

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana S. Brbaklić

**MOLEKULARNA I ASOCIJATIVNA ANALIZA
SVOJSTAVA KLASA PŠENICE
(*Triticum aestivum* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana S. Brbaklić

**MOLECULAR AND ASSOCIATION ANALYSIS OF
SPIKE - RELATED TRAITS IN WHEAT
(*Triticum aestivum* L.)**

doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

MENTORI:

Dr Svetlana Radović, redovni profesor, Biološki fakultet
Univerziteta u Beogradu

Dr Ankica Kondić-Špika, naučni savetnik, Institut za
ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Vesna Maksimović, naučni savetnik, Institut za
molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta
u Beogradu

Datum odbrane: _____

Veliku zahvalnost dugujem...

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za strna žita i Odeljenju za biotehnologiju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu kao deo projekta pod nazivom "*Savremeno oplemenjivanje za sadašnje i buduće potrebe*" (TR31066) čiji rukovodilac je **dr Nikola Hristov**, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

Veliku zahvalnost, pre svega dugujem **prof. dr Borislavu Kobiljskom**, mom prvom mentoru i idejnom tvorcu ove doktorske disertacije. Njegovo iskustvo i znanje, kao i podrška, brojne sugestije i kritike su i dalje veliki podstrek i motivacija u mom naučnom stvaralaštvu. Zahvaljujem se, pre svega na stalnoj težnji da stremim ka boljem, na velikoj pomoći ne samo kao naučnika već i kao čoveka tokom svih ovih godina.

Veliku zahvalnost dugujem i **dr Ankici Kondić-Špika** na ukazanom poverenju i savetima tokom celokupnog zajedničkog rada kao i tokom doktorskih studija i izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Svetlani Radović** na stručnim savetima i svesrdnoj pomoći tokom nastajanja ove doktorske teze.

Neizmernu zahvalnost dugujem i kolegici **Dragani Trkulji** na prvim naučnim koracima i nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu i iskustvu koje je podelila samnom. Na sugestijama, savetima, prijateljskoj pomoći i razumevanju tokom dugogodišnjeg zajedničkog uspešnog rada.

Neizmernu zahvalnost dugujem i **Sanji Mikić** i **Marini Tomičić** koje su svojom podrškom, svesrdnom pomoći, strpljenjem, pozitivnom energijom i prijatnom atmosferom omogućile savladavanje svih koraka tokom doktorskih studija i velikoj podršci tokom pisanja i objavljivanja naučnih radova i same doktorske teze

Veliko hvala i **Ljiljani Dragoljević** na velikoj pomoći i podršci u eksperimentalnom radu.

Na kraju, veliko hvala i mojoj porodici mama **Jeleni**, tata **Svetislavu**, bratu **Branislavu**, **Jasmini**, **Inki** i **Kati** i mojim prijateljima na strpljenju i velikom razumevanju.

MOLEKULARNA I ASOCIJATIVNA ANALIZA SVOJSTAVA KLASA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.)

Rezime

Uvod: Hlebna pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedna od najvažnijih žitarica široko zastupljena u proizvodnji u svetu, odnosno po ukupnoj proizvodnji zrna nalazi se na trećem mestu iza kukuruza i pirinča. Zahvaljujući značaju ove biljne vrste posebno u ljudskoj ishrani, prioritet u selekciji je usmeren na poboljšanje postojećih i stvaranje novih sorti sa povećanim genetičkim potencijalom za prinos, kako bi se zadovoljile i obezbedile kvantitativne potrebe za ovom žitaricom. Razvoj savremenih metoda i primena najnovijih tehnologija iz oblasti biotehnologije, sa posebnim akcentom na korišćenje molekularnih markera, otvorila je mogućnost implementacije molekularnog oplemenjivanja u klasične oplemenjivačke programe. Na ovaj način se putem marker-asistirane selekcije ostvaruje efikasnije, preciznije i ekonomičnije stvaranje prinosnijih sorti. Najvažnije agronomске osobine nalaze se pod kontrolom većeg broja gena i lokusa za kvantitativna svojstva (QTL), te su i osobine klasa koje predstavljaju najvažnije komponente prinosa, svojstva koja se nalaze pod većim uticajem faktora spoljašnje sredine. Danas se za otkrivanje i precizno definisanje hromozomskih regiona odgovornih za ekspresiju ovih važnih osobina primenjuje jedan od najperspektivnijih pristupa tzv. asocijativno mapiranje koje visokom rezolucijom mapiranja olakšava primenu marker-asistirane selekcije.

Cilj istraživanja je bio da se utvrde osnovni parametri genetičke varijabilnosti primenom mikrosatelita, da se proceni genetička struktura u ispitivanoj populaciji na osnovu molekularnih podataka, da se analiziraju svojstva klasa kao najznačajnijih komponenti prinosa pšenice kao i adaptivnih svojstava tokom pet vegetacionih sezona. Takođe, postavljen je i cilj da se ispita neravnoteža vezanosti između hromozoma, i da se analiziraju veze između markera i svojstava u svim ispitivanim godinama primenom najsavremenijeg pristupa - asocijativnog mapiranja. Krajnji cilj bio je da se identifikuju značajni i stabilni lokusi odgovorni za ekspresiju pojedinačnih karakteristika klasa i

svojstava adaptabilnosti i da se utvrde poželjni aleli u okviru lokusa koji su imali najveći uticaj na fenotipsku varijabilnost ispitivanih osobina. Na ovaj način bi bilo moguće odabrati genotipove koji su nosioci poželjnih alela za pojedine karakteristike klasa, koji bi mogli da posluže kao roditelji u narednim ukrštanjima, a u cilju poboljšanja postojećih genotipova ili stvaranja novih sorti pšenice sa željenim osobinama klasa.

Materijal i metode: Molekularnom analizom je obuhvaćeno 283 genotipa pšenice odabranih na osnovu višegodišnje fenotipske ocene velikog broja agronomski važnih svojstava koja su ukazala na prisustvo značajnog stepena varijabilnosti. Ovaj materijal je reprezentativni deo genetičke kolekcije pšenice koji pripada Odeljenju za strna žita Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Genotipovi su nastali u različitim oplemenjivačkim centrima i poreklom su iz 24 zemlje sa svih pet kontinenata. Od 41 mikrosatelitskog markera, 30 je pokazalo efikasnost i značajan stepen polimorfности čime su iskorišćeni za analizu svih genotipova primenom fragmentne analize na genetičkom sekvenatoru Genetic Analyzer 3130. Fenotipskom ocenom je obuhvaćeno ukupno 10 osobina (8 svojstava klasa i 2 adaptivne osobine) koje su merene i beležene tokom pet vegetacionih sezona (1994/95., 1995/96., 1996/97., 1997/98., 1998/99.). Obrada statističkih podataka je vršena u sledećim programima: PowerMarker, Excel Mikrosatellite Kit, GenAEx, Structure, Tassel i Statistica.

Rezultati: Fenotipskom evaluacijom ispitivanih osobina utvrđena je značajna varijabilnost u ispitivanom materijalu. U 30 mikrosatelitskih lokusa svih genotipova zabeleženo je ukupno 349 alelnih varijanti sa prosečnim brojem od 11,5 alela po lokusu i prosečnom PIC vrednošću od 0,68. Procenjena struktura populacije u programu STRUCTURE je pokazala distribuciju genotipova unutar šest subpopulacija na osnovu vrednosti verovatnoće, dok je ΔK metod grupisao genotipove unutar tri postojeća klastera. Slična distribucija genotipova dobijena je i primenom analize glavnih koordinata (PCoA). Asocijativna analiza je pokazala da je 8 osobina (izuzev mase klasa i mase zrna po klasu) pokazalo stabilne veze sa dvanaest markera u tri i više ispitivanih godina. Detektovano je prisustvo trideset i tri stabilna QTL za svojstva klasa i adaptivna svojstva, sa prosečnim uticajem na fenotipsku varijabilnost koja se kretala od 4,7% do 40,7% u zavisnosti od datog svojstva. Ovi značajni QTL locirani su na sledećim hromozomima: 1B, 2A, 2B, 2D, 5B, 6A, s tim da su dominirali markeri sa druge

hromozomske grupe. Izdvojeni su i poželjni aleli u stabilnim QTL, gde se izdvajaju QTL za broj klasića po klasu i broj zrna po klasu, kao najvažnije komponente klase. Tako su genotipovi koji su nosioci poželjnih alela za pojedina svojstva izabrani putem marker-asistirane selekcije, kao roditelji za naredna ukrštanja u toku oplemenjivačkog procesa.

Zaključak: 1. Polimorfni mikrosatelitski markeri su se pokazali informativni i značajni u utvrđivanju genetičke varijabilnosti u oplemenjivačkom materijalu pšenice. 2. Procenjen je i odgovarajući stepen prisustva genetičke strukture u populaciji kao preduslov asocijativne analize. 3. Potvrđena je i značajna fenotipska varijabilnost ispitivanih osobina klase i adaptivnih osobina. 4. Utvrđeno prisustvo interhromozomskog LD je posledica rekombinacija i/ili epistatičkih interakcija nastalih tokom selekcije. 5. Primenom i komparacijom različitih modela asocijativne analize (GLM i MLM) pri utvrđivanju značajnih i stabilnih veza marker-svojstvo smanjena je mogućnost detekcije lažno-pozitivnih veza. 6. Većina otkrivenih QTL je detektovana u prethodnim istraživanjima na različitim mapirajućim populacijama, a sada je njihov značaj potvrđen i na relevantnom oplemenjivačkom materijalu i u našim agro-ekološkim uslovima. Pored ranije poznatih, detektovano je i nekoliko novih QTL. 7. Izdvojeno je nekoliko genotipova koji su za pojedine osobine imali po nekoliko poželjnih alela u okviru dva i više lokusa.

Ova disertacija predstavlja doprinos na polju molekularnog oplemenjivanja koje bi zajedno sa klasičnim metodama oplemenjivanja omogućilo stvaranje genotipova sa poboljšanim karakteristikama klase čime bi se indirektnim putem postiglo povećanje genetičkog potencijala za prinos.

Ključne reči: mikrosatelitski markeri, hlebna pšenica, genetički diverzitet, lokusi za kvantitativna svojstva - QTL, komponente prinosa, karakteristike klase, adaptabilne osobine, GLM i MLM pristupi.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Genetika i oplemenjivanje

UDK broj:

MOLECULAR AND ASSOCIATION ANALYSIS OF SPIKE - RELATED TRAITS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Summary

Introduction: Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important cereals worldwide and in terms of total grain production wheat is positioned on third place after maize and rice. Due to a great importance for human diet, the priority in wheat breeding is focused on improving of existing and creating new varieties with increased genetic yield potential, in order to meet quantitative demands for this grain. The development of modern methods and the use of new technologies in the field of biotechnology, with particular emphasis on the use of molecular markers, opened the possibility of implementing molecular breeding in classical breeding programs. In this way, the creation of high yielding varieties is more efficient, accurate and cost-effective. The most important agronomic traits are controlled by a large number of genes and quantitative trait loci (QTL). As the most important yield components, spike-related traits are under strong influence of numerous environmental factors. In the last few years, association mapping has been considered as one of the most promising methods for the exploration of precise detection chromosome regions responsible for the expression of these important traits. This high resolution perspective approach facilitates the application of marker-assisted selection into breeding process.

The aim of this study was to determine the basic parameters of genetic variability by using microsatellites, to assess the genetic structure in the population based on molecular data, to analyze the spike characteristics as the most important yield components and the adaptability traits during five growing seasons. Moreover, linkage disequilibrium, and the associations between SSR markers and traits investigated were examined by use of association mapping. Furthermost, the aim was to identify significant and stable loci responsible for expression of spike-related and adaptability characteristics, to identify desirable alleles within loci that have had the greatest impact

on the phenotypic variability. Genotypes which are carriers of favorable alleles for each spike characteristics could serve as parents in future crosses, in order to improve the existing genotypes in terms of specific spike characteristics.

Materials and Methods: Molecular analysis included 283 wheat genotypes were selected upon results of multi-year phenotypic assessment of a large number of agronomical important traits which indicated the presence of a significant degree of variability. This material is a representative part of the genetic collection of wheat which belongs to the Small Grains Department of Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad. Genotypes were created in different breeding centers, originating from 24 countries spread on all five continents. Of the 41 microsatellite markers, 30 showed efficiency and a significant degree of polymorphism so they were used for analysis of all genotypes by using fragment analysis on Genetic Analyzer 3130. A total of 10 properties (8 spike characteristics and 2 adaptability traits) were evaluated, measured and recorded during five growing seasons (1994/95, 1995/96, 1996/97, 1997/98, 1998/99.). Statistical data processing was performed by the following programs: PowerMarker, Excel Mikrosatellite Kit, Genalex, Structure, Tassel and Statistica.

Results: The phenotypic evaluation of the studied traits showed significant variability in the breeding material. A set of 30 microsatellite markers positioned near important agronomic loci were used to evaluate genetic diversity, resulting in a total of 349 allelic variants in all genotypes with an average number of 11.5 alleles per locus and an average PIC value of 0.68. The population structure estimated by model-based clustering distributed the genotypes into six subpopulations according to log probability of data, whereas Evanno's ΔK method grouped genotypes within three existing clusters. Moreover, internal genetic structure using principal coordinates (PCoA) analyze separated genotypes in a similar distribution as obtained by program Structure. Association analysis showed that 8 traits investigated (except spike weight and grain weight per spike) had a stable associations with 12 markers in three or more years. A total number of 33 stable QTLs were detected for all traits investigated, with an average effect on the phenotypic variation ranged from 4.7% to 40.7% depending on certain traits. A significant QTLs were located on following chromosomes: 1B, 2A, 2B, 2D, 5B, 6A with a major concentration of the markers on chromosome group 2. Likewise, desirable alleles were determined in stable QTLs, with emphasis on QTLs for number of

spikelets per spike and number of grains per spike, as the most important yield components. Thus genotypes that possess favorable alleles responsible for certain traits could be selected through marker-assisted selection, as parents for the next crossing during the breeding process.

Conclusion: 1. The polymorphic microsatellites proved to be informative and relevant markers in determination of the genetic diversity in wheat breeding materials. 2. The evaluated collection of wheat genotypes shows genetic diversity, and population structure is an important tool and prerequisite for association analysis. 3. In addition to molecular and phenotypic evaluation of the traits investigated have shown and confirmed significant level of variability in breeding material. 4. The presence of inter-chromosomal LD is a consequence of recombination and/or epistatic interactions occurred during the selection. 5. The different statistical models (GLM and MLM) evaluated increase the accuracy and power of the associations. 6. The new chromosome regions identified as responsible for spike-related traits are useful for wheat breeding programs in our agro-ecological conditions. 7. The genotypes which are carriers of favorable alleles for particular traits are highlighted and could be useful for further breeding program.

This thesis is a contribution to the field of molecular breeding, and implemented with the conventional breeding methods could create genotypes with improved spike characteristics and consequently increase of wheat yield potential.

Key words: microsatellite markers, bread wheat, genetic diversity, quantitative trait loci - QTL, yield components, spike characteristics, adaptability traits, GLM and MLM approaches.

Scientific field: Biotechnical Sciences

Special topic: Genetics and Breeding

UDC number:

Skraćenice

AFLP (*engl. Amplified Fragment Length Polymorphism*)

AMOVA (*engl. Analysis of Molecular Variance*) - analiza molekularne varijanse

AM (*engl. Association Mapping*) - asocijativno mapiranje

BARC - Beltsville Agricultural Research Center

bp (*engl. base pair*) - bazni par

CTAB - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DArT (*engl. Diversity Arrays Technology*)

dNTP (*engl. deoxyribonucleotide triphosphates*) deoksiribonukleozidtrifosfat

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

EMMA (*engl. Efficient Massive Mapping Algorithm*)

EST - SSR (*engl. Expressed Sequence Tag - Simple Sequence Repeat*)

Eps (*engl. Earliness per se*) geni - geni odgovorni za ranostasnost

GLM (*engl. General Linear Model*) - opšti linearni model

GWAS (*engl. Genome Wide Association Study*) studija asocijacije na čitavom genomu

GWM - IPK - Gatersleben Wheat Microsatellite - Institut fuer PflanzenKultur

H3K27me3 – trimetilacija lizina na poziciji 27 histona H3

H3 - histon 3

Hi-Di formamide - (*engl. high deionized formamide*) - visoko dejonizovani formamid

HMW - GS (*engl. High Molecular Weight Glutenin Subunits*) - gluteninske jedinice velike molekulske mase

ISBP markera (*engl. Insertion Site Based Polymorphism*)

kb (*engl. kilo base*) - kilo baza

LD (*engl. Linkage Disequilibrium*) - neravnoteža vezanosti

LMW - GS (*engl. Low Molecular Weight Glutenin Subunits*) - gluteninske jedinice male molekulske mase

MAS (*engl. Marker-Assisted Selection*) - marker asistirana selekcija

Mb (*engl. mega base*) - mega baza

MCMC (*engl. Markov Chain Monte Carlo*)

MLM (*engl. Mixed Linear Model*) - mešoviti linearni model

NJ (*engl. Neighbor Joining*) metod - zasnovan na distancama sa neukorenjenim stablom

QTL (*engl. Quantitative Trait Loci*) - lokusi za kvantitativna svojstva

RNK - ribonukleinska kiselina

PCoA (*engl. Principal Coordinates Analysis*) - analiza osnovnih koordinata

PCR (*engl. Polymerase Chain Reaction*) - lančana reakcija polimeraze

POP-4 (*engl. Performance Optimized Polymer-4*) - polimer za fragmentnu analizu

PIC (*engl. Polymorphism Information Content*)

Ppd (*engl. Photoperiod or day length*) geni - geni odgovorni za fotoperiod

Prefiksi mikrosatelita:

BARC - R. Ward

CFD i CFA - INRA Clermont-Ferrand

GWM i GDM - IPK Gatersleben

PSP - the John Innes Centre

WMC - the Wheat Microsatellite Consortium

SNP (*engl. Single Nucleotide Polymorphism*) - polimorfizam pojedinačnih nukleotida ili tačkasta polimorfnost

SPL (*engl. Squamosa promoter binding Protein-Like*)

SSR (*engl. Simple Sequence Repeat*) - mikrosateliti

TASSEL - Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage

TE (*engl. Transposable Elements*) - transpozabilni elementi

TE pufer - 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA

UTR (*engl. UnTranslated Region*) - netranslatirajući region

UV - ultraljubičasta svetlost

UPGMA (*engl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*)

Vrn (*engl. Vernalization genes*) geni - geni odgovorni za vernalizaciju

WMC - Wheat Microsatellite Consortium

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Proizvodnja pšenice u svetu i kod nas	2
1.2. Evolucija i poreklo heksaploidnog genoma pšenice	4
1.2.1. O sekvencama A genoma	6
1.2.2. O sekvencama D genoma	6
1.3. Genom hlebne pšenice	7
1.4. Mikrosateliti	9
1.4.1. Primena mikrosatelita	11
1.4.2. Mikrosateliti pšenice i mape	12
1.5. Linkidž diseqvilibrijum (LD) i asocijativno mapiranje	13
1.5.1. Prednosti i nedostaci asocijativnog mapiranja	15
1.5.2. Asocijativno mapiranje na pšenici	16
1.6. Prinos i osobine klasa pšenice	17
1.7. Adaptabilne osobine	19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	24
3. MATERIJAL I METODI	26
3.1. Materijal i fenotipska ocena	27
3.2. Molekularna analiza	28
3.2.1. Ekstrakcija genomske DNK	31
3.2.2. Kvantifikacija DNK izolata	31
3.2.3. Umnožavanje mikrosatelitskih lokusa	32
3.2.4. Analiza fragmenata	34
3.3. Statistička obrada	34
3.3.1. Genetički diverzitet	34
3.3.2. Fenotipski podaci	35
3.3.3. Struktura populacije	35
3.3.4. Analize u programu TASSEL v.2.1.	37
3.3.4.1. LD - linkage disequilibrium	37
3.3.4.2. Veze marker -svojstvo primenom GLM	38
3.3.4.3. Veze marker - svojstvo primenom MLM	38
3.3.4.4. Identifikacija favorizovanih alela	38
4. REZULTATI	40
4.1. Genetički diverzitet	41
4.2. Parametri genetičkog diverziteta po genomima	42
4.3. Struktura populacije	44
4.3.1. Parametri genetičkog diverziteta u potpopulacijama	47
4.3.2. Genetička udaljenost između potpopulacija	48

4.4. Molekularna analiza varijanse (AMOVA)	52
4.5. Fenotipska evaluacija	53
4.6. Neravnoteža vezanosti - LD (linkage disequilibrium)	54
4.7. Poređenje GLM i MLM modela	56
4.8. Značajne asocijacije između svojstava i markera	59
4.8.1. Broj klasića po klasu	59
4.8.2. Broj sterilnih klasića po klasu	60
4.8.3. Broj zrna po klasu	62
4.8.4. Dužina klasa	63
4.8.5. Dužina vršne internodije	65
4.8.6. Masa klasa i masa zrna po klasu	65
4.8.7. Indeks klasa	67
4.8.8. Vreme klasanja i cvetanja	69
4.9. Marker i fenotipski efekti alela	71
5. DISKUSIJA	75
5.1. Genetički diverzitet	76
5.1.1. Genetički diverzitet u pojedinačnim genomima	78
5.2. Struktura populacije	79
5.2.1. Parametri genetičkog diverziteta u dobijenim potpopulacijama	81
5.3. Analiza molekularne varijanse	82
5.4. LD analiza	82
5.5. Asocijacija primenom MLM i GLM modela	84
5.5.1. QTL za broj sterilnih klasića po klasu i QTL za broj klasića po klasu	85
5.5.2. QTL za broj zrna po klasu	88
5.5.3. QTL za dužinu klasa	89
5.5.4. QTL za dužinu vršne internodije	91
5.5.5. QTL za masu klasa i masu zrna po klasu	92
5.5.6. QTL za indeks klasa	93
5.5.7. QTL za adaptivne osobine	94
5.6. Favorizovani aleli	97
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	102
8. PRILOZI	128

1. UVOD

1.1. *Proizvodnja pšenice u svetu i kod nas*

Pšenica je jedna od najvažnijih žitarica koju u svakodnevnoj ishrani upotrebljava oko dve milijarde ljudi, a što predstavlja oko 40% svetske populacije. Na globalnom nivou, 95% proizvodnje čini hlebna pšenica (*Triticum aestivum* L.), dok je proizvodnja durum pšenice (*Triticum durum*) zastupljena sa svega 5% (Shewry, 2009). Prema podacima *Faostat*, pšenica se u svetu gaji na preko 219 miliona ha, zauzimajući oko 17% (1/6) obradivih površina čime se postiže ukupna proizvodnja od oko 684 miliona tona (prosek 2009-2013). Razmatrajući proizvodnju žitarica na svetskom nivou, ova kultura zauzima treće mesto, odmah posle kukuruza i pirinča. Prosečan prinos pšenice iznosi 3,12 t ha⁻¹ (prosek 2009-2013). Prvo mesto u svetu po ukupnoj proizvodnji pšenice zauzima Kina, koju slede Indija, Rusija i SAD, dok se u najveće evropske proizvođače ubrajaju Francuska i Nemačka (<http://faostat.fao.org/>).

Velika potražnja za ovom žitaricom uslovljena je pre svega potrebama u ljudskoj ishrani, kojom se obezbeđuje oko 20% neophodnih kalorija. Zrno pšenice je bogato esencijalnim hranljivim materijama pre svega ugljenim hidratima (60-80% uglavnom u obliku skroba), proteinima (8-15%), esencijalnim amino kiselinama (sa nedostatkom lizina, triptofana i metionina), mastima (1,5-2%), mineralima (1,5-2%) vitaminima (vitamini B kompleksa i vitamin E) i vlaknima (2,2%) (Hussain i Qamar, 2007). Pored toga što se koristi u osnovnoj ljudskoj ishrani za pravljenje hleba, peciva, kolača, testenina, kuskusa, u proizvodnji alkoholnih pića, pšenica ima široku primenu u proizvodnji biorazgradive plastike, drveta, biogasa i obnovljivih izvora energije. Ovo je uslovalo sve veću potrebu za povećanjem proizvodnje ove biljne kulture.

Sredinom prošlog veka značajno povećanje prinosa postignuto je tokom "*Zelene revolucije*", predvođene nobelovcem Normanom Borlagom, tokom koje su introdukovani *Rht* geni (reducing height) tj. geni reduktori visine. Tako su stvorene visokoprinosne sorte patuljastog rasta otporne na prevalentne bolesti, što je uslovalo znatno povećanje proizvodnje u pojedinim delovima sveta (Pakistan i Indija), u kojima su postojali veliki problemi u proizvodnji hrane. Međutim, zbog velikog porasta broja stanovnika, (koji bi prema Godfray i sar. (2010), mogao da dostigne 9 milijardi u narednih 40 godina), čak i pored povećanja prinosa po jedinici površine (i relativno konstantnih površina na kojoj se pšenica gaji) neophodno je da se proizvodnja zrna

dodatno poveća za 2% do 3% na godišnjem nivou kako bi se obezbedile dovoljne količine zrna za rastuću ljudsku populaciju (Gupta i sar., 2008, Hawkesford i sar., 2013). Osim toga, prinos je u visokoj zavisnosti i od brojnih abiotičkih i biotičkih faktora koji mogu smanjiti prinos i do 40% (Oepke, 2006). Zbog izuzetnog ekonomskog značaja pšenice, pokrenuta su brojna i intenzivna citogenetička i genetička istraživanja čiji je zajednički cilj da se stvaraju sorte sa povećanim genetičkim potencijalom za prinos, tolerantnije na različite stresove kao i sorte poboljšanog kvaliteta (Carver, 2009).

U Srbiji se pšenica gaji na površini od preko 500 hiljada ha, sa prosečnim prinosom od 3,99 t ha⁻¹ i ukupnom proizvodnjom od oko 2,1 miliona tona. Kako se u Vojvodini nalazi najveći procenat obradivih površina, u njoj se pšenica gaji na preko 263 hiljade ha, gde prosečni prinos iznosi 4,5 t ha⁻¹, a ukupna proizvodnja iznosi oko 1,2 miliona tona (RZS; prosek 2009-2013). Rad na oplemenjivanju pšenice u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo je počeo davne 1938. godine, gde je najvažniji pravac oplemenjivanja, kao i u svetu, usmeren na stvaranje sorti većeg potencijala za prinos. Tokom ovoga perioda, oplemenjivanje je prolazilo kroz nekoliko faza, sa najvećim uspehom postignutim 70-tih godina prošloga veka, kada je prinos na nacionalnom nivou povećan za skoro 1 t/ha. Do danas, stvorene su brojne sorte sa visokim genetičkim potencijalom za prinos, koji doseže i preko 10 t/ha. Prema raspoloživim podacima, maksimalan prinos ostvaren je na Novom Zelandu tokom 2010. godine i iznosio je 15,62 t ha⁻¹.

Dosadašnji rezultati u Institutu postignuti su primenom klasičnih metoda i načina oplemenjivanja uz dopunske metode iz oblasti biotehnologije, pre svega kulture tkiva (Kondić-Špika i sar., 2008). Kobiljski i sar. (2007) ističu da je uvođenje molekularnog oplemenjivanja u postojeće programe oplemenjivanja neophodno radi selekcije genotipova na bazi markera tzv. marker asistirane selekcije (MAS). Na ovaj način bi se uspešnije i efikasnije stvarali genotipovi sa poželjnim svojstvima, sa akcentom na genotipove povećanog genetičkog potencijala za prinos. Zahvaljujući velikom napretku u razvoju novih i savremenih metoda u molekularnoj biologiji, genetici, i bioinformatici, omogućeno je precizno definisanje hromozomskih regiona i gena odgovornih za ekspresiju važnih agronomskih svojstava pšenice (Somers, 2005; Denčić, 2006; Landjeva i sar., 2007; Varshney i sar., 2014).

1.2. Evolucija i poreklo heksaploidnog genoma pšenice

Triticum aestivum L. poznatija kao hlebna pšenica pripada tribusu *Triticeae*, subfamiliiji *Pooideae*, koja se svrstava u familiju trava, *Poaceae*. Pretpostavlja se da je evolucija subfamiliije *Pooideae*, kojoj pored pšenice, pripadaju i ječam i ovas, otpočela u periodu pre 50 do 80 miliona godina. Nešto kasnije, pre 35 miliona godina došlo je do razdvajanja tribusa *Triticeae* i *Poeae* (*Lolium rigidum*). Rod *Hordeum* (ječmovi) divergirao je od roda *Triticum/Aegilops* pre negde oko 11 miliona godina, dok se rod *Secale* (ovas) odvojio pre 7 miliona godina. Zahvaljujući naprednim civilizacijama u jugozapadnoj Aziji, Kini i Južnoj Americi, nekoliko vrsta iz porodice trava (*Poacea*) kao što su pšenica (rod *Triticum*), pirinač (rod *Oryza*) i kukuruz (rod *Zea*) su kultivisani u periodu pre 8.000 do 12.000 godina (Pozzi i sar., 2004)

Današnji izgled pšenica duuguje procesima koji su se odvijali pre 300.000 godina, a doveli su do povećanja nivoa ploidnosti sa haploidnog ka tetraploidnom. Potom je čovek izveo ukrštanja koja su uslovlila pojavu heksaploidnosti (Akhunov i sar., 2003). Najraniji dokaz da je čovek sakupljao i koristio ove žitarice, potiču iz perioda epipaleolita (19.000 pre n.e.) sa lokaliteta Ohalo II koji se nalazio na jugozapadnoj obali Galilejskog jezera. Odavde potiču prvi dokazi o obradi i pečenju brašna. Prostor današnjeg Bliskog istoka, poznatog i kao plodni polumesec je područje u kome je otpočelo gajenje hlebne pšenice. Među prvim gajenim vrstama spominje se diploidna vrsta *Triticum monoccocum* (genomska formula se označava kao $A^m A^m$). Međutim, pravi donor genoma A među danas poznatim vrstama pšenice je vrsta *Triticum urartu* (genomske formule $A^u A^u$), koja se u prirodi spontano ukrštala sa vrstama iz roda *Aegilops*, sekcije *Sitopsis*. Najadekvatniji predstavnik ove sekcije je današnja vrsta *Aegilops speltoides* (Kilian i sar., 2006). Iako, Huang i sar. (2002) ovu vrstu navode kao najverovatnijeg donora B genoma hlebne pšenice, nedavna ispitivanja (Gupta i sar., 2008) su pokazala da je ova vrsta ipak donor G genoma kod vrste *Triticum timophevii*. Precizno poreklo B genoma još uvek nije dokazano. Jedan od razloga je nepostojanje podudarnosti između današnjih genoma diploidnih vrsta sa B genomom kod hlebne pšenice, jer je predak nestao u procesu evolucije.

Predstavnik tetraploidne vrste pšenice, *Triticum turgidum* spp. *dicoccoides* (sa A^uA^uBB genomom) stvorena je u prirodi spontanom ukrštanjem. Ona je poslužila za formiranje današnjih kultivisanih tetraploidnih podvrsta *Triticum turgidum* spp. *durum* i *Triticum turgidum* spp. *dicoccum*. Pretpostavlja se da se spontana hibridizacija kultivisanih tetraploidnih pšenica i nesrodne divlje diploidne vrste *Aegilops tauschii* ($2n=14$) odigrala nekoliko puta, pri čemu su stvorene heksaploidne pšenice sa AABBDD genomom. Zbog svojih superiornih karakteristika čovek je odabirao ove heksaploidne forme čime je i otpočela evolucija modernih današnjih vrsta pšenice (Shewry, 2009). Podvrsta *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* danas se smatra preciznijim donatorom D genoma hlebne pšenice u odnosu na podvrstu *Ae. tauschii* ssp. *tauschii* (Dvorak i sar., 1998). U odnosu na druge vrste pšenice, obična ili hlebna pšenica predstavlja relativno mlad aloheksaploid (Pozzi i Salamini, 2007), ali dokazi o postojanju divljih srodnika heksaploidne pšenice do danas nisu pronađeni.

Usled izuzetno složenog procesa nastajanja, hlebna pšenica (*Triticum aestivum* L.) se odlikuje kompleksnim genomom u čijem sastavu se nalaze tri genoma. Ovi genomi su označeni kao A, B, D i različitog su porekla. Tako je pšenica svrstana u važan model organizam za proučavanje evolucionih teorija alopoliploidne specijacije, adaptacije i domestikacije kod biljaka (Gustafson i sar., 2009). Sa citogenetičkog aspekta, hlebna pšenica u okviru tri genoma poseduje 7 homeolognih grupa, sa ukupno 42 hromozoma ($2n = 6x = 42$). Svaka homeolognna grupa ima tri srodna hromozoma, po jedan hromozom sa srodnog podgenoma. Ovakva organizacija genoma pšenice posebno je značajna tokom mejoze kada se ova vrsta ponaša kao diploidni organizam i može da toleriše aneuploidiju zbog prisustva utrostručnog broja gena (Gupta i sar., 2008).

Specijacija koja je vodila ka alopoliploidizaciji je praćena brzim, neslučajnim uklanjanjem specifičnih, jedinstvenih, nekodirajućih DNK sekvenci u ranim fazama alopoliploidizacije. Ovo je rezultiralo u daljoj divergenciji homeolognih hromozoma. Ovi hromozomi različitih genoma dele isti raspored genskih lokusa. Feldman i sar. (1997) su utvrdili da je mejoza slična diploidnoj omogućena kroz dva molekularna procesa i to neslučajane eliminacije DNK sekvenci i homeolognog sparivanja zahvaljujući *Ph1* genu (gen odgovoran za sparivanje hromozoma). Prvi fenomen povećava razliku između homeolognih hromozoma, čime su sprečene međugenomske rekombinacije.

1.2.1. O sekvencama A genoma

A genom predstavlja osnovni genom hlebne pšenice kao i drugih poliploidnih pšenica: *Triticum turgidum* (AABB), *Triticum timopheevii* (AAGG) i *Triticum zhukovskyi* (AAAGGA^mA^m) i imao je važnu ulogu u evoluciji, domestikaciji i poboljšanju pojedinih svojstava pšenice. A^u genom poreklom iz *Triticum urartu* pokazuje veću sličnost (za oko 20%) sa A genomom tetraploidnih i heksaploidnih pšenica u odnosu sa A^m genomom iz *Triticum monococcum*. Oko 66,8% sekvenci genoma *Triticum urartu* su repetitivni elementi, koji su predstavljeni dugim terminalnim ponovcima retrotranspozona (49,07%), DNK transpozona (9,77%) i drugih neklasifikovanih elemenata (8,04%). Proporcija repetitivne DNK je manja od 80% u odnosu na prethodna istraživanja (Choulet i sar., 2010). Predikcioni model je pokazao prisustvo čak 34879 protein kodirajućih gena. Prosečna veličina gena iznosi oko 3.207 bp sa 4,7 egzona po genu, što je slično podacima kod *Brachypodium distachyon* (5,2), a nešto je veća u odnosu na podatke o egzonima kod pirinča (3,8), kukuruza (4,1) i sirka (4,3). *T. urartu* je sadržao 6800 više gena nego što je to procenjeno na A genomu heksaploidne pšenice. Anotiranje sekvenci *T. urartu* je važno za dalji razvoj genetičkih markera koji će poslužiti za molekularno oplemenjivanje i selekciju. Identifikovano je čak 739534 ISBP markera (Insertion Site Based Polymorphism) i 166309 mikrosatelitskih markera. Validacija primenom PCR tehnike pokazala je da 94,5% SSR markera daju očekivane produkte i da je 33,6% SSR specifično za A genom. Sem toga, 28,7% SSR lokusa su polimorfni kod hlebne pšenice (Ling i sar., 2013).

1.2.2. O sekvencama D genoma

Analizom genoma *Aegilops tauschii* je otkrivena ekspanzija relevantnih genskih familija od agronomske važnosti koje su odgovorne za otpornost na bolesti, tolerantnost na abiotički stres i kvalitet zrna. Hlebna pšenica se pre svega zahvaljujući D genomu adaptirala na širok areal rasprostranjenja i na različite uslove spoljašnje sredine (Jia i sar., 2013).

Više od 65,9% sekvenci kod *Aegilops tauschii* čine različite familije transpozabilnih elemenata (TE). Veliki broj gena iz familije citohroma P450 su važni u odgovoru na abiotički stres tokom biosintetičkih procesa i detoksikacije. Genom *Ae. tauschii* je izvor za mnoge gene koji određuju kvalitet heksaploidne pšenice, a odnose se na bolju elastičnost testa, odgovorni su za ekspresiju gluteninskih subjedinića velike i male molekulske mase (HMW-GS, LMW-GS), strukturnih proteina kao i aktivatora odgovornih za skladištenje (Dubcovsky i Dvorak, 2007). Na hromozomu 2D locirana su do danas čak 33 QTL. Sekvence genoma su pokazale prisustvo više od 860126 SSR, od čega je 37,7% sa tripletima i 27,5% sa tetramernim ponovcima. Sekvenciranje ovoga genoma bi trebalo da pomogne u identifikaciji novih elitnih alela za osobine adaptabilnosti važne u poljoprivredi (Jia i sar., 2013).

S obzirom da tačno poreklo B genoma još uvek nije poznato detaljnije informacije o B genomu nisu predstavljene.

1.3. Genom hlebne pšenice

Sa jedne strane razmatrajući genome trava pokazano je da se odlikuju izuzetnom konzerviranošću u rasporedu gena, ali sa druge strane pokazuju značajan stepen dinamičnosti. Ona je posledica prisustva velikog broja ponovaka koji svojom aktivnošću dovode do značajnih varijacija u veličini genoma, u rasporedu lokalnih gena i formiranju pseudogena (Moore i sar., 1995). Upotreba najnovije tehnologije pirosekvenciranja je omogućila preciznije određivanje veličine genoma hlebne pšenice koja je procenjena na oko 17 Gb. U pojedinačnim genomima otkriveno je prisustvo 28000 (A), 38000 (B) i 36000 gena (D). U heksaploidnom genomu nalazi se između 94000 i 96000 gena. Anotiranjem sekvenci broj gena je daleko veći i kreće se između 164000 i 334000 gena, zbog analize kako funkcionalnih gena tako i pseudogena. Kada se uporedi sadržaj gena kod heksaploidne pšenice sa tri diploidna pretka uočava se gubitak od 10000 do 16000 gena. Ovo se dogodilo tokom procesa poliploidizacije, koja je dovela do određenog stepena genetičke erozije kod savremenih sorti pšenice. (Haudry i sar., 2007). Većina funkcionalnih klasa je proporcionalno nestala kod sva tri genoma, ali familije transkripcionih faktora pokazuju tendenciju da se održe kao funkcionalni

geni u sva tri genoma. Oni formiraju transkripcionu mrežu u svakom genomu i doprinose neaditivnoj ekspresiji gena i plastičnosti genoma (Pumphrey i sar., 2009). Uprkos gubitku pojedinih članova genskih familija, nekoliko klasa gena koji igraju važnu ulogu u odbrani, povećanju sadržaja hranljivih materija, metabolizmu i ključnim procesima rasta i razvića su se vremenom povećali kao rezultat selekcije tokom domestikacije što je dovelo do celokupnog povećanja produktivnosti pšenice (Brenchley i sar., 2012).

Posmatrajući masu DNK u haploidnom jedru ona iznosi samo 18,5 pg sa prosečnom dužinom hromozoma od 10 μ m. U poređenju sa genomom pirinča, koji predstavlja model organizam monokotiledonih biljaka, genom pšenice je jedan od najkompleksnijih i najvećih genoma kod žitarica. Prosečan hromozom pšenice je oko 25 puta veći po sadržaju DNK u odnosu na hromozom pirinča (Moore i sar., 1995). U pogledu veličine, prosečan hromozom pšenice (809 Mb) je dvostruko veći u odnosu na hromozom pirinča (390 Mb). Hromozom 3B je najveći hromozom pšenice i prvi je korišćen za fizičko mapiranje, dok se u najmanje hromozome svrstavaju 1D, 4D i 6D. Različita istraživanja pokazuju da ponovljene DNK sekvence čine od 70% do 80 % genoma. Ostatak od 20% čine slabo ponovljive i jedinstvene sekvence, a manje od 1% su pravi kodirajući geni. Više od 85% ukupnog broja gena pšenice se nalazi u kontinuiranim klasterima koji su bogati genima, a razdvajaju ih regioni siromašni genima, u kojima prevladavaju retrotranspozoni, pre svega repetitivne sekvence i pseudogeni. Svaki hromozomski krak se sastoji od šest do osam regiona bogatih genima zauzimajući manje od 10% celog hromozoma. Svaki ovaj region dodatno se može podeliti u manje segmente bogate genima i prostore siromašne genima (Gupta i sar., 2008).

Gustina i organizacija gena nije u korelaciji sa veličinom genoma. Regioni koji su bogati genima pokazuju određeni nivo sličnosti u fizičkoj poziciji, strukturnoj organizaciji i gustini gena duž sva tri genoma hlebne pšenice, ali postoje i određena odstupanja u broju, gustini gena i frekvenciji rekombinacija. Raspodela rekombinacija kod hromozoma *Triticeae* je izuzetno nejednaka i pretežno je ograničena na distalne delove hromozoma. Poređenjem fizičkih i genetičkih linkidž mapa, Gill i sar. (1996) su ustanovili da se rekombinacije dešavaju samo u regionima bogatim genima kod pšenice, što su potvrdili i Sandhu i sar. (2001), sa detektovanih čak 82% rekombinacija u

genskom regionu 1S0.8 na hromozomskoj grupi 1. Međutim, nivo rekombinacija varira i unutar istog regiona bogatog genima. Relativno mali nivo rekombinacija (20-30%) je identifikovan u proksimalnom delu hromozoma pšenice što je uzrokovano prisustvom centromere, iako su geni prisutni i u ovom regionu. Odnos bp/cM može da varira od 118 Kb u regionima koji su bogati genima do 22 Mb u regionima sa manje gena, kao rezultat neslučajne raspodele rekombinacija duž hromozoma (Hussain i Qamar, 2007).

