih osobina, jedinice u kojima su izražene vrednosti merenja, kao i opis merenja su prikazani u Tabeli 4.

Istovremeno, odabrana potomstva su ukrštena sa komercijalnim test F_1 hibridom radi provere kombinacione sposobnosti u odnosu na standardnu liniju. Kombinacija odabranog testera i standardne linije predstavlja jedan od vodećih hibrida Instituta za kukuruz „Zemun Polje“.

Uporedo sa ovim ogledom posejano je po pet kućica istih potomstava BC_2F_3 generacije. Biljke iz ovih redova su samooplođene i dobijena je BC_2F_4 generacija. Nakon berbe je određen stepen modifikacije endosperma zrna na prosvetljivaču, sadržaj triptofana, ukupnih proteina i indeks kvaliteta zasebno za svaki samooplođeni klip. Ponovo je pomoću SSR markera određena genetička sličnost sa standardnom linijom. Na osnovu svih dobijenih fenotipskih, biohemijskih i SSR rezultata, odabrane su sub-linije koje su genetički najbližije roditeljskoj liniji i koje od nje najmanje odstupaju po svojim agronomskim osobinama, a istovremeno imaju povećani sadržaj triptofana.

Sledeće, 2014. godine, postavljen je ogled po istom eksperimentalnom dizajnu kao i prethodne godine sa odabranim sub-linijama, kao i ogled sa F_1 generacijom test-ukrštanja (hibridi) odabranih genotipova. U ogledu sa test-ukrštanjima kao standard je korišćen izogeni komercijalni hibrid. Takođe, odabrane sub-linije su samooplođene radi biohemijskih i genetičkih analiza.

Tabela 4. Analizirane morfološke i agronomske osobine

Tip osobine	Osobina	Skraćenica	Jedinica	Opis načina merenja
Morfološke osobine	Visina biljke	VB	cm	Visina biljke od površine zemlje do vrha metlice
	Visina biljke do klipa	VBK	cm	Visina biljke od površine zemlje do nodusa koji nosi primarni klip
	Broj listova	BL		Ukupan broj listova na biljci
	Broj listova iznad klipa	BLK		Broj listova na biljci iznad primarnog klipa
	Broj klipova po biljci	BKB		Ukupan broj klipova po parceli podeljen sa ukupnim brojem biljaka
	Procenat slomljenih biljaka	SB	%	Broj slomljenih biljaka podeljen sa ukupnim brojem biljaka po parceli i pomnožen sa 100
	Period između metličanja i svilanja	ASI	dani	Razlika između pojave polena i svile kod više od 50% analiziranih biljaka
Agronomske osobine	Dužina klipa	DK	cm	Dužina klipa od drške do vrha klipa
	Prečnik klipa	PK	cm	Prečnik izmeren na sredini klipa
	Broj redova zrna	BRZ		Ukupan broj redova zrna na klipu
	Broj zrna u redu	BZR		Ukupan broj zrna u redu
	Dubina zrna	DZ	cm	Razlika između prečnika klipa i prečnika oklaska podeljena sa dva
	Masa 100 zrna	MZ	g	Prosečna masa 100 zrna sa sredine klipa
	Procenat oklaska	OK	%	Težina oklaska od uzorka od 5 klipova podeljena sa ukupnom težinom 5 klipova pomnoženo sa 100
	Procenat vlage	VL	%	Procenat vlage u zrnu u trenutku berbe
	Prinos zrna	PR	t/ha	Prinos zrna sa parcele preračunat na prinos u t/ha sa 14% vlage

Morfološke osobine merene su u polju na biljkama u fazi cvetanja i izražene kao srednja vrednost. Zabeleženi su datumi metličanja i svilanja svih genotipova na osnovu kojih je izračunat broj dana između metličanja i svilanja - ASI (eng. *Anthesis Silking Interval*) za svaki genotip.

U berbi su obrane sve biljke po elementarnoj parcelici i izmerena težina klipova po genotipu. Odabrano je pet klipova za određivanje sadržaja vlage (vlagomer Dickey John GAC 2100) i težine oklasaka. Preračun prinosa zrna sa parcele na prinos u t/ha sa 14% vlage rađen je prema sledećoj formuli:

$$PR(t/ha) = \left(\frac{10}{P}\right) * M_{ep} * \left(\frac{M_{uz} - M_{ok}}{M_{uz}}\right) * \left(\frac{100 - \%VI}{86}\right)$$

gde je:

P - površina elementarne parcele

M_{ep} - prinos zrna (masa) sa elementarne parcele

M_{uz} - masa uzorka od pet klipova

M_{ok} - masa oklasaka uzorka od pet klipova

%VI - procenat vlage u zrnu u trenutku berbe.

Nakon berbe uzeto je deset klipova po genotipu za merenje komponenti prinosa. Prečnik klipa i oklasaka su izmereni pomoću šublera. Masa 100 zrna je određena tako što je odbrojano dva puta po sto zrna sa sredine klipova, izmereno je na analitičkoj vagi i izračunata srednja vrednost.

3.5.1. Statistička analiza fenotipskih osobina

Za svaku osobinu je izračunata srednja vrednost (\bar{X}), minimalna vrednost (X_{\min}), maksimalna vrednost (X_{\max}), standardna devijacija (σ), koeficijent varijacije (CV) i varijansa (σ^2) po sledećim formulama (Hadživuković, 1991):

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

$$CV = \frac{\sigma * 100}{\bar{X}} \quad (\%)$$

gde je:

n - broj podataka

X_i - vrednost pojedinačnog podatka

Za sve parametre i obe lokacije je urađena dvofaktorijalna analiza varijanse (eng. *Analysis of Variance* - ANOVA) po kompletno slučajnom blok sistemu u MSTAT-C statističkom programu. Značajnost razlika između srednjih vrednosti genotipova za različite osobine određena je na osnovu Fisher-ovog LSD (eng. *Least Significant Difference*) testa, na nivou značajnosti od 0,05.

Korelacije između posmatranih parametara su izračunate primenom Pearson-ovog koeficijenta korelacije (r).

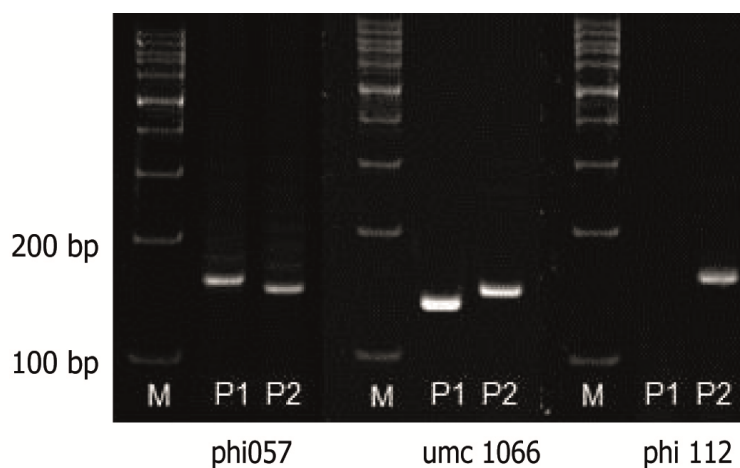
Na osnovu srednjih vrednosti morfoloških osobina urađena je klaster analiza, pri čemu je kao mera distance korišćen kvadrat euklidskog rastojanja, a kao metod grupisanja UPGMA (eng. *Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Klaster analiza je urađena u NTSYSpc 2.1 programu (Rohlf, 2000).

4. REZULTATI

4.1. Genetička i biohemijska karakterizacija roditeljskih linija

4.1.1. Analiza roditeljskih linija *opaque2* specifičnim markerima

Markeri phi057 i umc1066 pokazali su ko-dominantni polimorfizam između linija standardnog kvaliteta zrna i QPM linije. Phi057 je dao fragment veličine oko 170 bp kod CML 144 i oko 160 bp kod ZPL 3 i ZPL 5. Umc1066 je dao fragment veličine oko 150 bp kod CML 144 i oko 165 bp kod ZPL 3 i ZPL 5. Phi112 je pokazao dominantni polimorfizam između linija. *Null* alel (izostanak trake) je bio prisutan kod CML 144, a fragment veličine oko 170 bp kod ZPL 3 i ZPL 5. Zbog nemogućnosti razlikovanja dominantnih homozigota (O_2O_2) i heterozigota (O_2null), marker phi112 je izbačen iz daljih analiza, a za selekciju su korišćeni phi057 i umc1066. Ilustracija amplifikacije roditeljskih linija CML 144 i ZPL 5 sa tri *opaque2* specifična SSR markera je data na Slici 4.



Slika 4. SSR profil *opaque2* specifičnih markera phi057, umc1066 i phi112. M: 100 bp DNK marker, P1: CML 144, P2: ZPL 5.

4.1.2. Određivanje genetičke sličnosti između roditeljskih linija

Od 40 SSR markera korišćenih u analizi (Tabela 2), 24 markera je pokazalo polimorfizam između ZPL 3 i ZPL 5 sa jedne, i CML 144 sa druge strane. Ukupni broj amplifikovanih alela je bio 72. Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od 2 do 4, a prosečan broj alela po markeru je bio 3. Genetička sličnost između ZPL 3 i CML 144, kao i između ZPL 5 i CML 144, izračunata prema *Dice*-ovom koeficijentu, je bila 0,05.

4.1.3. Biohemijska analiza roditeljskih linija

Linija visokog kvaliteta proteina CML 144 je imala skoro duplo veći sadržaj triptofana i indeks kvaliteta (QI) u odnosu na linije standardnog kvaliteta zrna ZPL 3 i ZPL 5. Sadržaj proteina je bio sličan kod sve tri ispitivane linije. Sadržaj proteina (%), sadržaj triptofana (%) i indeks kvaliteta (QI) roditeljskih linija su prikazani u Tabeli 5.

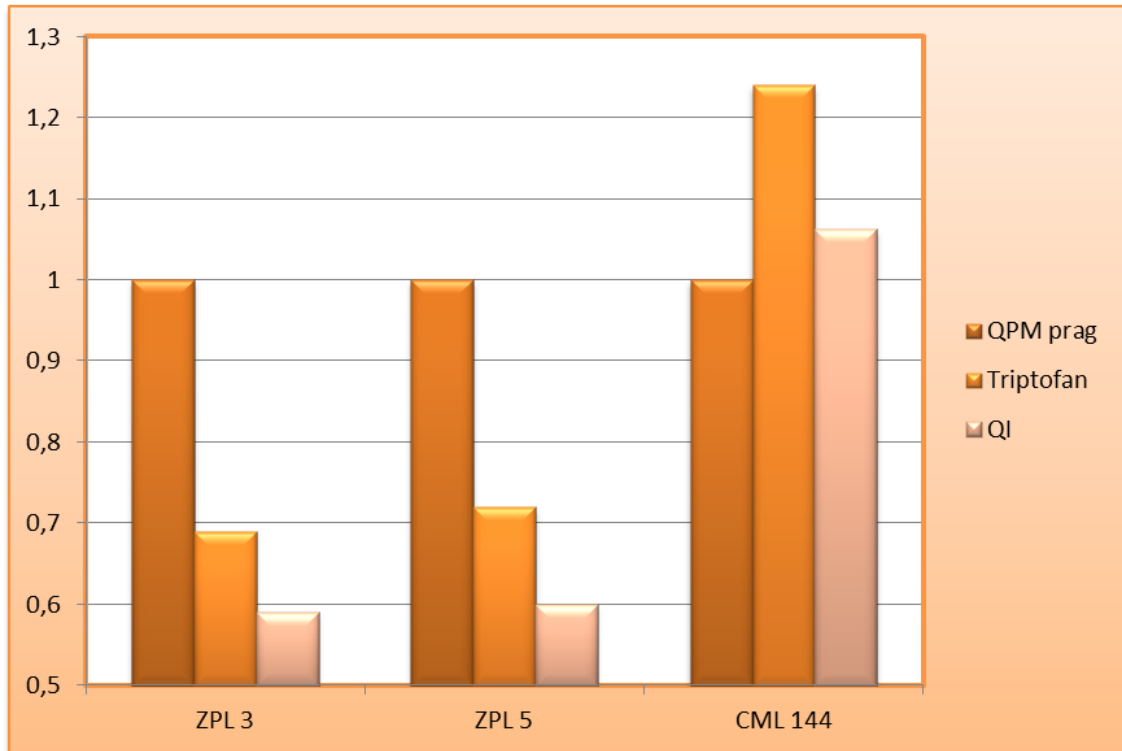
Tabela 5. Sadržaj proteina (%), sadržaj triptofana (%) i indeks kvaliteta (QI) roditeljskih linija

	Protein (%)	Triptofan (%)	QI
ZPL 3	10,98	0,052	0,47
ZPL 5	11,07	0,054	0,48
CML144	10,95	0,093	0,85
QPM prag ¹		>0,075	>0,8

¹granične vrednosti sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta (QI), koje određuju QPM genotip

U odnosu na vrednosti za QPM prag, obe linije standardnog kvaliteta zrna su imale manji sadržaj triptofana - ZPL 3 linija za 31%, a ZPL 5 za 28%. QI je bio manji za 41% (ZPL 3), odnosno 40% (ZPL 5). Kod linije visokog kvaliteta proteina vrednosti za triptofan i QI su bile iznad QPM praga. Sadržaj triptofana je bio veći za 24%, a QI za

0,63%. Razlike u sadržaju triptofana i indeksu kvaliteta između standardnih linija i QPM linije su prikazane na Slici 5. Vrednosti za QPM prag su date kao 1 (100%).

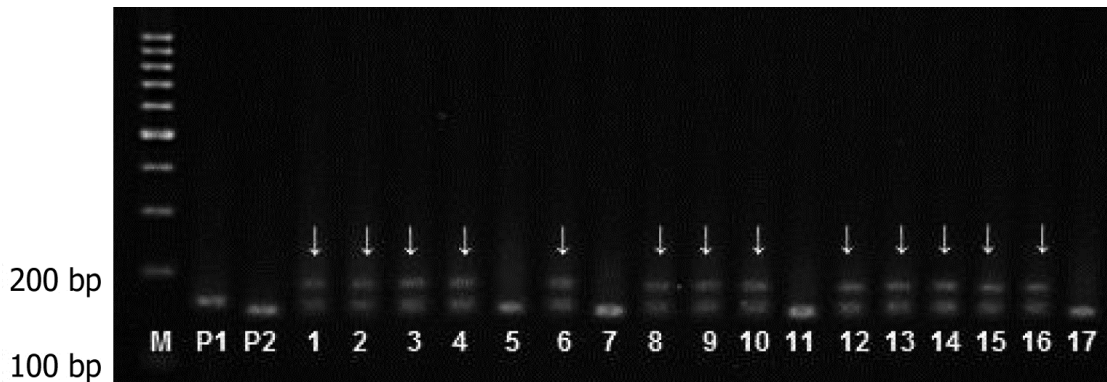


Slika 5. Sadržaj triptofana i indeks kvaliteta (QI) roditeljskih linija ZPL 3, ZPL 5 i CML 144, predstavljeni kao % u odnosu na vrednosti za QPM prag. Vrednosti za QPM prag su date kao 1 (100%).

4.2. Genetička karakterizacija potomstava povratnih ukrštanja (BC_1 i BC_2)

4.2.1. Analiza biljaka BC_1 i BC_2 generacija *opaque2* specifičnim markerima

Nakon prvog i drugog povratnog ukrštanja formirane su BC_1 i BC_2 generacije. Ukrštanjem biljaka F_1 ($O2o2$) generacije i RP ($O2O2$), odnosno BC_1 ($O2o2$) i RP ($O2O2$), dobijena su BC_1 i BC_2 potomstva koja su činile heterozigotne ($O2o2$) i dominantno homozigotne biljke ($O2O2$). Odabrani *opaque2* specifični SSR markeri korišćeni su za identifikaciju heterozigotnih biljaka. Ilustracija amplifikacije roditeljskih linija (CML 144 i ZPL 5) i BC_1 potomstva sa markerom phi057 je data na Slici 6.



Slika 6. SSR profil *opaque2* specifičnog markera phi057. M: 100 bp DNK marker, P1: CML 144, P2: ZPL 5, 1-17: BC₁ potomstva. Strelicama su obeležene heterozigotne biljke.

Od 100 biljaka dobijenih iz ukrštanja (ZPL 3)² x CML 144 identifikovane su 52 heterozigotne i 48 dominantno homozigotnih biljaka. Slični rezultati su dobijeni i za BC₁ potomstvo iz ukrštanja (ZPL 5)² x CML 144 - od 100 biljaka identifikovano je 47 heterozigotnih (47%) i 53 dominantno homozigotne biljke (53%). Identifikovane heterozigotne biljke su povratno ukrštene sa rekurentnim roditeljem ZPL 3, odnosno ZPL 5, radi formiranja BC₂ generacije.

Od 227 biljaka dobijenih iz ukrštanja (ZPL 3)³ x CML 144 identifikovano je 109 heterozigotnih (48%) i 118 dominantno homozigotnih biljaka (52%). Slični rezultati su dobijeni i za potomstvo ukrštanja (ZPL 5)³ x CML 144 - od 67 biljaka identifikovano je 29 heterozigotnih (43,3%) i 38 dominantno homozigotnih biljkaka (56,7%). Identifikovane heterozigotne biljke su samooplođene radi formiranja BC₂F₂ generacije. Biljke koje su nakon berbe imale dovoljnu količinu semena odabrane su za analizu genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljem (ukupno 43).

4.2.2. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC₂ generacije

Za određivanje genetičke sličnosti između rekurentnih roditeljskih linija i potomstava BC₂ generacije korišćeno je 34 SSR markera (Tabela 2). Četrnaest markera je bilo monomorfno, tako da su genetičke sličnosti izračunate na osnovu rezultata dobijenih sa 20 polimorfnih SSR markera.

ZPL 3

Ukupni broj dobijenih alela sa 20 SSR prajmera je iznosio 79. Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od dva do 6, a prosečan broj alela je iznosio 3,95.

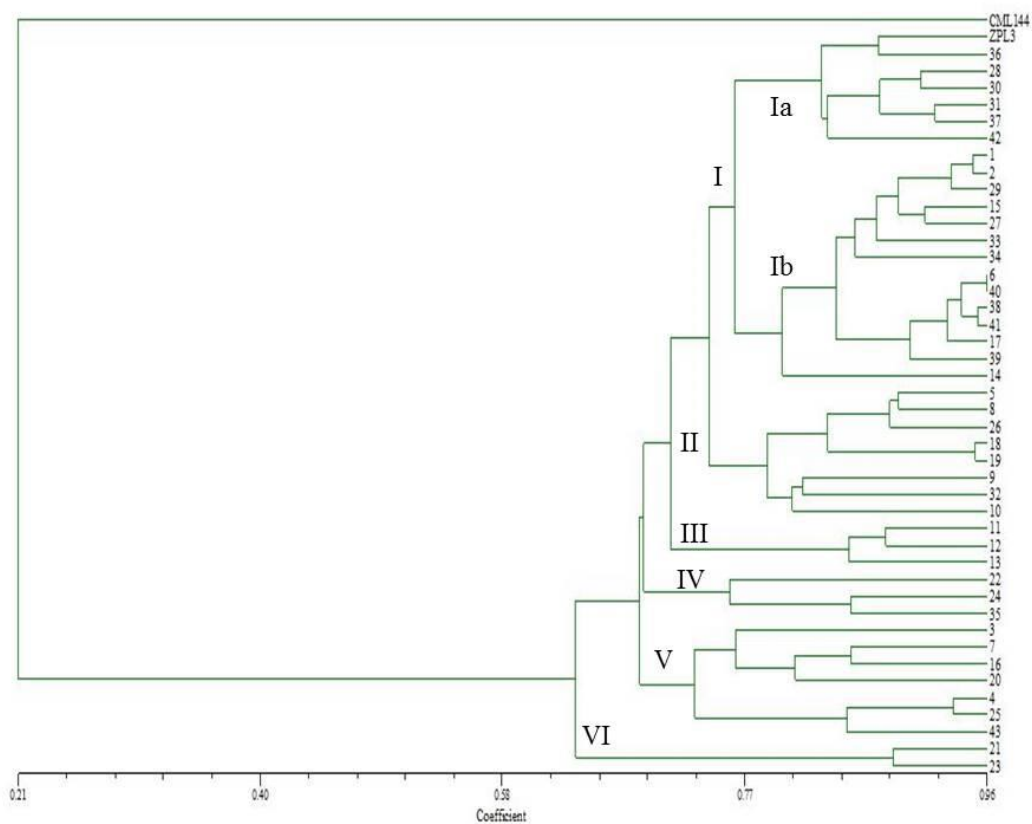
Vrednosti koeficijenta genetičke sličnosti (GS) između rekurentnog roditelja ZPL 3 i potomstava (P-1 do P-43) su iznosile od 0,51 do 0,89 (Tabela 6), sa srednjom vrednošću od 0,74.

Za dalju selekciju izabrana su tri potomstva koja su imala najveću vrednost koeficijenta genetičke sličnosti: P-30 je sa koeficijentom genetičke sličnosti 0,89, P-36 sa 0,87 i P-33 sa 0,86. Vrednosti GS preostalih 40 potomstava su iznosile od 0,51 - 0,85 i ona nisu korišćena u daljem radu.

Tabela 6. Koeficijenti genetičke sličnosti (GS) BC₂ potomstava sa rekurentnim roditeljem ZPL 3

Potomstvo	Koeficijent GS	Potomstvo	Koeficijent GS	Potomstvo	Koeficijent GS
P-1	0,81	P-15	0,79	P-29	0,78
P-2	0,80	P-16	0,67	<u>P-30</u>	<u>0,89</u>
P-3	0,72	P-17	0,71	P-31	0,84
P-4	0,68	P-18	0,74	P-32	0,71
P-5	0,75	P-19	0,77	<u>P-33</u>	<u>0,86</u>
P-6	0,77	P-20	0,59	P-34	0,85
P-7	0,74	P-21	0,57	P-35	0,74
P-8	0,81	P-22	0,61	<u>P-36</u>	<u>0,87</u>
P-9	0,62	P-23	0,51	P-37	0,81
P-10	0,65	P-24	0,70	P-38	0,72
P-11	0,74	P-25	0,64	P-39	0,78
P-12	0,67	P-26	0,77	P-40	0,72
P-13	0,81	P-27	0,81	P-41	0,71
P-14	0,67	P-28	0,83	P-42	0,83
				P-43	0,75

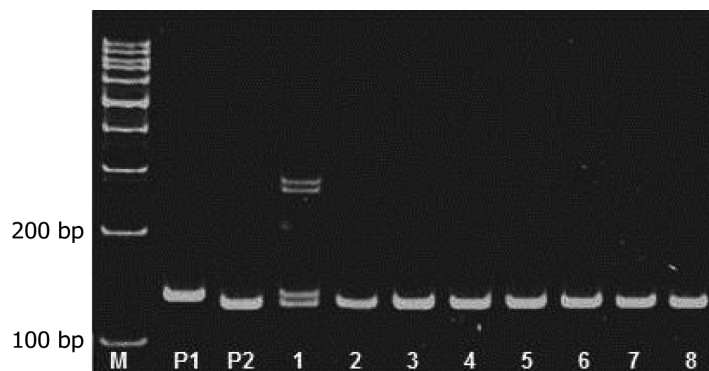
Na osnovu matrica genetičkih sličnosti urađena je klaster analiza, kako bi se potvrdila sličnost između rekurentnog roditelja i potomstava. Rezultati klaster analize prikazani su grafički u formi dendrograma (Slika 7). Potomstva sa najvećim koeficijentom GS grupisala su se u klaster I sa roditeljskom linijom ZPL 3, P-30 i P-36 u sub-klaster Ia, a P-33 u sub-klaster Ib. Klaster analiza pokazala je dobro poklapanje sa matricom genetičkih sličnosti po *Dice*-u, što je potvrdila visoka vrednost ko-fenetičkog koeficijenta korelacije ($r = 0,88$).



