Asocijativna analiza fenotipskih svojstava heksaploidne pšenice i molekularnih markera

Guberac, Sunčica

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:357327

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Sunčica Guberac, mag. ing. agr.

ASOCIJATIVNA ANALIZA FENOTIPSKIH SVOJSTAVA HEKSAPLOIDNE PŠENICE I MOLEKULARNIH MARKERA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2020.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Sunčica Guberac, mag. ing. agr.

ASOCIJATIVNA ANALIZA FENOTIPSKIH SVOJSTAVA HEKSAPLOIDNE PŠENICE I MOLEKULARNIH MARKERA

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2020.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Sunčica Guberac, mag. ing. agr.

ASOCIJATIVNA ANALIZA FENOTIPSKIH SVOJSTAVA HEKSAPLOIDNE PŠENICE I MOLEKULARNIH MARKERA

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Povjerenstvo za ocjenu:

1. **dr. sc. Sonja Petrović, izvanredna profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
2. **dr. sc. Andrijana Rebekić, izvanredna profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, član**
3. **dr. sc. Tihomir Čupić, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta Osijek, član**

Osijek, 2020.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Sunčica Guberac, mag. ing. agr.

ASOCIJATIVNA ANALIZA FENOTIPSKIH SVOJSTAVA HEKSAPLOIDNE PŠENICE I MOLEKULARNIH MARKERA

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Javna obrana doktorske disertacije održana je 9. siječnja 2020. godine pred Povjerenstvom za obranu:

1. **dr. sc. Sonja Petrović, izvanredna profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
2. **dr. sc. Andrijana Rebekić, izvanredna profesorica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, član**
3. **dr. sc. Tihomir Čupić, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta Osijek, član**

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti
Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

UDK:
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Poljoprivreda
Grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama

Asocijativna analiza fenotipskih svojstava heksaploidne pšenice i molekularnih markera

Sunčica Guberac, mag. ing. agr.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost genotipova pšenice na temelju rezultata fenotipske i molekularne evaluacije te provesti asocijativnu analizu. Istraživanje je provedeno na 120 kultivara heksaploidne pšenice. Poljski pokus postavljen je kroz četiri vegetacijske godine. Izmjereno je i ocjenjeno 10 fenotipskih svojstava pšenice (osjatost, gustoća klasa, broj dana do klasanja, visina biljke, duljina klasa, broj klasića po klasu, broj zrna po klasu, masa 1000 zrna, masa klasa i prinos). Za provedbu PCR analize korišteno je šest grupa funkcionalnih markera (za identifikaciju Rht, Ppd i Vrn alela, gena povezanih s otpornošću na abiotski stres i masom 1000 zrna te identifikaciju prisustva 1RS translokacije pšenica-raž). U laboratoriju Diversity Arrays Technology Sveučilišta u Canberri (Australija) provedena je analiza uzoraka DArTseq metodom. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$) godine pokusa na sva ispitivana agronomska svojstva. Na temelju korelacijske, regresijske i path analize zaključeno je da su masa klasa, broj zrna po klasu i masa 1000 zrna svojstva koja imaju najveći utjecaj na prinos. PIC vrijednosti DArTseq markera u prosjeku su iznosile 0,237, a He vrijednosti 0,289. Analizom molekularne varijance utvrđeno je da je najveći dio varijabilnosti uzrokovan razlikama između jedinki (90,79 %). Analizom strukture populacije utvrđeno je postojanje tri genska skupa ($K = 3$). Na temelju GLM modela utvrđeno je postojanje 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$), a na temelju MLM modela njih 71. Trideset osam veza bilo je visoko značajno u oba modela.

Broj stranica: 146
Broj slika i grafikona: 36
Broj tablica: 50
Broj literaturnih navoda: 257
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: pšenica, asocijativna analiza, fenotipska svojstva, molekularni markeri

Datum obrane: 09. siječnja 2020.

Povjerenstvo za obranu:

1. **izv. prof. dr. sc. Sonja Petrović** – predsjednik
2. **izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić** – član
3. **dr. sc. Tihomir Čupić** – član

Disertacija je pohranjena u:
Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Postgraduate university study: Agricultural sciences
Course: Plant Breeding and Seed Production

UDK:
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Agriculture
Branch: Genetics and breeding of plants, animals and microorganisms

Association analysis of phenotypic traits and molecular markers in hexaploid wheat

Sunčica Guberac, MEngSC

Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

Supervisor: PhD Sonja Vila, full professor

The aim of this study was to examine the genetic variability of wheat genotypes based on the results of phenotypic and molecular evaluation and to carry out an association analysis. The study was conducted on 120 hexaploid wheat cultivars. The field experiment was set up over four vegetation years, where 10 phenotypic traits of wheat were measured and evaluated (presence of awns, spike density, days to heading, plant height, spike length, number of spikelets per spike, number of grains per spike, 1000 kernel weight, spike weight and yield). Six groups of functional markers were used for PCR analysis (identification of Rht, Ppd and Vrn alleles, genes associated with abiotic stress tolerance and 1000 kernel weight, 1RS wheat-rye translocation). DArTseq analysis was performed in the Diversity Arrays Technology laboratory (University of Canberra, Australia). Analysis of variance revealed a statistically significant influence ($p < 0.001$) of the experiment year on all tested agronomic traits. Based on the correlation, regression and path analysis it was concluded that the spike weight, number of grains per spike and 1000 kernel weight are traits having the greatest influence on the yield. Average PIC value of DArTseq markers was 0.237 and average He value 0.289. Molecular variance analysis revealed that most of the variability was caused by differences between individuals (90.79 %). Analysis of the population structure revealed the existence of three gene pools ($K = 3$). GLM identified 127 highly significant associations ($p < 0.01$) and MLM 71. Thirty-eight associations were significant in both models used.

Number of pages: 146
Number of figures: 36
Number of tables: 50
Number of references: 257
Original in: croatian

Key words: wheat, association analysis, phenotypic traits, molecular markers

Date of the thesis defense: January 09, 2020

Reviewers:

1. **PhD Sonja Petrović, professor** – president
2. **PhD Andrijana Rebekić, professor** – member
3. **PhD Tihomir Čupić** – member

Thesis deposited in:
National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD 1
1.1. Pregled literature 4
1.2. Cilj istraživanja 21
2. MATERIJAL I METODE RADA 22
2.1. Biljni materijal 22
2.2. Poljski pokus 25
2.3. Fenotipska analiza 30
2.4. Molekularna analiza 30
2.4.1. Uzgoj klijanaca 31
2.4.2. Izolacija genomske DNA 31
2.4.3. Provjera čistoće i koncentracije DNA 33
2.4.4. PCR analiza 33
2.4.5. Elektroforeza i očitavanje rezultata 42
2.4.6. DArTseq analiza 44
2.5. Statistička obrada podataka 44
3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 46
3.1. Fenotipska analiza 46
3.1.1. Opisna statistika 46
3.1.2. Analiza varijance 47
3.1.3. Korelacijska analiza agronomskih svojstava 49
3.1.4. Regresijska analiza agronomskih svojstava 52
3.1.5. Path koeficijent analiza agronomskih svojstava 53
3.2. Molekularna analiza 56
3.2.1. PCR analiza 56
3.2.2. DArTseq analiza 58
3.3. Analiza strukture populacije 61
3.3.1. *F* – statistika i analiza molekularne varijance (AMOVA) 61
3.3.2. Metoda *structure* 62
3.3.3. Klaster analiza 67
3.4. Asocijativna analiza 69
3.4.1. Opći linearni model 69
3.4.2. Mješoviti linearni model 81
3.4.3. Usporedba GLM i MLM modela 91

4. RASPRAVA 96
4.1. Fenotipska analiza 96
4.2. PCR analiza 102
4.3. DArTseq analiza 105
4.4. Analiza strukture populacije 107
4.5. Asocijativna analiza 111
5. ZAKLJUČCI 117
6. LITERATURA 118
7. SAŽETAK 142
8. SUMMARY 143
9. PRILOG 144

Istraživanje je financirano od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) u sklopu Uspostavno – istraživačkog projekta PHENOWHEAT (No. 2000)

1. UVOD

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedna od najvažnijih kultura za prehranu stanovništva te se uzgaja u gotovo svim zemljama svijeta. Prema FAO podacima za 2017. godinu pšenica je treća na ljestvici ukupne svjetske proizvodnje, nakon šećerne trske i kukuruza, s ukupnom proizvodnjom od 771 718 579 tona na površini od 218 543 071 ha. Najveći proizvođači pšenice u svijetu su Kina, Indija i Rusija, dok su najveći europski proizvođači Francuska, Ukrajina i Njemačka (FAO, 2017.).

Prema FAO podacima svaki osmi čovjek na zemlji je gladan, a očekuje se da će do 2050. godine ljudska populacija doseći broj od 9 milijardi ljudi te bi prema procjenama svjetska poljoprivredna proizvodnja trebala porasti za čak 60 % kako bi se doskočilo tome problemu (FAO, 2013.). S druge strane poljoprivredna proizvodnja je ograničena negativnim ekološkim promjenama kao što su nestašica i zagađenost vode, neplodna i zagađena tla, klimatske promjene, razvoj novih rasa i biotipova bolesti i štetnika i sl. Zbog navedenoga, oplemenjivači su prisiljeni brže i efikasnije stvarati nove, poboljšane kultivare, prilagođene specifičnim i limitirajućim uvjetima proizvodnje. Naglasak se stavlja na stvaranje stabilnih i adaptabilnih kultivara, otpornih na biotski i abiotski stres, povećane efikasnosti usvajanja vode i iskorištavanja hranjiva (Collard i Mackill, 2008.).

Oplemenjivanje bilja je dugotrajan i neizvjestan proces koji ovisi o nizu različitih čimbenika, polazeći od oplemenjivača i njegovog pristupa stvaranju novog kultivara do genetskih i agroekoloških činitelja. Zbog velikog utjecaja negenetskih činitelja na kvantitativna, a ujedno i najvažnija agronomska svojstva, konvencionalno oplemenjivanje i izbor željenih genotipova su otežani (Pržulj i Perović, 2005.; Boopathi, 2013.).

Zbog mnogobrojnih problema koji se javljaju tijekom procesa oplemenjivanja klasično oplemenjivanje se sve više kombinira s biotehnološkim metodama. Svakako jedna od najvažnijih jest metoda molekularnih markera te markerima potpomognuta selekcija (MAS - Marker Assisted Selection), koja bi mogla imati ključnu ulogu u povećanju efikasnosti i preciznosti konvencionalnog oplemenjivanja. Molekularni markeri znatno skraćuju oplemenjivački proces, omogućavaju brzo utvrđivanje traženih svojstava i daju direktnu informaciju o genotipu. Molekularni ili DNA markeri predstavljaju fragmente DNA, a omogućavaju razlikovanje pojedinih genotipova na temelju DNA analize (Collard i sur., 2005.). Osnovni princip MAS-a je iskorištavanje neravnoteže vezanosti gena (LD - Linkage Disequilibrium) između markera i lokusa kvantitativnog svojstva (QTL - Quantitative Trait

Loci), pri čemu LD označava tendenciju određene kombinacije alela da se nasljeđuju zajedno. S dovoljno snažnim LD-om selekcija se može provoditi direktno putem markera kako bi se indirektno povećala frekvencija vezanih QTL alela od interesa (Hospital, 2009.).

Unatoč tome što postoji veliki broj različitih markera koji se koriste u oplemenjivanju pšenice većina ih nije razvijena iz samih gena budući da je kloniranje gena u pšenice komplicirano zbog njene aloheksaploidne prirode i velikog genoma (Bagge i sur., 2007.). Također, takvi markeri razvijeni su nasumično iz polimorfnih regija unutar genoma te kod njih postoji opasnost od gubitka veze između markera i gena od interesa uslijed pojave genetskih rekombinacija, što smanjuje njihovu prediktivnu vrijednost (Lübberstedt i sur., 1998.). Zbog toga su za oplemenjivanje posebno značajni tzv. funkcionalni markeri (FM – Functional Markers) razvijeni iz polimorfnih regija unutar gena, koje direktno utječu na varijabilnost nekog fenotipskog svojstva (Andersen i Lübberstedt, 2003.), te kao takvi predstavljaju idealne markere za markerima potpomognutu selekciju (Liu i sur., 2012.).

Najveći napredak vezan za molekularne markere dogodio se razvojem DNA mikročipova (microarrays), a koji predstavljaju brzu metodu za ostvarivanje visoke pokrivenosti genoma. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP - Single Nucleotid Polymorphism) predstavlja najpoznatiji oblik DNA mikročipova. SNP – ovi su najzastupljeniji oblik varijacije u genomu te se otkrivaju usporedbom sekvenci većeg broja jedinki (Huang i sur., 2012.). Oduvijek se smatralo da je nemoguće sekvencionirati genom pšenice zbog velike količine ponavljajućih sekvenci (> 80%) i njegove veličine od 17 Gb, a što je pet puta veće od ljudskog genoma. Najveći kromosom pšenice (3B) je dva puta veći od cijelog genoma riže (370 Mb), a cijeli genom kukuruza (2,6 Gb) veličine je tri kromosoma pšenice. Problem predstavlja i heksaploidnost (2n=6x=42) pšenice i postojanje tri homeologna genoma (A, B i D) različitog podrijetla. Iz navedenih razloga razvoj SNP mikročipova kod pšenice je otežan (Paux i sur., 2008.).

DArT (Diversity Arrays Technology) markeri predstavljaju alternativni oblik DNA mikročipova. DArT tehnologija omogućava istovremeno određivanje nekoliko stotina polimorfnih lokusa rasprostranjenih širom genoma, bez prethodnog poznavanja sekvenci. DArT tehnologija uključuje primjenu određene kombinacije restrikcijskih enzima za rezanje genomske DNA, čime se reducira kompleksnost genoma i povećava broj rijetkih sekvenci (low-copy sequences) za razvoj markera (Marone i sur., 2012.).

Identifikacija veze marker-svojstvo prvi je korak prema primjeni markerima potpomognute selekcije u oplemenjivanju bilja. Asocijativno mapiranje (AM – Association Mapping) ili LD mapiranje koristi se za genetsko rastavljanje kompleksnih svojstava na temelju neslučajnih veza između alela na lokusu/ima i fenotipskih svojstava od interesa unutar raznolike germplazme (Weir, 1996.; Wang i sur., 2014.). Razvoj velikog broja molekularnih markera i smanjenje njihove cijene doveli su do široke primjene asocijativnog mapiranja. Postoje dva AM pristupa: "genome wide association" pristup (GWA) i „candidate gene" pristup (CG). GWA zahtjeva veliku količinu dobro raspodjeljenih molekularnih markera i koristi se za kompleksnija svojstva, dok CG zahtjeva detaljno genetsko i biokemijsko poznavanje svojstva i koristi se za ona nešto jednostavnija. Većina ranijih AM istraživanja kod žitarca odnosila se na CG pristup, ali je u zadnje vrijeme porastao interes za GWA pristupom (Alvarez i sur., 2014.).

1.1. Pregled literature

Genetska varijabilnost

Genetska varijabilnost predstavlja mjeru tendencije pojedinih genotipova u populaciji da se međudobno razlikuju jedan od drugoga. Genetska varijabilnost populacije važna je za očuvanje bioraznolikosti, adaptabilnost populacije i njenu evoluciju. Varijabilnost nekog svojstva pokazuje koliko svojstvo varira pod utjecajem okolišnih i genetskih činitelja. (Okorogbona i sur., 2015.).

Oplemenjivanje bilja može se definirati kao proces iskorištavanja i fiksacije genetske varijabilnosti putem selekcije, pa genetska varijabilnost stoga predstavlja osnovu uspješnog oplemenjivačkog procesa (DePauw i O'Brien, 2016.).

Kumar i sur. (2013.b) navode da ispitivanje genetske varijabilnosti omogućava uvid u informacije o prisutnosti određenih varijacija u genetskim konstitucijama jedinki te kao takvo predstavlja osnovu efektivne selekcije.

Za razliku od genetske varijabilnosti, genetska raznolikost predstavlja količinu varijacije opaženu u nekoj određenoj populaciji (Rao i Hodgkin, 2002.; Okorogbona i sur., 2015.).

Marić i sur. (2004.) navode da je poznavanje genetske raznolikosti germplazme pšenice ključno za identifikaciju divergentnih roditeljskih kombinacija i samim time za stvaranje segregirajućeg potomstva visoke genetske varijabilnosti potrebne za daljnju selekciju.

Ispitivanje genetske raznolikosti je proces kojim se varijacije između jedinki, grupa jedinki ili populacija, analiziraju specifičnim metodama ili kombinacijom metoda. Danas je za ispitivanje genetske raznolikosti dostupan veliki broj različitih metoda od kojih se neke oslanjaju na podatke o pedigreu, morfološke, agronomske ili biokemijske podatke, a u novije vrijeme sve više i na molekularne podatke (Mohammadi i Prasanna, 2003.).

Kalimullah i sur. (2012.) ispitivali su genetsku varijabilnost, korelacije i raznolikost germplazme krušne pšenice na uzorku od 41 genotipa za šest agronomskih svojstava pšenice. Utvrđena je značajna varijabilnost između genotipova za svako od ispitivanih svojstava. Prinos zrna po biljci bio je u jakoj pozitivnoj korelaciji s brojem vlati po biljci i brojem zrna po klasu te pozitivnoj korelaciji s masom 1000 zrna.

Zecevic i sur. (2010.) ispitivali su varijabilnost, heritabilnost i komponente varijance za broj zrna po klasu i masu zrna po klasu na uzorku od 10 kultivara ozime pšenice kroz tri vegetacijske godine. Prosječne vrijednosti ispitivanih svojstava značajno su se razlikovale između godina i između kultivara. Za broj zrna po klasu utvrđen je koeficijent varijacije od 17,4 %, a za masu zrna po klasu 21,4 %. Heritabilnost u širem smislu iznosila je 60 % za broj zrna po klasu i 40 % za masu zrna po klasu.

Genetsku varijabilnost 24 genotipa krušne pšenice ispitivali su Wani i sur. (2018.). Analizom varijance utvrđena je značajna genetska varijabilnost za sva ispitivana agronomska svojstva. Utvrđene su negativne korelacije između prinosa i broja dana do zrelosti. Broj dana do klasanja bio je u pozitivnoj korelaciji s visinom biljke i negativnoj korelaciji s biološkim prinosom.

Nukasani i sur. (2013.) proveli su korelacijsku i path analizu na uzorku od 114 linija pšenice kojom je utvrđeno da su broj klasova po jedinici površine, masa zrna po klasu i broj zrna po klasu u jakoj pozitivnoj korelaciji te imaju značajan direktan i pozitivan utjecaj na prinos zrna pšenice.

Genetsku varijabilnost pšenice ispitivali su i Kumar i sur. (2013.a) na uzorku od 30 genotipova. Ispitivano je osam kvantitativnih svojstava. Prinos zrna po biljci bio je u jakoj pozitivnoj korelaciji s masom 1000 zrna, visinom biljke i brojem plodnih vlati po biljci. Duljina klasa i masa 1000 zrna bile su u jakoj pozitivnoj korelaciji s brojem zrna po klasu. Path analizom utvrđeno je da masa 1000 zrna i visina biljke imaju najveći direktan utjecaj na prinos zrna.

Molekularni markeri

Molekularni markeri koriste se u oplemenjivanju bilja od 80-ih godina prošloga stoljeća (Kage i sur., 2016.). Međutim, najčešće se radi o neutralnim genetskim markerima koji se nalaze na određenoj udaljenosti od ciljanog gena i čija vrijednost ovisi o jakosti veze između markera i gena/alela od interesa (Bagge i sur., 2007.). Salgotra i sur. (2014.) navode da su glavne prednosti funkcionalnih u odnosu na konvencionalne markere: a) nepostojanje rekombinacija između markera i gena od interesa, b) prijenos informacija na nepoznati materijal uz visoku vrijednost predviđanja i c) ciljana eksploatacija genetske raznolikosti. Funkcionalni markeri koriste se za efikasniju fiksaciju alela u populacijama, kontroliranu

balansiranu selekciju, „screening“ alela u prirodnim i oplemenjivačkim populacijama, kombiniranje FM alela i konstrukciju vezanih FM haplotipova (Andersen i Lubberstedt, 2003.). Kako bi se razvili funkcionalni markeri potrebno je poznavati funkciju gena, alelne sekvence gena, identificirati polimorfne i funkcionalne regije unutar tih gena te potvrditi vezu između DNA polimorfizma i varijabilnosti svojstva (Lübbersted i sur., 2005.).

U pšenice je klonirano više od 30 lokusa (gena), a razvijeno je i koristi se 97 funkcionalnih markera za identifikaciju 93 alela za kvalitativna, agronomska i svojstva otpornosti. Za važna agronomska svojstva kao što su visina biljke, odgovor na fotoperiod, potreba za vernalizacijom, masa 1000 zrna i otpornost na abiotski stres razvijeno je 27 funkcionalnih markera (Liu i sur., 2012.).

Rht geni

Smanjena visina biljaka jedno je od najvažnijih svojstva koje su oplemenjivači uspjeli razviti kod žitarica unazad sto godina. Niže biljke manje su osjetljive na polijeganje, posebice u uvjetima intenzivne poljoprivrede, te imaju veći priljev asimilata u zrno, što u konačnici dovodi i do povećanog prinosa (Ellis i sur., 2007.; Würschum i sur., 2015.). Veliko povećanje prinosa pšenice koje je postignuto tijekom zelene revolucije 60-ih godina prošloga stoljeća povezano je s introdukcijom Rht (Reduced Height) gena, Rht-B1 i Rht-D1, za smanjenu visinu biljaka. Knopf i sur. (2008.) navode da 90 % kultivara pšenice, koji se uzgajaju diljem svijeta, ima polupatuljasti fenotip, kontroliran s tri major gena Rht-B1, Rht-D1 i Rht8. Geni za smanjenje visine klasificirani su na temelju njihove osjetljivosti na primjenu giberelina (GA - Gibberellic Acid), pa su tako Rht-B1 i Rht-D1 geni GA-neosjetljivi, dok je Rht8 GA-osjetljiv (http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/dwarf/). Ukupno su identificirana 22 gena za smanjenje visine kod pšenice, označeni kao Rht1 do Rht22 (McIntosh i sur., 2012.).