1.4. Mikrosateliti

Mikrosateliti su poznati i kao kratki tandemske ponovci (STR - *Short Tandem Repeats*), jednostavne ponovljive sekvence (SSR - *Simple Sequence Repeats*) ili jednostavne sekvence sa polimorfnom dužinom (SSLP - *Simple Sequence Length Polymorphism*) koji su zastupljeni u svim prokariotskim i eukariotskim genomima (Litt i Luty, 1998). Tandemski ponovljivi motiv je sačinjen od jednog do šest baznih parova. Mikrosatelitski markeri su definisani parom prajmera koji ograničavaju mikrosatelitsko mesto u genomu i koriste se za umnožavanje tokom lančane reakcije polimeraze. U poređenju sa drugim molekularnim markerima, mikrosateliti se odlikuju specifičnim karakteristikama koje im pružaju prednost tokom primene u različitim istraživanjima. SSR markeri su multialelne prirode što ih čini superiornijim u odnosu na bialelne markere. Takođe, automatska i istovremena analiza velikog broja lokusa olakšava njihovu upotrebu. Kodominatna priroda SSR markera omogućava detekciju heterozigota. S obzirom na visoku zastupljenost i ravnomeran raspored u celom genomu, SSR markeri pokazuju visok stepen polimorfnosti (Roeder i sar., 1995).

Mikrosateliti su prisutni u nuklearnom, mitohondrijalnom i hloroplastnom genomu, u okviru kodirajućih i nekodirajućih regiona. Imaju relativno mali broj ponavljanja po lokusu (5-100) sa prosečnim rasporedom od 10^4 do 10^5 po genomu (Tautz, 1993). Visok stepen polimorfizma se ogleda u dužini ponovaka. Njihova klasifikacija je određena na osnovu veličine, vrste ponovaka i položaja u genomu. U zavisnosti od broja nukleotida koji se nalaze u ponavljajućoj sekvenci, SSR su podeljeni na mono, di, tri, tetra, penta i heksanukleotide. Raspored nukleotida u ponavljajućem motivu određuje podelu na proste i složene sa savršenim i nesavršenim ponavljanjima.

Najučestaliji su dinukleotidni ponovci, ali je njihova zastupljenost mala u kodirajućim regionima. Kod većine vrsta, egzone najčešće čine motivi sa tripletom kako bi se sprečile promene u okvirima čitanja (Kalia i sar., 2011).

Položaj mikrosatelita u genomu određuje i njegovu ulogu. Oni učestvuju u organizaciji hromatina, regulaciji aktivacije gena, u procesima rekombinacija, replikaciji DNK, u deobi ćelije itd. Kada su prisutni u kodirajućem regionu mikrosateliti mogu da utiču na aktivaciju gena i njihovu ekspresiju. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, UTR regioni (5', 3' i introni) sadrže znatno više mikrosatelita nego kodirajući regioni. Prisustni SSR markeri u 5' UTR regionima (regioni u kojima su prisutni kao regulatorni elementi) su odgovorni za ekspresiju pojedinih gena, a varijacije u SSR mogu uticati na njihovu transkripciju i translaciju. Ekspanzija SSR u 3' UTR dovodi do transkripcionog proklizavanja čime se stvaraju produžene RNK molekule. Ovo može da utiče na proces splajsinga RNA (modifikacije nascentnog RNA transkripta isecanjem introna i pridruživanjem egzona do funkcionalnog molekula) i niz drugih ćelijskih funkcija. Mikrosateliti u intronima takođe regulišu gensku transkripciju i translaciju. SSR ekspanzija u intronima i 3'UTR mogu voditi ka genskom utišavanju ili gubitku funkcije gena (Li i sar., 2004). Svi ovi efekti koji nastaju usled ekspanzije SSR ili smanjenja unutar gena vode ka promenama u fenotipu, što je pokazano kod mnogih neurodegenerativnih i neuromuskularnih bolesti u ljudskoj populaciji. Funkcije gena koje sadrže SSR i uloga različitih motiva kod gena biljaka nije još dovoljno proučena (Varshney i sar., 2005). S obzirom na to da EST sekvence pretežno imaju ulogu enzima, strukturnih proteina, skladišnih proteina, kao i transkripcionih faktora, ovo ukazuje na važnu ulogu SSR u metabolizmu biljaka i ulozi u evolutivnim procesima. EST-SSR imaju prednost u odnosu na genomske SSR jer se na ovaj način detektuju varijacije u eksprimiranim delovima genoma. SSR lokusi se javljaju na svake 2 do 30 kb (Gupta i sar., 2003).

Usled visoke zastupljenosti u genomu i specifičnog načina ponavljanja, mikrosatelitski lokusi su izloženi visokom stepenu mutacija zbog čega predstavljaju tzv. mutacione „hotspotove“. To su DNK sekvence sa izraženom sklonošću ka mutacijama usled neke nasledne nestabilnosti, težnji ka nejednakom krosigoveru ili hemijskoj predispoziciji prema pojedinim supstitucijama nukleotida. Varijabilost u sekvenci mikrosatelita najčešće se dešava zbog nejednakog krosingovera tj. razmene genetičkog

materijala između homeolognih hromozoma a čiji su rezultat rekombinantni hromozomi. Jedan od načina jeste i proklizavanja polimeraze duž DNK matrice (Hancock, 1999). Postoji veliki broj faktora koji utiču na mutacioni koeficijent. U tome glavnu ulogu ima dužina mikrosatelita, zatim veličina ponavljajućeg motiva, i sadržaj nukleotida, pozicija u genomu (kodirajuće i nekodirajuće sekvence), prisustvo mikrosatelita na vodećem ili zaostajućem lancu i udaljenost od mesta na DNK lancu od koga počinje sama replikacija (engl. replication origin). Tačnost replikacije i mehanizmi popravke kao i epigenetički faktori mogu uticati na stabilnost mikrosatelita. Uprkos visokoj stopi mutacija, njihovi granični regioni pokazuju značajnu stabilnost.

1.4.1. Primena mikrosatelita

Od početka 80-tih godina prošloga veka pa sve do danas, mikrosateliti su zahvaljujući svojim karakteristikama našli široku primenu u različitim genetičkim, molekularnim, taksonomskim, evolucionim i populacionim istraživanjima.

Visok stepen varijabilnosti mikrosatelitima je omogućio da postanu idealni markeri za procenu genetičkog diverziteta. Stoga, brojna istraživanja koriste mikrosatelite za karakterizaciju germplazme različitog geografskog porekla (Roeder i sar., 2002; Kobiljski i sar., 2002; Hao i sar., 2011; Nielsen i sar., 2014). Takođe, moguće je okarakterisati i linije iz različitih kolekcija germplazme, kako bi se pratile promene genetičkog diverziteta tokom vremena (Donini i sar., 2000; Manifesto i sar., 2001; Christiansen i sar., 2002; Laido i sar., 2013). Procena diverziteta na različitoj germplazmi može ukazati i na međusobne genetičke odnose između populacija i/ili oplemenjivačkog materijala (Plaschke i sar., 1995, Stachel i sar., 2000).

Takođe, mikrosateliti su značajni za identifikaciju genetičkih profila putem fingerprintinga kojim se identifikuju jedinstvene kombinacije DNK sekvence čak i kod blisko srodnih sorti, što može da posluži u zaštiti autorskih prava oplemenjivača (Roeder i sar., 2002).

U oplemenjivanju pšenice, mikrosateliti se sve više koriste za lokalizaciju pojedinačnih gena kao što su geni otpornosti na različite bolesti i drugi geni od agronomске važnosti. Pored individualnih gena, mikrosatelitski markeri koriste se i za detekciju velikog broja lokusa za kvantitativna svojstva (QTL) koji su odgovorni za

ekspresiju brojnih morfoloških i drugih važnih osobina u poljoprivredi. Takođe, mikrosatelitski markeri pšenice sve više će se koristiti kao okosnica za poboljšanje fizičke mape pšeničnog genoma na osnovu genetičke mape, čime će se olakšati procedura kloniranja pojedinačnih gena iz genoma. Poseban akcenat jeste na primeni mikrosatelita u marker asistiranoj selekciji (MAS) radi unošenja važnih osobina povratnim ukrštanjima u elitni materijal i time stvaranje novih poboljšanih sorti (Ganal i Roeder, 2007; Kalia i sar., 2011).

1.4.2. Mikrosateliti pšenice i mape

Prvi radovi na mikrosatelitima pšenice pojavili su se krajem prošloga veka (Devos i sar., 1995; Roeder i sar., 1995). Oko 50% mikrosatelitskih markera hlebne pšenice predstavljaju genom specifične markere jer se nalaze samo na jednom od tri postojeća genoma. Čak i u slučaju da se amplifikuju sa više lokusa, lako se razlikuju primenom sistema sa visokom rezolucijom. Unutar jednog lokusa pšenice moguće je detektovati preko 30 različitih alelnih varijanti što ih čini izuzetno informativnim u poređenju sa drugim bialelnim markerima (Plaschke i sar., 1995; Roeder i sar., 2002). Takođe, istovremena analiza većeg broja lokusa na velikom broju biljaka daje ovim markerima prednost za primenu u marker asistiranoj selekciji, mapiranju i oplemenjivanju pšenice.

Najpolimorfniji mikrosateliti su dinukleotidni GT ponovci. Kod biljaka je AAG najprisutniji ponovak, dok je kod žitarica najzastupljeniji (oko 32%) ponovak CCG. Ovaj ponovak je specifična karakteristika monokotila gde povećan sadržaj GC sekvenci može da dovede do povećanja prisustva određene aminokiseline (Morgante i sar., 2002).

Do danas je razvijen veliki broj mikrosatelitskih markera pšenice u različitim istraživačkim centrima (Jülich Research Centre, IPK - Gatersleben, Wheat Microsatellite Consortium, Beltsville Agricultural Research Center, INRA), koji su dizajnirani korišćenjem različitih genetičkih izvora kao što su: jedinstvene sekvence genomskih klonova, EST sekvence, biblioteke sekvenci itd. (Roeder i sar., 1998; Song i sar., 2005; Gao i sar., 2004; Yu i sar., 2004). Mikrosateliti koji su stvoreni iz motiva EST sekvenci su visoko konzervirani i mogu se koristiti u širem opsegu germplazme

(Zhang i sar., 2006), ali se sa druge strane odlikuju manjim stepenom polimorfnosti u odnosu na SSR koji potiču iz genomske sekvenci (Varshney i sar., 2005).

Prva sveobuhvatna dostupna mikrosatelitska mapa pšenice je objavljena još 1998. godine od strane Roeder i sar. (1998). Iako je prvo mapiranje molekularnih markera otpočelo još u prošlom veku, i danas se koriste i dopunjuju postojeće mape svih homeolognih grupa pšenice. Formiranje kompozitne mape uključuje kombinaciju različitih tipova molekularnih markera, pre svega SSR, AFLP, SNP i DArT markera. Jedna od najviše korišćenih mikrosatelitskih mapa je konstruisana od strane Somers i sar. (2004) kombinovanjem 4 nezavisne genetičke mape hlebne pšenice i obuhvata oko 2569 cM. Gustina genetičkih mapa pšenice se kontinuirano povećava razvojem novih molekularnih markera.

Sa druge strane, jedna od najdostupnijih fizičkih mapa je mapa Sourdille i sar. (2004) nastala sa 725 genetički mapiranih mikrosatelita primenom različitih delecionijskih linija. Saintenac i sar. (2009) su analizirali stepen rekombinacije, distribuciju i gustinu gena kombinujući genetičke i fizičke mape primenom 102 markera sa 3B hromozoma pšenice. Utvrdili su da frekvencija rekombinacije raste od proksimalnog ka distalnom delu hromozoma. Najnoviju integralnu fizičku mapu pšenice su razvili Kumar i sar. (2013) sa 2031 mikrosatelitom koji su raspoređeni na svim hromozomima pšenice. Srednja rezolucija između dva SSR lokusa je iznosila 7,8 Mb. Međutim, za kloniranje određenih gena neophodne su znatno gušće fizičke mape sa većim brojem markera. Dostupnost molekularnih markera asociranih sa pojedinačnim osobinama će povećati primenu selekcije bazirane na markerima tokom procesa oplemenjivanja biljaka (Gupta i sar., 2008).

1.5. Linkidž disekvilibrjum (LD) i asocijativno mapiranje

Prva uspešna primena asocijativnog mapiranja je ostvarena u oblasti humane genetike na otkrivanju genetičke osnove neurodegenerativnih bolesti, a potom je isti pristup korišćen i na biljnom materijalu. Među prvim studijama kod biljaka koje su se bazirale na LD mapiranju su urađene na kukuruzu (*Zea mays*) (Bar-Hen i sar., 1995), zatim pirinču (*Oryza sativa*) (Virk i sar., 1996) i ovsu (*Avena sativa*) (Beer i sar., 1997)

primenom RAPD markera i izozima. Među prvima je detektovan kandidat gen kod kukuruza u okviru *D8* lokusa povezan sa vremenom cvetanja primenom molekularnih markera (Pritchard, 2001). Brojna LD i AM istraživanja su u poslednjoj deceniji objavljena na najvažnijim ratarskim kulturama, pa samim tim i na pšenici, sa akcentom na detekciju lokusa odgovornih za adaptaciju, otpornost na prevalentne bolesti, parametre kvaliteta i niz drugih važnih agronomskih svojstava.

Neravnoteža vezanosti (LD) predstavlja neslučajnu vezu između dva markera ili dva gena/QTL u populaciji, dok asocijativno mapiranje (AM) podrazumeva detekciju statistički značajnih veza između markera i fenotipske osobine. Na ovaj način, AM predstavlja primenu LD, s tim da dva markera koja se nalaze u LD, ne moraju nužno biti u korelaciji sa određenim fenotipom (Flint-Garcia i sar., 2003).

Različiti pristupi koji se koriste za detekciju QTL kao što su: QTL analiza i asocijativno mapiranje, zasnivaju se na LD između molekularnih markera, odnosno funkcionalnih lokusa. Osnovna razlika koja postoji kod QTL mapiranja je da LD nastaje isključivo kao posledica rekombinacija nastalih usled specifičnog sistema oplodnje, dok kod AM, LD na raznovrsnoj kolekciji germplazme može da nastane kao rezultat selekcije, mutacija, strukture populacija itd. (Stich i Melchinger, 2010). Određene sekvence mogu da imaju veliki direktan ili indirektan uticaj na LD, među kojima je i sadržaj GC nukleotida i gustina gena (Dawson i sar., 2002). Naime, povećan nivo GC parova je asociiran sa većom stopom rekombinacija i/ili mutacija što utiče na smanjenje nivoa LD. Sa druge strane, kod nekih protein kodirajućih sekvenci, promene koje su nastale usled rekombinacija ili mutacija mogu uticati na bolju adaptaciju, čime se stvara određeni nivo LD kao posledica prirodne selekcije (Smith i sar., 2005). Nivo LD varira i unutar i između hromozoma, gde centromerni regioni pokazuju znatno veći nivo LD. Ispitivanjem LD unutar genoma i hromozoma može se precizno proceniti gustina markera na svakom hromozomu, na osnovu čega je moguće odrediti i značaj samog AM pristupa. Za AM mogu biti značajne kako populacije sa sporim tako i populacije sa brzim opadanjem LD. Populacije sa uskim genetičkim diverzitetom i širim opsegom LD su korisne za mapiranje sa manjim brojem markera, dok se za fino mapiranje koristi više različitih populacija sa pretpostavkom da su genetički faktori slični u različitim grupama germplazme (Soto-Cerda i sar., 2012).

Pored rekombinacija, mutacija, genetičkog drifta, protoka gena, i selekcija ima uticaj na genom i na LD u specifičnim lokusima. Pored toga i struktura populacije utiče na LD u celom genomu. Celokupan LD u genomu može da ukaže na istorijske/evolucione promene koje su se dogodile u populacijama. Međutim, moć samog asocijativnog mapiranja može biti smanjena usled specifične strukture populacije. Struktura populacije nastaje zbog nejednake preraspodele alela između subpopulacija koji potiču od različitih predaka. Kada se odaberu linije za AM analizu, prisutne su različite frekvencije alela koje su odgovorne za različite nivoe LD. Značajan LD koji se javlja između nevezanih lokusa može da uzrokuje lažno pozitivne asocijacije između markera i osobine (Slatkin, 2008).

1.5.1. Prednosti i nedostaci asocijativnog mapiranja

Jedna od najvažnijih prednosti asocijativnog mapiranja u odnosu na linkidž mapiranje jeste postizanje bolje rezolucije pri lokalizaciji QTL/gena. S obzirom da se asocijativno mapiranje vrši direktno na oplemenjivačkom materijalu, nije potrebno ulagati vreme za stvaranje specijalnih populacija, kao što su F_2 populacije, populacije dvostrukih haploida, rekombinantne inbred linije, supstitucione linije itd., koje su neophodne kod QTL mapiranja (Yu i Buckler, 2006). Pomoću AM moguće je identifikovati znatno veći broj alela, pa samim tim i superiornijih alela sa poželjnim efektom nego pri analizi biparentalnih populacija. Takođe, moguće je identifikovati složene interakcije (npr. epistaza) koje nastaju između alela u većem broju lokusa, kao i gena sa malim efektom. Ovako asociirani markeri mogu poslužiti oplemenjivačima za direktno unošenje u nove sorte. Pored ovoga i sa aspekta ekonomske isplativosti, AM ima prednost u odnosu na QTL mapiranje. Ne samo da se mogu identifikovati i mapirati QTL, moguće je identifikovati polimorfnost unutar gena koji su odgovorni za razlike između dva fenotipa (Palaisa i sar., 2003).

Jedno od ograničenja primene AM je kod osobina koje su se adaptirale na lokalne uslove sredine ili tokom uravnotežene selekcije, čime je ostvarena čvrsta veza sa strukturom populacije (Stich i Melchinger, 2010). Takođe primenom AM otkriva se i veliki broj kako pozitivnih tako i negativnih asocijacija, i otežano je otkrivanje retkih alela.

1.5.2. Asocijativno mapiranje na pšenici

Prva asocijativna istraživanja na pšenici izvedena su od strane Breseghello i Sorrells (2006), koji su detektovali značajne hromozomske lokuse odgovorne za masu, dužinu, veličinu i oblik zrna pšenice. U poslednjih nekoliko godina pojavio se čitav niz istraživanja koja se baziraju na asocijativnom pristupu tzv. GWAS koja obuhvataju analize čitavog genoma.

Tako su Rehman Arif i sar. (2012a) vršili genetička istraživanja dugovečnosti semena kod heklsaploidne pšenice primenom asocijativnog pristupa. Na ovaj način otkriveno je ukupno 38 značajnih asocijacija. Detektovani markeri su bili raspoređeni na 14 hromozoma. Genetičkim rasčlanjivanjem ove kompleksne osobine identifikovani su poželjni aleli koji obezbeđuju predikciju za dugovečnost semena. Ova osobina je važna za očuvanje semena u bankama gena. Neki od otkrivenih regiona sadrže i gene koji determinišu arhitekturu klasa.

Predžetveno proklijavanje i mirovanje semena su kao važne osobine kod heksaploidne pšenice bile u centru ispitivanja iste grupe autora (Rehman Arif i sar., 2012b). Primenom asocijativne metode na 96 genotipova ozime pšenice detektovano je 70 asocijacija za dormantnost i 34 veze marker-svojstvo za predžetveno proklijavanje. Najveći broj markera odgovornih za dormantnost nalazio se na hromozomima homeologne grupe 1, dok je grupa 7 imala najviše markera koji su bili u vezi sa predžetvenim proklijavanjem. Otkrivanjem efikasnih regulatora mirovanja i sprečavanje predžetvenog proklijavanja omogućiće oplemenjivačima stvaranje sorti sa uravnoteženim mirovanjem i otpornošću na proklijavanje.

Neumann i sar. (2011) su asocijativnim mapiranjem pšenice obuhvatili čak 20 morfoloških i agronomskih svojstava koja su beležena tokom osam vegetacionih sezona. Molekularna analiza je vršena primenom velikog broja (874) DArT markera. Rezolucija asocijativnog mapiranja u radu je poboljšana primenom dve metode: GLM i MLM. Pored toga što je detektovano prisustvo 385 značajnih veza između markera i svojstva u oba modela, otkriveni su i novi hromozomski regioni odgovorni za ekspresiju pojedinih svojstava.

Komponente prinosa su merene u 15 ogleda u mediteranskom podneblju u različitim uslovima vodnog režima. Testirane su značajne asocijacije sa 180 mikrosatelitskih markera na kolekciji od 189 kultivisanih sorti durum pšenice (Maccaferri i sar., 2011). Ovo istraživanje je potvrdilo postojanje major lokusa ranije opisanih kod biparentalnih mapirajućih populacija. Takođe, otkriveni su i novi lokusi koji su bitni u uslovima stresa izazvanog sušom.

Zhang i sar. (2013) su identifikovali 37 lokusa odgovornih za ekspresiju mase hiljadu zrna kao važne komponente prinosa. Ispitivanje je pokazalo značajne veze u većem broju ispitivanih sredina sa različitim tretmanima vode i đubrenja.

Veličina i oblik zrna utiču na masu zrna što doprinosi i sveukupnom povećanju prinosa kod pšenice. Asocijativna istraživanja na morfologiji zrna su sprovedena od strane Rasheed i sar. (2014) u cilju razumevanja molekularne genetike mase zrna. Na 231 sintetičkoj heksaploidnoj pšenici otkriveno je prisustvo čak 60 hromozomskih regiona primenom GLM pristupa, odnosno 31 pomoću MLM koji su identifikovani na 2, 3, 6 i 7 hromozomskim homeolognim grupama. Na D genomu je detektovano 28 veza marker-osobina na 2, 3 i 6 hromozomima a otkriveni su i novi aleli koji su imali uticaj na povećanje mase zrna. Povoljni aleli za masu hiljadu zrna, dužinu, visinu i širinu zrna su imali aditivan genetički efekat.

Asocijativno mapiranje su primenili Liu i sar. (2010) na 103 genotipa poreklom iz Kine primenom 76 SSR markera i 40 EST-SSR markera smeštenih na 4A hromozomu. Fenotipska evaluacija obuhvatala je šest agronomskih svojstava na tri lokaliteta tokom tri ispitivane godine. Asocijativna studija je identifikovala 10 SSR markera povezanih sa ovim osobinama, dok je 6 markera bilo asocirano istovremeno sa više osobina.

1.6. Prinos i osobine klasa pšenice

Prinos predstavlja najvažniji proizvod koji nastaje tokom procesa rasta i razvika biljaka u složenom sistemu interakcije sa abiotičkim i biotičkim faktorima. Ova kompleksna osobina nalazi se pod kontrolom velikog broja gena koji su direktno ili indirektno uključeni u razvoj pšenice (Slafer, 2007). Na prvom mestu, prinos određuju

tri komponente i to: broj klasova po jedinici površine, broj zrna po klasu i masa klasa. Broj klasova po jedinici površine i broj zrna po klasu izražavaju treću komponentu, odnosno ukupan broj zrna po jedinici površine. Teoretski, povećanje samo jedne komponente usloviće povećanje celokupnog prinosa pšenice. Međutim, sve ove komponente su konstantno u međusobnoj interakciji i kompeticiji za ograničene resurse (Grafius, 1959). Otkrivanje QTL za prinos je izuzetno kompleksno iako postoji veliki broj radova koji se bave ovom tematikom. Praktična primena ovih QTL u različitom genetičkom materijalu i različitim uslovima sredine i dalje dovode do prosečnih vrednosti prinosa. Uzrok je pre svega što QTL za prinos imaju slabu rezoluciju sa malim individualnim efektom i veoma su zavisni od interakcije genotipa i spoljašnje sredine. Zbog toga je prinos pogodno rasčlaniti na jednostavnije komponente koje ga određuju, a to su pre svega komponente klasa. Osobine klasa su takođe pod kontrolom poligena tj. velikog broja gena/lokusa. Međutim, uticaj faktora spoljašnje sredine na pojedinačne komponente prinosa je znatno manji, a i heritabilnost je veća u poređenju sa prinosom *per se* (Ma i sar., 2007). Denčić (1989) ukazuju da je dalje povećanje potencijala za prinos moguće ostvariti promenama na klasu, pre svega povećanjem broja klasića po klasu, broja zrna po klasu, mase zrna itd. jer je postignut optimalan odnos stabla i listova i da dalje promene na izvoru asimilata (list i stablo) ne bi dovele do značajnijih pozitivnih promena.

S obzirom na to da morfologija i arhitektura klasa imaju veliki uticaj na konačan prinos, veliki značaj se ogleda u razumevanju kontrolnih mehanizama koji uslovljavaju karakteristike klasa pšenice. Glavnu ulogu u određivanju morfologije klasa pšenice imaju tri gena Q, C i S1 koji se nalaze na sledećim hromozomima: 5A, 2D i 3D. Johnson i sar. (2007) su pored 2D hromozoma detektovali i homeologni region na 2A hromozomu koji je odgovoran za kompaktnost klasa. Na osnovu studija Boerner i sar. (2002) su pokazali prisustvo QTL skoro na svakom od 21 hromozoma pšenice koji uslovljavaju pojedine osobine klasa.

Prvobitna istraživanja na determinaciji genetičkih faktora koji uslovljavaju karakteristike klasa bazirala su se na pojedinačnim hromozomskim supstitucionim linijama ili rekombinantnim inbred hromozomskim linijama. Ovaj pristup poslužio je u detektovanju lokusa za komponente prinosa na pojedinačnim hromozomima 3A (Shah i sar., 1999), zatim 4A (Araki i sar. 1999), 5A (Snape i sar., 1985; Kato i sar., 2000) itd.

Tako su Li i sar. (2007) QTL analizom na RIL populaciji detektovali 4 QTL regiona na hromozomima 1D, 2A, 6B i 7D koji su pokazali fenotipsku varijabilnost pojedinih komponenti prinosa. U fokusu istraživanja Ma i sar. (2007) je bilo mapiranje QTL za osobine klasa na 136 rekombinantnih inbred linija i F₂ populaciji, koje su ispitivane na tri lokaliteta. Glavni QTL je mapiran u intervalu *Xcfd46-Xwmc702* na hromozomu 7D koji utiče na povećanje dužine klasova. Cui i sar. (2011) su ispitivali sedam karakteristika klasa na dve populacije sa rekombinantnim inbred linijama. Otkriveno je 190 potencijalnih QTL sa aditivnim efektom koji su se nalazili na svakom od 21 hromozoma. Trkulja i sar. (2012) su na populaciji dvostrukih haploida identifikovali region na 2D hromozomu koji je pokazao vezu sa čak 6 ispitivanih osobina klasa pšenice.

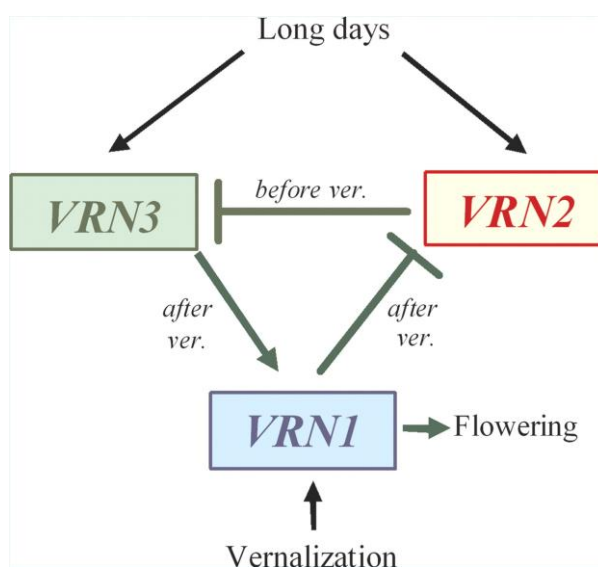
Danas sve veći broj istraživanja uključuje asocijativno mapiranje radi što preciznijeg definisanja hromozomskih regiona, koji bi u specifičnim uslovima spoljašnje sredine bili odgovorni za pojedine osobine klasa a samim tim i prinos (Yao i sar., 2009; Neumann i sar., 2011; Heidari i sar., 2012; Zhang i sar., 2013; Rasheed i sar., 2014)

1.7. Adaptabilne osobine

Od mesta nastanka u oblasti plodnog polumeseca na Bliskom istoku, pšenica se danas gaji na svim kontinentima, u širokom rasponu nadmorskih visina i geografskih širina i dužina. Ovakvu sposobnost adaptacije pšenici je omogućio kompleksan heksaploidni genom, a pre svega je zaslužna varijabilnost u genima odgovornim za vreme klasanja. Regulacija vremena klasanja se nalazi pod kontrolom gena za fotoperiodizam (*Ppd* gena), gena za vernalizaciju (*Vrn* gena), dok su za fino podešavanje odgovorni geni ranostasnosti (*Eps* geni). *Eps* geni su uključeni u fino podešavanje vremena cvetanja kod pšenice, dok sam mehanizam njihovog delovanja na fiziologiju i druga agronomska svojstva do danas nije poznat. Pretpostavlja se da su ovi geni uključeni ne samo u tranziciju od vegetativnog ka reproduktivnom stadijumu već učestvuju u svim fazama razvoja klasa, izduživanju stabljike i određivanju vremena klasanja (Griffiths i sar., 2010; Lewis i sar., 2008).

U našem regionu koji pripada području sa umerenom klimom odnosno izraženom smenom godišnjih doba, gaje se sorte pretežno ozimog tipa koje imaju regulisan prelazak iz vegetativne u reproduktivnu fazu. Prelazak iz jedne faze u drugu kontrolisan je posebnim genetičkim parametrima, koji su integrisani endogenim faktorima i faktorima spoljašnje sredine. Genetička analiza arabidopsisa i drugih vrsta, otkriva veliki broj gena koji indukuju cvetanje, čiji posrednici su hormoni, temperatura (tj. proces vernalizacije), zatim kvalitet svetlosti (fotoperiod), i drugi spoljašnji faktori. Ovi geni se kodiraju u nekoliko paralelnih puteva kako bi regulisali aktivnost različitih integrator gena. Ekspresija ovih integratora iznad granične vrednosti, dovodi do cvetanja.

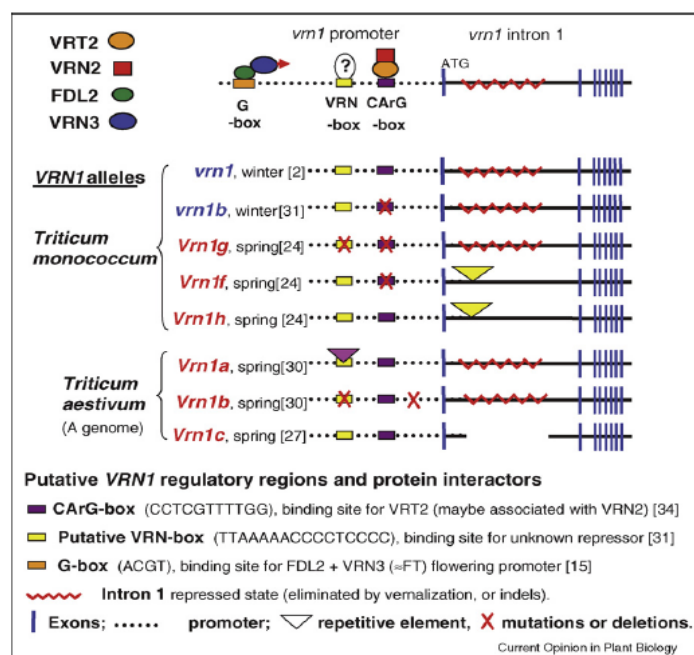
Najveći efekat u tranziciji iz vegetativne u reproduktivnu fazu imaju geni vernalizacije, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* i *Vrn-D1*, koji su pozicionirani na 5A, 5B i 5D hromozomima (Worland i Snape, 2001). Ozime pšenice moraju proći proces vernalizacije kako bi mogle da pređu u reproduktivnu fazu dok jarim sortama to nije neophodno. Genetičke varijacije između ozimih i jarih sorti uglavnom su uslovljene alelnim varijacijama u *VRN-1* lokusu. Jare sorte poseduju mutaciju u promotorskom regionu ili deleciju unutar prvog introna u *Vrn-1* genu (Yan i sar., 2003), što im omogućava da preskoče proces vernalizacije. Najvažniju ulogu u procesu prelaska iz vegetativne u reproduktivnu fazu imaju dva gena *VRN-1* i *VRN-2* geni, koji dele isti regulatorni put na šta ukazuju jake epistatičke interakcije.



Slika 1 Odnos *VRN1*, *VRN2* i *VRN3* gena u uslovima vernalizacije i fotoperioda

VRN-2 gen pšenice je transkripcijski faktor sa CCT domenom (poznatiji kao cinkovi prsti koji formiraju koordinatne veze sa jednim ili više jona cinka) čija se ekspresija smanjuje (engl. downregulation) tokom vernalizacije. Kod ozimih sorti, tokom procesa vernalizacije dolazi do povećane ekspresije (engl. up-regulation) gena VRN-1 (sličnog AP1 arabidopsisa) koja potom dodatno smanjuje ekspresiju VRN-2 (Slika 1). Biohemijski dokazi ukazuju da se VRN2 protein ne vezuje direktno za regulatorne regione VRN1 gena, ali se drugi represor cvetanja *TaVRT2*, gen MADS boksa, direktno vezuje za CarG motiv u VRN1 promotoru, što ukazuje da *TaVRT2* smanjuje transkripciju VRN-1 zajedno sa VRN-2 (Slika 2).

Ova dva gena pokazuju jake epistatičke interakcije što ukazuje da oni dele isti regulatorni put. Pored toga, i *Vrn-3* (na hromozomu 7B) ima važnu ulogu u aktivaciji cvetanja. Kod jarih linija koje su homozigotne za nefunkcionalne VRN-2 alele, varijacije u VRN-1 nemaju uticaj na vreme cvetanja. Kao i obrnuto, mutacije u promotoru ili prvom intronu VRN1 gena u potpunosti eliminišu ili smanjaju efekat VRN-2 i time ne zahtevaju vernalizaciju jarih sorti.



Slika 2. Potencijalni VRN1 regulatorni regioni i njihove varijacije kod različitih jarih alela (*Vrn1*) kod diploidnih i heksaploidnih vrsta pšenice. Mutirani ili deletirani domeni kod različitih alela (crveni krstić), insercije repetitivnih elemenata (obrnuti trougao različitih boja) (Distelfeld i sar., 2009)

Tako je ključni faktor kod žitarica koji promovira tranziciju iz vegetativne u reproduktivnu fazu gen *VRN1*. Indukcija *VRN1* je praćena smanjenom ekspresijom drugih gena, pre svega *VRN2* koji kada je aktivan sprečava transkripciju aktivnost FT (engl. flowering time) gena i produkciju mobilnog signala za cvetanje (Dennis i sar., 2009). Kod pšenice, insercija transpozabilnog elementa u promotor *VRN3* je povezana sa povećanjem nivoa *VRN3* transkripta. Transformacija ozimih biljaka sa ovakvim alelima povlači za sobom povećanje i *VRN1* transkripta, što dovodi do ranijeg cvetanja. Slično ovome, introgresija *VRN3* alela u ozimi ječam povećava *VRN1* i na taj način eliminiše zahteve za vernalizacijom, pri čemu se potvrđuje uloga da *VRN3* dovodi do povećane ekspresije *VRN1*.

Pored vernalizacije, tranzicija ka cvetanju je uslovljena i dugim danom, koja je determinisana genima *Ppd-A1*, *Ppd-B1* i *Ppd-D1*, koji se nalaze na homolognoj grupi 2. Kada su u ovim genima prisutni dominantni aleli pšenica je neosetljiva na fotoperiod, što dovodi do ranijeg klasanja u slučaju kratkog dana. Kod nosioca recesivnih alela cvetanje je kasnije osim ako se ne izlože dugom danu (Worland i sar., 1998)

Pored gena vernalizacije i fotoperioda i različite epigenetičke modifikacije mogu da spreče ekspresiju gena odgovornih za cvetanje. Jedan od epigenetičkih znakova jeste metilacija lizina (K27me3) na histonu H3, koja dovodi do utišavanja. Najvažnija odlika vernalizacijom indukovano cvetanja je sistem pamćenja kroz ćelijske generacije koji se odvija tokom mitoze. Histonska modifikacija se nasleđuje mitotičkom deobom prema definisanoj proceduri, tako da svaka sledeća generacija mora biti izložena niskim temperaturama kako bi prešle u sledeću reproduktivnu fazu. Detaljan mehanizam resetovanja kod žitarica nije poznat ali su identifikovane promene u histonskoj aktivnosti (Dennis i sar., 2009).

Genetičke mreže koje vode ka prelasku u reproduktivnu fazu su povezane i sa dve visoko konzervirane mikro RNK molekule: miR156 i miR172. MiR156 se vezuje za transkripte SPL (squamosa promoter binding protein-like) transkripcionih faktora. Prvobitno su identifikovani u proteinskom jedarnom ekstraktu cvasti preko njihovog konzerviranog DNK vezujućeg SBP domena i dokazano je da utiču na tranziciju iz juvenilnog u adultno stanje i dovode do početka cvetanja. MiR172 se vezuju za iRNK koje kodiraju proteine sa 2 APETALA2 (AP2) DNK vezujućim domenima. Ovi proteini regulišu i tranziciju u cvetanje i sam razvoj cveta.

Pored važnosti reproduktivnog procesa, prelazak iz vegetativne u reproduktivnu fazu je od velikog značaja kod ekonomski i agronomski važnih kultura. Prerano cvetanje može da dovede do smanjenja biomase i količine semena, dok produženi vegetativni stadijum može da uzrokuje povećanje biomase, ali istovremeno da dovede do smanjenja broja zrna kao i skraćenje perioda naliivanja zrna (Huijser i sar., 2011).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kako bi se unapredilo stvaranje novih sorti pšenice i/ili poboljšali postojeći genotipovi, pre svega u pogledu genetičkog potencijala za prinos, ukazala se potreba za uvođenjem molekularnog oplemenjivanja i njegovom integracijom sa klasičnim načinima oplemenjivanja pšenice. Primena molekularnih markera putem marker-asistirane selekcije bi omogućila efikasniji i jednostavniji odabir genotipova, koji bi poslužili kao roditelji u daljim ukrštanjima i procesu oplemenjivanja.

Na osnovu svega navedenog, postavljeni su sledeći ciljevi u ovoj tezi:

- Utvrđivanje osnovnih parametara genetičke varijabilnosti primenom mikrosatelitskih markera na oplemenjivačkom materijalu pšenice.
- Procena prisustva genetičke strukture u populaciji bazirane na molekularnim podacima.
- Analiza fenotipskih podataka svojstava klasa kao i važnih osobina odgovornih za adaptabilnost u toku pet vegetacionih sezona.
- Ispitivanje neravnoteže vezanosti (*linkage disequilibrium*) između hromozoma.
- Određivanje veza između mikrosatelitskih lokusa i odabranih osobina u svim ispitivanim godinama primenom asocijativnog mapiranja.
- Identifikovanje značajnih lokusa u većem broju ispitivanih godina tzv. stabilnih lokusa koji su odgovorni za ekspresiju ispitivanih svojstava, kao i utvrđivanje poželjnih alela u okviru ovih lokusa, koji imaju najveći i željeni uticaj na fenotipsku varijabilnost pojedinačnih osobina.
- Odabir genotipova koji su nosioci poželjnih alela za pojedine karakteristike klasa.

3. MATERIЈAL I METODI

3.1. Materijal i fenotipska ocena

Dugogodišnjim sakupljanje i stvaranjem linija i sorti pšenice u Odeljenju za strna žita formirana je genetička kolekcija, koja danas broji preko hiljadu genotipova. Ona predstavlja najveću genetičku kolekciju pšenice u Republici Srbiji u kojoj su genotipovi klasifikovani na osnovu specifičnih morfoloških, biohemijskih i genetičkih karakteristika sa akcentom na sledeća svojstva: kvalitet, otpornost na prevalentne bolesti, otpornost na niske temperature, arhitekturu klasa, ranostasnost, otpornost na poleganje i mnoge druge.

Iz celokupne genetičke kolekcije, u sprovedenom radu je izdvojeno i korišćeno u analizama 283 genotipa pšenice (*Triticum aestivum* L.) koji predstavljaju njen reprezentativni deo. Na osnovu višedecenijske fenotipske ocene u poljskim uslovima, ovi genotipovi su pokazali značajnu varijabilnost u pogledu niza ispitivanih agronomskih svojstava. Pored toga što su genotipovi pokazali izuzetnu varijabilnost u morfologiji klasa, genotipovi su izabrani i na osnovu geografskog porekla. Tako su genotipovi korišćeni u radu bili poreklom sa svih pet kontinenata, obuhvatajući čak 24 zemlje (Prilog 1). Najveći procenat sorti/linija, preciznije više od polovine 59,7% su poreklom sa evropskog kontinenta, dok je 20,8% pripadalo američkim sortama. Znatno manji procenat su činile azijske sorte sa 9,5%, dok je najmanje 1% zastupljeno afričkih i australijskih genotipova pšenice. Pored toga, u materijalu se nalazilo i 8,8% sorti nepoznatog porekla. Najveći deo materijala (34,6 % genotipova) predstavljaju elitne linije i sorte stvorene u Institutu, dok su preostali genotipovi pripadali različitim zemljama i oplemenjivačkim centrima širom sveta. Samo jedna izabrana sorta nije pripadala hleboj pšenici, nego spelta pšenici *Triticum spelta* var. *duhamelianum*, koja se prema nekim klasifikacijama i ubraja u podvrstu hlebne pšenice (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*).