Slika 7. Dendrogram rekurentnog roditelja ZPL 3 i BC₂ potomstava analiziranih pomoću SSR markera dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Dice*-u.

ZPL 5

Ukupni broj dobijenih alela sa 20 SSR prajmera je iznosio 76. Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od dva do 6, a prosečan broj alela je iznosio 3,8. Elektroforegram za SSR prajmer umc2047 je prikazan na Slici 8.



Slika 8. Elektroforegram SSR alela za prajmer umc2047 roditeljskih linija i BC₂ potomstava. M: 100 bp DNK marker, P1: CML 144, P2: ZPL 5, 1-8: BC₂ potomstva

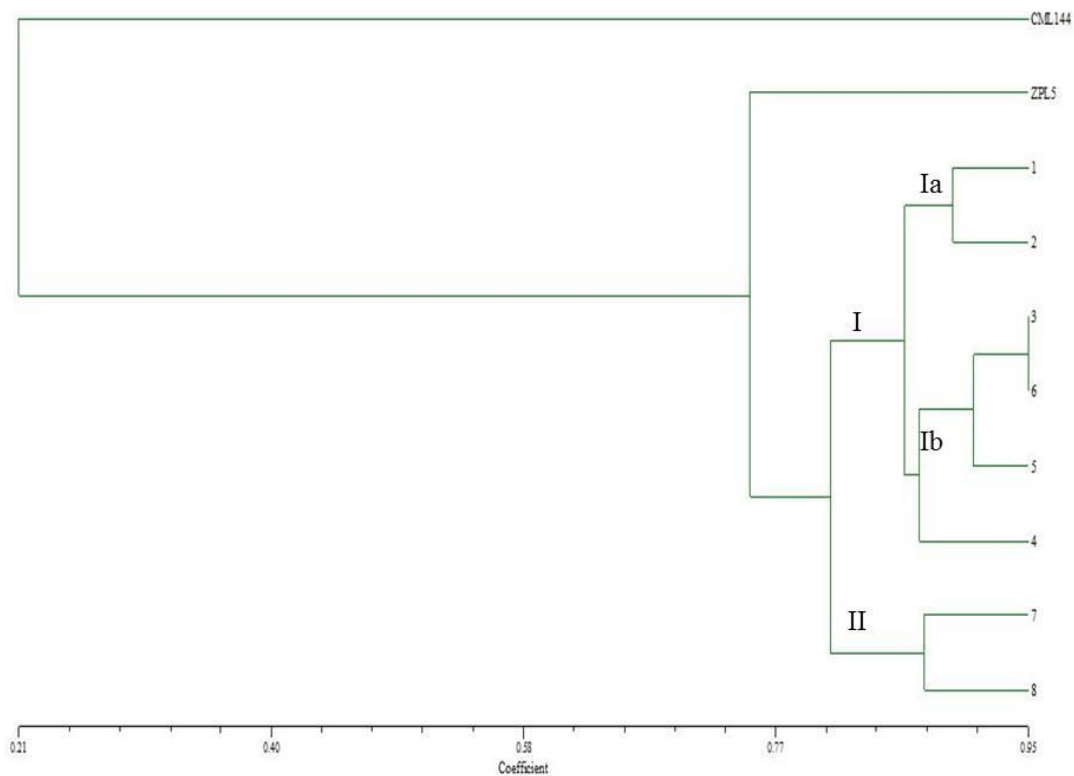
Vrednosti koeficijenta genetičke sličnosti (GS) između rekurentnog roditelja ZPL 5 i potomstava (P-1 do P-8) su iznosile od 0,67 do 0,85 (Tabela 7), sa srednjom vrednošću od 0,75.

Tabela 7. Koeficijenti genetičke sličnosti (GS) BC₂ potomstava sa rekurentnim roditeljem ZPL 5

Potomstvo	Koeficijent GS	Potomstvo	Koeficijent GS
P-1	0,75	P-5	0,67
<u>P-2</u>	<u>0,85</u>	P-6	0,71
P-3	0,72	<u>P-7</u>	<u>0,80</u>
P-4	0,78	P-8	0,74

Za dalju selekciju izabrana su dva potomstva koja su imala najveću vrednost koeficijenta genetičke sličnosti: P-2 sa 0,85, a P-7 sa 0,80. Vrednosti GS preostalih šest potomstava su iznosile od 0,67 - 0,78 i ona nisu korišćena u daljem radu.

Na osnovu matrica genetičkih sličnosti urađena je klaster analiza, da bi se potvrdila sličnost između rekurentnog roditelja i potomstava. Rezultati klaster analize prikazani su grafički u formi dendrograma (Slika 9). Potomstva od P-1 do P-6 izdvojila su se u klaster I, P-7 i P-8 u klaster II, a za njih je vezana roditeljska linija ZPL 5. Klaster analiza pokazala je dobro poklapanje sa matricom genetičkih sličnosti po *Dice*-u što je potvrdila visoka vrednost ko-fenetičkog koeficijenta korelacije ($r = 0,98$).



Slika 9. Dendrogram rekurentnog roditelja ZPL 5 i BC₂ potomstava analiziranih pomoću SSR markera dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Dice*-u.

4.3. Genetička, fenotipska i biohemijska karakterizacija potomstava dobijenih samooplodnjom povratnih ukrštanja (BC₂F₂, BC₂F₃ i BC₂F₄)

4.3.1. Analiza biljaka BC₂F₂ generacije *opaque2* specifičnim markerima

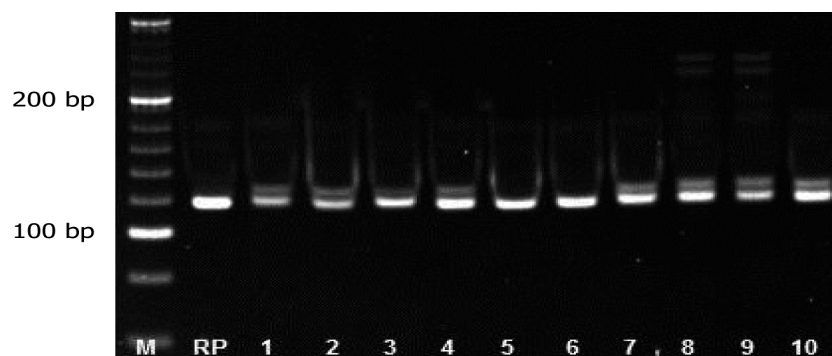
Nakon samooplodnje odabranih heterozigotnih biljaka BC₂ generacije, formirana je BC₂F₂ generacija. Dobijeno je potomstvo koje je sadržalo heterozigotne (*O2o2*), dominantno homozigotne (*O2O2*) i recesivno homozigotne biljke (*o2o2*). U ovom koraku selekcije, odabrani *opaque2* specifični SSR markeri su korišćeni za identifikaciju recesivno homozigotnih biljaka.

Od 329 biljaka BC₂F₂ potomstva iz ukrštanja ZPL 3 x CML 144 detektovano je 15 recesivno homozigotnih biljaka (4,5%). Nijedna od ovih biljaka nije dala dovoljan broj zrna, što je onemogućilo dalji rad sa potomstvom koje potiče od linije standardnog kvaliteta zrna ZPL 3. Takođe je i kod potomstva iz ukrštanja ZPL 5 x CML 144 identifikovan znatno manji procenat recesivno homozigotnih biljaka od očekivanih 25% - samo 7,6%, odnosno 19 od ukupno 250 biljaka. Ove biljke su samooplođene radi formiranja BC₂F₃ generacije. Zrno sa deset biljaka kod kojih je dovoljno uspela samooplodnja posejano je u polju za dalja ispitivanja.

4.3.2. Genetička i fenotipska karakterizacija BC₂F₃ generacije

4.3.2.1. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC₂F₃ generacije

Analiza genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja (ZPL 5) i BC₂F₃ potomstava urađena je pomoću 32 SSR markera (Tabela 2). Tri markera nisu iskorišćena u analizi zbog loše amplifikacije (*phi072* i *phi087*) ili odsustva amplifikacije (*bnlg2235*). Ukupni broj dobijenih alela sa 29 SSR parajmera je iznosio 163, od čega je 53 bilo monomorfno (32,5%), a 110 polimorfno (67,5%). Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od dva do 6, a prosečan broj alela je iznosio 5,6. Elektroforegram za SSR prajmer *umc1594* je prikazan na Slici 10.



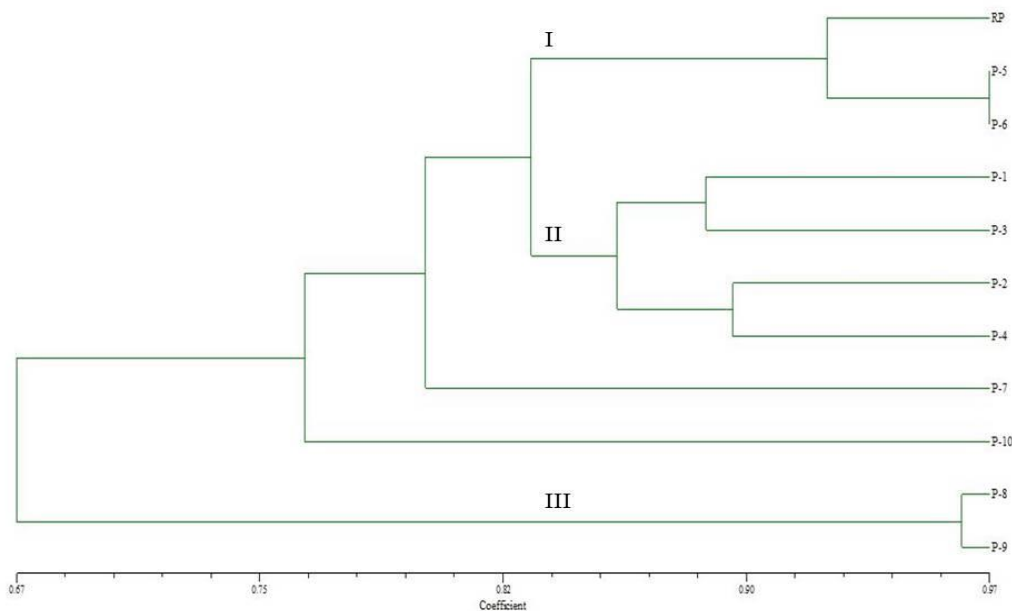
Slika 10. Elektroforegram SSR alela za prajmer umc1594 rekurentnog roditelja (RP) i BC₂F₃ potomstava. M: 20 bp DNK marker, RP: ZPL 5, 1-10: BC₂F₃ potomstva.

Koeficijenti genetičke sličnosti (GS) između rekurentnog roditelja (RP) i potomstava (P-1 do P-10) su iznosili od 0,71 do 0,94, sa srednjom vrednošću od 0,81. Potomstva koja su imala koeficijent GS ispod 0,81 su odbačena iz daljih analiza. Pet preostalih potomstava je imalo koeficijent GS veći od prosečnog (Tabela 8) i korišćena su za dalji proces dobijanja linija visokog kvaliteta proteina.

Tabela 8. Koeficijenti genetičke sličnosti (GS) BC₂F₃ potomstava sa rekurentnim roditeljem ZPL 5

Potomstvo	Koeficijent GS	Potomstvo	Koeficijent GS
<u>P-1</u>	<u>0,82</u>	<u>P-6</u>	<u>0,91</u>
P-2	0,78	<u>P-7</u>	<u>0,83</u>
P-3	0,75	P-8	0,71
<u>P-4</u>	<u>0,84</u>	P-9	0,71
<u>P-5</u>	<u>0,94</u>	P-10	0,76

Na osnovu matrica genetičkih sličnosti urađena je klaster analiza, da bi se potvrdila sličnost između rekurentnog roditelja i BC₂F₃ potomstava. Rezultati klaster analize prikazani su grafički u formi dendrograma (Slika 11). Grupisanje potomstava P-5 i P-6 u isti klaster (I) sa rekurentnim roditeljem ZPL 5 je potvrdilo rezultate dobijene analizom genetičke sličnosti prema kojima upravo ova dva potomstva imaju najveći koeficijent GS. Visoka vrednost ko-fenetičkog koeficijenta korelacije ($r = 0,94$) potvrdila je dobro poklapanje dobijenog klastera sa matricom genetičkih sličnosti po *Dice*-u.



Slika 11. Dendrogram rekurentnog roditelja (RP) i BC₂F₃ potomstava analiziranih pomoću SSR markera dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Dice*-u.

Na odabranim potomstvima urađene su fenotipske analize i ona su ukrštena sa komercijalnim testerom radi provere kombinacionih sposobnosti u poređenju sa rekurentnim roditeljem. Ova potomstva su takođe samoopložena (formiranje BC₂F₄ generacije) i nakon berbe određena je genetička sličnost sa rekurentnim roditeljem, stepen modifikacije endosperma zrna i izvršena je biohemijska evaluacija.

4.3.2.2. Analiza fenotipskih osobina BC₂F₃ generacije

Analizirane fenotipske osobine roditeljske linije ZPL 5 i odabranih BC₂F₃ generacije u poljskim ogledima predstavljene su njihovim prosečnim vrednostima i intervalom variranja (\bar{X} , X_{\min} i X_{\max}). Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti 15 analiziranih fenotipskih osobina su dati u Tabeli 9.

Koeficijent varijacije (CV) je izračunat na osnovu srednjih vrednosti i standardne devijacije (σ) da bi se uporedila variranja osobina. Najmanji koeficijenti varijacije su izračunati za procenat vlage u zrnu - %VL (2,37%) i ukupan broj listova - BL (2,45%), dok je najveće variranje utvrđeno kod procenta slomljenih biljaka - %SB (72,07%). Koeficijent varijacije veći od 30% je utvrđen za period između metličanja i svilanja - ASI (34,64%) i prinos zrna - PR (30,65%).

Analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za određene osobine. U Tabeli 9. su prikazani nivoi značajnosti za sredine kvadrata genotipa iz analize varijanse. Visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova je uočeno kod sledećih osobina: visine biljke - VB, broja listova - BL, broja listova iznad klipa - BLK i broja redova zrna - BRZ. Osobina visina biljke iznad klipa - VBK pokazala je srednje značajno variranje ($P < 0,01$), dok je kod broja klipova po biljci - BKB, dužine klipa - DK, mase 100 zrna - MZ i prinosa zrna - PR uočeno slabo značajno variranje ($P < 0,05$). Genotip nije bio značajan izvor variranja (ns) za period između metličanja i svilanja - ASI, procenat slomljenih biljaka - %SB, procenat oklaska - %OK, procenat vlage u zrnu - %VL, broj zrna u redu - BZR i dubinu zrna - DZ.

LSD test je pokazao da ne postoje statistički značajne razlike između roditeljske linije ZPL 5 i ispitivanih potomstava za sledeće osobine: period između metličanja i svilanja - ASI, broj listova iznad klipa - BLK, broj klipova po biljci - BKB, procenat slomljenih biljaka - %SB, procenat oklaska - %OK, broj zrna u redu - BZR i masu 100 zrna - MZ. Kod svih genotipova uočena je značajna razlika u odnosu na ZPL 5 za visinu biljke - VB, ukupan broj listova - BL i broj redova zrna - BRZ. U odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5, najmanja statistički značajna razlika za visinu biljke iznad klipa - VBK, procenat vlage - %VL, dužinu klipa - DK, dubinu zrna - DZ i prinos zrna - PR je bila kod potomstava P-5 i P-6.

Tabela 9. Fenotipske osobine BC₂F₃ generacije

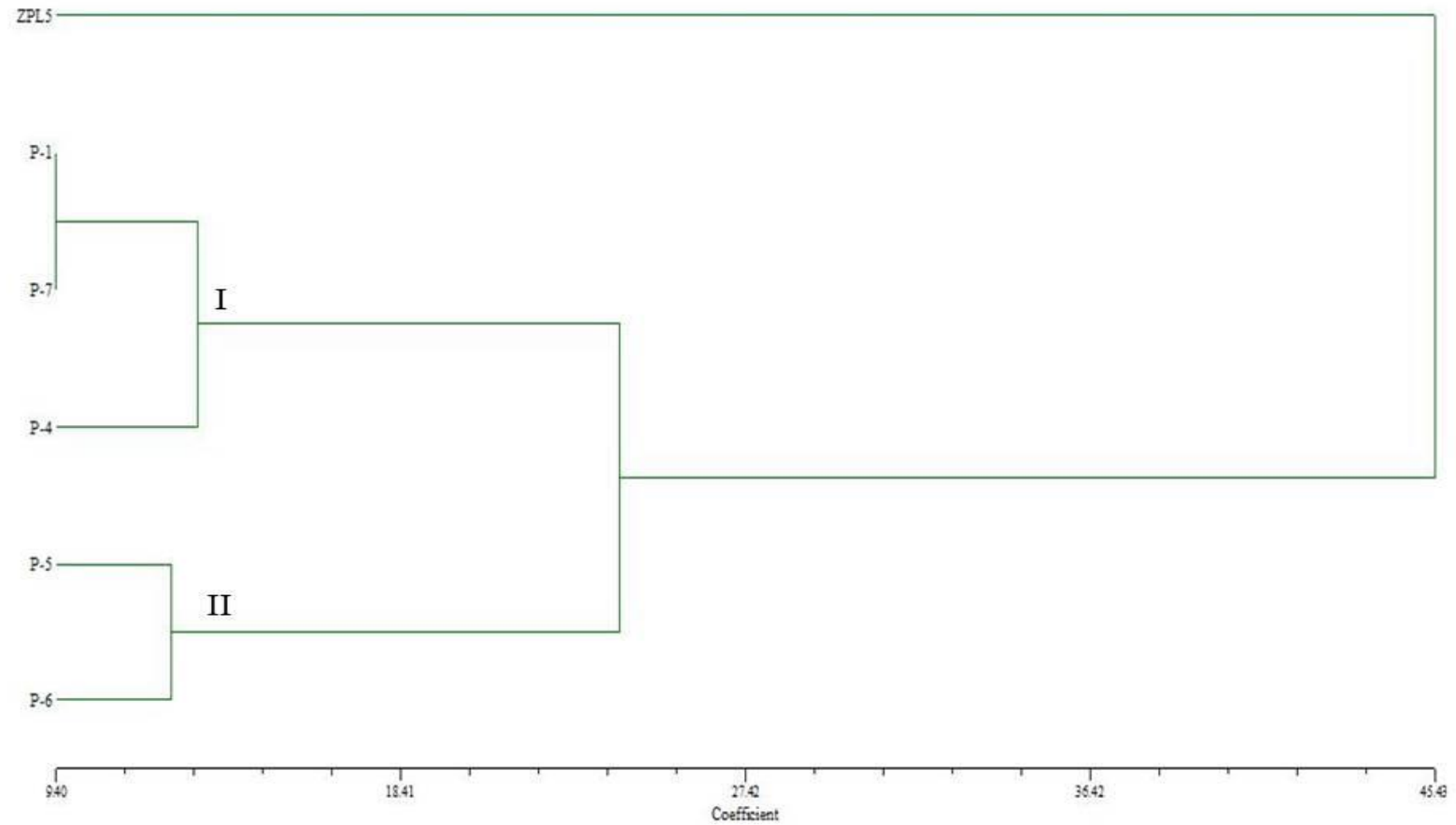
	ASI	VB (cm)	VBK (cm)	BL	BLK	BKB	SB (%)	OK (%)	VL (%)	DK (cm)	BRZ	BZR	DZ (cm)	MZ (g)	PR (t/ha)
ZPL 5	5,00a	159,60b	59,47b	14,60b	4,20a	0,65a	6,83a	30,82ab	24,08b	15,27c	13,77c	30,79ab	0,74b	20,34a	2,03c
P-1	3,50a	196,90a	81,72ab	17,02a	5,48a	0,92a	13,68a	31,01ab	25,25a	17,39ab	15,70b	32,30ab	0,86ab	23,81a	3,98ab
P-4	4,75a	212,40a	82,00ab	16,60a	5,10a	0,98a	10,46a	31,12ab	25,47a	18,73a	15,95b	36,67a	0,86ab	24,25a	4,44a
P-5	3,75a	192,70a	68,63ab	16,25a	4,88a	0,70a	15,66a	29,49ab	24,81ab	15,79bc	16,80b	30,10ab	0,82ab	17,65a	2,70bc
P-6	4,50a	197,00a	72,63ab	16,28a	4,72a	0,78a	8,10a	31,98a	24,89ab	16,53bc	16,17b	29,15b	0,80ab	20,03a	2,71bc
P-7	3,25a	206,90a	95,20a	17,20a	4,85a	1,00a	15,95a	27,93b	25,42a	17,53ab	18,50a	31,85ab	0,91a	26,51a	4,25a
\bar{X}	4,12	194,23	76,61	16,32	4,87	0,84	11,78	30,39	24,99	16,88	16,15	31,81	0,83	22,10	3,35
X _{min}	3,25	159,60	59,47	14,60	4,20	0,65	6,83	3,98	24,08	15,27	13,77	29,15	0,74	17,65	2,03
X _{max}	5,00	212,40	95,20	17,20	5,48	1,00	15,95	31,12	25,47	18,73	18,50	36,67	0,91	26,51	4,44
SD	1,74	19,30	13,23	0,94	0,48	0,34	8,55	3,10	1,77	1,97	1,61	4,92	0,11	4,09	1,66
CV (%)	34,64	5,35	11,09	2,45	4,92	15,76	72,07	6,95	2,37	8,12	5,72	11,58	15,10	12,99	30,65
LSD _{0,05}	2,62	28,19	28,83	2,07	1,32	0,57	24,90	3,56	1,13	2,11	1,53	7,44	0,1626	9,38	1,39
MS	2,08ns	1364,91***	619,24**	3,45***	0,71***	0,09*	60,71ns	8,40ns	1,08ns	6,40*	9,46***	27,87ns	0,013ns	43,28*	3,98*

ASI - razlika između datuma polinacije i svilanja u danima, VB - visina biljke (cm), VBK - visina klipa (cm), BL - ukupan broj listova, BLK - broj listova iznad klipa, BKB - broj klipova po biljci, SB - slomljene biljke (%), OK - % oklaska, VL - % vlage u zrnu u momentu berbe, DK - dužina klipa (cm), BRZ - broj redova zrna na klipu, BZR - broj zrna u redu, DZ - debljina zrna (cm), MZ - masa 100 zrna (g), PR - prinos zrna u t/ha sa 14% vlage u zrnu, \bar{X} - srednja vrednost, X_{min} - minimalna vrednost, X_{max} - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, MS - sredina kvadrata genotipova iz analize varijanse (ANOVA), *, ** i *** - statistički značajno na nivou od 0,05; 0,01 i 0,001, redom, ^{ns} - statistički nesigifikantno, CV - koeficijent varijacije, LSD_{0,05} - LSD vrednost na nivou značajnosti od 0,05. Prosečne vrednosti parametara označene istim slovom unutar svake kolone se statistički ne razlikuju na nivou značajnosti od 0,05.

Na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina urađena je klaster analiza, pri čemu je kao mera distance korišćen kvadrat euklidskog rastojanja (Tabela 11). Na osnovu UPGMA klaster metode dobijen je dendrogram prikazan na slici 12. Potomstva P-1, P-7 i P-4 izdvojila su se u klaster I, P-5 i P-6 u klaster II, a za njih je vezana roditeljska linija. Najmanja distanca u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5 uočena je kod potomstava P-6 (24,89) i P-5 (26,37), što je potvrdilo dobijene rezultate analize genetičke sličnosti BC₂F₃ potomstava.