Rht-B1 (ranije Rht1) i Rht-D1 (ranije Rht2) geni podrijetlom su iz japanskog kultivara Norin 10, koji je iz Japana prenešen u SAD, a zatim u Meksiko (CIMMYT) odakle su se navedeni geni proširili u kultivare pšenice diljem svijeta (Borojević i Borojević, 2005.a). Rht8 gen unešen je u europske kultivare pšenice iz japanskog kultivara Akakomugi 30-ih godina prošloga stoljeća (Lorenzetti, 2000.), te se uglavnom koristi u sušnijim područjima kao što su mediteranske zemlje, gdje povećava adaptabilnost biljaka (Gasperini i sur., 2012.). Rht-B1 i Rht-D1 geni za smanjenje visine locirani su na homeolognim kromosomima 4BS

(kratki krak kromosoma 4B) i 4DS (kratki krak kromosoma 4D) (Peng i sur. 1999.), gdje alelne varijante Rht-B1b i Rht-D1b dovode do razvoja patuljastog ili polupatuljastog tipa rasta, a Rht-B1a i Rht-D1a aleli do divljeg tipa rasta. Ellis i sur. (2002.) razvili su funkcionalne ili tzv. „savršene“ PCR markere za identifikaciju dva major polupatuljasta gena Rht-B1 i Rht-D1, koji omogućavaju razlikovanje mutantnih (patuljastih) Rht-B1b i Rht-D1b alela od divljih (visokih) Rht-B1a i Rht-D1a alela kod pšenice.

Rebetzke i sur. (2012.) navode da polupatuljasti geni, odnosno Rht-B1b i Rht-D1b alelne varijante, smanjuju visinu biljke te povećavaju broj zrna i prinos pšenice u povoljnim uvjetima okoline, ali i da su povezani sa smanjenom duljinom koleoptile kao i sporijim rastom lista i akumulacijom biomase.

Würschum i sur. (2015.) ispitivali su genetsku kontrolu visine biljaka na uzorku od 410 europskih kultivara ozime pšenice. Kultivari su genotipizirani za Rht-B1, Rht-D1, Rht8, Ppd-B1 i Ppd-D1 lokuse. Utvrđeno je da su Rht-B1 i Rht-D1 lokusi imali najveći utjecaj na visinu biljke objašnjavajući 40,9 % i 15,5 % genotipske varijance. Ppd-D1 i Rht8 objasnili su 3,0 % i 2,0 % genotipske varijance. Pronađena su i dva QTL-a srednjeg efekta na kromosomu 6A i 5B koja su objasnila 11,0 % i 5,7 % genotipske varijance.

Liu i sur. (2017.a) ispitivali su utjecaj Rht4 i Rht-B1b gena na visinu biljke i važna agronomska svojstva pšenice. Rht4, Rht-B1b i Rht4 + Rht-B1b značajno su smanjili visinu biljaka za 11,5 %, 19,3 % i 18, 2 %. Broj zrna bio je povećan kod linija s Rht4 i Rht-B1b, a broj klasova samo kod linija s Rht-B1b. Rht-B1b smanjio je nadzemnu masu, ali i povećao broj zrna i žetveni indeks, dok Rht4 nije imao značajniji utjecaj na navedena svojstva. Linije s kombinacijom Rht 4 + Rht-B1b imale su najveći prinos, broj zrna, broj klasova i žetveni indeks.

Utjecaj Rht-D1 na agronomska i kvalitativna svojstva ozime pšenice isptivali su Mohler i sur. (2012.) na populaciji od 114 dihaploidnih linija tijekom dvije godine na tri različite lokacije. Mutantni Rht-D1b alel povećao je prinos zrna na samo jednoj lokaciji i to za 4,0 dt/ha u jednoj i 8,4 dt/ha u drugoj godini. Rht-D1b linije imale su manju visinu u odnosu na Rht-D1a linije za 21,6 % u jednoj i 19,4 % u drugoj godini. Rht-D1b alel smanjio je masu 1000 zrna za 4,5 % jedne i 7,3 % druge godine. Prve godine Rht-D1b alel povećao je žetveni indeks za 4,9 %.

Li i sur. (2006.) ispitivali su utjecaj Rht-B1b, Rht-D1b i Rht-B1c gena na agronomska svojstva pšenice. Utvrđeno je da su Rht-B1b i Rht-D1b imali značajan pozitivan utjecaj na

broj zrna i masu zrna po klasu, te negativan utjecaj na masu 1000 zrna u odnosu na linije s Rht-B1a alelom. Rht-B1c imao je negativan utjecaj na broj zrna po klasu i pozitivan utjecaj na masu 1000 zrna. Kombinacija Rht-D1b i Rht-B1c pokazala je negativan utjecaj na komponente prinosa. Nije utvrđen negativan utjecaj ispitivanih alela na broj klasića i duljinu klasa.

Distribuciju Rht-B1b, Rht-D1b i Rht8 gena ispitivali su Zhang i sur. (2006.) na 220 kineskih kultivara ozime pšenice. Utvrđeno je da su Rht-D1b i Rht-B1b prevladavali s frekvencijama od 45,5 % i 46,8 %, dok je Rht-B1b imao frekvenciju od 24,5 %. Također, utvrđeno je da su frekvencije Rht-B1b i Rht-D1b porasle s 8,6 % na 32,2 % i s 36,2 % na 53,4 %, a frekvencije Rht8 su ostale konstantne tijekom vremena, kada se usporede kultivari priznati prije i poslije 1990. godine.

Ppd geni

Geni za odgovor na fotoperiod, Ppd (Photoperiod) geni, igraju glavnu ulogu u određivanju klimatske adaptabilnosti kultivara pšenice (Foulkes i sur., 2004.). Kultivari pšenice koji su osjetljivi na fotoperiod cvjetaju ranije u uvjetima dugog dana te kasnije u uvjetima kratkog dana. Za razliku od njih kultivari neosjetljivi na fotoperiod cvjetaju ranije i u uvjetima kratkog i uvjetima dugog dana (Díaz i sur., 2012.). Sposobnost kultivara neosjetljivih na fotoperiod da cvjetaju ranije predstavlja prednost u toplijim okolinama budući da biljke mogu dovršiti svoj razvoj i nalijevanje zrna prije nastupa visokih ljetnih temperatura povezanih s vodnim deficitom. Poznavanje genetske osnove neosjetljivosti na fotoperiod kao i raspona varijabilnosti vremena cvatnje od velikog je značaja za oplemenjivače pšenice posebice u kontekstu ubrzanih klimatskih promjena (Beales i sur., 2007.). Odgovor pšenice na fotoperiod uglavnom je određen homeolognim lokusima, Ppd-D1 (ranije Ppd1), Ppd-B1 (Ppd2) i Ppd-A1 (Ppd3), koji se nalaze na kratkom kraku kromosoma 2D, 2B i 2A (Scarth i Law, 1983.). Neosjetljivost na fotoperiod uvjetovana je dominantnim alelima nazvanim Ppd-D1a, Ppd-B1a i Ppd-A1a, a osjetljivost na fotoperiod recesivnim alelima Ppd-D1b, Ppd-B1b i Ppd-A1b (Andeden i sur., 2011.), s poretkom utjecaja gena Ppd-D1 > Ppd-B1 > Ppd-A1 (Worland, 1998.).

Japanska pšenica Akakomugi izvor je patuljastog Rht8 gena i Ppd-D1 gena neosjetljivog na fotoperiod, a iz koje su navedeni geni prošireni u kultivare pšenice diljem svijeta. Rht8 i

Ppd-D1 geni locirani su na kratkom kraku kromosoma 2D te je utvrđena njihova uska vezanost (Pestsova i sur., 2002.; Borojević i Borojević, 2005.b).

Funkcionalne markere za identifikaciju Ppd- D1 gena i razlikovanje dominantnog Ppd-D1a alela od recesivnog Ppd-D1b alela razvili su Beales i sur. (2007.).

Distribuciju Ppd-B1a i Ppd-D1a alela i njihov utjecaj na vrijeme klasanja japanskih kultivara pšenice ispitivali su Seki i sur. (2011.). Većina kultivara nosila je neosjetljivi alel Ppd-D1a, a njihovo klasanje bilo je ranije za 10,3 dana u odnosu na kultivare s Ppd-D1b alelom. Samo 11 kultivara je imalo Ppd-B1a alel, ali u kombinaciji s Ppd-D1a alelom. Ppd-B1a/Ppd-D1a kultivari klasali su 6,7 dana ranije u odnosu na Ppd-B1b/Ppd-D1a kultivare.

Novoselović i sur. (2015.) ispitivali su utjecaj Ppd alela na adaptabilna svojstva pšenice na području istočne Hrvatske. Utvrđeno je da su alelni efekti varirali 9,2 dana za vrijeme klasanja, 8,7 dana za vrijeme cvatnje i 11,7 dana za vrijeme fiziološke zrelosti u slučaju Ppd-D1a i Ppd-D1b alela. Ppd-A1 lokus pokazao je najveći utjecaj na prinos zrna. Ppd-D1a alel imao je najveći utjecaj na ranozrelost, klasanje, cvatnju i fiziološku zrelost, a Ppd-D1b najmanji. Nije bilo značajne razlike između utjecaja Ppd-A1a i Ppd-B1a alela na vrijeme klasanja, ali su za vrijeme cvatnje i fiziološku zrelost utvrđene statistički značajne razlike, te se Ppd-B1a pokazao „slabijim“ alelom za ranozrelost.

Wilhelm i sur. (2013.) ispitivali su utjecaj Rht-1 i Ppd-D1 gena na visinu biljaka, osjetljivost na GA i vrijeme klasanja na uzorku od 372 primke pšenice. Utvrđeno je da je Ppd-D1a alel povezan sa značajnim smanjenjem broja dana do klasanja i visine, u odnosu na Ppd-D1b alel. Također, utvrđeno je da su aleli Rht-B1b i Rht-D1b doveli su do značajnog smanjenja visine (~30 %) i GA osjetljivosti.

Distribuciju Ppd-D1a alela ispitivali su Yang i sur. (2009.) na uzorku od 926 kultivara kineske pšenice. Prosječna frekvencija Ppd-D1a alela bila je 66,0 % (38,6 % kod lokalnih i 90,6 % kod komercijalnih kultivara). Ppd-D1a alel bio je prisutan u svim komercijalnim kultivarima priznatim nakon 1970. godine izuzev jarih pšenica sjeverozapadne Kine i ozimih pšenica s područja Gansu i Xinjiang. Također, utvrđeno je da je zastupljenost Ppd-D1a alela postupno rasla od sjevera prema jugu, što ukazuje na vezu fotoperioda i okoline. Kao izvori Ppd-D1a alela navode se kultivari Akagomughi, Mazhamai i Youzimai.

Kako bi se povećao prinos žitarica ključno je njihov životni ciklus prilagoditi okolišnim uvjetima u kojima se uzgajaju (Cockram i sur., 2007.). Geni za vernalizaciju i fotoperiod

kod heksaploidne pšenice glavni su regulatori prijelaza iz vegetativne u reproduktivnu fazu, čime se osigurava pojava cvjetanja kada su temperature povoljne, a sadržaj vode dostatan za normalan rast biljaka (Guedira i sur., 2016.).

Vrn geni

Ključno svojstvo za adaptaciju žitarica na hladne zime jest potreba za dužim izlaganjem niskim temperaturama, odnosno potreba za vernalizacijom (Dubcovsky i sur., 2006.). Ozime žitarice koje se siju u jesen zahtijevaju duže izlaganje niskim temperaturama, odnosno pokazuju potrebu za vernalizacijom kako bi mogle cvjetati, dok jare žitarice koje se siju u proljeće nemaju potrebu za vernalizacijom (Distelfeld i Dubcovsky, 2009.). Pretci pšenice i mnogi moderni kultivari pokazuju potrebu za vernalizacijom, iako se tijekom domestikacije provodila selekcija i za jare forme. Ozime pšenice razlikuju se međusobno po vremenu izlaganja niskoj temperaturi koje im je potrebno da završe proces vernalizacije (Díaz i sur., 2012.).

Kod heksaploidne pšenice potreba za vernalizacijom je najvećim dijelom kontrolirana alelima na tri ortologna lokusa, Vrn-A1, Vrn-B1 i Vrn-D1, koji su locirani na dugom kraku kromosoma 5A, 5B i 5D, a koji se još nazivaju i Vrn-1 lokusi (Vernalisation). Prisutnost dominantnog Vrn-1 alela uvjetuje razvoj jarih formi, a prisutnost recesivnih alela u homozigotnom stanju razvoj ozimih formi pšenice (Santra i sur., 2009.). Kultivari pšenice s dominantnim alelima na Vrn-A1 lokusu neosjetljivi su na vernalizaciju dok oni s dominantnim alelima na Vrn-B1 i Vrn-D1 pokazuju malu osjetljivost na vernalizaciju, s tim da Vrn-A1 prikriva osjetljivost ostalih dominantnih alela (Shindo i Sasakuma, 2002.; Iqbal i sur., 2011.).

Vrn-1 aleli su klonirani i sekvencionirani te su razvijeni dijagnostički markeri za njihovu identifikaciju (Fu i sur., 2005.; Yan i sur., 2004.). Vrn-B3 gen mapiran je na kratkom kraku kromosoma 7B, a dijagnostičke PCR markere za njegovu identifikaciju razvili su Yan i sur. (2006.).

Andeden i sur. (2011.) ispitivali su distribuciju Vrn i Ppd gena na uzorku od 63 komercijalna i 7 lokalnih kultivara pšenice, podrijetlom iz Turske. Ppd-D1a alel utvrđen je kod 60 % komercijalnih i 42 % lokalnih kultivara pšenice, dok su svi ostali kultivari nosili Ppd-D1b alel. Kod 24 komercijalna i 4 lokalna kultivara utvrđena je prisutnost recesivnih alela na sva

četiri Vrn lokusa, dok je 39 komercijalnih i 6 lokalnih kultivara imalo jedan ili više dominantnih Vrn alela. Kod najvećeg broja turskih kultivara utvrđen je dominantni Vrn-B1 alel, a zatim Vrn-D1 i Vrn-A1 aleli.

Iqbal i sur. (2011.) su ispitivali distribuciju alela na Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-B3 i Ppd-D1 lokusima na uzorku od 59 kultivara jare pšenice. Vrn-A1a alel utvrđen je kod 36 % kultivara, sam ili u kombinaciji s Vrn-B1a i Vrn-D1a alelima. Kod dva kultivara utvrđena je prisutnost Vrn-A1c alela, dok prisutnost Vrn-A1b alela nije utvrđena. Vrn-B1 bio je najzastupljeniji alel (64 %), utvrđen sam ili u kombinaciji s Vrn-A1a, Vrn-A1c i Vrn-D1. Vrn-D1 utvrđen je kod 61 % kultivara. Vrn-B3 nije utvrđen kod nijednog ispitivanog kultivara. Nije utvrđena veza između vremena cvatnje i kompozicije Vrn alela. Kod svih kultivara, osim kultivara Era, utvrđen je Ppd-D1a alel, neosjetljiv na fotoperiod.

Distribuciju Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1 i Vrn-B3 gena ispitivali su Zhang i sur. (2008.) na uzorku od 278 kineskih kultivara pšenice. Dominantni Vrn-D1 alel imao je najveću frekvenciju (37,8 %), a slijedili su ga dominantni Vrn-A1, Vrn-B1 i Vrn-B3 aleli. Kod 92 ozima kultivara utvrđena je prisutnost recesivnih alela na sva četiri lokusa. Kod 172 jara kultivara utvrđena je prisutnost barem jednog dominantnog alela. Vrn-D1 alel povezan je s najkasnijim vremenom klasanja, Vrn-A1 s najranijim, dok je Vrn-B1 pokazivao srednje vrijednosti.

Santra i sur. (2009.) ispitivali su distribuciju Vrn-1 gena unutar germplazme jare pšenice s područja SAD-a. Kod većine ispitivanih genotipova utvrđena je prisutnost dominantnog Vrn-A1a alela, samog ili u kombinaciji s Vrn-B1, Vrn-D1 ili Vrn-B3 alelima. Također je utvrđeno da su Vrn-B1 i Vrn-D1 gotovo uvijek bili povezani s drugim dominantnim Vrn-1 alelima.

Distribuciju Vrn i Ppd gena i njihov utjecaj na vrijeme klasanja ispitivali su Kiss i sur. (2014.), na uzorku od 683 genotipa pšenice. Dominantni Vrn-1 aleli bili su zastupljeni s malom frekvencijom. Ppd-D1a alel utvrđen je kod 57 % kultivara i bio je najzastupljeniji kod azijskih i europskih kultivara. Ppd-B1a alel utvrđen je kod 22 % genotipova iz Azije, Amerike i Europe. Alelne kompozicije Ppd-D1, Ppd-B1 i Vrn-D1 značajno su utjecale na vrijeme klasanja, objašnjavajući zajedno 37,5 % fenotipske varijance, gdje je Ppd-D1 kao pojedinačna komponenta objasnio 28 % fenotipske varijance. Najraniji genotipovi bili su oni s kombinacijom Ppd-D1a, Ppd-B1a, Vrn-D1, vrn-A1 i vrn-B1 alela. Kasniji genotipovi posjedovali su Ppd-D1b i Ppd-B1b alele neovisno o Vrn-1 alelima.

Sun i sur. (2009.) ispitivali su distribuciju Vrn gena na uzorku od 551 genotipa kineske pšenice. Dominantni Vrn-A1 alel utvrđen je kod 69 genotipova, Vrn-B1 kod 85, a Vrn-D1 kod njih 258. Vrn-A1 pokazao se kao najefektivniji alel za razvoj jare forme. Recesivni vrn-A1 alel utvrđen je kod 482 genotipa, vrn-B1 kod 466, a vrn-D1 kod njih 293. Svi ozimi genotipovi imali su kombinaciju alela vrn-A1/vrn-B1/vrn-D1. Najzastupljenija alelna kombinacija (40 %) bila je vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1. Razlike u odgovoru na vernalizaciju bile su povezane s razlikama u vremenu klasanja, duljini klasa, tipu busanja i tolerantnosti na smrzavanje.

DREB geni i akvaporini

Abiotski stres predstavlja jedno od glavnih ograničenja i opasnosti biljnoj proizvodnji i sigurnosti hrane u svijetu. Visoke temperature i suša zasigurno su dva najvažnija tipa stresa, koji imaju veliki utjecaj na rast i produktivnost biljaka (Fahad i sur., 2017.). Zampieri i sur. (2017.) navode da toplinski stres zajedno sa sušom ili suviškom vode može objasniti oko 40% promjena u prinosu pšenice od godine do godine.

Transkripcijski faktori reguliraju ekspresiju gena i prijenos signala tijekom odgovora biljke na stres (Seki i sur., 2003.). DREB (Dehydration Responsive Element Binding) proteini predstavljaju veliki skupinu transkripcijskih faktora koji induciraju ekspresiju velikog broja funkcionalnih gena te sudjeluju u odgovoru biljke na stres (Huseynova i Rustamova, 2010.). Huseynova i sur. (2013.) navode da su DREB proteini inducirani abiotskim stresom i reguliraju funkcionalne gene povezane sa sušom, salinitetom i niskim temperaturama. Posebno je zanimljiva Dreb 1 grupa gena koja sudjeluje u odgovoru biljke na osmotski i temperaturni stres te kao takva može biti korisna za poboljšanje tolerantnosti pšenice na sušu (Wei i sur., 2009.). Kod pšenice su klonirane potpune sekvence DREB gena (Shen i sur., 2003.), te su razvijeni molekularni markeri specifični za A, B i D genom pšenice na temelju dostupnih sekvenci Dreb1 gena, locirani na kromosomima 3A, 3B i 3D (Wei i sur., 2009.).

Huseynova i sur. (2013.) pokušali su identificrati Dreb1 gene u uzorku od 12 genotipova pšenice, među kojima su bili na sušu tolerantni, polu-tolerantni i netolerantni genotipovi. PCR analizom utvrđena je prisutnost Dreb-A1 gena kod svih genotipova, osim kod jednog polu-tolerantnog genotipa - Tale-38. Dreb-B1 gen utvrđen je samo kod jednog genotipa, Baraktali-95, a za kojeg je ranije utvrđeno da je visoko tolerantan na sušu. Početnice za identifikaciju Dreb-D1 gena nisu dale očekivane produkte amplifikacije.

Guberac i sur. (2018.) ispitivali su distribuciju Dreb-1 gena na uzorku od 96 europskih kultivara ozime pšenice. Prisutnost Dreb-B1 gena utvrđena je kod 15,62 % ispitivanih kultivara pšenice, Dreb-D1 gena kod 94,79 % kultivara, a Dreb-A1 gena kod 82,29 % kultivara. Kod većine ispitivanih kultivara pšenice utvrđena je prisutnost kombinacije Dreb-A1 i Dreb-D1 gena (65,62 %), dok je prisutnost sva tri Dreb 1 gena utvrđena kod 13,54 % ispitivanih kultivara.