Poljski ogledi su izvedeni na lokalitetu oglednih polja Rimski šančevi (45° 20' severne geografske širine i 19° 51' istočne geografske dužine) Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u toku vegetacionih sezona: 1994/95., 1995/96., 1996/97., 1997/98., 1998/99. Ogled je postavljan po slučajnom blok sistemu na parcelama veličine od 1,2 m². Svaka parcela je sejana u 6 redova sa razmakom od 20 cm između redova. Tokom

rasta i razvića biljaka beleženi su brojni parametri od kojih je izdvojeno osam svojstava klasa i to: **broj klasića po klasu**, **broj sterilnih klasića po klasu**, **broj zrna po klasu**, **dužina klasa**, **dužina vršne internodije**, **masa klasa**, **masa zrna po klasu**, **indeks klasa** kao i dva važna adaptivna svojstva **vreme klasanja** i **vreme cvetanja**. Svaka osobina je beležena u svim ispitivanim godinama, osim dužine vršne internodije koja je merena u 3 navedene godine 1997, 1998 i 1999. Osobine su beležene na sledeći način:

- **Broj klasića po klasu i broj sterilnih klasića po klasu** su određivani na uzorku od 20 nasumično odabranih klasova sa primarnih stabala.
- **Dužina klasa** je izražena u cm i merena je, od osnove do vrha klasa bez osja tokom faze sazrevanja.
- **Dužina vršne internodije** je izražena u cm i merena je od poslednjeg kolenca do osnove klasa tokom faze sazrevanja.
- **Masa klasa, masa zrna po klasu i broj zrna po klasu** su merene na 5 nasumično odabranih klasova.
- **Indeks klasa** predstavlja odnos između mase zrna po klasu i mase pojedinačnog klasa.
- **Vreme klasanja** je predstavljeno brojem dana od 1. januara do momenta kada je vidljivo 2/3 klasa izvan lista zastavičara na oko 50% biljaka na parceli.
- **Vreme cvetanja** je predstavljeno kroz broj dana od 1. januara do trenutka kada se uočavaju antere na 50% klasova na parceli.

3.2. Molekularna analiza

Isti materijal sastavljen od 283 genotipa koji je korišćen u fenotipskoj evaluaciji, poslužio je i za molekularnu analizu primenom mikrosatelitskih markera. Prema dostupnim literaturnim podacima, mikrosateliti su odabrani na osnovu pozicije u blizini gena ili lokusa za kvantitativna svojstva, a koja su pokazala vezu sa komponentama prinosa i/ili nekim drugim važnim agronomskim svojstvima pšenice (Roy i sar., 2006; Pozniak i sar., 2007; Sofalian i sar., 2008; Yao i sar., 2009; Golabadi i sar., 2011; Maccaferri i sar., 2011). Pored navedenog, prioritet su imali mikrosateliti raspoređeni

ravnomerno duž sva tri genoma, kao i locirani na pojedinačnim hromozomima. Osnovni podaci o mikrosatelitskim markerima preuzeti su iz postojeće baze podataka GrainGenes <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml> (Tabela 1).

Navedeni su prefiksi u nazivu mikrosatelita koji su korišćeni u radu, a predstavljaju institucije u kojima su dizajnirani: 1. *PSP* - the John Innes Centre (Bryan i sar., 1997); 2. *GWM* - IPK Gatersleben (Röder i sar., 1998; Pestsova i sar., 2000); 3. *WMC* - the Wheat Microsatellite Consortium (Gupta i sar., 2002); 4. *BARC* - Beltsville Agricultural Research Center, R. Ward (Song et al., 2005), USA; 5. *CFD* i *CFA* - INRA Clermont-Ferrand (Guyomarc'h i sar., 2002; Sourdille i sar., 2003, 2005).

Tabela 1. Mikrosatelitski marker i hromozom, sekvence prajmera i ponavljajući motiv

Redni broj	Mikrosateliti	Sekvence levog prajmera	Sekvence desnog prajmera	Motiv ponovka
1	CFA2086 (2A)	5' TCT ACT TTC AGG GCA CCT CG 3'	5' TCT CTC CAA ACC TCC CTG TAA 3'	(CA)21
2	WMC170 (2A)	5' ACA TCC ACG TTT ATG TTG TIG C 3'	5' TTG GTT GCT CAA CGT TTA CTT C 3'	(CA)19
3	GWM11 (1B)	5' GGA TAG TCA GAC AAT TCT TGT G 3'	5' GTG AAT TGT GTC TTG TAT GCT TCC 3'	(TA)6CATA(CA)19(TA)6
4	WMC44 (1B)	5' GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G 3'	5' TGT TGC TAG GGA CCC GTA GTG G 3'	(GT)35
5	GWM368 (4B)	5' CCA TTT CAC CTA ATG CCT GC 3'	5' AAT AAA ACC ATG AGC TCA CTT GC 3'	(AT)25
6	BARC124 (2A,2B)	5' TGC ACC CCT TCC AAA TCT 3'	5' TGC GAG TCG TGT GGT TGT 3'	(CT)19
7	CFD38 (6D)	5' TGG CCA TTC GAT ATT CAA AA 3'	5' GTG AGT TGA GGC GCA TGA TA 3'	(GA)32
8	WMC657 (4B)	5' CGG GCT GCG GGG GTA T 3'	5' CGG TTG GGT CAT TTG TCT CA 3'	-
9	WMC664 (3A)	5' GGG CCA ACA AAT CCA AT 3'	5' TCT ACT TCC TTC ATC CAC TCC 3'	-
10	WMC625 (3A,3B)	5' CAC AGA CCT CAA CCT CTT CTT 3'	5' AGT ACT GTT CAC AGC AGA CGA 3'	-
11	CFA2114 (6A)	5' ATT GGA AGG CCA CGA TAC AC 3'	5' CCC GTC GGG TTT TAT CTA GC 3'	(CA)32
12	BARC101 (2B)	5' GCT CCT CTC ACG ATC ACG AA AG 3'	5' GCG AGT CGA TCA CAC TAT GAG CCA ATG 3'	(TAA)9
13	WMC216 (1D)	5' ACG TAT CCA GAC ACT GTG GTA A 3'	5' TAA TGG TGG ATC CAT GAT AGC C 3'	(GT)22
14	GWM294 (2A)	5' GGA TTG GAG TTA AGA GAG AAC CG3'	5' GCA GAG TGA TCA ATG CCA GA 3'	(GA)9TA(GA)15
15	WMC166 (7B)	5' ATA AAG CTG TCT CTT TAG TTC G 3'	5' GTT TTA ACA CAT ATG CAT ACC T 3'	(GA)8(GT)8(GT)8
16	WMC18 (2D)	5' CTG GGG CTT GGA TCA CGT CAT T 3'	5' AGC CAT GGA CAT GGT GTC CTT C 3'	(CA)(CT)
17	GWM160 (4A)	5' TTC AAT TCA GTC TTG GCT TGG 3'	5' CTG CAG GAA AAA AAG TAC ACC C 3'	(GA)21
18	WMC154 (2B)	5' ATG CTC GTC AGT GTC ATG TTT G 3'	5' AAA CGG AAC CTA CCT CAC TCT T 3'	(GT)34
19	WMC413 (4B)	5' CAC TGG AAA CAT CTC TTC AAC T 3'	5' ACA GGA AAG GAT GAT GTT CTC T 3'	(GT)9
20	GWM257 (2B)	5' AGA GTG CAT GGT GGG ACG 3'	5' CCA AGA CGA TGC TGA AGT CA 3'	(GT)30
21	CFA2257 (7A)	5' GAT ACA ATA GGT GCC TCC GC 3'	5' CCA TTA TGT AAA TGC TTC TGT TTG A 3'	(TG)28
22	WMC83 (7A)	5' TGG AGG AAA CAC AAT GGA TGC C 3'	5' GAG TAT CGC CGA CGA AAG GGA A 3'	(GT)28
23	GWM148 (2B)	5' GTG AGG CAG CAA GAG AGA AA 3'	5' CAA AGC TTG ACT CAG ACC AAA 3'	(CA)22
24	PSP3200 (6D)	5' GTT CTG AAG ACA TTA CCG ATG 3'	5' GAG AAT AGC TGG TTT TGT GG 3'	(AAG)16
25	GWM181 (3B)	5' TCA TTG GTA ATG AGG AGA GA 3'	5' GAA CCA TTC ATG TGC ATG TC 3'	(GA)28
26	CFD71 (4A)	5' CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA 3'	5' TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC 3'	(CA)10(GA)30
27	WMC144 (2D)	5' GGA CAC CAA TCC AAC ATG AAC A 3'	5' AAG GAT AGT TGG GTG GTG CTG A 3'	(CA)14
28	GWM219 (6B)	5' GAT GAG CGA CAC CTA GCC TC 3'	5' GGG GTC CGA GTC CAC AAC 3'	(GA)35imp
29	WMC765 (5D)	5' GGG ATC AGA CTG GGA CTG GAG 3'	5' GGG TTG GCT TGG CAG AGA A 3'	-
30	CFD26 (5D)	5' TCA AGA TCG TGC CAA ATC AA 3'	5' ACT CCA AGC TGA GCA CGT TT 3'	-
31	WMC28 (5B)	5' ATC ACG CAT GTC TGC TAT GTA T 3'	5' ATT AGA CCA TGA AGA CGT GTA T 3'	(CA) (T) (CA) (GT) 29
32	CFD65 (1A)	5' AGA CGA TGA GAA GGA AGC CA 3'	5' CCT CCC TTG TTT TTG GGA TT 3'	(CT)32
33	GWM292 (5D)	5' TCA CCG TGG TCA CCG AC 3'	5' CCA CCG AGC CGA TAA TGT AC 3'	(CT)38
34	WMC167 (2D)	5' AGT GGT AAT GAG GTG AAA GAA G 3'	5' TCG GTC GTA TAT GCA TGT AAA G 3'	(CA)22(CA)8(CA)8
35	GWM271 (5B)	5' CAA GAT CGT GGA GCC AGC 3'	5' AGC TGC TAG CTT TTG GGA CA 3'	(CT)4imp(GA)10
36	GWM157 (2D)	5' GTC GTC GCG GTA AGC TTG 3'	5' GAG TGA ACA CAC GAG GCT TG 3'	(CT)14
37	WMC407 (2A)	5' GGT AAT TCT AGG CTG ACA TAT GCT C 3'	5' CAT ATT TCC AAA TCC CCA ACT C 3'	(GA)16
38	WMC333 (1A,6A)	5' TCA AGC ATA GGT GGC TTC GG 3'	5' ACA GCA GCC TTC AAG CGT TC 3'	(GT)15
39	WMC245 (2D,2B)	5' GCT CAG ATC ATC CAC CAA CTT C 3'	5' AGA TGC TCT GGG AGA GTC CTT A 3'	-
40	GWM494 (4A)	5' ATT GAA CAG GAA GAC ATC AGGG 3'	5' TTC CTG GAG CTG TCT GGC 3'	(CA)13

3.2.1. Ekstrakcija genomske DNK

Genomska DNK je izolovana prema modifikovanoj CTAB metodi (Doyle i Doyle, 1990). Od svakog genotipa je na naklijavanje stavljeno po deset semena. Posle nedelju dana, uzeto je oko 2 g tkiva mladih listova klijanaca. Nakon maceracije tkiva u prisustvu tečnog azota, uzorcima je dodato 500 µl CTAB pufera za ekstrakciju i stavljeni su na inkubaciju 30 min na 65°C. Zatim je smeši dodato 500 µl hloroform/izoamilalkohola u proporciji 24:1 i centrifugirana je 10 minuta na 11000 obrtaja u minuti. Supernatant koji je nastao tokom centrifugiranja prebačen je u nove kivete uz dodatak 350 µl ledenog izopropanola. Uzorci su mešani lagano inverzijom do pojave beličastih struktura DNK, nakon čega su centrifugirani 5 minuta na 10000 obrtaja. Nastali supernatant je uklonjen i dodato je 200 µl pufera za ispiranje. Posle centrifugiranja u trajanju od 3 min na 10.000 obrtaja, supernatant je pažljivo odstranjen, a DNK na dnu kivete je sušena u termobloku oko 30 minuta. Izolovana DNK je rastvorena u 50 µl TE pufera. Korišćena metoda za ekstrakciju DNK se pokazala izuzetno pogodna na šta je ukazao dobar prinos i čistoća izolata potvrđena tokom dalje kvantifikacije. Za dugotrajnije čuvanje uzoraka, genomska DNK je odložena na temperaturu od - 20°C.

3.2.2. Kvantifikacija DNK izolata

Za dalju DNK analizu, izolat je iskorišćen za kontrolu kvaliteta i kvantiteta DNK rastvora pre formiranja radne koncentracije. Merena je koncentracija i određivana čistoća izolovane DNK na spektrofotometru (MBA 2000 Perkin-Elmer). Određivanje koncentracije vršeno je na osnovu sledeće formule:

$$x(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260} * DF * 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}) / 1000$$

*DF –faktor razblaženja

Vrednost apsorbancije na talasnoj dužini UV svetlosti od 260 nm predstavlja maksimalne vrednosti absorbancije za dvolančanu DNK molekulu, dok je maksimalna

vrednost apsorpcije za proteine na talasnoj dužini od 280 nm. Odnos vrednosti apsorpcije na 260 nm i 280 nm jeste pokazatelj čistoće DNK izolata i optimalan je kada se vrednosti kreću u opsegu od 1,7 do 2,0. Vrednosti manje od 1,7 ukazuju na povećanu koncentraciju primesa kao što su fenoli, ulja, proteini itd., dok vrednosti iznad 2 ukazuju na povećanu koncentraciju RNK molekula.

3.2.3. Umnožavanje mikrosatelitskih lokusa

Pored navedenih genotipova koji su korišćeni za genotipizaciju, kao pozitivna kontrola u molekularnoj analizi korišćena je kineska sorta Chinese Spring. Ova reprezentativna sorta predstavlja jednu od najčešće korišćenih sorti u brojnim molekularnim i genetičkim istraživanjima. Prvobitno je izvršena optimizacija za 41 odabran mikrosatelitski marker na 16 nasumično odabranih genotipova različitog porekla, u cilju utvrđivanja funkcionalnosti samih markera. Mikrosateliti koji su pokazali zadovoljavajući stepen efikasnosti i polimorfnosti tokom lančane reakcije polimeraze (PCR) korišćeni su za dalju genotipizaciju čitavog seta genotipova. Lančane reakcije polimeraze postavljane su na mikrotitarskim pločama u zapremini od 10 µl. Svaka reakciona smeša je sadržala od 20 do 30 ng genomske DNK matrice, 1x razblaženi pufer, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 10 pmol fluorescentno obeleženog levog i neobeleženog desnog prajmera i jednu jedinicu *Taq* DNK polimeraze. Lančane reakcije polimeraze izvođene su na aparatu ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) prema uputstvima Roeder i sar. (1998). Detaljan opis PCR programa za svaki ispitivani marker predstavljen je u Tabeli 2.

Tabela 2. Mikrosatelitski markeri, programi sa temperaturama vezivanja pojedinačnih mikrosatelitskih prajmera

Markeri	Boja	Programi	Opis programa lančane reakcije polimeraze (PCR)		
WMC167	VIC	ann52	Predenaturacija 5 minuta na 94°C		
GWM181	PET	ann52	Denaturacija	30 s na 94°C	} 45 ciklusa
GWM11	6-FAM	ann52	Vezivanje prajmera	45s na 52°C	
WMC44	6-FAM	ann52	Ekstenzija	45s na 72°C	
WMC28	VIC	ann52	Završna ekstenzija 10 min na 72°C		
WMC83	PET	ann62			
GWM148	PET	ann62			
PSP3200	PET	ann62			
CFA2086	6-FAM	ann62			
WMC170	6-FAM	ann62			
CFA2114	NED	ann62			
GWM294	NED	ann62			
WMC18	NED	ann62	Predenaturacija 5 minuta na 94°C		
CFD71	PET	ann62			
GWM157	VIC	ann62	Denaturacija	30s na 94°C	} 45 ciklusa
WMC144	PET	ann62	Vezivanje prajmera	45s na 62°C	
WMC407	VIC	ann62	Ekstenzija	45s na 72°C	
WMC333	VIC	ann62			
GWM160	NED	ann62			
WMC154	NED	ann62	Završna ekstenzija10 min na 72°C		
GWM368	6-FAM	ann62			
CFD65	VIC	ann62			
GWM292	VIC	ann62			
GWM271	VIC	ann62			
			Predenaturacija 5 minuta na 94°C		
BARC101	NED	Touchdown	Denaturacija	30s na 94°C	} 10 ciklusa
		57-52	Vezivanje prajmera	30s na 57°C*	
			Ekstenzija	30s na 72°C	
WMC216	NED	Touchdown	* u svakom ciklusu temperatura je smanjena za pola stepena		
		57-52	Denaturacija	30s na 94°C	} 37 ciklusa
			Vezivanje prajmera	30s na 52°C	
WMC166	NED	Touchdown	Ekstenzija	30s na 72°C	
		57-52	Završna ekstenzija 10 min na 72°C		
			Predenaturacija 5 minuta na 94°C		
CFA2257	PET	Touchdown	Denaturacija	30s na 94°C	} 10 ciklusa
		63-59	Vezivanje prajmera	30s na 63°C	
			Ekstenzija	30s na 72°C	
GWM219	PET		* u svakom ciklusu temperatura je smanjena za pola stepena		
		Touchdown	Denaturacija	30s na 94°C	} 34 ciklusa
		63-59	Vezivanje prajmera	45s na 59°C	
			Ekstenzija	45s na 72°C	
			Završna ekstenzija 10 min na 72°C		

3.2.4. Analiza fragmenata

Produkti lančane reakcije polimeraze su analizirani na genetičkom sekvenatoru Genetic Analyzer - ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Za kapilarnu elektroforezu korišćen je polimer POP-4 koji se koristi za analizu fragmenata. Zapremina reakcije je iznosila 10 µl, u kojoj se nalazilo 2 µl smeše sa različito obojenim PCR produktima, 0,2 µl standarda za dužinu - GeneScan 500 LIZ i 7,8 µl Hi-Di formamida. Pre početka kapilarne elektroforeze, produkti su stavljeni na denaturaciju 5 min na temperaturu od 94°C kako bi se obezbedilo kretanje jednolančanih segmenata kroz kapilarni sistem. Podaci dobijeni analizom fragmenata prikupljeni su u programu DataCollection verzija 3.0., a potom je za obradu podataka korišćen softver GeneMapper verzija 4.0. (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

3.3. Statistička obrada

3.3.1. Genetički diverzitet

U cilju određivanja osnovnih parametara genetičke raznovrsnosti upotrebljena su dva programa: PowerMarker verzija 3.25 (Liu i Muse, 2005) i Excel MicrosatelliteToolKit verzija 3.1 (Park, 2001) koja su poslužila za određivanje ukupnog broja alela u ispitivanim lokusima, prosečnog broja alela po lokusu, frekvencije pojedinačnih alela, PIC vrednosti u pojedinačnim lokusima, očekivane i dobijene heterozigotnosti, Šenonovog informacionog indeksa, retkih alela i efektivnog broja alela. Prikazane su formule za najznačajnije parametre diverziteta:

Polymorphism Information Content (PIC) predstavlja najrelevantniju meru diverziteta (Botstein i sar., 1980), koja se izračunava prema datoj formuli:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

gde p_i predstavlja frekvenciju i -tog alela u populaciji.

Heterozigotnost (Nei, 1978) predstavlja proporciju heterozigotnih individua u populaciji. Heterozigotnost u pojedinačnom lokusu se izračunava prema sledećoj formuli:

$$H = 1 - \sum p$$

Genetički diverzitet (Nei, 1973) ili očekivana heterozigotnost se definiše kao verovatnoća da se dva nasumično odabrana alela u populaciji razlikuju.

Broj jedinstvenih alela predstavlja broj specifičnih alela koji se nalaze u pojedinim grupama (subpopulacijama) a nisu prisutni u drugim.

Broj retkih alela predstavlja broj alela čija frekvencija je manja od 5% u pojedinačnim lokusima.

Broj efektivnih alela (Ne) je procenjen za svaki ispitivani lokus i računa se na osnovu zajedničkih alela (Kimura i Crow, 1964). To je mera varijabilnosti lokusa koja uzima u obzir i broj alela i njegovu frekvenciju (p_i je frekvencija i -tog alela u populaciji)

$$Ne = 1 / (\sum p_i^2)$$

Šenonov informacijski indeks (I) se izračunava prema sledećoj formuli (Shannon i Weaver, 1949)

$$I = -1 * \sum (p_i * \ln(p_i))$$

3.3.2. Fenotipski podaci

Osnovni parametri fenotipske analize dobijeni su putem deskriptivne statistike, kao i fenotipske korelacije, a analizirani su u programu Statistika v.12. (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3.3.3. Struktura populacije

Za analizu strukture populacije korišćen je program **STRUCTURE** verzija 2.3.4. (Pritchard i sar., 2000) sa implementiranim Bajesovim algoritmom, koji je baziran na modelu. Analiza je vršena putem nekoliko simulacija sa različitim parametrima radi utvrđivanja optimalnog broja subpopulacija. Prema uputstvu programa odabran je mešoviti (engl. admixture) model zbog genotipova različitog porekla i nezavisnom

frekvencijom alela, koji se primenjuje za mikrosatelitsku analizu. Parametar lambda koji predstavlja rasprostranjenje frekvencije alela je iznosio jedan. Dužina trajanja analiza i broj ponavljanja MCMC (Markov Chain Monte Carlo) su postavljeni na 100000. Struktura je procenjena na osnovu hipotetičkog broja klastera (K) koji se kretao od 1 do 20. U analizi su korišćena tri ponavljanja. Broj subpopulacija je određen na osnovu poređenja logaritamskih vrednosti verovatnoća $Pr [X|K]$. Dodatna korekcija dobijenih vrednosti je urađena prema metodi Evanno i sar. (2005) u cilju dobijanja relevantnijeg broja subpopulacija. Na osnovu jednog od gore pomenutih kriterijuma (verovatnoće ili ΔK) genotipovi su raspoređeni u odgovarajuće podgrupe na osnovu vrednosti koeficijenta, koji je bio jednak ili veći od 0,5. Dobijene srednje vrednosti verovatnoće za definisan broj subpopulacija korišćene su za formiranje Q matrice, koja je upotrebljena za dalju analizu veze marker-svojstvo u programu TASSEL verzija 2.1. (Bradbury i sar., 2007).

Za dodatno određivanje unutrašnje strukture populacije upotrebljena je i analiza glavnih koordinata **PCoA analiza** (engl. Principal Coordinates Analysis) u programu GenAlEx verzija 6.5. (Peakall i Smouse, 2012) primenom matrica udaljenosti sa standardizovanim podacima.

Na osnovu rezultata dobijenih u programu STRUCTURE konstruisani su dendrogrami za svaku pojedinačnu subpopulaciju pomoću NJ algoritma (Neighbour-Joining) u programu *Tassel* verzija 2.1. Formiranje stabala primenom NJ algoritma dobijena su neukorenjena stabla (engl. unrooted) prema jednostavnom substitucionom modelu, a koja su znatno preciznija od UPGMA modela.

Genetičke distance dobijene na osnovu polimorfnih markera u programu PowerMarker iskorišćene su za konstruisanje UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) dendrograma u programu **Dendroscope** koji je specijalizovan za prikazivanje filogenetskog stabla (Huson i sar., 2007).

Razlike unutar i između definisanih populacija su procenjene i putem analize molekularne varijanse (AMOVA - engl. Analysis of **M**olecular **V**ariance) na osnovu matrica udaljenosti u programu GenAlEx verzija 6.5. Genetička udaljenost između dobijenih potpopulacija je utvrđena na osnovu matrica genetičke udaljenosti.

Podaci o dostupnim pedigreeima su preuzeti iz baze <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree> podataka (Prilog 1) i korišćeni su za dodatno objašnjenje prisustva genotipova različitog porekla u okviru pojedinih klastera.

3.3.4. Analize u programu TASSEL v.2.1.

Trait Analysis by aSSociation, Evolution, and Linkage - **TASSEL** verzija 2.1. (Bradbury i sar., 2007) je softverski program koji poseduje višenamenske funkcije, a korišćen je za analizu veze marker-svojstvo primenom dva različita modela - GLM i MLM (Yu i sar. 2006), za analizu neravnoteže vezanosti tj. LD (linkidž disekvilibrjuma), za klaster NJ analizu (gore navedeno), i za vizualizaciju analiza frekvencije alela koji su dostupni u Prilogu 2.

3.3.4.1. LD - linkage disequilibrium

Neravnoteža vezanosti (**LD**) između SSR markera je procenjena u programu *Tassel* verzija 2.1 pri čemu su markeri sa frekvencijom manjom od 1% isključeni iz dalje analize. Nivo značajnosti parova LD je izračunata na osnovu hiljadu permutacija. LD je analiziran samo između interhromozomskih parova zbog malog broja markera smeštenih na istom hromozomu. LD analiza je urađena odvojeno za populaciju u celini i za potpopulacije koje su dobijene analizom u programu *Structure*. LD analizom su dobijeni sledeći parametri D' , r^2 i p (vrednosti $p < 0,01$ su prikazane kao statistički značajne vrednosti). Parametar D' je standradizovani koeficijent disekvilibrjuma (neravnoteže) koji određuje rekombinacije između alelnih parova, dok r^2 predstavlja vrednost korelacije alelne frekvencije između alela u dva lokusa i koristan je parametar za evaluaciju rezolucije asocijativnog pristupa. Većina mapirajućih istraživanja na biljkama koriste r^2 za kvantifikaciju LD jer je važan parametar korelacije između markera i QTL. Vrednosti r^2 od 0,1 ili 0,2 su donja granica značajnih asocijacija između lokusa i opisuju maksimum genetičke i fizičke udaljenosti pri kojoj je LD značajan.

3.3.4.2. Veze marker -svojstvo primenom GLM

U programu TASSEL omogućeno je korišćenje linearnog modela za testiranje asocijacija između odvojenih lokusa i fenotipa. GLM analiza koristi strukturu populacije (Q matricu) kao kovarijanse koje prikazuju stepen srodstva u osnovnoj populaciji. Glavni efekti samog modela su automatski i koriste sve varijable ulaznih podataka. Faktori, kovarijanse, ponavljanja ili lokacije su uključeni u svaki model kao glavni efekti. Osnovni parametar asocijativne analize jeste vrednost R^2 koja predstavlja efekat QTL, odnosno procenat fenotipske varijabilnosti određenog svojstva.

3.3.4.3. Veze marker - svojstvo primenom MLM

Pored GLM modela u programu je omogućeno korišćenje mešovitog linearnog modela, koji je unapređen korišćenjem EMMA algoritma (Kang i sar., 2008) da bi se povećala brzina izračunavanja i statistička moć asocijativne analize. U okviru programa postoji i dodatna metoda P3D (Zhang i sar., 2010) koja optimizuje komponente varijansi i obezbeđuje skeniranje velikog broja markera. Mešoviti model uključuje i fiksne i nasumične efekte. Uključivanjem nasumičnih efekata MLM pruža mogućnost da uvrsti u analizu i informacije o srodstvu između individua udruživanjem Q i K matrice. K matrica, odnosno matrica srodnosti formirana je takođe u programu *Tassel* na osnovu molekularnih podataka, a poslužila je u daljoj analizi veze marker-svojstvo primenom ovog modela. Na ovaj način se povećava statistička moć rezolucije u odnosu na primenu samo Q matrice u GLM modelu.

Za oba modela predstavljeni su nivou značajnosti za vrednosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

3.3.4.4. Identifikacija favorizovanih alela

U okviru MLM modela procenjen je fenotipski efekat pojedinačnih alela poređenjem prosečne fenotipske vrednosti svih individua sa specifičnim alelom i svih ispitivanih genotipova, na osnovu sledeće formule:

$$a_i = \sum x_{ij}/n_i - \sum N_k/n_k$$

gde je a_i fenotipski efekat i-tog alela, x_{ij} je fenotipska vrednost određenog genotipa sa i-tim alelom; n_i je broj genotipova sa i-tim alelom; N_k je fenotipska vrednost u svim individuama, n_k je broj genotipova. Ako je vrednost $a_i > 0$, alel ima pozitivan efekat, a kada je $a_i < 0$, fenotipska vrednost je negativna (Mei i sar., 2013). Najpovoljniji aleli su identifikovani prema ciljevima oplemenjivanja za svaku pojedinačnu osobinu koja je pokazala stabilnost u više od tri ispitivane godine.

4. REZULTATI

4.1. Genetički diverzitet

Nakon optimizacije lančane reakcije polimeraze, 30 mikrosatelitskih markera je pokazalo zadovoljavajući nivo polimorfnosti i korišćeni su za molekularnu genotipizaciju 284 genotipa pšenice. Zbog prisustva nespecifičnih produkata 11 mikrosatelita je izuzeto iz naknadnih analiza. Analizom 30 mikrosatelitskih lokusa utvrđeno je prisustvo ukupno 349 alelnih varijanti (Tabela 3). Najmanji broj alela (3) je detektovan u lokusu *Xwmc333* koji se nalazi na hromozomu 1A, dok je najveći broj alela (24) otkriven u lokusu *Xcfa2086* koji se nalazi na 2A hromozomu. Prosečan broj alela po lokusu iznosio je 11,5. Frekvencija najučestalijeg alela se kretala od 0,17 identifikovana u lokusu *Xgwm219* do 0,83 u lokusu *Xgwm157*.

Vrednost polimorfnosti za pojedinačne lokuse tj. PIC vrednost se kretala od 0,30 u lokusu *Xgwm157* do maksimalne vrednosti od 0,90 utvrđene u lokusu *Xcfa2086*. Prosečna PIC vrednost u svim ispitivanim lokusima je iznosila 0,68. U istim lokusima su detektovane maksimalne i minimalne vrednosti očekivane heterozigotnosti i iznosile su 0,90 i 0,31. Prosečna vrednost genetičkog diverziteta iznosila je 0,72. Od ukupnog broja analiziranih lokusa, u 11 mikrosatelitskih lokusa nije detektovan heterozigotni alel. Najveća heterozigotnost uočena je u lokusu *Xwmc170* sa 21,8% heterozigota. Ukupan broj retkih alela sa frekvencijom manjom od 5% u svim ispitivanim lokusima je bio čak 57,3%. Najviše detektovanih retkih alela (16) bilo je u lokusu u kome je otkriven i najveći broj alela, dok u lokusu *Xwmc166* nije uočeno prisustvo retkih alela. Prisustvo nultog alela utvrđeno je u 21 ispitivanom lokusu. Šenonov informacijski indeks se kretao u opsegu od 0,47 (*Xgwm157*) do 2,07 (*Xcfa2086*), dok je prosečna vrednost iznosila 1,38. Vrednosti efektivnog broja alela varirale su od 1,34 (*Xgwm157*) do 6,44 (*Xcfa2086*). Prosečan broj efektivnih alela u svim lokusima iznosio je 3,69.

Najveći broj ispitivanih markera pripadao je linkidž (hromozomskoj) grupi 2 sa ukupno 11 SSR markera, dok je trećoj hromozomskoj grupi pripadao samo jedan ispitivani marker. Posmatrajući homeologne grupe hromozoma, najveći broj prosečno detektovanih alela po lokusu, 14,3 je detektovan u četvrtoj grupi, a samo 6,3 identifikovano je u 7 homeolognoj grupi.

Frekvencija pojedinačnih alela u svim mikrosatelitskim lokusima prikazana je na grafikonima (Prilog 2).

Tabela 3. Osnovni pokazatelji genetičkog diverziteta dobijeni molekularnom analizom 283 genotipa pšenice u PowerMarker v.3.25 i Excel Mikrosatellite Kit v.3.1 programu

SSR markeri	Hromozom	Broj alela	Frekvencija najučestalijeg alela	PIC	Genetički diverzitet (očekivan a heteroz.)	Heteroz igotnost (%)	Veličina alela	Broj retkih alela	Šenonov informacijski indeks	Efektivni broj alela
<i>CFD65</i>	1A	10	0,27	0,73	0,78	0,4	180-202, multi	5	1,43	3,67
<i>WMC333</i>	1A	3	0,51	0,40	0,52	0	157-161	1	0,72	1,94
<i>CFA2086</i>	2A	24	0,19	0,90	0,91	0,4	207-275, multi	16	2,07	6,44
<i>WMC170</i>	2A	10	0,37	0,70	0,74	21,8	182-226, multi	5	1,37	3,20
<i>GWM294</i>	2A	19	0,23	0,86	0,87	0,4	65-111	12	1,99	6,04
<i>WMC407</i>	2A	11	0,38	0,74	0,77	0,4	121-153	7	1,57	4,00
<i>CFD71</i>	4A	16	0,18	0,88	0,89	0,7	169-207, multi	9	1,90	5,86
<i>GWM160</i>	4A	8	0,25	0,79	0,81	0,4	166-186, multi	2	1,37	3,49
<i>CFA2114</i>	6A	12	0,24	0,84	0,86	0	199-221, multi	5	1,67	4,45
<i>WMC333</i>	6A	6	0,47	0,55	0,63	0	161-183	3	1,08	2,60
<i>CFA2257</i>	7A	6	0,57	0,43	0,53	2,1	123-141	4	0,81	2,00
<i>WMC83</i>	7A	9	0,29	0,80	0,82	0	151-165, multi	3	1,70	4,69
<i>GWM11</i>	1B	11	0,30	0,80	0,83	0	184-206, multi	5	1,53	3,87
<i>WMC44</i>	1B	21	0,38	0,80	0,82	1,4	204-266, multi	15	1,76	4,39
<i>GWM148</i>	2B	11	0,27	0,79	0,81	1,1	140-168, multi	5	1,60	4,25
<i>BARC101</i>	2B	10	0,54	0,62	0,66	1,1	102-130, multi	6	1,00	2,24
<i>WMC154</i>	2B	15	0,22	0,82	0,84	0,4	117-161	9	1,76	5,11
<i>GWM181</i>	3B	19	0,23	0,83	0,85	17,6	117-157, multi	14	1,83	5,21
<i>GWM368</i>	4B	19	0,39	0,77	0,79	0	202-258, multi	12	1,75	4,98
<i>WMC28</i>	5B	10	0,36	0,71	0,75	0	177-203, multi	6	1,46	3,65
<i>GWM271</i>	5B	7	0,53	0,63	0,66	0,4	142-166, multi	2	0,78	2,04
<i>GWM219</i>	6B	15	0,17	0,88	0,89	0	163-195, multi	7	1,85	5,38
<i>WMC166</i>	7B	4	0,63	0,51	0,55	0	306-310, multi	0	0,77	1,84
<i>WMC216</i>	1D	12	0,79	0,35	0,36	0,4	106-132, multi	11	0,76	1,66
<i>WMC167</i>	2D	13	0,65	0,52	0,55	2,8	141-191	10	0,99	2,11
<i>WMC18</i>	2D	14	0,28	0,83	0,85	0,4	218-248, multi	6	1,70	4,73
<i>GWM157</i>	2D	7	0,83	0,30	0,31	1,4	77-107	4	0,47	1,34
<i>WMC144</i>	2D	6	0,58	0,43	0,52	0	137-157	4	0,80	1,99
<i>GWM292</i>	5D	14	0,34	0,78	0,80	0	196-222, multi	9	1,66	4,49
<i>PSP3200</i>	6D	7	0,39	0,70	0,74	2	159-177, multi	3	1,28	3,16
Ukupno		349						200		
Prosek		11,5	0,39	0,69	0,72	2			1,38	3,69

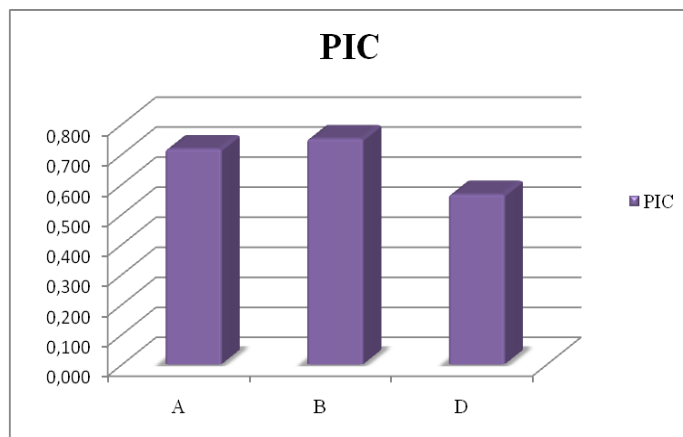
4.2. Parametri genetičkog diverziteta po genomima

Najveći broj ispitivanih markera pripadao je genomu A sa ispitivanih 12 mikrosatelita, 11 markera je pripadalo B genomu, a samo 7 markera je bilo poreklom sa D genoma (Tabela 4).

Tabela 4. Parametri diverziteta u pojedinačnim genomima

Genetički diverzitet	A genom	B genom	D genom	Prosek/ Ukupno
Broj lokusa	12	11	7	30
Broj alela	134	142	73	349
Broj alela/lokusu	11,2	12,9	10,4	11,5
Broj retkih alela	72	81	47	200
Šenonov indeks	1,47	1,46	1,09	1,38
Efektivan broj alela	4,03	3,90	2,78	3,69
Genetički diverzitet	0,76	0,77	0,59	0,72

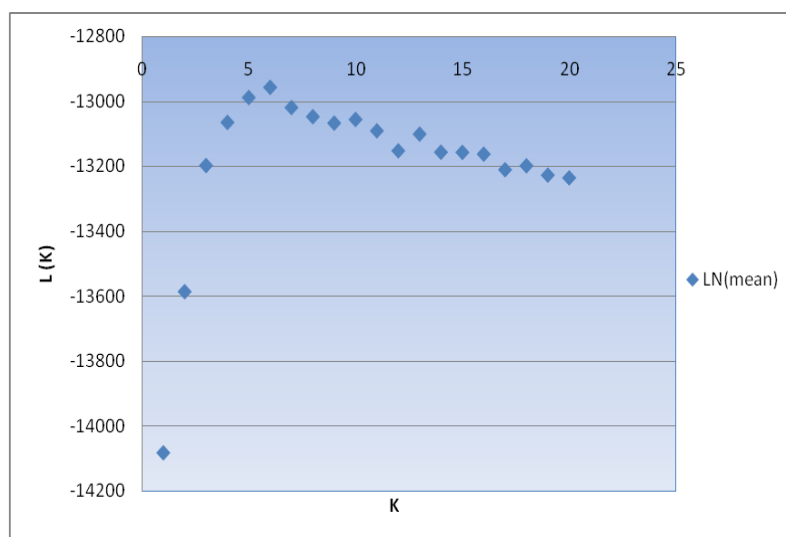
Najveći broj alela je detektovan u okviru B genoma i iznosio je 142, dok je najmanji broj alela (73) detektovan analizom lokusa na D genomu. Najveći prosečan broj alela po lokusu (12,9) je otkriven na B genomu dok je u okviru D genoma utvrđen najmanji broj sa 10,4 alela po lokusu. Najveći efektivan broj alela je pronađen u A genomu (4,03) dok je najmanji iznosio 2,78 i utvrđen je u okviru D genoma. Prosečne vrednosti polimorfnosti (PIC) u okviru pojedinačnih genoma su se kretale od 0,74 u B genomu, zatim 0,72 u A genomu i 0,56 u D genomu (Slika 3).



Slika 3. Histogram prosečnih PIC vrednosti u pojedinačnim genomima

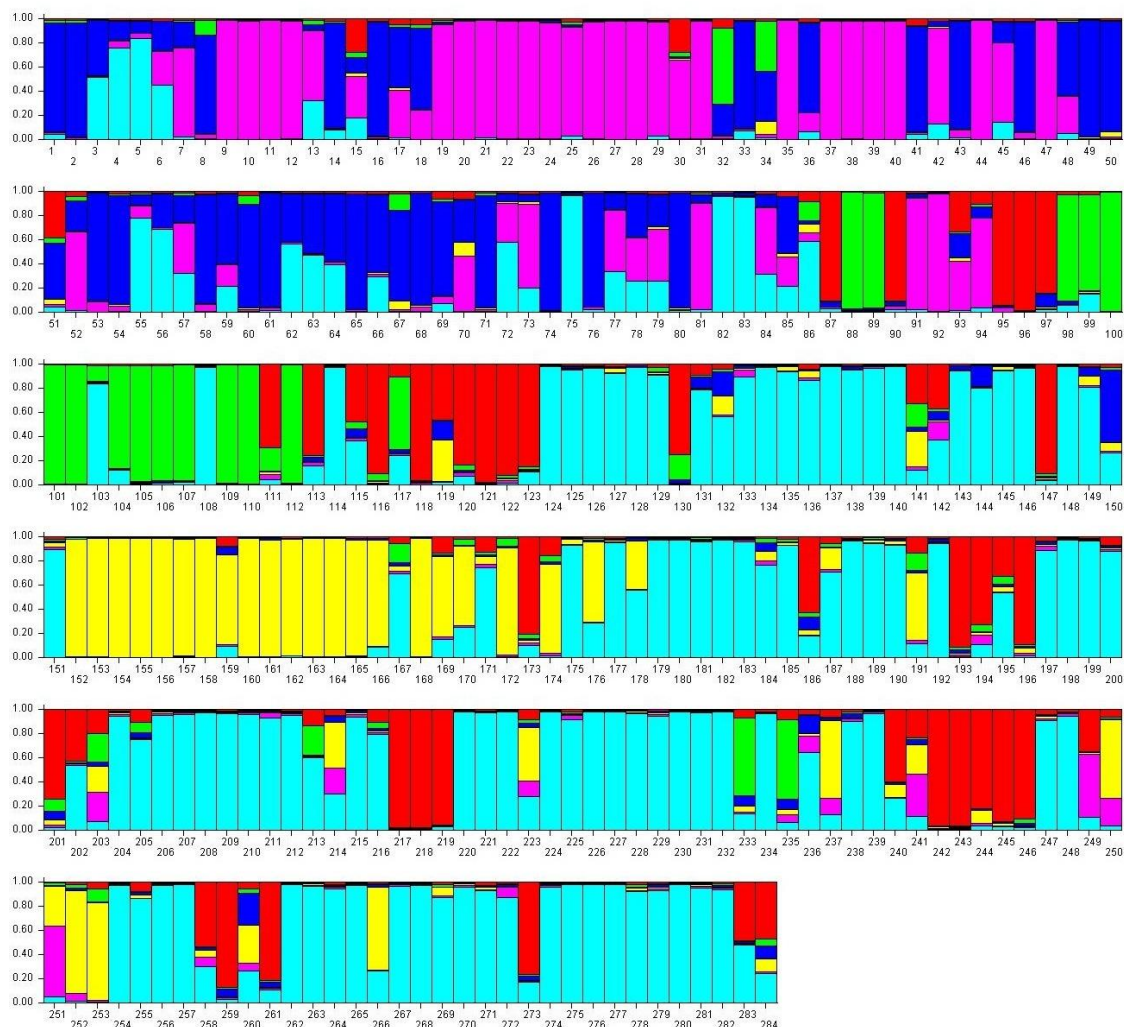
4.3. Struktura populacije

Analizom genetičke strukture populacije u programu STRUCTURE utvrđeno je prisustvo šest subpopulacija na osnovu vrednosti verovatnoće (Slika 4).