Tabela 11. Kvadrati euklidskog rastojanja između ZPL 5 i BC₂F₃ potomstava

Potomstvo	Distanca (kvadrat euklidskog rastojanja)
P-1	48,96
P-4	53,65
P-5	26,37
P-6	24,89
P-7	73,28



Slika 12. Dendrogram rekurentnog roditelja ZPL5 i BC_2F_3 potomstava dobijen UPGMA klaster metodom iz kvadrata euklidskog rastojanja na osnovu fenotipskih osobina.

4.3.3. Genetička, fenotipska i biohemijska karakterizacija BC₂F₄ generacije

Samooplodnja odabranih BC₂F₃ potomstava bila je uspešna samo na jednoj lokaciji, dok na drugoj nije bilo dovoljno zrna za dalji rad. Nakon berbe odabrano je 14 BC₂F₄ potomstava (Tabela 8) čiji su klipovi dali dovoljno zrna za SSR i biohemijsku analizu, kao i za setvu naredne godine.

4.3.3.1 Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i potomstava BC₂F₄ generacije

Analiza genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja ZPL 5 i potomstava BC₂F₄ generacije urađena je pomoću 32 SSR markera (Tabela 2). Tri markera nisu iskorišćena u analizi zbog loše amplifikacije (phi087, umc1015 i bnlg1350). Ukupni broj dobijenih alela sa 29 SSR prajmera je iznosio 132, od čega je 54 bilo monomorfno (40,9%), a 78 polimorfno (59,1%). Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od jedan do 6, a prosečan broj alela je iznosio 4,55. Elektroforegram za SSR prajmer umc1594 je prikazan na Slici 13.

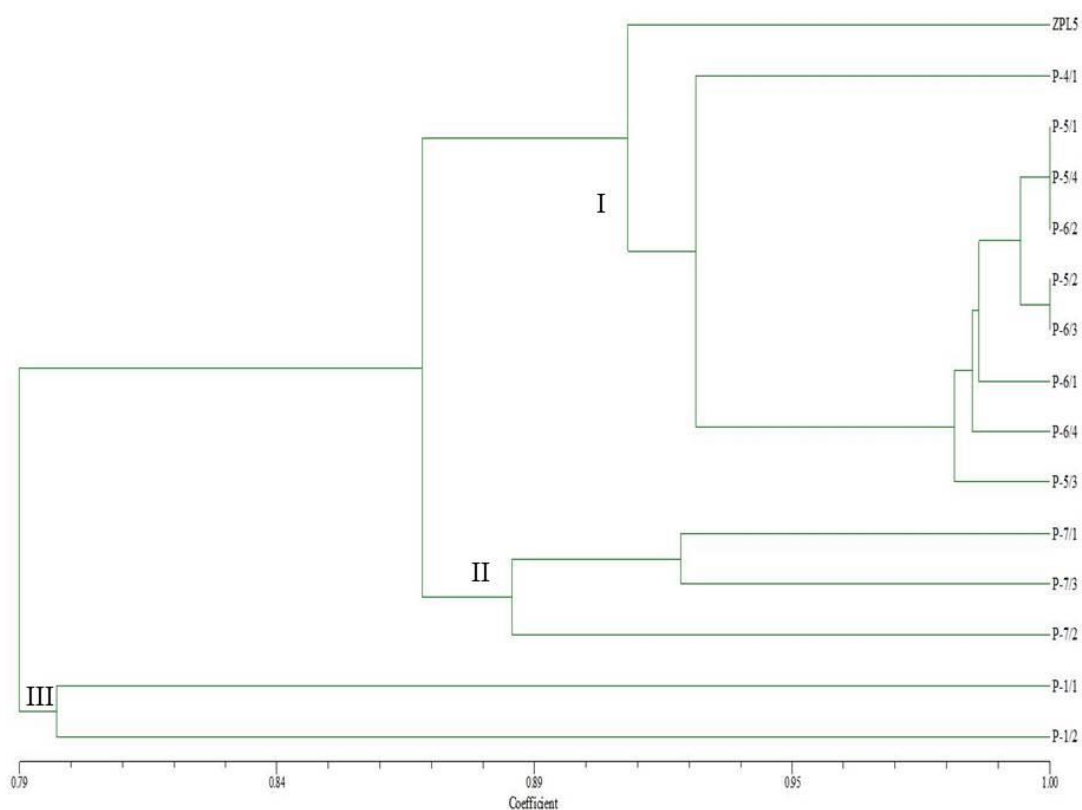


Slika 13. Elektroforegram SSR alela za prajmer umc1594 rekurentnog roditelja (RP) i BC₂F₄ potomstava. M: 20 bp DNK marker, RP: ZPL 5, 1-14: BC₂F₄ potomstva.

Koeficijenti genetičke sličnosti (GS) između rekurentnog roditelja (RP) i BC₂F₄ potomstava su iznosili od 0,81 do 0,93, sa srednjom vrednošću od 0,88. Devet potomstava je imalo vrednost koeficijenta GS veću od prosečne (0,91 - 0,93) (Tabela 8). P-6/4 je imalo najveći koeficijent GS - 0,93, zatim P-5/1, P-5/4 i P-6/2 po 0,92, a P-4/1, P-5/2, P-5/3, P-6/1 i P-6/3 po 0,91. Ova potomstva su korišćena za agronomske i biohemijske analize.

Vrednosti koeficijenta GS preostalih pet potomstava (P-1/1, P-1/2, P-7/1, P-7/2, i P-7/3) su iznosile od 0,80 - 0,84 i osim P-1/2 (zbog visokog sadržaja triptofana), nisu korišćena u daljim analizama.

Na osnovu matrica genetičkih sličnosti urađena je klaster analiza, da bi se potvrdila sličnost između rekurentnog roditelja i BC₂F₄ potomstava. Rezultati klaster analize prikazani su grafički u formi dendrograma (Slika 14). Grupisanje potomstava P-4/1, P-5/1, P-5/2, P-5/3, P-5/4, P-6/1, P-6/2, P-6/3 i P-6/4 u isti klaster (I) sa rekurentnim roditeljem ZPL 5 je potvrdilo rezultate dobijene analizom genetičke sličnosti prema kojima upravo ovih devet potomstava imaju najveći koeficijent GS. Klaster analiza pokazala je dobro poklapanje sa matricom genetičkih sličnosti po *Dice*-u što je potvrđeno visokom vrednošću ko-fenetičkog koeficijenta korelacije ($r = 0,94$).



Slika 14. Dendrogram rekurentnog roditelja ZPL 5 i BC_2F_4 potomstava analiziranih pomoću SSR markera dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Dice*-u.

4.3.3.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna BC_2F_4 generacije

Od 14 potomstava BC_2F_4 generacije kod šest (P-1/1, P-4/1, P-5/1, P-5/2, P-5/3 i P-5/4) su identifikovana samo zrna sa tvrdim endospermom ($\leq 25\%$ *opaque*). Potomstva P-6/1 i P-6/2 su imala i zrna koja su $\leq 50\%$ *opaque* (6,3% i 8,3%, redom) i $\leq 75\%$ *opaque* (2,7% i 3,4%, redom).

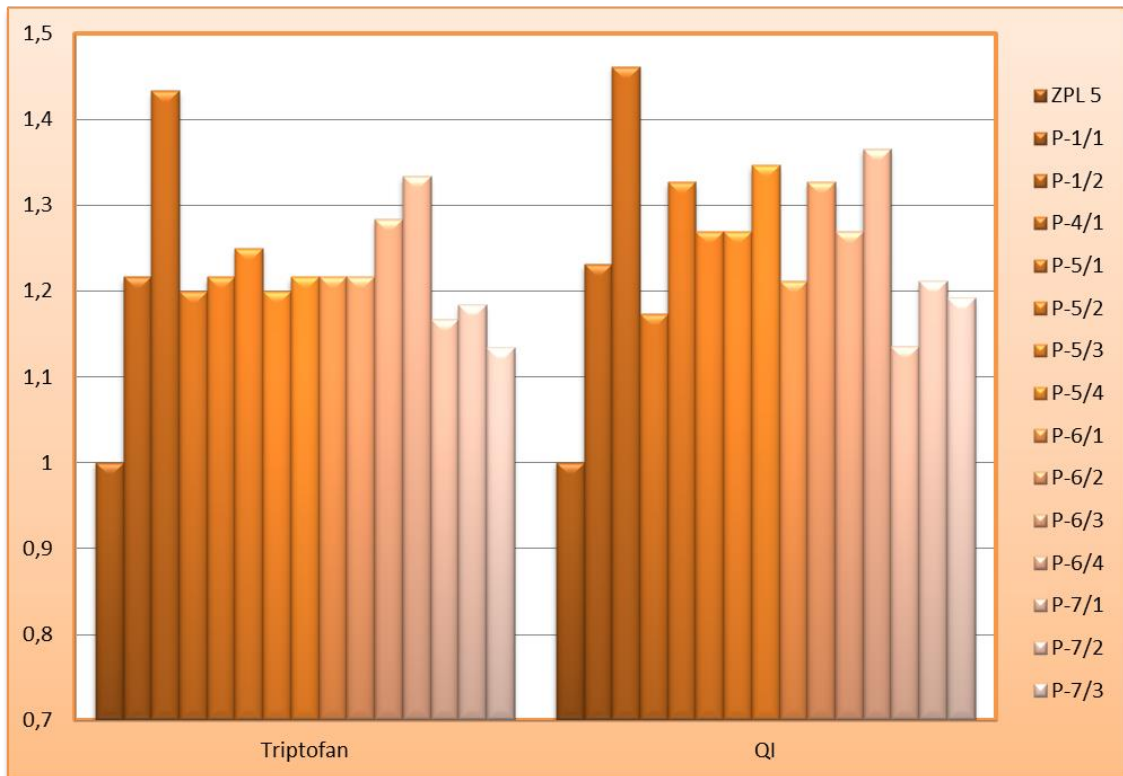
Ostala potomstva (P-1/2, P-6/3, P-6/4, P-7/1, P-7/2 i P-7/3) su imala i zrna sa mekim endospermom (100% *opaque*). Najmanji procenat zrna sa mekim endospermom nađen je kod potomstva P-6/4 (2,2%), a najveći kod P-7/2 (4,9%). Učestalosti različitih klasa ($\leq 25\%$ *opaque*, $\leq 50\%$ *opaque*, $\leq 75\%$ *opaque* i 100% *opaque*) stepena modifikacija endosperma zrna BC_2F_4 generacije data je u Tabeli 12.

4.3.3.3. Biohemijska evaluacija BC₂F₄ generacije

Rezultati analize biohemijskih parametara pokazali su značajno povećanje sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta (QI) kod svih ispitivanih potomstava u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5, dok sadržaj proteina nije bio značajno promenjen u odnosu na roditeljsku liniju (Tabela 12).

Analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za ispitivane biohemijske osobine. U Tabeli 12. su prikazani nivoi značajnosti za sredine kvadrata za genotip. Visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova uočeno je kod sadržaja triptofana i proteina, dok je indeks kvaliteta pokazao umereno značajno variranje ($P < 0,01$).

Najveće povećanje sadržaja triptofana (43%) i QI (46%) u odnosu na roditeljsku liniju uočeno je kod potomstva P-1/2. Nešto manje povećanje sadržaja triptofana (33%) i QI (37%) u odnosu na ZPL 5 utvrđeno je kod potomstva P-6/4. Kod devet ispitivanih potomstava povećanje sadržaja triptofana iznosilo je preko 20% (20 - 28%). Najmanje povećanje sadržaja triptofana uočeno je kod potomstava P-7/1, P-7/2 i P-7/3 (13 - 18%). Odnos prosečnih vrednosti sadržaja triptofana i QI BC₂F₄ generacije i roditeljske linije ZPL 5 (izražen u %) je prikazan na Slici 15. Vrednosti roditeljske linije date su kao 100% (1).



Slika 15. Sadržaj triptofana i indeks kvaliteta (QI) BC_2F_4 generacije, predstavljeni kao % vrednosti roditeljske linije ZPL 5. Vrednosti za ZPL 5 su date kao 1 (100%).

4.3.3.4. Izbor sub-linija za fenotipsku i biohemijsku evaluaciju

Na osnovu svih dobijenih fenotipskih, biohemijskih i SSR rezultata, izabrano je deset sub-linija za fenotipsku i biohemijsku evaluaciju (Tabela 12). Linije P-1/1, P-7/1, P-7/2 i P-7/3 su odbačene zbog niske genetičke sličnosti sa ZPL 5 (0,80 do 0,84). Pored nezadovoljavajućeg stepena genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljem, P-7/1 i P-7/2 linije su imale nizak stepen modifikacije endosperma zrna (manje od 90% zrna u kategorijama $\leq 25\%$ *opaque* i $\leq 50\%$ *opaque*), a P-7/3 i nizak sadržaj triptofana (0,068%).

Tabela 12. Rezultati genetičke, fenotipske i biohemijske karakterizacije BC₂F₄ potomstava na osnovu kojih su odabrane sub-linije za dalja ispitivanja

BC ₂ F ₃	BC ₂ F ₄	Koeficijent GS	Stepen modifikacija endosperma zrna (%)				Triptofan (%)	Proteini (%)	QI	Sub-linije
			≤ 25% opaque	≤ 50% opaque	≤ 75% opaque	100% opaque				
ZPL 5							0,060f	11,56ab	0,52h	
P-1	P-1/1	0,81	100,0	-	-	-	0,073cde	11,49ab	0,64cdefg	
	P-1/2	0,81	91,2	4,4	2,0	2,4	0,086a	11,26abc	0,76a	S-1
P-4	P-4/1	0,91	100,0	-	-	-	0,072cde	11,74a	0,61fg	S-2
P-5	P-5/1	0,92	100,0	-	-	-	0,073bcde	10,62cd	0,69bcde	S-3
	P-5/2	0,91	100,0	-	-	-	0,075bcd	11,31ab	0,66bcdef	S-4
	P-5/3	0,91	100,0	-	-	-	0,072cde	11,02bcd	0,66bcdef	S-5
	P-5/4	0,92	100,0	-	-	-	0,073bcde	10,51d	0,70abc	S-6
P-6	P-6/1	0,91	91,0	6,3	2,7	-	0,073cde	11,61ab	0,63efg	S-7
	P-6/2	0,92	88,3	8,3	3,4	-	0,073bcde	10,51d	0,69abcd	S-8
	P-6/3	0,91	91,3	1,3	3,6	3,8	0,077bc	11,82a	0,66bcdef	S-9
	P-6/4	0,93	83,5	11,9	2,4	2,2	0,080ab	11,20abc	0,71ab	S-10
P-7	P-7/1	0,84	75,5	9,3	11,7	3,5	0,070de	11,84a	0,59g	
	P-7/2	0,84	85,2	4,7	5,2	4,9	0,071cde	11,30ab	0,63defg	
	P-7/3	0,80	97,4	-	-	2,6	0,068e	10,98bcd	0,62fg	
						\bar{X}	0,073	11,25	0,65	
						X _{min}	0,060	10,51	0,52	
						X _{max}	0,086	11,84	0,76	
						SD	0,01	0,49	0,06	
						MS	0,00***	0,40**	0,01***	
						CV (%)	4,60	2,63	4,50	
						LSD _{0,05}	0,01	0,64	0,07	

\bar{X} - srednja vrednost, X_{min} - minimalna vrednost, X_{max} - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, MS - sredina kvadrata genotipova iz analize varijanse, ** i *** - statistički značajno na nivou od 0,01 i 0,001, redom, CV - koeficijent varijacije, LSD_{0,05} - LSD vrednost na nivou značajnosti od 0,05. Prosečne vrednosti parametara označene istim slovom unutar svake kolone se statistički ne razlikuju na nivou značajnosti od 0,05.

4.4. Fenotipska i biohemijska evaluacija odabranih sub-linija

4.4.1. Analiza fenotipskih osobina odabranih sub-linija

Analizirane fenotipske osobine roditeljske linije ZPL 5 i odabranih sub-linija u poljskim ogledima predstavljene su njihovim prosečnim vrednostima i intervalom variranja (\bar{X} , X_{\min} i X_{\max}). Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti 15 analiziranih fenotipskih osobina su dati u Tabeli 13.

Koeficijent varijacije (CV) je izračunat da bi se uporedila variranja osobina. Najmanji CV su izračunati za ukupan broj listova - BL (3,22%), procenat vlage u zrnu - %VL (3,79%) i visinu biljke - VB (3,86%), dok je najveće variranje nađeno kod procenta slomljenih biljaka - %SB (89,71%). Koeficijent varijacije veći od 30% je utvrđen za period između metličanja i svilanja - ASI (35,72%).

Analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za većinu osobina. U Tabeli 13. su prikazani nivoi značajnosti za sredine kvadrata genotipova iz analize varijanse. Visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova je uočeno kod sledećih osobina: visine biljke - VB, visine biljke iznad klipa - VBK, broja listova - BL, broja listova iznad klipa - BLK, broja klipova po biljci - BKB, procenta vlage u zrnu - %VL, dužine klipa - DK, dubine zrna - DZ, mase 100 zrna - MZ i prinosa zrna - PR. Osobine broj redova zrna - BRZ i broj zrna u redu - BZR pokazale su umereno značajno variranje ($P < 0,01$). Genotip nije bio značajan izvor variranja (ns) za period između metličanja i svilanja - ASI, procenat slomljenih biljaka - %SB i procenat oklaska - %OK.

LSD test je pokazao da ne postoje statistički značajne razlike između roditeljske linije ZPL 5 i ispitivanih sub-linija za sledeće osobine: period između metličanja i svilanja - ASI, broj klipova po biljci - BKB, procenat slomljenih biljaka - %SB i procenat oklaska - %OK. Kod svih genotipova uočena je statistički značajna razlika u odnosu na ZPL 5 za visinu biljke - VB i broj redova zrna - BRZ. U odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5, najmanja statistički značajna razlika za visinu biljke iznad klipa - VBK, ukupan broj listova - BL, broj listova iznad klipa - BLK, procenat vlage u zrnu - %VL, dužinu klipa - DK, broj zrna u redu - BZR, dubinu zrna - DZ, masu 100 zrna - MZ i prinos zrna - PR je bila kod sub-linija S-3 do S-10.

Tabela 13. Fenotipske osobine odabranih sub-linija

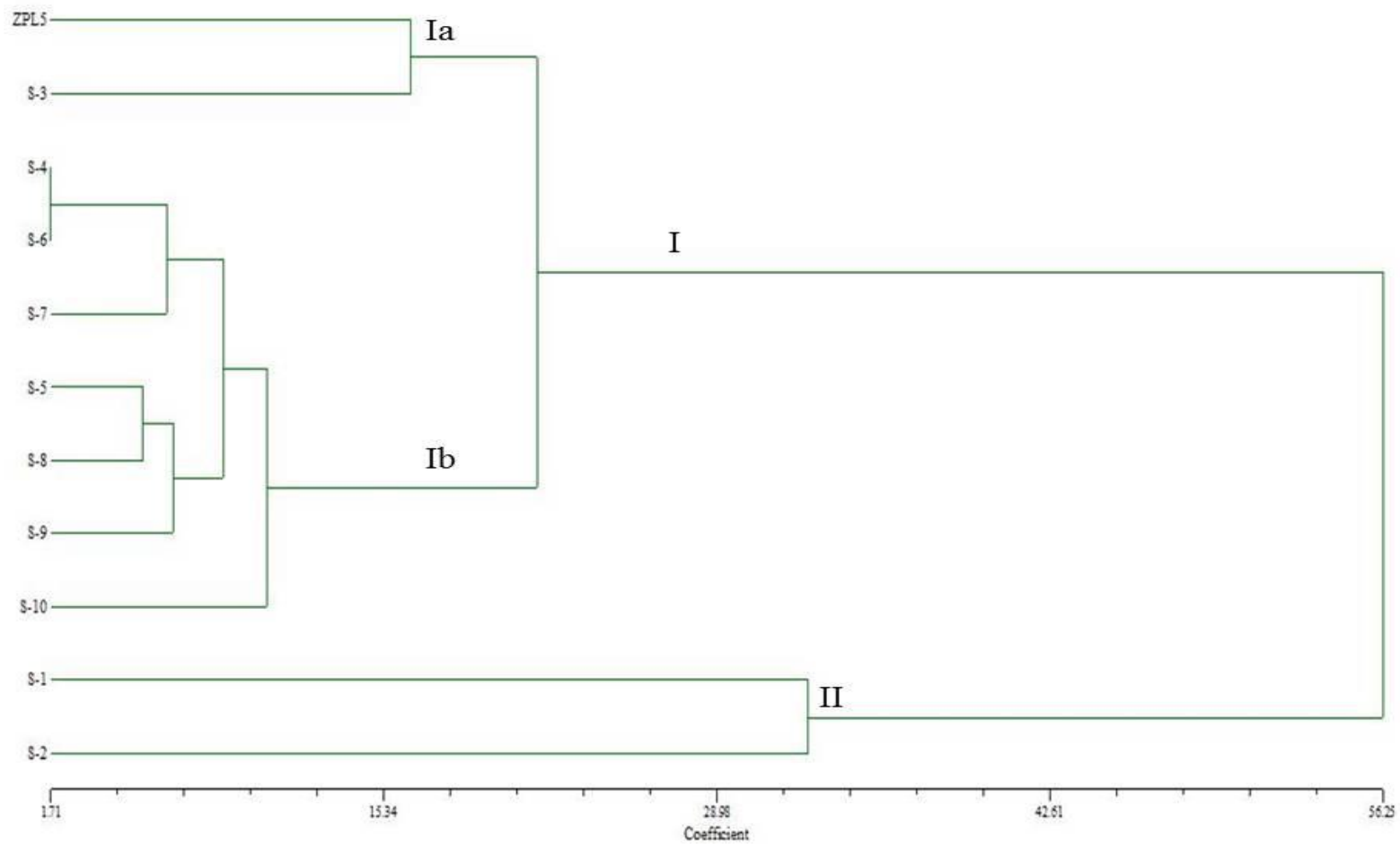
Genotip	ASI	VB (cm)	VBK (cm)	BL	BLK	BKB	SB (%)	OK (%)	VL (%)	DK (cm)	BRZ	BZR	DZ (cm)	MZ (g)	PR (t/ha)
ZPL 5	3,00ab	168,90e	47,25b	13,43de	4,10f	0,81a	6,72ab	18,62ab	17,25b	14,94de	12,75c	30,59cd	0,77bc	18,05c	3,16de
S-1	4,75a	193,73bcd	69,63a	16,15a	5,18ab	0,88a	15,73a	21,30a	19,49a	16,71c	15,05b	29,60d	0,99a	29,48a	5,56b
S-2	3,25ab	217,30a	73,03a	16,10a	5,50a	1,02a	3,12b	19,40ab	19,94a	18,69a	15,85ab	39,01a	1,00a	25,54a	8,59a
S-3	4,25ab	185,40d	50,03b	13,65cde	4,38def	0,80a	12,67ab	21,38a	17,10b	14,60e	15,58ab	27,95d	0,73c	18,05c	2,46e
S-4	2,50b	187,38cd	45,60b	13,23de	4,55cde	0,80a	3,49b	16,38b	17,44b	16,86bc	15,50ab	34,90abc	0,77bc	15,67c	3,77cde
S-5	4,25ab	195,63bcd	51,88b	13,93bcd	4,75bcd	0,78a	10,10ab	18,30ab	17,19b	16,36cd	15,60ab	32,79bcd	0,80bc	16,92c	3,50cde
S-6	3,50ab	186,08d	47,00b	13,23de	4,58cde	0,88a	3,12b	17,42b	17,49b	17,08abc	15,45ab	35,61abc	0,77bc	15,37c	4,14bcd
S-7	4,75a	196,83bcd	54,50b	13,88bcd	4,60cde	0,78a	4,79ab	18,35ab	17,25b	18,44ab	15,30b	36,94ab	0,82bc	18,02c	4,74bc
S-8	3,75ab	202,68b	54,93b	14,45b	4,88bc	0,90a	9,81ab	18,45ab	17,06b	16,19cde	16,85a	32,85bcd	0,85b	16,58c	4,26bcd
S-9	4,00ab	197,95bc	54,25b	14,25bc	4,65cde	0,90a	3,35b	19,25ab	16,81b	16,90bc	15,10b	32,88bcd	0,76bc	17,55c	3,50cde
S-10	3,00ab	189,48cd	46,18b	13,10e	4,28ef	0,94a	13,39ab	16,65b	16,84b	17,19abc	15,45ab	32,89bcd	0,78bc	17,66c	3,88cde
\bar{X}	3,73	192,80	54,02	14,13	4,68	0,86	7,85	18,68	17,62	16,72	15,32	33,27	0,82	18,99	4,32
X _{min}	2,50	168,90	45,60	13,10	4,10	0,78	3,12	16,65	16,81	14,60	12,75	27,95	0,73	15,37	2,46
X _{max}	4,75	217,30	73,03	16,15	5,50	1,02	12,67	21,38	19,94	18,69	16,85	39,01	1,00	29,48	8,59
SD	1,63	14,62	11,68	1,20	0,49	0,16	7,37	2,52	1,20	1,62	1,25	4,15	0,10	4,58	1,93
MS	2,22 ^{ns}	584,39 ^{***}	341,57 ^{***}	4,64 ^{***}	0,64 ^{***}	0,02 ^{***}	87,84 ^{ns}	10,52 ^{ns}	4,49 ^{***}	6,13 ^{***}	3,82 ^{**}	41,72 ^{**}	0,04 ^{***}	77,53 ^{***}	10,67 ^{***}
CV (%)	35,72	3,86	12,27	3,22	5,97	18,50	89,71	11,81	3,79	6,14	6,07	9,70	7,41	11,71	23,21
LSD _{0,05}	2,10	11,72	10,44	0,72	0,44	0,25	11,09	3,48	1,05	1,62	1,46	5,08	0,1	3,50	1,58

ASI - razlika između datuma polinacije i svilanja u danima, VB - visina biljke (cm), VBK - visina klipa (cm), BL - ukupan broj listova, BLK - broj listova iznad klipa, BKB - broj klipova po biljci, SB - slomljene biljke (%), OK - % oklaska, VL - % vlage u zrnu u momentu berbe, DK - dužina klipa (cm), BRZ - broj redova zrna na klipu, BZR - broj zrna u redu, DZ - debljina zrna (cm), MZ - masa 100 zrna (g), PR - prinos zrna u t/ha sa 14% vlage u zrnu, \bar{X} - srednja vrednost, X_{min} - minimalna vrednost, X_{max} - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, MS - sredina kvadrata genotipova iz analize varijanse (ANOVA), ** i *** - statistički značajno na nivou od 0,01 i 0,001, redom, ^{ns} - statistički nesigifikantno, CV - koeficijent varijacije, LSD_{0,05} - LSD vrednost na nivou značajnosti od 0,05. Prosečne vrednosti parametara označene istim slovom unutar svake kolone se statistički ne razlikuju na nivou značajnosti od 0,05.