Madrid-Espinoza i sur. (2018.) navode da je tolerantnost pšenice na nedostatak vode kompleksno poligensko svojstvo te veliku ulogu u kontroli ove vrste stresa imaju akvaporini (AQP). Oni predstavljaju grupu transmembranskih proteina, koji reguliraju protok vode i molekula potrebnih za razvoj i tolerantnost biljaka na stres. Autori navode da kod pšenice postoji veliki broj AQP gena, njih čak 113, ali dobar dio njih predstavlja kopije nastale uslijed poliploidizacije i duplikacije.

Pandey i sur. (2013.) navode da je razvijen funkcionalni marker (SNP) za identifikaciju PIP (Plasma Intrinsic Proteins) akvaporina. Marker je korišten za ispitivanje 38 genotipova pšenice, gdje je kod njih 20 utvrđena prisutnost amplificiranog fragmenta veličine ~ 170 bp. Navodi se da je do amplifikacije navedenog fragmenta došlo većinom kod genotipova za koje je ranije utvrđeno da su otporni na sušu.

Translokacija pšenica-raž

Kratki krak kromosoma raži 1RS predstavlja najzastupljeniji strani materijal korišten u oplemenjivanju pšenice. Poznato je preko 16 različitih pšenica – raž translokacija, među kojima su 1AL/1RS i 1BL/1RS najzastupljenije u oplemenjivačkim programima pšenice (Friebe i sur., 1996.; Rabinovich, 1998.; Bagherikia i sur., 2014.).

1RS segment raži povezuje se s otpornošću na različite bolesti i štetnike, adaptabilnošću i tolerantnosti na abiotski stres, ali i pozitivnim utjecajem na važna agronomska svojstva pšenice kao što su nadzemna masa, broj klasova po jedinici površine, masa zrna i prinos (Merker, 1982.; McIntosh, 1983.; Rajaram i sur., 1983.; Schlegel i Korzun, 1997.; Villareal i sur., 1998.; Ehdaie i sur., 2003.). Međutim, učinci 1RS translokacije na prinos zrna pšenice prilično su nedosljedni, što se pripisuje različitoj genetskoj pozadini ispitivanih kultivara (Moreno-Sevilla i sur., 1995.; McKendry i sur., 1996.; Singh i sur., 1998.).

Prisutnost translokacije povezuje se i s negativnim utjecajem na tehnološku kvalitetu pšenice, koji se očituje kroz smanjenje tolerantnosti tijesta na miješanje, povećanje ljepljivosti tijesta i smanjenje volumena kruha (Graybosch i sur., 1993.), kao posljedica prisutnosti sekalina iz raži i zamjene glutenina i glijadina (Dhaliwal i MacRitchie, 1990.).

Rabinovich (1998.) navodi da su samo četiri izvora translokacije pretci stotina komercijalnih kultivara pšenice diljem svijeta, iz čega je jasno vidljivo da je genetska osnova translokacije poprilično uska. Izvori 1BL/1RS translokacije su diploidna raž Petkus (2x) i oktaploidna pšenoraž (8x), a spomenuta translokacija je uvedena u kultivare pšenice diljem svijeta korištenjem ruskih kultivara pšenice Kavkaz i Aurora u oplemenjivačkim programima. 1AL/1RS translokacija podrijetlom je od diploidne raži Insave (2x) te je prvotno unešena u kultivar pšenice Amigo (Schlegel i Korzun, 1997.; Ko i sur., 2002.).

Mali kromosomski segmenti raži, koji su najpoželjniji u oplemenjivanju pšenice, teško se mogu identificirati citološkim metodama, zbog čega su posebno zanimljivi molekularni markeri kao jednostavna metoda identifikacije spomenutih translokacija (Iuoraş i sur., 2006.), te je do danas razvijen veći broj različitih markera koji se koriste u tu svrhu (Guidet i sur. 1991.; Koebner, 1995.; Saal i Wricke, 1999.; Chai i sur., 2006.; Liu i sur., 2008.).

Villareal i sur. (1994.) ispitivali su utjecaj 1B/1R translokacije na agronomska svojstva jarih pšenica od kojih je pet bilo sa, a pet bez translokacije. Utvrđeno je da su genotipovi s translokacijom imali veći prinos nadzemne mase (2,2 %), više klasova po metru kvadratnom (2,1 %), veću masu 1000 zrna (za 1,12 g) i veću specifičnu masu (za 0,8 kg/ha). Genotipovi bez translokacije imali su veći žetveni indeks (0,8 %) i duže klasove (za 0,6 cm). 1B/1R kultivari dozrijevali su 2,5 dana kasnije od 1B kultivara.

Utjecaj 1R supstitucija, 1RS translokacija i 1RL translokacija na agronomska svojstva pšenice ispitivali su Kim i sur. (2004.). Utvrđeno je da je 1RS translokacija imala najpovoljniji utjecaj na agronomska svojstva pšenice te je značajno povećala prinos zrna. Također, utvrđeno je da izvor kromatina raži ima veći utjecaj na performanse pšenice nego sama pozicija kromatina raži u genomu pšenice.

Lelley i sur. (2004.) su ispitivali agronomska i kvalitativna svojstva šest parova izogenih linija pšenice sa i bez 1BL/1RS translokacije, koji su uzgajani u 11 različitih okolina. Stabilnost prinosa bila je slična kod linija sa i bez translokacije te je zaključeno da je za stabilnost bitnija genetska pozadina pšenice nego samo prisutstvo translokacije. Četiri genotipa su se izdvojila od prosjeka kada se gledaju kombinirano prinos, masa zrna, sadržaj

proteina i glutena te okolišna stabilnost. Među njima su bila dva genotipa s 1BL/1RS translokacijom, ali i dva bez translokacije. Stoga, autori navode da je važnost 1BL/1RS translokacije za oplemenjivanje pšenice upitna, posebice kada se ovome pridoda i njen negativan utjecaj na kvalitetu.

Korištenjem mikrosatelitnog markera Denčić i sur. (2008.) su ispitivali distribuciju 1BL/1RS translokacije na uzorku od 150 genotipova heksaploidne pšenice podrijetlom iz 18 država. Prisutnost 1BL/1RS translokacije utvrđena je kod 31 genotipa (20,7 %). Među srpskim kultivarima prisutnost translokacije utvrđena je s frekvencijom od 25,2 %, dok je kod stranih kultivara translokacija utvrđena kod samo 4 genotipa (9,3 %). Autori navode da je ovakva distribucija najvjerojatnije rezultat korištenja ruskih kultivara Kavkaz, Aurora i Skorospelka 35 u domaćim programima oplemenjivanja.

Tabibzadeh i sur. (2013.) ispitivali su distribuciju 1BL/1RS i 1AL/1RS translokacije u 44 iranska kultivara pšenice, od čega 29 krušne i 15 durum. Za utvrđivanje prisutnosti translokacije korišteni su SDS-PAGE i tri PCR markera. Istraživanjem je utvrđena prisutnost 1BL/1RS translokacije kod pet kultivara krušne pšenice, dok prisutnost 1AL/1RS translokacije nije utvrđena.

Distribuciju 1AL/1RS i 1BL/1RS translokacije ispitivali su Bagherikia i sur. (2014.) u uzorku od 66 iranskih i 70 stranih kultivara krušne pšenice. Za utvrđivanje prisutnosti translokacije korištena su tri DNA markera specifična za raž. Prisutnost 1BL/1RS translokacije utvrđena je kod 14 (21 %) iranskih i dva (3 %) strana kultivara pšenice. Prisutnost 1AL/1RS translokacije utvrđena je kod samo jednog kultivara.

TaSus2 i TaCwi geni

Prinos i dalje predstavlja najvažnije svojstvo pšenice, kako sa stajališta oplemenjivača, tako i sa stajališta proizvođača. Glavne komponente prinosa pšenice su broj fertilnih klasova po jedinici površine, broj zrna po klasu i masa 1000 zrna (Hou i sur., 2014.). Masa 1000 zrna jedna je od komponenti prinosa s najvećom heritabilnošću i pod utjecajem je gena većinom aditivnog efekta (Wang i sur., 2012.), a QTL-ovi za masu 1000 zrna mapirani su na gotovo svim kromosomima pšenice (Ma i sur., 2012.).

Saharozna sintetaza (SUS – Sucrose Synthase) je enzim koji pretvara saharozu u škrob, a koji čini oko 70 % suhe tvari zrna te na taj način direktno utječe na formiranje njegove mase.

TaSus2 geni pšenice, odgovorni za sintezu SUS enzima, nalaze se na homeolognoj grupi kromosoma 2 (Hou i sur., 2014.). Jiang i sur. (2011.) razvili su SNP marker za identifikaciju TaSus2 gena, na TaSus2-2B lokusu, gdje dolazi do formiranja dva različita haplotipa, Hap-H i Hap-L. Prvi haplotip dovodi se u vezu s povećanom, a drugi sa smanjenom masom 1000 zrna. Invertaza stanične stijenke (CWI – Cell Wall Invertase) enzim je koji katalizira hidrolizu saharoze do fruktoze i glukoze, a također je povezan s masom zrna. CWI geni kod pšenice nalaze se na kromosomima 4A, 5B i 5D (Khalid i sur., 2018.). Ma i sur. (2012.) razvili su funkcionalne markere za identifikaciju alelnih varijanti TaCwi-A1 gena pšenice, gdje se alel TaCwi-A1a dovodi u vezu s povećanom masom, a TaCwi-A1b sa smanjenom masom 1000 zrna. Vezu između mase 1000 zrna i spomenutih markera ispitivali su na uzorcima kineskih lokalnih i komercijalnih kultivara pšenice te utvrdili njihovu usku povezanost.

Famina i sur. (2017.) ispitivali su distribuciju alela na TaCwi-A1 i TaSus2-2B lokusu, na uzorku od 79 kultivara ozime pšenice. Istraživanjem je prisutnost TaCwi-A1a alela utvrđena kod 70 (89 %) ispitivanih kultivara, a TaCwi-A1b alela kod njih 9 (11 %). Na TaSus2-2B lokusu utvrđena je prisutnost samo Hap-L haplotipa. Zaključeno je da distribucija alela na navedenim lokusima nije mogla u potpunosti objasniti fenotipsku varijancu za svojstvo mase 1000 zrna.

Distribuciju alela na spomenutim lokusima ispitivali su i Gao i sur. (2015.) na uzorku od 102 kultivara pšenice. Prisutnost TaCwi-A1a alela utvrđena je kod 76,47 % ispitivanih kultivara, a TaCwi-A1b alela kod 31,37 %. Kod osam kultivara utvrđena je prisutnost oba alela na TaCwi-A1 lokusu. Hap-H haplotip utvrđen je kod 56,9 % ispitivanih kultivara, a Hap-L haplotip kod njih 43,1 %.

Guberac i sur. (2019.) ispitivali su alelnu kompoziciju TaCwi-A1 i TaSus2-2B lokusa na uzorku od 50 hrvatskih kultivara ozime pšenice. Prisutnost TaCwi-A1a alela utvrđena je kod 90 % ispitivanih kultivara pšenice, a TaCwi-A1b alela kod njih 14 %. Na TaSus2-2B lokusu utvrđena je prisutnost Hap-L haplotipa kod 80 % ispitivanih kultivara pšenice, a Hap-H haplotipa kod njih 6 %. Nisu utvrđene značajnije razlike u masi 1000 zrna s obzirom na različite alelne kompozicije ispitivanih kultivara.

Asocijativno mapiranje i DArT markeri

Većina agronomski važnih svojstava su kompleksna svojstva kontrolirana s većim brojem QTL-ova. Dva najvažnija pristupa za rastavljanje kompleksnih svojstava na jednostavnije komponente su „linkage“ analiza i asocijativno mapiranje. Glavne prednosti asocijativnog mapiranja u odnosu na „linkage“ analizu su: veća rezolucija mapiranja, veći broj alela, šira referentna populacija te kraće trajanje istraživanja (Yu i Buckler, 2006.). Asocijativno mapiranje poznato i kao asocijativna analiza ili „linkage disequilibrium“ (LD) mapiranje, služi za otkrivanje i lociranje QTL-ova na temelju jakosti veze između mapiranog genetskog markera i određenog svojstva (Mackay i Powell, 2007.). Alvarez i sur. (2014.) navode da je glavni cilj asocijativne analize odrediti važnost utjecaja određenih lokusa ili genomskih regija na ekspresiju određenih svojstava, odnosno identificirati veze između markera i svojstava od interesa, a koje se kasnije mogu koristiti u markerima potpomognutoj selekciji.

Glavni princip asocijativne analize zasniva se na neravnoteži vezanosti gena (LD), a koja predstavlja neslučajne veze između alela na različitim lokusima (Flint-Garcia i sur., 2003.). Asocijativna analiza oslanja se na pad LD-a, prvotno prisutnog u populaciji, po stopi koja je određena genetskom udaljenošću dva lokusa i broju generacija od njegove pojave; pa tako u nestrukturiranoj populaciji nakon većeg broja generacija ostaju samo veze između QTL-ova i markera koji su usko vezani što omogućava precizno mapiranje (Mackay i Powell, 2007.). Neumann i sur. (2011.) navode da struktura populacije može uzrokovati prividan LD između lokusa koji nisu vezani ili su u slaboj vezi te na taj način dovesti do lažno pozitivnih veza između markera i svojstva pa je potrebno prilikom analize uzeti u obzir i LD nastao uslijed određene strukture populacije. Zhu i sur. (2008.) navode da LD određuje rezoluciju mapiranja i broj potrebnih markera. Primjerice, ako LD opada unutar kratke regije, rezolucija mapiranja će biti veća, ali će biti potreban i veći broj markera, dok će u obrnutom slučaju, gdje LD raste unutar duže regije, rezolucija mapiranja biti manja, ali će biti potreban i manji broj markera. Neki od faktora koji dovode do povećanja LD-a su inbreeding, mala veličina populacije, genetska izolacija skupina, niska stopa rekombinacije i prirodna i umjetna selekcija; dok faktori kao što su stranooplodnja, visoka stopa rekombinacije i visoka stopa mutacija dovode do smanjenja LD-a (Gupta i sur., 2005.). Myles i sur. (2009.) navode da je rezolucija mapiranja funkcija pada LD, pa je stoga vrlo bitno odabrati raznoliku germplazmu koja iskorištava rekombinacije nastale tijekom prošlosti određene vrste.

Primjena asocijativnog mapiranja kod žitarica, prvenstveno GWA pristupa, bila je prilično otežana zbog potrebe za genotipizacijom velikog broja jedinki s velikim brojem molekularnih markera (Neumann i sur., 2011.). Razvojem visoko-propusnih sustava kao što su DArT markeri ovaj problem je nadvladan, te je omogućena brza i isplativa genotipizacija biljnih vrsta neovisno o razini ploidnosti i podatcima o DNA sekvencama (Jaccoud i sur., 2001.). DArT marker je segment genomske DNA čija je prisutnost polimorfna u određenoj genomskoj strukturi, a može biti dominantan (ocjene 1 i 0) ili kodominantan (ocjene 2, 1 i 0) (Wenzl i sur., 2004.). Zbog velikog broja markera koji se istovremeno ocjenjuju DArT omogućava visoku razinu rezolucije u studijama genetske raznolikosti (Wenzl i sur., 2008.). DArT markeri detektiraju polimorfizam uslijed promjene pojedinačnih parova baza (SNP) na restrikcijskim stranama endonukleaza te InDel (Insertions/Deletions) rearanžmane unutar restrikcijskih fragmenata (Jaccoud i sur., 2001.). Glavne prednosti DArT markera su: a) neovisnost o DNA sekvenci, b) genetski opseg analize definiran od strane korisnika, c) visoka propusnost i isplativost metode (Huttner i sur., 2005.).

GBS (Genotyping By Sequencing) predstavlja novi, brz, isplativ i visoko-propusan pristup za istovremeno otkrivanje SNP-ova i genotipizaciju (Elshire i sur., 2011.; Baloch i sur., 2017.). Klasični DArT markeri sve više se zamjenjuju DArTseq markerima, koji se baziraju na spomenutom GBS pristupu, a razvijeni su korištenjem DArT platformi u kombinaciji s NGS (Next Generation Sequencing) platformama (Sansaloni i sur., 2011.). Osnova DArT i DArTseq metode jest redukcija kompleksnosti genoma, koja se postiže primjenom određene kombinacije restrikcijskih enzima, čime se odvajaju „low copy“ sekvence od ponavljajućih fragmenata (https://www.diversityarrays.com).

DArT markere za pšenicu razvili su Akbari i sur. (2006.), a prvo GWA istraživanje kod pšenice u kojemu su korišteni DArT markeri objavili su Crossa i sur. (2007.).

Badea i sur. (2008.) su korištenjem 25 SSR i 409 DArT markera analizirali 87 kultivara jare i ozime pšenice te proveli klaster analizu. Analizom su linije razdvojene u šest klastera koji su generalno odgovarali podrijetlu, tipu rasta i/ili pedigreu ispitivanih pšenica.

Crossa i sur. (2007.) proveli su asocijativnu analizu germplazme pšenice korištenjem 813 DArT markera i 831 drugih markera. Cilj istraživanja bio je pronaći vezu između svojstava otpornosti na različite bolesti i prinosa zrna s korištenim markerima. Istraživanjem su pronađene nove kromosomske regije povezane s otpornošću na bolesti i prinos zrna, ali i potvrđene neke ranije poznate.

Zhang i sur. (2011.) su korištenjem DArT markera ispitivali genetsku raznolikost i strukturu populacije na uzorku od 111 kineskih kultivara pšenice. Od ukupno 7000 DArT markera 1637 je bilo polimorfno. PIC vrijednost DArT markera kretala se od 0,03 do 0,50, s prosjekom od 0,40, i stupnjem sigurnosti P > 80 (pouzdani markeri). PCA analizom utvrđeno je postojanje dvije glavne grupe s obzirom na 1RS/1BL tip.

Neumann i sur. (2011.) proveli su GWA mapiranje na 96 primki pšenice korištenjem DArT markera. U istraživanju je ocijenjeno dvadeset agronomskih svojstava kroz osam vegetacijskih sezona. Za asocijativnu analizu korštena su dva različita pristupa – opći linearni model i mješoviti linearni model. Korištenjem oba modela utvrđeno je ukupno 385 marker-svojstvo veza. Neke od njih utvrđene su u regijama gdje do tada nisu bili locirani geni.

Genetsku analizu i asocijativno mapiranje 96 kultivara ozime pšenice proveli su Dodig i sur. (2012.). Kroz tri godine ocijenjena su 24 agronomska svojstva i to u uvjetima s navodnjavanjem, bez navodnjavanja i u sušnim uvjetima. Za analizu su korišteni SSR markeri. Utjecaj markera kretao se od 14 % do 50,8 %. Ukupno su utvrđene 34 značajne marker-svojstvo veze korištenjem devet markera, gdje su najzastupljeniji bili markeri psp3200 (6DS) i gwm484 (2DS), koji su objašnjavali najveći dio fenotipske varijacije.

Yu i sur. (2014.) proveli su analizu genetske raznolikosti i asocijativno mapiranje agronomskih svojstava na B genomu pšenice. U ispitivanju je ocjenjeno 13 agronomskih svojstava na 109 primki pšenice. Za analizu su korišteni DArT markeri. Analizom fenotipske raznolikosti utvrđeno je da je struktura populacije odgovorna za 5,82 % fenotipske varijacije. Također, pronađene su 84 značajne veze marker-svojstvo te je identificirano pet važnih markera za buduća istraživanja.

Nielsen i sur. (2014.) ispitivali su genetsku varijabilnost i strukturu populacije europske heksaploidne krušne pšenice korištenjem DArT markera. Od ukupno 7000 markera njih 1849 se pokazalo polimorfnima. Izdvojene su dvije podgrupe kultivara, čemu je pridonijelo geografsko podrijetlo, ali velikim dijelom i markeri locirani na 2D kromosomu u blizini Rht8 lokusa.

GWA mapiranje za svojstvo prinosa i komponente prinosa kod jare pšenice proveli su Edae i sur. (2014.). Biljke su uzgajane u uvjetima sa i bez navodnjavanja kroz dvije godine. Molekularna analiza provedena je korištenjem DArT markera. Istraživanjem je pronađen

stabilan QTL za prinos zrna na kromosomu 2DS u uvjetima sa i bez navodnjavanja, koji se može koristiti u markerima potpomognutoj selekciji.

Wang i sur. (2014.) su ispitivali genetsku varijabilnost i strukturu populacije 94 elitne linije pšenice te proveli GWA analizu za identifikaciju marker-svojstvo veza za pet svojstava pšenice: tvrdoća zrna, masa 1000 zrna, sadržaj proteina, testna masa i visina biljke. Pronađeno je šest marker lokusa koji su značajno povezani s tvrdoćom zrna, masom 1000 zrna i visinom biljke. Za gen pinB je utvrđena visoka povezanost s tvrdoćom zrna, kao i za gen pinA. Marker XwPt-7187 na kromosomu 2A također je bio značajno povezan s tvrdoćom zrna. DArT markeri XwPt-1250 i XwPt-4628 bili su povezani s masom 1000 zrna, a marker Xgwm512 s visinom biljke.

Tadesse i sur. (2015.) koristili su 3051 DArT marker za GWA mapiranje svojstava prinosa i kvalitete kod ozime pšenice. Genotipovi su ispitivani u uvjetima sa i bez navodnjavanja tijekom dvije godine. Za pet markera utvrđena je značajna veza s prinosom u uvjetima bez navodnjavanja. U uvjetima s navodnjavanjem za jedan marker je utvrđena značajna veza s prinosom. Kod dva markera utvrđena je značajna veza sa sadržajem proteina i alveografskom čvrstoćom.