Slika 4. Prikaz logaritamske verovatnoće $L(K)$ u funkciji hipotetičkog broja subpopulacija (K) dobijen u programu Structure v.2.3.4.

U svaku pojedinačnu potpopulaciju genotipovi su raspoređeni na osnovu verovatnoće čija vrednost je bila jednaka ili veća od 0,5 (Slika 5). Kod 22 genotipa dobijene vrednosti su bile nešto manje od 0,5, ali su na osnovu najpribližnijih vrednosti raspoređeni u jednu od 6 postojećih potpopulacija.



Slika 5. Grupisanje genotipova u šest subpopulacija dobijenih u programu Structure korišćenjem Bajesovog algoritma na osnovu vrednosti verovatnoće. Prikazane su grupe obeležene sledećim bojama sa pripadajućim brojem genotipova u svakoj subpopulaciji: Q1-tamno plava (37), Q2-roza (45), Q3-zelena (18), Q4- žuta (30), Q5-svetlo plava (114), Q6-crvena boja (40).

U klasteru **Q1** raspoređeno je 37 genotipova koji su bili najraznovrsniji po poreklu obuhvatajući sorte sa svih kontinenata. Od ukupnog broja, 12 sorti je bilo poreklom iz Srbije, 4 su bile japanske, po tri genotipa je pripadalo oplemenjivačkim centrima iz Australije, Moldavije i Meksika, dve sorte su poreklom iz Amerike i Kine, i po jedna sorta je bila iz Argentine, Francuske, Mađarske, Italije, Zimbabvea, Rumunije, Rusije i Ukrajine.

Subpopulacija **Q2** se sastojala od 45 sorti pretežno poreklom iz Engleske (16) i Francuske (7), uz prisustvo manjeg broja italijanskih (5), srpskih (4), meksičkih (3), američkih (3), kineskih (1), austrijskih (1), mađarskih (1) i 4 sorte su imale nepoznato poreklo.

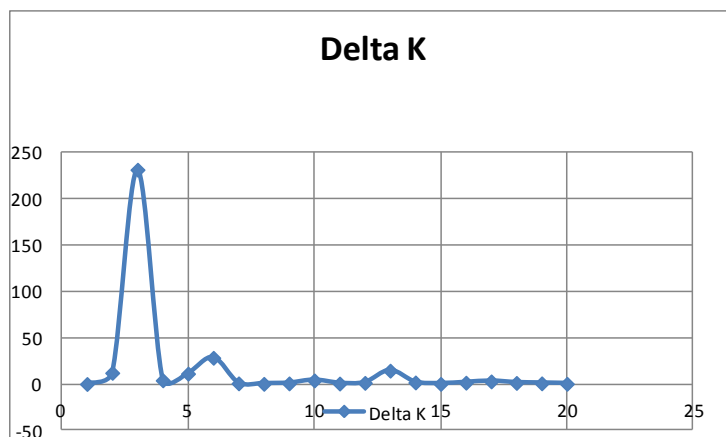
Najmanji klaster **Q3** je sačinjen od samo 18 genotipova od kojih je 15 pripadalo američkim sortama. Preostala tri su bila iz oplemenjivačkih centara iz Bugarske, Srbije i Hrvatske.

Klaster **Q4** je posedovao 30 genotipova od kojih je većina pripadala hrvatskim sortama (16). Znatno manji broj je bilo američkih (5), srpskih (3), zatim 2 italijanske i po jedna sorta iz Austrije, Mađarske, Rusije i jedna sorta nepoznate zemlje porekla.

Najveća subpopulacija (**Q5**) je imala ukupno 114 genotipova. Približno 80% ove subpopulacije su činili genotipovi stvoreni u Srbiji, dok su preostale sorte vodile poreklo iz Rusije (8), Italije (4), Amerike (4), Makedonije (3), po dve iz Bugarske, Kine, Ukrajine, Hrvatske i Moldavije kao i po jedna sorta poreklom iz Rumunije, Češke i Francuske.

Subpopulaciju **Q6** je činilo 40 genotipova od kojih je 50% bilo američkih sorti sa predstavnicima iz Srbije (9), dve sorte iz Mađarske i po jedna sorta iz Francuske, Čilea, Kolumbije, Južnoafričke Republike i Meksika.

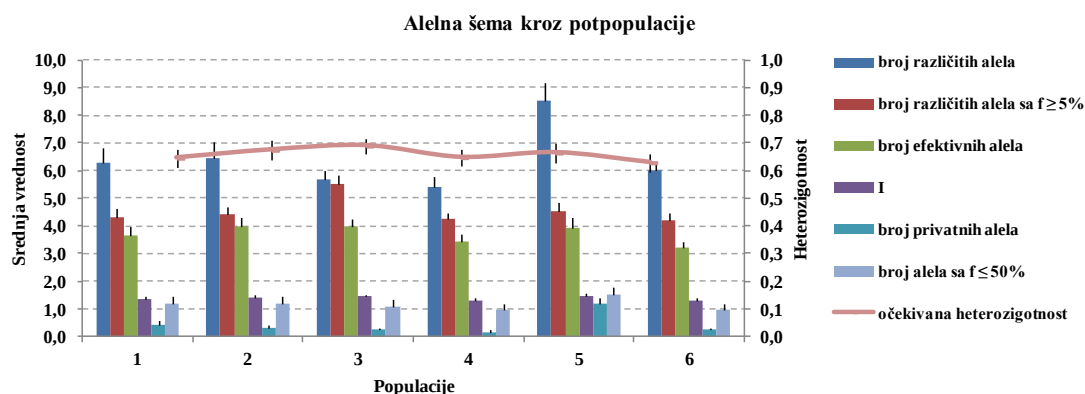
Evanno i sar. (2005) predlažu korekciju broja podgrupa dobijenih na osnovu verovatnoće. Matematičkom korekcijom dobijen je parametar ΔK koji je pokazao najveću vrednost (maksimalan pik) i grupisanje ispitivanih genotipova u tri subpopulacije (Slika 6).



Slika 6. Procena broja subpopulacija prema uputstvu Evanno i sar. (2005)

4.3.1. Parametri genetičkog diverziteta u potpopulacijama

Na osnovu rezultata dobijenih u programu Structure predstavljeni su osnovni parametri genetičkog diverziteta prikazani kroz pojedinačne potpopulacije (Slika 7).



Slika 7. Parametri genetičkog diverziteta u pojedinačnim potpopulacijama

Najveći prosečan broj alela i najviše detektovanih jedinstvenih alela uočeno je u Q5 potpopulaciji (Tabela 5). Vrednosti efektivnog broja alela i Šenonovog indeksa su bile ujednačene u pojedinačnim potpopulacijama. Srednja vrednost fiksacionog indeksa je iznosila 0,97.

Tabela 5. Parametri genetičkog diverziteta u pojedinačnim potpopulacijama

Potpopulacije/parametri diverziteta	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
Prosečan broj alela	6,27	6,47	5,67	5,40	8,53	6,00
Broj jedinstvenih alela	13/0,43	9/0,30	7/0,23	5/0,17	35/1,17	7/0,23
Efektivni broj alela	3,63	3,97	3,97	3,44	3,94	3,21
Šenonov informacioni indeks	1,35	1,42	1,43	1,31	1,47	1,30
Dobijena heterozigotnost	0,65	0,67	0,69	0,65	0,66	0,63
Fiksacioni indeks	0,97	0,98	0,96	0,97	0,97	0,96

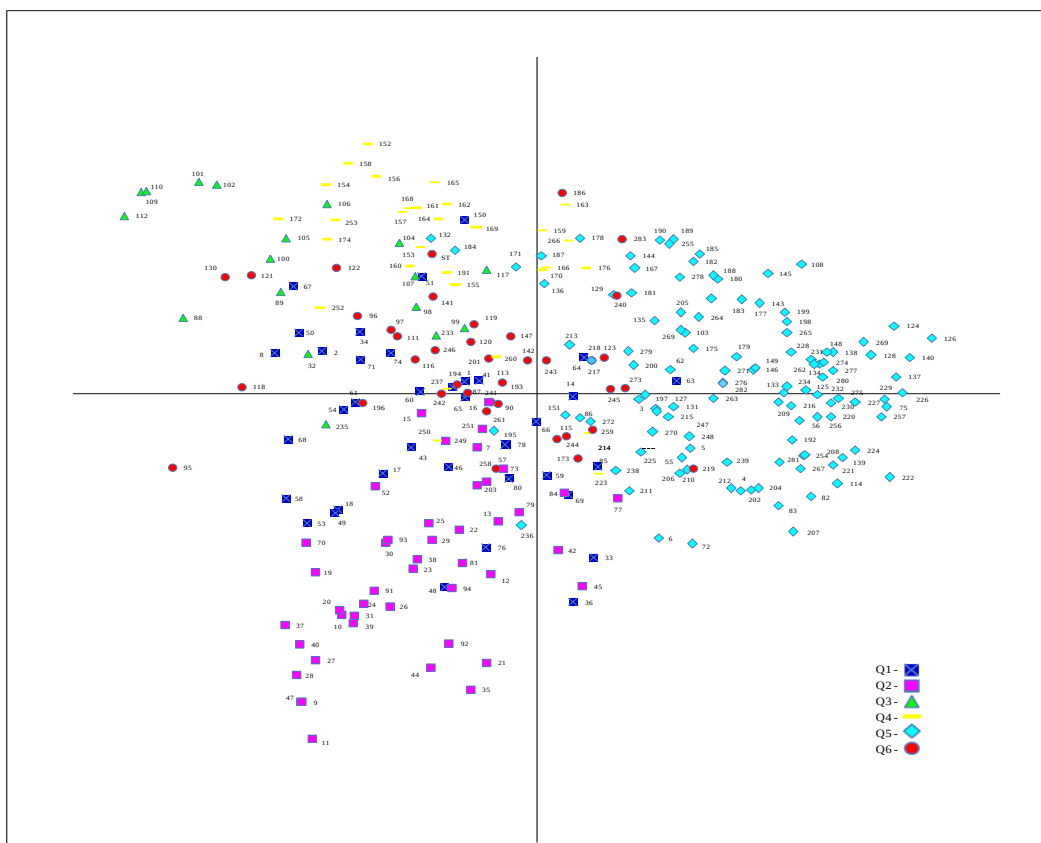
4.3.2. Genetička udaljenost između potpopulacija

Najveća vrednost genetičke distance je utvrđena između subpopulacije Q1 i Q4 i iznosila je 0,37, a najmanja udaljenost 0,06 je postojala između Q5 i Q6 subpopulacija (Tabela 6).

Tabela 6. Genetička udaljenost između potpopulacija

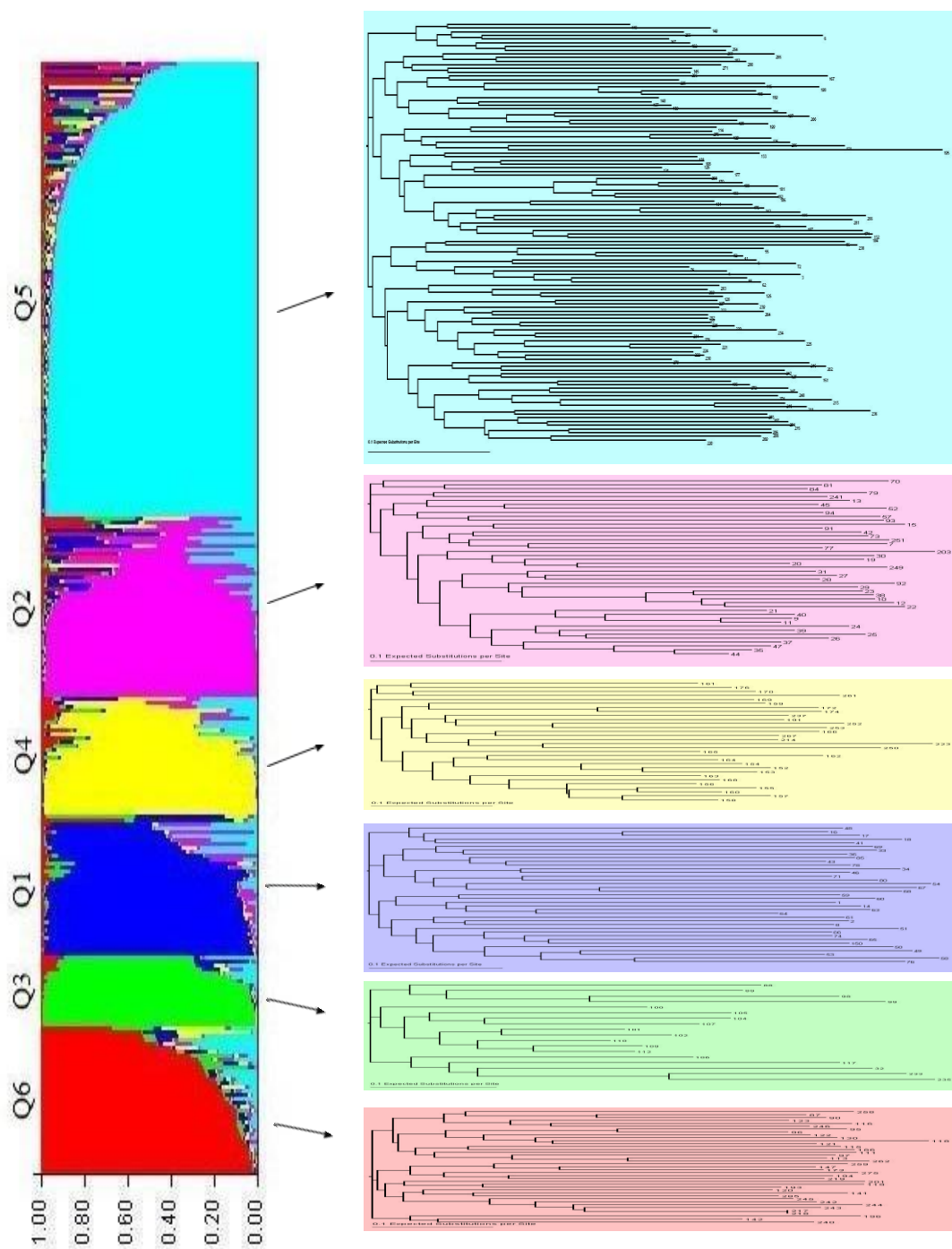
Potpopulacije	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
Q1	0,00					
Q2	0,13	0,00				
Q3	0,20	0,18	0,00			
Q4	0,37	0,31	0,19	0,00		
Q5	0,31	0,21	0,23	0,17	0,00	
Q6	0,32	0,26	0,25	0,22	0,06	0,00

Unutrašnja genetička struktura je urađena i primenom analize glavnih koordinata tj. *PCoA* analizom koja je pokazala slično grupisanje sa dobijenim rezultatima u programu Structure (Slika 8). Najudaljenije grupe u koordinatnom sistemu su bile subpopulacije Q5, Q2 i Q3. Takođe, genotipovi poreklom iz Hrvatske iz klastera Q4 su se grupisali nezavisno u odnosu na ostale podgrupe. Genotipovi iz Q1 i Q6 klastera pokazali su neravnomeran raspored u dvodimezionalnom sistemu.



Slika 8. Raspored 284 genotipa u okviru 6 subpopulacija u dvodimenzionalnom sistemu urađen u GenAlex programu.

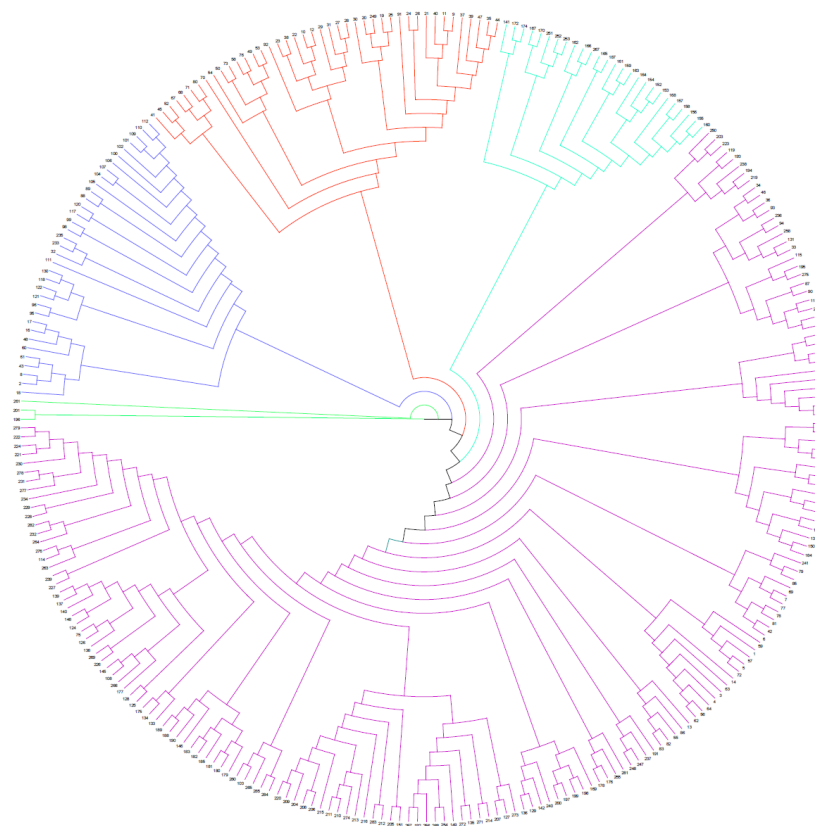
Pojedinačni klasteri dobijeni analizom u STRUCTURE softveru su poslužili za dobijanje kladograma primenom NJ algoritma u programu Tassel (Slika 9). U okviru svih šest subpopulacija uočava se grupisanje u dodatne potklasterne.



Slika 9. Levo - distribucija genotipova u šest subpopulacija analizom u programu STRUCTURE. Desno - dodatno grupisanje pojedinačnih klastera primenom NJ algoritma u programu Tassel

Na osnovu rezultata dobijenih u PowerMarkeru na osnovu genetičke distance u programu Dendroscope je dobijeno grupisanje u pet potklastera (Slika 10) U najmanjem potklasteru je bilo samo tri genotipa od kojih je jedan genotip *Triticum spelta* var.

duhamelianum, koja se izdvaja u posebnu podvrstu hlebne pšenice. U klasteru označenom svetlo plavom bojom se nalaze svi genotipovi poreklom iz Hrvatske (uz nekoliko sorti iz Austrije i SAD-a), koji odgovaraju Q4 klasteru iz programa Structure. Potklaster označen crvenom bojom u velikoj meri odgovara klasteru Q2 sa genotipovima poreklom iz Velike Britanije i Francuske, uz prisustvo manjeg broja genotipova iz Italije, Srbije, Japana i Mađarske. U tamnoplavom klasteru nalaze se genotipovi poreklom iz SAD, a podudaraju se sa grupom Q3. Veliki udeo u najvećem potklasteru čine genotipovi poreklom iz Srbije.



Slika 10. Klaster analiza 284 genotipa zasnovana na genetičkoj distanci 30 polimorfnih SSR markera.

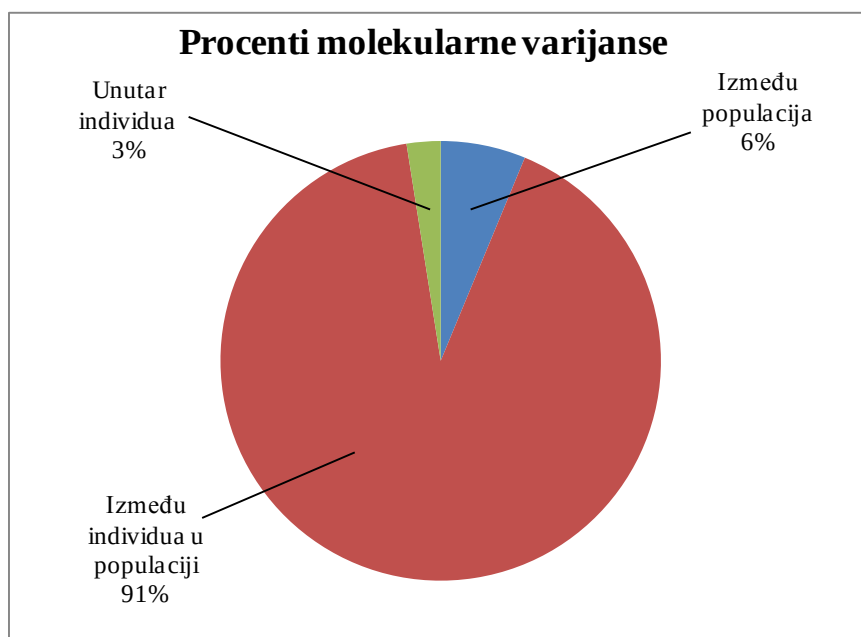
4.4. Molekularna analiza varijanse (AMOVA)

U cilju utvrđivanja udela genetičkog variranja unutar i između dobijenih subpopulacija urađena je analiza molekularne varijanse (Tabela 7).

Tabela 7. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA)

Izvor variranja	Stepeni slobode	Suma kvadrata	Sredina zbira kvadrata	Procenjena varijansa	%
Između populacija	5	400,58	80,12	0,69	6%
Između individu unutar populacija	278	5682,71	20,44	10,08	91%
Unutar individua	284	78,00	0,28	0,28	3%
Ukupno	567	6161,29		11,05	100%

Rezultati su pokazali da najveći udeo variranja 91% potiče od variranja između individua unutar populacije, dok je najmanje variranje od 3% utvrđeno u okviru individua. Variranje od 6% potiče od variranja između postojećih subpopulacija (Slika 11).



Slika 11. Analiza molekularne varijanse duž ispitivanih lokusa

4.5. Fenotipska evaluacija

U Tabeli 8 su predstavljeni osnovni fenotipski parametri za deset ispitivanih osobina u svim analiziranim genotipovima, a koja su merena i beležena tokom pet ispitivanih godina. Najveća vrednost standardne devijacije je utvrđena za broj zrna po klasu 10,1. Minimalne i maksimalne vrednosti za veliki broj osobina su ukazivale na značajnu fenotipsku varijabilnost prisutnu u odabranom materijalu. Najveći koeficijent varijacije iznosio je 80,9% za broj sterilnih klasića po klasu.

Tabela 8. Deskriptivna statistika za 10 ispitivanih osobina tokom 5 godina

Osobine/	Srednja vrednost	Interval poverenja - 95%	Interval poverenja +95%	Medijana	Min.	Max.	Varijansa	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Broj klasića po klasu	21,82	21,44	22,20	20,5	13,5	86,5	52,7	7,26	33,3
Broj st. klasića po klasu	2,36	2,26	2,46	2,0	0	22,5	3,6	1,91	80,9
Broj zrna po klasu	44,86	44,34	45,39	43,6	21,5	111	102,1	10,11	22,5
Dužina klasa	10,17	10,08	10,27	10,0	5,2	19,7	3,1	1,77	17,4
Indeks klasa	0,76	0,76	0,76	0,8	0,5	1	0,0	0,05	6,6
Masa klasa	2,13	2,11	2,16	2,1	0,8	4,3	0,2	0,45	20,9
Masa zrna po klasu	1,63	1,61	1,65	1,6	0,5	3,4	0,1	0,36	22,0
Klasanje	133	133,02	133,67	134,0	115	150	37,7	6,14	4,6
Cvetanje	138	138,09	138,65	139,0	123	154	28,7	5,36	3,9
Vršna internodija	34,32	33,83	34,81	33,7	7,5	62,7	52,5	7,25	21,1

U Tabeli 9 su predstavljene parcijalne fenotipske korelacije između ispitivanih osobina uzimajući godinu kao faktor. Najveće vrednosti Pearsonovih koeficijenata su uočene između vremena klasanja i cvetanja (0,975) kao i između mase klasa i mase zrna po klasu (0,953). Visoke vrednosti zapažene su i između broja klasića i sterilnih klasića po klasu (0,796) i broja klasića i broja zrna po klasu (0,667). Srednje vrednosti korelacija utvrđene su između broja zrna/klasu i mase klasa (0,742) i broja zrna/klasu i mase zrna/klasu (0,629). Najslabije korelacije utvrđene su između dužine vršne internodije i ostalih osobina. Najveći broj negativnih korelacija je utvrđen sa indeksom klasa.

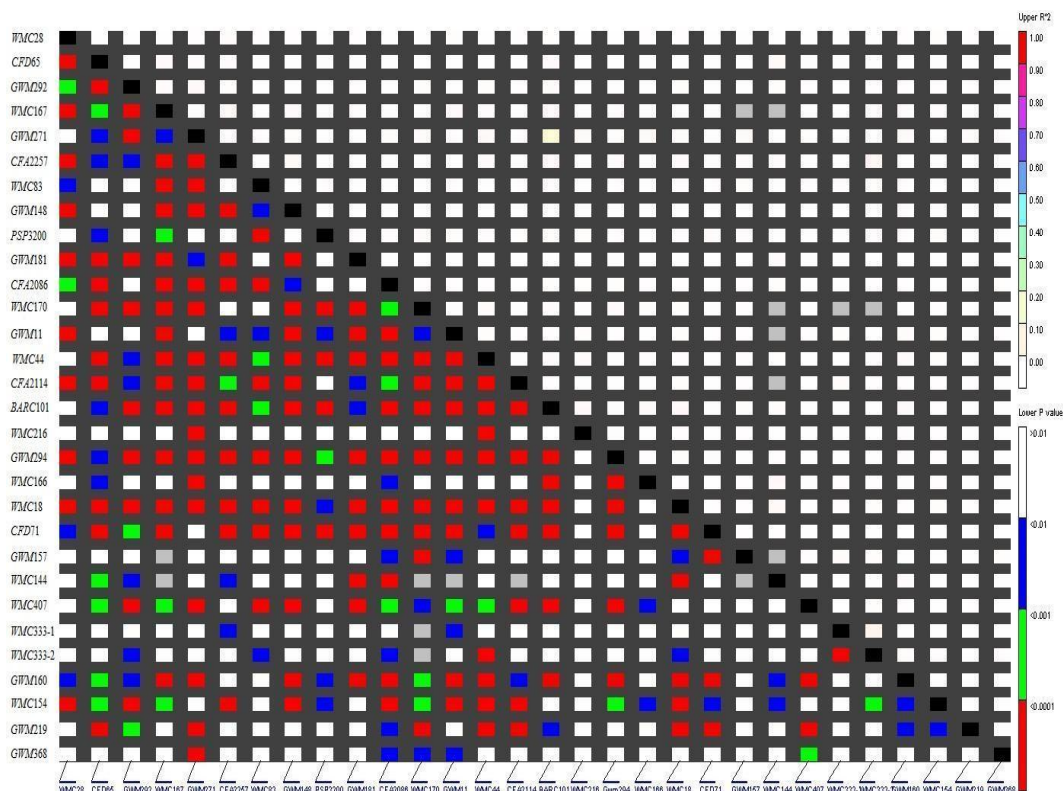
Tabela 9. Značajne parcijalne fenotipske korelacije između ispitivanih osobina

Fenotipske osobine	Broj klasića/ klasu	Broj st. klasića/ klasu	Broj zrna/ klasu	Dužina klasa	Indeks klasa	Masa klasa	Masa zrna/ klasu	Klasanje	Cvetanje	Dužina vršne internodije
Broj klasića/klasu	1									
Broj sterilnih klasića/klasu	0,796**	1								
Broj zrna/klasu	0,667**	0,396**	1							
Dužina klasa	0,444**	0,410**	0,432**	1						
Indeks klasa	-0,330**	-0,340**	-0,159**	-0,319**	1					
Masa klasa	0,409**	0,181**	0,742**	0,399**	0,115**	1				
Masa zrna/klasu	0,256**	-	0,629**	0,269**	0,389**	0,953**	1			
Klasanje	0,305**	0,340**	0,133**	0,431**	-0,515**	-	0,214**	1		
Cvetanje	0,329**	0,363**	0,155**	0,456**	-0,543**	-	0,213**	0,975**	1	
Dužina vršne internodije	0,155**	0,203**	-	0,278**	0,084*	0,076*	0,076*	-	0,08*	1

Nivo značajnosti *p<0,05; **p<0,001

4.6. Neravnoteža vezanosti - LD (linkage disequilibrium)

Svih 30 SSR lokusa je korišćeno za procenu prisustva neravnoteže vezanosti (LD) uz eliminaciju alela sa frekvencijom manjom od 1%. Od ukupnog broja ispitivanih interhromozomskih parova (435) u celoj populaciji čak 55,6% je pokazalo značajan nivo LD na nivou značajnosti od $p < 0,01$ (Slika 12).



Slika 12. LD u svim ispitivanim mikrosatelitskim lokusima

Posmatranjem LD u pojedinačnim subpopulacijama uočen je znatno manji procenat lokusa u odnosu na celokupnu populaciju (Tabela 10). Grupa Q1 je imala najmanji broj parova u LD, dok je najviše detektovano u Q5 subpopulaciji.

Prosečna vrednost r^2 u svim ispitivanim parovima u celokupnoj populaciji je iznosila 0,009, dok je kod statistički značajnih parova vrednost povećana na 0,012. Srednja vrednost interhromozomskog LD kod svih parova je bila manja u celoj populaciji, u odnosu na pojedinačne potpopulacije. U potpopulaciji Q5 je utvrđena najmanja srednja vrednost od 0,014, dok je najveća srednja vrednost (r^2) kod statistički značajnih parova bila u grupi Q3.

Nijedan ispitivani par nije bio u potpunom LD, čija vrednost iznosi $r^2=1$. Posmatrajući LD u celoj populaciji, samo dva marker para su imali vrednosti r^2 između 0,1 i 0,2. Najveća r^2 vrednost (0,151) je uočena između markera *BARC101* (2B) i *GWM271* (5B), dok je vrednost r^2 od 0,061 utvrđena kod istoimenog markera *WMC333* čiji lokusi su smešteni na hromozomima 1A i 6A.

Tabela 10. Pregled interhromozomskog LD u celokupnoj populaciji i pojedinačnim potpopulacijama

Broj subpopulacija	Ukupan broj parova	Broj značajnih parova	Procenat značajnih parova	Srednja vrednost r^2 u svim parovima	Srednja vrednost r^2 parovima sa $p < 0,01$	Broj u kompletnom LD
Celokupna populacija	435	242	55,6	0,009	0,012	0
Q1	435	10	2,3	0,031	0,062	0
Q2	435	32	7,4	0,030	0,068	0
Q3	406	24	5,9	0,078	0,167	0
Q4	378	26	6,9	0,044	0,096	0
Q5	435	47	10,8	0,014	0,032	0
Q6	435	27	6,2	0,034	0,065	0

4.7. Poređenje GLM i MLM modela

U asocijativnoj analizi primenjena su dva modela, koja su otkrila različiti broj veza između osobina i svojstava, kako u ispitivanim godinama, tako i sa različitim stepenom značajnosti. U Tabeli 11 je prikazan ukupan broj veza za svaku pojedinačnu osobinu. Primenom GLM modela je otkriven znatno veći broj asocijacija u poređenju sa MLM modelom. Ukupan broj detektovanih veza korišćenjem GLM je iznosio 415 ($p < 0,05$), a analizom pomoću MLM modela je broj asocijacija smanjen na 208 za isti nivo značajnosti. U slučaju vredosti $p < 0,01$ broj asocijacija je smanjen sa 260 (GLM) na 103 asocijacije (MLM)

Najveći broj veza (GLM, $p < 0,05$) je detektovan za broj klasića po klasu (58), a najmanje (23) je otkriveno za masu zrna po klasu. Kada je posmatran nivo značajnosti $p < 0,01$ sa GLM pristupom, maksimalan broj asocijacija je utvrđen za broj sterilnih klasića po klasu (46), a najmanji za masu klasa i masu zrna po klasu (12).

Kod MLM metode ($p < 0,05$), najveći broj asocijacija je detektovan za broj zrna po klasu (32), a najmanje za masu zrna po klasu (11), dok je za vrednosti $p < 0,01$ najviše veza uočeno za broj klasića po klasu (22) a najmanje za indeks klasa (3).

Broj identičnih asocijacija dobijenih sa oba modela se kretao od 11 asocijacija za masu zrna po klasu do 31 zajedničke veze za broj zrna po klasu. Ukupan broj zajedničkih asocijacija između markera i svojstava u oba modela ($p < 0,05$) je iznosio

206. Najveća razlika između nivoa značajnosti za zajedničke veze marker-svojstvo uočena je kod asocijacija za dužinu klasa, a najmanje za broj klasića po klasu.

Maksimalan broj asocijacija koje su otkrivene samo sa GLM (34) je bio znatno veći u poređenju sa dobijenim vezama sa MLM pristupom (2). Polovina detektovanih GLM asocijacija je bila jedinstvena, dok je jedinstvenih MLM asocijacija bilo samo 7,8%.

Asocijacije detektovane primenom GLM i MLM modela za svaku pojedinačnu godinu na različitim nivoima značajnosti su predstavljene u Tabeli 12.

Tabela 11. Broj detektovanih veza u pojedinačnim godinama na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$ sa GLM i MLM metodama dobijeni u programu Tassel

Osobine	MTA GLM za $p < 0,05$	MTA GLM za $p < 0,01$	MTA MLM za $p < 0,05$	MTA MLM za $p < 0,01$	Zajednički MTA	Zajednički MTA samo na nivou $p < 0,01$	Broj jedinstvenih GLM	Broj jedinstvenih MLM	% jedinstvenih GLM	% jedinstvenih MLM
Broj klasića/klasu	58	42	24	22	24	22	34	0	58,6	0
Broj sterilnih klasića/klasu	54	46	24	18	24	18	30	0	55,6	0
Broj zrna/ klasu	46	30	32	16	31	15	15	1	32,6	3,1
Vreme cvetanja	50	35	29	15	29	14	21	0	42,0	0
Dužina klasa	54	29	26	7	26	7	28	0	51,9	0
Vreme klasanja	50	36	27	12	27	12	23	0	46,0	0
Masa klasa	31	12	14	4	14	4	17	0	54,8	0
Masa zrna/klasu	23	12	11	4	11	4	12	0	52,2	0
Indeks klasa	37	12	13	3	13	3	24	0	64,9	0
Dužina vršne internodije	12	6	8	2	7	2	5	1	41,7	12,5
Ukupno/prosek	415	260	208	103	206	102	209	2	50	7,8

Tabela 12. Broj detektovanih veza u pojedinačnim godinama na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$ sa GLM i MLM metodama dobijeni u programu Tassel

Osobine	MTA GLM za $p < 0,05$					Ukupno	MTA GLM za $p < 0,01$					Ukupno	MTA MLM za $p < 0,05$					Ukupno	MTA MLM za $p < 0,01$					Ukupno	Broj jedinstvenih GLM	Broj jedinstvenih MLM
Godine	1995	1996	1997	1998	1999		1995	1996	1997	1998	1999		1995	1996	1997	1998	1999		1995	1996	1997	1998	1999		Ukupno	Ukupno
Broj klasića/klasu	10	13	11	11	13	58	7	9	9	8	9	42	6	5	4	5	4	24	5	5	4	5	3	22	34	0
Broj sterilnih klasića/klasu	8	13	11	10	12	54	7	10	8	9	12	46	5	5	5	3	6	24	5	4	5	2	2	18	30	0
Broj zrna/ klasu	9	7	11	9	10	46	4	5	8	7	6	30	8	4	8	8	4	32	4	2	2	5	3	16	15	1
Vreme cvetanja	11	9	10	11	9	50	8	6	8	7	6	35	6	7	5	7	4	29	2	4	5	2	2	15	21	0
Dužina klasa	8	9	13	13	11	54	5	5	4	8	7	29	4	5	6	5	6	26	0	1	0	2	4	7	28	0
Vreme klasanja	11	9	10	11	9	50	8	6	7	7	8	36	6	4	6	6	5	27	3	1	3	3	2	12	23	0
Masa klasa	5	7	7	6	6	31	1	1	2	3	5	12	2	3	2	3	4	14	0	0	1	1	2	4	17	0
Masa zrna/klasu	3	6	6	3	5	23	3	2	3	1	3	12	3	0	3	1	4	11	1	0	1	1	1	4	12	0
Indeks klasa	9	2	11	7	8	37	1	1	6	1	3	12	1	1	3	5	3	13	0	0	2	0	1	3	24	0
Dužina vršne internodije	–	–	2	10	6	18	–	–	1	3	5	9	–	–	1	5	6	12	–	–	0	1	1	2	7	1
Ukupno	74	75	90	81	83	421	44	45	56	54	64	263	41	34	43	48	46	212	20	17	23	22	21	103	211	2

4.8. Značajne asocijacije između svojstava i markera

Prikazane su samo značajne veze ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) markera sa pojedinačnim svojstvima klasa i adaptabilnim svojstvima, dobijeni u svim ispitivanim godinama, primenom GLM i MLM pristupa.

4.8.1. Broj klasića po klasu

Najveći broj značajnih asocijacija (58) u svim ispitivanim godinama je detektovan za broj klasića po klasu primenom GLM modela, dok je primenom MLM broj detektovanih asocijacija bio manji i iznosio je 24 (Tabela 12). Ukupno 14 markera sa 7 hromozoma je imalo uticaj na fenotipsku varijabilnost prikazanog svojstva i kretala se od 3,6% (GWM148 u 1999. godini) do 42,4% (WMC144 u 1996. godini). Marker koji su pokazali vezu sa brojem klasića po klasu su bili smešteni na sledećim hromozomima: 1B, 1D, 2A, 2B, 2D, 4A i 6A. Samo markeri raspoređeni na hromozomu 2D (GWM157, WMC144, WMC167 i WMC18) su pokazali stabilnost u tri i više ispitivanih godina. Najveći uticaj na fenotipsku varijabilnost broja klasića po klasu je imao marker WMC144 u tri (1995, 1996 i 1998 godini) od pet ispitivanih godina sa prosečnom vrednošću od 40,1%. Tri markera (WMC18, WMC167 i GWM157) su pokazali vezu u svih pet ispitivanih godina (Tabela 13).

Tabela 13. Veze između markera i broja klasića po klasu u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
WMC44-1B	GLM			0,021*		0,009**		0,017*		0,0053**	
	MLM				6,2		8,3		6,1		7,0
GWM11-1B	GLM	5,26E-05**		0,002**		3,55E-04**				0,002**	
	MLM	0,008**	6,9		4,5		6,3				4,4
WMC216-1D	GLM	0,005**		2,37E-05**		0,006**		2,53E-06**		1,58E-06**	
	MLM		5,1		6,5		5,2		6,9		7,4
CFA2086-2A	GLM	0,019*		0,037*						0,026*	
	MLM	0,043*	7,6		6,1						6,3
GWM294-2A	GLM			0,015*		0,003**		0,044*			
	MLM				5,6		7,9		4,8		
WMC170-2A	GLM			0,002**		0,033*		0,033*		0,032*	
	MLM				6,6		6,3		4,9		5,1
GWM148-2B	GLM			0,022*						0,049*	
	MLM				4,1						3,6
BARC101-2B	GLM	0,002**		2,35E-06**		0,03*		6,48E-07**		2,48E-05**	
	MLM		5,4	0,003**	7,3		4,3	0,004**	7,4		6,1
GWM157-2D	GLM	3,61E-17**		1,65E-14**		8,74E-07**		6,36E-18**		2,26E-14**	
	MLM	9,28E-15**	15,8	8,51E-11**	12,3	0,002**	8,1	2,32E-12**	13,4	1,01E-04**	11,4
WMC144-2D	GLM	1,63E-29**		3,97E-35**				3,30E-35**		0,020*	
	MLM	1,47E-28**	37,3	4,56E-33**	42,4			2,22E-34**	42,3		4,0
WMC167-2D	GLM	1,90E-38**		1,89E-40**		5,62E-22**		7,69E-48**		1,77E-51**	
	MLM	1,30E-27**	29,4	1,92E-23**	25,9	8,90E-10**	21,8	5,03E-25**	27,0	5,48E-20**	29,1
WMC18-2D	GLM	3,00E-09**		7,99E-16**		1,78E-10**		1,17E-14**		7,73E-19**	
	MLM	8,00E-04**	11,8	3,48E-04**	14,4	3,71E-04**	13,4	8,53E-04**	13,1	0,0025**	16,0
CFD71-4A	GLM	0,011*		1,67E-04**		0,0018**		4,80E-04**		0,003**	
	MLM		6,2		7,3		7,6		6,5		6,0
CFA2114-6A	GLM	0,018*				2,40E-08**		0,002**		1,96E-04**	
	MLM		4,4			2,71E-06**	10,8		4,5	0,025*	5,6

4.8.2. Broj sterilnih klasića po klasu

Ukupno 15 mikrosatelitskih markera je imalo uticaj na fenotipsku varijabilnost broja sterilnih klasića po klasu tokom 5 ispitivanih godina (Tabela 14). Od ukupnog broja mikrosatelita samo 5 je bilo u asocijaciji u više od tri ispitivane godine. Ista 4 markera sa hromozoma 2D koji su pokazali vezu sa brojem klasića po klasu imali su uticaj i na fenotipsku varijabilnost u pojavi sterilnih klasića po klasu. Marker GWM11 smešten na hromozomu 1B je pokazao uticaj tokom 1995., 1997. i 1999. godine korišćenjem i MLM modela. Markeri CFD65, CFA2086 i WMC407 su imali vezu samo u jednoj ispitivanoj godini. Marker WMC407 je imao najmanji uticaj na fenotipsku varijabilnost broja sterilnih klasića po klasu u 1996. godini sa samo 3,9%, dok je najveći

efekat od 26,8 % imao marker *WMC167* u toku 1999. godine. Veze markera *WMC18* i *WMC167* sa brojem sterilnih klasića bile su postojane u svim ispitivanim godinama, s tim da je veći uticaj (prosečna vrednost u ispitivanim godinama $R^2 = 22,2\%$) imao marker *WMC167*. *CFD71* je pokazao stabilnu vezu tokom svih ispitivanih godina, ali nije utvrđena njena značajnost sa MLM metodom. Marker *WMC144* smešten na hromozomu 2D je bio asociran samo sa brojem klasića i sterilnih klasića po klasu, dok njegova veza sa drugim osobinama nije utvrđena.