Na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina je urađena klaster analiza, pri čemu je kao mera distance korišćen kvadrat euklidskog rastojanja (Tabela 14). Na osnovu UPGMA klaster metode dobijen je dendrogram prikazan na slici 16. Najveća distanca u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5 uočena je kod sub-linija S-2 (103,87) i S-1 (58,32), što je potvrdilo njihovo grupisanje u poseban klaster (II). Sub-linije S-3 do S-10, čije su vrednosti distanci iznosile od 16,45 (S-3) do 35,71 (S-8), formirale su poseban klaster (I) sa roditeljskom linijom, pri čemu se S-3 izdvojila sa ZPL 5 u sub-klaster Ia. Dobijeni rezultati klaster analize fenotipskih osobina potvrdili su rezultate LSD testa gde su najmanje značajne razlike između srednjih vrednosti ispitivanih osobina odabranih sub-linija u odnosu na ZPL 5 uočene upravo kod sub-linija od S-3 do S-10.

Tabela 14. Kvadrati euklidskog rastojanja između ZPL 5 i odabranih sub-linija

Sub-linija	Distanca (kvadrat euklidskog rastojanja)
S-1	58,32
S-2	103,87
S-3	16,45
S-4	18,65
S-5	19,30
S-6	19,31
S-7	28,09
S-8	35,71
S-9	19,92
S-10	21,44



Slika 16. Dendrogram rekurentnog roditelja ZPL5 i odabranih sub-linija dobijen UPGMA klaster metodom iz kvadrata euklidskog rastojanja na osnovu fenotipskih osobina.

4.4.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna odabranih sub-linija

Od deset ispitivanih sub-linija kod četiri (S-2, S-4, S-5 i S-6) su identifikovana samo zrna sa tvrdim endospermom ($\leq 25\%$ *opaque*). Pored $\leq 25\%$ *opaque* zrna, sub-linija S-1 je imala još samo potpuno nemodifikovana zrna (100% *opaque*) u najvećem procentu (12,22%) u odnosu na ostale sub-linije (1,36% - 2,89%) i izbačena je iz daljeg rada. Prosečne učestalosti različitih klasa ($\leq 25\%$ *opaque*, $\leq 50\%$ *opaque*, $\leq 75\%$ *opaque* i 100% *opaque*) stepena modifikacija endosperma zrna odabranih sub-linija date su u Tabeli 15.

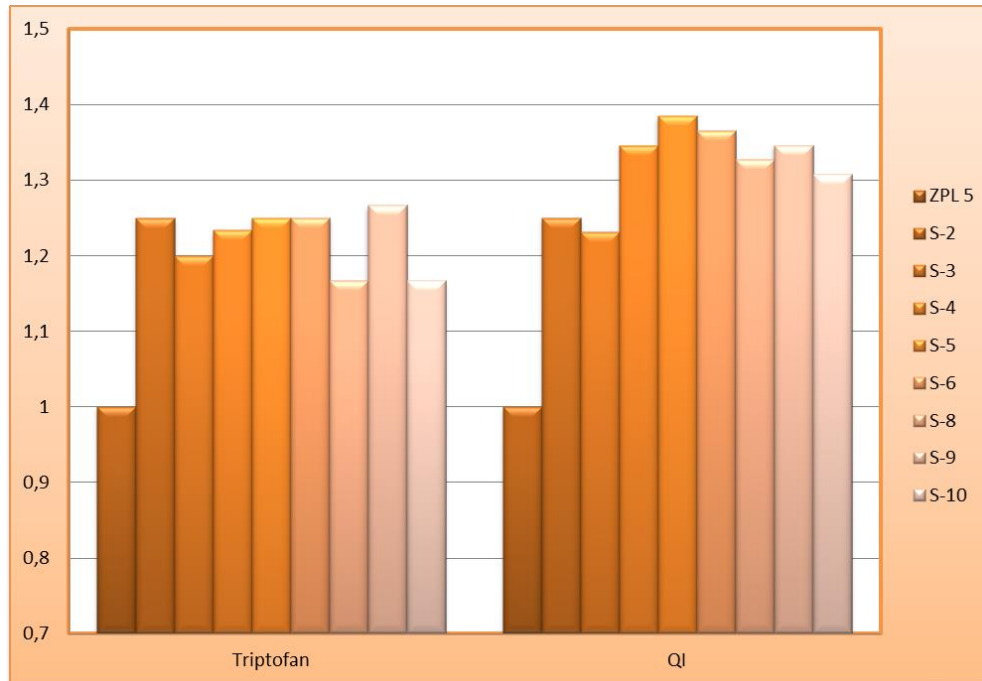
4.4.3. Biohemijska analiza odabranih sub-linija

Sub-linije S-1 i S-7 nisu dale dovoljnu količinu zrna, pa biohemijske analize nisu rađene. Sve ostale sub-linije su imale veći sadržaj triptofana i indeks kvaliteta u odnosu na roditeljsku standardnu liniju. Prosečne vrednosti sadržaja proteina (%), sadržaja triptofana (%) i indeksa kvaliteta (QI) odabranih sub-linija su prikazane u Tabeli 15.

Tabela 15. Prosečne vrednosti stepena modifikacija endosperma zrna (%), sadržaja triptofana (%), sadržaja proteina (%), indeksa kvaliteta (QI) i prinosa zrna (t/ha) odabranih sub-linija

BC ₂ F ₃	BC ₂ F ₄	Sub-linije	Stepen modifikacije endosperma zrna (%)				Triptofan (%)	Proteini (%)	QI	Prinos (t/ha)
			$\leq 25\%$ <i>opaque</i>	$\leq 50\%$ <i>opaque</i>	$\leq 75\%$ <i>opaque</i>	100% <i>opaque</i>				
ZPI 5							0,060	11,56	0,52	3,16
P-1	P-1/2	S-1	87,78	0,00	0,00	12,22	-	-	-	5,56
P-4	P-4/1	S-2	100,00	0,00	0,00	0,00	0,075	11,59	0,65	8,59
	P-5/1	S-3	97,84	1,81	0,00	0,35	0,072	11,19	0,64	2,46
P-5	P-5/2	S-4	100,00	0,00	0,00	0,00	0,074	10,60	0,70	3,77
	P-5/3	S-5	100,00	0,00	0,00	0,00	0,075	10,46	0,72	3,50
	P-5/4	S-6	100,00	0,00	0,00	0,00	0,075	10,62	0,71	4,14
	P-6/1	S-7	80,76	11,92	5,96	1,36	-	-	-	4,74
P-6	P-6/2	S-8	90,77	3,23	3,37	2,64	0,070	10,18	0,69	4,26
	P-6/3	S-9	77,34	16,55	3,23	2,89	0,076	10,84	0,70	3,50
	P-6/4	S-10	85,25	5,72	6,13	2,89	0,070	10,24	0,68	3,88

Povećanje sadržaja triptofana odabranih sub-linija u odnosu na roditeljsku liniju kretalo se u rangu od 27% kod S-9 do 17% kod S-8 i S-10. Najveće povećanje QI (38%) u odnosu na ZPL 5 utvrđeno je kod S-5, a najmanje (23%) kod S-3. Odnos prosečnih vrednosti sadržaja triptofana i QI odabranih sub-linija i roditeljske linije ZPL 5 (izražen u %) je prikazan na Slici 17. Vrednosti roditeljske linije date su kao 100% (1).



Slika 17. Sadržaj triptofana i indeks kvaliteta (QI) odabranih sub-linija, predstavljeni kao % vrednosti roditeljske linije ZPL 5. Vrednosti za ZPL 5 su date kao 1 (100%).

Nakon samooplodnje analiziranih sub-linija, na dve lokacije je dobijen različiti broj klipova sa dovoljnim brojem zrna za biohemijske analize i dalji rad. Sadržaj triptofana (%), sadržaj proteina (%) i indeks kvaliteta (QI) pojedinačnih klipova odabranih sub-linija sa obe lokacije posebno u poređenju sa roditeljskom linijom ZPL 5 prikazani su u Tabeli 16.

Rezultati analize biohemijskih komponenti pokazali su statistički značajne razlike u sadržaju triptofana i indeksu kvaliteta (QI) kod svih ispitivanih sub-linija u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5. U Tabeli 16. su prikazani nivoi značajnosti za sredine kvadrata za genotip. Visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova uočeno je kod svih ispitivanih biohemijskih osobina.

Tabela 16. Sadržaj triptofana (%), sadržaj proteina (%) i indeks kvaliteta (QI) odabranih sub-linija po lokacijama

Genotip	Triptofan (%)		Protein (%)		QI	
	I lokacija	II lokacija	I lokacija	II lokacija	I lokacija	II lokacija
ZPL 5	0,060d	0,060k	11,54b	11,58bc	0,52f	0,52p
S-2	0,076ab	0,078bc	11,75a	11,48de	0,65d	0,68i
	-	0,067j	-	11,49cd	-	0,58o
	-	0,078bcd	-	11,39e	-	0,68i
	-	0,072defghij	-	11,48de	-	0,63m
	-	0,075bcdefgh	-	11,59b	-	0,65l
S-3	-	0,072defghij	-	11,97a	-	0,60n
	0,071bc	0,071efghij	11,35b	10,75h	0,63e	0,66k
	-	0,074cdefghi	-	11,20f	-	0,66k
	-	0,071fghij	-	11,46de	-	0,62m
S-4	0,080a	0,074cdefghi	11,09c	10,96g	0,72b	0,68j
	0,071bc	0,071efghij	10,39d	10,43k	0,68c	0,68i
	-	0,071efghij	-	10,21l	-	0,70gh
	-	0,075bcdefgh	-	10,44k	-	0,72de
S-5	-	0,077bcde	-	10,65i	-	0,72cd
	-	0,081ab	-	10,98g	-	0,74b
	-	0,073cdefghij	-	10,41k	-	0,70f
	-	0,069hij	-	10,11mn	-	0,68hi
	-	0,068ij	-	10,03n	-	0,68i
	-	0,075bcdefgh	-	10,48jk	-	0,72cd
	-	0,081ab	-	10,73hi	-	0,75a
S-6	-	0,076bcdefg	-	10,47jk	-	0,73c
	0,076ab	0,071efghij	10,97c	10,21l	0,69c	0,70g
	0,076ab	0,077bcde	10,97c	10,73hi	0,69c	0,72cd
	0,074ab	0,076bcdefg	10,02e	11,00g	0,74a	0,69hi
S-8	-	0,074cdefghi	-	10,39k	-	0,71ef
	-	0,070ghij	-	10,18lm	-	0,69hi
	-	0,068ij	-	10,54j	-	0,65l
S-9	-	0,085a	-	11,14g	-	0,76a
S-10	0,066cd	-	10,11e	-	0,65d	-
	0,075ab	-	10,37d	-	0,72b	-
\bar{X}	0,072	0,073	10,86	10,84	0,67	0,68
X_{\min}	0,060	0,060	10,02	10,03	0,74	0,52
X_{\max}	0,080	0,085	11,75	11,97	0,52	0,76
SD	0,006	0,005	0,59	0,54	0,06	0,05
MS	0,00***	0,00***	0,73***	0,58***	0,01***	0,01***
CV (%)	3,17	2,93	0,80	0,38	3,31	2,59
LSD _{0.05}	0,01	0,01	0,20	0,09	0,01	0,01

\bar{X} - srednja vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, MS - sredina kvadrata genotipova iz ANOVA, *** - statistički značajno na nivou od 0,001, CV - koeficijent varijacije, LSD_{0.05} - LSD vrednost na nivou značajnosti od 0,05. Prosečne vrednosti parametara označene istim slovom unutar svake kolone se statistički ne razlikuju na nivou značajnosti od 0,05.

Statistička značajnost koeficijenta korelacija između biohemijskih komponenti i ispitivanih fenotipskih osobina odabranih sub-linija prikazana je u Tabeli 17.

Ispitivane biohemijske osobine nisu pokazale značajne fenotipske korelacije sa većinom fenotipskih osobina. Visoko značajne korelacije ($P < 0,01$) uočene su između sadržaja triptofana - TRP i visine biljke - VB, broja redova zrna - BRZ i indeksa kvaliteta - QI, a značajne korelacije ($P < 0,05$) između sadržaja triptofana - TRP i broja listova iznad klipa - BLK, dužine klipa - DK i broja zrna u redu - BZR. Sadržaj proteina pokazao je visoko značajne korelacije ($P < 0,01$) sa procentom vlage - %VL, masom 100 zrna - MZ i indeksom kvaliteta - QI, a značajnu korelaciju ($P < 0,05$) sa brojem redova zrna - BRZ. Između indeksa kvaliteta - QI i broja redova zrna - BRZ, sadržaja triptofana - TRP i proteina - PROT uočene su visoko značajne korelacije ($P < 0,01$), a značajne korelacije ($P < 0,05$) između indeksa kvaliteta - QI i visine biljke - VB, kao i dužine klipa - DK.

Između prinosa zrna - PR i većine ispitivanih osobina uočene su značajne fenotipske korelacije. Jedino procenat slomljenih biljaka - %SB i biohemijski parametri nisu pokazali značajne korelacije sa prinosom zrna - PR. Značajna korelacija ($P < 0,05$) ustanovljena je između prinosa zrna - PR i procenta oklaska - %OK, a visoko značajne fenotipske korelacije ($P < 0,01$) između prinosa zrna - PR i ostalih ispitivanih osobina.

Tabela 17. Statistička značajnost koeficijenta korelacija između biohemijskih komponenti i fenotipskih osobina odabranih sub-linija

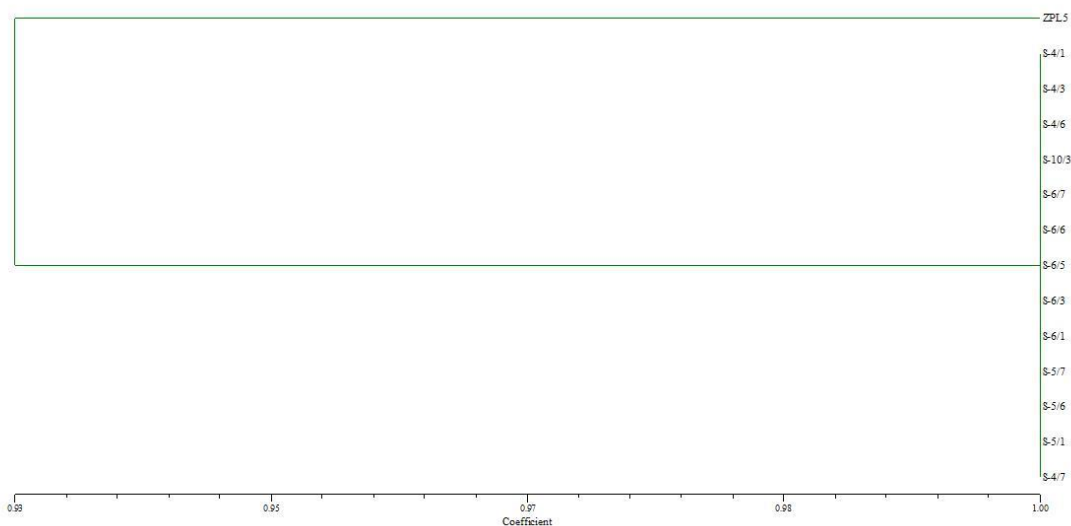
	ASI	VB	VBK	BL	BLK	BKB	%SB	%OK	%VL	DK	BRZ	BZR	DZ	MZ	PR	TRP	PROT	QI
PR	**	**	**	**	**	**	ns	*	**	**	**	**	**	**	1			
TRP	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	**	*	ns	ns	ns	1		
PROT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	**	ns	ns	1	
QI	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	**	**	1

^{ns} - statistički nesigifikantno, * i ** - statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, redom

4.4.4. Određivanje genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja i sub-linija povećanog sadržaja triptofana

Genetička sličnost izračunata je između roditeljske linije ZPL 5 i pojedinačnih klipova odabranih sub-linija čiji je sadržaj triptofana bio iznad praga za QPM. Za analizu je korišćeno 32 SSR markera (Tabela 2). Ukupni broj amplifikovanih alela je bio 63. Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od 1 do 4, a prosečan broj alela po markeru je bio 1,97. Genetička sličnost između ZPL 5 i svih analiziranih sub-linija, izračunata prema *Dice*-ovom koeficijentu, je bila 0,93.

Na osnovu matrica genetičkih sličnosti urađena je klaster analiza, da bi se potvrdila sličnost između rekurentnog roditelja i poboljšanih linija. Rezultati klaster analize prikazani su grafički u formi dendrograma (Slika 18). Sve analizirane linije formirale su jedinstveni klaster sa rekurentnim roditeljem ZPL 5 što je potvrdilo rezultate dobijene analizom genetičke sličnosti. Visoka vrednost ko-fenetičkog koeficijenta korelacije ($r = 1$) potvrdila je dobro poklapanje dobijenog klastera sa matricom genetičkih sličnosti po *Dice*-u.



Slika 18. Dendrogram roditeljske linije ZPL 5 i poboljšanih sub-linija analiziranih pomoću SSR markera dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Dice*-u.

Na osnovu svih rezultata, dobijene su linije povećanog sadržaja triptofana (od 37-50% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), povećanog indeksa kvaliteta (42-56% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), održane genetičke sličnosti sa roditeljskom linijom (93% genoma rekurentnog roditelja), visokog stepena modifikacije endosperma zrna (100% zrna tvrdog endosperma), povećanog prinosa zrna (11-31% u odnosu na roditeljsku liniju) i očuvanih odličnih kombinacionih sposobnosti (Tabela 18). Linije poboljšanog kvaliteta, dobijene kombinacijom konvencionalnog i molekularnog oplemenjivanja, adaptirane su na uslove umerenog klimatskog područja.

Tabela 18. Koeficijent genetičke sličnosti, stepen modifikacija endosperma zrna, sadržaj triptofana i prinos zrna poboljšanih linija

BC ₂ F ₃	BC ₂ F ₄	Sub-linija	Genotip	Koef. GS	Stepen modifikacije endosperma zrna (%)				Triptofan (%)	Prinos (t/ha)	
					≤ 25% <i>opaque</i>	≤ 50% <i>opaque</i>	≤ 75% <i>opaque</i>	100 % <i>opaque</i>			
P-5	P-5/2	S-4	S-4/1	0,93	100	-	-	-	0,080	3,77	
			S-4/3	0,93	100	-	-	-	0,074		
			S-4/6	0,93	100	-	-	-	0,075		
			S-4/7	0,93	100	-	-	-	0,077		
	P-5/3	S-5	S-5/1	0,93	100	-	-	-	0,081	3,50	
			S-5/6	0,93	100	-	-	-	0,081		
			S-5/7	0,93	100	-	-	-	0,076		
	P-5/4	S-6	S-6/1	0,93	100	-	-	-	0,076	4,14	
			S-6/3	0,93	100	-	-	-	0,074		
			S-6/5	0,93	100	-	-	-	0,077		
			S-6/6	0,93	100	-	-	-	0,076		
	P-6	P-6/4	S-10	S-10/2	0,93	100	-	-	-	0,075	3,88

4.5. Fenotipska evaluacija hibrida

4.5.1. Analiza fenotipskih osobina hibrida

Analizirane fenotipske osobine hibrida sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) i odabranim potomstvima BC₂F₃ generacije (H-2 do H-5) u poljskim ogledima predstavljene su njihovim prosečnim vrednostima i intervalom variranja (\bar{X} , X_{\min} i X_{\max}). Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti 15 analiziranih fenotipskih osobina su dati u Tabeli 19.

Koeficijent varijacije (CV) je izračunat da bi se uporedila variranja osobina. Najmanji koeficijenti varijacije su dobijeni za visinu biljke - VB (1,81%), broj zrna u redu - BRZ (2,07%) i procenat vlage u zrnu - %VL (2,52%), dok je najveće variranje nađeno kod procenta slomljenih biljaka - %SB (142,98%). Koeficijent varijacije veći od 30% je utvrđen za period između metličanja i svilanja - ASI (30,12%).

Analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za mali broj osobina. U Tabeli 19 su prikazani nivoi značajnosti za sredine kvadrata genotipova iz analize varijanse. Visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova je uočeno kod visine biljke - VB. Osobina broj redova zrna - BRZ pokazala je srednje značajno variranje ($P < 0,01$), dok je kod procenta vlage u zrnu - %VL i prinosa zrna - PR uočeno slabo značajno variranje ($P < 0,05$). Genotip nije bio značajan izvor variranja (ns) za period između metličanja i svilanja - ASI, visinu biljke iznad klipa - VBK, broj listova - BL, broj listova iznad klipa - BLK, broj klipova po biljci - BKB, procenat slomljenih biljaka - %SB, procenat oklaska - %OK, dužinu klipa - DK, broj zrna u redu - BZR, dubinu zrna - DZ i masu 100 zrna - MZ.