GWA analizu 385 kultivara ozime i 14 kultivara jare pšenice proveli su Zanke i sur. (2015.). Cilj istraživanja bio je pronaći major QTL za svojstvo mase 1000 zrna. Za analizu su korišteni fenotipski podatci, 732 mikrosatelitna markera i 7769 SNP-ova. Najveći broj značajnih SNP markera pronađen je na kromosomima 3B i 1B, a SSR markera na kromosomima 6D i 3D. Zaključeno je da je masa 1000 zrna određena većim brojem markera maloga efekta.

Bellucci i sur. (2015.) proveli su AM kako bi se utvrdila povezanost markera sa svojstvima prinosa, visine biljke i karakteristikama važnim za prozvodnju bioetanola. U istraživanju je korištena DArTseq platforma s 5525 markera za provedbu GWA mapiranja. Mapirano je šest QTL-ova za prinos zrna, visinu biljke i sadržaj glukoze.

Novoselović i sur. (2016.) ispitivali su raznolikost hrvatske germplazme pšenice i strukturu u europskom kontekstu korištenjem 1229 DArT markera. Rezultati su pokazali veću genetsku varijabilnost germplazme Srednje Europe u odnosu na Sjevernu i Zapadnu Europu te je većina varijabilnosti pripisana razlikama između kultivara unutar pojedinih zemalja. Također, utvrđeno je da hrvatska germplazma predstavlja dio genetske varijabilnosti koji nije prisutan u elitnoj europskoj germplazmi pšenice.

Chen i sur. (2018.) su ispitivali strukturu populacije na uzorku od 138 kultivara kineske pšenice korištenjem DArTseq tehnologije. DArTseq analizom dobiveno je 30 485 markera, 6 486 SNP i 23 999 DArT, sa srednjim PIC vrijednostima 0,33 za DArT i 0,28 za SNP. Koeficijent genetske sličnosti (GS) iznosio je 0,72. PCA analizom utvrđeno je postajanje dvije osnovne grupe kultivara. Analiza strukture populacije otkrila je šest podgrupa na temelju podrijetla, pedigrea i otpornosti na bolesti.

1.2. Cilj istraživanja

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su sljedeći:

i. Ispitati genetsku varijabilnost genotipova pšenice na temelju fenotipske evaluacije 10 morfoloških i agronomskih svojstava
ii. Ispitati genetsku varijabilnost genotipova pšenice na temelju molekularnih podataka dobivenih funkcionalnim markerima
iii. Ispitati genetsku varijabilnost genotipova pšenice na temelju molekularnih podataka dobivenih DArT markerima
iv. Provesti asocijativnu analizu na temelju rezultata fenotipske i molekularne analize i utvrditi veze marker – svojstvo

Postavljena je sljedeća hipoteza: Istraživanjem će se utvrditi značajna genetska varijabilnost između ispitivanih genotipova te će se pronaći veza između fenotipskih svojstava i markera.

2. MATERIJAL I METODE RADA

2.1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na 120 kultivara heksaploidne pšenice, koji predstavljaju dio kolekcije Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Kultivari su priznati u posljednjih 100 godina i podrijetlom su s pet kontinenata, iz 25 država svijeta. Popis svih kultivara s njihovim podrijetlom i godinom priznavanja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Podrijetlo i godina priznavanja ispitivanih kultivara pšenice

R.br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina	R.br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina
1.	SIRBAN PROLIFIK	HUN	1905.	**31.**	NS RANA 2	SRB	1975.
2.	AKAKOMUGHI	JPN	1929.	**32.**	COOK	AUS	1977.
3.	SAITAMA 27	JPN	1931.	**33.**	OSJEČKA 20	CRO	1978.
4.	BANKUTI 1205	HUN	1931.	**34.**	NIZIJA	SRB	1979.
5.	THATCHER	USA	1934.	**35.**	LABRIEGO INIA	CHL	1980.
6.	NORIN 10	JPN	1935.	**36.**	AGRON	AUT	1980.
7.	U1	CRO	1936.	**37.**	GEMINI	ITA	1981.
8.	SAN PASTORE	ITA	1940.	**38.**	SKOPJANKA	MKD	1982.
9.	CAPPELLE DESPREZ	FRA	1946.	**39.**	SANA	CRO	1983.
10.	MARA	ITA	1947.	**40.**	IKARUS	AUT	1983.
11.	FIORELLO	ITA	1947	**41.**	ŽITARKA	CRO	1985.
12.	ATLAS 66	USA	1948.	**42.**	HANA	CZK	1985.
13.	ETOILE DE CHOISY	FRA	1950.	**43.**	AI-BIAN 1	CHN	1986.
14.	GALA	AUS	1960.	**44.**	SLEJPNER	SWE	1986.
15.	BEZOSTAJA	RUS	1963.	**45.**	MV-16	HUN	1987.
16.	LIBELLULA	ITA	1965	**46.**	SOISSONS	FRA	1987.
17.	SIETE CERROS	MEX	1966.	**47.**	ALIDOS	GER	1987.
18.	MAGNIF 41	ARG	1966.	**48.**	SRPANJKA	CRO	1989.
19.	MURA	CRO	1967.	**49.**	CAPO	AUT	1989.
20.	SONALIKA	IND	1967.	**50.**	RENAN	FRA	1989.
21.	JUBILEJNAJA 50	RUS	1970.	**51.**	MV-19	HUN	1990.
22.	HIRA	IND	1970	**52.**	SIDERAL	FRA	1990.
23.	ZLATNA DOLINA	CRO	1971.	**53.**	CONTRA	GER	1990.
24.	CAJEME 71	MEX	1971.	**54.**	DEMETRA	CRO	1991.
25.	GLENLEA	CAN	1972.	**55.**	NS RANA 5	SRB	1991.
26.	AVRORA	RUS	1972.	**56.**	MV-24	HUN	1992.
27.	KAVKAZ	RUS	1972.	**57.**	PKB SUNCE	SRB	1993.
28.	VOJVOĐANKA	SRB	1973.	**58.**	CERERA	CRO	1993.
29.	MV-4	HUN	1974.	**59.**	RIALTO	GBR	1993.
30.	CHILE 8	CHL	1974.	**60.**	MV-VILMA	HUN	1994.

Tablica 1. (nastavak)

R.br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina	R.br.	Kultivar	Podrijetlo	Godina
61.	BC PATRIA	CRO	1994.	**91.**	BANQUET	CZK	2001.
62..	DIVANA	CRO	1995.	**92.**	VANDA	SVK	2001.
63.	UKRAINKA-ODESSKAYA	UKR	1995.	**93.**	BC ELVIRA	CRO	2002.
64.	AREZZO	FRA	1995.	**94.**	FABULA	AUT	2002.
65.	KUNA	CRO	1995.	**95.**	PRIMA-ODESSKAYA	UKR	2002.
66.	RENESANSA	SRB	1995.	**96.**	NEVENA	CRO	2002.
67.	MIHELCA	CRO	1996.	**97.**	ŠEVA	CRO	2002.
68.	BREA	CZK	1996.	**98.**	SW MAXI	GER	2002.
69.	AC ELSA	CAN	1996.	**99.**	MV-TOBORZO	HUN	2003.
70.	MV-MATADOR	HUN	1997.	**100.**	JANICA	CRO	2003.
71.	SUPERŽITARKA	CRO	1997.	**101.**	BASTIDE	FRA	2003.
72.	GOLUBICA	CRO	1997.	**102.**	ATENA	CRO	2003.
73.	LARA	CRO	1997.	**103.**	ZRNKA	CRO	2003.
74.	ISENGRAIN	FRA	1997.	**104.**	BLANKA	CRO	2003.
75.	BANICA	CRO	1997.	**105.**	TOISONDOR	FRA	2004.
76.	MV-MAGVAS	HUN	1998.	**106.**	TALIA	CRO	2004.
77.	SOFIJA	CRO	1998.	**107.**	NIRVANA	SRB	2004.
78.	VIKTORIYA-ODESSKAYA	UKR	1998.	**108.**	AVORIO	ITA	2004.
79.	KOLEDA	CRO	1998.	**109.**	MATEA	CRO	2005.
80.	ELPA	GER	1998.	**110.**	HELIA	CRO	2005.
81.	MAGISTRAL	ROM	1998.	**111.**	DALNITSKAYA	UKR	2005.
82.	GABI	CRO	1999.	**112.**	REDIMER	SRB	2006.
83.	DEKAN	GER	1999.	**113.**	PREMIO	FRA	2007.
84.	GALATEYA	BGK	1999.	**114.**	LIVIJA	CRO	2007.
85.	KARLA	CRO	2000.	**115.**	DONNA	CRO	2007.
86.	MIRONOVSKAYA-65	UKR	2000.	**116.**	ILIRIJA	CRO	2008.
87.	ALTOS	GER	2000.	**117.**	AFZG KAJA	CRO	2010.
88.	MV-PANNA	HUN	2001.	**118.**	AFZG KARLA	CRO	2010.
89.	LUCIJA	CRO	2001.	**119.**	BIANCA	CRO	2010.
90.	EDISON	AUT	2001.	**120.**	CHINESE SPRING	CHN	-

S obzirom na geografsko podrijetlo kultivari su podijeljeni u osam grupa na sljedeći način:

1) Sjeverna Amerika – Kanada (CAN), Sjedinjene Američke Države (USA)
2) Srednja i južna Amerika – Meksiko (MEX), Argentina (ARG), Čile (CHL)
3) Azija i Australija – Kina (CHN), Japan (JPN), Indija (IND), Australija (AUS)
4) Zapadna Europa – Švedska (SWE), Velika Britanija (GBR), Francuska (FRA)
5) Srednja Europa – Njemačka (GER), Austrija (AUT), Češka (CZK), Slovačka (SVK)
6) Istočna Europa – Mađarska (HUN), Bugarska (BGK), Rumunjska (ROM), Rusija (RUS), Ukrajina (UKR)
7) Južna Europa – Italija (ITA), Makedonija (MKD)
8) Hrvatska i Srbija (CRO, SRB)

S obzirom na period priznavanja kultivari su podijeljeni u četiri grupe na sljedeći način:

1) Kultivari priznati od 1900. do 1950. godine
2) Kultivari priznati od 1950. do 1980. godine
3) Kultivari priznati od 1980. do 2000. godine
4) Kultivari priznati od 2000. godine do danas

2.2. Poljski pokus

Poljski pokus postavljen je kroz četiri vegetacijske godine (2013./2014., 2014./2015., 2015./2016. i 2016./2017.), u sklopu HRZZ istraživačkog projekta „PHENOWHEAT“. Pokus je kroz sve četiri vegetacijske godine bio postavljen na lokacijama u okolici Osijeka, 2013./2014. na lokaciji Nemetin, 2014./2015. na lokaciji Sarvaš, a 2015./2016. i 2016./2017. na lokaciji Brijest (Slika 1). Na pokusima je provedena standardna agrotehnika za pšenicu. Pokusne parcele bile su veličine 5 m x 1,25 m (6,25 m^2).

Slika 1. Poljski pokus – lipanj 2016. (foto original; S. Guberac)

Prve godine na lokaciji Nemetin pokus je postavljen na ilovastom tipu tla gdje je kao predkultura bio posijan silažni kukuruz. Na temelju agrokemijske analize tla određene su potrebe za gnojidbom. Provedena je predsjetvena gnojidba sa 130 kg urea-e i 360 kg/ha NPK 0:20:30, te dvije prihrane sa 160 i 180 kg/ha KAN-a. Sredinom ožujka provedena je zaštita usjeva primjenom herbicida Lintur (dikamba + triasulfuron) u količini od 170 g/ha. Druge godine na lokaciji Sarvaš pokus je postavljen također na ilovastom tipu tla s merkantilnim kukuruzom kao predkulturom. Provedena je predsjetvena gnojidba sa 130 kg

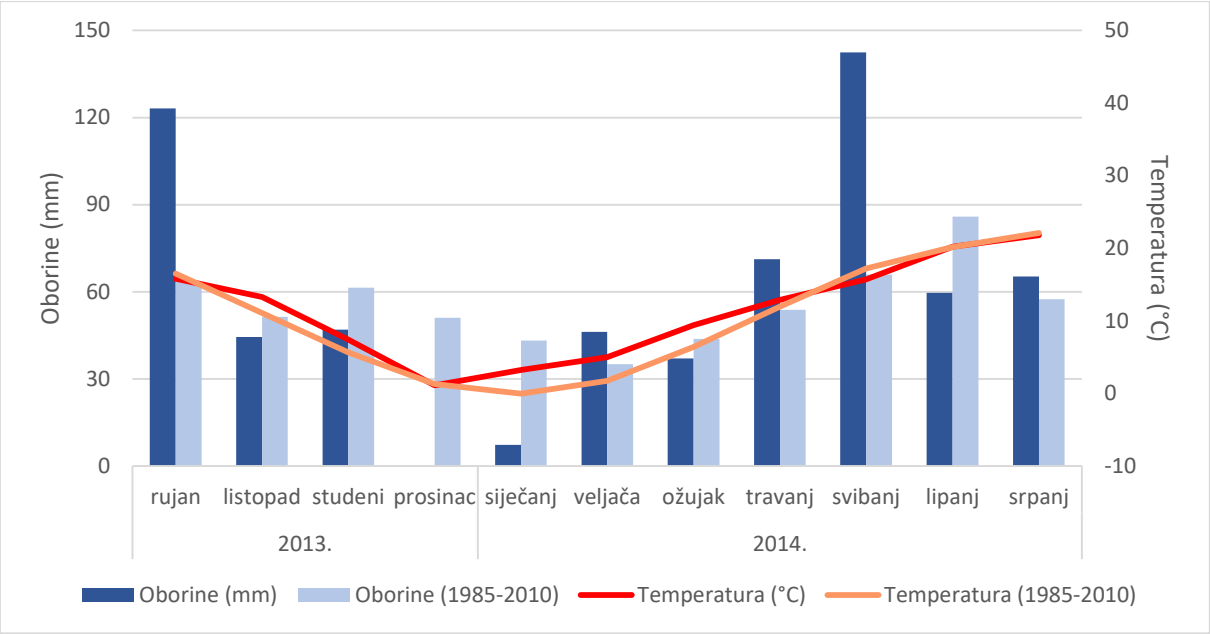
urea-e i 40 kg/ha NPK 0:20:30, te dvije prihrane sa 160 i 180 kg/ha KAN-a. U drugoj polovini ožujka provedena je zaštita usjeva primjenom herbicida Lancelot (aminopiralid + florasulam) u količini od 33 g/ha. U trećoj godini na lokaciji Brijest pokus je postavljen na eutričnom smeđem tlu, gdje je kao predkultura posijana soja. Na temelju agrokemijske analize tla određene su potrebe za gnojidbom te je zaorano 200 kg/ha NPK 7:20:30 i 81 kg/ha urea-e. Provedene su i dvije prihrane primjenom 150 kg/ha KAN-a. U tri navrata provedena je zaštita usjeva primjenom herbicida: Filon (prosulfokarb) u količini od 3 l/ha, Logran (triasulfuron) u količini od 37 g/ha i Starane (fluroksipir) u količini od 0,8 l/ha. Fungicid Amistar Extra (azoksistrobin + ciprokonazol) primijenjen je u dva navrata u količini od 1 l/ha. Insekticidi su primjenjivani u tri navrata, jednom Chromorel-D (klorpirifos + cipermetrin) u količini od 1 l/ha te dva puta Karate Zeon (cihalotrin) u količini od 0,15 l/ha. U zadnjoj godini pokus je ponovno postavljen na lokaciji Brijest i eutričnom smeđem tlu, gdje je kao predkultura posijana soja. Zaorano je 400 kg/ha NPK 7:20:30 i 103 kg/ha urea-e. Provedene su dvije prihrane sa 170 i 150 kg/ha KAN-a. Sredinom ožujka primjenjeni su herbicidi Filon 80 EC (prosulfokarb) u količini od 3 l/ha i Logran 20 WG (triasulfuron) u količini od 50 g/ha. U dva navrata primijenjeni su fungicidi Artea plus (ciprokonazol + propikonazol) u količini od 0,5 l/ha i Comrade (ciprokonazol + azoksistrobin) u količini od 1,0 l/ha. Insekticidi su primjenjivani tri puta, prvi puta Carate Zeon (cihalotrin) u količini 0,15 l/ha, te dva puta Nurelle D (klorpirifos-etil + cipermetrin) u količini 1,0 l/ha.

Klimatološki podatci o srednjim mjesečnim temperaturama zraka i ukupnim mjesečnim količinama oborina dobiveni su od Zavoda za sjemenarstvo i rasadničarstvo (mjerna postaja Brijest) i Državnog hidrometeorološkog zavoda (mjerna postaja Osijek-Klisa). Navedeni podatci prikazani su Walterovim klima dijagramom (Grafikon 1 - 4) za sve četiri godine pokusa u usporedbi s višegodišnjim prosjekom (1985. – 2010.).

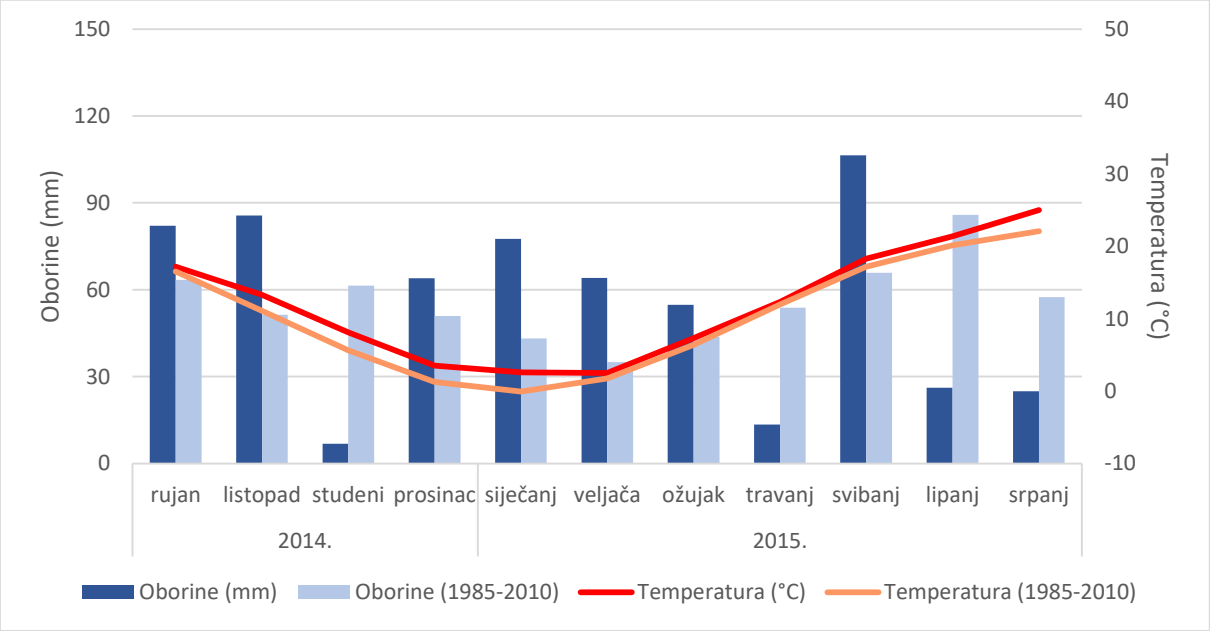
Na Grafikonu 1 može se vidjeti da su tijekom prve vegetacijske godine srednje mjesečne temperature zraka bile veće od višegodišnjeg prosjeka, izuzev zadnja tri mjeseca. U rujnu 2013. te travnju i svibnju 2014. zabilježena je znatno veća količina oborina, u odnosu na višegodišnji prosjek, dok je nedostatak oborina zabilježen u prosincu 2013. i siječnju 2014. Kroz drugu vegetacijsku godinu (Grafikon 2) srednje mjesečne temperature zraka bile su blizu ili nešto iznad vrijednosti višegodišnjeg prosjeka. Veća količina oborina zabilježena je u listopadu 2014. kao i siječnju, veljači i svibnju 2015. Nedostatak vode zabilježen je u studenom 2014., te travnju i lipnju 2015.

Na Grafikonu 3 prikazane su srednje mjesečne temperature zraka za treću vegetacijsku godinu. U trećoj godini srednje mjesečne temperature zraka kretale su se oko vrijednosti višegodišnjeg prosjeka, izuzev veljače 2016. kada su temperature bile veće za 4,7ºC od prosjeka. Veća količina oborina zabilježena je u listopadu 2015. te veljači, lipnju i srpnju 2016. Tijekom četvrte vegetacijske godine (Grafikon 4) srednje mjesečne temperature zraka veće od višegodišnjeg prosjeka (~ 2-3ºC) zabilježene su u veljači, ožujku i lipnju 2017., dok su temperature zraka niže od višegodišnjeg prosjeka zabilježene u prosincu 2016. i siječnju 2017. Znatno niža količina oborina, u odnosu na višegodišnji prosjek, zabilježena je u prosincu 2016. te siječnju i lipnju 2017.