Tabela 14. Veze između markera i **broja sterilnih klasića po klasu** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
	Metoda	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
CFD65-1A	GLM					0,036*					
	MLM						4,9				
WMC44-1B	GLM			0,0086**						0,006**	
	MLM				8,0						8,6
GWM11-1B	GLM	3,87E-06**		2,60E-04**		7,47E-08**		0,009**		2,19E-08**	
	MLM	0,002**	8,8		6,2	0,002**	12,7		4,4	0,029*	10,5
WMC216-1D	GLM	0,004**		0,01*		0,023*		4,21E-04**		0,003**	
	MLM		5,7		4,7		5,6		6,1		5,6
GWM294-2A	GLM			0,028*		4,16E-04**					
	MLM				6,2		11,5				
CFA2086-2A	GLM									0,005**	
	MLM									0,022*	8,9
WMC407-2A	GLM			0,045*							
	MLM				3,9						
BARC101-2B	GLM			1,25E-06**		0,003**		0,008**		3,45E-06**	
	MLM				8,8		7,1		4,7		8,4
GWM148-2B	GLM			9,76E-05**		0,023*		6,12E-04**		0,0013**	
	MLM				7,6		6,4		6,5		6,7
GWM157-2D	GLM	2,54E-12**		1,15E-05**		1,02E-04**		9,25E-05**		4,35E-10**	
	MLM	7,04E-10**	13,6	0,005**	7,0	0,005**	7,7		5,8	2,47E-06**	10,8
WMC144-2D	GLM	2,21E-06**		3,05E-05**				7,68E-05**		0,007**	
	MLM	5,55E-06**	11,3	3,64E-04**	9,7			2,81E-04**	8,8	0,021*	4,6
WMC167-2D	GLM	2,30E-25**		4,09E-19**		2,61E-15**		1,95E-18**		2,39E-30**	
	MLM	1,07E-15**	25,1	7,07E-08**	19,2	1,55E-05**	22,0	4,95E-08**	18,2	2,26E-13**	26,8
WMC18-2D	GLM	3,39E-09**		2,88E-13**		5,47E-10**		3,97E-12**		3,91E-12**	
	MLM	0,002**	12,9	3,91E-04**	15,1	8,19E-04**	16,6	0,012*	13,8	0,017*	14,9
CFD71-4A	GLM	0,014*		1,03E-04**		0,0038**		0,011*		0,007**	
	MLM		6,7	0,049*	8,8		9,2		6,1		6,9
CFA2114-6A	GLM	9,53E-04**		1,89E-04**		2,58E-08**		0,004**		0,001**	
	MLM		6,5		6,7	2,15E-07**	13,8		5,0		6,1

4.8.3. Broj zrna po klasu

Značajne asocijacije sa brojem zrna po klasu su identifikovane sa 16 markera (Tabela 15). Markeri su locirani na različitim hromozomima ali su stabilnost u većem broju godina pokazali samo markeri sa linkidž grupe 2. Markeri *WMC83*, *WMC28*, *GWM292*, *WMC170*, *WMC144* su bili značajni samo u jednoj ispitivanoj godini. Marker *WMC83* je jedinstvenu asocijaciju pokazao samo sa ovom osobinom. Broj zrna po klasu je bio asociiran sa 4 SSR markera u pet ispitivanih godina, od čega su 3 markera sa hromozoma 2D pokazala uticaj i na ekspresiju broja klasića i broja sterilnih klasića po klasu. Marker *BARC101* smešten na istoj hromozomskoj grupi je jedini stabilan marker sa B genoma. Mikrosatelitski marker *GWM294* je pokazao vezu i sa dužinom klasa i oba adaptabilna svojstva. Vrednosti fenotipske varijabilnosti za broj zrna po klasu kretale su se od najniže vrednosti od 4,2% (*CFA2114* u 1999. godini) do 12,9% (*WMC170* u 1995. godini). Prosečne vrednosti fenotipske varijabilnosti broja zrna po klasu za markere koji su bili stabilni u više vegetacionih sezona su iznosile od 7,1% (*BARC101*) do 11,1% (*WMC167*).

Tabela 15. Veze između markera i **broja zrna po klasu** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina Metoda	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
WMC44-1B	GLM	0,038*		0,011*		0,002**		0,012*		6,58E-04**	
	MLM		11,6		10,5		12,0		10,8		10,2
WMC407-2A	GLM	0,015*								0,034*	
	MLM	0,034*	7,5								4,3
GWM294-2A	GLM	0,038*		0,030*		9,17E-04**		0,008**		0,001**	
	MLM	0,041*	10,0		8,2	0,015*	10,9	0,017*	9,8	0,037*	8,8
WMC170-2A	GLM	0,002**									
	MLM	0,003**	12,9								
WMC154-2B	GLM									0,025*	
	MLM										5,4
BARC101-2B	GLM	0,018*				0,002**		7,04E-05**		0,003**	
	MLM	0,022*	7,3			0,008**	7,4	3,80E+00**	10,0		5,4
GWM157-2D	GLM	0,009**		1,44E-05**		0,009**		5,37E-06**		1,86E-07**	
	MLM	0,008**	6,1	2,16E+00**	8,9	0,023*	4,8	1,05E+00**	9,7	4,07E-01**	8,6
WMC18-2D	GLM	0,005**		0,004**		0,006**		0,001**		1,30E-05**	
	MLM	0,006**	9,5	0,011*	7,8	0,013*	7,4	0,011*	8,9	0,005**	9,1
WMC167-2D	GLM	0,004**		6,02E-05**		6,73E-04**		2,02E-04**		4,37E-13**	
	MLM	0,005**	9,7	6,25E-01**	10,5	0,005**	8,9	0,002**	10,2	2,26E-03**	16,0
WMC144-2D	GLM					0,017*		0,006**			
	MLM			0,032*		0,016*	4,5	0,003**	5,5		
CFD71-4A	GLM	0,027*		0,009**				0,010*		0,012*	
	MLM	0,038*	9,6		8,6			0,025*	8,9		6,7
GWM160-4A	GLM					0,005**		8,81E-05**			
	MLM					0,038*	5,6	0,008**	8,4		
WMC28-5B	GLM					0,041*					
	MLM						4,5				
GWM292-5D	GLM					0,015*					
	MLM						6,7				
CFA2114-6A	GLM					0,005**				0,038*	
	MLM					0,020*	6,8				4,2
WMC83-7A	GLM			0,009**							
	MLM				5,2						

4.8.4. Dužina klasa

Ukupno 54 veze sa dužinom klasa je identifikovano primenom GLM modela, ali je relativno mali broj asocijacija bio postojan/stabilan tokom godina (Tabela 16). Od ukupno 19 markera, četiri su identifikovana u vezi sa dužinom klasa u više ispitivanih godina. Dva hromozomska regiona duž 2A (CFA2086 i GWM294) hromozoma i po jedan na 2D (GWM157) i 6A (WMC333) hromozomu su odgovorna za ekspresiju dužine klasa u ispitivanim uslovima spoljašnje sredine. Jedinstvena veza marker-svojstvo je detektovana na 6A hromozomu. Marker na hromozomu 2A (CFA2086) je

bio značajan u svim ispitivanim godinama i pokazao je najveći uticaj na varijabilnost dužine klasa sa prosečnom vrednošću od 14,6%. Marker *PSP3200* je pokazao jedinstvenu vezu sa dužinom klasa u toku jedne godine.

Tabela 16. Veze između markera i **dužine klasa** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
<i>CFD65-1A</i>	GLM	0,049*				0,043*		0,008**			
	MLM		5,4				5,0		7,0		
<i>GWM11-1B</i>	GLM								0,042*		
	MLM										5,5
<i>WMC44-1B</i>	GLM			0,002**		0,02*		0,031*		0,001**	
	MLM			0,011*	13,6		10,3		11,0	0,007**	13,8
<i>GWM294-2A</i>	GLM	0,008**				0,02*		4,08E-04**			
	MLM	0,016*	10,7			0,014*	8,9	0,001**	13,4		
<i>CFA2086-2A</i>	GLM	0,004**		7,40E-07**		0,001**		8,43E-04**		0,007**	
	MLM	0,022*	13,3	0,002**	19,7	0,016*	12,8	0,029*	14,9	0,045*	12,6
<i>WMC407-2A</i>	GLM			0,005**		0,02*				0,004**	
	MLM				7,6		5,9			0,017*	8,0
<i>WMC170-2A</i>	GLM			0,041*				0,002**		0,046*	
	MLM				8,9			0,010*	12,2		8,8
<i>WMC154-2B</i>	GLM	0,041*				0,01*				0,038*	
	MLM		7,1				7,5				7,1
<i>GWM148-2B</i>	GLM	0,040*				0,013*					
	MLM		6,8			0,025*	7,0				
<i>GWM157-2D</i>	GLM	0,002**		0,001**		0,001**		2,55E-05**			
	MLM	0,027*	7,1	0,034*	7,2	0,011*	6,6	0,003**	9,8		
<i>WMC144-2D</i>	GLM			0,011*						0,006**	
	MLM			0,018*	5,0					0,005**	5,7
<i>WMC167-2D</i>	GLM			0,014*		0,01*		0,008**		2,41E-04**	
	MLM			0,016*	7,7		7,1		8,4	0,001**	10,9
<i>WMC18-2D</i>	GLM							0,025*			
	MLM								7,3		
<i>CFD71-4A</i>	GLM							0,028*			
	MLM								8,8		
<i>GWM219-6B</i>	GLM	0,002**		1,76E-04**		6,57E-04**		8,94E-04**		1,12E-04**	
	MLM		9,7		11,5		9,6		10,6		11,9
<i>WMC333-6A</i>	GLM					0,01*		0,012*		0,001**	
	MLM					0,012*	4,0	0,030*	4,4	0,004**	5,8
<i>CFA2114-6A</i>	GLM					0,006**		0,008**		0,048*	
	MLM					0,034*	6,9		7,5		5,8
<i>PSP3200-6D</i>	GLM	0,009**									
	MLM	0,021*	6,4								
<i>WMC166-7B</i>	GLM			0,024*		0,02*		0,015*			
	MLM				2,8		2,7		3,1		

4.8.5. Dužina vršne internodije

Dužina vršne internodije je osobina koja je beležena tokom tri vegetacione sezone, stoga su asocijacije u toku dve sezone razmatrane kao stabilne asocijacije (Tabela 17). Dva QTL za dužinu vršne internodije su detektovana na hromozomu 2A. Prema Somersovoj mapi (2004) marker *CFA2086* je smešten na oko 133,4 cM dugog kraka hromozoma 2A, dok je marker *GWM294* smešten na položaju 52,9 cM na istom hromozomu. Oba markera su asocirana u dve godine, s tim da je marker *GWM294* pokazao veći uticaj na varijabilnost dužine vršne internodije sa vrednošću od 12,9%.

Tabela 17. Veze između markera i **dužine vršne internodije** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1997		1998		1999	
	Metoda	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
CFA2086-2A	GLM			0,006**		0,022**	
	MLM			0,008**	11,8	0,03*	10,4
GWM294-2A	GLM	0,001**				3,48E-05**	
	MLM	0,017*	12,3			0,003**	11,8
WMC170-2A	GLM						
	MLM					0,041*	
WMC154-2B	GLM					0,017*	
	MLM						7,2
GWM181-3B	GLM					0,029*	
	MLM						12,4
GWM160-4A	GLM					0,041*	
	MLM						4,3
GWM271-5B	GLM					0,004**	
	MLM					0,019*	5,0
GWM292-5D	GLM					0,006**	
	MLM					0,017*	7,6
CFA2114-6A	GLM			0,049*			
	MLM				5,2		
GWM219-6B	GLM						
	MLM						
WMC166-7B	GLM			0,04*			
	MLM			0,047*	2,8		

4.8.6. Masa klasa i masa zrna po klasu

Masa klasa i masa zrna po klasu su osobine koje su pokazale vezu sa ispitivanim mikrosatelitskim markerima u jednoj ili u dve godine primenom oba modela. Veza

markera GWM294 i mase klasa je bila značajna u 4 godine primenom GLM metode ali su asocijacije primenom MLM modela potvrđene samo za dve godine (Tabela 18). Markeri WMC28 i WMC167 su pokazali identične odnose GLM i MLM asocijacija.

Tabela 18. Veze između markera i **mase klasa** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
GWM11-1B	GLM									0,006**	
	MLM									0,032*	5,9
WMC44-1B	GLM					0,044*		0,012*			
	MLM						9,1		11,6		
WMC170-2A	GLM	0,014*				0,020*					
	MLM	0,042*	10,6				8,6				
GWM294-2A	GLM	0,020*		0,010*		2,21E-04**		4,20E-05**			
	MLM		10,3		9,6	0,005**	12,0	3,47E-04**	14,6		
BARC101-2B	GLM					0,012*		0,004**			
	MLM					0,038*	6,2	0,011*	7,8		
WMC154-2B	GLM			0,022*						1,18E-04**	
	MLM			0,04*	7,1					7,10E-04**	9,8
GWM157-2D	GLM			0,003**				0,013*			
	MLM			0,04*	5,9			0,041*	5,2		
WMC167-2D	GLM	0,021*		0,011*				0,004**		0,004**	
	MLM	0,048*	7,8	0,04*	7,4				8,6		7,3
GWM181-3B	GLM					0,030*					
	MLM						12,0				
CFD71-4A	GLM			0,039*							
	MLM				7,7						
GWM368-4B	GLM			0,045*							
	MLM				7,9						
WMC28-5B	GLM	0,006**				0,003**		0,043*		0,003**	
	MLM		7,0				6,4		5,0	0,025*	5,9
CFA2114-6A	GLM			0,033*							
	MLM				5,7						
GWM219-6B	GLM					0,032*					
	MLM						6,5				
CFA2257-7A	GLM									0,004**	
	MLM									0,005**	5,4
WMC166-7B	GLM	0,037*								0,011*	
	MLM		2,6								2,7

Od 14 mikrosatelita za koje je utvđena veza sa masom zrna po klasu, sedam markera je bilo identifikovano samo u jednoj godini istraživanja (Tabela 19). Tri markera (GWM294, WMC170 i WMC28) su imala značajne veze u tri vegetacione sezone korišćenjem GLM metode. Značajne veze nisu potvrđene u više od 3 godine MLM pristupom.

Tabela 19. Veze između markera i **mase zrna po klasu** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina Metoda	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R(%)	P	R(%)	P	R(%)	P	R(%)	P	R(%)
WMC44-1B	GLM							0,031*			
	MLM								11,0		
WMC407-2A	GLM					0,029*				0,029*	
	MLM					0,030*	5,7			0,045*	5,6
GWM294-2A	GLM			0,011*		2,91E-04**		2,45E-05**			
	MLM				9,7	0,005**	12,3	2,38E-04**	15,7		
WMC170-2A	GLM	0,006**		0,050*		0,033*					
	MLM	0,021*	12,2		8,2		8,5				
BARC101-2B	GLM							0,047*			
	MLM								6,0		
WMC154-2B	GLM			0,034*						8,11E-04**	
	MLM				6,8					0,002**	9,3
GWM157-2D	GLM			0,008**							
	MLM				5,3						
GWM181-3B	GLM					0,009**					
	MLM						13,7				
GWM368-4B	GLM			0,010**							
	MLM				9,4						
WMC28-5B	GLM	0,007**				0,004**				0,005**	
	MLM	0,017*	7,3				6,4				6,1
CFA2114-6A	GLM			0,041*							
	MLM				5,6						
GWM219-6B	GLM	1,13E-04**				0,016*					
	MLM	0,001**	13,3			0,042*	7,3				
CFA2257-7A	GLM									0,011*	
	MLM									0,013*	5,1
WMC166-7B	GLM									0,009**	
	MLM									0,032*	3,0

4.8.7. Indeks klasa

Ukupno 21 mikrosatelitski marker je bio u asocijaciji sa indeksom klasa (Tabela 20). Veze nisu bile postojane u većem broju ispitivanih godina. Samo marker GWM294 je imao vezu u svih pet godina primenom GLM modela ali je značajnost primenom MLM pristupa utvrđena samo u jednoj godini. Mikrosateliti GWM11, WMC44, WMC216, GWM148, WMC144, GWM181, GWM368, GWM292, WMC333, GWM219, CFA2257, WMC166 su asocirani sa indeksom klasa u jednoj ispitivanoj godini. Oba modela su pokazala značajnost i stabilnost u tri godine samo između markera CFA2086 i indeksa klasa.

Tabela 20. Veze između markera i **indeksa klasa** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
	Metoda	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
CFD65-1A	GLM					0,041*				0,006**	
	MLM						6,1			0,016*	6,3
GWM11-1B	GLM	0,021*									
	MLM		6,7								
WMC44-1B	GLM	0,041*									
	MLM		11,4								
WMC216-1D	GLM							0,014*			
	MLM							0,023*	7,4		
WMC407-2A	GLM	0,026*				8,09E-09**				0,004**	
	MLM		7,0			1,77E-06**	17,9			0,010**	6,9
CFA2086-2A	GLM	0,003**		0,037*		5,42E-04**					
	MLM	0,029*	14,8	0,038*	11,9	0,004**	16,4				
GWM294-2A	GLM	0,039*		4,85E-04**		1,43E-04**		0,002**		0,004**	
	MLM		9,9		14,1		15,3		12,7	0,046*	9,8
GWM148-2B	GLM							0,039*			
	MLM								7,3		
WMC154-2B	GLM					0,008**				0,016*	
	MLM						9,4				7,0
WMC144-2D	GLM							0,021*			
	MLM							0,020*	4,7		
GWM157-2D	GLM							0,017*		0,038*	
	MLM							0,027*	5,4		3,5
WMC18-2D	GLM					0,024*		0,011*		0,031*	
	MLM						7,9	0,022*	8,5		6,1
GWM181-3B	GLM					0,004**					
	MLM						17,2				
CFD71-4A	GLM	0,035*				0,026*				0,025*	
	MLM		9,2				9,5				7,6
GWM368-4B	GLM					0,018*					
	MLM						10,3				
GWM271-5B	GLM	0,046*						0,017*			
	MLM		4,1					0,050*	4,9		
GWM292-5D	GLM					1,51E-04**					
	MLM						12,3				
WMC333-6A	GLM					0,010*					
	MLM					0,035*	4,8				
GWM219-6B	GLM									0,015*	
	MLM										7,0
CFA2257-7A	GLM	0,049*									
	MLM		5,0								
WMC166-7B	GLM	0,036*									
	MLM		2,7								

4.8.8. Vreme klasanja i cvetanja

Vreme klasanja je pokazalo vezu sa 15 ispitivanih markera dok je vreme cvetanja bilo u asocijaciji sa 14 SSR markera (Tabela 21 i Tabela 22). Markeri *GWM271* i *GWM292* su pokazali vezu samo sa vremenom klasanja u jednoj odnosno dve godine istraživanja, a marker *WMC333* sa hromozoma 1A je bio u vezi sa vremenom cvetanja takođe u jednoj ispitivanoj godini. Najveći broj značajnih asocijacija u više od tri godine uočen je za ove dve osobine. Od ukupnog broja, 6 zajedničkih markera su bili vezani sa osobinama adaptabilnosti u više od tri ispitivane godine. Markeri *WMC44* (1B), *WMC407* (2A) i *WMC28* (5B) su pokazali vezu sa oba svojstva i karakteristični su samo za njih. Marker *CFA2086* je asociiran i sa indeksom klasa i nalazi se na hromozomu 2A, a uticaj na fenotipsku varijabilnost vremena klasanja ovaj marker je imao tokom svih godina osim 1996. godine, dok je za vreme cvetanja izuzetak bila 1999. godina. Dve stabilne asocijacije su uočene i sa markerima *GWM294* i *WMC167* sa linkidž grupe 2, na genomima A i D. Najmanja prosečna vrednost R^2 tokom 5 ispitivanih godina za vezu cvetanja i markera *WMC167* iznosila je 7,3%, dok je za klasanje iznosila 7,1%. Najveća R^2 vrednost (14,7%) je uočena između *WMC44* i cvetanja, a za vreme klasanja je ovaj marker imao uticaj na fenotipsku varijabilnost od 16,2%.

Tabela 21. Veze između markera i **vremena klasanja** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
	Metoda	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
GWM11-1B	GLM	0,014*						0,009**		0,001**	
	MLM		5,4						5,4		6,9
WMC44-1B	GLM	1,81E-06**		1,38E-06**		2,16E-07**		5,09E-06**		5,02E-09**	
	MLM	0,008**	15,8	0,001**	15,0	0,002**	17,3	0,003**	14,4	2,96E-06**	18,8
GWM294-2A	GLM	2,91E-04**		6,44E-04**		9,93E-05**		5,05E-05**		0,002**	
	MLM	0,004**	11,3	0,016*	10,1	0,007**	12,2	0,003**	11,7	0,037*	10,0
WMC407-2A	GLM	4,48E-06**		0,007**		1,45E-06**		8,43E-06**		1,45E-04**	
	MLM	0,030*	10,6		5,8	0,006**	11,4	0,024*	9,7		8,6
CFA2086-2A	GLM	0,001**		0,045*		0,003**		8,62E-04**		2,79E-04**	
	MLM	0,021*	11,9		8,4	0,030*	11,5	0,014*	11,6	0,012*	13,0
WMC144-2D	GLM					0,045*				0,017*	
	MLM						3,0				3,6
WMC167-2D	GLM	0,005**		0,008**		0,003**		0,021*		0,002**	
	MLM	0,005**	7,2	0,028*	6,5	0,016*	7,9	0,028*	5,9	0,001**	8
WMC18-2D	GLM	0,004**		1,87E-05**		0,003**		0,004**		0,002**	
	MLM		7,4	0,022*	10,0		7,8		7,0		7,7
GWM181-3B	GLM					0,027*					
	MLM						11,8				
GWM271-5B	GLM							0,025*			
	MLM								3,4		
WMC28-5B	GLM	7,14E-05**		7,48E-04**		9,08E-05**		1,28E-05**		9,04E-05**	
	MLM	0,035*	8,2		6,5	0,016*	8,3	0,005**	8,7	0,038*	8,1
GWM292-5D	GLM			0,044		0,048*					
	MLM				5,3		5,6				
WMC333-6A	GLM	0,009**						0,02*			
	MLM		3,8						3,1		
GWM219-6B	GLM	0,045*									
	MLM		5,9								
WMC166-7B	GLM	0,041*		0,028*				0,031*			
	MLM		2,0		2,1				2,1		

Tabela 22. Veze između markera i **vremena cvetanja** u toku pet ispitivanih godina na nivou značajnosti od $p < 0,05$ i $p < 0,01$

Markeri	Godina	1995		1996		1997		1998		1999	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)	P	R ² (%)
WMC333-1A	GLM							0,046*			
	MLM								1,4		
WMC44-1B	GLM	2,65E-05**		9,14E-07**		9,89E-07**		9,90E-06**		4,08E-07**	
	MLM	0,038*	14,6	0,003**	14,5	0,007**	15,1	0,015*	13,3	0,001**	15,9
GWM11-1B	GLM	0,016*				0,026*		0,010**		0,005**	
	MLM		5,5				4,7		5,1		5,8
WMC407-2A	GLM	1,27E-06**		1,31E-05**		1,06E-06**		3,35E-07**		1,13E-04**	
	MLM	0,013*	11,6	0,006**	9,0	0,005**	10,6	0,005**	10,7		8,4
GWM294-2A	GLM	4,39E-04**		0,018*		0,007**		0,004**		1,10E-04**	
	MLM	0,007**	11,3	0,040*	7,4		8,5	0,033*	8,5	0,021*	11,4
CFA2086-2A	GLM	0,002**		0,003**		9,13E-04**		5,98E-04**		0,022*	
	MLM	0,027*	11,9	0,030*	10,2	0,010**	11,4	0,024*	11,3		9,2
WMC144-2D	GLM			0,011*		0,004**					
	MLM			0,009**	3,5	0,009**	4,3				
WMC167-2D	GLM	0,006**		7,01E-04**		1,67E-04**		0,01*		0,004**	
	MLM	0,005**	7,3	0,005**	7,6	0,002**	8,8	0,031*	6,0	0,002**	7,1
WMC18-2D	GLM	0,001**		4,56E-06**		5,86E-05**		2,09E-04**		0,011*	
	MLM		8,4	0,027*	10,2		9,4	0,041*	8,3		6,4
GWM181-3B	GLM					0,012*		0,046*			
	MLM						11,6		9,9		
WMC28-5B	GLM	4,65E-05**		3,67E-04**		5,21E-04**		2,85E-05**		2,57E-04**	
	MLM	0,026*	8,7		6,5		6,7	0,007**	7,9	0,040*	7,2
WMC333-6A	GLM	0,009**								0,039*	
	MLM		3,9								2,8
GWM219-6B	GLM	0,030*									
	MLM		6,4								
WMC166-7B	GLM	0,025*		0,017*				0,015*			
	MLM		2,4		2,2				2,3		

4.9. Markeri i fenotipski efekti alela

Od 30 analiziranih mikrosatelitskih lokusa, 12 je pokazalo stabilnu vezu sa osam od deset ispitivanih osobina (Tabela 23). Ovi markeri su pozicionirani na 6 hromozoma: 1B, 2A, 2B 2D, 5B i 6A i detektovali su ukupno 33 QTL. Masa klasa i masa zrna po klasu nisu pokazale stabilne veze sa odabranim markerima, odnosno nisu pokazale stabilne asocijacije u većem broju godina. Maksimalna prosečna vrednost fenotipske varijabilnosti ($R^2=40,7$) je utvrđena između broja klasića po klasu i markera WMC144, dok je najmanja iznosila $R^2=4,7$ između WMC333 i dužine klasa. Detektovan je samo jedan QTL za indeks klasa, a 6 QTL je detektovano za obe adaptivne osobine.

Fenotipski efekti favorizovanih alela svakog mikrosatelita koji je pokazao stabilnu vezu sa ispitivanim osobinama u više od tri ispitivane godine prikazani su u Tabeli 24. Za vreme cvetanja detektovano je 8 poželjnih alela, a maksimalni efekat je imao alel u lokusu *Xgwm294* koji je uticao na skraćanje vremena cvetanja za 2,63 dana. Najveći pozitivan efekat je uočen za broj klasića po klasu koji je uticao na povećanje od 22,3 klasića, izazvan prisustvom alela veličine 157bp u lokusu *Xwmc144*. Značajno visok efekat utvrđen je i kod broja zrna po klasu gde je marker *WMC167* imao efekat na povećanje broja zrna od 16,32 usled prisustva alela veličine 149 bp. Aleli u okviru *Xwmc167* (185bp) lokusa koji su pokazivali značajan efekat na smanjenje vremena klasanja i cvetanja su zastupljeni u genotipovima sa izuzetno visokom frekvencijom.

Tabela 23. Prikazane su značajne veze markera i svojstava u više od tri ispitivane godine detektovane sa oba modela sa naznačenim brojem godina u kojima su detektovane i r^2 vrednosti koje označavaju prosečnu vrednost fenotipske varijabilnosti u značajnim godinama

Svojstvo/marker	GWM11 (1B)	WMC44 (1B)	GWM294 (2AL)	CFA2086 (2A)	WMC407 (2A)	BARC101 (2BL)	GWM157 (2DL)	WMC144 (2DS)	WMC18 (2D)	WMC167 (2DL)	WMC28 (5B)	WMC333 (6A)
Broj klasića po klasu							5 ($r^2=12,2$)	3 ($r^2=40,7$)	5 ($r^2=13,7$)	5 ($r^2=26,6$)		
Broj sterilnih klasića po klasu	3 ($r^2=10,7$)						4 ($r^2=9,7$)	4 ($r^2=8,6$)	5 ($r^2=14,6$)	5 ($r^2=22,5$)		
Broj zrna po klasu			4 ($r^2=9,8$)			3 ($r^2=8,2$)	5 ($r^2=7,6$)		5 ($r^2=8,5$)	5 ($r^2=11$)		
Indeks klasa				3 ($r^2=14,3$)								
Dužina vršne internodije			3 ($r^2=12$)	2 ($r^2=11,1$)								
Dužina klasa			3 ($r^2=11$)	5 ($r^2=14,6$)			4 ($r^2=7,6$)					3 ($r^2=4,7$)
Klasanje		5 ($r^2=16,3$)	5 ($r^2=13,5$)	4 ($r^2=12$)	3 ($r^2=10,6$)					5 ($r^2=7,1$)	4 ($r^2=8,3$)	
Cvetanje		5 ($r^2=14,7$)	4 ($r^2=9,6$)	4 ($r^2=11,2$)	4 ($r^2=10,5$)					5 ($r^2=7,4$)	3 ($r^2=7,9$)	

Tabela 24. Asocirani markeri sa favorizovanim alelima i njihovim fenotipskim efektima na pojedine osobine, broj genotipova sa poželjnim alelima i odabrana tri reprezentativna genotipa koja imaju poželjni alel

Osobina	Lokus	Hromozom	Pozicija (cM)	Favorizovan alel(i) bp	R ² (%)	frekvencija alela	Fenotipski efekat (a _i)	Godine u kojima su detektovane asocijacije	Genotipovi sa favorizovanim alelom	Reprezentativni genotipovi
Broj klasića po klasu	<i>Xwmc167</i>	2DL	97,1	153	26,6	2,99	14,3	1995,1996,1997,1998,1999	8	ZG 1020 A, ZG 1008, ZG 8065
	<i>Xwmc18</i>	2D	45,8*	nulti	13,7	6,34	8,56	1995,1996,1997,1998,1999	18	SST 101/A, NS 10/94, NSA 89-5126
	<i>Xgwm157</i>	2DL	73,1	107	12,2	6,74	1,97	1995,1996,1997,1998,1999	17	ZG K 146/82, ZG 8065 , ZG 1020 A
	<i>Xwmc144</i>	2DS	67,1	157	40,7	-	-	-	-	-
Broj st. klasića po klasu	<i>Xwmc167</i>	2DL	97,1	177	22,5	10,92	-9,4	1995,1996,1997,1998,1999	31	Norin 50, Huequen, NS 3/90
	<i>Xgwm11</i>	1B	57	194	10,7	8,10	-0,88	1995,1997,1999	23	NS 51-11, Resistente , Szegedi 765
	<i>Xwmc18</i>	2D	45,8*	240	14,6	6,34	-0,4	1995,1996,1997,1998,1999	18	Resistente , NS 10/94, No4
	<i>Xgwm157</i>	2DL	73,1	101	9,7	5,32	-1,16	1995, 1996,1997,1999	15	Banks, Huequen, Condor
	<i>Xwmc144</i>	2DS	67,1	137	8,6	2,96	-0,82	1995,1996,1998,1999	8	NS 3/90, Sap "S"-Mon"S", Chinofuz
Broj zrna po klasu	<i>Xwmc167</i>	2DL	97,1	149	11	1,06	16,32	1995,1996,1997,1998,1999	3	ZG K T 178/82, NS 7/94, ZG K T 171/1/82
	<i>Xbarc101</i>	2BS	75,5	120	8,2	7,57	1,88	1995,1997,1998	21	ZG 1020 A, ZG 8065 , ZG 990
	<i>Xgwm294</i>	2AL	74	111	9,8	2,11	8,71	1995,1997,1998,1999	6	NS 62-20 (S.Cerros M), NS 62-21 (S.Cerros M), Sundown
	<i>Xwmc18</i>	2D	45,8*	nulti	8,5	6,34	4,31	1995,1996,1997,1998,1999	18	ZG 1020 A, ZG 8065 , ZG 990
	<i>Xgwm157</i>	2DL	73,1	77	7,6	1,06	1,81	1995,1996,1997,1998,1999	3	ZG K 172/82, ZG K T 171/1/82 , NS 55-32
Indeks klasa	<i>Xcfa2086</i>	2A	133,4*	211	14,3	1,41	0,02	1995,1996,1997	4	Hang Chou, Kratka, Banačanka
Dužina vršne internodije	<i>Xgwm294</i>	2AL	74	75	12	1,06	-13	1997,1999	3	UC 66206, UC 64246, UC 66052
	<i>Xcfa2086</i>	2A	133,4*	211	11,1	1,41	-2,56	1998,1999	4	Hang Chou, Kratka, Banačanka
Dužina klasa	<i>Xgwm294</i>	2AL	74	95	11	6,51	1,41	1995,1997,1998	17	L-160/89, L-154/89, Sentry
	<i>Xcfa2086</i>	2A	133,4*	249	14,6	2,46	1,46	1995,1996,1997,1998,1999	7	ZG K 176/82, ZG K 77/82 , NS 7/94
	<i>Xgwm157</i>	2DL	73,1	107	7,6	6,74	0,4	1995,1996,1997,1998	17	ZG K 171/1/82, ZG K 77/82 , L-160/89
	<i>Xwmc333</i>	6A		181	4,7	2,83	1,53	1997,1998,1999	8	<i>Tr. spelta</i> var. <i>duhamelianum</i> , Partizanka, NS 625
Vreme klasanja	<i>Xwmc44</i>	1B	92	266	16,3	4,23	-2,97	1995,1996,1997,1998,1999	12	INTRO 7, Noe, Lr22
	<i>Xgwm294</i>	2AL	74	79	13,5	1,41	-3,34	1995,1996,1997,1998,1999	4	Hang Chou , Arg.80/5216, Condor
	<i>Xcfa2086</i>	2A	133,4*	253	12	4,93	-2,86	1995,1997,1998,1999	14	Sap "S"- Mon"S" , Olesen Dwarf, S.174/72
	<i>Xwmc407</i>	2A	7,7	121	10,6	2,46	-2,81	1995,1997,1998	7	Fisherect 4A , NS 30/95, S 13
	<i>Xwmc167</i>	2DL	97,1	185	7,1	65	-2	1995,1996,1997,1998,1999	180	Peking 1-38, Sap "S"-Mon"S" , Hang Chou
	<i>Xwmc28</i>	5B	139,4	197	8,3	8,45	-1,71	1995,1997,1998,1999	24	Sap "S"- Mon"S" , Fisherect 4A , Noe
Vreme cvetanja	<i>Xwmc44</i>	1B	92	266	14,7	4,23	-2,47	1995,1996,1997,1998,1999	12	INTRO 7, Noe, Lr22
	<i>Xgwm294</i>	2AL	74	79 i 101	9,6	1,41; 2,11	-2,52; -2,63	1995,1996,1998,1999	4,6	Hang Chou , Arg.80/5216, Condor;NS 736, NS 603, NS 51-11
	<i>Xcfa2086</i>	2A	133,4*	253	11,2	4,93	-2,06	1995,1996,1997,1998	14	Sap "S"-Mon"S" , Olesen Dwarf, S.174/72
	<i>Xwmc407</i>	2A	7,7	121	10,5	2,46	-2,34	1995,1996,1997,1998	7	Fisherect 4 A, NS 30/95, S 13
	<i>Xwmc167</i>	2DL	97,1	185	7,4	65	-2,07	1995,1996,1997,1998,1999	180	Peking 1-38, Sap "S"-Mon"S" , Hang Chou
	<i>Xwmc28</i>	5B	139,4	197 i 201	7,9	8,45; 3,87	-1,68; -2,14	1995,1998,1999	24;11	Sap "S"-Mon"S" , Fisherect 4 A, Lerma Rojo; Norin 61, NS 603, NS 51-11

Somers i sar. (2004) A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics. 109:1105-1114.

*<https://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/markerDetailAction.do?markerId=1113>

5. DISKUSIJA

5.1. Genetički diverzitet

Jedan od važnih uslova u početnim fazama oplemenjivanja pšenice je prisustvo određenog stepena varijabilnosti u oplemenjivačkom materijalu. Genetički diverzitet roditeljskih komponenti je najznačajniji faktor kako bi se tokom oplemenjivačkog procesa stvorila željena i superiorna potomstva (Kobiljski i sar., 2002). Fenotipska varijabilnost koja je utvrđena za pojedina ispitivana svojstva pšenice ukazala je na dobar preliminarni izbor početnog materijala. Da bi se potvrdilo prisustvo diverziteta i na molekularnom nivou pristupilo se analizi mikrosatelitskih lokusa na odabranom setu genotipova. Otkriven je ukupan broj od 349 alelnih varijanti u svih 30 ispitivanih lokusa, kao i prosečan broj od 11,5 alela po lokusu, koji su predstavljali prve pokazatelje značajnih genetičkih varijacija akumuliranih u materijalu. Pored toga, u dvadeset lokusa je detektovano prisustvo više od 10 alelnih varijanti. Znatno manji broj 4,8 alela po lokusu utvrdili su Breseghello i Sorrels (2006) ispitujući američke elitne sorte pšenice. Nešto veće vrednosti utvrdili su Plaschke i sar. (1995) sa detektovana 5,2 alela po lokusu analizom elitnih genotipova hlebne pšenice, dok su Stachel i sar. (2000) na sličnom materijalu detektovali 6,2 alela po lokusu primenom 42 SSR markera. Chen i sar. (2012) su takođe zabeležili relativno mali broj 5,05 alela po lokusu. Može se pretpostaviti da su relativno male vrednosti rezultat ispitivanja znatno manjeg broja genotipova ili analize elitnog oplemenjivačkog materijala, kao i korišćenja sistema za detekciju koji ima slabiju moć rezolucije. Sa druge strane, ispitujući znatno veći broj genotipova (502) Roeder i sar. (2002) su utvrdili 10,5 alela po lokusu, što ukazuje na značajan diverzitet prisutan u evropskim sortama. U većini istraživanja, koja su bazirana isključivo na materijalu poreklom iz određene zemlje ili specifičnog regiona, uočava se smanjenje genetičkog diverziteta. Tako su ispitivanja na američkim tvrdim i mekim sortama pšenice, utvrdila 7,2 alela po lokusu (Zhang i sar., 2010) iako je analizirano čak 205 genotipova. Međutim, rezultati dobijeni od strane Roussel i sar. (2004), iako su bazirani na genotipovima iz Francuske ukazuju na izuzetno značajan prosečan broj alela po lokusu (14,5) i značajnu PIC vrednost od 0,66. Ovaj rezultat je nastao ispitivanjem velikog broja (559) genotipova primenom 42 SSR markera. Slične rezultate sa izuzetno značajnim genetičkim diverzitetom identifikovani su i od strane Huang i sar. (2002) na

kolekciji od 998 sorti sa 18,1 alelom po lokusu i prosečnim genetičkim diverzitetom od 0,77 u 26 mikrosatelitskih lokusa. Takođe, značajan diverzitet detektovao je Balfourier (2007) sa prosekom od 23,9 alela po lokusu primenom 38 SSR markera. Iako je korišćen relativno mali broj markera u navedenim istraživanjima, broj genotipova i njihova raznovrsnost su doprineli utvrđivanju značajne varijabilnosti na molekularnom nivou. Sa druge strane, Landjeva i sar. (2014) su na svega 52 genotipa uočili 10,5 alela po lokusu primenom samo 24 markera. U radu su korišćeni genotipova koji su pripadali lokalnim populacijama i divljim srodnicima pšenice, te je i očekivan veći stepen diverziteta u odnosu na oplemenjivački materijal. Takođe su detektovane i visoke vrednosti prosečne heterozigotnosti od 41% u radu Landjeve i sar. (2014), dok je u ovom radu ona iznosila samo 2%. Ovi rezultati su očekivani s obzirom na to da su u našem materijalu dominirale sorte i elitne linije, a samim tim i mali procenat prisutnih heterozigota. Približno ovim vrednostima ustanovljena je prosečna heterozigotnost od 9,1% u radu Al Khanjari i sar. (2007).

U radovima koji su koristili materijal iz iste genetičke kolekcije koja je korišćena u ovoj studiji, utvrđen je znatno manji broj 7,96 alela po lokusu (Kobiljski i sar. 2002; Dodig i sar., 2012). Jedan od razloga jeste analiza samo 96 genotipova iz ove kolekcije kao i različiti set odabranih markera. Približno slične rezultate dobijene u ovoj studiji dobili su Guo i sar. (2011) sa 11,7 alela po lokusu primenom 69 mikrosatelita i analizom 99 genotipova iz Kine.

Dobijena prosečna vrednost genetičkog diverziteta u ovom radu imala je vrednost od 0,722 i bila je veća ili slična rezultatima u gore navedenim radovima (kretala se od 0,54 do 0,77), što je potvrdilo činjenicu o prisustvu značajne varijabilnosti materijala.