Statistički značajne razlike ne postoje između H-1 i ostalih hibrida za sledeće osobine: period između metličanja i svilanja - ASI, visinu biljke iznad klipa - VBK, ukupan broj listova - BL, broj klipova po biljci - BKB, procenat slomljenih biljaka - %SB, procenat oklaska - OK, broj zrna u redu - BZR, dubinu zrna - DZ, masu 100 zrna - MZ i prinos zrna - PR. Kod svih hibrida uočena je statistički značajna razlika u odnosu na H-1 za broj redova zrna - BRZ. U odnosu na H-1, najmanja statistički značajna razlika za visinu biljke - VB, broj listova iznad klipa - BLK, procenat vlage u zrnu - %VL i dužinu klipa - DK je bila kod hibrida H-2.

Tabela 19. Fenotipske osobine hibrida

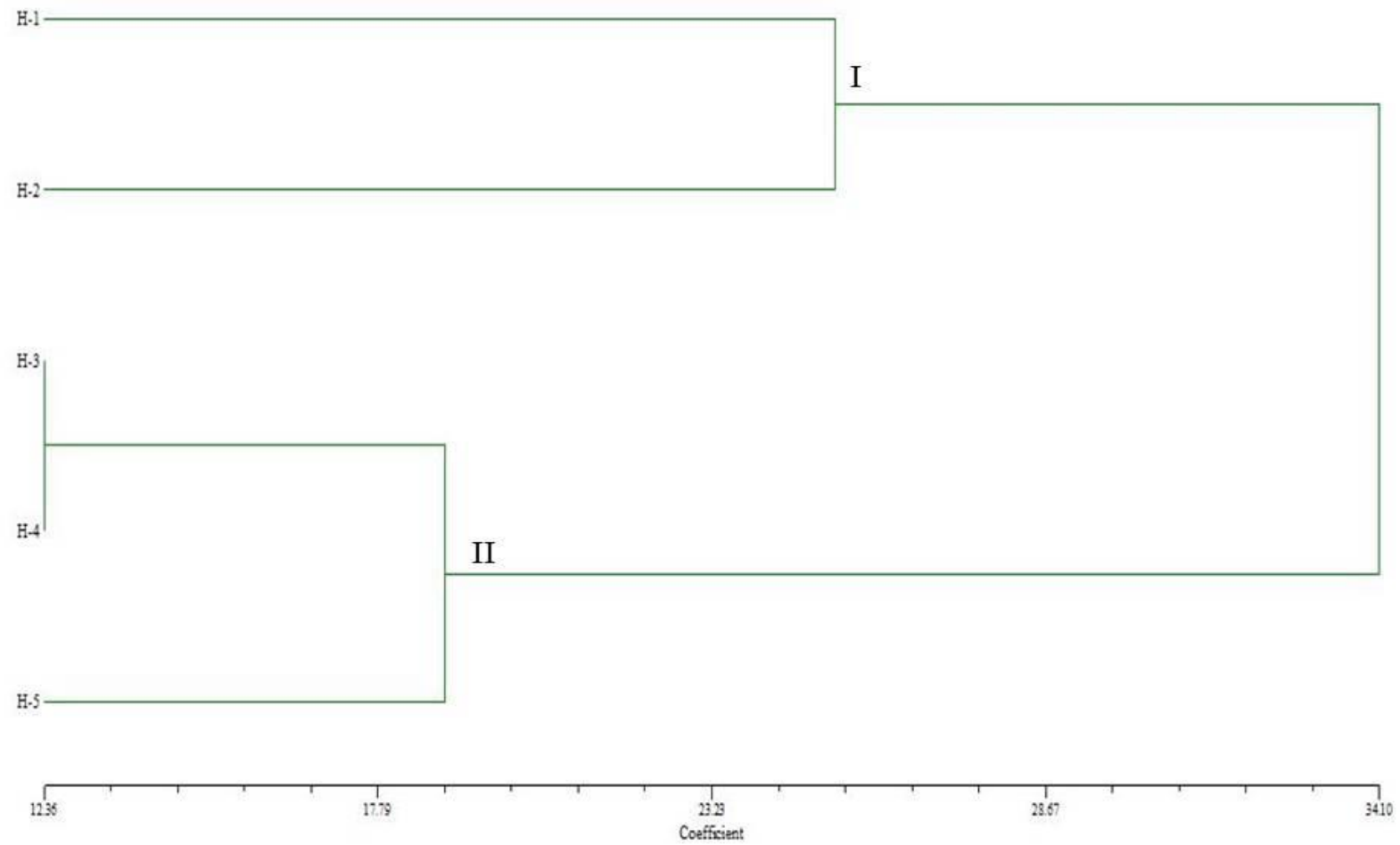
Genotip	ASI	VB (cm)	VBK (cm)	BL	BLK	BKB	SB (%)	OK (%)	VL (%)	DK (cm)	BRZ	BZR	DZ (cm)	MZ (g)	PR (t/ha)
H-1	2,00a	220,18b	84,18a	14,52a	4,02b	1,00a	7,81a	14,15a	18,42b	17,99ab	13,10b	36,24a	1,12a	37,20a	10,07ab
H-2	1,70a	220,20b	84,70a	14,98a	4,45ab	0,90a	6,25a	15,22a	18,42b	17,00b	13,75a	33,06a	1,09a	36,74a	9,67b
H-3	2,50a	228,22b	84,92a	15,18a	4,58a	0,95a	3,12a	15,33a	19,56a	18,32ab	14,25a	36,50a	1,11a	36,88a	11,64ab
H-4	2,00a	236,42a	85,78a	15,25a	4,60a	0,90a	1,56a	14,08a	19,24ab	18,42ab	13,80a	37,28a	1,15a	36,82a	10,15ab
H-5	2,25a	238,85a	90,98a	15,30a	4,48ab	1,00a	4,69a	14,28a	18,62b	19,02a	14,15a	36,22a	1,16a	36,51a	11,93a
\bar{X}	2,1	228,78	86,11	15,04	4,42	0,95	4,69	14,62	18,86	18,15	13,81	35,86	1,13	36,83	10,69
X_{\min}	1,75	220,18	84,18	14,52	4,02	0,90	1,56	14,08	18,42	17,00	13,10	33,06	1,09	36,51	9,67
X_{\max}	2,5	238,85	90,98	15,30	4,60	1,00	7,81	15,33	19,56	19,02	14,25	37,28	1,16	37,20	11,93
SD	0,64	14,51	6,89	0,50	0,36	0,07	6,37	1,40	0,74	1,37	0,68	4,47	0,07	1,19	2,41
MS	0,33 ^{ns}	307,82 ^{***}	30,92 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,01 ^{ns}	24,41 ^{ns}	1,50 ^{ns}	1,07*	2,22 ^{ns}	0,82 ^{**}	10,51 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,25 ^{ns}	4,16*
CV (%)	30,12	1,81	4,12	3,62	5,87	8,15	142,98	9,00	2,52	4,86	2,07	6,35	6,86	4,15	10,30
LSD _{0,05}	1,24	8,13	9,84	1,51	0,51	0,15	13,16	2,58	0,94	1,73	0,56	4,47	0,15	3,00	2,16

ASI - razlika između datuma polinacije i svilanja u danima, VB - visina biljke (cm), VK - visina klipa (cm), BL - ukupan broj listova, BLK - broj listova iznad klipa, BKB - broj klipova po biljci, SB - slomljene biljke (%), OK - % oklaska, VL - % vlage u zrnu u momentu berbe, DK - dužina klipa (cm), BRZ - broj redova zrna na klipju, BZR - broj zrna u redu, DZ - debljina zrna (cm), MZ - masa 100 zrna (g), PR - prinos zrna u t/ha sa 14% vlage u zrnu, \bar{X} - srednja vrednost, X_{\min} - minimalna vrednost, X_{\max} - maksimalna vrednost, SD - standardna devijacija, MS - sredina kvadrata genotipova iz analize varijanse (ANOVA), *, ** i *** - statistički značajno na nivou od 0,05; 0,01 i 0,001, redom, ^{ns} - statistički nesigifikantno, CV - koeficijent varijacije, LSD_{0,05} - LSD vrednost na nivou značajnosti od 0,05. Prosečne vrednosti parametara označene istim slovom unutar svake kolone se statistički ne razlikuju na nivou značajnosti od 0,05.

Na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina je urađena klaster analiza sa kvadratom euklidskog rastojanja (Tabela 20) kao merom distance i rezultati su prikazani u obliku dendrograma (Slika 19). Najveća distanca u odnosu na hibrid sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) uočena je kod hibrida H-5 (42,30), a nešto manja kod H-3 (34,84) i H-4 (34,52), što je i potvrdilo njihovo grupisanje u poseban klaster (II). Hibrid H-2 kod koga je dobijena najmanja vrednost distance (25,22), izdvojen je u poseban klaster (I) sa hibridom H-1 što je potvrdilo rezultate LSD testa gde su najmanje značajne razlike između srednjih vrednosti ispitivanih osobina hibrida u odnosu na hibrid sa ZPL 5 uočene upravo kod hibrida H-2.

Tabela 20. Kvadrati euklidskog rastojanja između hibrida sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) i odabranim potomstvima (H-2 do H-5)

Hibrid	Distanca (kvadrat euklidskog rastojanja)
H-2	25,22
H-3	34,84
H-4	34,52
H-5	42,30



Slika 19. Dendrogram hibrida dobijen UPGMA klaster metodom iz kvadrata euklidskog rastojanja na osnovu fenotipskih osobina.

4.5.2. Određivanje stepena modifikacije endosperma zrna hibrida

Kod ispitivanih hibrida uočen je sličan procenat zrna sa $\leq 25\%$ *opaque* endospermom (93,87% - 98,75%). Jedino hibrid sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) nije imao nijedno zrno sa mekim endospermom (100% *opaque*), dok se procenat ovih zrna kod ostalih hibrida kretao od 0,36% - 4,06%. Prosečne učestalosti različitih klasa ($\leq 25\%$ *opaque*, $\leq 50\%$ *opaque*, $\leq 75\%$ *opaque* i 100% *opaque*) stepena modifikacije endosperma zrna hibrida sa odabranim potomstvima BC₂F₃ generacije date su u Tabeli 21.

Tabela 21. Procenat učestalosti različitih klasa stepena modifikacije endosperma zrna hibrida

	$\leq 25\%$ <i>opaque</i> (%)	$\leq 50\%$ <i>opaque</i> (%)	$\leq 75\%$ <i>opaque</i> (%)	100% <i>opaque</i> (%)
H-1	98,47	1,00	0,53	0,00
H-2	93,87	3,27	1,44	1,41
H-3	98,30	1,35	0,00	0,36
H-4	98,75	0,68	0,16	0,41
H-5	95,12	0,35	0,47	4,06

5. DISKUSIJA

Hranljiva vrednost žitarica je glavno ograničenje za njihovu upotrebu u ishrani ljudi i životinja. Proteini žitarica, uključujući i proteine endosperma kukuruza, imaju nizak sadržaj esencijalnih aminokiselina, naročito lizina, triptofana i metionina (Segal i sar., 2003). Biološka vrednost standardnog kukuruza iznosi 40% od vrednosti mleka (Bressani, 1991) i zato je potrebno dopuniti ishranu dodatnim izvorima proteina, kao što su mahunarke ili proizvodi životinjskog porekla. Kombinacija žitarica i mahunarki je česta u praksi, pošto se sastav njihovih esencijalnih aminokiselina dopunjuje - žitarice imaju visok sadržaj aminokiselina bogatih sumporom i nizak sadržaj lizina, dok je kod mahunarki taj odnos suprotan (Shewry i Halford, 2002). Hranljiva vrednost žitarica je od posebnog značaja u siromašnim i nerazvijenim područjima subsaharske Afrike, Azije i Južne Amerike, u kojima su one osnovna ljudska hrana i glavni izvor proteina. S druge strane, u razvijenim zemljama se najviše pažnje obraća na uticaj proteina žitarica na funkcionalna svojstva pri industrijskoj preradi hrane.

Korišćeni su različiti pristupi kako bi se povećala hranljiva vrednost kukuruza, ali je najveći uspeh postignut otkrićem *opaque2* mutanta (*o2*) sa superiornim hranljivim svojstvima (Mertz i sar., 1964). Direktna upotreba *o2* mutacije u programima oplemenjivanja nije bila uspešna zbog njenih negativnih plejotropnih efekata. Paez i sar. (1969) su prvi objavili značaj modifikacije endosperma zrna za smanjenje negativnih plejotropnih efekata *o2* mutacije. Selekcija na tvrdi endosperm je integrisana u programe stvaranja QPM, kukuruza poboljšane nutritivne vrednosti proteina bez negativnih plejotropnih efekata *o2* mutacije. Promena u sastavu proteina endosperma zrna QPM, izazvana *o2* mutacijom, podrazumeva povećanje od 60-100% sadržaja deficitarnih esencijalnih aminokiselina lizina i triptofana, kao i smanjenje od 50% lizinom siromašne prolaminske frakcije, što povećava svarljivost proteina i unos azota u odnosu na kukuruz standardnog kvaliteta zrna (Vasal, 2000). Pored toga, QPM ima povećan sadržaj niacina, gvožđa i cinka i utiče na poboljšano iskorišćavanje kalcijuma i karotena.

Nastanak QPM je rezultat dvodecenijskog procesa oplemenjivanja. Istraživači u CIMMYT-u su, koristeći tehnike povratne (*back-cross*) i rekurentne selekcije, konvertovali nekoliko populacija kukuruza u *opaque2* i zatim popravili nepoželjne

osobine (Bjarnason i Vasal, 1992; Villegas i sar., 1992). Iako je QPM razvijen klasičnim metodama selekcije, poslednjih godina se sve više primenjuje selekcija upotrebom molekularnih markera sa ciljem poboljšanja elitnih linija za kvalitet proteina. Kod klasične selekcije, pri popravci elitne linije za neku recesivnu osobinu koja nema vidljiv fenotipski marker (kao što je sadržaj lizina/triptofana) neophodno je posle svakog povratnog ukrštanja uraditi samooplodnju. Kod samooplođenih biljaka je moguće fenotipski identifikovati recesivne biljke za sledeću generaciju povratnog ukrštanja. Upotrebom specifičnih markera izbegava se generacija samooplodnje, već se direktno biraju recesivne i heterozigotne BC biljke (eng. *foreground selection*). Na ovaj način se dvostruko smanjuje broj potrebnih generacija tokom procesa povratnih ukrštanja.

Selekcija upotrebom molekularnih markera za poboljšanje kvaliteta proteina je već korišćena kod tropskog i suptropskog kukuruza (Babu i sar., 2005; Zhang i sar., 2010; Zhang i sar., 2012; Gupta i sar., 2013). Prevođenje standardnog kukuruza na kukuruz visokog kvaliteta proteina adaptiranog na umereno klimatsko područje predstavlja veći izazov, pošto zahteva introgresiju *opaque2* i gena modifikatora iz egzotične, neadaptirane germplazme. U Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ već nekoliko godina se realizuje program poboljšanja komercijalnih, elitnih inbred linija na visok kvalitet proteina, čiji su deo i istraživanja prikazana u ovoj disertaciji. Dve elitne linije, ZPL 3 i ZPL 5, su selekcijom pomoću molekularnih markera prevođene na QPM varijante, korišćenjem tropske linije CML 144 kao donora poželjnih svojstava. Ovaj proces se sastojao iz dva ciklusa povratnog ukrštanja i tri ciklusa samooplodnje, kao što je opisano u radu Babu i sar (2004). Babu i sar. (2005) objavili su rezultate konverzije standardne inbred linije V25 u QPM verziju koristeći liniju CML176 kao donora visokog kvaliteta proteina. Njihov rad obuhvatio je selekciju za *opaque2* gen u dve generacije povratnog ukrštanja, selekciju biljaka genetički najrodnijim rekurentnom roditelju u BC₂F₂ generaciji, kao i fenotipsku selekciju za poželjne agronomske osobine u dve uzastopne generacije samooplodnje.

Prvi korak MAS je utvrđivanje polimorfnosti *opaque2* specifičnih SSR markera za dati par roditeljskih linija pošto isti marker može biti polimorfan za jedan, a monomorfan za drugi par linija. Za kombinaciju linija ZPL 3 i CML 144, kao i ZPL 5 i CML 144, ko-dominantnu polimorfnost su pokazali markeri umc1066 i phi057, dok je

marker phi112 pokazao dominantni polimorfizam, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u radovima Babu i sar. (2005) i Jompuk i sar. (2011). Nasuprot tome, u radu Danson i sar. (2006) prajmer umc1066 nije detektovao polimorfizam između QPM linija i linija standardnog kvaliteta zrna, dajući jedan isti fragment veličine 134 bp kod oba genotipa, što potvrđuje neophodnost testiranja roditeljskih komponenti na polimorfnost specifičnih *opaque2* SSR markera. Zbog dominantne prirode polimorfizma, marker phi112 se u ovom radu nije koristio za razlikovanje recesivnih homozigota.

Određivanje genetičke sličnosti između roditeljskih linija, kao i između roditelja i potomstava BC₂, BC₂F₃ i BC₂F₄ generacija tokom procesa MAS je neophodno kako bi se identifikovala potomstva sa najvećim koeficijentom GS sa rekurentnim roditeljem. Upotreba molekularnih markera radi utvrđivanja procenta genoma rekurentnog roditelja u potomstvima povratnih ukrštanja (eng. *background selection*; Charcosset, 1997) smanjuje broj generacija potrebnih za stvaranje željenog genotipa. Na osnovu rezultata GS roditelja i potomstava smanjuje se broj biljaka koje je potrebno testirati i povećava efikasnost oplemenjivanja (Mladenović Drinić i sar., 2012). Pouzdanost rezultata zavisi od broja korišćenih markera, njihove ravnomerne raspodele po genomu, generacije ukrštanja i broja pojedinačnih biljaka u populaciji (Tamilkumar i sar., 2014). Simulacione studije su pokazale da povećanje broja markera na više od tri po hromozomu nije efikasno u ranim generacijama povratnih ukrštanja (Hospital i sar., 1992). U ovom radu korišćeno je najmanje tri markera po hromozomu.

Za određivanje genetičke sličnosti (GS) između roditeljskih linija korišćeno je 40 SSR markera, sa prosečno 3 alela po markeru, što je slično rezultatima dobijenim na linijama kukuruza i u drugim radovima. Maphosa i sar. (2011) dobili su prosečan broj od 4,15 alela sa 24 SSR markera, Bante i Prasanna (2003) 3,25 alela sa 36 SSR markera, a Legesse i sar. (2007) 3,85 alela sa 27 SSR markera. S druge strane, nešto veći broj alela dobijen je u radu Warburton i sar. (2002) - 4,9 alela sa 88 SSR markera. Razlike u broju alela mogu biti posledica različitih faktora, kao što su broj SSR markera i tip ponovaka korišćenih u analizi, kao i različite metode korišćene za detekciju polimorfizma (Liu i sar., 2003; Legesse i sar., 2007). U ovom radu su korišćeni prajmeri sa ponovcima od dva do pet nukleotida. Prajmeri koji imaju ponovke sa većim brojem nukleotida su manje polimorfni u odnosu na one sa dinukleotidnim ponovcima, ali se

koriste kako bi se izbegla pojava “*stutter*” traka koje se češće javljaju kod prajmera sa dinukleotidnim ponovcima (Warburton i sar., 2002). Genetička sličnost između ZPL 3 i CML 144, kao i između ZPL 5 i CML 144, izračunata prema *Dice*-ovom koeficijentu, je bila veoma niska (0,05), što je najverovatnije posledica vrste germplazme (adaptirana i egzotična). Ovako niska GS između donora i rekurentnog roditelja obično zahteva veći broj povratnih ukrštanja radi povraćaja genoma rekurentnog roditelja.

Pored selekcije primenom molekularnih markera, MAS za poboljšanje kvaliteta proteina podrazumeva i određivanje sadržaja triptofana/lizina u odgovarajućim generacijama selekcije. Sadržaj lizina i triptofana u znu kukuruza su visoko korelisani ($r = 0,85$) (Hernandes i Bates, 1969), a ovakav njihov odnos uočen je i kod standardnog i kod QPM kukuruza (Bjarnson i Vasal, 1992; Vivek i sar., 2008). Zato je dovoljno pratiti samo jednu aminokiselinu tokom procesa stvaranja QPM germplazme. Pošto je metoda za određivanje sadržaja triptofana brža i jednostavnija, ona se i češće primenjuje u odnosu na određivanje sadržaja lizina. Sadržaj triptofana kod kukuruza standardnog kvaliteta zrna je obično ispod 0,060%. U radu Ignjatovic-Micic i sar. (2009) sadržaj triptofana kod linija B73 i Oh43 je bio 0,059% i 0,054%, redom. Slične vrednosti od 0,059% kod hibrida ZP74b i 0,052% kod ZP636, kao i malo veća vrednost od 0,065% kod hibrida ZP434, dobijene su analizom biohemijskih komponenti hibrida kukuruza (Žilić i sar., 2011). Kao što se i očekivalo, kod ispitivanih roditeljskih linija u ovom radu sadržaj triptofana i indeks kvaliteta bili su skoro duplo veći kod linije CML 144 u odnosu na linije ZPL 3 i ZPL 5. Takođe, obe vrednosti su bile iznad praga za QPM. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Jompuk i sar. (2006) i Prasanna i sar. (2001), kod kojih su vrednosti za sadržaj triptofana bile duplo veće kod QPM genotipova u odnosu na kukuruz standardnog kvaliteta zrna, dok su vrednosti za sadržaj proteina bile slične kod svih ispitivanih genotipova. Sadržaj proteina se takođe nije razlikovao između CML 144 i ZPL 3, odnosno ZPL 5.

Nakon što su rezultati genetičke i biohemijske karakterizacije potvrdili dobar odabir roditeljskih linija, njihovim ukrštanjem formirana je F_1 generacija u kojoj su sve biljke bile heterozigotne za *opaque2* gen ($O2o2$). Nakon povratnih ukrštanja formirane su BC_1 i BC_2 generacije, odnosno potomstva koje su činile dominantno homozigotne ($O2O2$) i heterozigotne ($O2o2$) biljke. Procenat identifikovanih heterozigotnih biljaka u BC_1 i BC_2 generacijama bio je približno 50%, što je u skladu sa očekivanim odnosom 1

O2O2 : 1 *O2o2* prema pravilima Mendelovog nasleđivanja. Slični rezultati su dobijeni i u radu Babu i sar. (2005), koji su identifikovali 71 heterozigot od ukupno 148 biljaka BC_1 generacije (47,6%), kao i 74 od 159 biljaka BC_2 generacije (46,5%). U radu Gupta i sar. (2013) nađeno je 87 heterozigota od ukupno 158 biljaka BC_1 generacije (55,1%), kao i 98 od 212 biljaka BC_2 generacije (46,2%). Identifikacija heterozigotnih biljaka omogućava odbacivanje potomstava koja nemaju željeni alel (*O2O2*) pre polinacije, što znatno doprinosi efikasnosti selekcije. Kada su u pitanju markeri kao što su phi057 i umc1066, koji su locirani unutar samog *opaque2* gena, selekcija željenih genotipova je vrlo jednostavna. Ovakav odnos markera i ciljnog gena jeste najpoželjniji u procesima MAS, ali takvi markeri nisu uvek dostupni, osim ako nisu već klonirani i sekvencirani (Babu i sar., 2005).

Utvrđivanjem procenta genoma rekurentnog roditelja i BC_2 generacije, ustanovljeno je da je kod 65% BC_2 potomstava koeficijent GS bio oko proseka, a njihov broj je opadao ka višim i nižim vrednostima. Skoro simetrična distribucija biljaka sa niskim, srednjim i visokim koeficijentom genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljem u BC_2 generaciji ukazuje na dovoljan broj podataka dobijen molekularnim markerima.