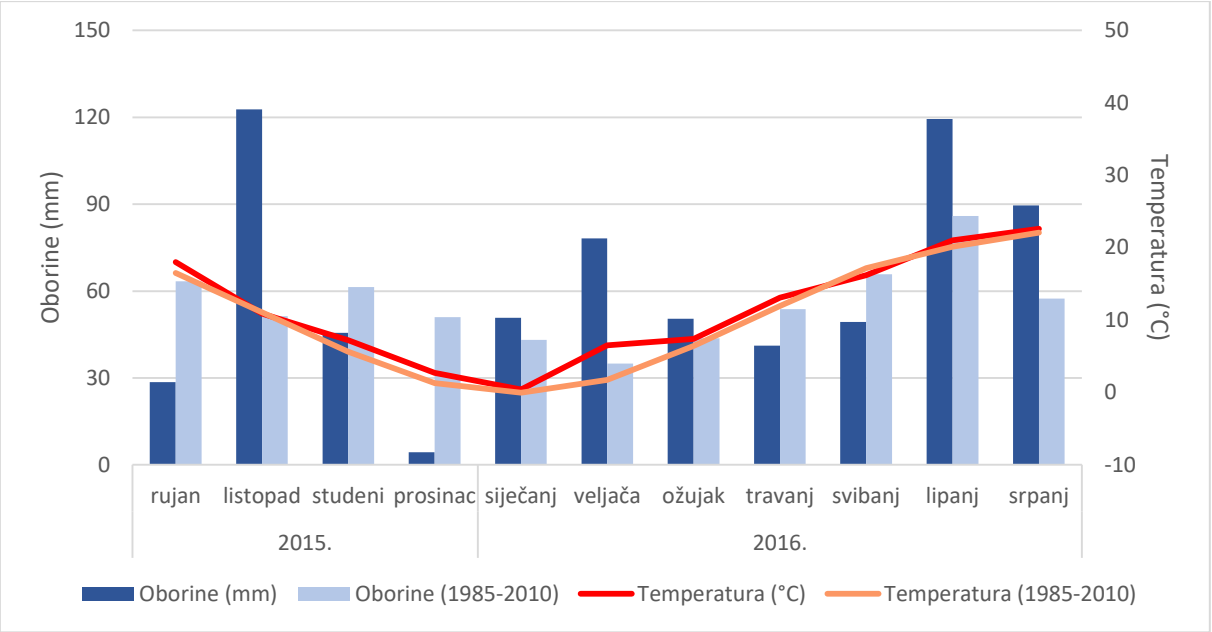
Prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda za područje Osječko – baranjske županije sve godine obuhvaćene pokusom opisane su kao ekstremno tople. Godina 2014. izdvojena je kao vrlo kišna, dok su ostale opisane kao normalno kišne do kišne (https://meteo.hr).



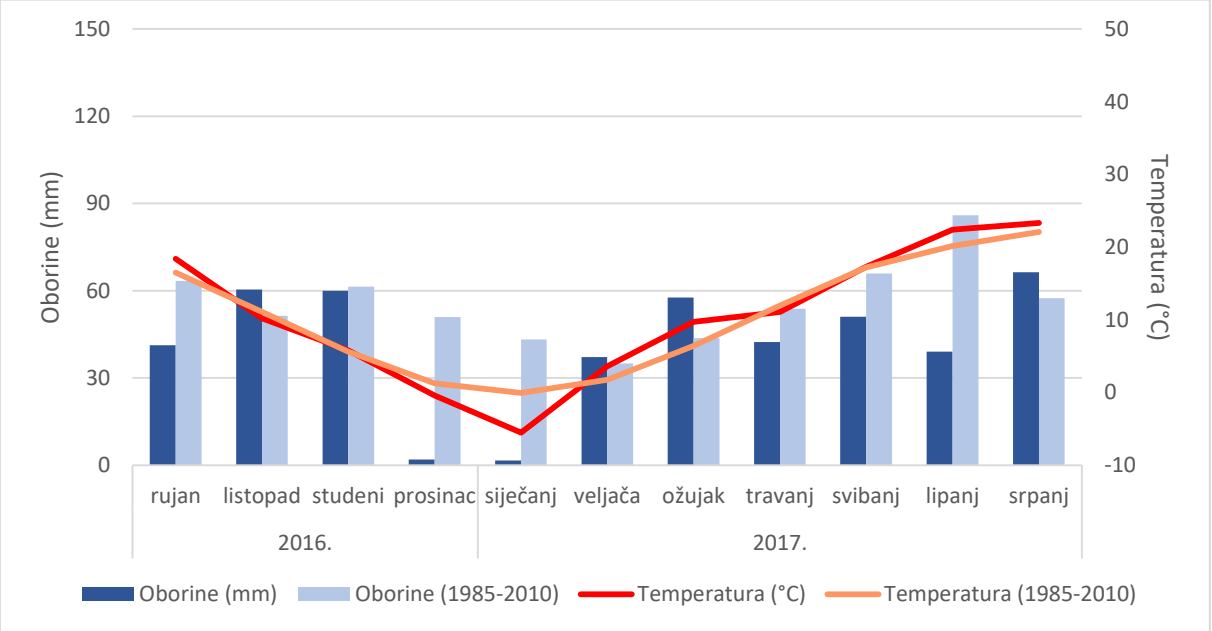
Grafikon 1. Walterov klima dijagram za 2013./2014. godinu



Grafikon 2. Walterov klima dijagram za 2014./2015. godinu



Grafikon 3. Walterov klima dijagram za 2015./2016. godinu



Grafikon 4. Walterov klima dijagram za 2016./2017. godinu

2.3. Fenotipska analiza

Tijekom četiri vegetacijske godine na ispitivanim kultivarima pšenice izmjereno je i ocjenjeno 10 morfoloških i agronomskih svojstava pšenice: osjatost, gustoća klasa, broj dana do klasanja (Brdana), visina biljke (Vis), duljina klasa (duljKL), broj klasića po klasu (BrklpoKL), broj zrna po klasu (BrZRpoKL), masa 1000 zrna (APS), masa klasa (MaKL) i prinos (PR). U polju su izmjereni visina biljke i duljina klasa, na uzorku od 25 slučajno odabranih biljaka po parceli. Broj dana do klasanja izražen je kao broj dana od 1. siječnja do datuma klasanja (50 % isklasalih biljaka na parceli). U Laboratoriju za sjemenarstvo Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek određeni su broj klasića po klasu, broj zrna po klasu i masa klasa, na uzorku od 25 ručno prikupljenih klasova po parceli. Kultivari pšenice ocjenjeni su za svojstva osjatosti i gustoće klasa prema UPOV-im smjernicama za ispitivanje različitosti, uniformnosti i stabilnosti, na uzorku od 30 ručno prikupljenih klasova (Tablica 2). Nakon žetve određeni su hektolitar i vlaga te je utvrđena masa 1000 zrna. Procjena uroda napravljena je na temelju 13 % sadržaja vlage. Ukupno je provedeno preko 100 000 pojedinačnih mjerenja.

Tablica 2. Ispitivana morfološka svojstva i ocjene prema UPOV-om tehničkom vodiču za DUS ispitivanje ozime pšenice

Br. UPOV	Svojstvo	Ocjena	Opis
12	Klas: gustoća	1	Vrlo rijedak
		3	Rijedak
		5	Srednje gust
		7	Gust
		9	Vrlo gust
14	Osje ili produžetak pljevica: prisutnost	1	Oboje odsutno
		2	Pljevice prisutne
		3	Osje prisutno

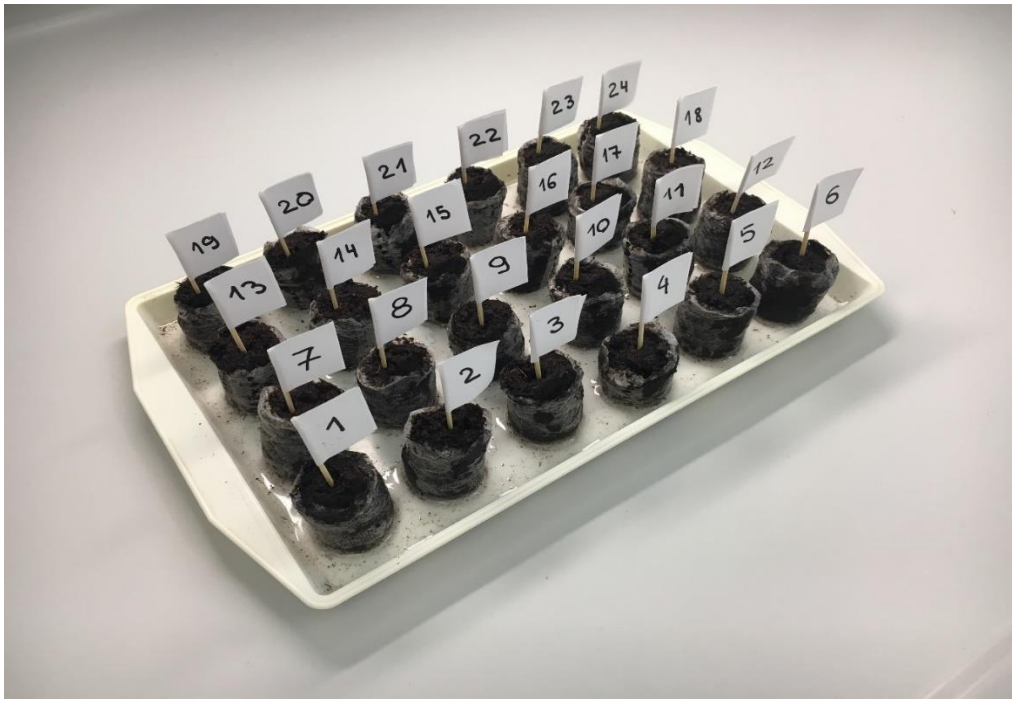
2.4. Molekularna analiza

Molekularna analiza sastojala se od izolacije genomske DNA iz 120 genotipova pšenice te analize izolirane DNA pomoću funkcionalnih markera i DArT (Diversity Arrays Technology) markera. Izolacija genomske DNA i PCR analiza provedene su u Laboratoriju za biljnu genetiku i biotehnologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, a DArT

analiza u uslužnom laboratoriju Diversity Arrays Technology Sveučilišta u Canberri (Australija).

2.4.1. Uzgoj klijanaca

Sjeme svakog kultivara pšenice posijano je u tresetne tablete (Jiffy 7, Ø 30 mm), s ciljem dobivanja listova za izolaciju DNA (Slika 2). Tresetne tablete prethodno su nakvašene vodom te su nakon ulaganja sjemena stavljene na naklijavanje u klima komoru. Klijanci su uzgajani tijekom dva tjedna te je za to vrijeme temperatura u klima komori održavana na 20°C uz svjetlosni režim 12 sati dan / 12 sati noć, uz povremeno zalijevanje. Listovi pšenice prikupljeni su u fazi dva do tri lista.

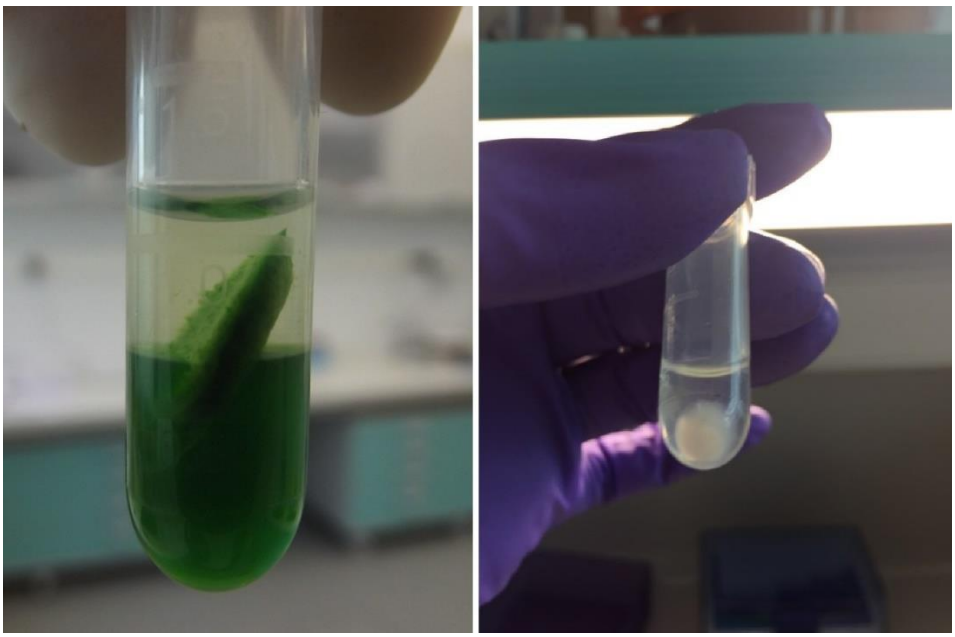


Slika 2. Tresetne tablete s naklijalim sjemenom pšenice (foto original: S. Guberac)

2.4.2. Izolacija genomske DNA

Izolacija DNA iz listova pšenice provedena je prema cetil-trimetil-amonij-bromid metodi (CTAB) (Doyle i Doyle, 1987.), modificiranoj prema Grljušić (2003.). Od svakog kultivara odvagano je oko 20 mg odrezanih listova. Odrezani listovi stavljeni su u tarionike i preliveni tekućim dušikom te pomoću tučka smrvljeni u fini prah. U svaki uzorak dodano je 1000 µl 2 % CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 Na_2EDTA pH 8.0, 5 M NaCl, 10 % SDS), prethodno zagrijanog na 65°C. Sadržaj je prenesen u tubice od 2 ml i stavljen na inkubaciju u vodenu kupelj, prethodno zagrijanu na 65°C, u trajanju 45 minuta.

Nakon inkubacije tubice su stavljene na led, gdje je u svaki uzorak dodano 670 µl kloroform izoamilnog alkohola (SEVAG). Tubice su zatim stavljene na stalak za mućkanje 30 minuta, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje uzoraka 8 minuta na brzini od 14 000 o/min. Pipetom je iz tubica izvučena vodenasta faza (oko 750 µl), koja se izdvojila centrifugiranjem te je prenešena u nove tubice od 2 ml (Slika 3, lijevo). U tubice je dodano 16 µl RNAze te su tubice stavljene na stalak za mućkanje 30 minuta. U svaku tubicu zatim je dodano 650 µl prethodno ohlađenog 0,7 V izopropanola te su tubice lagano okretane rukom dok DNA nije postala vidljiva. Uzorci su ostavljeni u izopropanolu sat vremena uz povremeno okretanje rukom. Tubice su zatim centrifugirane 1 minutu na brzini od 14 000 o/min. Nakon centrifugiranja pažljivo je izlivena tekućina iznad bijele pelete formirane na dnu tubice (Slika 3, desno). U tubice je dodano 500 µl 0,2 mM natrij acetata u 76 % etanolu te su pelete DNA prane 30 minuta laganim treskanjem. Nakon pranja tubice su ponovno centrifugirane 2 minute brzinom od 14 000 o/min te je tekućina iznad pelete ponovno izlivena. U tubice je zatim dodano 500 µl 10 mM amonij acetata u 76 % etanolu te su pelete prane 10 minuta. Nakon pranja uslijedilo je centrifugiranje 1 minutu brzinom 14 000 o/min nakon čega je izlivena tekuća faza iznad pelete. Pipetom je uklonjen preostali etanol iz tubica. Otvorene tubice ostavljene su u digestoru oko 45 min da se osuše. Nakon sušenja u tubice je dodano 100 µl 1X TE pufera, u kojem je otopljena izolirana DNA. Tubice su zatim kratko centrifugirane i pohranjene u zamrzivač na – 20°C.



Slika 3. Izdvajanje tekuće faze (lijevo), formirana DNA peleta (desno)
(foto original: S. Guberac)

2.4.3. Provjera čistoće i koncentracije DNA

Provjera čistoće i koncentracije DNA provedena je spektrofotometrijskom i elektroforetskom analizom. Čistoća izolirane DNA provjerena je mjerenjem apsorbanci otopine DNA na dvije valne duljine, 260 i 280 nm, korištenjem Varian Cary® 50 UV-Visible spektrofotometra. Otopina DNA priređena je dodavanjem 15 µl čiste DNA i 735 µl TE pufera. Čistoća izolirane DNA utvrđena je na temelju omjera apsorbanci A 260/A 280, gdje je DNA zadovoljavajuće čistoće imala vrijednosti A 260/A 280 između 1,5 i 2,0.

Koncentracija DNA (ng/µl) izračunata je iz dobivenih vrijednosti apsorbanci prema formuli:

$$[DNA] = A\ 260 * A\ 280 * 50^2$$

Koncentracija DNA provjerena je elektroforetski usporedbom s λ DNA, unaprijed poznate koncentracije. Uzorci DNA za koje je utvrđena loša kvaliteta spektrofotometrijskom ili elektoroforetskom analizom ponovno su izolirani.

Za svaki uzorak određena je potrebna količina DNA i TE pufera za pripremu radnih uzoraka prema sljedećim formulama:

$$DNA\ (\mu l) = 20/[DNA] * 50$$

$$TE\ 8.0\ (\mu l) = 50 - DNA\ (\mu l)$$

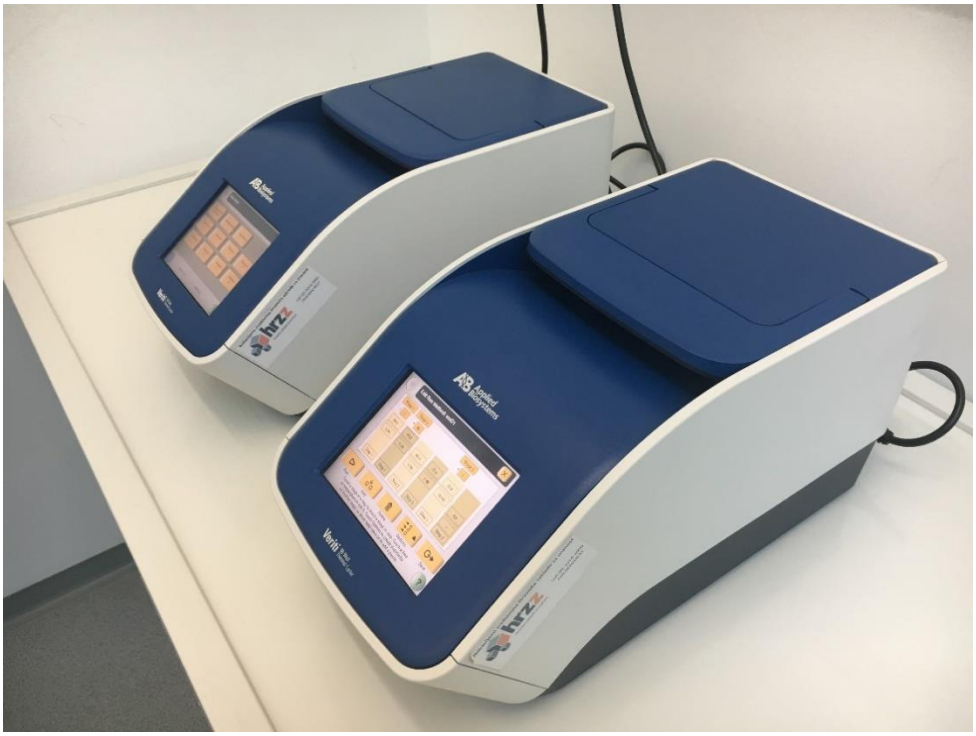
2.4.4. PCR analiza

Na izoliranim uzorcima DNA provedena je PCR (Polymerase Chain Reaction) analiza. Za provedbu analize korišteno je šest grupa funkcionalnih markera za identifikaciju Rht alela (patuljasti rast), Ppd alela (fotoperiod), Vrn alela (vernalizacija), gena povezanih s otpornošću na abiotski stres (DREB i TaAQP), gena povezanih s masom 1000 zrna (TaCwi-A1 i TaSus2-2B), te za identifikaciju prisustva 1RS translokacije pšenica-raž.

Ukupno su za PCR analizu korištena 24 para početnica. Za identifikaciju Rht alela korištena su četiri para početnica, za identifikaciju Ppd alela tri para početnica, za identifikaciju Vrn alela pet parova početnica, za identifikaciju gena povezanih s otpornošću na abiotski stres četiri para početnica, za identifikaciju gena povezanih s masom 1000 zrna četiri para

početnica te za identifikaciju prisutstva 1RS translokacije četiri para početnica. Popis svih korištenih markera i početnica s njihovim sekvencama prikazan je u Tablici 3.

Sve PCR analize provedene su korištenjem uređaja Applied Biosystems Veriti® Thermal Cycler (Slika 4). Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa kao i uvjeti za amplifikaciju pojedinih početnica određeni su na temelju podataka iz dostupnih literaturnih izvora uz određene optimizacije. Prije pripreme reakcijskih smjesa za PCR analizu napravljena su razrjeđenja oligonukleotidnih početnica prema uputama proizvođača te su priređeni radni uzorci početnica koncentracije 10 μM.



Slika 4. Uređaj za PCR analizu (foto original: S. Guberac)

Tablica 3. Svojstva parova početnica korištenih za PCR analizu

Lokus	Sekvence početnica (5'-3')	Alel(i)	Očekivani fragment (bp)	Kromosom	Tm (°C)	Referenca
Rht-B1	BF: GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG WR1: CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG	Rht-B1a	237	4BS	69 70	Ellis i sur. (2002.)
	BF: CCAGATACACAACTGCTGGC MR1: TGATCTTGAGGTTCTCGTCG	Rht-B1b	237		69 69	
Rht-D1	DF2: GGCAAGCAAAAGCTTCGCG WR2: GGCCATCTCGAGCTGCAC	Rht-D1a	264	4DS	59 61	
	DF: CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG MR2: CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA	Rht-D1b	254		65 70	
Ppd-D1	Ppd-D1_F: ACGCCTCCCACTACACTG Ppd-D1_R2: CACTGGTGGTAGCTGAGATT	Ppd-D1a	288	2DS	53 55	Beales i sur. (2007.)
	Ppd-D1_R1: GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd-D1_F: ACGCCTCCCACTACACTG	Ppd-D1b	414		51 53	
Ppd-B1	TaPpd-B1proF1:ACACTAGGGCTGGTCGAAGA TaPpd-B1int1R1:CCGAGCCAGTGCAAATTAAC	Ppd-B1a	1600	2B	60	Seki i sur. (2011.)
		Ppd-B1b	1292		58	
Vrn-A1	VRN1AF: GAAAGGAAAAATTCTGCTCG VRN1-INT1R: GCAGGAAATCGAAATCGAAG	Vrn-A1a	965 + 876	5AL	54	Yan i sur. (2004.)
		Vrn-A1b	714		56	
		Vrn-A1c	734			
		vrn-A1	734			
	Intr1/C/F: GCACTCCTAACCCACTAACC Intr1/AB/R: TCATCCATCATCAAGGCAAA	vrn-A1	1068		60 54	Fu i sur. (2005.)
Vrn-B1	Intr1/B/F: CAAGTGGAACGGTTAGGACA Intr1/B/R4: CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	vrn-B1	1149	5BL	58 57	Fu i sur. (2005.)
Vrn-D1	Intr1/D/F: GTTGTCTGCCTCATCAAATCC Intr1/D/R4: AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	vrn-D1	997	5DL	59 57	Fu i sur. (2005.)