Srednja PIC vrednost dobijena u ovom radu (0,68) bila je slična kao u radu Hao i sar. (2011), a iznosila je 0,65 koji su analizirali sličan broj genotipova (250) hlebne pšenice. U većini lokusa je detektovan veći broj alela (više od 10) u sprovedenoj studiji. Razlike koje postoje u broju alela kod različitih lokusa mogu se objasniti različitim stopom mutacija zastupljenih u pojedinačnim lokusima. S obzirom da je selekcija i oplemenjivanje realizovano u različitim agro-ekološkim uslovima ovako visoka alelna varijabilnost oslikava i raznovrsnost spoljašnje sredine (Landjeva i sar., 2014).

Pojava multih alela je česta kod pšenice što je potvrđeno u radu prisustvom multih alela u 21 lokusu. Ona je posledica delecija u određenim mikrosatelitskim lokusima ili mutacijama (indel ili substitucijama) na mestu vezivanja prajmera (Gupta i Varshney, 2000).

5.1.1. Genetički diverzitet u pojedinačnim genomima

Od 30 SSR markera, najveći broj (12) je pripadao genomu A, zatim genomu B (11) i genomu D (7). Iako je najveći broj alela detektovan na A genomu, prosečno najveći broj alela po lokusu je uočen u okviru B genoma (12,9). U literaturi se mogu naći različiti podaci za detektovan prosečan broj alela po lokusu u pojedinim genomima, s tim da je najčešći odnos B>A>D koji se podudara sa utvrđenim u ovom radu. Tako su i nedavno Nielsen i sar. (2014) utvrdili znatno veći prosečan broj alela u okviru B genoma, u odnosu na A i D genome. Takođe, veća polimorfnost B genoma u odnosu na preostale genome utvrđena je i u ranijim istraživanjima (Roeder i sar., 1998; Khlestkina i sar., 2004). Međutim, potpuno drugačija slika je dobijena u rezultatima Peng i sar. (2009) koji su utvrdili sledeći odnos A>D>B po genomima sa neočekivano malom polimorfnošću B genoma.

Kada se razmatraju PIC vrednosti u sprovedenom istraživanju, one su se kretale od 0,57 u D genomu do 0,74 u B genomu. Slične prosečne PIC vrednosti od 0,75 i odnos po genomima od 0,36 (D) do 0,88 (B) detektovali su Wang i sar. (2013). Takođe, su i rezultati Huang i sar. (2002) uporedivi sa rezultatima u sprovedenom radu koji su analizirali genetički diverzitet na 998 genotipova pšenice. Literaturni podaci nesumnjivo govore o najvećoj polimorfnosti prisutnoj u B genomu, koja se pripisuje procesu domestikacije. Tačnije, heksaploidna pšenica je najveći deo genetičkog diverziteta preuzela od svojih tetraploidnih predaka za razliku od vrste *Aegilops tauschii* (donor D genoma), što je dovelo do većeg broja efektivnih rekombinacija unutar A i B genoma. Ova činjenica je potvrđena u sprovedenom radu sa najmanjom PIC vrednosti genoma D unutar heksaploidnog genoma. Nešto drugačiji odnos između genoma dobili su Roussel i sar. (2004) analizom francuskih sorti, gde je na osnovu PIC vrednosti i genetičkog diverziteta dobijen odnos B>D>A, što se pripisuje specifičnom odabiru molekularnih markera. Shodno tome D genom je imao manju polimorfnost u pogledu većine

parametara koji su pokazatelji diverziteta. Ovo je u potpunoj saglasnosti sa očekivanim i dobijenim rezultatima.

Dobijene vrednosti ukazuju na izuzetno značajnu genetičku varijabilnost bez obzira što je primenjen relativno mali broj mikrosatelita. Time je potvrđena ne samo reprezentativnost materijala odabranog na osnovu fenotipske varijabilnosti nego i poželjan izbor polimorfni mikrosatelita za dalju analizu.

5.2. Struktura populacije

Pored utvrđivanja genetičkog diverziteta i određivanje strukture populacije je važan faktor tokom molekularnog oplemenjivačkog procesa. Struktura populacije je posledica niza faktora, pre svega nastala kroz dugogodišnju aktivnost samih oplemenjivača, kao i brojnih faktora spoljašnje sredine. Ona ima snažan uticaj na gametsku neravnotežu, a samim tim i na asocijativnu analizu. Odgovarajuća struktura populacije sprečava ili smanjuje greške tipa I i tipa II i time je omogućeno identifikovanje pravih veza između molekularnih markera i osobina. U sprovedenom istraživanju na osnovu algoritma modela, genotipovi su klasifikovani u 6 subpopulacija. Međutim, Evanno i sar. (2005) predlažu korekciju ove klasifikacije primenom delta K modela, kojom je dobijena preraspodela u okviru 3 subpopulacije. Ovaj metod u većini slučajeva favorizuje raspored genotipova u 2 ili 3 subpopulacije, bez obzira na broj genotipova uključenih u analizu (Vigouroux i sar., 2008). Takođe na osnovu verovatnoće, ostvarena je zadovoljavajuća diskriminacija genotipova prema kriterijumu većem ili jednakom od 0,5 te je kriterijum verovatnoće korišćen u daljoj diskusiji. Međutim, precizna preraspodela genotipova na osnovu geografskog porekla je otežana usled konstantne razmene oplemenjivačkog materijala i linija između različitih oplemenjivačkih centara i oplemenjivačkih programa. Laido i sar. (2013) upućuju na relativno podjednaku distribuciju genotipova poreklom iz istih regiona, koja je rezultat sličnog selektivnog pritiska tokom domestikacije i oplemenjivačkog procesa.

Kako bi se dodatno objasnilo grupisanje genotipova u pojedine potpopulacije korišćene su dostupne informacije o pedigreeima za 188 genotipova (Prilog 1). U sprovedenom istraživanju geografsko poreklo genotipova je delimično moglo da objasni

grupisanje u okviru iste subpopulacije. Međutim, u prvoj subpopulaciji uočena je velika divergentnost genotipova poreklom sa svih kontinenata. Presudnu ulogu u tome je imala razmena genetičkog materijala između oplemenjivačkih centara, što je posebno izraženo u oplemenjivačkim centrima u Mađarskoj, Rumuniji, Bugarskoj, Češkoj koje su pri stvaranju sorti koristile različite italijanske i jugoslovenske sorte (Borojević, 2003). Sa druge strane, mnoge sorte iz bivšeg Sovjetskog Saveza i Meksika su takođe introdukovane i korišćene u brojnim oplemenjivačkim programima širom sveta. U prošlom veku, italijanske sorte su uspešno gajene u Južnoj Americi, posebno Argentini zbog poželjnih svojstava, pre svega niske stabljike, ranostasnosti i visokog potencijala za prinos (Lorenzetti, 2000). Podgrupu dva su činile pretežno engleske i francuske sorte, kao i najproduktivnije italijanske sorte iz druge polovine prošloga veka: Mara, San Pastore i Fortunato. Pedigrei za većinu genotipova u trećoj subpopulaciji nisu bili dostupni, ali u njoj dominiraju američke sorte koje su nosioci gena otpornosti na lisnu rđu (*Lr* gena). U četvrtoj subpopulaciji nalaze se sorte sa prostora Hrvatske, u čijim pedigreeima su prisutne sorte Granata i Ranka, koje predstavljaju potomke italijanskih sorti Mare i Libelule, a koje su imale veliki uticaj na oplemenjivačke programe u bivšoj Jugoslaviji (Borojević i Borojević, 2005). Većinu genotipova podgrupe 5 su činile sorte stvorene u Odeljenju za strna žita. Iako su kao roditelji korišćeni slični genotipovi, NJ analiza je pokazala značajnu divergentnost i unutar ove grupe. Pedigre analiza je pokazala da je ozima sorta Bezostaja 1 zastupljena u velikom broju genotipova ove grupe. Ova ruska sorta, visokog kvaliteta i polupatuljaste stabljike, je bila dominantna sorta u brojnim oplemenjivačkim programima u istočnoj i centralnoj Evropi (Denčić, 2006). Ova sorta je glavni donor *Rht-8* i *Ppd-1* gena, koji potiču od japanske sorte Akakomugi, koja je bila jedan od roditelja tokom složenih ukrštanja. Davne 1913. godine Stampelli je indirektno koristio ovu sortu u ukrštanjima pri stvaranju sorte San Pastore, koja je uticala na značajno povećanje produktivnosti pšenice na našim prostorima. Sorta Akakomugi je bila donor ovih gena i u sortama Kavkaz i Aurora koje su takođe prisutne u pedigreeima genotipova iz ove grupe (Borojević i Borojević, 2005).

Međutim, genetički odnosi između genotipova koji se zasnivaju samo na podacima o pedigreeu ne mogu u potpunosti da objasne kompleksne odnose koji nastaju usled selekcije, mutacija i genetičkog drifta (Maccaferri i sar., 2005). Pored toga, podaci o pedigreeima su često nedostupni i nekompletni za većinu genotipova što je bio slučaj i

u našem istraživanju posebno kod genotipova šeste subpopulacije. Bez obzira na sve Laido i sar. (2013) ističu značaj pedigreea kao važnog elementa za procenu strukture kod modernih sorti. S druge strane, primena različitih molekularnih markera pokazuje znatno veću efikasnost u proceni genetičkog diverziteta i strukture populacije. Pored toga, Maccaferri i sar. (2003) ističu efikasnost mikrosatelitskih markera u karakterizaciji germplazme zbog jednostavne upotrebe, visoke polimorfnosti, lokusne specifičnosti i kodominantne prirode ovih markera.

Analiza glavnih koordinata je potvrdila slično grupisanje genotipova sa analizom u programu Structure, s tim da je kod pojedinih subpopulacija došlo do međusobnih preklapanja. S obzirom da je u analizu uključen veliki broj genotipova, otežano je njihovo potpuno razdvajanje u koordinatnom sistemu. Hao i sar. (2011) su korišćenjem analize glavnih koordinata i Bajesovog algoritma utvrdili sličnu preraspodelu genotipova što je bilo u skladu sa dobijenim rezultatima u ovom radu. Time je potvrđen značaj obe analize, s tim da Chen i sar. (2012) koji su koristili različite pristupe za analizu strukture populacije naglašavaju značaj određivanja strukture u programu Structure. Određivanje strukture populacije na osnovu modela u programu Structure pokazuje najkompletnije razvrstavanje genotipova i predstavljaju najadekvatnije sredstvo za određivanje genetičke strukture za dalju asocijativnu analizu između markera i svojstava (Yu i sar., 2006), te su ovi podaci poslužili kao osnova za dalju analizu.

5.2.1. Parametri genetičkog diverziteta u dobijenim potpopulacijama

Prisustvo zajedničkih, retkih, jedinstvenih, specifičnih i novih alela imaju važnu ulogu u genetičkim istraživanjima ukazujući da je najpovoljniji uravnotežen odnos broja efektivnih alela i zajedničkih alela u pojedinim potpopulacijama kako bi se izbegla dominacija pojedinih alela (Dickson i sar., 2010; Landjeva i sar., 2014). Pored toga i jedinstveni aleli služe kao indikatori protoka gena. Šenonov indeks diverziteta (H') je važan parametar za karakterizaciju diverziteta i služi za razumevanje strukture alela u SSR lokusu. Prosečna vrednost Šenonovog indeksa u svim lokusima iznosila je 1,38, a vrednosti su se kretale od 0,48 do 2,07. Svi parametri genetičkog diverziteta dobijeni u

ovom istraživanju su pokazali značajan nivo polimorfnosti na šta je uticao veliki broj genotipova različitog geografskog porekla uključenih u istraživanje.

5.3. Analiza molekularne varijanse

Veliki broj istraživanja, koja se bave procenom varijabilnosti unutar i između genotipova poreklom iz različitih oplemenjivačkih programa, geografskih regija, razdoblja priznavanja, divljih i modernih sorti su dobila slične rezultate kao u sprovedenom radu (Roussel i sar., 2004; Prasad i sar., 2009; Christiansen i sar., 2002).

Na osnovu AMOVA analize izvršena je procena varijabilnosti između individua u okviru iste subpopulacije kao i variranja između utvrđenih subpopulacija. Najveći udeo variranja od 91% potiče od variranja između genotipova, pre svega zbog varijabilnosti koja potiče od razlika između sorti iz raznovrsnih oplemenjivačkih centara, s obzirom na to da su koristili genetički različite i udaljene genotipove. Kod genotipova u okviru iste populacije je utvrđeno najmanje variranje što je i očekivano s obzirom na dobijena grupisanja, u kojima bi trebali biti genotipovi što sličnije germplazme. Variranje od 6% potiče od variranja između postojećih subpopulacija i nije veliko, ali je ono bilo dovoljno da ih razdvoji u odvojene klastere. Uzgajanje sorti u sličnim agroekološkim uslovima je moglo da smanji eventualna variranja između dobijenih potpopulacija. Ovi rezultati ukazuju da u kolekciji Instituta za ratarstvo i povrtarstvo postoji značajna varijabilnost u genotipovima koje predstavljaju dobar izvor genetičkog diverziteta za stvaranje novih sorti u daljem oplemenjivačkom radu.

5.4. LD analiza

Posmatrajući LD kod različitih vrsta i populacija moguće je uočiti različit stepen LD koji nastaje usled specifičnog načina oplodnje, rekombinacija ili genetičkog drifta. Velika variranja u pogledu LD uočavaju se prilikom analize različitih hromozoma u okviru iste vrste. Ovakvi rezultati su dobijeni u radu Crossa i sar. (2007) gde je prisustvo LD utvrđeno na udaljenosti od čak 87 cM, dok sa druge strane LD kod blisko vezanih markera nije utvrđen. Ispitujući nivo LD u okviru istih hromozoma,

Bresegghello i Sorrells (2006) su takođe utvrdili značajne razlike. Tako su utvrdili prisustvo LD na 2D hromozomu na udaljenosti manjoj od 1 cM, dok se na 5A hromozomu LD javljao na oko 5 cM. S obzirom na to da su markeri u sprovedenom radu raspoređeni u okviru čitavog genoma, njihova gustina na pojedinim hromozomima je bila zanemarljiva te je analiza LD između interhromozomskih parova bila od većeg značaja. Iako je prisustvo LD na nezavisnim hromozomima iznenađujuća, ova pojava se objašnjava kroz rekombinacije i/ili epistatičke interakcije između samih hromozoma, a koje su nastale selekcionim pritiskom (Gupta i sar., 2005). Stepen LD zavisi kako od načina oprašivanja kod različitih biljnih vrsta (razlike između stanooplodnih i samooplodnih biljaka) tako i od same strukture populacije (Flint-Garcia i sar., 2003). U dosadašnjim istraživanjima, veći nivo LD je utvrđen kod heksaploidne pšenice nego kod drugih biljnih vrsta (npr. kukuruza) zbog inbridinga koji se javlja kod samooplodnih biljaka.

Broj lokusa u LD, kao i nivo LD strogo zavise od strukture populacije što je potvrđeno u radu posmatrajući procentualni broj lokusa u celokupnoj populaciji (55,6) i pojedinačnim subpopulacijama (Q1-2,3; Q2-7,4; Q3-5,9; Q4-6,9; Q5-10,8; Q6-6,2.) U skladu sa našim rezultatima su i istraživanja Somers i sar. (2007) koji su na 189 kanadskih sorti pšenice uočili 47,9% parova u značajnom LD, dok je u okviru pojedinačnih grupa, u LD bilo samo 0,9% (hlebna pšenica) i 3,2% (durum pšenica) parova. Takođe, veliki broj lokusnih parova (70%) u LD su utvrdili i Maccaferri i sar. (2005) na 134 sorte pšenice. Potpuno suprotne rezultate, dobili su Neumman i sar. (2011) sa samo 3,2% interhromozomska para u značajnom LD što je znatno manje u poređenju sa našim dobijenim rezultatima. Sličan odnos utvrdili su i Guo i sar. (2011) na elitnim kineskim linijama sa 1,95% marker parova u značajnom LD. Relativno veliki procenat parova detektovan u ovom istraživanju odlika je same populacije sačinjene pretežno od sorti koje su tokom selekcije fiksirale gene od agronomске važnosti. Bez obzira na veliki broj značajnih parova, same detektovane LD vrednosti su bile izuzetno male.

Slični rezultati dobijeni su u radu Neumann i sar. (2011) sa prosečnom vrednošću od $r^2=0,019$ u svim interhromozomskim parovima. Takođe su slične vrednosti od $r^2=0,022$ utvrđene od strane Bresegghello i Sorrells (2006), dok je srednja vrednost iznosila $r^2=0,023$ u svim interhromozomskim parovima u kolekciji durum

pšenice (Laido i sar., 2013). Kako je analiziran relativno mali broj markera vezanih za prethodno detektovane QTL, pa samim tim i male gustine markera i očekivane su relativno male vrednosti. Sorrells i Yu (2009) predlažu vrednosti r^2 u rasponu od 0,1 do 0,2 kao statistički značajne pokazatelje LD. Na osnovu ovih kriterijuma, od ukupnog broja ispitivanih parova samo dva para su imala ove vrednosti. Dok Somers i sar. (2007) predlažu vrednost r^2 veću od 0,2 kao umerenu vrednost LD, koja uglavnom postoji kod markera na udaljenosti manjoj od 10 cM. Veći broj markera u našem radu se nalazio samo u okviru 2A i 2D hromozoma, ali nijedan od njih nije bio na manjoj udaljenosti i nije pokazao značajan uticaj na vrednost LD.

Razmatrajući parove u potpunom LD ($r^2=1$) Neumann i sar. (2011) su detektovali izuzetno veliki broj parova (24) kao posledica analize relativno male populacije (96) pretežno sastavljene od oplemenjivačkog materijala. U većini radova je detektovan mali broj parova u potpunom LD što je u skladu sa rezultatima dobijenim u našem radu, s obzirom na to da su ispitivani interhromozomski parovi.

Nivo LD ima važnu ulogu u asocijativnoj analizi determinišući rezoluciju asocijativnog mapiranja. U slučaju kada vrednost LD naglo opada, rezolucija mapiranja je visoka (Rafalski i sar., 2002). Značajno je napomenuti da su vrednosti LD izuzetno male i nisu mogle imati uticaj na samu asocijativnu analizu.

5.5. Asocijacija primenom MLM i GLM modela

Postoji mnogo izazova pri korišćenju asociiranih markera u marker asistiranom oplemenjivanju, a jedan od njih je da li je distanca između markera i QTL dovoljno mala? Sa druge strane asociirani QTL mogu imati epistatički efekat ili mogu biti povezani sa strukturom populacije ili spoljašnjom sredinom (Camus-Kulandaivelu i sar., 2006). Međutim, upotrebom kolekcije visokog genetičkog diverziteta i tačnih fenotipskih podataka u multilokacijskim i višegodišnjim ogledima moguće je izbeći eventualne nedostatke asocijativne analize. Bez obzira na sve, obavezna je potvrda rezultata jer SSR koji su u vezi, ne moraju biti suštinski u vezi sa datim genom.

Primenom markera koji su pokazali vezu sa QTL iz ranijih istraživanja, moguće je povećati moć same asocijativne analize (Breseghello i Sorrels, 2006).

Primenom GLM modela moguće je detektovati znatno veći broj asocijacija nego korišćenjem MLM modela. Brojna istraživanja ukazuju da se primenom MLM metode otkrivaju stvarne veze sa agronomskim svojstvima i na taj način izbegavaju lažno pozitivne asocijacije koje se mogu detektovati kada se koristi samo GLM analiza (Zhang i sar., 2013). U sprovedenom radu je detektovano ukupno 415 asocijacija primenom GLM modela, u poređenju sa 208 veza detektovanih pomoću MLM modela, što ukazuje na veću diskriminaciju koja se postiže MLM metodom. U radu Yu i sar. (2009) ukazuju na značaj korišćenja oba modela, jer se upotrebom samo MLM modela mogu izostaviti potencijalno značajni lokusi. Ovakav pristup potvrđuju i Neumann i sar. (2011) da se primenom GLM modela mogu otkriti i novi značajni lokusi kao i da je ovaj model korisno upotrebiti za validaciju veze sa datim svojstvom. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju razmatrani su kroz stabilnost QTL kako u godinama tako i kroz značajnost veza detektovanih primenom obe metode. Ovakvo sagledavanje rezultata je poslužilo da se smanji verovatnoća otkrivanja lažnih asocijacija.

Sa stanovišta oplemenjivača jedan od najvažnijih aspekata molekularnog oplemenjivanja jeste u mogućnosti otkrivanja veza između određenih alela i prinosa zrna, odnosno određenih hromozomskih segmenata koji kontrolišu pojedine komponente prinosa. To može da nam ukaže na pravac u kojem želimo da idemo (Kobiljski i sar., 2007) i glavni je razlog zbog koga je prinos kao kompleksno svojstvo rasčlanjeno na jednostavnije komponente.

5.5.1. QTL za broj sterilnih klasića po klasu i QTL za broj klasića po klasu

Pored niza abiotičkih i biotičkih stresova koji utiču na konačan prinos tokom različitih razvojnih stadijuma pšenice, sterilni klasići mogu u velikoj meri dovesti do smanjenja prinosa. Visoka temperatura tokom pojedinih faza razvoja pšenice posebno tokom cvetanja može da dovede do pojave sterilnih klasića (Liu i sar., 2006). Zbog toga je detektovanje lokusa koji mogu da utiču na smanjenje broja sterilnih klasića u klasu važno kako bi se postigla maksimalna fertilnost klasića. Posebno klasići koji se nalaze u bazi klasa kao i u vršnim delovima pokazuju sklonost ka sterilnosti.

Brojna istraživanja za pronalaženje lokusa odgovornih za ekspresiju klasića po klasu su pokazala njihovo prisustvo na različitim hromozomima 1A, 2A, 3A, 5A (Ma i sar., 2013; Sourdille i sar., 2000). U istraživanjima Li i sar. (2007) su identifikovali samo 1 QTL za broj klasića po klasu na 5D hromozomu, dok je za kontrolu broja sterilnih klasića po klasu detektovan veći broj QTL (8) na sledećim hromozomima: 1A, 4A, 6B, 7A i 7D. U istraživanjima sprovedenim od strane Zhang i sar. (2010) su pored hromozomske grupe 5, najveći broj QTL za broj klasića po klasu identifikovali u okviru grupe 2, koji bi se mogli podudarati sa detektovanim regionima u ovom radu. Veliki broj QTL za broj klasića po klasu je detektovan od strane Ma i sar. (2007) i Wu i sar. (2012) koji ukazuju na njihovo prisustvo skoro na svim hromozomima. U sprovedenom istraživanju svi lokusi koji su odgovorni za ekspresiju kako broja klasića po klasu tako i broja sterilnih klasića po klasu detektovani su isključivo na 2D hromozomu u neposrednoj blizini 4 navedena markera: *WMC144*, *WMC18*, *GWM157*, *WMC167*. Pored ovih kolokalizovanih QTL, detektovan je i QTL za broj sterilnih klasića po klasu na 1B hromozomu (blisko vezan sa markerom *GWM11*). Međutim, iako su svi stabilni QTL za broj klasića po klasu detektovani samo u okviru 2D hromozoma, potvrđeno je prisustvo i asocijacija na drugim hromozomima, ali ne i njihova stabilnost u većem broju godina.

Istraživanja Johnson i sar. (2008) su pokazala da se u oblasti centromere na hromozomu 2D između markera *WMC144* i *WMC18* nalazi C lokus, koji je odgovoran za morfologiju klasa, veličinu, oblik i broj zrna. Gul i Allan su još 1972. godine ukazali na direktne i indirektne uticaje ovog lokusa na brojna agronomska svojstva, dok su kasnija istraživanja dokazala da je kompaktnost klasa kompleksno svojstvo i da se nalazi pod uticajem većeg broja gena. Rezultati u sprovedenom radu utvrdili su vezu oba markera sa brojem klasića i brojem sterilnih klasića po klasu što potvrđuje značaj ovih regiona. S obzirom na to da broj klasića po klasu utiče na kompaktnost klasa, prisustvo veza ovih markera sa spomenutim osobinama može da ukaže na njihovu direktnu vezu sa ovim genom ili nekim bliskim QTL. Na istom hromozomu Dobrovolskaya i sar. (2009) su locirali i *Mrs1* (multirow spike) lokus koji je odgovoran za pojavu višerednih klasova (razgranatog klasa). Razgranatost klasa se nalazi pod kontrolom velikog broja gena. Samo u ovom regionu identifikovano je 18 major i 30 minor gena, a jedan od njih je i *Mrs1* lokus koji obuhvata 7Mbp i predstavlja visoko

rekombinantni hromozomski segment. Morfologija klasa odnosno arhitektura klasa ima veliku ulogu u determinisanju prinosa, te je ovaj region koji omogućava formiranje većeg broja klasova značajan za povećanje kapaciteta klasa. U našem materijalu su sorte poreklom iz Hrvatske predstavljale genotipove koji poseduju razgranate klasove sa znatno većim brojem klasića u odnosu na ostale genotipove. Oba markera koja su pokazala vezu sa brojem klasića po klasu su detektovana u regionu centromere (*WMC18* i *WMC144*) i mogla bi ukazivati i na vezu sa *Mrs* genom.

Marker *WMC144* je imao najveći uticaj od 40,7% na varijabilnost broja klasića po klasu tokom tri ispitivane godine, međutim svi aleli u ovom lokusu su doveli do smanjenja broja klasića, te je značaj ovog markera za MAS od malog značaja. Pretpostavlja se da su samo aleli sa frekvencijom manjom od 1% imali pozitivan efekat na povećanje broja klasića. U saglasnosti sa našim rezultatima su i utvrđene identične veze ovog markera sa QTL za broj klasića po klasu u radu Wu i sar. (2012). Isti marker je pokazao vezu i sa dužinom klasa, koja je utvrđena i u našem materijalu ali samo tokom dve ispitivane godine. Isti autori su detektovali i QTL za prinos u blizini markera *GWM157*. U sprovedenom radu ovaj marker je imao vezu sa brojem klasića i brojem sterilnih klasića po klasu, kao i brojem zrna po klasu, koje predstavljaju glavne komponente prinosa što indirektno ukazuje i na vezu sa prinosom *per se*.

Pored detektovanih QTL na 2D hromozomu, region hromozoma 1B blisko vezan sa markerom *GWM11* je jedini imao efekat na fenotipsku varijabilnost broja sterilnih klasića po klasu. U ranijim literaturnim podacima ovaj marker je pokazao prisustvo QTL za veliki broj agronomski važnih i adaptivnih osobina (Yang i sar., 2002; Wang i sar., 2009), kao i vezu sa prinosom zrna (Kuchel i sar., 2007). U radu Neumann i sar. (2011) su primenom DArT markera detektovali 5 markera na dugom kraku 1B hromozoma koji su u vezi sa navedenim osobinama, čiji regioni bi mogli da se podudaraju sa detektovanim QTL. Genotipovi sa specifičnim alelima čiji efekat dovodi do smanjenja broja sterilnih klasića po klasu bi mogli da budu od značaja kao roditeljske komponente u daljim ukrštanjima.

Li i sar. (2007) ističu hromozom 7D kao potencijalnog nosioca QTL klastera za niz ispitivanih komponenti prinosa. Međutim, u radu nijedan od ispitivanih markera nije ukazivao na vezu markera i osobina klasa koji pripada ovom hromozomu.

Interesantno je naglasiti da su markeri *GWM157*, *WMC167* i *WMC18* pozicionirani na 2D hromozomu asocirani i sa brojem klasića po klasu, brojem sterilnih klasića po klasu, kao i sa brojem zrna po klasu. Ovo ukazuje na veliki značaj ovih regiona koji kontrolišu veći broj osobina tzv. kolokalizovanih QTL. U neposrednoj blizini markera *GWM157* detektovan je *Acph-D2* gen koji kodira proteine iz klase fosfataza (Kirby i sar., 2005).

5.5.2. QTL za broj zrna po klasu

Broj zrna po klasu je jedna od najvažnijih komponenti prinosa, koja ima veću heritabilnost i nalazi se pod manjim uticajem faktora spoljašnje sredine u odnosu na prinos *per se* (Ma i sar., 2007). Stabilni i značajni QTL u istraživanju su otkriveni na sledećim hromozomima: 2A i 2B (po jedan marker), 2D (tri markera) hromozomu. Njihov uticaj na fenotipsku varijabilnost broja zrna po klasu se kretala od 7,6 do 11%. Neumann i sar. (2011) su takođe pronašli vezu markera i broja zrna po klasu na hromozomu u okviru 2B i 2D hromozoma, dok su Li i sar. (2007) detektovali 3 QTL locirana na 2A hromozomu. Međutim, ovi QTL su pripadali kratkom kraku ovog hromozoma što nije bilo u saglasnosti sa detektovanim QTL koji je pripadao dugom kraku (2AL), a koji je pozicioniran u blizini markera *GWM294*. Isti QTL za broj zrna po klasu blisko vezan sa ovim markerom otkriven je u radu Yao i sar. (2009), koji su pokazali i prisustvo QTL za dužinu klasa, a u vezi sa istim markerom.

Najznačajniji i najstabilniji QTL (u svim ispitivanim godinama) za broj zrna po klasu je detektovan u blizini markera *WMC167*, koji je u radu Jia i sar. (2013) pokazao vezu sa parametrom kvaliteta. U radu Cuthbert i sar. (2008) su utvrdili prisustvo QTL za broj zrna po klasu na hromozomu 2D na samo 4,2 cM od markera *WMC18*. Stabilna veza ovog markera i osobine je potvrđena u rezultatima dobijenim u ovom radu, što nesumnjivo govori o postojanju i značaju ovog regiona za ekspresiju ove osobine u našim uslovima spoljašnje sredine i u našem materijalu.

Pored gore navedenih markera (*GWM157*, *WMC18*, *WMC167*), koji su pokazali vezu i sa drugim osobinama klasa kao što su: broj klasića i sterilnih klasića po klasu, ovi regioni na 2D hromozomu potvrđuju značajnu ulogu i u ekspresiji ove osobine. Još davna ispitivanja na vrsti *Aegilops tauschii* od strane Kimber i Feldman (1987), ukazuju

na važnost 2D hromozoma kao izvora agronomski važnih gena koji učestvuju u morfologiji klasa.

Marker *BARC101* (2BL) je imao jedinstvenu vezu sa brojem zrna po klasu sa uticajem od 8,2% na varijabilnost ovog svojstva. Ovaj marker je u radu Ma i sar. (2013) pokazao negativan efekat na masu hiljadu zrna redukujući je za čak 13,2%. Prema literaturnim navodima marker *BARC101* se dovodi u vezu sa QTL za otpornost na različite bolesti, pre svega fuzarijum i različite tipove rđe (Yuan i sar., 2010; Randhawa i sar., 2012). U blizini ovog markera nalazi se gen *Yr36* koji je odgovoran za razvoj žute rđe. U dosadašnjim istraživanjima nije utvrđena veza sa brojem zrna po klasu, ali su Golabadi i sar. (2011) identifikovali u ovom regionu, QTL za broj klasova po m², masu hiljadu zrna i prinos zrna, što ukazuje na važnost ovog regiona za ekspresiju važnih komponenti prinosa. Ovaj marker bi mogao da predstavlja potencijalno novi QTL za broj zrna po klasu.

Wang i sar. (2009) su na hromozomu 2A u blizini markera *WMC407* detektovali QTL za broj zrna po klasu koji je u našem radu bio značajan samo GLM analizom tokom dve ispitivane godine. Zbog izostanka veze primenom MLM metode kao i detektovane male vrednosti za varijabilnost ove osobine (5,6%) primenom GLM, ovaj marker ne bi imao veći značaj za primenu u MAS.

5.5.3. *QTL za dužinu klasa*

Duži klasovi bi omogućili povećanje broja zrna po klasu što bi potencijalno moglo usloviti i postizanje većeg prinosa. Kao što je već navedeno morfologija klasa se nalazi pod kontrolom tri glavna gena Q, C i S1, koji se nalaze na 5A, 2D i 3D hromozomima. Pored ovih gena u konačnoj ekspresiji dužine klasa učestvuje veliki broj minor gena (Sourdille i sar. 2000). Snape i sar. (1985) ukazuju da Q lokus ima glavnu ulogu u varijabilnosti dužine klasa. Međutim, dobijeni rezultati nisu utvrdili postojanje QTL na hromozomima grupe 5, zbog relativno malog broja korišćenih markera sa ove grupe. Jedini region na 2D hromozomu u blizini *GWM157* je imao asocijaciju sa dužinom klasa, a koji bi mogao odgovarati regionu C lokusa. Ovakav zaključak sledi iz rezultata koji su pokazali da je isti region bio odgovoran i za broj klasića po klasu, broj sterilnih klasića po klasu i broj zrna po klasu, što je u saglasnosti sa činjenicom da ovaj

region ima važnu ulogu u morfologiji klasa koju određuju gore navedne osobine. U ispitivanom materijalu pored 2D regiona, na varijabilnost dužine klasa uticala su i dva hromozomska regiona na 2A hromozomu (*CFA2086* i *GWM294*). Asocijacija markera *GWM294* (2AL) i dužine klasa detektovana u sprovedenom radu je u skladu sa rezultatima Yao i sar. (2009) koji su detektovali isti QTL. Pored značajnih QTL na dugom kraku 2A hromozoma je mapiran i *Br* gen (brittle rachis) koji je odgovoran za krtost rahisa. Ova karakteristika je odlika divljih srodnika pšenice koja je doživela transformaciju tokom procesa domestikacije pšenice. U intervalu od 32,2 cM, između *Br* gena i mikrosatelitskog markera *GWM294*, Peng i sar. (2003) su utvrdili prisustvo čak 8 QTL u vezi sa osobinama koje su bile važne tokom procesa domestikacije pšenice. Ovo govori o značaju ovog regiona, s obzirom na to da je veza ovog markera utvrđena i za još 2 osobine klasa (dužinu vršne internodije i broj zrna po klasu) kao i obe adaptivne osobine. Najstabilniji QTL je bio u blizini *CFA2086* (2A) i imao je najveći uticaj ($R^2=14,6\%$) na varijabilnost dužine klasa. Ovaj marker je pokazao vezu sa prinosom zrna (Maccaferri i sar., 2011). Na kratkom kraku istog hromozoma su Yao i sar. (2009) otkrili još jedan QTL za dužinu klasa u blizini markera *WMC407*, koji je u sprovedenom radu bio značajan u tri ispitivane godine primenom GLM modela, te bi mogao da bude iskorišćen kao potencijalni marker u daljoj validaciji.

Prethodna istraživanja su utvrdila lokuse povezane sa dužinom klasa locirane na 2A, 5A i 6B (Ma i sar., 2013), kao i na 4D, 4B i 2D hromozomima (Heideri i sar. (2012)). Na hromozomu 6D u blizini markera *PSP3200* u radu Dodig i sar. (2012) su detektovali QTL za dužinu klasa koji je u našem materijalu bio značajan samo u jednoj ispitivanoj godini, te je stoga isključen kao potencijalni marker za upotrebu u MAS. Prema dosadašnjim istraživanjima na hromozomu 6A (Neumann i sar., 2011) nije detektovan lokus povezan sa dužinom klasa. Ipak, naši rezultati su prikazali jedinstvenu vezu markera *WMC333* (6A hromozom) i dužine klasa koji bi mogao da predstavlja novi QTL sa minor efektom. Iako je QTL efekat (4,7%) ovog markera izuzetno slab, ovo pokazuje snagu asocijativnog mapiranja da se identifikuju čak i minor QTL za kompleksne osobine kakva je dužina klasa.

Značajan QTL za dužinu klasa su identifikovali Boerner i sar. (2002) na hromozomu 4A vršeći ispitivanja na mapirajućoj ITMI populaciji. Međutim, ispitivani regioni hromozomske grupe 4 nisu kontrolisali ekspresiju u našoj oplemenjivačkoj

populaciji. Brojna istraživanja koja su bazirana na kontroli ekspresije dužine klasa i visine biljaka su u međusobnoj kompeticiji. Tako su i Ma i sar. (2013) utvrdili identične QTL ili blisko vezane QTL, koji učestvuju u ekspresiji ove dve osobine, dok su radovi Cui i sar. (2011) ukazali da ne postoje zajedničke asocijacije za ove dve osobine.

5.5.4. *QTL za dužinu vršne internodije*

Visina stabljike je jedna od najvažnijih osobina, koja je transformisana tokom "Zelene revolucije", a njeno skraćenje dovelo je do povećanja prinosa u drugoj polovini prošloga veka. Tačnije, unošenjem gena reduktora visine (poznatih i kao *Rht* gena) u sorte je omogućena efikasnija preraspodela asimilata do zrna i smanjena je mogućnost poleganja biljaka. S obzirom na to da vršna internodija ima najveći uticaj na visinu biljke i ona se nalazi pod uticajem gena koji kontrolišu ovu osobinu, a koji su do danas dobro definisani (*Rht-B1-4BS*, *Rht-D1-4DS*, *Rht8-2DS*). QTL za ovu osobinu nisu toliko razmatrani u prethodnim istraživanjima koliko sama visina biljke. Tek od kada je uočena njena uloga da se spreči razvoj bolesti na klasu, intenziviraju se analize QTL odgovornih za ekspresiju ove osobine. Od mnogobrojnih *Rht* gena, Rebetzke i sar. (2012) su zaključili da *Rht13* lociran na hromozomu 7BS u najvećoj meri dovodi do redukcije visine biljaka, pre svega zbog skraćanja dužine vršne internodije. U sprovedenom radu, jedini marker koji je pripadao ovoj hromozomskoj grupi je marker *WMC166* (7D), koji je imao značajnu vezu sa dužinom vršne internodije samo u jednoj ispitivanoj godini. Pošto je dužina vršne internodije bila merena samo tokom tri godine, ovaj region bi mogao da se uzme u razmatranje za dalju validaciju.

Boerner i sar. (2002) su opisali i region na 6A hromozomu koji je pored kontrole dužine vršne internodije imao uticaj i na visinu stabljike, što nedvosmisleno govori o plejotropnom efektu ovog regiona. Asocijacije markera sa ovih hromozoma nisu potvrđene u našem istraživanju. Moguće je pretpostaviti da je jedan od razloga što je ispitivanje izvedeno samo tokom tri godine, te je zabeležen i znatno manji broj asocijacija u poređenju sa drugim ispitivanim osobinama.

Otkrivena su samo dva stabilna hromozomska regiona, oba u okviru 2A hromozoma, koja su se podudarala sa detektovanim QTL za dužinu klasa. Na osnovu vrednosti LD ($r^2=0,01$) između ova dva lokusa (*Xcfa2086* i *Xgwm294*) koja je bila

relativno mala može se pretpostaviti da se radi o odvojenim QTL, na šta ukazuje i sama konsenzus mapa Somers (2004). QTL u blizini *GWM294* je u ranijim istraživanjima (Maccaferri i sar., 2011) pokazao vezu sa dužinom vršne internodije i nizom drugih osobina. Iznenadjujući su rezultati efekta favorizovanog alela u okviru *GWM294* koji je skraćivao vršnu internodiju za čak 13 cm, a genotipovi sa ovim alelima su poreklom američke sorte (*UC66206*, *UC64246* i *UC66052*). Sa druge strane, QTL u blizini *CFA2086* bi mogao da predstavlja novi QTL za dužinu vršne internodije, a o značajnosti ovog markera govori i veza markera sa indeksom klasa, dužinom klasa i vremenom klasanja i cvetanja.

5.5.5. QTL za masu klasa i masu zrna po klasu

Masa klasa ima veću heritabilnost u odnosu na broj zrna po klasu ali je manje varijabilno svojstvo. Na taj način dobit od ovoga svojstva je relativno mala iako se radi o osobini koja ima visoku heritabilnost (Slafer, 2003).

Na osnovu dobijenih rezultata, postojani QTL (veza prisutna u više od tri ispitivane godine) za ove dve osobine nisu identifikovani iako su prethodna istraživanja pokazala brojne QTL locirane duž različitih hromozoma (Kumar i sar., 2006; Roeder i sar., 2008). U diskusiju su uključene značajne veze detektovane u manjem broju godina.

Povećanje mase zrna može dovesti do smanjenja broja zrna po klasu, te se ove osobine nalaze u stalnoj kompeticiji. Na ovaj način bi rezultati dobijeni u radu olakšali izbor markera i QTL koji dovode do povećanja broja zrna po klasu. Varshney i sar. (2000) su pored značajnih regiona na 8 hromozoma istakli značaj markera *WMC333* (1A) u povećanju mase zrna kod hlebne pšenice. Prema dobijenim rezultatima u ovom radu veza ovog markera i mase zrna je u potpunosti izostala.

Marker *WMC28* je mapirao potencijalni region na 5B hromozomu koji je bio u vezi sa masom klasa (4 godine primenom GLM) i masom zrna po klasu (3 godine primenom GLM), koji bi eventualno bio uključen u dalju validaciju u većem broju godina. Ovaj segment bi mogao da se podudara sa jednim od regiona odgovornih za masu hiljadu zrna i prinos koje su mapirali Groos i sar. (2003) na 5B hromozomu.

Roeder i sar. (2008) su u telomernom delu hromozoma 7D mapirali region koji je kontrolisao čak 84,7% varijabilnosti mase zrna. Ovako velika vrednost fenotipske

varijabilnosti ovoga svojstva je ukazivala na prisustvo major gena označenog kao *gw1*. Nijedan od ispitivanih markera nije pripadao ovoj hromozomskoj grupi. Mir i sar. (2012) su identifikovali QTL za masu zrna u okviru 1B hromozoma u neposrednoj blizini markera *WMC44* (koji je objašnjavao 8,54% varijabilnosti), a koji je u našem istraživanju bio značajan samo u jednoj godini za masu zrna po klasu, odnosno u dve godine za masu klasa. Budući da je otkriven relativno mali broj asocijacija neophodna je njegova validacija pre upotrebe u MAS. Isti autori su uočili značajan QTL blisko vezan sa *GWM219* na hromozomu 6B, koji je potvrđen u našem materijalu, ali bez stabilnosti tokom godina.