Vrednosti koeficijenata genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja ZPL 3 i BC_2 potomstava (P-1 do P-43) su iznosile od 0,51 do 0,89, sa srednjom vrednošću od 0,74. Vrednosti koeficijenata GS između rekurentnog roditelja ZPL 5 i BC_2 potomstava (P-1 do P-8) su iznosile od 0,67 do 0,85, sa srednjom vrednošću od 0,75. Zbog nepredvidivih okolnosti u poljskim uslovima, posebno kod QPM germplazme koja je sklona slabom klijanju, odabrano je više od jedne biljke za dalji proces selekcije - tri iz ukrštanja ZPL 3 x CML 144 i dve iz ukrštanja ZPL 5 x CML 144. Takođe, odabir više od jednog genotipa doprinosi većoj genetičkoj varijabilnosti, što povećava kvalitet fenotipske selekcije poželjnih agronomskih svojstava u kasnijim generacijama. Dobijeni rezultati genetičke sličnosti su u skladu sa rezultatima Babu i sar. (2005), gde je srednja vrednost procenta genoma rekurentnog roditelja bila 78,4%, a za dalju selekciju odabrane su tri biljke sa najvećim procentom - 95,75%, 93,25% i 92,75%, redom. Slične rezultate dobili su i Gupta i sar. (2013), koji su za formiranje BC_2F_2 generacije izabrali biljke čiji je procenat genoma rekurentnog roditelja iznosio od 83,7% do 94,4% kod jednog i od 80% do 93,7% kod drugog ukrštanja. Za razliku od navedenih radova, u ovom radu nisu identifikovana BC_2 potomstva sa preko 90% genoma rekurentnih

roditelja. Najverovatnije je manja genetička sličnost posledica većih razlika između roditeljskih linija (tropska prema adaptiranoj germplazmi).

Heterozigotne jedinke sa najvećim procentom genoma rekurentnog roditelja su nakon povratnih ukrštanja samooplođene radi formiranja BC₂F₂ generacije. Dobijeno potomstvo je sadržalo dominantno homozigotne (*O2O2*), heterozigotne (*O2o2*) i recesivno homozigotne biljke (*o2o2*) čiji je očekivani odnos 1:2:1 (25:50:25%). Recesivno homozigotne biljke su identifikovane pomoću specifičnih *opaque2* markera u oba ukrštanja. Od potomstva iz ukrštanja ZPL 3 x CML 144 detektovano je 4,5% recesivno homozigotnih biljaka. Nijedna od ovih biljaka samooplođnjom nije dala dovoljan broj zrna (250) za biohemijske i genetičke analize, kao i za formiranje sledeće generacije, što je onemogućilo dalji rad sa potomstvima koja potiču od linije standardnog kvaliteta zrna ZPL 3. Takođe je i kod potomstva iz ukrštanja ZPL 5 x CML 144 identifikovan znatno manji procenat (7,6%) recesivno homozigotnih biljaka od očekivanih 25%. Manji procenat recesivno homozigotnih biljaka od očekivanog dobili su i Jompuk i sar. (2011). Kod potomstva iz ukrštanja Agron20 x Pop65C₆-46 nađeno je osam recesivnih homozigota od ukupno 70 biljaka (8,57%), a kod potomstva iz ukrštanja Agron29 x Pop65C₆-55 samo jedna recesivno homozigotna biljka od ukupno 70 (1,43%). Autori su kao mogući uzrok ovakvih rezultata naveli malu veličinu uzorka i slučajno odabrane biljke iz polja. Najverovatnije je na mali broj *o2o2* biljaka uticala veća kompetitivnost polena sa dominantnim alelom (*O2*).

Kompeticija polena je naročito dobro opisana kod kukuruza zbog specifične građe cveta koja omogućava detaljno izučavanje ovog fenomena (Jones, 1928; Mulcahy, 1971; Ottaviano i Sari-Gorla, 1979; Ottaviano i sar., 1988). Najvažnije komponente vitalnosti polena su klijavost polenovog zrna i stopa rasta polenove cevčice. Sari-Gorla i Rovida (1980) su pokazali da polenova zrna koja nose recesivni *o2* alel imaju slabiju klijavost u odnosu na polenova zrna sa dominantnim alelom, dok razlike u brzini rasta polenove cevčice nisu uočene. Klijavost polena mogu izmeniti mnogi faktori, kao što su odnosi između gameta (Sari-Gorla i Rovida, 1980), uticaji spoljne sredine (Young, 1992) i interakcija sa tkivom stubića tučka (Pfahler, 1967; Heslop-Harrison, 1975; Sari-Gorla i sar., 1976; Herrero i Arbeloa, 1989). Takođe, kompleksni fiziološki odnosi između polena i stubića tučka podrazumevaju aktivaciju stubića od strane polenove cevčice, kao i uticaj proteina stubića na genom polena.

Razlike u kompetitivnosti polena mogu zato da se objasne razlikama u sposobnosti indukcije metaboličkih odgovora u stubiću tučka ili upotrebi njegovih metaboličkih produkata.

Interakcija polena i tučka je od suštinske važnosti za uspešnu oplodnju (Cheung, 1995) i podrazumeva strogo regulisane procese koji obezbeđuju uspešno spajanje muških i ženskih gameta (Edlund i sar., 2004). Inkompatibilna polenova zrna su zaustavljena na svom putu ka plodniku tučka (Takayama i Isogai, 2005). Genetička osnova odnosa između polena i stubića tučka utvrđena je kod kukuruza (Pfahler, 1967; Sari-Gorla i sar., 1976; Ottaviano i sar., 1980, 1983), ali je identifikovano samo nekoliko specifičnih gena koji ga direktno kontrolišu (Sari-Gorla i sar., 1995). Opisano je više različitih *Gametophytic factor* gena (*Ga*) koji pripadaju grupi gena specifičnih za razvoj polena, klijavost i rast polenove cevčice (Bianchi i Lorenzoni, 1975), od kojih je prvi i najbolje opisan gen *Ga1-s*. Polenova zrna koja nose recesivni alel (*ga*) su manje kompetitivna za tkivo stubića od onih sa dominantnim alelom (*Ga*) (Nelson, 1952, 1994). Ako je muški roditelj heterozigotan (*Ga/ga*), na oplodnju može da utiče preferencijalni prenos alela što rezultira manjim brojem zrna na klipju. Ovo bi takođe moglo biti objašnjenje zašto je tokom izrade ove disertacije često bio prisutan problem sa količinom zrna po samooplođenom klipju, pa je između ostalog i dovoljan broj zrna po biljci bio jedan od faktora za odabir genotipova.

Novije studije iz oblasti tehnologije transkriptoma i proteoma proširile su dosadašnje znanje o ekspresiji gena i proteina uključenih u interakciju polena i tučka (Qin i sar., 2009; Sang i sar., 2012; Xu i sar., 2012), kao i o post-transkripcionoj regulaciji ove interakcije (Kang i sar., 2012; Li i sar., 2013; Peng i sar., 2013; Yang i sar., 2013). *Ga1-s* gen je mapiran i selekcijom pomoću molekularnih markera ugrađen u roditeljske linije belog hibrida voskovca putem šest generacija povratnih ukrštanja i jedne samooplodnje (Liu i sar., 2014). Između dominantno i recesivno homozigotnih hibrida za ovaj gen uočena je potpuna inkompatibilnost. Ovo je dominantan gen koji se zbog svoje specifičnosti najlakše inkorporira u elitne linije putem MAS. *Ga* geni su veoma bitni za hibride specifičnih svojstava koji se baziraju na recesivnim genima, kao što je i QPM, pa bi bilo vrlo korisno ugraditi *Ga1-s* gen putem MAS u novodobijene QPM linije.

Identifikovane recesivno homozigotne biljke BC₂F₂ generacije su samooplođene radi formiranja BC₂F₃ generacije. Koeficijenti genetičke sličnosti između rekurentnog roditelja ZPL 5 i potomstava (P-1 do P-10) su iznosili od 0,71 do 0,94. Pet potomstava koja su imala koeficijent GS veći od prosečnog (82% - 94%) su korišćena za dalji proces dobijanja linija visokog kvaliteta proteina.

Na odabranim BC₂F₃ potomstvima urađena je analiza fenotipskih osobina. Prema rezultatima LSD testa, kod svih genotipova uočena je statistički značajna razlika u odnosu na ZPL 5 za visinu biljke, ukupan broj listova i broj redova zrna, dok za ostale ispitivane osobine ove razlike ili nisu bile značajne ili su bile najmanje statistički značajne. Za period između metličanja i svilanja nisu utvrđene statistički značajne razlike između roditeljske linije ZPL 5 i ispitivanih potomstava, što je od posebnog značaja kada se uzme u obzir da su roditeljske linije adaptirane na različite klimatske uslove. Kod potomstava P-5 i P-6 uočen je najveći broj osobina (12 od ispitivanih 15) čije se srednje vrednosti statistički značajno ne razlikuju u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5. Ovi rezultati su potvrđeni i dobijenim vrednostima GS, kao i klaster analizom.

Pet odabranih BC₂F₃ potomstava su samooplođena radi formiranja BC₂F₄ generacije. Od dve lokacije na kojima su postavljeni ogledi, samooplodnja je bila uspešna samo na jednoj. Izdvojeno je ukupno 14 potomstava koja su imala dovoljan broj zrna.

Prvi korak u odabiru genotipova za sledeću generaciju je bio utvrđivanje genetičke sličnosti BC₂F₄ potomstava sa rekurentnim roditeljem ZPL 5. Koeficijenti genetičke sličnosti su iznosili od 0,81 do 0,93, sa srednjom vrednošću od 0,88. Od 14 analiziranih potomstava, devet je imalo vrednost koeficijenta GS veću od prosečne (0,91 - 0,93) i ona su dalje korišćena za agronomske i biohemijske analize.

Modifikacija mekog u tvrd endosperm je jedan od ključnih koraka u stvaranju QPM genotipova. Plejotropni efekti *o2* mutacije čine endosperm zrna kukuruza mekim, a samo zrno osetljivim na pucanje, trulež i štetočine. Mehanizam kojim geni modifikatori menjaju strukturu endosperma zrna kukuruza od mekog i brašnjavog u tvrdi nije u potpunosti razjašnjena, niti se zna njihov broj, pozicija na hromozomu, kao ni razlike u nivou ekspresije u genotipovima različitog porekla (Prassana i sar., 2001; Sofi i sar., 2009). Poznato je prisustvo dva gena odgovorna za tvrdoću endosperma na hromozomu 7. Jedan od njih je lociran pored gena *gzm1* (eng. *gamma zein modifier1*)

(Lopes i sar., 1995). Uticaj γ -zeina na nastanak tvrdog endosperma, kao i uticaj gena modifikatora na sadržaj ovih proteina posledica su visoke korelacije između stepena modifikacije endosperma zrna i povećanog nivoa γ -zeina (Lopes i Larkins, 1991; 1995).

Tokom procesa stvaranja QPM genotipova, preporučuje se odabir zrna tipa 3 ($\leq 50\%$ netransparentnosti) u F_2 generaciji, tipa 2 ($\leq 25\%$ netransparentnosti) i tipa 3 u sledeće dve generacije, a tipa 2 u preostalim generacijama. Zrna tipa 3 su najbolji izbor u ranim generacijama pošto predstavljaju kompromis između garantovanog prisustva *o2o2*, što je glavni prioritet, i zadovoljavajućeg stepena modifikacije endosperma, koji može da se popravi u sledećim generacijama. U ovom periodu selekcije, zrna tipa 1 su najverovatnije *O2O2* ili *O2o2*, zrna tipa 5 su *o2o2*, a zrna tipa 4 imaju malu verovatnoću da u sledećim generacijama postignu dovoljan stepen modifikacije endosperma. Ovakav princip odabiranja zrna za formiranje sledeće generacije je primenjen i u ovom radu.

Stepen modifikacije endosperma zrna u BC_2F_4 generaciji je generalno bio visok. Od devet BC_2F_4 potomstava koja su na osnovu vrednosti GS odabrane za dalji rad, kod pet su identifikovana samo zrna sa tvrdim endospermom ($\leq 25\%$ *opaque*). Kod preostala četiri potomstva identifikovana su i zrna koja su $\leq 50\%$ *opaque* (od 1,3% do 11,9%) i $\leq 75\%$ *opaque* (2,4% do 3,6%), dok se procenat zrna sa mekim endospermom (100% *opaque*) kretao od 2,2% do 3,8%. Mali procenat zrna mekog endosperma ukazuje na to da je postignut zadovoljavajući stepen modifikacije endosperma zrna.

Biohemijska evaluacija potomstava BC_2F_4 generacije pokazala je značajno povećanje sadržaja triptofana i indeksa kvaliteta kod svih ispitivanih potomstava u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5, dok sadržaj proteina nije bio značajno promenjen u odnosu na roditeljsku liniju. Kod devet potomstava koja su imala najveći koeficijent GS sa roditeljskom linijom povećanje sadržaja triptofana u odnosu na ZPL 5 iznosilo je od 20% do 33%, a povećanje QI od 17% do 37%. Među potomstvima čiji je koeficijent GS bio ispod prosečne vrednosti izdvaja se P-1/2 sa najvećim povećanjem sadržaja triptofana (43%) i QI (46%) u odnosu na roditeljsku liniju. Iako je ovo potomstvo imalo vrednost GS ispod prosečne, zbog izuzetno visokog sadržaja triptofana odabrano je za dalji rad.

Na osnovu dobijenih rezultata stepena modifikacije zrna, biohemijske i SSR analize, izabrano je deset sub-linija za fenotipsku i biohemijsku evaluaciju u poljskim

ogledima. Analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za većinu osobina. Genotip nije bio značajan izvor variranja za period između metličanja i svilanja, kao ni za procenat slomljenih biljaka i procenat oklaska. Rezultati LSD testa identifikovali su kod svih genotipova statistički značajne razlike u odnosu na ZPL 5 za visinu biljke i broj redova zrna. Pošto je isti rezultat dobijen i za potomstva prethodne generacije, u prethodnoj godini, može se pretpostaviti da su vrednosti za ove dve osobine rezultat tropskog porekla roditeljske linije CML 144. Takođe, dobijen je isti rezultat kao u prethodnoj generaciji i za period između metličanja i svilanja, gde ne postoje statistički značajne razlike između roditeljske linije ZPL 5 i ispitivanih sub-linija. Ovo je potvrdilo dobru adaptiranost potomstava na uslove umerenog klimatskog područja. U odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5, najmanja statistički značajna razlika za većinu osobina je bila kod sub-linija od S-3 do S-10. Kod sub-linije S-3 uočen je najveći broj osobina (13 od ispitivanih 15) čije se srednje vrednosti statistički značajno ne razlikuju u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima klaster analize na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina. Sub-linije od S-3 do S-10 formirale su poseban klaster sa roditeljskom linijom. U okviru njega, posebno se sa roditeljskom linijom izdvojila sub-linija S-3, kod koje su utvrđene najmanje značajne razlike između srednjih vrednosti ispitivanih osobina u odnosu na ZPL 5.

Odabrane sub-linije su samooplođene i nakon berbe određen je stepen modifikacije endosperma i izvršena je biohemijska evaluacija svakog pojedinačnog klipa. Na osnovu dobijenih rezultata odabrane su sub-linije sa najvećim sadržajem triptofana i urađena je analiza genetičke sličnosti sa roditeljskom linijom ZPL 5, kako bi se potvrdilo da li su linije zadržale visok procenat sličnosti sa genomom rekurentnog roditelja.

Analizom stepena modifikacije endosperma zrna deset sub-linija, kod četiri su identifikovani samo klipovi sa zrnom tvrdog endosperma ($\leq 25\%$ *opaque*). Zrno mekog endosperma (100% *opaque*) bilo je prisutno kod ostalih šest sub-linija u malom procentu, što je potvrdilo da je održan zadovoljavajući stepen modifikacije endosperma zrna. Sve analizirane sub-linije su imale veći sadržaj triptofana i indeks kvaliteta u odnosu na roditeljsku standardnu liniju. Prosečno povećanje sadržaja triptofana odabranih sub-linija u odnosu na roditeljsku liniju kretalo se od 17% do 27%. Najveće

prosečno povećanje QI u odnosu na ZPL 5 iznosilo je 38%, a najmanje 23%. Kada su u pitanju pojedinačni klipovi, 46% je imalo sadržaj triptofana iznad praga za QPM, a za još 40% može se reći da imaju povećani sadržaj ove aminokiseline (0,070-0,075%). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenih u radu Gupta i sar. (2013), kod kojih je povećanje sadržaja triptofana iznosilo od 6 do 24% u odnosu na roditeljsku liniju standardnog kvaliteta zrna. Rezultati analize biohemijskih komponenti pokazali su statistički značajne razlike u sadržaju triptofana i indeksu kvaliteta kod svih ispitivanih sub-linija u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5. Takođe, visoko značajno variranje ($P < 0,001$) između genotipova uočeno je kod svih ispitivanih biohemijskih osobina. Koeficijent varijacije je bio niži kod biohemijskih osobina u odnosu na fenotipske osobine i prinos zrna. Moguće objašnjenje je relativno mala genotipska varijabilnost za ove osobine.

Poznavanje korelacija između različitih osobina, uključujući i kvalitet zrna, može da objasni u kom stepenu te osobine utiču na ekonomsku isplativost gajenja određenog genotipa (Bello i sar., 2012). Između prinosa zrna i većine ispitivanih osobina u ovom radu uočene su značajne korelacije. Značajna korelacija ($P < 0,05$) ustanovljena je između prinosa zrna i procenta oklaska, a visoko značajne fenotipske korelacije ($P < 0,01$) između prinosa zrna i ostalih ispitivanih osobina. Visoko značajne korelacije između prinosa i komponenti prinosa se uobičajeno detektuju zbog njihove međuzavisnosti (Blum, 1988). Komponente prinosa kao što su dužina klipa, prečnik klipa, broj redova zrna, broj zrna u redu i masa 100 zrna imaju veću heritabilnost od prinosa zrna (Austin i Lee, 1996; Messmer i sar., 2009), tako da se njihovim poboljšanjem može postići povećanje prinosa (Gupta i sar., 2006).

Ispitivane biohemijske osobine nisu pokazale značajne korelacije sa većinom fenotipskih osobina. Visoko značajne korelacije ($P < 0,01$) uočene su između sadržaja triptofana i visine biljke, broja redova zrna i indeksa kvaliteta, a značajne korelacije ($P < 0,05$) između sadržaja triptofana i broja listova iznad klipa, dužine klipa i broja zrna u redu. Sadržaj proteina pokazao je visoko značajne korelacije ($P < 0,01$) sa procentom vlage, masom 100 zrna i indeksom kvaliteta, a značajnu korelaciju ($P < 0,05$) sa brojem redova zrna. Između indeksa kvaliteta i broja redova zrna, kao i sadržaja triptofana i proteina uočene su visoko značajne korelacije ($P < 0,01$), a značajne korelacije ($P < 0,05$) između indeksa kvaliteta i visine biljke, kao i dužine klipa. Na osnovu dobijenih

rezultata, za dobijanje genotipova sa većim sadržajem triptofana i indeksa kvaliteta mogla bi se preporučiti selekcija na visinu biljke, dužinu klipa i broj redova zrna.

Biohemijski parametri su pokazali pozitivne statistički nesignifikantne korelacije sa prinosom zrna, što je delimično u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u radu Zaidi i sar. (2008). Ovi autori dobili su značajne korelacije ($P < 0,05$) između prinosa zrna i sadržaja proteina, kao i sadržaja triptofana u zrnu, a između prinosa zrna i sadržaja triptofana u proteinu nije uočena statistički značajna korelacija. Reddy i sar. (2013) su takođe dobili pozitivne korelacije između prinosa zrna i sadržaja triptofana, kao i indeksa kvaliteta, dok je između prinosa zrna i sadržaja proteina uočena negativna korelacija. Negativna korelacija između prinosa i sadržaja proteina dobijena je u nekoliko istraživanja (Mosisa i sar., 2008; Idikut i sar., 2009; Selvaraj i Nagarajan, 2011), dok je u radu Prakash i sar. (2006) uočena pozitivna korelacija kao i u ovom radu. Pošto su dobijene korelacije pozitivne, može se očekivati da se povećanjem prinosa povećaju i biohemijski parametri. Međutim, to povećanje neće biti veliko, pošto korelacije nisu bile statistički značajne. Ova činjenica, međutim, ukazuje na mogućnost paralelne selekcije na povećani prinos i poboljšani kvalitet zrna u ispitivanom materijalu.

Agroekološki uslovi imaju važno mesto u proizvodnom procesu kukuruza jer u velikoj meri utiču na dobijanje proizvoda visokog prinosa i kvaliteta. Klimatski faktori i zemljište, najznačajniji agroekološki faktori, utiču na stabilnost sadržaja proteina, kao i sadržaja lizina i triptofana. Različita istraživanja su pokazala da je sadržaj triptofana kod QPM u stresnim i optimalnim uslovima bio veći nego sadržaj triptofana kod kukuruza standardnog kvaliteta zrna u optimalnim uslovima (Prasanna i sar., 2001; CIMMYT, 2003; Mosisa, 2005; Gupta i sar., 2009), što se može objasniti drastičnim smanjenjem zeina, kao i povećanjem drugih rezervnih proteina bogatih lizinom i triptofanom (Tengan, 2010). Superiornost kvaliteta proteina QPM u odnosu na genotipove standardnog kvaliteta je dokazana u optimalnim uslovima zemljišta u Srbiji (Ignjatović-Micić i sar., 2013), Zimbabveu i Keniji (Mosisa i sar., 2007), kao i u različitim klimatskim uslovima (Ignjatović-Micić i sar., 2015). U radu Bello i sar. (2012) sadržaj lizina i triptofana, kao i indeks kvaliteta su bili značajno veći kod QPM, a vrednosti su održane iznad praga za QPM i u uslovima različitog sadržaja azota u zemljištu. Slično tome, objavljeno je i da je kvalitet proteina stabilniji nego sadržaj proteina i

modifikacije endosperma zrna kod QPM u različitim uslovima sredine (Pixley and Bjarnason, 2002; Zaidi et al, 2008). U ovom radu kod svih ispitivanih sub-linija uočen je povećani sadržaj triptofana u odnosu na liniju standardnog kvaliteta zrna. Kod većeg broja analiziranih pojedinačnih klipova (87%) vrednosti su bile iznad ili malo ispod granice za QPM. Kod malog broja ispitivanih genotipova uočena su odstupanja ovih vrednosti u okviru istog genotipa na različitim lokacijama, što se može objasniti specifičnim agroekološkim uslovima. Za razliku od 2013. godine kada su klimatski uslovi bili optimalni, u predvegetacionom periodu 2014. godine, bilo je neobičajeno toplo i suvo vreme sa malo snega. Nedostatak vlage u zemljištu nadoknađen je u vegetacionom periodu, kada su u maju, julu i septembru zabeležene veoma obilne i intenzivne padavine. Dok je temperatura vazduha bila u granicama višegodišnjeg proseka, ukupna količina padavina u toku vegetacionog perioda iznosila je 873,2 mm, što je duplo više u odnosu na uslovno optimalnu količinu vode od 425 mm (Vučić, 1976). Kod ispitivanih sub-linija je održan povećani nivo triptofana iz prethodne generacije, što govori o visokoj heritabilnosti ove osobine. Takođe, moglo bi se zaključiti da su sub-linije homozigotne za gene modifikatore sadržaja aminokiselina.