Tablica 3. (nastavak)

Vrn-B3	VRN4-BNOINS-F: ATGCTTTCGCTTGCCATCC VRN4-BNOINS-R: CTATCCCTACCGGCCATTAG	vrn-B3	1140	7BS	57 60	Yan i sur. (2006.)
TaCwi-A1	CW122_F: GGTGATGAGTTCATGGTTAAT CW122_R: AGAAGCCCAACATTAAATCAAC	TaCwi-A1a	402	2AL	55 57	Ma i sur. (2012.)
	CW121_F: GTGGTGATGAGTTCATGGTTAAG CW121_R: AGAAGCCCAACATTAAATCAAC	TaCwi-A1b	404		61 57	
TaSus2-2B	Sus2-SNP-185: TAAGCGATGAATTATGGC Sus2-SNP-589H2: GGTGTCCTTGAGCTTCTGG	Hap-H	423	2BS	49 59	Jiang i sur. (2011.)
	Sus2-SNP-227: CTATAGTATGAGCTGGATCAATGGC Sus2-SNP-589L2: GGTGTCCTTGAGCTTCTGA	Hap-L	381		64 57	
Dreb-B1	P18F: CCCAACCCAAGTGATAATAATCT * P18R: TTGTGCTCCTCATGGGTACTT	Dreb-B1	717	3BL	56.6 58.01	Wei i sur. (2009.)
Dreb-D1	P20F: TCGTCCCTCTTCTCGCTCCAT P20R: GCGGTTGCCCCATTAGACATAG	Dreb-D1	1193	3D	63 64	
Dreb-A1	P21F: CGGAACCACTCCCTCCATCTC P21R: CGGTTGCCCCATTAGACGTAA	Dreb-A1	1113	3A	65 61	
TaAQP	Aqua/C19/S102F: ACATCAATTTTACCGTGCTTTG Aqua/C19/S102R: CAATCAATCTGCCGACTGTG	-	170	-	59.06 60.26	Pandey i sur. (2013.)
1RS translokacija	RIS_F: TAATTTCTGCTTGCTCCATGC * RIS_R: ACT GGG GTG CAC TGG ATT AG	-	110	-	56.06 59.85	Koebner (1995.)
	RYE-NOR_F: GCATGTAGCGACTAACTCATC RYE-NOR_R: CCCAGTTTTCCATGTCGC	-	400,600,800	-	59 56	Koebner (1995.)
	PAW161_F: TGAGGGCCCAGACGGCCCTTTTTG PAW161_R: TTATCGCAATTACAACTCAAATTT	-	360	-	70 55	Guidet i sur. (1991.)
	SECA2: GTTTGCTGGGGAATTATTTG /SECA3: TCCTCATCTTTGTCCTCGCC	-	412	-	54 60	Chai i sur. (2006.)

* Početnice Bio Basic Canada Inc., sve ostale početnice su proizvođača Metabion International AG

Amplifikacija svih početnica za identifikaciju Vrn alela obavljena je prema modificiranom MAS Wheat protokolu (https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Vrn/). PCR smjesa sastojala se od PCR pufera, magnezijevog klorida ($MgCl_2$), slobodnih deoksiribonukleotida (dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate), desne i lijeve početnice (F-forward, R-reverse), Taq polimeraze (izolirana iz vrste *Thermus aquaticus*), ultra čiste vode (d.d. H_20 - double-distilled H_20) te genomske DNA. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa bili su jednaki za sve Vrn početnice i navedeni su u Tablici 4.

Tablica 4. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju Vrn početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			8,635 µl
Ukupno			15 µl

Amplifikacija svih početnica za identifikaciju Rht alela obavljena je prema modificiranom MAS Wheat protokolu (https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Dwarf/). Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa bili su jednaki za parove početnica BF i WR1, BF i MR1 te DF i MR2 i prikazani su u Tablici 5, dok su koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za DF2 i WR2 prikazani u Tablici 6.

Tablica 5. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju BF i WR1, BF i MR1 te DF i MR2 početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	2 mM	0,8 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
F – početnica	10 µM	0,5 µM	0,5 µl
R – početnica	10 µM	0,5 µM	0,5 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			3,95 µl
Ukupno			10 µl

Tablica 6. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju DF2 i WR2 početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	2 mM	0,8 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
F – početnica	10 µM	1,0 µM	1 µl
R – početnica	10 µM	1,0 µM	1 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,065 U/µl	0,13 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2
d.d. H_20			2,87 µl
Ukupno			10 µl

Amplifikacija TaPpd-B1proF1 i TaPpd-B1int1R1 početnica, za identifikaciju Ppd-B1 alela, obavljena je prema protokolu Seki i sur. (2011.), uz određene modifikacije. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za navedene početnice prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju TaPpd-B1proF1 i TaPpd-B1int1R1 početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			8,635 µl
Ukupno			15 µl

Amplifikacija parova početnica Ppd-D1_F i Ppd-D1_R1 te Ppd-D1_F i Ppd-D1_R2, za identifikaciju Ppd-D1 alela, obavljena je prema modificiranom MAS Wheat protokolu (https://maswheat.ucdavis.edu/protocols). Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za navedene početnice prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju Ppd-D1_F i Ppd-D1_R1 te Ppd-D1_F i Ppd-D1_R2 početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	10 x	1 x	1,5 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,4 mM	0,84 µl
dNTP	2,5 mM	0,02 mM	0,12 µl
F – početnica	10 µM	0,07 µM	0,105 µl
R – početnica	10 µM	0,07 µM	0,105 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,04 U/µl	0,12 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			10,21 µl
Ukupno			15 µl

Amplifikacija početnica za identifikaciju DREB alela obavljena je prema protokolu Huseynova i Rustanova (2010.), uz određene modifikacije. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za parove početnica P18F i P18R te P20F i P20R navedeni su u Tablici 9, a za P21F i P21R u Tablici 10.

Amplifikacija početnica za identifikaciju prisutstva 1RS translokacije obavljena je prema modificiranom MAS Wheat protokolu (https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Drought/) za RIS i RYE-NOR parove početnica, te prema protokolu Chai i sur. (2006.) za SECA2 i /SECA3 par početnica. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju RIS i RYE-NOR parova početnica prikazani su u Tablici 11, a za SECA2 i /SECA3 par početnica u Tablici 12.

Tablica 9. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju P18F i P18R te P20F i P20R početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			8,635 µl
Ukupno			15 µl

Tablica 10. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju P21F i P21R početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	10 x	1 x	1 µl
$MgCl_2$	25 mM	4 mM	1,6 µl
dNTP	2,5 mM	0,45 mM	1,8 µl
F – početnica	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
R – početnica	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,08 U/µl	0,16 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			2,94 µl
Ukupno			10 µl

Tablica 11. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju RIS i RYE-NOR parova početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			8,635 µl
Ukupno			15 µl

Tablica 12. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju SECA2 i /SECA3 para početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	1 x	3 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,15 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			8,635 µl
Ukupno			15 µl

Amplifikacija CW122_F i CW122_R te CW121_F i CW121_R parova početnica obavljena je prema protokolu Ma i sur. (2012.), uz određene modifikacije. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za navedene parove početnica prikazani su u Tablici 13.

Amplifikacija Sus2-SNP-185 i Sus2-SNP-589H2, kao i Sus2-SNP-227 i Sus2-SNP-589L2 parova početnica obavljena je prema protokolu Gao i sur. (2015.), a koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za navedene parove početnica prikazani su u Tablici 14.

Tablica 13. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju CW122_F i CW122_R te CW121_F i CW121_R parova početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	10 x	1 x	1,5 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9 µl
dNTP	2,5 mM	0,1 mM	0,6 µl
F – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
R – početnica	10 µM	0,08 µM	0,12 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,025 U/µl	0,075 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			9,685 µl
Ukupno			15 µl

Tablica 14. Koncentracije i volumeni reakcijskih smjesa za amplifikaciju Sus2-SNP-185 i Sus2-SNP-589H2 te Sus2-SNP-227 i Sus2-SNP-589L2 parova početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	10 x	1 x	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
dNTP	2,5 mM	0,25 mM	2 µl
F – početnica	10 µM	0,5 µM	1 µl
R – početnica	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			10,6 µl
Ukupno			20 µl

Amplifikacija Aqua/C19/S102F i Aqua/C19/S102R početnica obavljena je prema protokolu Padney i sur. (2013.). Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za navedeni par početnica prikazani su u Tablici 15.

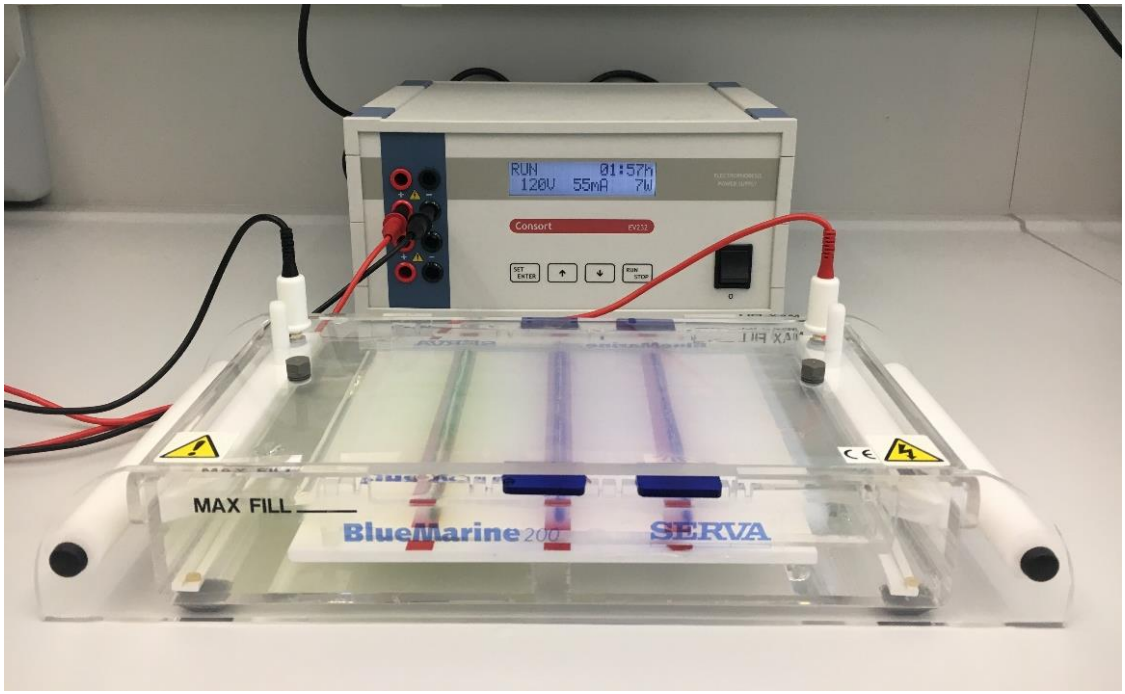
Tablica 15. Koncentracije i volumeni reakcijske smjese za amplifikaciju Aqua/C19/S102F i Aqua/C19/S102R para početnica

Reakcijska smjesa	**Koncentracija**		**Volumen po reakciji**
	Ishodišna	Radna	
PCR pufer	5 x	0,5 x	4 µl
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,4 µl
F – početnica	10 µM	0,2 µM	0,4 µl
R – početnica	10 µM	0,2 µM	0,4 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,04 U/µl	0,16 µl
Genomska DNA		50 - 100 ng/µl	2 µl
d.d. H_20			11,44 µl
Ukupno			20 µl

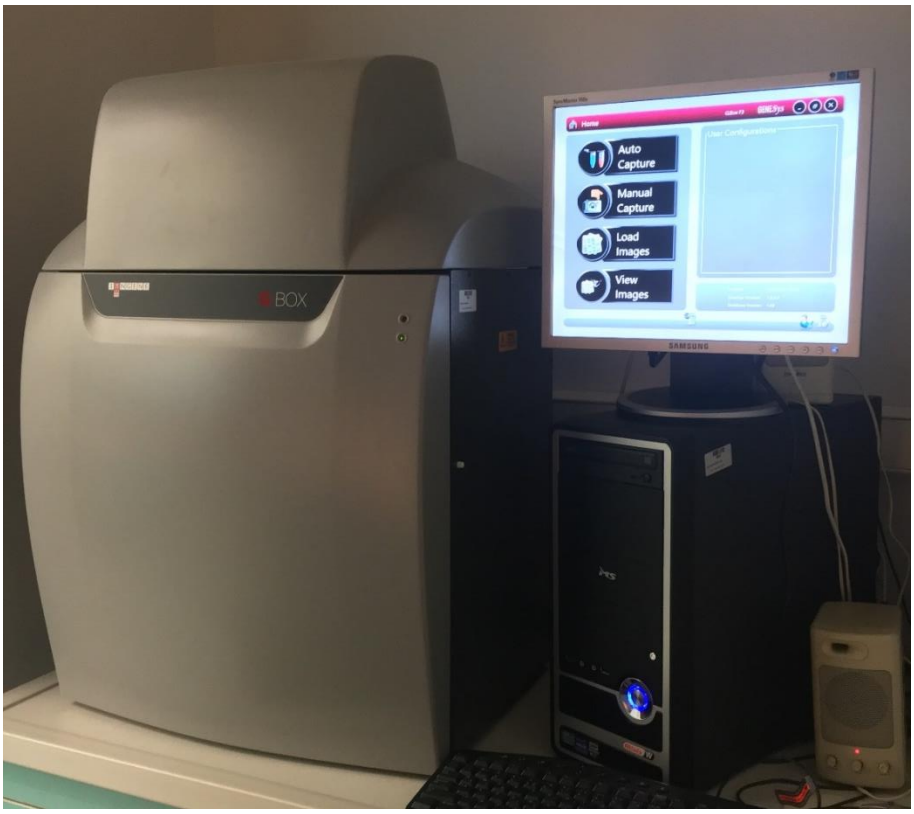
2.4.5. Elektroforeza i očitavanje rezultata

Nakon provedene PCR analize produkti amplifikacije nanešeni su na agarozni gel postavljen u uređaj za horizontalnu elektoroforezu. Za elektroforezu je korišten uređaj BlueMarine™ 200 Serva (Slika 5). Pripremljen je gel veličine 15x20 cm i debljine 1 cm. Postotak gela ovisio je o veličini očekivanih produkata te je tako za manje produkte pripremljen 2 % gel, a za one veće 1 %. Kao standard za utvrđivanje veličine fragmenata PCR produkata korištene su DNA ljestve BenchTop 100bp DNA Ladder, Promega.

Nakon završene elektroforeze agarozni gel s PCR produktima slikan je pomoću Syngene® G:BOX F3 uređaja za snimanje, koji u sebi ima ugrađenu kameru rezolucije 3.8 megapixela i GeneSys softver (Slika 6). Rezultati su očitani pomoću Syngene® programa GeneTools, kompatibilnim s GeneSys softverom ver. 1.4.1.0.



Slika 5. Uređaj za horizontalnu elektoroforezu (foto original: S. Guberac)



Slika 6. Uređaj za fluorescentno slikanje gela (foto original: S. Guberac)

2.4.6. DArTseq analiza

Izolirani uzorci DNA poslani su u uslužni laboratorij Diversity Arrays Technology Sveučilišta u Canberri (Australija) radi analize sa DArT markerima. Uzorci za slanje pakirani su u ploče sa 96 slobodnih mjesta od čega su uzorcima popunjavana 94 mjesta. Svaki uzorak sastojao se od 20 µl DNA u TE puferu, minimalne koncentracije 50-100 ng/µl. U laboratoriju su uzorci DNA analizirani DArTseq metodom kojom se izvodi sekvencioniranje na NGS (Next Generation Sequencing) platformi sa 2 500 DArT markera. DArTseq analizom dobivene su dvije vrste podataka - podatci o prisutnosti/odsutnosti (dominantnih) markera i podatci o SNP-ovima fragmenata prisutnih u uzorcima.

2.5. Statistička obrada podataka

Fenotipski podatci statistički su obrađeni korištenjem programa SAS® Enterprise Guide 7.1. Analiza podataka obuhvaćala je izračunavanje mjera opisne statistike, provedbu analize varijance (ANOVA) te korelacijsku i regresijsku analizu. Za one varijable kod kojih je utvrđen statistički značajan utjecaj nekog od ispitivanih faktora proveden je i Post hoc test Tukey-Kramer. Path analiza provedena je radi utvrđivanja direktnih i indirektnih veza između varijabli.

Za konverziju podataka dobivenih DArTseq analizom korišten je program PEAS ver 1.0 (Xu i sur., 2010.), a za izračun LD-a PLINK ver 1.9. (Purcell i sur., 2007.).

Molekularni podatci analizirani su pomoću programa POWERMARKER (Liu, 2002.), kojim su dobivene informacije o polimorfizmu korištenih molekularnih markera: ukupni i prosječni broj alela po markeru (Na), sadržaj polimorfnih informacija (PIC) i genetska raznolikost (He) ili očekivana heterozigotnost (Nei, 1973.).

Analiza molekularne varijance (AMOVA) provedena je na temelju geografske udaljenosti kultivara, primjenom programa Arlequin ver 3.5. (Excoffier i Lischer, 2010.). Regije su podijeljene u tri zone (Europa, Ostali svijet i Panonija).

Struktura populacije analizirana je primjenom programa STRUCTURE ver. 2.3.3. (Pritchard i sur., 2000.). Najvjerovatniji broj grupa K određen je prema metodi Evanno i sur. (2005.) i analiziran u opsegu vrijednosti K od 1 do 11. Napravljeno je 30 prohoda za svaku od 11 zadanih K vrijednosti na računalnom klasteru Isabella (Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računski centar). Burn-in period postavljen je na 200 000 koraka, a broj MCMC iteracija na 10^6. Za

provedbu Evanno metode korišten je program STRUCTURE HARVESTER ver. 0.6.92 (Earl, 2012.). Rezultati prohoda analizirani su i vizualizirani pomoću programa CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015.).

Klaster-analiza provedena je primjenom algoritma Neighbour – Joining (NJ) na temelju matrice genetskih udaljenosti (Shared Alleles Distance), u programu MEGA ver. 6.06.

Asocijativna analiza provedena je korištenjem programa TASSEL ver 3.0. (Bradbury i sur., 2007.). Za analizu su korištena dva modela, opći linearni model (GLM – General Linear Model) i mješoviti linearni model (MLM – Mixed Linear Model). Kod GLM modela kao ulazne varijable korišteni su genotipski podatci dobiveni analizom s DArT i funkcionalnim markerima, fenotipski podatci iz četiri vegetacijske godine te struktura populacije (Q matrica). Kod MLM modela pored ranije navedenoga korištena je i matrica srodnosti (K).

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Fenotipska analiza

3.1.1. Opisna statistika

Za svako od ispitivanih agronomskih svojstava pšenice izračunate su mjere opisne statistike primjenom programa SAS® Enterprise Guide 7.1 (Tablica 16).

Tablica 16. Mjere opisne statistike za ispitivana agronomska svojstva pšenice za četiri godine ispitivanja (n = 480)

Svojstvo	Minimum	Maksimum	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Visina biljke (cm)	62,00	151,32	100,22	15,94	15,90
Duljina klasa (cm)	5,92	16,77	9,01	1,47	16,34
Broj klasića/klas	12,32	23,88	17,58	1,88	10,67
Broj zrna/klas	18,04	78,00	42,37	8,56	20,19
Masa klasa (g)	0,65	4,14	2,34	0,55	23,30
Masa 1000 zrna (g)	27,30	62,80	45,06	5,39	11,95
Dani do klasanja	107,00	148,00	127,27	7,58	5,95
Prinos (t/ha)	1,62	10,61	7,08	1,82	25,67

Među ispitivanim agronomskim svojstvima najmanji koeficijent varijacije zabilježen je za svojstvo broja dana do klasanja (5,95 %), a najveći za svojstvo prinosa (25,67 %).

Visina biljke kretala se od 62 cm kod kultivara Srpanjka u 2014./2015. godini, do 151,32 cm kod kultivara U1 u 2015./2016. godini. Najmanja duljina klasa (5,92 cm) zabilježena je kod kultivara Magnif 41 u 2015./2016. godini, a najveća duljina klasa (16,77 cm) kod kultivara Mara u 2014./2015. godini. Broj klasića po klasu kretao se od 12,32 kod kultivara Bastide u 2013./2014. godini do 23,88 kod kultivara Mara u 2016./2017. godini. Najmanji broj zrna po klasu i najmanja masa klasa zabilježeni su u 2015./2016. godini kod kultivara Magnif 41, a najveći broj zrna po klasu i najveća masa klasa u 2016./2017. godini kod kultivara Rialto. Masa 1000 zrna kretala se od 27,3 g kod kultivara Magnif 41 do 62,8 g kod kultivara Mv-Toborzo u 2015./2016. godini. Najmanji prinos zrna zabilježen je u 2013./2014. godini kod kultivara Saitama 27 (1,62 t/ha), a najveći u 2016./2017. kod kultivara Gala (10,6 t/ha). Broj dana do

klasanja kretao se od 107 dana kod kultivara Saitama u 2013./2014., do 148 dana kod kultivara Hira u 2015./2016. godini.