U radu Golabadi i sar. (2011) su otkrili 3 markera koja su uticala na varijabilnost mase klasa sa relativno malim uticajem od 3,9 do 7,4%. Najstabilniji je bio marker *CFA2114* na 6A hromozomu. Najveći uticaj na fenotipsku varijabilnost je imao *WMC166* sa 7A i još jedan QTL sa malim efektom je detektovan na hromozomu 1B povezan sa markerom *GWM11*. Isti markeri su korišćeni u ovom radu i potvrdili su vezu sa masom klasa ali samo u jednoj ili dve ispitivane godine sa veoma malim uticajem na fenotipsku varijabilnost od 2,6% (*WMC166*) do 14,6% (*GWM294*) što ukazuje da je masa klasa kompleksna osobina kontrolisana od strane velikog broja QTL sa malim efektom.

5.5.6. QTL za indeks klasa

Kao što je već ranije spomenuto dalje povećanje genetičkog potencijala za prinos može se postići povećanjem kapaciteta samog klasa (Denčić i Borojević, 1992), te su od posebnog interesa regioni odgovorni za indeks klasa. Jedina stabilna asocijacija sa ovom osobinom utvrđena je sa markerom na 2A hromozomu. Ovaj region u blizini markera *CFA2086*, je kolokalizovan sa QTL za dužinu vršne internodije, dužinu klasa i vreme klasanja i cvetanja ukazuje na plejotropni efekat ovog regiona. Ranija istraživanja nisu pokazala vezu sa ovim svojstvom, te bi rezultati dobijeni u našem radu mogli da ukažu na prisustvo novog QTL za indeks klasa. Prema radu Neumann i sar. (2011) jedina veza sa ovim svojstvom uočena je u centromernom regionu hromozoma 6B. Naši rezultati su pokazali značajnost QTL na 6B hromozomu samo u jednoj ispitivanoj godini što ga ne čini stabilnim QTL. U prethodnim istraživanjima (Golabadi

i sar., 2011; Kumar i sar., 2006), QTL za indeks klasa detektovani su na različitim hromozomima (2B, 3B, 5B, 6A, 7B), međutim ovi markeri u sprovednom radu (GWM148, GWM181, WMC166,) su pokazali značajnost samo u pojedinim ispitivanim godinama, dok nijedna asocijacija markera WMC28-5B i indeksa klasa nije zabeležena tokom ispitivanih godina.

5.5.7. QTL za adaptivne osobine

Vreme klasanja i vreme cvetanja predstavljaju najvažnije osobine za adaptaciju pšenice na različite uslove spoljašnje sredine. Poznavanje genetičke kontrole ovih osobina može u značajnoj meri da obezbedi postizanje optimalnih prinosa u specifičnim agroekološkim uslovima (Pankova i sar., 2008). Iako su skoro svi homeologni hromozomi nosioci gena za kontrolu vremena cvetanja (Snape i sar., 2001) najvažniju ulogu u tome imaju geni koji su uključeni u procese vernalizacije i fotoperiodizma. Odgovor na vernalizaciju je pretežno kontrolisan od strane gena koji su detektovani na dugim kracima svih hromozoma grupe 5 (Sarma i sar., 1998; Shah i sar., 1999; Sourdille i sar., 2000; Leonova i sar., 2003; Snape i sar., 2001). Pored serije *VRN-1* gena na hromozomima 5A, 5B i 5D, detektovan je i gen *Vrn-A2* na distalnom kraju hromozoma 5AL (Yan i sar., 2004), zatim *Vrn-B3* na kraku 7BS hromozoma (Yan i sar., 2006), i gen *Vrn-D4* u centromernom regionu hromozoma 5D (Yoshida i sar., 2010). Dobijeni rezultati na našem materijalu pokazali su prisustvo QTL na distalnom delu hromozoma 5B odgovornog za klasanje i cvetanje u blizini markera WMC28 koji bi mogao da ukazuje na vezu sa *Vrn-B1* genom (McIntosh i sar., 2008). Ovaj region je homeologan genu za fotoperiodizam (*Hd6* gen) prisutan kod pirinča, a značaj ovog regiona utvrdili su i Zanke i sar. (2014) detektujući asocijaciju sa vremenom klasanja. U našem radu, ovaj region bio je odgovoran samo za varijabilnost u vremenu klasanja i cvetanja, dok su Golabadi i sar. (2011) utvrdili značaj istog regiona za ekspresiju broja klasova po m², žetvenog indeksa i indeksa klasa. Interesantno je da marker GWM292 (5D) nije pokazao stabilnost u sprovedenom istraživanju iako je pozicioniran u blizini *Vrn-D1* gena. Moguće je pretpostaviti da je asocijacija izostala zbog ispitivanja sorti koje su pretežno pripadale ozimom ili fakultativno ozimom tipu pšenice.

Pored *Vrn* gena, i fotoperiodizam se nalazi pod genetičkom kontrolom većeg broja *Ppd* gena čiji homeologi lokusi su smešteni na kratkim kracima 2A, 2B i 2D hromozoma (Welsh i sar., 1973; Law i sar., 1978). S obzirom na to da je većina QTL u sprovedenom radu detektovana na hromozomima grupe 2 (*GWM294-2A*, *CFA2086-2A*, *WMC407-2A*, *WMC167-2D*) potvrđuje se značaj ovih hromozomskih regiona i u našem materijalu. Ovo potvrđuje marker *WMC407*, koji je prema Somersovoj mapi lociran na kratkom kraku 2A u blizini samog *Ppd-A1* gena. QTL u blizini *GWM294* prepoznat je i od strane Maccaferi i sar. (2011) koji su pored značaja za vreme klasanja utvrdili vezu i za niz drugih agronomski važnih svojstava. S obzirom na to da se marker *CFA2086* nalazi na dugom kraku suprotno od *Ppd-A1* gena i na oko 70 cM udaljenosti od *GWM294*, ovaj hromozomski segment bi mogao da bude novi izvor poželjnih alela (253bp) sa uticajem na fenotipsku varijabilnost klasanja preko 10%. Što se tiče 2D hromozoma, u ranijim istraživanjima posebno se ističe značaj dobro okarakterisanog markera *GWM261* (dužine 192bp) koji se nalazi u blizini *Rht8* i *Ppd-D1* gena na kratkom kraku, koji je odgovoran za ranije cvetanje. Sorte, koje su nosioci *Ppd-D1* gena, u zemljama južne Evrope ulaze ranije u fazu cvetanja čime se izbegavaju visoke temperature i sušni periodi tokom leta i na taj način postižu prinosi veći za oko 30% (Worland i sar., 1998; Kobiljski i sar., 2007). Ovako veliko povećanje prinosa postiže se produženjem perioda nalivanja zrna kao i izbegavanjem sušnog perioda u kasnim fazama nalivanja. Pored ovog regiona na 2D hromozomu, koji je u ranijim istraživanjima (Tošović-Marić i sar., 2008) potvrdio visoku zastupljenost u našim sotama, otkriven je još jedan QTL u blizini markera *WMC167* smešten na suprotnom kraku (2DL) hromozoma, a pokazao je asocijaciju sa obe adaptivne osobine. Na osnovu rezultata fenotipskog efekta na oba svojstva utvrđeno je da je favorizovani alel (sa frekvencijom od 65%), takođe visoko zastupljen u ispitivanom materijalu. U istraživanjima Roy i sar. (2006) su uočili istu vezu markera *WMC167* sa vremenom klasanja ispitujući 55 elitnih ozimih sorti pšenice, kao i asocijacije sa žetvenim indeksom i brojem zrna po klasu. Pored asocijacija sa vremenom klasanja i cvetanja i naši rezultati su potvrdili vezu i sa drugim karakteristikama klasa. Marker *BARC101-2B*, koji je u radu Hanocq i sar. (2007) pokazao značajnu vezu sa vremenom klasanja, u našim uslovima sredine nije pokazao značajnost.

U poslednje vreme ističe se značaj gena ranostanosti (*Eps* geni), koji su odgovorni za fina podešavanje vremena klasanja/cvetanja u specifičnim uslovima sredine. Ovi *Eps* geni se nalaze na skoro svim hromozomima pšenice (Snape i sar., 2001; Bennet i sar., 2012), ali njihovo precizno otkrivanje je otežano zbog maskiranja od strane *Ppd* i *Vrn* gena. Otkrivanje novih QTL/gena manjeg fenotipskog efekta su od presudnog značaja za finu regulaciju kontrole vremena klasanja u određenim uslovima spoljašnje sredine. Međutim, u sprovedenom radu, samo je potvrđeno prisustvo ranije detektovanih QTL, bez otkrivanja novih QTL za vreme klasanja i cvetanja. Griffiths i sar. (2010) su u meta QTL analizi na elitnim evropskim ozimim pšenicama detektovali čak 19 QTL koji su uključeni u kontrolu vremena cvetanja. Najnovija istraživanja na mapirajućoj populaciji su pokazala da bi region 1DL hromozoma mogao ukazivati na novi kandidat gen za ranostanost (Zikhali i sar., 2014). Markeri sa ovog hromozoma u našem materijalu nisu pokazali značajnu vezu, ali je na homeolognom hromozomu (1B) detektovan značajan QTL u blizini markera *WMC44*. Ovaj QTL je imao najveći uticaj sa oko 14,7% na fenotipsku varijabilnost vremena cvetanja i 16,2% uticaja na vreme klasanja u toku svih pet ispitivanih godina, što ukazuje na veliki značajan ovog QTL. Dobijen rezultat je u saglasnosti sa istraživanjima Griffiths i sar. (2010) koji su zapazili značaj istog QTL u blizini markera *WMC44* u biparentalnoj populaciji Avalon x Cadenza. Validacija na relevantnom oplemenjivačkom materijalu dodatno ukazuje na značaj ovog QTL koji bi mogao da se iskoristi u MAS. Isti autori su utvrdili prisustvo i QTL za vreme klasanja na istom hromozomu u regionu markera *GWM18* koji je u našem materijalu bio značajan samo primenom GLM modela, što govori samo o potencijalnom značaju ovog regiona i potrebi za daljom procenom QTL efekta. Istraživanja sprovedena od strane Neumann i sar. (2011) su takođe utvrdila asocijacije sa *Eps* genima na hromozomu 1B u blizini centromere, što nedvosmisleno govori o postojanju većeg broja značajnih regiona na 1B hromozomu. Marker *WMC216* (1D) koji je u istraživanjima Roy i sar. (2006) ima veliki uticaj na vreme klasanja i cvetanja, nije bio značajan u našem istraživanju. Dodig i sar. (2012) su koristeći sličan genetički materijal iz iste genetičke kolekcije detektovali potencijalno novi gen na 6D hromozomu u blizini *PSP3200* pod određenim uslovima navodnjavanja. Međutim, moguće je da ovaj region nije pokazao značajnost ni sa adaptivnim osobinama ni sa ostalim karakteristikama klase usled standardnih uslova u spoljašnjoj sredini.

U brojnim istraživanjima otkriveno je prisustvo značajnih *Eps* lokusa detektovanih na 3A (Shah i sar., 1999; Boerner i sar., 2002) i 3B (Pankova i sar., 2008) hromozomima kao i gena za fotoperiodizam *Ppd-B2* i vernalizaciju *Vrn-B3* na hromozomima 7B (Sourdille i sar., 2000; Khlestkina i sar., 2009; Yan i sar., 2003) kao i 7A (Kuchel i sar., 2006) hromozomima. Međutim, rezultati u ovom istraživanju nisu pokazali značajnost veze ispitivanih osobina i markera raspoređenih na ovim hromozomima.

Budući da različiti klimatski modeli predviđaju stalan porast temperature usled globalnog zagrevanja od presudnog je značaja stvaranje sorti sa optimalnim vremenom cvetanja kako bi se obezbedila stabilna proizvodnja (Semenov i sar., 2014). Identifikacija novih regiona koji će obezbediti raniji ulazak u reproduktivnu fazu tj. unošenje gena/QTL u nove genotipove ima veliki značaj za oplemenjivanje pšenice na našim prostorima.

5.6. Favorizovani aleli

S obzirom na to da je prinos u najvećoj meri određen brojem klasova po jedinici površine, brojem zrna po klasu i masom zrna (Ma i sar., 2007) posebno su izdvojeni poželjni aleli koji su imali značajan fenotipski efekat na sledeće osobine: broj klasića po klasu i broj zrna po klasu. Osobina masa zrna nije imala stabilne asocijacije te nisu analizirani pojedinačni efekti alela. Takođe, kod adaptivnih osobina je uočeno prisustvo alela u jednom od analiziranih lokusa na hromozomu 2D (*WMC167-185bp*), koji je imao veliki uticaj na obe osobine. Ovaj alel je visoko zastupljen u genotipovima što ukazuje da je vremenom fiksiran u modernim sortama. Pored ovog lokusa utvrđeni su i lokusi na 2A i 5B hromozomima koji bi mogli da se iskoriste za dalja fina podešavanja vremena cvetanja i klasanja kako bi se postiglo optimalno vreme cvetanja u našim agroekološkim uslovima. Lokusi *Xgwm157* (alel od 107bp i 77bp) i *Xwmc18* (nulti alela) imaju pozitivan i značajan efekat na broj klasića po klasu i broj zrna po klasu. Isti alel (107 bp) u *Xgwm157* lokusu ima pozitivan efekat i na svojstvo dužinu klasa, koje takođe predstavlja značajnu komponentu prinosa. Marker *WMC144* iako je imao izuzetno veliki fenotipski uticaj na broj klasića po klasu, svi aleli sa frekvencijom

većom od 1% nisu imali pozitivan fenotipski efekat na ovo svojstvo. Za broj zrna po klasu ističe se marker *BARC101* sa poželjnim alelom od 120 bp. Detektovani aleli sa relativno malom frekvencijom bi mogli imati veliki potencijal u budućim procesima za postizanje boljeg genetičkog potencijala za prinos pšenice.

U zavisnosti od potreba oplemenjivača i zahteva tržišta, glavni cilj će svakako biti usmeren na stvaranje sorti sa povećanim potencijalom za prinos. S obzirom na to da su broj klasića po klasu i broj zrna najvažnija svojstva klasa koja dovode do povećanja celokupnog potencijala za prinos, mogle bi se iskoristiti kao najznačajnije osobine za povećanje genetičkog potencijala za prinos. Tako će putem marker asistiranе selekcije biti upotrebljeni genotipovi, koji su nosioci poželjenog alela, kao roditelji u daljim ukrštanjima radi stvaranja sorti sa poboljšanim karakteristikama klasa.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, a u skladu sa postavljenim ciljevima izvedeni su sledeći zaključci:

1. Polimorfni mikrosatelitski markeri su se pokazali informativni i izuzetno značajni u utvrđivanju genetičke varijabilnosti oplemenjivačkog materijala pšenice.
2. Utvrđen je značajan stepen genetičke strukture u populaciji čime je ispunjen uslov za asocijativnu analizu. Program *Structure* se pokazao kao najadekvatniji za procenu prisustva genetičke struktuiranosti unutar populacije bazirane na molekularnim podacima.
3. Pored molekularne utvrđena je i značajna fenotipska varijabilnost svih ispitivanih osobina, čime je potvrđen dobar izbor materijala za asocijativnu analizu.
4. S obzirom na to da su odabrani mikrosateliti pretežno bili locirani na različitim hromozomima, očekivan je izostanak intrahromozomskog LD, dok je interhromozomski LD posledica rekombinacija i/ili epistatičkih interakcija nastalih tokom selekcije.
5. Primenom različitih modela (GLM i MLM) utvrđene su značajne i stabilne asocijacije između markera i svojstava, dok je poređenjem različitih pristupa smanjena mogućnost za detekciju lažno-pozitivnih veza kao i zanemarivanje značajnih veza dobijenih primenom samo jednog pristupa.
6. Ukupno su detektovana 33 značajna QTL, koji su bili raspoređeni na sledećim hromozomima: 1B(3), 2A(12), 2B(1), 2D(15), 5B(1) i 6A(1). Od ukupnog broja, 12 markera je pokazalo vezu sa jednom ili više ispitivanih svojstava. Većina otkrivenih QTL je detektovana u prethodnim istraživanjima na različitim mapirajućim populacijama, a sada je njihov značaj potvrđen i na relevantnom oplemenjivačkom materijalu. Pored ranije poznatih detektovano je i nekoliko novih QTL, kao što su: QTL za dužinu klasa u blizini markera *WMC333* (6A), zatim QTL za broj zrna po klasu u blizini markera *BARC101* (2B) i QTL za dužinu vršne internodije i QTL indeks klasa smešten u blizini markera *CFA2086* (2A).

7. Izdvojeno je nekoliko genotipova koji su za pojedine osobine imali po nekoliko poželjnih alela u okviru dva i više lokusa:

- za broj klasića po klasu i broj zrna po klasu izdvojena je sorta ZG8065
- za broj sterilnih klasića po klasu sorta Resistente
- za indeks klasa i dužinu vršne internodije značajne su sorte Banaćanka i Kratka
- za dužinu klasa sorta ZG K 77/82
- za adaptivne osobine sorta Hang Chou i Sap „S“- Mon „S“

7. LITERATURA

1. Akhunov, E.D., Goodyear, J.A., Geng, S., Qi, L.-L., Echalier, B., Gill, B.S., Miftahudin, J., Gustafson, P., Lazo, G., Chao, S., Anderson, O.D., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., La Rota, M., Sorrells, M.E., Zhang, D., Nguyen, H.T., Kalavacharla, V., Hossain, K., Kianian, S.F., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Choi, D-W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Walker-Simmons, M.K., Steber, C., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Dvorak, J. (2003) The organization and rate of evolution of the wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* 13: 753-763.
2. Al Khanjari, S., Hammer, K., Buerkert, A., Roeder, M.S. (2007) Molecular diversity of Omani wheat revealed by microsatellites. *Genet Resour Crop Ev* 54: 1407-1417. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-006-9125-1>.
3. Araki, E., Miura, H., Sawada, S. (1999) Identification of genetic loci affecting amylose content and agronomic traits on chromosome 4A of wheat. *Theor Appl Genet* 98: 977-984.
4. Balfourier, F., Roussel, V., Strelchebko, P., Exbrayat-Vinson, F., Sourdille, P., Boutet, G., Koenig, J., Ravel, C., Mitrofanova, O., Beckert, M., Charmet, G. (2007) A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *Theor Appl Genet* 114: 1265-1275. Doi: 10.1007/s00122077-0517-1.
5. Bar-Hen, A., Charcosset, A., Bourgoïn, M., Guiard, J. (1995) Relationship between genetic markers and morphological traits in a maize inbred line collection. *Euphytica* 84(2): 145-154.
6. Bennett, D., Izanloo, A., Reynolds, M., Kuchel, H., Langridge, P., Schnirbusch, T. (2012) Genetic dissection of grain yield and physical grain quality in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under water-limited environments. *Theor Appl Genet* 125(2): 255-271. Doi: 10.1007/s00122-012-1831-9.
7. Beer, S., Siripoonwiwat, W., O'donoghue, L., Souza, E., Mathews, D., Sorrells, M. (1997) Associations between molecular markers and quantitative traits in oat germplasm pool: can we infer linkages? *J Agr Genomics* 3. <http://www.ncgr.org/research/jag/papars97/paper197/indexp197.html>.

8. Borojević, K. (2003) Art and science of Italian wheat breeding and its influence on breeding in South and Central Europe. In: Proceedings of Tenth International Wheat Symposium, Paestum Italy, 2003 (Pogna, N.E., Romano, M., Pogna, E.A., Galterio, G., eds.). Rome: Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura.pp. 109-113.
9. Borojević, K. & Borojević, K. (2005) Historic Role of the Wheat Variety Akakomugi in Southern and Central European Wheat Breeding Programs. *Breeding Sci* 55: 253-256.
10. Borojević, K. & Borojević, K. (2005): The Transfer and History of "Reduced height genes" (*Rht*) in wheat from Japan to Europe. *Journal of Hered* 96(4): 455-459.
11. Boerner, A., Schumann, E., Fuerste, A., Coester, H., Leithold, B., Roeder, S., Weber, E. (2002) Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 105: 921-936. Doi: 10.1007/s00122-002-0994-1.
12. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32(3): 314-31.
13. Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
14. Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B., Gale, M.D. (1997) Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* 94: 557-563.
15. Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L.A., D'Amore, R., Allen, A.M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M.C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W.R., Hall, A., Mayer, K.F.X., Edwards, K.J., Bevan, M.W., Hall, N. (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 49: 705-710. Doi: 10.1038/nature11650.

16. Breseghello, F. & Sorrells, M.E. (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172: 1165-1177. Doi: 10.1534/genetics.105.044586.
17. Camus-Kulandaivelu, L., Veyrieras, J.B., Madur, D., Combes, V., Fourmann, M., Barraud, S., Dubreuil, P., Gouesnard, B., Manicacci, D., Charcosset, A. (2006) Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the dwarf8 gene. *Genetics* 172: 2449-2463.
18. Carver, B.F. (2009) Wheat science and trade. Wiley, Danvers. 569.
19. Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Schulub, S., Le Paslier, M-C., Magdelenat, G., Gonthier, C., Couloux, A., Budak, H., Breen, J., Pumphrey, M., Liu, S., Kong, X., Jia, J., Gut, M., Brunel, D., Anderson, J.A., Gill, B.S., Appels, R., Keller, B., Feuillet, C. (2010) Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell* 22: 1686-1701.
20. Chao, S., Zhang, W., Dubcovsky, J., Sorrells, M. (2007) Evaluation of genetic diversity and genome-wide linkage disequilibrium among US wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm representing different market classes. *Crop Sci* 47(3): 1018-1030. Doi: 10.2135/cropsci2006.06.0434.
21. Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M-C., Dubcovsky, J. (2008) Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Mol Breed* 23: 23-33. Doi: 10.1007/s11032-008-9210-6.
22. Chen, X., Min, D., Yasir, T.A., Hu, Y-G. (2012) Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium in elite Chinese winter wheat investigated with SSR markers. *PLoS ONE* 7: e44510. Doi: 10.1371/journal.pone.0044510.
23. Christiansen, M.J., Andersen, S.B., Ortiz, R. (2002) Diversity changes in an intensively bread wheat germplasm during the 20th century. *Mol Breed* 9: 1-11.

24. Crossa, J., Burgueno, J., Dreisickacker, S., Vargas, M., Herrera- Foessel, S.A., Lillemo, M., Singh, R.P., Trethowan, R., Warburton, M., Franco, J., Reynolds, M., Crouch, J.H., Ortiz, R. (2007) Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177: 1889-1913.
25. Cuthbert, J.L., Somers, D.J., Brule-Babel, A.L., Brown, P.D., Crow, G.H. (2008) Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 117: 595-608.
26. Cui, Fa., Li, J., Ding, A., Zhao, C., Wang, L., Wang, X., Li, S., Bao., Y., Li, X., Feng, D., Kong, L., Wang, H. (2011) Conditional QTL mapping for plant height with respect to the length of the spike and internode in two mapping populations of wheat. *Theor Appl Genet* 122: 1517-1536. Doi: 10.1007/s00122-011-1551-6.
27. Dawson, E., Abecasis, G., Bumpstead, S., Chen, Y., Hunt, S., Beare, D., Pabial, J., Dibling, T., Tinsley, E., Kirby, S., Carter, D., Papaspyridonos, M., Livingstone, S., Ganske, R., Löhmußaar, E., Zernant, J., Tõnisson, N., Remm, M., Mägi, R., Puurand, T., Vilo, J., Kurg, A., Rice, K., Deloukas, P., Mott, R., Metspalu, A., Bentley, D., Cardon, L. Dunham, I. (2002) A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature* 418(6897): 544-548.
28. Denčić, S.S. (1989) Dalje mogućnosti oplemenjivanja pšenice promenom strukture klasa. XXIII Seminar agronoma. Kupari, str. 249-258.
29. Denčić, S. & Borojević, S (1992) Harvest index and spike index in crosses between wheat genotypes with different spike architecture. *Plant breeding* 109: 151-158.
30. Denčić, S. & Mihaljev, I. (1998) Efficiency of diverse germplasm and crossing methods in Novi Sad wheat breeding program. In: Proceedings of the 2nd Balkan Symposium on Field Crops, 1: 57-60.
31. Denčić, S. (2006) Genetika i oplemenjivanje strnih žita. Zbornik radova Naučni Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, 42: 377-394.

32. Dennis, E.S. & Peacock, W.J. (2009) Vernalization in cereals. *J Biol* 8: 57. Doi: 10.1186/jbiol156.
33. Devos, K.M., Bryan, G.J., Collins, A.J., Gale, M.D. (1995) Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor Appl Genet* 90: 247-252.
34. Dickson, S.P., Wang, K., Krantz, I., Hakonarson, H., Goldstein, D.B. (2010) Rare variants create synthetic genome wide associations. *PLoS Biol* 8(1): e1000294. doi:10.1371/journal.pbio.1000294.
35. Distelfeld, A., Li, C., Dubcovsky, J. (2009) Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr Opin in Plant Biol* 12: 1-7.
36. Dobrovolskaya, O., Martinek, P., Voylokov, A.V., Korzun, V., Roeder, M.S., Boerner, A. (2009) Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor Appl Genet* 119: 867-874.
37. Doyle, J.J. & J.L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
38. Dodig, D., Zoric, M., Kobiljski, B., Savic, J., Kandic, V., Quarrie, S., Barnes, J. (2012): Genetic and association mapping study of wheat agronomic traits under contrasting water regimes *Int J Mol Sci* 13, 6167-6188. Doi: 10.3390/ijms13056167.
39. Donini, P., Law, J.R., Koebner, R.M.D., Reeves, J.C., Cooke, R.J. (2000) Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theor Appl Genet* 100: 912-917.
40. Dvorak, J., Luo, M.C., Yang, Z.L., Zhang, H.B. (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 97: 657-670.
41. Dubcovsky, J. & Dvorak, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862-1866.

42. Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
43. Feldman, M., Liu, B., Segal, G., Abbo, S., Levy, A.A., Vega, J.M. (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381-1387.
44. Flint-Garcia, S., Thornsberry, J., Bukler, E. (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. *Ann Rev Plant Biol* 54: 357-374.
45. Gill, K.S., Gill, B.S., Endo, T.R., Taylor, T. 1996. Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144(4): 1883-1891.
46. Ganai, M.W. & Röder, M.S. (2007) Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In R.K. Varshney and R. Tuberosa (eds.), *Genomics Assisted Crop Improvement: Genomics Applications in Crops*, 2: 1-24.
47. Gao, I.F., Jing, R.L., Huo, N.X., Li, Y., Li, X.P., Zhou, R.H., Chang, X.P., Tang, J.F., Ma, Z.Y., Jia, J.Z. (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor Appl Genet* 108: 1392-1400.
48. Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812-818.
49. Grain genes a database for *Triticeae* and *Avena*. Grain Genes: a database. Available at <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>.
50. Golabadi, M., Arzani, A., Mirmohammadi Maibody, S.A.M., Sayed Tabatabaei, B.E., Mohammadi, B.E. (2011) Identification of microsatellite markers linked with yield components under drought stress at terminal growth stages in durum wheat. *Euphytica* 177: 207-221. Doi: 10.1007/s10681-010-0242-8.

51. Grafius, J.E., Wiebe, G.A. (1959) Expected genetic gain in yield in small grain. A geometrical interpretation. *Agron J* 51: 560-562.
52. Griffiths, S., Simmonds, J., Leverington, M., Wang, Y., Fish, L., Seyers, L., Alibert, L., Orford, S., Wingen, L., Herry, L., Faure, S., Laurie, D., Bilham, L., Snape, J.W. (2010) Meta QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *Theor Appl Genet* 119: 383-395. Doi: 10.1007/s00122-009-1046-x.
53. Groos, C., Robert, N., Bervas, E., Charmet, G. (2003) Genetic analysis of grain protein content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theor Appl Genet* 106: 1032-1040.
54. Gul, A. & Allan, R.E. (1972) Relation of the club gene with yield and yield components of near-isogenic lines. *Crop Sci* 12: 297-301.
55. Guo, X., Gao, A., Liu, W., Yang, X., Li, X., Li, L. (2011) Evaluation of genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium among elite Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Aust J of Crop Sci* 5(10): 1167-1172.
56. Gupta, K., Balyan, S., Edwards, J., Isaac, P., Korzun, V., Roeder, M., Gautier, M.F., Joudrier, P., Schlatter, R., Dubcovsky, J., De La Pena, C., Khairallah, M., Penner, G., Hayden, J., Sharp, P., Keller, B., Wang, C., Hardouin, P., Jack, P., Leroy, P. (2002) Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor Appl Genet* 105: 413-422.
57. Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N., Balyan, H.S. (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics* 270: 315-323.
58. Gupta, P.K., Mir, R.R., Mohan, A., Kumar, J. (2008) Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects. *Int J Plant Genomics*, Vol. 2008, Article ID 896451, 36 pages. Doi:10.1155/2008/896451.
59. Gupta, P.K. & Varshney, R.K. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.

60. Gupta P.K., Kulwal P.L., Rustgi S. (2005) Wheat cytogenetics in the genomics era and its relevance to breeding. *Cytogenet Genome Res* 109: 315-327.
61. Gustafson, P., Raskina, O., Ma, X., Nevo, E. (2009) Wheat evolution, domestication, and improvement. In: Carver, B.F. (ed) *Wheat: science and trade*. Wiley, Danvers, pp 5-30.
62. Guyomarc'h, H., Sourdille, P., Charmet, G., Edwards, J., Bernard, M. (2002) Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor Appl Genet* 104: 1164-1172.
63. Haudry, A., Cenci, A., Bataillon, T., Brunel, D., Poncet, C., Hochu, I., Poirier, S., Santoni, S., Glemin, S., David, J. (2007) Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol Biol Evol* 24(7): 1506-1517.
64. Hancock, J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D.B., Schlötterer, C. (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, pp 1-6.
65. Hanocq, E., Laperche, A., Jaminon, O., Laine, A.L., Le Gouis, J. (2007) Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. *Theor Appl Genet* 114: 569-584.
66. Hao, C., Wang, L., Ge, H., Dong, Y., Zhang, X. (2011) Genetic diversity and linkage disequilibrium in Chinese bread wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers. *PLoS ONE* 6(2): e17279. Doi: 10.1371/journal.pone.0017279.
67. Hawkesford, M.J., Araus, J.L., Park, R., Calderini, D., Miralles, D., Shen, T., Zhang, J., Parry, M.A.J. (2013) Prospects of doubling global wheat yields. *Food and Energy Security* 2 (1). Doi: 10.1002/fes3.15.

68. Heidari, B., Saeidi, G., Tabatabaei, B.E.S., Suenaga, K. (2012) QTLs involved in plant height, peduncle length and heading date of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agr Sci Tech* 14: 1093-1104.
69. <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>
70. <http://faostat.fao.org/>
71. <http://webrzs.stat.gov.rs/>
72. Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R., Gornicki, P. (2002) Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 99: 8133-8138.
73. Huijser, P. & Schmid, M. (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138: 4117-4129.
74. Hussain, S.S. & Qamar, R. (2007) Wheat genomics: challenges and alternative strategies. *Proc Pakistan Acad Sci* 44(4): 305-327.
75. Huson, D.H., DeZulian, T., Franz, M., Rausch, C., Richter, D.C., Rupp, R. (2007) Dendroscope: An interactive tree drawer. <http://ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/dendroscope>. last accessed 20.
76. Jia J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., Appels, R., Pfeifer, M., Tao, Y., Zhang, X., Jing, R., Zhang, C., Ma, Y., Gao, L., Gao, C., Spannagl, M., Mayer, K.F.X., Li, D., Pan, S., Zheng, F., Hu, Q., Xia, X., Li, J., Liang, Q., Chen, J., Wicker, T., Gou, C., Kuang, H., He, G., Luo, Y., Keller, B., Xia, Q., Lu, P., Wang, J., Zou, H., Zhang, R., Xu, J., Gao, J., Middleton, C., Quan, Z., Liu, G., Wang, J., International Wheat genome, Sequencing Consortium, Yang, H., Liu, X., He, Z., Mao, L., Wang, J. (2013) *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496: 91-95. Doi: 10.1038/nature12028.
77. Johnson, E.B., Nalam, V.J., Zemetra, R.S., Riera-Lizarazu, O. (2008) Mapping the *compactum* locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its

- relationship to other spike morphology genes of the Triticeae. *Euphytica* 163: 193-201. Doi: 10.1007/s10681-007-9628-7.
78. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
 79. Kang, H.M., Zaitlen, N.A., Wade, C.M., Kirby A, Heckermann D, Daly MJ, Eskin E (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709-1723.
 80. Kato, K., Miura, H., Sawada, S. (2000) Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet* 101: 933-943.
 81. Kilian, B., Ozkan, H., Deusch, O., Effgen, S., Brandolini, A., Kohl, J., Martin, W., Salamini, F. (2006) Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Mol Biol Evol* 24: 217-227.
 82. Kimber, G. & Feldman, M. (1987) Wild wheat, an introduction. Columbia (MO): College of Agriculture. University of Missouri Special Report No. 353. p. 146.
 83. Kimura, M., Crow, J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
 84. Kirby, J., Vinh, H.T., Reader, S.M., Dudnikov, A.J. (2005) Genetic mapping of the *AcpH1* locus in *Aegilops tauschii*. *Plant Breed* 124: 523-524.
 85. Khlestkina, E.K., Giura, A., Roeder, M.S., Boerner, A. (2009) A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. *Euphytica* 165: 579-585.
 86. Khlestkina, E.K., Pshenichnikova, T.A., Roeder, M.S., Boerner, A. (2009) Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes. *Cereal Res Commun* 37(3): 391-398. Doi: 10.1556/CRC.37.2009.3.8.
 87. Khlestkina, E.K., Roeder, M.S., Efremova, T.T., Boerner, A., Shumny, V.K. (2004) The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common

- spring wheat determined by microsatellite markers. *Plant Breed* 123: 122-127.
88. Kobiljski, B., Denčić, S., Hristov, N., Mladenov, N., Quarrie, S., Stephenson, P., Kirby, J. (2007) Potential uses of microsatellites in marker-assisted selection for improved grain yield in wheat. In: Buck, H.T., Nisi, J.E.; Salomón, N. (Eds.) *Developments in Plant Breeding, Wheat Production in Stressed Environments, Published by Springer*, 12: 729-736.
 89. Kobiljski, B., Quarrie, S., Denčić, S., Kirby, J., Ivegeš, M. (2002) Genetic diversity of the Novi Sad wheat core collection revealed by microsatellites. *Cell Mol Biol Lett* 7: 685-694.
 90. Kondić-Špika, A., Kobiljski, B., Hristov, N. (2008) Efficiency of anther culture technique in the production of wheat double haploids. *Matica Srpska J Nat Sci* 115: 35-40.
 91. Korzun, V. (2002) Use of molecular markers in cereal breeding. *Cell Mol Biol Lett* 7(2B): 811-20.
 92. Kuchel, H., Hollamby, G., Langridge, P., Williams, K., Jefferies, S.P. (2006) Identification of genetic loci associated with ear emergence in bread wheat. *Theor Appl Genet* 113: 1103-1112. Doi:10.1007/s00122-006-0370-7.
 93. Kuchel, H., Williams, K.J., Langridge, P., Eagles, H.A., Jefferies, S.P. (2007) Genetic dissection of grain yield in bread wheat. I. QTL analysis. *Theor Appl Genet* 115: 1029-1041.
 94. Kumar, N., Kulwal, L.P., Gaur, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P. Khurana P., Balyan, H.S., Gupta, P.K. (2006) QTL analysis for grain weight in common wheat. *Euphytica* 151: 135-144.
 95. Kumar, S., Goyal, A., Mohan, A., Balyan, H.S., Gupta, P.K. (2013) An integrated physical map of simple sequence repeats in bread wheat. *Aust J Crop Sci* 7(4): 460-468.
 96. Laido, G., Mangini, G., Taranto, F., Gadaleta, A., Blanco, A., Cattivelli, L., Marone, D., Mastrangelo, A.M., Papa, R., De Vita, P. (2013) Genetic diversity and population structure of tetraploid wheats (*Triticum turgidum* L.)

estimated by SSR, DarT and pedigree data. *PLoS ONE* 8(6): e6720. Doi:10.1371/journal.pone.0067280.

97. Landjeva, S., Korzun, V., Boerner, A. (2007) Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271-296.
98. Landjeva, S., Ganeva, G., Korzun, V., Palejev, D., Chebotar, S., Kudrjavev, A. (2014) Genetic diversity of old bread wheat germplasm from the Black Sea region evaluated by microsatellites and agronomic traits. *Plant Genet Resour* 1-12. Doi: 10.1017/S1479262114000781.
99. Law, C.N., Sutka, J., Worland, A.J. (1978) A genetic study of daylength response in wheat. *Heredity* 41: 575-585.
100. Leonova, E., Pestsova, E., Salina, E., Efermova, T., Roeder, M., Boerner, A. (2003) Mapping of the *Vrn-B1* gene in *Triticum aestivum* using microsatellite markers. *Plant Breed* 122: 209-212. Doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00818.x.
101. Lewis, S., Faricelli, M.E., Appendino, M.L., Valarik, M., Dubcovsky, J. (2008) The chromosome region including the earliness per se locus *Eps-Am* 1 affects the duration of early developmental phases and spikelet number in diploid wheat. *J Exp Bot* 59(13): 3593-3607.
102. Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 21: 991-1007.
103. Li, S., Jia, J., Wei, X., Zhang, X., Li, L., Chen, H., Fan, Y., Sun, H., Zhao, X., Lei, T., Xu, Y., Jiang, F., Wang, H., Li, L. (2007) A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Mol Breed* 20: 167-178.
104. Ling, H.Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., Fan, H., Li, D., Dong, L., Tao, Y., Gao, C., Wu, H., Li, Y., Cui, Y., Guo, X., Zheng, S., Wang, B., Yu, K., Liang, Q., Yang, W., Lou, X., Chen, J., Feng, M., Jian, J., Zhang, X., Luo, G., Jiang, Y., Liu, J., Wang, Z., Sha, Y., Zhang, B., Wu, H., Tang, D., Shen, Q., Xue, P., Zou, S., Wang, X., Liu, X., Wang, F., Yang, Y., An, X., Dong, Z., Zhang, K., Zhang, X., Luo, M.C., Dvorak, J., Tong, Y.,

- Wang, J., Yang, H., Li, Z., Wang, D., Zhang, A., Wang, J. (2013): Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496: 87-90.
105. Litt, M. & Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397-401.
 106. Liu, K., & Muse, S.V. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9): 2128-2129.
 107. Liu, L., Wang, L., Yao, J., Zheng, Y., Zhao, C. (2010) Association mapping of six agronomic traits on chromosome 4A of wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Plant Breed* 1(5): 1-10. Doi: 10.5376/mpb.2010.01.0005.
 108. Liu, Z.H., Wang, H.Y., Wang, X.E., Zhang, G.P., Chen, P.D., Liu, D.J. (2006) Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, iron and zinc contents in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Cereal Sci* 44: 212-219.
 109. Lorenzetti, R. (2000) The Wheat Science: The Green Revolution of Nazareno Strampelli. *Journal of Genet Breed, Roma*, p. 229.
 110. Ma, Z., Zhao, D., Zhang, C., Zhang, Z., Xue, S., Lin, F., Kong, Z., Tian, D., Luo Q. (2007) Molecular genetic analysis of spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F2 populations. *Mol Genet Genomics* 277(1): 31-42.
 111. Ma, J., Zhang, C.Y., Yan, G.J., Liu, C.J. (2013) Improving yield and quality traits of durum wheat by introgressing chromosome segments from hexaploid wheat. *Genet Mol Res* 12 (4): 6120-6129.
 112. McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Somers, D.J., Apples, R., Devos, K.M. (2008) Catalogue of gene symbols for wheat.
<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.

113. Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Noli, E., Tuberosa, R. (2005) Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol Breed* 15(3): 271-289.
114. Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Demontis, A., El-Ahmed, A., Garcia del Moral, L., Maalouf, F., Nachit, M., Nserallah, N., Ouabbou, H., Rhouma, S., Royo, C., Villegas, D., Tuberosa, R. (2011) Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *J Exp Bot* 62(2): 409-438. Doi: 10.1093/jxb/erq287.
115. Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Donini, P., Tuberosa, R. (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor Appl Genet* 107: 783-797.
116. Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Suarez, E.Y., Dubcovsky, J. (2001) Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci* 41: 682-690.
117. Mei, H., Zhu, X., Zhang, T. (2013) Favorable QTL alleles for yield and its components identified by association mapping in chinese upland cotton cultivars. *PLoS ONE* 8(12): e82193. Doi: 10.1371/journal.pone.0082193.
118. Mir, R.R., Kumar, N., Jaiswal, V., Girdharwal, N., Prasad, M., Balyan, H.S., Gupta, P.K. (2012) Genetic dissection of grain weight in bread wheat through quantitative trait locus interval and association mapping. *Mol Breed* 29: 963-972. Doi: 10.1007/s11032-011-9693-4.
119. Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D. (1995) Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5: 737-739.
120. Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30: 194-200.
121. Nielsen, N.H., Backes, G., Stougaard, J., Andersen, S.U., Jahoor, A. (2014) Genetic diversity and population structure analysis of european hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *PLoS ONE* 9(4): e94000. Doi: 10.1371/journal.pone.0094000.

122. Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
123. Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 70: 3321-3323.
124. Neumann, K., Kobiljski, B., Dencic, S., Varshney, R.K., Boerner, A. (2011) Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed* 27: 37-58.
125. Oerke, E.C. (2006) Crop losses to pests. *J Agric Sci* 144: 31-43.
126. Varshney, R.K., Ribaut, J.M., Buckler, E.S., Tuberosa, R., Rafalski, J.A., Langridge, P. (2012) Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nat Biotechnol* 30: 1172-1176.
127. Palaisa, K., Morgante, M., Tingey, S., Rafalski, A. (2003) Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *The Plant Cell* 15(8): 1795-1806.
128. Park, S.D.E. (2001) The Excel Microsatellite Toolkit (version 3.1). Animal Genomics Laboratory, UCD, Ireland. <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>
129. Pankova, K., Milec, Z., Simmonds, J., LeveringtonWaite, M., Fish, L., Snape, J.W. (2008) Genetic mapping of a new flowering time gene on chromosome 3B of wheat. *Euphytica* 164: 779-787. Doi: 10.1007/s10681-008-9727-0.
130. Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012) GenAleEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
131. Peng, J., Ronin, Y., Fahima, T., Roeder, M.S., Li, Y., Nevo, E., Korol, A. (2003) Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *PNAS* 100 (5): 2489-2494.
132. Peng, J. H., Bai, Y., Haley, S.D, Lapitan, N.L.V (2009) Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of

- wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica* 135: 95-122. Doi: 10.1007/s10709-008-9262-x.
133. Pestsova, E.G., Korzun, V., Goncharov, N.P., Hammer, K., Ganai, M.W., Roeder, M.S. (2000) Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. *Theor Appl Genet* 101: 100-106.
 134. Prasad, B., Babar, M.A., Xu, X.Y., Bai, G.H., Klatt, A.R. (2009) Genetic diversity in the U.S. hard red winter wheat cultivars as revealed by microsatellite markers. *Crop Pasture Sci* 60: 16-24.
 135. Pritchard, J.K. (2001) Deconstructing maize population structure. *Nature Genetics* 28(3): 203-204.
 136. Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
 137. Plaschke, J., Ganai, M.W., Roeder, M.S. (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91: 1001-1007.
 138. Pozzi, C., Rossini, L., Vecchietti, A., Salamini, F. (2004) Gene and genome changes during domestication of cereals. In: Gupta, P., Varsheny, R.K. (Eds.) *Cereal genomics*, Kluwer Academic Press, Netherlands, pp. 165-198
 139. Pozzi, C. & Salamini, F. (2007) Genomics of wheat domestication In: Varshney, R.K., Tuberosa, R. (Eds.). *Genomics Assisted Crop Improvement*, 2: 453-481.
 140. Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R., Clarke, J.M. (2007) Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theor Appl Genet* 114(3): 525-537.
 141. Pumphrey, M.O., Bai, J., Laudencia-Chingcuanco, D., Anderson, O., Gill, B.S. (2009) Non-additive expression of homoeologous genes is established upon polyploidization in hexaploid wheat. *Genetics* 181: 1147-1157.
 142. Rafalski, A. (2002) Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD based approaches. *Plant Sci* 162(3): 329-333.

143. Randhawa, H., Puchalski, B.J., Frick, M., Goyal, A., Despins, T., Graf, R.J., Laroche, A., Gaudet, D.A. (2012) Stiripe rust resistance among western Canadian spring wheat and triticale varieties. *Can J Plant Sci* 92: 713722. Doi: 10.4141/CJPS2011-252.
144. Rasheed, A., Xia, X., Ogbonnaya, F., Mahmood, T., Zhang, Z., Mujeeb-Kazi, A., He, Z. (2014) Genome-wide association for grain morphology in synthetic hexaploid wheats using digital imaging analysis. *BMC Plant Biol* 14: 128. Doi: 10.1186/1471-2229-14-128.
145. Rebetzke, G.J., Ellis, M.H., Bonnett, D.G., Mickelson, B., Condon, A.G., Richards, R.A. (2012) Height reduction and agronomic performance for selected gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Res* 126: 87-96.
146. Rehman-Arif, M.A., Nagel, M., Neumann, K., Kobiljski, B., Lohwasser, U., Boerner, A. (2012a) Genetic studies of seed longevity in hexaploid wheat exploiting segregation and association mapping approaches. *Euphytica* 186: 1-13.
147. Rehman-Arif, M.A., Neumann, K., Nagel, M., Kobiljski, B., Lohwasser, U., Boerner, A. (2012b) An association mapping study of dormancy and pre-harvest sprouting in wheat. *Euphytica* 188: 409-417.
148. Roeder, M.S., Plaschke, J., Koenig, S.U., Boerner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganai, M.W. (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246: 327-333.
149. Roeder, M.S., Wendehake, K., Korzun, V., Bredemeijer, G., Laborie, D., Bertrand, L., Isaac, P., Rendell, S., Jackson, J., Cooke, R.J., Vosman, B., Ganai, M.W. (2002) Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor Appl Genet* 106: 67-73.
150. Roeder, M.S., Huang, X.Q., Boerner, A. (2008) Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Funct Integr Genomics* 8: 79-86. Doi: 10.1007/s10142-007-0053-8.

151. Roeder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W. (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
152. Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S., Gupta, P.K. (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Current Sci* 90(5): 683-689.
153. Roussel, V., Koenig, J., Beckert, M., Balfourier, F. (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* 108: 920-930.
154. Saintenac, C., Falque, M., Martin, O.C., Paux, E., Feuillet, C., Sourdille, P. (2009) Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 181: 393-403.
155. Sandhu, D., Champoux, J.A., Bondareva, S.N., Gill, K.S. (2001) Identification and physical localization of useful genes and markers to a major gene-rich region on wheat group 1S chromosomes. *Genetics* 157(4): 1735-1747.
156. Sarma, R.N., Gill, B.S., Sasaki, T., Galiba, G., Sutka, J., Laurie, D.A., Snape, J.W. (1998) Comparative mapping of the wheat chromosome 5A *Vrn-A1* region with rice and its relationship to QTL for flowering time. *Theor Appl Genet* 97: 103-109.
157. Slafer, G.A. (2007) Physiology of determination of major wheat yield components. In: Buck, H.T., *et al.* (Eds.) Wheat production in stressed Enviroments. pp. 557-565.
158. Semagn, K, Bjornstad, A., Skinnes, H., Maroy, A.G., Tarkegne, Y., William, M. (2006) Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545-555. Doi: 10.1139/g06-002.
159. Semenov, M.A., Stratonovitch, P., Alghabari, F., Gooding, M.J. (2014) Adapting wheat in Europe for climate change. *J Cereal Sci* 59: 245-256.

160. Shewry, P.R. (2009) Wheat. *J of Exp Bot* 60(6): 1537-1553. Doi: 10.1093/jxb/erp058.
161. Shah, M., Gill, K.S., Bezinger, P.S., Yen, Y., Kaeppler, S.M., Ariyaratne, H.M. (1999) Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. *Crop Sci* 39: 1728-1732.
162. Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
163. Slafer, G.A. (2003) Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann Appl Biol* 142: 117-128.
164. Slatkin, M. (2008) Linkage disequilibrium: Understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Rev Genetics* 9(6): 477-485.
165. Smith, A., Thomas, D., Munro, H., Abecasis, G. (2005) Sequence features in regions of weak and strong linkage disequilibrium. *Genome Res* 15(11): 1519-1534.
166. Snape, J., Law, W., Parker, C.N., Worland, B.B., Worland, A.J. (1985) Genetical analysis of chromosome 5A of wheat and its influence on important agronomic characters. *Theor Appl Genet* 71: 518-526.
167. Snape, J.W., Butterworth, K., Whitechurch, E., Worland, A.J. (2001) Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. *Euphytica* 119: 185-190.
168. Sofalian, O., Mohammadi, S.A., Aharizad, S., Moghaddam, M., Shakiba, M.R. (2008) Mapping of QTLs for frost tolerance and heading time using SSR markers in bread wheat. *Af J Biotechnol* 9 (20): 5260-5264.
169. Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K. (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109: 1105-1114.
170. Somers, D.J. (2005): Molecular breeding and assembly of complex genotypes in wheat. Frontiers of wheat bioscience. Memorial Issue, Wheat Information Service 100: 235-246.

171. Somers, D.J., Banks, T., DePauw, R., Fox, S., Clarke, J., Pozniak, C., McCartney, C. (2007) Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome* 50(6): 557-567. Doi: 10.1139/G07-031.
172. Song, Q.J., Shi, J.R., Singh, S., Fickus, E.W., Costa, J.M., Lewis, J., Gill, B.S., Ward, R., Cregan, P.B. (2005) Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet* 110: 550-560.
173. Soto-Cerda, B.J. & Cloutier, S. (2012) Association Mapping in Plant Genomes, Genetic Diversity in Plants. In: Caliskan, M. (Eds.). Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-plants/association-mapping-in-plant-genomes>.
174. Sorrells, M.E. & Yu, J. (2009) Linkage disequilibrium and association mapping in the *Triticeae*. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G.J., (Eds.). Genetics and genomics of the *Triticeae*. New York: Springer, pp. 655-683.
175. Sourdille, P., Cadalen, T., Guyomarc'h, H., Snape, J.W., Perretant, M.R., Charmet, G., Boeuf, C., Bernard, S., Bernard, M. (2003) An update of the Courtot x Chinese Spring intervarietal molecular marker linkage map for the QTL detection of agronomic traits in wheat. *Theor Appl Genet* 106: 530-538.
176. Sourdille, P., Gandon, B., Chiquet, V., Nicot, N., Somers, D., Murigneux, A., Bernard, M. (2005) Wheat genoplante SSR mapping data release: a new set of markers and comprehensive genetic and physical mapping data. Available at: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index/shtml>.
177. Sourdille, P., Singh, S., Cadalen, T., Brown-Guedira, G.L., Gay, G., Qi, L., Gill, B.S., Dufour, P., Murigneux, A., Bernard, M. (2004) Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetical-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics* 4: 12-25.
178. Sourdille, P., Snape, J.W., Cadalen, T., Charmet, G., Nakata, N., Bernard, S., Bernard, M. (2000) Detection of QTLs for heading time and photoperiod response in wheat using a doubled-haploid population. *Genome* 43: 487-494.

179. Sourdille, P., Tixier, M.H., Charmet, G., Gay, G., Cadalen, T., Bernard, S., Bernard, M. (2000) Location of genes involved in ear compactness in wheat (*Triticum aestivum*) by means of molecular markers. *Mol breed* 6: 247-255.
180. Stachel, M., Lelley, T., Grausgruber, H., Vollmann, J. (2000) Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theor Appl Genet* 100: 242-248.
181. Stich, B. & Melchinger, A. (2010) An introduction to association mapping in plants. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 5(39): 1-9.
182. Tautz, D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T., Jeffreys, A.J. (Eds.). DNA fingerprinting: state of the science. Birkhauser Verlag, Basel, pp 21-28.
183. Tošović-Marić, B., Kobiljski, B., Obreht, D., Vapa, Lj. (2008) Evaluation of wheat *Rht* genes using molecular markers. *Genetika* 40(1): 31-38.
184. Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Brbaklić, Lj., Kobiljski, B., Hristov, N. (2012) Marker-trait associations for spike-related characters in a doubled haploid population of wheat. *Rom Agric Res* 29: 9-16.
185. Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.
186. Varshney, R.K., Prasad, M., Roy, J.K., Kumar, N., Harjit-Singh, Dhaliwal, H.S., Balyan, H.S., Gupta, P.K. (2000) Identification of eight chromosomes and a microsatellite marker on 1AS associated with QTL for grain weight in bread wheat. *Theor Appl Genet* 100: 1290-1294.
187. Varshney, R.K., Terauchi, R., McCouch, S.R. (2014) Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. *PLoS Biol* 12(6): e1001883. Doi: 10.1371/journal.pbio.1001883.

188. Vigouroux, Y., Glaubitz, J.C., Matsuoka, Y., Goodman, M.M., Jesus Sanchez, G., Doebley, J. (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Am J Bot* 95(10): 1240-1253.
189. Virk, P., Ford-Lloyd, B., Jackson, M., Pooni, H., Clemeno, T., Newbury, H. (1996) Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* 76(3): 296-304.
190. Wang, R.X., Hai, L., Zhang, X.Y., You, G.X., Yan, C.S., Xiao, S.H. (2009) QTL mapping for grain filling rate and yield-related traits in RILs of the Chinese winter wheat population Heshangmai x Yu8679. *Theor Appl Genet* 118: 313-325.
191. Wang, J., Luo, M.C., Chen, Z., You, F.M., Wei, Y., Zheng, Y., Dvorak, J. (2013) *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat. *New Phytol* 198: 925-937.
192. Weir, B.S. (1996) Genetic data analysis. II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc, Sunderland, p. 376
193. Welsh, J.J., Keim, D.L., Pirasteh, B., Richards, R.D. (1973) Genomic control of photoperiod response in wheat. In: Sears, E.S., Sears, L.M.S. (Eds.). Proceedings of the international wheat genetic symposium. Missouri, USA, 879-884.
194. Worland, T. & Snape, J.W. (2001) Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement. In: Bonjean, A.P., Angus, W.J. (Eds.). The World Wheat Book: a history of wheat breeding. Paris, Lavoisier Publishing. pp. 61-67.
195. Worland, A.J., Boerner, A., Korzun, V., Li, W.M., Petrovic, S., Sayers, E.J. (1998) The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica* 100: 385-394. Doi: 10.1023/A:1018327700985.
196. Wu, X., Chang, X., Jing, R. (2012) Genetic insight into yield-associated traits of wheat grown in multiple rain-fed environments. *PLoS ONE* 7(2): e31249. Doi: 10.1371/journal.pone.0031249.

197. www.statsoft.com
198. Yu, J.K., Dake, T.M., Singh, S., Benscher, D., Li, W., Gill, B., Sorrells, M.E. (2004) Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome* 47: 805-818.
199. Yu, J. & Buckler, E. (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr Opin in Biotechnol* 17(2): 155-160.
200. Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Bi, I.V., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38(2): 203-208.
201. Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 6263-6268. Doi: 10.1073/pnas.0937399100.
202. Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J. (2006) The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103(51): 19581-19586. Doi: 10.1073/pnas.0607142103.
203. Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., San Miguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004) The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303(5664): 1640-1644. Doi: 10.1126/science.1094305.
204. Yang, J., Sears, R.G., Gill, B.S., Paulsen, G.M. (2002) Quantitative and molecular characterization of heat tolerance in hexaploid wheat. *Euphytica* 126: 275-282.
205. Yao, J., Wang, L., Liu, L., Zhao, C., Zheng, Y. (2009) Association mapping of agronomic traits on chromosome 2A of wheat. *Genetica* 137: 67-75.
206. Yoshida, T., Nishida, H., Zhu, J., Nitcher, R., Distelfeld, A., Akashi, Y., Kato, K., Dubcovsky, J. (2010) *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the

- centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 120 (3): 543-552. Doi: 10.1007/s00122-009-1174-3.
207. Yu, J., Zhang, Z., Zhu, C., Tabanao, D.A., Pressoir, G., Tuinstra, M.R., Kresovich, S., Todhunter, R.J., Buckler, E.S. (2009) Simulation appraisal of the adequacy of number of background markers for relationship estimation in association mapping. *Plant Genome* 2: 63-77. Doi: 10.3835/plantgenome2008.09.0009.
 208. Yuan, Y.Y., Wang, Q.Z., Cui, F., Zhang, J.T., Du, B., Wang, H.G. (2010) Specific loci in genome of wheat milestone parent bima 4 and their transmission in derivatives. *Acta Agron Sin* 36(1): 9-16.
 209. Zanke, C., Ling, J., Plieske, J., Kollers, S., Ebmeyer, E., Korzun, V., Argillier, O., Stiewe, G., Hinze, M., Beier, S., Ganai, M.W., Roeder, M.S. (2014) Genetic architecture of main effect QTL for heading date in European winter wheat. *Frontiers in plant science. Plant Genet Genomics* 217(5): 1-12.
 210. Zikhali, M., Leverington-Waite, M., Fish, L., Simmonds, J., Orford, S., Wingen, L.U., Gorum, R., Gosman, N., Bentley, A., Griffiths, S. (2014) Validation of a 1DL earliness per se (*Eps*) flowering QTL in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Breed* 34: 1023-1033. Doi: 10.1007/s11032-014-0094-3.
 211. Zhang, K., Wang, J., Zhang, L., Rong, C., Zhao, F., Peng, T., Li, H., Cheng, D., Liu, X., H. Qin, Zhang, A., Tong, Y., Wang, D. (2013) Association analysis of genomic loci important for grain weight control in elite common wheat varieties cultivated with variable water and fertilizer supply. *PLoS ONE* 8(3): e57853. Doi: 10.1371/journal.pone.0057853.
 212. Zhang, L.Y., Ravel, C., Bernard, M., Balfourier, F., Leroy, P., Feuillet, C., Sourdille, P. (2006) Transferable bread wheat EST-SSRs can be useful for phylogenetic studies among the *Triticeae* species. *Theor Appl Genet* 113: 407-418.
 213. Zhang, L.Y., Liu, D.C., Guo, X.L., Yang, W.L., Sun, J.Z., Wang, D.W., Zhang, A. (2010) Genomic distribution of quantitative trait loci for yield and yield-related traits in common wheat. *J Integr Plant Biol* 52(11): 996-1007.

214. Zhang, Y., Liu, J., Xia, X., He, Z. (2014) TaGS-D1, an ortholog of rice OsGS3, is associated with grain weight and grain length in common wheat. *Mol Breed* 34: 1097-1107. Doi: 10.1007/s11032-014-0102-7.
215. Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C.Q., Todhunter, R.J., Tiwari, H.K., Gore, M.A., Brudbury, P.J., Yu, J., Arnett, D.K., Ordovas, J.M., Buckler, E. S. (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat Genet* 42(4): 355-360.

8. PRILOZI

Prilog 1. Oplemenjivački materijal sa podacima o pedigreu, raspored u subpopulacijama dobijen u programu *Structure* i zemlja porekla

	Sorte/linije	Podaci o pedigreu	Q	Poreklo
1	Mironovska 264		1	UKR
2	Stepnjačka 30	Odeskaja 16 x PPG-1126	1	RUS
3	Partizanka	Bezostaja 1 x NS-116	5	SRB
4	Una	NS845 x Bezostaja 1	5	SRB
5	Partizanka niska	((NS646 x Bezostaja 1) x Aurora) x Partizanka	5	SRB
6	Kolubara	(NS646 x Bezostaja1) x Aurora	5	SRB
7	Buckskin	((Oro x Marquillo) x (Tenmaro x Quivira)) x Scout	2	USA
8	Tecumseh	(((((Fultz x Hungarian) x W38) x Wabash) x Fairfield) x (Minhardi x Wabash)) x (Redcoat x Wisconsin245)) x (PD427-A-1-1-3 x (PD427-A-1-1-3 x (PD427-A-1-1-3 x Kenya-Farmer)))	1	USA
9	Bersee 0	Allies x Vilmorin23	2	FRA
10	M.Huntsman 0	((CI 12633 x Cap. Desp.) x Hyb.46) x Profeseur Marchal	2	GBR
11	Bersee 1	Allies x Vilmorin23	2	FRA
12	Maris Huntsman 1	((CI 12633 x Cap. Desp.) x Hyb.46) x Profeseur Marchal	2	GBR
13	Tanori 71	(Inia66 x Ciano 67) x Sonora 64	2	MEX
14	Lerma Rojo	(Lerma 50 x Yaqui 48) x (Maria Escobar x (Maria Escobar x Supremo 211))	1	MEX
15	Norteno 67	Lerma Rojo 64 x Sonora 64	2	MEX
16	Condor	(Waga-waga 80 x Waga-waga 15) x Waga-waga 15	1	AUS
17	Banks	((PETH x Condor) x Condor) x Condor	1	AUS
18	Aobakomughi	Norin7 x Ardito	1	JPN
19	Galahad	(Joss Cambier x Durin) x Hobbit	2	GBR
20	Dwarf A (Maris Hobbit)		2	GBR
21	Bersee 2	Allies x Vilmorin23	2	FRA
22	Maris Huntsman 2	((CI 12633 x Cap. Desp.) x Hyb.46) x Profeseur Marchal	2	GBR
23	Hobbit	((Profeseur Marchal) x Marne Desprez) x VG 9144) x TJB 16	2	GBR
24	Bounty	Maris Widgeon derivative x Durin	2	GBR
25	Sentry	Poloughman x Hobit	2	GBR
26	Wizard	M.Freeman x Hobit	2	GBR
27	Norman	TJB268-175 x Hobit "Sib"	2	GBR
28	Mithras	TJB268-175 x Hobit "Sib"	2	GBR
29	Fenman	TJB268-175 x Hobit "Sib"	2	GBR
30	Sandown	Sona227 x Hobbit	2	GBR
31	Longbow	TJB268-175 x Hobbit"Sib"	2	GBR
32	Era	((II-53-388 x III-58-4) x II-53-546) x (Pembina x II 52-329)) x II-55-10	3	USA
33	Buckbuck	((HD832.5.5 x Olesen Dwarf) x Bluebird) x (Ciano 67 x Penjamo 62)) x (Bucky x Maya 74)	1	MEX
34	Olesen Dwarf	(Pitic 62 x Mara) x LV	1	ZWE
35	Bersee 1+2	Allies x Vilmorin23	2	FRA
36	Yecora	((Sonora64 x Klein Rendidor) x Ciano "S") x Siete Cerros	1	MEX
37	Bersee 3	Allies x Vilmorin23	2	FRA
38	Maris Huntsman 3	((CI 12633 x Cap. Desp.) x Hyb.46) x Profeseur Marchal	2	GBR
39	Bersee 2+3	Allies x Vilmorin23	2	FRA

40	Bersee 7	Allies x Vilmorin23	2	FRA
41	Akakomughi		1	JPN
42	Fortunato 2D	Lauro Bassi x Damiano	2	ITA
43	Talent	((Thather x Vilmorin 27) x Fortunato) x Champlain	1	FRA
44	Cap.dep./Mara	Cappelle Desprez/ Mara	2	ITA
45	Mara	Autonomia/Aquila	2	ITA
46	D 6899	(Tom Thumb x Sonora64) x Tacuari	1	USA
47	Cap./Bez.5A		2	ITA
48	S13	Sterling B x Wase Nibay	1	ITA
49	NS 322	S 13 x Aobakomughi	1	SRB
50	NS 603	S 13 x Aobakomughi	1	SRB
51	NS 732	S 13 x Aobakomughi	1	SRB
52	NS 900	Forlani x Acciaio	2	SRB
53	NS 51-11	NS322 x NS611	1	SRB
54	NS 54-52	NS732 x Cajeme	1	SRB
55	Bezostaja Dwarf		5	RUS
56	Pitikul	Krasnodarski karlik 1 x Odeska51	5	MDA
57	Szegedi 7610		2	HUN
58	Szegedi 765		1	HUN
59	Timson Sun		1	AUS
60	F5 5065-2		1	ROM
61	BCD 1186/83		1	MDA
62	BCD 1286/83		5	MDA
63	BCD 1295/83		1	MDA
64	BCD 1304/83		1	MDA
65	NSP 187	(Purdue5517 x Žitnica) x Žitnica	1	SRB
66	L 69/92	(SO1456 x Žitnica) x Žitnica	1	SRB
67	Norin 50	Norin 9 x Shinochumaga	1	JPN
68	Norin 61	Fukuoka Komugi x Shinchuanaga	1	JPN
69	Peking 1-38		1	CHN
70	No 4		2	CHN
71	Hang Chou		1	CHN
72	Pai Yu Pao		5	CHN
73	San Pastore	Balilla x Villa Glori	2	ITA
74	Biserka	Fortunato x (Fortunato x Red Coat)	1	SRB
75	NSR 2	((Bezostaja 1 x NS 262) x Mironovska 808) x NS 435	5	SRB
76	NS 736	S 13 x Aobakomughi	1	SRB
77	Rana Niska	((Tobari66 x Kavkaz) x Bačvanka 1) x Novosadska rana 1	2	SRB
78	Italija	Talent x NSR-2	1	SRB
79	Kratka	Skopljanka x ZG2463.74	2	SRB
80	Arg.80/5216		1	ARG
81	INTRO 1066		2	USA
82	NS 4/93	GK Szalkas x Novosadska 6001	5	SRB
83	NS 48/93	Ai bian x Novosadska 6002	5	SRB

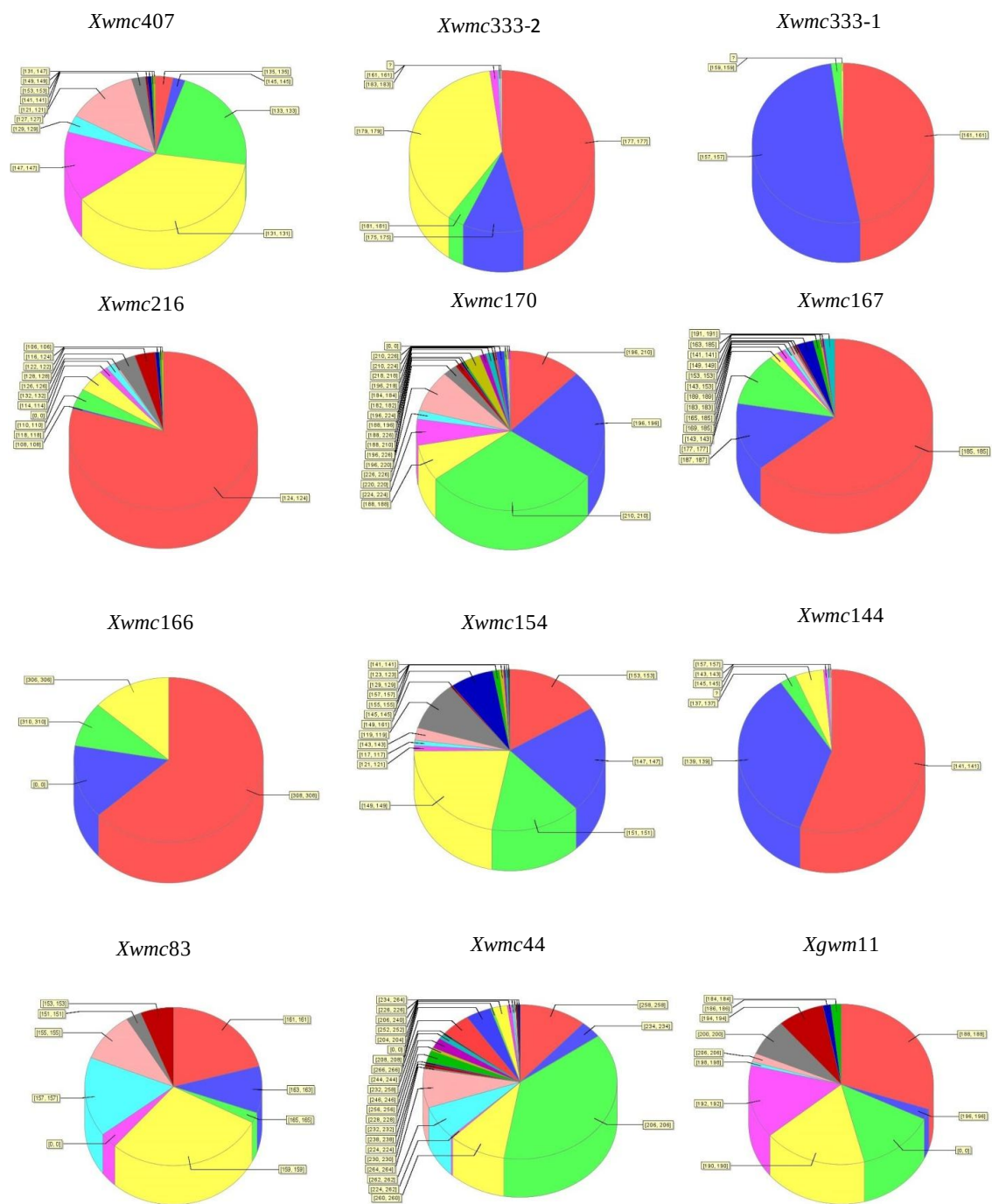
84	NS 90/92	Francuska x FR 91-19	2	SRB
85	NS 30/95	(ZG172 x Bolonjska) x NS 0.58	1	SRB
86	Riley	Monon x PD-4126-A-9-16-1-1-3	5	USA
87	Knox 62	(((PD-4126-A-9-16-1-1-3 x PD- 4781-A-7-26-2) x Knox 5) x Knox 5) x Knox 5) x Knox 5	6	USA
88	Combination N	Bluestem x Early morn	3	USA
89	Dimitrovska 5-12		3	BGR
90	Purdue 5752A-5-7-2		6	USA
91	7203-36		2	
92	SI PV 63		2	
93	Chinofuz	(Chinese x Hope) x Fultz	2	USA
94	64209-77		2	
95	Auburn		6	USA
96	Purdue 79406-I-26-2		6	USA
97	NS 1/92	ABE x Žitnica	6	SRB
98	ND 516		3	USA
99	ND 517		3	USA
100	Lr 1	(Iumillo x Marquis) x (Kanred x Marquis)	3	USA
101	Lr 3		3	USA
102	Lr 10		3	USA
103	Lr 11		5	USA
104	Lr 12		3	USA
105	Lr 13		3	USA
106	Lr 14		3	USA
107	Lr 15		3	USA
108	Lr 16		5	USA
109	Lr 17		3	USA
110	Lr 20		3	USA
111	Lr 22		6	USA
112	Lr 30		3	USA
113	Tiha	(Bean x Žitnica) x Žitnica	6	SRB
114	NS 116/95	Draga x Duga	5	SRB
115	Purdue composite		6	USA
116	Purdue 5565 C-4-1-3-3		6	USA
117	Agent	(((AE x Agel) x Triumph) x Triumph) x Triumph) x Triumph) x Triumph) x Triumph	3	USA
118	ABE	(((Riley67 x Riley2) x Riley2) x PD-6028-A-2-15-9-2)x Arthur4)x Arthur4) x Arthur4)x Arthur	6	USA
119	Sap"S"-Mon"S"		6	USA
120	OK 75R 3645	(((Cofen x Sturdy)x Suwon-92) x Heines kolben-38) x Frontana)) x ((Kenza farmer x Newthatch) x Thather)	6	USA
121	T 734-145		6	
122	Purdue 77249-RCI-133		6	USA
123	Caldwell	Benhur x (Benhur x S. Cerros)	6	USA
124	Pesma	NS 51-37 x Balkan	5	SRB
125	Sreća	(Panonija x Sundown) x Žitnica	5	SRB
126	NS 7/93	VM6959 x Novosadska 6002	5	SRB

170	INTRO 604		4	USA
171	INTRO 509		5	USA
172	INTRO 613		4	USA
173	INTRO 29		6	USA
174	GSN 17	(((((N108 x Y50) x My54) x K-Linc) x (CD x Buho)) x Mon.) x Temu 179-74	4	USA
175	NSP 54	Panonija x GK GRA 992	5	SRB
176	NSP 40	NS 58-97 x GK GRA 992	4	SRB
177	L 63/89	NS 58-97 x GK GRA 992	5	SRB
178	L 64/89	NS 58-97 x GK GRA 992	5	SRB
179	L 152/89	(Oligoculum 112 x Panonija) x Panonija	5	SRB
180	L 154/89	(Oligoculum 112 x Panonija) x Panonija	5	SRB
181	L 156/89	(Oligoculum 112 x Panonija) x Panonija	5	SRB
182	L 159/89	(Oligoculum 112 x Panonija) x Panonija	5	SRB
183	L 160/89	(Oligoculum 112 x Panonija) x Panonija	5	SRB
184	30-SC.Smoc.88/89		5	CZE
185	NS 56/90	Žitnica x Bolonjska	5	SRB
186	NS 3/90	Talent x NSR 2	6	SRB
187	Vitka		5	HRV
188	Skopljanka	Argelato x Kavkaz	5	MKD
189	Nova Skopljanka	Sanja x Bosanka	5	MKD
190	Radika	Partizanka x (Partizanka x SK-7)	5	MKD
191	Szegedi 5		4	HUN
192	Lovrin 24	(Fiorelo x Bezostaja 1) x Lovrin 10	5	ROM
193	Huequen	(Tezanos Pintos Precoz x Paloma) x Siete Cerros	6	CHL
194	Napo 63	((Frontana x Yaqui 48) x Frocor) x Narino 59	6	COL
195	NO 5519		5	CHN
196	SST 101/A		6	ZAF
197	Zarija	(Bezostaja 1 x Priboj) x Cappell	5	RUS
198	PPG-186	Lutescens 329 x Ag.gl	5	RUS
199	Kunčevska	Lutescens 17 x OP	5	RUS
200	Nemčinovskaja 110	Harkovskaja 9029 x Uljanovka	5	RUS
201	<i>Tr. spelta</i> var. <i>duhamelianum</i>		6	
202	WWMCB 339		5	
203	WWMCB 338		2	
204	Campo d Oro con.	Freccia x Mara	5	ITA
205	CR-8		5	
206	CR-10		5	
207	2004		5	
208	2005		5	
209	2017		5	
210	3015		5	
211	3017		5	
212	3020		5	
213	3002		5	

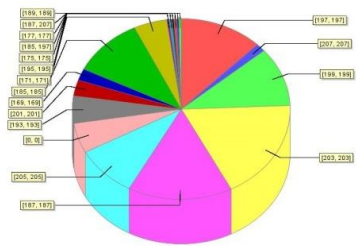
214	Produttore	(Quaderna x Saitama 27) x Salto	4	ITA
215	Leone	San Pastore x Funo	5	ITA
216	5263		5	
217	NS 62-20		6	SRB
218	NS 62-21		6	SRB
219	NS 59-20		6	SRB
220	NS 59-23		5	SRB
221	Panonija	Heine 7 x 129 Genus	5	SRB
222	Košava	(((((S 30 x Sava) x NS 736) x Sava) x Panonija)x Panonija) x Panonija) x Panonija)	5	SRB
223	NS 625	R-37 x Gohls	4	SRB
224	NS 974/1	Bezostaja 1 x Bačka	5	SRB
225	NS 984/1	Bezostaja 1 x Bačka	5	SRB
226	NS 12-77	(Dunav x Bezostaja 1) x Bezostaja 1	5	SRB
227	NS 12-87	((KS-56-R-386 x T-22) x Bezostaja 1) x Bezostaja 1	5	SRB
228	NS 55-30	NS 14-33 x Panonija	5	SRB
229	NS 55-32	NS 14-33 x Panonija	5	SRB
230	NS 56-11	F 26-70 x Sava	5	SRB
231	NS 63-15	NSR-1 x Panonija	5	SRB
232	L 44/83	NSR-1 x Panonija	5	SRB
233	NS 7003	(L 94 x Aurora) x M. Jubilejnaja 50	3	SRB
234	NS 7007/3	(L 94 x Aurora) x M. Jubilejnaja 50	5	SRB
235	ZG 884/73	(ZG 6877/61 x T.derivate 1651) x Abbondanza	3	HRV
236	ZG 2396/73	(RA 295 x BO*TP114 x 1965A) x ZG 3184/67	5	HRV
237	Resistente	Salto x Glutinoso	4	ITA
238	S.174/72		5	
239	L 60/71		5	SRB
240	Fisherect 4A	(Zaragoza 75 x Tobari 66) x Bluebird	6	MEX
241	Erect Raf E2	((TZPP x Sonora 64) x Napo)) x (Tobari x 8156)	2	MEX
242	UC 66052		6	USA
243	UC 66206		6	USA
244	UC 67052		6	USA
245	UC 64246		6	USA
246	Pudue 6413		6	USA
247	Sadovo"S"		5	BGR
248	Sadovo Super	(Moisson x PPG186) x Yubileina III)	5	BGR
249	Minister Dwarf	Minister x ((San Pastore x Tom pouce)	2	GBR
250	Stephens	Nord Desprez x Pullman 101	4	USA
251	Multibraun	Hav-34 x Heines VII	2	AUT
252	ST 924 (Selekta)	Slavia x Whenstephaner-378-57-132-B	4	RUS
253	Hilgendorf 61	Hilgendorf x Indian variety	4	AUT
254	NS 112/92	Žitnica x Rostovčanka	5	SRB
255	Sutjeska	Sava x Aurora	5	SRB
256	Zvezda	((Bezostaja 1 x Sava) x (Mironovska 808 x NS 413)) x Kavkaz	5	SRB
257	Zelegora	(NS646 x Bezostaja 1) x Avrora	5	SRB

258	Szegedi 60		6	HUN
259	WSTGP 91-2		6	HUN
260	A.dw.20/6/Ciano 3-5		4	
261	NSP 192	(Purdue 6413 x Žitnica) x Žitnica	6	SRB
262	NS 114/90	(Aurora x NS 55-25) x Una	5	SRB
263	NS 1/94	Cananea x Jugoslavija	5	SRB
264	NS 2/94	Cananea x Jugoslavija	5	SRB
265	NS 36/91	Rana niska x Una	5	SRB
266	NS 7/94	Tbb ZG 172 x ZG 171-1 Granata	4	SRB
267	NS 9/93	Evropa x Belozrna	5	SRB
268	NS 18/93	Novosadska 6001 x Kosovka	5	SRB
269	NS 23/94	Saulesku x OWM 5	5	SRB
270	NS 57/92	((WWMCB 339 x 12 th ISN 158) x Biserka) x Biserka	5	SRB
271	L 165/94	(NS 36-49 x Novosadska 330) x NS 63-93	5	SRB
272	NS 97/95	((WWMCB 339 x 12 th ISN 158) x Biserka) x Biserka	5	SRB
273	NS 98/95	((WWMCB 339 x 12 th ISN 158) x Biserka) x Biserka	6	SRB
274	NS 124/95	Sremka 2 x Hlebna	5	SRB
275	Danica	(NS 2773 x Partizanka) x Sremica	5	SRB
276	Proteinka	NS 2726 x Mačvanka 1	5	SRB
277	NSP 51	Panonija x Bolonjska	5	SRB
278	NSA 89-5126		5	FRA
279	L 131/94	NS 0.62 x Italija	5	SRB
280	L 351/94	D-002 x Jugoslavija	5	SRB
281	NS 50-14	Tobari 66 x NS 973-47	5	SRB
282	Mironovska 10	Bezostaja 1 x Erythrospermum2107	5	UKR
283	Raduša	Aurora x Siete Cerros	6	SRB

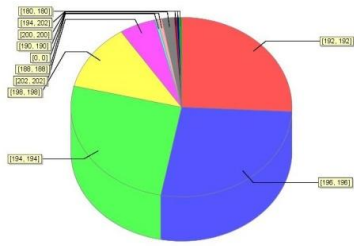
Prilog 2. Frekvencije alela u svim ispitivanim mikrosatelitskim lokusima



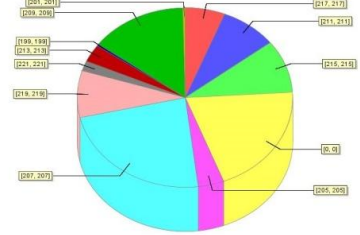
Xcfd71



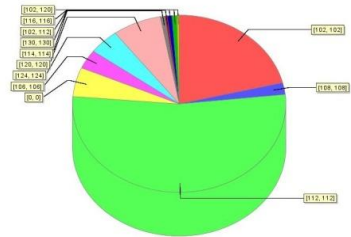
Xcfd65



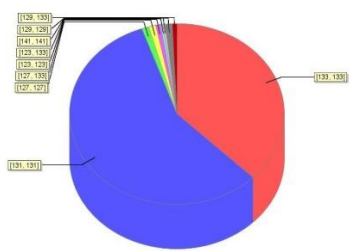
Xcfa2114



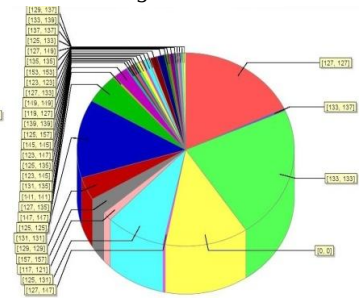
Xbarc101



Xcfa2257



Xgwm181



Biografija autora

Ljiljana Brbaklić rođena je 22. marta 1982. godine u Somboru. Osnovnu školu „21. oktobar“ i Gimnaziju “Veljko Petrović“ završila je u Somboru, sa odličnim uspehom. Osnovne studije upisala je 2001. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu, smer diplomirani biolog na Departmanu za biologiju i ekologiju, Univerziteta u Novom Sadu. Diplomski rad pod nazivom “Analiza alozima u prirodnoj populaciji fazana (*Phasianus* spp.) Vojvodine“ odbranila je na Katedri za Genetiku na Departmanu za biologiju i ekologiju, 11. jula 2006. godine, sa ocenom 10. Prosečna ocena tokom osnovnih studija iznosila je 9,14.

Akadske master studije upisala je oktobra 2006. godine, na Katedri za biohemiju, genetiku, fiziologiju i histologiju na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, smer "*Funkcionalna biologija*". Završni master rad pod naslovom „*Molekularna evaluacija komponenti prinosa pšenice*“ odbranila je 30. septembra 2009. godine sa ocenom 10. Prosečna ocena tokom master studija iznosila je 9,60.

Doktorske akademske studije upisala je 30. oktobra 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program *Molekularna biologija*, smer *Molekularna biologija eukariota*.

Od 2007. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za strna žita, a 2010. godine je izabrana u zvanje istraživač saradnik u Odeljenju za biotehnologiju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Trenutno je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “*Savremeno oplemenjivanje strnih žita za sadašnje i buduće potrebe*“ (broj projekta: TR31066). Učesnik je i dva međunarodna projekta: 1. FP7 projekat pod nazivom „*Genetics and physiology of wheat development to flowering: Tools to breed for improved adaptation and yield potential*“ – ADAPTAWHEAT i 2. COST projektu FA1306 pod nazivom: “*The quest for tolerant varieties - Phenotyping at plant and cellular level*”.

Objavila je 55 naučnih radova u celini ili izvodu od kojih je 7 u međunarodno priznatim časopisima.

Govori engleski jezik i poznaje osnove nemačkog jezika.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Љиљана С. Брбаклић _____

број индекса _____ M3015/2009 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице

(*Triticum aestivum* L.)

- 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 користим интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Љиљана Брбаклић

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Љиљана Брбаклић

Број индекса M3015/2009

Студијски програм молекуларна биологија

Наслов рада Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа
пшенице (*Triticum aestivum* L.)

Ментор др Светлана Радовић и др Анкица Кондић-Шпика

Потписани/а _____

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, _____

Љиљана Брбаклић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Молекуларна и асоцијативна анализа својстава класа пшенице

(*Triticum aestivum* L.)

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, _____

Анијана Ђубалић

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

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

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

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

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

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