Na osnovu rezultata biohemijske analize samooplođenih pojedinačnih klipova BC₂F₄ generacije sub-linija odabrano je ukupno 13, čiji je sadržaj triptofana bio iznad praga za QPM i izračunata je genetička sličnost između roditeljske linije ZPL 5 i ovih sub-linija poboljšanog kvaliteta. Genetička sličnost između ZPL 5 i svih analiziranih sub-linija, izračunata prema *Dice*-ovom koeficijentu, je bila 0,93. Rezultate GS potvrdila je i klaster analiza na osnovu matrica genetičkih sličnosti, prema kojoj su analizirane linije formirale jedinstveni klaster sa rekurentnim roditeljem ZPL 5. Ovakvi rezultati potvrdili su da su linije sa povećanim sadržajem triptofana zadržale visok procenat sličnosti sa genom rekurentnog roditelja. Svih 13 linija poboljšanog kvaliteta zrna potiču od P-5 i P-6 potomstva BC₂F₃ generacije, koja su imala najveći koeficijent GS sa rekurentnim roditeljem, najmanju distancu na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina, kao i najveći broj fenotipskih osobina čije se srednje vrednosti statistički značajno ne razlikuju u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5. Rezultati dobijeni u ovom radu su u skladu sa rezultatima Gupta i sar. (2013) koji su povratili genom rekurentnog roditelja u proseku za 94%, kao i Zhang i sar. (2010) kod kojih je taj procenat iznosio od 92 do 95%.

Odabrana BC₂F₃ potomstva su ukrštena sa komercijalnim test F₁ hibridom radi provere kombinacionih sposobnosti dobijenih sub-linija u poređenju sa rekurentnim roditeljem. Analiza varijanse dobijenih hibrida je pokazala statistički značajne razlike između analiziranih genotipova za mali broj osobina. Za većinu ispitivanih osobina genotip nije bio značajan izvor variranja. Rezultati LSD testa pokazali su da ne postoje statistički značajne razlike između hibrida sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) i ostalih hibrida za većinu ispitivanih osobina. Kod svih hibrida uočena je značajna razlika u odnosu na H-1 za broj redova zrna. U odnosu na H-1, najmanje statistički značajne razlike za visinu biljke, broj listova iznad klipa, procenat vlage u zrnu i dužinu klipa su uočene kod hibrida H-2. Veliki broj osobina ispitivanih hibrida čije se srednje vrednosti statistički ne razlikuju u odnosu na H-1 ukazuje da su kod linija poboljšanog kvaliteta zrna očuvane dobre kombinacione sposobnosti roditeljske linije ZPL 5.

Na osnovu srednjih vrednosti fenotipskih osobina hibrida urađena je klaster analiza. Najveća distanca u odnosu na hibrid sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) uočena je kod hibrida H-5, a nešto manja kod H-3 i H-4, što je i potvrdilo njihovo grupisanje u poseban klaster. Hibrid H-2, kod koga je dobijena najmanja vrednost distance, izdvojen je u poseban klaster sa hibridom H-1, što je potvrdilo rezultate LSD testa gde su najmanje značajne razlike između srednjih vrednosti ispitivanih osobina hibrida u odnosu na hibrid sa ZPL 5 uočene upravo kod hibrida H-2.

Analiza stepena modifikacije endosperma zrna pokazala je kod svih ispitivanih hibrida sličan procenat zrna sa $\leq 25\%$ *opaque* endospermom (93,87% - 98,75%). Jedino hibrid sa roditeljskom linijom ZPL 5 (H-1) nije imao nijedno zrno sa mekim endospermom (100% *opaque*), dok se procenat ovih zrna kod ostalih hibrida kretao od 0,36% - 4,06%. Mali procenat zrna sa mekim endospermom potvrđuje prisustvo gena modifikatora za tvrdoću endosperma, odnosno dobar odabir genotipova u procesu dobijanja linija poboljšanog kvaliteta zrna.

Prednosti MAS u poboljšanju kvaliteta kukuruza su već objavljene (Babu i sar., 2005; Zhang i sar., 2010; Zhang i sar., 2012; Gupta i sar., 2013). Ona povećava pouzdanost i efikasnost procesa stvaranja linija i hibrida kukuruza poboljšanog kvaliteta (Babu i sar., 2004). Babu i sar. (2005) objavili su rezultate konverzije standardne inbred linije V 25 u QPM verziju koristeći QPM donor liniju CML 176. Njihov rad obuhvatio je selekciju za *opaque2* gen u dve generacije povratnog ukršanja, selekciju biljaka

genetički najbližijih rekurentnom roditelju u BC₂F₂ generaciji, kao i fenotipsku selekciju za poželjne agronomske osobine u dve uzastopne generacije samooplodnje. Gupta i sar. (2013) su pomoću MAS stvorili QPM roditeljske linije Vivek-9 hibrida i dobili QPM hibrid za duplo kraće vreme u odnosu na konvencionalno oplemenjivanje. SSR markeri su uspešno iskorišćeni kako za odabir genotipova recesivno homozigotnih za *o2* gen, tako i onih sa najvećim procentom genoma rekurentnog roditelja. Kombinujući konvencionalno oplemenjivanje i MAS, Zhang i sar. (2010) su dobili linije sa povećanim sadržajem lizina koristeći kao roditeljske komponente *o2* i *o16* kukuruz. Selekcijom na *o2* i *o16* pomoću SSR markera umc1066 i umc1141, nakon dva ciklusa povratnog ukrštanja i tri ciklusa samooplodnje, stvorene su linije koje su imale veći sadržaj lizina od oba roditelja (23% i 64%). Jompuk i sar. (2011) su ukrštanjem inbred linija standardnog kvaliteta zrna (Agron20 i Agron29) i QPM linija (Pop65C₆-46 i Pop65C₆-55) i upotrebom SSR markera specifičnih za *opaque2* gen dobili sedam linija koje su imale duplo veći sadržaj triptofana u odnosu na kukuruz standardnog kvaliteta zrna. Dve linije iz njihovog istraživanja koje su pokazale najbolje kombinacione sposobnosti preporučene su za programe stvaranja QPM hibrida.

Rezultati ovog rada su dobijanje linija povećanog sadržaja triptofana (37-50% u odnosu na početnu vrednost roditeljske standardne linije), povećanog indeksa kvaliteta (42-56% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), očuvane genetičke sličnosti sa rekurentnom linijom (93% genoma rekurentnog roditelja), visokog stepena modifikacije endosperma zrna (100% zrna tvrdog endosperma), povećanog prinosa zrna (11-31% u odnosu na roditeljsku liniju) i očuvanih odličnih kombinacionih sposobnosti. Ove linije poboljšanog kvaliteta, dobijene kombinacijom konvencionalnog i molekularnog oplemenjivanja, adaptirane su na uslove umerenog klimatskog područja.

Molekularna genetika je danas u svetu sastavni deo različitih programa selekcije i oplemenjivanja žitarica. Povećanje hranljive vrednosti zrna kukuruza je samo jedan od primera njene primene. U odnosu na druge žitarice, najveći napredak je ostvaren kod kukuruza, zato što se njegova proizvodnja nalazi u vlasništvu velikih privatnih kompanija (Pioneer Hi-Bred, Syngenta, Monsanto, KWS, Limagrain) koje ulažu velika sredstva u razvoj novih tehnologija. Savremena selekcija i oplemenjivanje kroz različite segmente kao što su sekvenciranje genoma, razvoj molekularnih markera zajedno sa fenotipskom evaluacijom, funkcionalna genomika, asocijativno mapiranje,

transformacije, poziciono kloniranje, molekularno oplemenjivanje i evaluacija u poljskim ogledima, dovode do stvaranja novih varijeteta. Gajenje linija i hibrida visokog kvaliteta proteina obezbedilo bi proizvodnju biljnih proteina veće hranljive i biološke vrednosti za ishranu ljudi i domaćih životinja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata proučavanja upotrebe molekularnih markera u stvaranju linija kukuruza sa poboljšanim kvalitetom proteina adaptiranih na umereno klimatsko područje, došlo se do sledećih zaključaka:

- Molekularni markeri phi057 i umc1066, specifični za *opaque2* gen, pokazali su ko-dominantni polimorfizam između linija standardnog kvaliteta zrna i QPM linije.
- Procenat identifikovanih heterozigotnih biljaka u BC₁ i BC₂ generacijama bio je približno 50%, što je u skladu sa očekivanim odnosom 1 *O2O2* : 1 *O2o2* prema pravilima Mendelovskog nasleđivanja.
- U BC₂F₂ generaciji identifikovan je manji procenat recesivno homozigotnih biljaka od očekivanih 25% - 4,5% kod ukrštanja ZPL 3 x CML 144 i 7,6% kod ukrštanja ZPL 5 x CML 144. Najverovatnije je na mali broj *o2o2* biljaka uticala veća kompetitivnost polena sa dominantnim alelom (*O2*).
- Pomoću *opaque2* specifičnih markera, tokom selekcije su direktno birane heterozigotne i recesivno homozigotne biljke. Takođe, upotrebom SSR markera ravnomerno raspoređenih po genomu, za dalju selekciju birana su potomstva sa najvećim koeficijentom genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljima. Na taj način je povećana efikasnost selekcije, odnosno smanjen broj generacija potrebnih za dobijanje željenog genotipa.
- Kod ispitivanih sub-linija održan je povećani nivo triptofana iz prethodne BC₂F₄ generacije, što ukazuje na visoku heritabilnost ove osobine, kao i na to da su sub-linije homozigotne za gene modifikatore sadržaja aminokiselina.
- Mali procenat zrna mekog endosperma kod ispitivanih sub-linija ukazuje na to da je postignut zadovoljavajući stepen modifikacije endosperma.
- Kod analiziranih sub-linija biohemijski parametri su pokazali pozitivne statistički nesigifikantne korelacije sa prinosom zrna, što ukazuje na mogućnost paralelne selekcije na povećani prinos i poboljšani kvalitet zrna u ispitivanom materijalu.

- Na osnovu dobijenih korelacija između ispitivanih biohemijskih i fenotipskih osobina, za dobijanje genotipova sa većim sadržajem triptofana i indeksa kvaliteta mogla bi se preporučiti selekcija na visinu biljke, dužinu klipa i broj redova zrna.
- Kombinacijom konvencionalnog i molekularnog oplemenjivanja dobijeno je trinaest linija adaptiranih na uslove umerenog klimatskog područja koje imaju povećani sadržaj triptofana (37-50% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), povećani indeks kvaliteta (42-56% u odnosu na početnu vrednost roditeljske linije), očuvanu genetičku sličnost sa roditeljskom linijom (93% genoma rekurentnog roditelja), visok stepen modifikacije endosperma zrna (100% zrna tvrdog endosperma), povećani prinos zrna (11-31% u odnosu na roditeljsku liniju), kao i očuvane odlične kombinacione sposobnosti. Svih 13 linija poboljšanog kvaliteta potiču od P-5 i P-6 potomstva BC₂F₃ generacije koja su imala najveći koeficijent genetičke sličnosti sa rekurentnim roditeljem, kao i najveći broj fenotipskih osobina čije se srednje vrednosti statistički značajno ne razlikuju u odnosu na roditeljsku liniju ZPL 5.
- Između hibrida sa roditeljskom linijom ZPL 5 i hibrida sa odabranim BC₂F₃ potomstvima, za većinu ispitivanih fenotipskih osobina nisu utvrđene statistički značajne razlike, što je ukazalo da su kod sub-linija poboljšanog kvaliteta očuvane dobre kombinacione sposobnosti roditeljske linije ZPL 5.
- Mali procenat zrna sa mekim endospermom kod ispitivanih hibrida potvrdio je prisustvo gena modifikatora za tvrdoću endosperma.
- Rezultati ove disertacije potvrdili su prednosti selekcije upotrebom molekularnih markera u poboljšanju kvaliteta kukuruza. Pošto su roditeljske linije korišćene u ovom radu bile različitog porekla (tropska i adaptirana germplazma), što je potvrdio veoma nizak koeficijent genetičke sličnosti između njih (0,05), povraćaj genoma rekurentnog roditelja kod poboljšanih linija je iznosio 93%. Radi većeg povraćaja genoma rekurentnog roditelja, za prevođenje standardnog kukuruza na kukuruz visokog kvaliteta proteina adaptiranog na umereno klimatsko područje, preporučuje se još jedno povratno ukrštanje.

7. LITERATURA

Agrawal, P. K., H. S. Gupta (2010): Enhancement of protein quality of maize using biotechnological options. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 10: 79–91.

Akuamo-Boateng, A. (2002): Quality protein maize infant feeding trials in Ghana. Ghana Health Service. Ashanti, Ghana.

Ames, B.N. (1979): Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593.

Andersen, J.R., T. Lübberstedt (2003): Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8: 554-560.

Austin, D.F., M. Lee (1996): Comparative mapping in F2:3 and F6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theor. Appl. Genet.* 92: 817-826.

Ayers, N.M., A.M. McClung, P.D. Larkin, H.F.J. Bligh, C.A. Jones, W.D. Park (1997): Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 94: 773–781.

Babu, R., S.K. Nair, M. Prassana, H.S. Gupta (2004): Integrating marker assisted selection in crop breeding – prospects and challenges. *Curr Sci*, 87 (5): 607-619.

Babu, R., Nair S.K., A. Kumar, S. Venkatesh, J.C. Sekhar, N.N. Singh, G. Srinivasan, H.S. Gupta (2005): Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). *Theor Appl Genet* 111: 888-897.

Babu, B.K., P.K. Agrawal, H.S. Gupta, A. Kumar, J.C. Bhatt (2012): Identification of candidate gene-based SSR markers for lysine and tryptophan metabolic pathways in maize (*Zea mays*). *Plant Breeding* 131: 20-27.

Bantte, K., B.M. Prasanna (2003): Simple sequence repeat polymorphism in quality protein maize (QPM) lines. *Euphytica*, 129: 337-344.

Barcaccia, G., L. Pallottini, P. Parrini, M. Lucchin (2006): A genetic linkage map of a flint maize (*Zea mays* var. *Indurata* L.) Italian landraces using one way pseudo-test cross strategy and multilocus PCR based markers. *Maydica* 51: 469-480

Bello, O.B., O.J. Olawuyi, M.A. Azeez, M. Lawal, S.Y. Abdulmalik, M.S. Afolabi, S.A. Ige, J. Mahamood (2011-12): Genotypic variation in endosperm protein, lysine and tryptophan contents of normal extra-early maize cultivars and their quality protein hybrids under nitrogen stress and non-stress environments. *Journal of Research (Science)*, 22-23: 27-48.

Bianchi, A., C. Lorenzoni (1975): Gametophytic factors in *Zea mays*. In: Mulcahy, D.L. (ed.) *Gamete Competition in Plants and Animals*. North Holland, Amsterdam: 257-263.

Bjarnason, M., S.K. Vasal (1992): Breeding of quality protein maize (QPM). *Plant Breeding Review* 9: 181-216.

Black, R.E., L.H., Allen, Z.A., Bhutta, L.E. Caulfield, M. de Onis, M. Ezzati, C. Mathers, J. Rivera (2008): Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet* 371(9608):243-260.

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

Brennecke, K., A.J. Souza Neto, J. Lugli, P.J. Lea, R.A. Azevedo (1996): Aspartate kinase in the maize mutants *ask1-lt19* and *opaque-2*. *Phytochemistry* 41: 707-712.

Bressani, R. (1991): Protein quality of high-lysine maize for humans. *Cereal Foods World* 36: 806-811.

Bressani, R. (1992): Nutritional value of high-lysine maize in humans. In: E.T. Mertz (Ed.), *Quality protein maize*. Am. Ass. Cereal Chem., St. Paul, MN: 205-224.

Brochetto-Braga, M.R., A. Leite, P. Arruda (1992): Partial purification and characterization of lysine-ketoglutarate reductase in normal and opaque-2 maize endosperms. *Plant Physiology* 98: 1139-1147.

Burgoon, K.G., J.A. Hansen, D.A. Knabe, A.J. Bockholt (1992): Nutritional value of quality protein maize for starter and finisher swine. *Journal of Animal Science* 70: 811-817.

Camus-Kulandaivelu, L., J-B. Veyrieras, D. Madur, V. Combes, M. Fourmann, S. Barraud, P. Dubreuil, B. Gouesnard, D. Manicacci, A. Charcosset (2006): Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf gene. *Genetics* 172: 2449–2463.

Carena, M.J. (2013): Development of cold and drought tolerant short-season maize germplasm for fuel and feed utilization. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 13: 1-8.

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

Charcosset, A. (1997): Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*. 147: 1469-1485.

Chardon, F., B. Virlon, L. Moreau, M. Falque, J. Joets, L. Decousset, A. Murigneux, A. Charcosset (2004): Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* 168: 2169–2185.

Cheung, A.Y. (1995): Pollen-pistil interaction in compatible pollination. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3077-3080.

Ching, A., K.S. Caldwell, M. Jung, M. Dolan, O.S. Smith, S. Tingey et al. (2002): SNP frequency: haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3: 19-32 .

CIMMYT (2003): The development and promotion of quality protein maize in sub-Saharan Africa. Progress Report Submitted to Nippon Foundation, Harare, Zimbabwe.

Cord Neto, G., J.A. Yunes, M.J. Dasilva, A.L. Vettore, P. Arruda, A. Leite (1995): The involvement of Opaque 2 on beta-prolamin gene regulation in maize and Coix suggests a more general role for this transcriptional activator. *Plant Molecular Biology* 27: 1015-1029.

Crow, J.F., J. Kermicle (2002): Oliver Nelson and quality protein maize. *Genetics* 160:819.

Damerval, C., D. de Vienne (1993): Quantification of dominance for proteins pleiotropically affected by *opaque-2* in maize. *Heredity* 70: 38-51.

Danson, J., M. Mbogori, M. Kimani, M. Lagat, A. Kuria, A. Diallo (2006): Marker assisted introgression of opaque2 gene into herbicide resistant elite maize inbred lines. *African journal of biotechnology*, 5 (24): 2417-2422.

Denić, M., V. Hadži-Tašković Šukalović, D. Jelenić, J. Dumanović, I. Božović (1979): Comparison of some chemical methods for screening maize genotypes with improved protein quality. *Genetika* 11(1): 75-83.

Dice, L.R. (1945): Measures of the amount of ecologic association between species, *Ecology*, 26: 297-302.

Diplock, A. T., P. J. Agget, M. Ashwell, F. Bornet, E. B. Fern, M. B. Roberfroid (1999): Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1): S1–S27.

Doyle, J.J., J.L. Doyle (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11-15.

Edlund, A.F., R. Swanson, D. Preuss (2004): Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell* 16 Suppl: S84-97.

Edwards, A., A. Civitello, H.A. Hammond, C.T. Caskey (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 49: 746-756.

Esen, A. (1987): A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). *J. Cereal Sci.* 5: 117.

Gallusci, P., F. Salamini, R.D. Thompson (1994): Differences in cell typespecific expression of the gene Opaque 2 in maize and transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics* 244: 391-400.

Ganal, M.W., G. Durstewitz, A. Polley, A. Berard, E.S. Buckler, A. Charcosset, J.D. Clarke, E. Graner, M. Hansen, J. Joets, M. le Paslier, M.D. McMullen, P. Montalent, M. Rose, C. Schon, Q. Sun, H. Walter, O.C. Martin, M. Falque (2011): A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS ONE* 6(12): e28334.

Gernach, D.I., C.C. Ariahu, E.K. Ingbian (2011): Effects of malting and lacting on some chemical and functional properties of maize (*Zea mays*). *American Journal of Food Technology* 6: 404-412.

Gill, G. (2008): Quality protein maize and special purpose maize improvement. In *Recent Advances in crop improvement CAS training at PAU from 05-25 Feb*, 377-385.

Glass, G.V. (1976): Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educ Res* 5:3-8.

Gupta, P.K., S. Rustgi, 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.

Gupta, H.S., P.K. Agrawal, V. Mahajan, G.S. Bisht, A. Kumar (2009): Quality protein maize for nutritional security: Rapid development of short duration hybrids through molecular marker assisted breeding. *Curricul. Sci.* 96: 230-237.

Gupta, H.S., R. Babu, P.K. Agrawal, V. Mahajan, F. Hossain, N. Thirunavukkarasu (2013): Accelerated development of quality protein maize hybrid through marker-assisted introgression of *opaque-2* allele. *Plant Breed* 118: 77-82.

Hadživuković, S. (1991): *Statistički metodi*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Hagiwara, A., K. Miyashita, T. Nakanishi, M. Sano, S. Tamano, T. Kadota, T. Koda, M. Nakamura, K. Iamaida, N. Ito, T. Shirai (2001): Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16- phenylimidazol (4-5-b) pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Letters*. 171: 17-25.

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

Hartings, H., M. Maddaloni, N. Lazzaroni, N.D. Fonzo, M. Motto, F. Salamini, R. Thompson (1989): The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO Journal* 8: 2795-2801.

Hernandez, H.H., L.S. Bates (1969): A modified method for rapid tryptophan analysis in maize. *CIMMYT Research Bulletin no. 13*. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Herrero, M., A. Arbeloa (1989): Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *Am. J. Bot.* 76: 1441-1447.

Heslop-Harrison, J. (1975): Male gametophyte selection and the pollen stigma-interaction. In: Mulcahy, D. L. (ed.) *Gamete Competition in Plants and Animals*, North-Holland, Amsterdam, 177-190.

Holding, D.R., B.A. Larkins (2006): The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. *Maydica* 51: 243-254.

Holding, D.R., B.G. Hunter, T. Chung, B.C. Gibbon, C.F. Ford, A.K. Bharti, J. Messing, B.R. Hamaker, B.A. Larkins (2008): Genetic analysis of opaque2 modifier loci in quality protein maize. *Theor. Appl. Genet.* 117: 157-170.

Hospital, F., C. Chevalet, P. Mulsant (1992): Using markers in gene introgression programs. *Genetics* 132: 1199-1210.

Huang, S.S., D.E. Kruger, A. Frizzi, R.L. D'Ordine, C.A. Florida, W.R. Adams, W.E. Brown, M.H. Luethy (2005): High-lysine corn produced by the combination of enhanced lysine biosynthesis and reduced zein accumulation. *Plant Biotechnol J* 3: 555–569.

Huang, S, A. Frizzi, C.A. Florida, D.E. Kruger, M.H. Luethy (2006): High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Mol Biol* 61: 525–535.

Idikut, L., A.I. Atalay, S.N. Kara, A. Kamalak (2009): Effect of hybrid on starch, protein and yields of maize grain. *J. Anim. Vet. Adv.* 8:1945-1947.

Ignjatović-Micić, D., K. Marković, D. Ristić, S. Mladenovic Drinić, S. Stanković, V. Lazić-Jančić, M. Denić (2009): Variability analysis of normal and *opaque2* maize inbred lines. *Genetika* 41(1): 81-93.

Ignjatović-Micić, D., G. Stanković, K. Marković, S. Mladenović Drinić, V. Lazić-Jančić, M. Denić (2010): Kernel modifications and tryptophan content in QPM segregating generations. *Genetika*, 42(2): 267-278.

Ignjatović-Micić, D., M. Kostadinović, G. Stanković, K. Marković, J. Vančetović, S. Božinović, V. Anđelković (2013): Biochemical and agronomic performance of quality protein maize hybrids adapted to temperate regions. *Maydica* 58: 311-317.

Ignjatović-Micić, D., J. Vančetović, D. Trbović, Z. Dumanović, M. Kostadinović, S. Božinović (2015): Grain nutrient composition of maize (*Zea mays* L.) drought-tolerant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 1251-1260.

Jompuk, P., W. Wongyai, C. Jampatong, S. Apisitvanich (2006): Detection of quality protein maize (QPM) using simple sequence repeat (SSR) markers and analysis of tryptophan content. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)*, 40: 768-774.

Jompuk, C., P. Cheuchart, P. Jompuk, S. Apisitwanich (2011): Improved tryptophan content in maize with *opaque-2* gene using marker assisted selection (MAS) in backcross and selfing generations. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)*, 45: 666-674.