Što se tiče morfoloških svojstava, ocjena gustoće klasa kretala se od 1 do 9, gdje je ocjena 1 zabilježena samo kod kultivara Bankuty 1205, a ocjena 9 kod kultivara Ai-Bian1. Ocjenu gustoće klasa 3 imalo je 15,83 % ispitivanih kultivara, ocjenu 5 njih 21,66 %, a ocjenu 7 njih 6,66 %. Najveći broj kultivara, njih 47,5 %, imao je prijelaznu ocjenu gustoće klasa 4. Ocjena osjatosti klasa kretala se od 1 do 3. Najveći broj kultivara imao je ocjenu osjatosti klasa 2 (62,5 %), ocjenu 3 imalo je 35,83 % ispitivanih kultivara, dok su ocjenu 1 imali samo kultivari Chinese Spring i Magnif 41. Između vegetacijskih godina nisu postajale razlike u pogledu ocjena gustoće i osjatosti klasa, s obzirom da se radi o sortnim karakteristikama.

3.1.2. Analiza varijance

Analiza varijance provedena je korištenjem mješovitog modela za efekt godine pokusa, geografske regije i godine priznavanja.

Iz Tablice 17 vidljivo je da je analizom varijance utvrđen statistički značajan utjecaj godine pokusa na sva ispitivana agronomska svojstva pšenice.

Tablica 17. Analiza varijance (mješoviti model) za ispitivane godine pokusa

Svojstvo	Efekt	DF	Den DF	F	Pr > F
Visina biljke (cm)	god.pokusa	3	476	12,79	<,0001
Duljina klasa (cm)	god.pokusa	3	476	6,9	0,0001
Broj klasića/klas	god.pokusa	3	476	29,77	<,0001
Broj zrna/klas	god.pokusa	3	476	36,68	<,0001
Masa klasa (g)	god.pokusa	3	476	61,3	<,0001
Masa 1000 zrna (g)	god.pokusa	3	476	19,2	<,0001
Dani do klasanja	god.pokusa	3	476	136,81	<,0001
Prinos (t/ha)	god.pokusa	3	476	136,81	<,0001

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj geografske regije na visinu biljke, duljinu klasa, masu 1000 zrna, gustoću klasa, broj dana do klasanja i prinos, kao i statistički značajan utjecaj geografske regije na broj klasića po klasu, masu klasa i osjatost. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj geografske regije na broj zrna po klasu (Tablica 18).

Tablica 18. Analiza varijance (mješoviti model) za ispitivane geografske regije pšenice

Svojstvo	Efekt	DF	Den DF	F	Pr > F
Visina biljke (cm)	geog. regija	7	472	12,57	<,0001
Duljina klasa (cm)	geog. regija	7	472	4,12	0,0002
Broj klasića/klas	geog. regija	7	472	2,06	0,0465
Broj zrna/klas	geog. regija	7	472	0,79	0,5921
Masa klasa (g)	geog. regija	7	472	2,47	0,0169
Masa 1000 zrna (g)	geog. regija	7	472	4,75	<,0001
Prinos (t/ha)	geog. regija	7	472	6,57	<,0001
Dani do klasanja	geog. regija	7	472	11,39	<,0001
Gustoća klasa	geog. regija	7	472	8,30	<,0001
Osjatost	geog. regija	7	472	4,14	0,0002

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj godine priznavanja na visinu biljke, broj zrna po klasu, masu klasa, gustoću klasa i prinos, kao i statistički značajan utjecaj godine priznavanja na duljinu klasa i masu 1000 zrna. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj godine priznavanja na broj klasića po klasu, broj dana do klasanja i osjatost (Tablica 19).

Tablica 19. Analiza varijance (mješoviti model) za ispitivana razdoblja priznavanja pšenice

Svojstvo	Efekt	DF	Den DF	F	Pr > F
Visina biljke (cm)	god.prizn.	3	476	35,81	<,0001
Duljina klasa (cm)	god.prizn.	3	476	2,7	0,045
Broj klasića/klas	god.prizn.	3	476	1,01	0,3878
Broj zrna/klas	god.prizn.	3	476	10,94	<,0001
Masa klasa (g)	god.prizn.	3	476	9,04	<,0001
Masa 1000 zrna (g)	god.prizn.	3	476	3,64	0,0129
Prinos (t/ha)	god.prizn.	3	476	30,4	<,0001
Dani do klasanja	god.prizn.	3	476	0,36	0,7836
Gustoća klasa	god.prizn.	3	476	11,6	<,0001
Osjatost	god.prizn.	3	476	0,44	0,7236

3.1.3. Korelacijska analiza agronomskih svojstava

Za utvrđivanje veza između ispitivanih agronomskih svojstava pšenice korišten je Pearsonov koeficijent korelacije, a jačina veza određena je na temelju skale koju je predložio Evans (1996.):

- Vrlo slaba korelacija → r = 0,00 – 0,19
- Slaba korelacija → r = 0,20 – 0,39
- Srednja korelacija → r = 0,40 – 0,59
- Jaka korelacija → r = 0,60 – 0,79
- Vrlo jaka korelacija → r = 0,80 – 1,00

Visina biljke bila je u vrlo slaboj ili slaboj korelaciji s ostalim ispitivanim svojstvima, gdje je najveću pozitivnu korelaciju imala s duljinom klasa, a najveću negativnu korelaciju s prinosom. Duljina klasa je bila u srednje jakoj pozitivnoj korelaciji s brojem klasića po klasu te slaboj pozitivnoj korelaciji s visinom biljke (Tablica 20).

Broj klasića po klasu bio je u srednje jakoj pozitivnoj korelaciji s duljinom klasa, brojem zrna po klasu i masom klasa. Broj zrna po klasu bio je u jakoj pozitivnoj korelaciji s masom klasa te srednje jakom pozitivnom korelacijom s brojem klasića po klasu. Također, broj zrna po klasu bio je u slaboj pozitivnoj korelaciji s prinosom i slaboj negativnoj korelaciji s visinom biljke (Tablica 20).

Masa klasa bila je u jakoj pozitivnoj korelaciji s brojem zrna po klasu, srednje jakoj pozitivnoj korelaciji s brojem klasića po klasu i prinosom, slaboj korelaciji s masom 1000 zrna, te vrlo slaboj korelaciji s duljinom klasa i brojem dana do klasanja. Masa 1000 zrna bila je u vrlo slaboj ili slaboj korelaciji s ostalim ispitivanim svojstvima, gdje je najveću pozitivnu korelaciju imala s masom klasa i prinosom, a negativnu korelaciju s brojem klasića po klasu (Tablica 20).

Prinos je bio u srednje jakoj pozitivnoj korelaciji s masom klasa te slaboj pozitivnoj korelaciji s brojem zrna po klasu, masom 1000 zrna i brojem dana do klasanja. S druge strane, prinos je bio u slaboj negativnoj korelaciji s visinom biljke te vrlo slaboj negativnoj korelaciji s duljinom klasa (Tablica 20).

Broj dana do klasanja bio je u slaboj pozitivnoj korelaciji s visinom biljke i prinosom te vrlo slaboj pozitivnoj korelaciji s duljinom klasa, masom klasa i masom 1000 zrna (Tablica 20).

Gustoća klasa bila je u slaboj negativnoj korelaciji s visinom, duljinom klasa i brojem dana do klasanja te vrlo slaboj pozitivnoj korelaciji s brojem zrna po klasu i prinosom. Osjatost je bila u slaboj negativnoj korelaciji s brojem klasića po klasu, vrlo slaboj negativnoj korelaciji s brojem zrna po klasu i vrlo slaboj pozitivnoj korelaciji s masom 1000 zrna i visinom (Tablica 20).

Najveći broj korelacija između ispitivanih svojstava je bio vrlo slab ili slab. Najjača korelacija je utvrđena između mase klasa i broja zrna po klasu ($r = 0,79$; $n = 480$; $p < 0,001$) te između broja zrna po klasu i broja klasića po klasu ($r = 0,57$; $n = 480$; $p < 0,001$).

Tablica 20. Pearsonovi koeficijenti korelacije za ispitivana agronomska svojstva pšenice za četiri godine ispitivanja (n = 480)

	Visina	**Duljina klasa**	**Broj klasića po klasu**	**Broj zrna po klasu**	**Masa klasa**	**Masa 1000 zrna**	**Prinos**	**Broj dana do klasanja**
Visina	1							
Duljina klasa	0,37 ***	1						
Broj klasića po klasu	0,10 *	0,43 ***	1					
Broj zrna po klasu	-0,27 ***	0,17 ***	0,58 ***	1				
Masa klasa	-0,09 n.s.	0,19 ***	0,43 ***	0,80 ***	1			
Masa 1000 zrna	0,12 **	0,04 n.s.	-0,14 **	-0,07 n.s.	0,37 ***	1		
Prinos	-0,32 ***	-0,14 **	-0,06 n.s.	0,37 ***	0,48 ***	0,34 ***	1	
Broj dana do klasanja	0,28 ***	0,16 ***	0,08 n.s.	0,03 n.s.	0,14 **	0,18 ***	0,35 ***	1

n.s. – nije statistički značajno, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.1.4. Regresijska analiza agronomskih svojstava

Regresijskom analizom ispitivana je zavisnost prinosa pšenice (zavisna varijabla) o ostalim agronomskim svojstvima (nezavisne varijable). Regresijski model dobiven je primjenom metode izbora varijabli tzv. *stepwis*e regresije, za svaku godinu pokusa pojedinačno. Kao kriterij za određivanje modela korišten je Bayesov (BIC) kriterij. U nastavku su prikazani modeli za svaku godinu pokusa pojedinačno.

2013./2014.

PR = - 0,112 + (- 0,047 * **Vis**) + (- 0,117 * **BrklpoKL**) + 0,107 * **BrZRpoKL** + 0,081 * **APS** + 0,036 * **Brdana**

2014./2015.

PR = 4,977 + (- 0,031 * **Vis**) + 0,088 * **BrZRpoKL** + (- 1,009 * **MaKL**) + 0,097 * **APS**

2015./2016.

PR = 5,844 + (- 0,020 * **Vis**) + 0,018 * **BrZRpoKL** + 0,491 * **MaKL** + 0,042 * **APS**

2016./2017.

PR = - 0,471 + (- 0,031 * **Vis**) + 0,918 * **MaKL** + 0,035 * **APS** + 0,057 * **Brdana**

PR-prinos, **Vis** – visina, **BrZRpoKL** – broj zrna po klasu, **BrklpoKL** –broj klasića po klasu, **MaKL** – masa klasa, **Brdana** – broj dana do klasanja, **APS** – masa 1000 zrna

R^2 vrijednosti dobivenih regresijskih modela bile su niske. Najveću vrijednost imao je regresijski model prve godine pokusa (R^2 = 0,47). Regresijski model druge godine pokusa ima je vrijednost R^2 = 0,31, treće godine pokusa vrijednost R^2 = 0,23, a četvrte godine pokusa vrijednost R^2 = 0,29.

Svojstva koja su se najčešće pojavljivala u regresijskim modelima su visina biljke i masa 1000 zrna (sve 4 godine), te masa klasa i broj zrna po klasu (3 godine). Udio u varijabilnosti prinosa, koji su objašnjavala navedena svojstva, kretao se do 25 % za svojstvo broja zrna po

klasu (u prvoj godini pokusa), do 20 % za svojstvo visine (u drugoj godini pokusa), do 15 % za svojstvo mase klasa (u zadnjoj godini pokusa) te 10 % za svojstvo mase 1000 zrna (u prvoj godini pokusa).

3.1.5. Path koeficijent analiza agronomskih svojstava

Path analizom ispitivani su direktni i indirektni utjecaji nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu (prinos). Rezultati analize prikazani su u Tablici 21. Utvrđeno je da najveći direktan pozitivan utjecaj na prinos pšenice ima masa klasa (0,34), a slijede ju broj zrna po klasu (0,31) i masa 1000 zrna (0,15), dok je broj klasića po klasu imao direktan negativni utjecaj na prinos pšenice (-0,34).

Najveći indirektan pozitivan utjecaj na prinos pšenice imao je broj zrna po klasu preko mase klasa (0,25). Masa 1000 zrna i masa klasa imale su indirektan pozitivan utjecaj na prinos pšenice preko broja zrna po klasu (0,23). Broj klasića po klasu imao je indirektan pozitivan utjecaj na prinos pšenice preko broja zrna po klasu. Masa 1000 zrna imala je indirektan pozitivan utjecaj na prinos pšenice preko mase klasa. Najmanji indirektan pozitivan utjecaj na prinos pšenice imali su broj klasića po klasu preko mase klasa, masa klasa preko mase 1000 zrna i masa 1000 zrna preko broja klasića po klasu.

Najveći indirektan negativni utjecaj na prinos pšenice imao je broj zrna po klasu preko broja klasića po klasu (-0,19). Najmanji indirektan negativan utjecaj na prinos pšenice imali su broj zrna po klasu preko mase 1000 zrna, masa klasa preko broja klasića po klasu i broj klasića po klasu preko mase 1000 zrna.

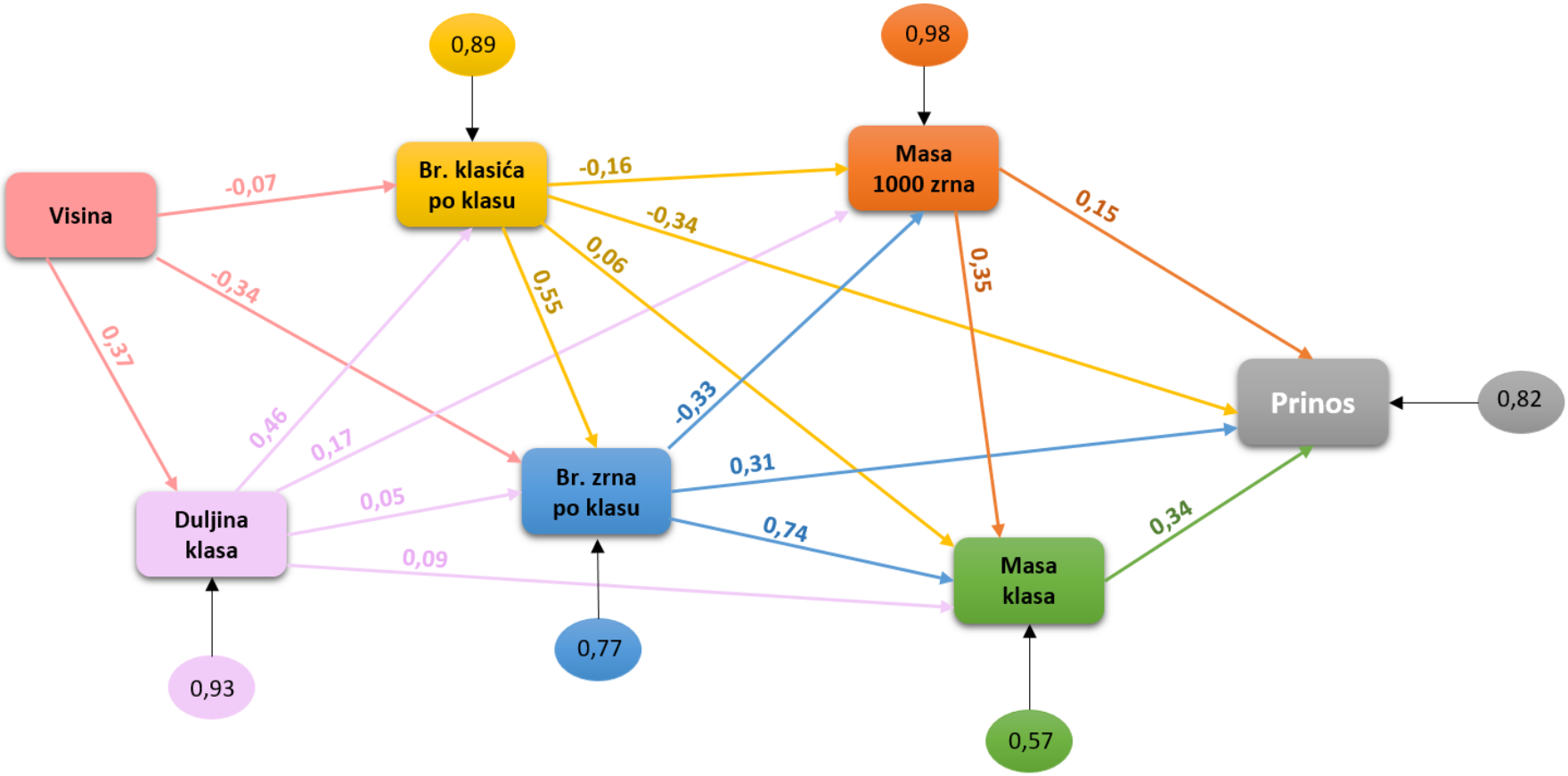
Tablica 21. Path analiza za svojstvo prinosa pšenice

Svojstvo	**Direktan utjecaj**	**Indirektan utjecaj preko**			
		BrklpoKL	BrZRpoKL	APS	MaKL
BrklpoKL	-0,340**	-	0,169	-0,023	0,021
BrZRpoKL	0,308**	-0,187	-	-0,005	0,250
APS	0,145**	0,055	0,227	-	0,118
MaKL	0,339**	-0,022	0,227	0,051	-

Analizom su utvrđeni i direktni utjecaji između pojedinih komponenti prinosa (Grafikon 5).

Visina je imala direktan pozitivan utjecaj na duljinu klasa i direktan negativan utjecaj na broj zrna po klasu i broj klasića po klasu. Duljina klasa je imala direktan pozitivan utjecaj na broj klasića po klasu, masu 1000 zrna, masu klasa i broj zrna po klasu.
Broj klasića po klasu imao je direktan pozitivan utjecaj na broj zrna po klasu i masu klasa te direktan negativni utjecaj na masu 1000 zrna. Broj zrna po klasu imao je direktan pozitivan utjecaj na masu klasa i direktan negativni utjecaj na masu 1000 zrna.
Masa 1000 zrna imala je direktan pozitivan utjecaj na masu klasa. Masa klasa nije imala direktan utjecaj na ostale komponente prinosa.

Najveći direktan pozitivan utjecaj imao je broj zrna po klasu na masu klasa (0,74), zatim broj klasića po klasu na broj zrna po klasu (0,55) i duljina klasa na broj klasića po klasu (0,46). Najveći direktan negativan utjecaj imala je visina na broj zrna po klasu (-0,34) te broj zrna po klasu na masu 1000 zrna (-0,33).



Grafikon 5. Path dijagram s prikazom direktnih utjecaja između ispitivanih agronomskih svojstava (kružićima su prikazane vrijednosti efekta pogreške)

3.2. Molekularna analiza

3.2.1. PCR analiza

Na temelju rezultata PCR analize izračunata je distribucija alela na ispitivanim lokusima pšenice (Tablica 22).

Analizom je utvrđeno da je na Rht-B1 lokusu kod 47 % ispitivanih kultivara pšenice bio prisutan Rht-B1a alel (divlji tip), a kod njih 45 % Rht-B1b alel (patuljasti tip). Na Rht-D1 lokusu kod najvećeg broja kultivara (84 %) bio je prisutan divlji tip alela, Rht-D1a, dok je 11 % kultivara imalo patuljasti tip alela, Rht-D1b.

Na Ppd-B1 lokusu najveći broj kultivara (97 %) imao je Ppd-B1b alel (osjetljivost na fotoperiod), dok prisutnost Ppd-B1a alela (neosjetljivost na fotoperiod) nije utvrđena kod ispitivanih kultivara pšenice. Na Ppd-D1 lokusu utvrđena je prisutnost Ppd-D1a alela kod 63 % ispitivanih kultivara pšenice te Ppd-D1b alela kod njih 23 %.

Kod većine ispitivanih kultivara pšenice (88 %) na Vrn-A1 lokusu utvrđena je prisutnost recesivnog alela vrn-A1, a koji uvjetuje razvoj ozimih formi pšenice. Dominantni aleli Vrn-A1a i Vrn-B1b/c bili su zastupljeni redom s 5 % i 8 %. Na lokusima Vrn-B1, Vrn-B3 i Vrn-D1 utvrđena je prisutnost recesivnih alela (vrn-B1, vrn-B3 i vrn-D1) od redom 92 %, 96 % i 94 %.

Na TaCwi-A1 lokusu najveći broj kultivara (75 %) imao je TaCwi-A1a alel (povezan s povećanom masom 1000 zrna), a 25 % kultivara TaCwi-A1b alel (povezan sa smanjenom masom 1000 zrna). S druge strane na TaSus2-2B lokusu kod 71 % kultivara utvrđena je prisutnost Hap-L haplotipa (povezan sa smanjenom masom 1000 zrna), dok je kod svega 1 % kultivara utvrđena prisutnost Hap-H haplotipa (povezan s povećanom masom 1000 zrna).

Na DREB lokusima, Dreb-B1, Dreb-D1 i Dreb-A1, produkti amplifikacije bili su prisutni kod redom 35 %, 96 % i 78 % ispitivanih kultivara pšenice. Na TaAQP lokusu produkti amplifikacije bili su prisutni kod 22 % ispitivanih kultivara pšenice.