Jones, D. F. (1928): *Selective Fertilization*. University of Chicago Press, Chicago.

Kang, M., Q. Zhao, D. Zhu, J. Yu (2012): Characterization of microRNAs expression during maize seed development. *BMC Genomics* 13: 360.

Kemper, E.L., G. Cord Neto, F. Papes, K.C. Martinez Moraes, A. Leite, P. Arruda (1999): The role of *Opaque2* in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* 11: 1981-1993.

Kirihara, J.A., J.B. Petri, J. Messing (1988): Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. *Gene* 71:359.

Kostadinović, M., D. Ignjatović-Mičić, G. Stanković, J. Vancetović, D. Ristić, S. Mladenović Drinić (2014): Genetic and biochemical characterisation of parental inbred lines in marker assisted selection for quality protein maize. *Genetika* 46(2): 579-590.

Krivanek, A.F., H.D. Groote, N.S. Gunaratna, A.O. Diallo, D. Friesen (2007): Breeding and Disseminating Quality Protein Maize (QPM) for Africa. *African Journal of Biotechnology* 6: 312-324.

Kurilich, A.C., J.A. Juvik (1999): Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Food and Agric. Chem.* 47: 1948-1955.

Kutchan, T., R.A. Dixon (2005): Physiology and metabolism: Secondary metabolism: Nature's chemical reservoir under deconvolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 227-229.

Lago, C., M. Landoni, E. Cassani, E. Doria, E. Nielsen, R. Piloni, (2013): Study and characterization of a novel functional food: purple popcorn. *Mol Breeding* 31: 575-585.

Lago, C., M. Landoni, E. Cassani, S. Atanassiu, E. Cantaluppi, R. Pilu (2014): Development and characterization of a coloured sweet corn line as a new functional food. *Maydica* 59: 191-200.

Lands, W.E.M. (2005): Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1055: 179-192.

Larkins, B.A., C.R. Lending, J.C. Wallace, G. Galili, E.E. Kawata, K.B. Geetha, A.L. Kriz, D.N. Martin, C.E. Bracker (1989): Zein gene expression during maize endosperm development. In: *The Molecular Basis of Plant Development*. R. Goldberg, ed. Alan R. Liss: New York. 109-120.

Larson, S. (2002): *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*. R.J. Henry (ed.), CABI Publishing, Oxford. Book review. *Heredity* 88: 220.

Lee, E.A., W.F. Tracy (2009): Modern maize breeding. In: Bennetzen JL, Hake S (eds) *Maize handbook - Volume II: Genetics and genomics*, Springer Science and Business, New York: 142-160.

Legesse, B.W., A.A. Myburg, K.V. Pixley, A.M. Botha (2007): Genetic diversity of African inbred lines revealed by SSR markers. *Hereditas*, 144: 10-17.

Li, X.M., Y.L. Sang, X.Y. Zhao, X.S. Zhang (2013): High-throughput sequencing of small RNAs from pollen and silk and characterization of miRNAs as candidate factors involved in pollen-silk interactions in maize. *PLoS One* 8(8): e72852.

Liu, K., M. Goodman, S. Muse (2003): Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165: 2117-2128.

Liu, X., H. Sun, P. Wu, Y. Tian, D. Cui, C. Xu, S. Li, P. Li, H. Zhang, T. Chen, D. Li, X. Zhao, Y. Zhang, Y. Xue, H. Chen (2014): Fine mapping of the maize cross-incompatibility locus *Gametophytic factor 1 (gal)* using a homogeneous population. *Crop Science* 54(3): 873-881.

Lohmer, S., M. Maddaloni, M. Motto, N. Difonzo, H. Hartings, F. Salamini, R.D. Thompson (1991): The maize regulatory locus *Opaque-2* is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence. *Embo Journal* 10: 617-624.

Lopes, M. A., B.A. Larkins (1991): Gamma-zein content is related to endosperm modification in quality protein maize (QPM). *Crop Science* 31: 1655-1662.

Lopes, M. A., B.A. Larkins (1995): Genetic analysis of *opaque2 modifier* gene activity in maize endosperm. *Theoretical and Applied Genetics* 119(5): 274-281.

Lopes, M.A., K. Takasaki, D.E. Bostwick, T. Helentjaris, B.A. Larkins (1995): Identification of two *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics* 247(5): 603-13.

Lopez-Martinez, L.X., R.M. Oliart-Ros, G. Valerio-Alfaro, C.H. Lee, K.L. Parkin, H.S. Garcia (2009): Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Science and Technology*, 42: 1187–1192.

Ma, Y., O.E. Nelson (1975): Amino acid composition and storage proteins in two new high-lysine mutants in maize. *Cereal Chemistry* 52: 412-419.

Maddaloni, M., G. Donini, C. Balconi, E. Rizzi, P. Gallusci, F. Forlani, S. Lohmer, R. Thompson, F. Salamini, M. Motto (1996): The transcriptional activator *Opaque-2* controls the expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Molecular and General Genetics* 250: 647-654.

Mantel, N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

Maphosa, M., G. Oballim, A. Nalukenge, R. Edema, P. Okori (2011): Feasibility of zein proteins, simple sequence repeats and phenotypic traits for background selection in quality protein maize breeding. *African Crop Science Journal*, 19 (2): 65-78.

Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, G.J. Sanchez, E. Buckler, J. Doeblry (2002): A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 6080-6084.

Mbuya, K., K.K. Nkogolo, A. Kalonji-Mbuyi (2011): Nutritional analysis of quality protein maize varieties selected for agronomic characteristics in a breeding program. *Int J Plant Breed Genet*, 5: 317-327.

McWhirter, K. S., (1971): A floury endosperm, high lysine locus on chromosome 10. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 45: 184.

Mertz, E.T., L.S. Bates, O.E. Nelson (1964): *Science*, 145: 279-280.

Messmer, R., Y. Fracheboud, M. Banziger, M. Vargas, P. Stamp, 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.

Mladenović Drinić, S., M. Kostadinović, D. Ristić, M. Stevanović, Z. Čamdžija, M. Filipović, D. Kovačević (2012): Correlation of yield and heterosis of maize hybrids and their parental lines with genetic distance based on SSR markers. *Genetika*, 44(2): 399-408.

Morgante, M., M. Hanafey, W. Powell (2002): Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genet* 3: 194-200.

Mosisa, W. (2005): Genetic and crop-physiological basis of nitrogen efficiency in tropical maize: Field Studies, PhD Dissertation, University of Hannover, Hannover, Germany.

Mosisa, W., M. Bänziger, D. Friesen, G.S.A. Erley, O.D. Alpha, B. Vivek, W.J. Horst (2007): Protein quantity and quality, and grain yield performance of quality protein maize and normal endosperm maize under different levels of nitrogen. *Afr. Crop Sci. Conf. Proceed.* 8: 1905-1909.

Mosisa, W., M. Banziger, D. Friesen, G. Schulte auf m Erley, W.J. Horst, B.S. Vivek (2008): Relative importance of general combining ability and specific combining ability among tropical maize (*Zea mays* L.) inbreds under contrasting nitrogen environments. *Maydica* 53: 279-288.

Motto, M., M. Maddaloni, G. Ponziani, M. Brembilla, R. Marotta, N. di Fonzo, C. Soave, R. Thompson, F. Salamini (1988): Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea Mays* using transposon marking. *Mol Gen Genet* 212: 488-494.

Mulcahy, D.L., (1971): A correlation between gametophytic and sporophytic characteristics in *Zea mays* L. *Science*, 171: 1155—1156.

Muthusamy, V., F. Hossain, N. Thirunavukkarasu, M. Choudhary, S. Saha, J.S. Bhat, M.B. Prassana, H.S. Gupta (2014): Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of *β -carotene hydroxylase* allele. *PLoS ONE* 9(12): e113583. doi:10.1371/journal.pone.0113583.

Nelson, O. (1952): Non reciprocal cross sterility in maize. *Genetics* 37:101-124.

Nelson, O. E., E. T. Mertz, L. S. Bates (1965): Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150: 1469–1470.

Nelson, O.E. (1994): The Gametophyte Factors of Maize. In: Freeling, M. Walbot, V. (eds) *The Maize Handbook*, 496-502. Springer, New York.

Nurit, E., A. Tiessen, K. Pixley, N. Palacios-Rojas (2009): Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7233-7238.

Ortega, E.I., L.S., Bates (1983): Biochemical and agronomic studies of 2 modified hard-endosperm opaque-2 maize (*Zea mays* L) populations. *Cereal Chem.* 60: 107–111.

Ortiz, R., S. Taba, V.H. Chávez Tovar, M. Mezzalama, Y. Xu, J. Yan, J.H. Crouch (2010): Conserving and enhancing maize genetic resources as global public goods – a perspective from CIMMYT. *Crop Sci.* 50: 13–28.

Ostlund Jr, R. E., S.B. Racette, A. Okeke, W.F. Stenson (2002): Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75: 1000-1004.

Ottaviano, E., M. Sari-Gorla (1979): Genetic variability of male gametophyte in maize. Pollen genotype and pollen-style interaction. In: Israeli-Italian Joint Meeting. *Genetics and Breeding in Crop Plants. Monographs in Genetic Agraria IV Rome*: 89-106.

Ottaviano, E., M. Sari-Gorla, D.L. Mulcahy (1980): Pollen tube growth rates in *Zea mays*: implications for genetic improvement of crops. *Science* 210: 437-438.

Ottaviano, E., M. Sari-Gorla, I. Arenari (1983): Male gametophyte competitive ability in maize. Selection and implications with regard to the breeding system. In: Mulcahy, D.L. and Ottaviano, E. (eds) *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*, Elsevier, New York: 367-373.

Ottaviano, E., M. Sari-Gorla, M. Villa (1988): Pollen competitive ability in maize: within population variability and response to selection. *Theor. Appl. Genet.* 76: 601-608.

Paez, A.V., J.L. Helm, M.S. Zuber (1969): Lysine content of opaque2 maize kernels having different phenotypes. *Crop Sci.* 29: 251-252.

Peng, T., H. Sun, Y. Du, J. Zhang, J. Li, et al. (2013): Characterization and expression patterns of microRNAs involved in rice grain filling. *PLoS One* 8: e54148.

Pfahler, P.L., (1967): Fertilization ability of maize pollen grains. II Pollen genotype, female sporophyte and pollen storage interaction. *Genetics*, 57: 513-521.

Pixley, K.V., M.S. Bjarnason (2002): Stability of grain yield, endosperm modification, and protein quality of hybrid and open-pollinated quality protein maize (QPM) cultivars. *Crop Sci.* 42: 1882-1890.

Prakash, O., P. Shanti, E. Satyanarayana, R.S. Kumar (2006): Studies on inter relationship and path analysis for yield improvement in sweet corn (*Zea mays* L.). *New Bot.* 33: 91-98.

Prassana, B.M., S.K. Vasal, B. Kassahun, N.N. Singh, (2001): Quality protein maize. *Curr. Sci.* 81(10): 1308-1319.

Qin, Y., A.R. Leydon, A. Manziello, R. Pandey, D. Mount et al. (2009): Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet* 5: e1000621.

Radić, D. (1872): Sve o kukuruzu. Društvo za poljsku privredu, Beograd

Rasco'n-Cruz, Q., S. Sinagawa-Garci'a, J.A. Osuna-Castro, N. Bohorova, O. Paredes-Lo'pez (2004): Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theor. Appl.Genet.* 108: 335-342.

Reddy, Y.R., D. Ravi, C.R. Reddy, K.V.S.V. Prasad, P.H. Zaidi, M.T. Vinayan, M. Blummel (2013): A note on the correlations between maize grain and maize stover quantitative and qualitative traits and the implications for whole maize plant optimisation. *Field Crops Research* 153: 63-69.

Ribaut, J.M., D.A. Hoisington (1998): Marker assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3: 236-239.

Rohlf, F.J. (2000): NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1. Owner's manual.

Rogers, S.O., A.J. Bendich (1988): Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual A6*: 1-10.

Rong, J., F.A. Feltus, V.N. Waghmare, G.J. Pierce, P.W. Chee, X. Draye, Y. Saranga, R.J. Wright, T.A. Wilkins, O.L. May, C.W. Smith, J.R. Gannaway, J.F. Wendel, A.H. Paterson (2007): Meta-analysis of polyploidy cotton QTL shows unequal contributions of subgenomes to a complex network of genes and gene clusters implicated in lint fiber development. *Genetics* 176: 2577–2588.

Rosengrant, M., C. Ringler, S. Msangi, T. Sulser, T. Zhu, S. Cline (2008): International Model for Policy Analysis of Agricultural Commodities and Trade (IMPACT): Model Description, International Food Research Institute: Washington, D.C.

Sang, Y.L., M. Xu, F.F. Ma, H. Chen, X.H. Xu et al. (2012): Comparative proteomic analysis reveals similar and distinct features of proteins in dry and wet stigmas. *Proteomics* 12: 1983–1998.

Sari-Gorla, M., R. Bellintani, E. Ottaviano (1976): Competitive ability of maize pollen. Interaction between genotypes of pollen and stylar tissues. *Maydica*, 21: 77-88.

Sari-Gorla, M., E. Rovida (1980): Competitive ability of maize pollen. Intergametophytic effects. *Theor. Appl. Genet.* 57: 37-41.

Sari-Gorla, M., G. Binelli, M.E. Pe, M. Villa (1995): Detection of genetic factors controlling pollen-style interaction in maize. *Heredity* 74: 62-69.

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

Schmidt, R.J., F.A. Burr, B. Burr (1987): Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. *Science* 238(4829): 960-963.

Schmidt, R.J., F.A. Burr, M.J. Aukerman, B. Burr (1990): Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a "leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 46-50.

Schmidt, R.J., M. Ketudat, M.J. Aukerman, G. Hoschek (1992): Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 4: 689-700.

Schnable, P.S., D. Ware, R.S. Fulton i sar. (2009): The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326 (5956): 1112-1115.

Segal, G., R.T. Song, J. Messing (2003): A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics* 165: 387-397.

Selvaraj, C.I., P. Nagarajan (2011): Interrelationship and path-coefficient studies for qualitative traits, grain yield and other yield attributes among maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5 (3): 209-223.

Senior, M.L., J.P. Murphy, M.M. Goodman, C.W. Stuber (1998): Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci* 38: 1088-1098.

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, M.G.K. Jones (2001): Validation of molecular markers for wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1357–1366.

Shewry, P.R. (2007): Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science* 46: 239-250

Shewry., P.R., N.G. Halford (2002): Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53 (370): 947-958.

Shi, J., H. Wang, Y. Wu, J. Hazebroek, R.B. Meeley, D.S. Ertl (2003): The maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* 131: 507-515.

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.

Smith, D.N., M.E. Devey (1994): Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome* 37: 977–983.

Smith, J.S.C., E.C.L Chin., H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E Mitchell., S. Kresovich, J. Ziegler (1997): An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet* 95: 163–173.

Sneath, P.H.A., R.R. Sokal (1973): *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Sofi, P.A., S.A. Wani, A.G. Rather, S.H. Wani (2009): Review article: Quality protein maize (QPM): genetic manipulation for the nutritional fortification of maize. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 1(6): 244-253.

Song, R., G. Segal, J. Messing (2004): Expression of the sorghum 10-kDa member kafirin gene cluster in maize endosperm. *Nuc. Acid. Res.*32(22): e189 doi:10.1093/nar/gnh183

Sunnucks, P. (2000): Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 199-203.

Takayama, S., A. Isogai (2005): Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56: 467-489.

Tamilkumar, P., N. Senthil, S. Sureshkumar, A.U. Thangavelu, P. Nagarajan, S. Vellaikumar, K.N. Ganesan, N. Natarajan, R. Balagopal, T. Nepolean, M. Raveendran (2014): Introgression of low phytic acid locus (*lpa2-2*) into an elite Maize (*Zea mays* L.) inbred through marker assisted backcross breeding. *Australian Journal of Crop Science* 8(8): 1224-1231.

Tanksley, S.D. (1983): Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1: 3-8.

Temple, N.J. (2000): Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research* 20: 449-459.

Tenaillon, M.I., M.C. Sawkins, A.D. Long, R.L. Gaut, J.F. Doebley, B.S. Gaut (2001): Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9161–9166.

Tengan, K.M.L. (2010): Conversion of Okomasa-a normal open pollinated maize variety to quality protein maize using the backcross breeding approach, MSc Thesis, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi.

Thompson, G.A., B.A. Larkins (1989): Structural elements regulating zein gene expression. BioEssays 10: 108.

Torrent, M., I. Alvarez, M.I. Geli, I. Dalcol, D. Ludevid (1997): Lysine-rich mediated zeins accumulate in protein bodies of transiently transformed maize endosperms. Plant Mol. Biol. 34: 139-149.

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

Trifunović, V. (1978): Maize production and maize breeding in Europe. in: Walden D.B. (ur.) Maize Breeding and Genetics, New York: Wiley: 41-57.

Vasal, S.K. (2000): The quality protein maize story. Food Nutr. Bull. 21: 445–450.

Vasal, S.K. (2001): High quality protein corn. In: Hallauer AR (ed) specialty corns. CRC Press, New York, 85-129.

Villegas, E., S.K. Vasal, M. Bjarnason (1992): Quality protein maize - what is it and how was it developed. In: E.T. Mertz (Ed.), Quality protein maize. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN: 27-48.

Vivek, B.S., A.F. Krivanek, N. Palacios-Rojas, S. Twumasi-Afriyie, A.O. Diallo (2008): Breeding Quality Protein Maize (QPM): Protocols for Developing QPM Cultivars. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Vosman, B., P. Arens, W. Rus-Kortekaas, M.J.M. Smulders (1992): Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 85: 239-244.

Vroh Bi, I., M.D. McMullen, H.S. Villeda, S. Schroeder, J. Gardiner, M. Polacco, C. Soderlund, R. Wing, Z. Fang, E.H. Coe (2006): Singlenucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Sci* 46: 12–21.

Vučić, N. (1976): Navodnjavanja poljoprivrednih kultura. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Wallace, J.C., G. Galili, E.E. Kawata, R.E. Cuellar, B.A. Shotwell, B.A. Larkins (1988): Aggregation of lysine-containing zeins into protein bodies in *Xenopus* oocytes. *Science* 240: 662–664.

Wallace, J.C., M.A. Lopes, E. Paiva, B.A. Larkins (1990): New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-Zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiology* 92(1): 191-196.

Wang, X., B.A. Larkins (2001): Genetic analysis of amino acid accumulation in *opaque-2* maize endosperm. *Plant Physiol.* 125: 1766—1777.

Wang, Y., Y. Ji, Z. Zhang, Y. Zheng (2006): The comparative analysis based on maize integrated QTL map and metaanalysis of plant height QTLs. *Chin Sci Bull* 51: 2219–2230.

Warburton, M.L., X. Zianchun, J. Crossa, J. Franco, A.E. Melchinger, M. Frisch, M. Bohn, D. Hoisington (2002): Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Sci*, 42: 1832-1840.

Watson, S. A. (2003): Description, development, structure and composition of the corn kernel. In *Corn: Chemistry and Technology*, 2nd ed.; White, J., Johnson, L., Eds.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN: 69–101.

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

Welch, R.M., R.D. Graham (2004): Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55: 353-364.

Wu, R.L., X.Y. Lou, C.X. Ma, X.L. Wang, B.A. Larkins, G. Casella (2002): An improved genetic model generates high-resolution mapping of QTL for protein quality in maize endosperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11281-11286.

Xu, Y., D.J. Skinner, H. Wu, N. Palacios-Rojas, J.L. Araus, J. Yan, S. Gao, M.L. Warburton, J.H. Crouch (2009): Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. *International Journal of Plant Genomics* 2009: Article ID 957602 (doi:10.1155/2009/957602).

Xu, X.H., H. Chen, Y.L. Sang, F. Wang, J.P. Ma et al. (2012): Identification of genes specifically or preferentially expressed in maize silk reveals similarity and diversity in transcript abundance of different dry stigmas. *BMC Genomics* 13: 294.

Yang, J., X. Liu, B. Xu, N. Zhao, X. Yang et al. (2013): Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *brassica juncea*. *BMC Genomics* 14: 9.

Young, H. (1992): Environmental effects on pollen characters and paternity. In: Ottaviano, E., Mulcahy, D. L. and Sari- Gorla, M. (eds) *Angiosperm Pollen and Ovules. Basic and Applied Aspects*. Springer-Verlag, Berlin.

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

Yu, J., P. Peng, X. Zhang, Q. Zhao, D. Zhy, X. Sun, J. Liu, G. Ao (2004): Seed-specific expression of a lysine rich protein *sb401* genesignificantly increases both lysine and total protein content in maizeseeds. *Mol. Breed.* 14: 1-7.

Zaidi, P.H., S.K. Vasal, P. Maniselvan, G.C. Jha, K. Mehrajjudin, R.P. Singh, (2008): Stability in performance of quality protein maize under abiotic stress. *Maydica* 53: 249-260.

Zhang, W.L., W.P. Yang, Z.W. Chen, M.C. Wang, L.Q. Yang, Y.L. Cai (2010): Molecular marker-assisted selection for *o2* introgression lines with *o16* gene in corn. *Acta Agronomica Sinica* 36(8): 1302-1309.

Zhang, X, W.H. Pfeiffer, N. Palacios-Rojas, R. Babu, H. Bouis, J. Wang (2012): Probability of success of breeding strategies for improving pro-vitamin A content in maize. *Theor Appl Genet.* 125: 235-246.

Žilić, S., D. Dodig, M. Milašinović Šeremešić, V. Kandić, M. Kostadinović, S. Prodanović, Đ. Savić (2011): Small grain cereals compared for dietary fibre and protein content. *Genetika* 43(2): 381-395.

BIOGRAFIJA

Marija Kostadinović je rođena 25.05.1980. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 2008. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 8,74. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Genetika, upisala je 2010. godine, a ispite predviđene programom za doktorske studije je položila sa prosečnom ocenom 9,8. U Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ (Laboratorija za biotehnologiju) počinje volonterski rad 2009. godine. Od 2011. godine angažovana je na projektu „Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim metodama“ finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS kao mlađi istraživač, a od 2012. godine kao istraživač saradnik u Laboratoriji za biotehnologiju. Osnovnu istraživačku aktivnost razvija u oblasti molekularne genetike biljaka koja se odnosi na proučavanje strukture i funkcije genoma kukuruza. Primarno se bavi selekcijom kukuruza na poboljšanje kvaliteta proteina upotrebom molekularnih markera, kao i genetičkom karakterizacijom linija, hibrida i populacija kukuruza banke gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ i biohemijskim ispitivanjem kvaliteta zrna. Uključena je i u utvrđivanje divergentnosti različitih vrsta šumskog drveća pomoću molekularnih markera, kao i u karakterizaciju korovskih biljnih vrsta. Član je Društva genetičara Srbije i Društva selekcionara i semenara Srbije. Rezultate svojih istraživanja objavila je u 12 naučnih radova publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima, kao i u 24 naučnih saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Костадиновић

број уписа Б3025/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Селекција линија кукуруза са побољшаним квалитетом протеина и адаптираних на умерено климатско подручје употребом молекуларних маркера“

- 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, 16.09.2015.

M. Kostadinović

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Костадиновић

Број уписа Б3025/2010

Студијски програм Генетика

Наслов рада „Селекција линија кукуруза са побољшаним квалитетом протеина и адаптираних на умерено климатско подручје употребом молекуларних маркера“

Ментори

др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

др Драгана Игњатовић-Мицић, научни саветник, Институт за кукуруз „Земун Поље“

Потписани Марија Костадиновић

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, 16.09.2015.

Марија Костадиновић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Селекција линија кукуруза са побољшаним квалитетом протеина и адаптираних на умерено климатско подручје употребом молекуларних маркера“

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, _____ 16.09.2015. _____

M. Stadinović

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.