Prisutnost 1RS translokacije ispitivana je pomoću četiri različita para početnica, RYE-NOR, RIS, PAW 161 i SEC A2/A3, kojima je prisutnost translokacije utvrđena kod redom 8 %, 19 %, 17 % i 14 % ispitivanih kultivara pšenice.

Tablica 22. Distribucija alela na ispitivanim lokusima pšenice

Lokus	Alel	Frekvencija
Rht-B1	Rht-B1a	0,47
	Rht-B1b	0,45
Rht-D1	Rht-D1a	0,84
	Rht-D1b	0,11
Ppd-B1	Ppd-B1a	0,00
	Ppd-B1b	0,97
Ppd-D1	Ppd-D1a	0,63
	Ppd-D1b	0,23
Vrn-A1	Vrn-A1a	0,05
	Vrn-A1b,c	0,08
	vrn-A1	0,88
Vrn-B1	vrn B1	0,92
Vrn-B3	vrn B3	0,96
Vrn-D1	vrn D1	0,94
TaCwi-A1	TaCwi-A1b	0,21
	TaCwi-A1a	0,75
TaSus2-2B	Hap-H	0,01
	Hap-L	0,71
Dreb-B1	Dreb-B1	0,35
Dreb-D1	Dreb-D1	0,96
Dreb-A1	Dreb-A1	0,78
TaAQP	TaAQP	0,22
1RS translokacija	RYE-NOR	0,08
	RIS	0,19
	PAW 161	0,17
	SEC A2/A3	0,14

3.2.2. DArTseq analiza

DArTseq analizom dobiveno je ukupno 32 342 markera (SNP). Nakon što su isključeni svi oni s nepoznatom kromosomskom lokacijom broj markera sveden je na 11 793. Isključivanjem heterotičnih i onih s neamplificiranim produktima („missing data“) broj markera smanjen je na 4 050, a dodatnim isključivanjem svih onih s manje od 5 % minor alela (MAF – Minor Allele Frequency) na 1 097. Nakon što su isključeni svi koji su bili blizu i u jakoj korelaciji pojavnosti broj markera u konačnici je sveden na 934.

Raspodjela markera po genomima pšenice prikazana je na Grafikonu 6. Iz grafikona je vidljivo da je najveći broj markera lociran na B genomu pšenice (426), nešto manji broj na A genomu (341), a najmanji broj na D genomu pšenice (167).

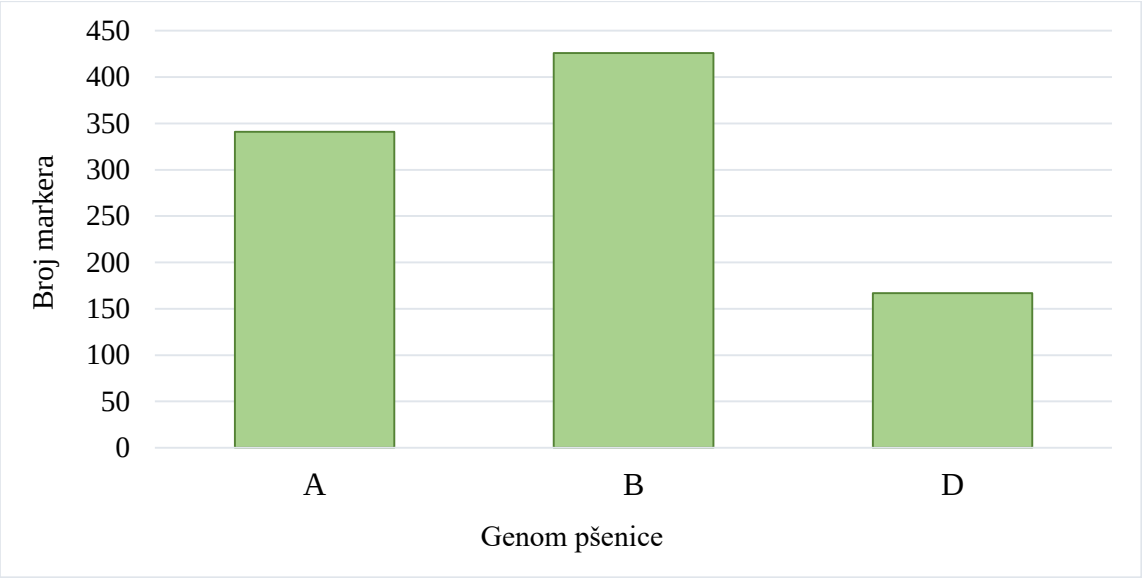
Od sedam homeolognih grupa kromosoma grupa 3 imala je najveći broj markera (167), slijede ju grupa 2 (156), grupa 1 (154), grupa 6 (139), grupa 7 (130), grupa 5 (115) i s najmanjim brojem markera grupa 4 (73).

Na Grafikonu 7 prikazana je raspodjela markera po kromosomima pšenice. Najmanji broj markera lociran je na kromosomu 5D (10), a najveći na kromosomu 3B (87). Prosječni broj markera po kromosomu iznosio je 44,47.

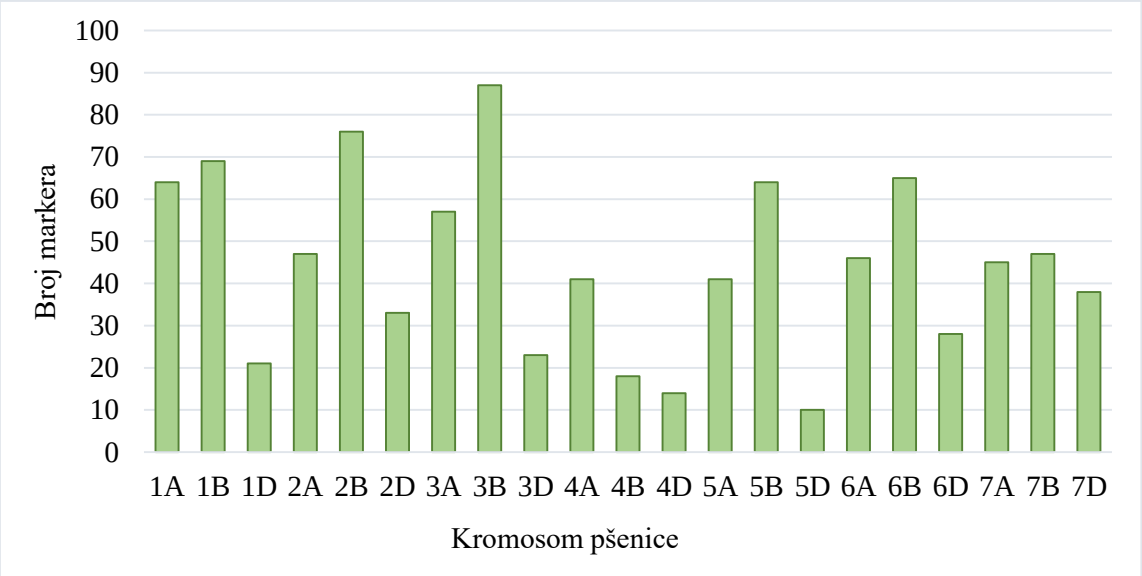
PIC vrijednosti markera kretale su se u rasponu od 0,09 do 0,375, s prosječnom vrijednosti od 0,237. Distribucija PIC vrijednosti markera prikazana je na Grafikonu 8. Iz grafikona je vidljivo da je najveći broj markera imao PIC vrijednosti u rasponu 0,11 – 0,15 te 0,351 – 0,375. PIC vrijednosti za A, B i D genom iznosile su redom 0,235, 0,232 i 0,245. Prosječna PIC vrijednost po kromosomima pšenice kretala se u rasponu od 0,211 (kromosom 4B) do 0,257 (kromosom 3D).

He vrijednosti markera kretale su se u rasponu od 0,095 do 0,5, s prosječnom vrijednosti od 0,289. Na Grafikonu 9 prikazana je distribucija He vrijednosti markera. Najveći broj markera imao je He vrijednosti u rasponu 0,451 – 0,5 i 0,11 – 0,15. He vrijednosti za A, B i D genom iznosile su redom 0,286, 0,281 i 0,299. Prosječna He vrijednost po kromosomima pšenice kretala se u rasponu od 0,251 (kromosom 4B) do 0,320 (kromosom 3D).

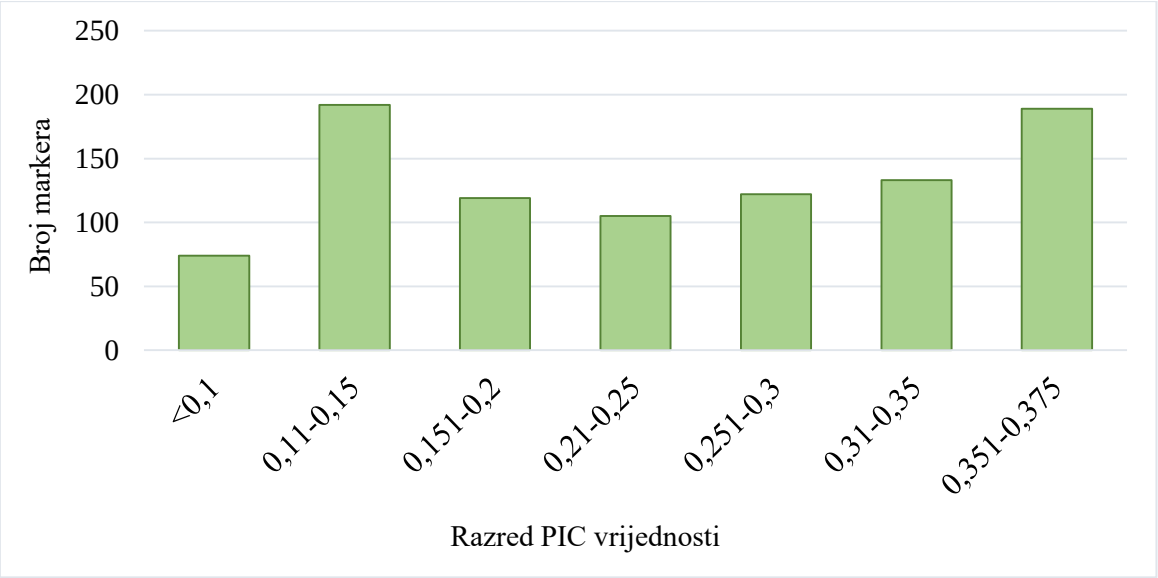
Prosječni broj alela po markeru (Na) iznosio je dva.



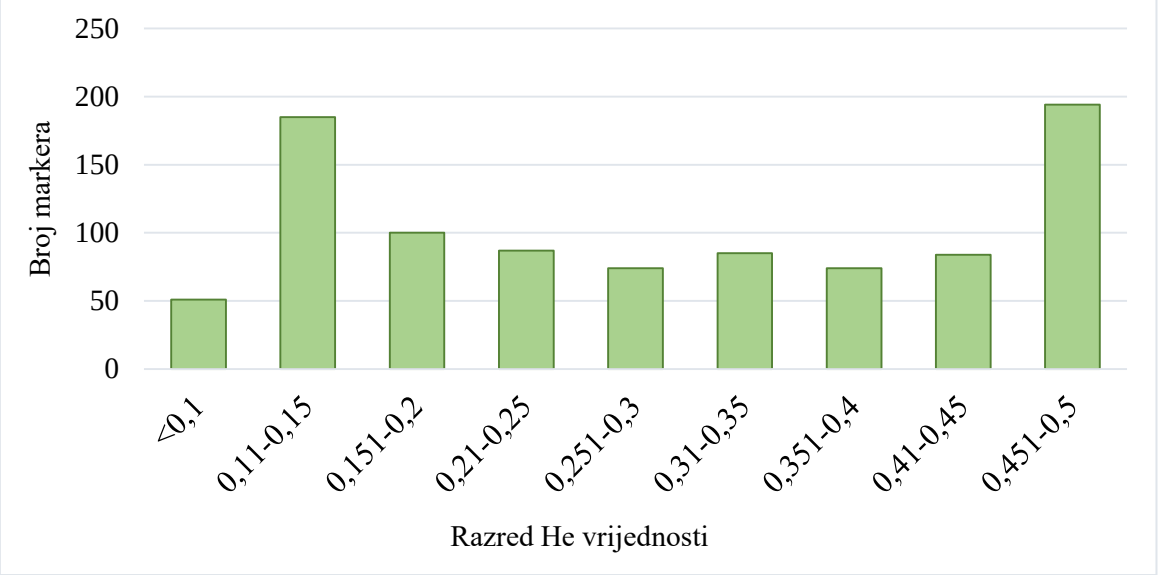
Grafikon 6. Distribucija DArTseq markera po genomima pšenice



Grafikon 7. Distribucija DArTseq markera po kromosomima pšenice



Grafikon 8. Distribucija PIC vrijednosti DArTseq markera



Grafikon 9. Distribucija He vrijednosti DArTseq markera

3.3. Analiza strukture populacije

3.3.1. *F* – statistika i analiza molekularne varijance (AMOVA)

Za određivanje genetske udaljenosti između osam geografskih regija pšenice korišten je Wright-ov fiksacijski indeks (F_{ST}). F_{ST} predstavlja udio genetske raznolikosti nastao uslijed razlike u frekvenciji alela između populacija te pokazuje iznos genetske diferencijacije između istih (Holsinger i Weir, 2009.) Vrijednost $F_{ST} = 0$ označava nepostojanje diferencijacije između populacija, dok vrijednost $F_{ST} = 1$ označava potpunu diferencijaciju između populacija. Analiza molekularne varijance je statistička metoda kojom je moguće raspodijeliti genotipsku varijancu između i unutar pretpostavljenih razina strukture kao i testirati značajnost svakog od izvora varijabilnosti (Šatović i sur., 2000.).

Za sve parove geografskih regija F_{ST} vrijednosti izračunate su pomoću programa Arlequin, a prikazane su u Tablici 23.

Tablica 23. Genetske udaljenosti (F_{ST}) između osam geografskih regija pšenice

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
1		n.s	n.s	**	**	**	n.s	n.s
2	0,12		n.s	**	**	**	**	**
3	0,11	0,10		**	**	**	*	**
4	0,18	0,16	0,14		*	**	**	**
5	0,17	0,16	0,14	0,06		**	**	**
6	0,14	0,15	0,14	0,14	0,10		**	**
7	0,13	0,13	0,11	0,12	0,10	0,09		n.s
8	0,09	0,10	0,08	0,08	0,07	0,06	0,03	

1-Sjeverna Amerika, 2-Srednja i južna Amerika, 3-Azija i Australija, 4-Zapadna Europa, 5-Srednja Europa, 6-Istočna Europa, 7-Južna Europa, 8-Hrvatska i Srbija

Većina dobivenih F_{ST} vrijednosti bila je visoko značajna ($p < 0,01$). Vrijednosti su se kretale od 0,06 (zapadna Europa i srednja Europa) do 0,18 (Sjeverna Amerika i zapadna Europa).

Analiza molekularne varijance provedena je na temelju matrice genetskih udaljenosti, primjenom programa Arlequin. S obzirom na postojanje tri razine strukture (između zona,

između regija unutar zona i unutar regija) provedena je dvosmjerna analiza molekularne varijance, čiji su rezultati prikazani u Tablici 24.

Tablica 24. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Izvor varijabilnosti	DF	Suma kvadrata	Komponentne varijance	Udio varijabilnosti (%)	f	P(f)
Između zona	2	1664,035	0,56783 Va	0,31	0,0031	0,1121
Između regija/ Unutar zona	5	2576,798	16,09440 Vb	8,89	0,0892	‹0,0001
Unutar regija	232	38116,016	164,29317 Vc	90,79	0,0921	‹0,0001
Ukupno	239	42356,850	180,95540			

Analizom molekularne varijance utvrđeno je da je najveći dio varijabilnosti uzrokovan razlikama između jedinki (90,79 %), dok je preostali dio varijabilnosti uglavnom uzrokovan razlikama između regija (8,89 %). Procijenjene f vrijednosti za navedene izvore varijabilnosti bile su visoko značajne ($p < 0,0001$), što upućuje na točnost pretpostavljene strukture varijabilnosti. Udio varijabilnosti uzrokovan razlikama između zona je bio zanemariv (0,31 %) i statistički neznačajan.

3.3.2. Metoda *structure*

Struktura populacije određena je primjenom programa STRUCTURE ver. 2.3.3 (Pritchard i sur., 2000.), koji se zasniva na Bayesovskoj statistici i MCMC metodi (Markov Chain Monte Carlo). Najvjerovatniji broj K grupa određen je metodom prema Evanno i sur. (2005.), kojom se radi usporedba prosječnih procjena vjerojatnosti podataka, $ln[Pr(X|K)]$, za svaku od K vrijednosti, te izračun parametra Delta K (ΔK), koji se zasniva na stopi promjene logaritma vjerojatnosti između uzastopnih K vrijednosti.

Za određivanje strukture populacije korišteni su rezultati genotipizacije s DArTseq markerima. Analiza je provedena na temelju *a priori* podjele kultivara u osam populacija (s obzirom na njihovo geografskog podrijetlo).

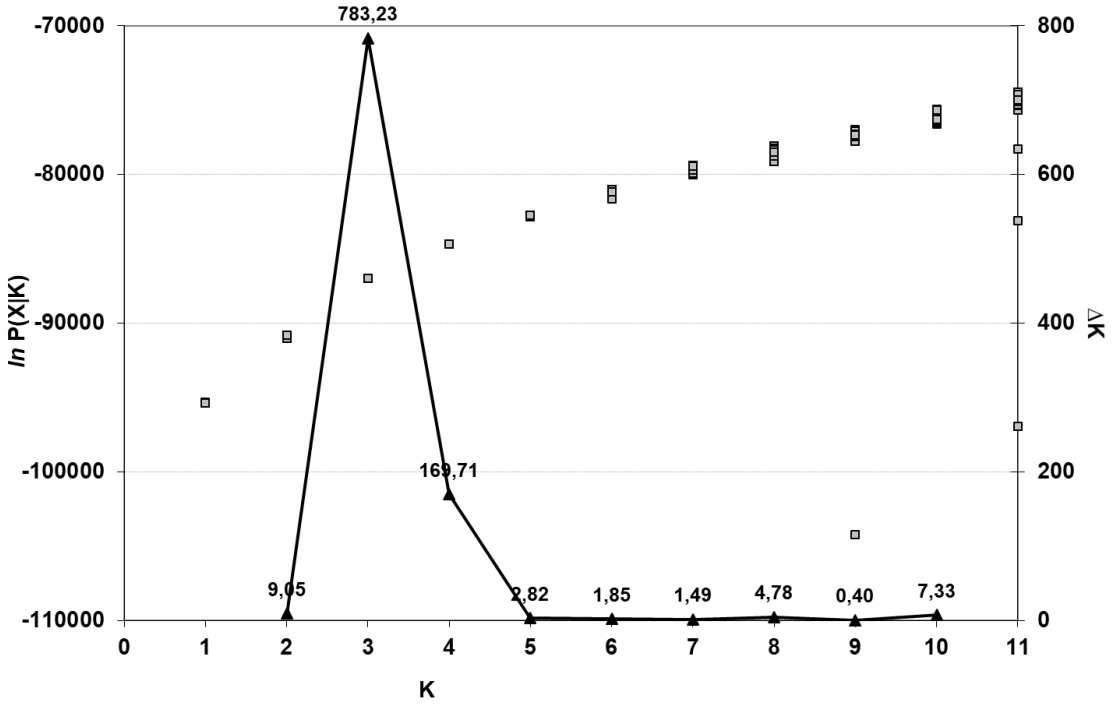
Sumarni rezultati Evanno metode za K vrijednosti od 1 do 11, dobiveni na temelju 30 ponavljanja, prikazani su u Tablici 25. Iz tablice je vidljivo da je najmanja standardna devijacija zabilježena kod K = 3, a druga najmanja kod K = 4. Također, najveća vrijednost Delta K zabilježena je za K = 3, a druga najveća za K = 4. Na temelju vrijednosti Stdev LnP(K) i Delta K može se zaključiti da je optimalni broj grupa K = 3, a drugi najbolji K = 4.

Iz Grafikona 10 vidljivo je da kod vrijednosti K = 2 i vrijednosti K = 5 do K = 11 dolazi do raspadanja strukture, koje se povećava kako se povećava i vrijednost K. S druge strane, kod vrijednosti K = 3 i K = 4 struktura ostaje cjelovita, što potvrđuje da se radi o najvjerojatnijem broju K grupa.

Na temelju rezultata Evanno metode utvrđeno je postojanje tri glavne grupe ili genska skupa, u koje su razvrstani ispitivani kultivari pšenice. Najveći broj kultivara, njih 50, bio je raspoređen u A grupu ili zapadni genski skup. Grupa B ili istočni genski skup obuvaćala je 44 kultivara, dok je u grupu C ili južni genski skup raspoređen najmanji broj kultivara, njih 26.

Tablica 25. Rezultati Evanno metode za K vrijednosti od 1 do 11

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	|Ln''(K)|	Delta K
1	30	-95353,76	0,98	NA	NA	
2	30	-90833,88	75,15	4519,88	680,14	9,05
3	30	-86994,14	1,93	3839,74	1512,68	783,23
4	30	-84667,08	2,80	2327,06	474,60	169,71
5	30	-82814,62	39,77	1852,46	112,27	2,82
6	30	-81074,43	123,10	1740,19	227,18	1,85
7	30	-79561,43	207,97	1513,00	309,18	1,49
8	30	-78357,60	223,00	1203,83	1066,47	4,78
9	30	-78220,24	4914,35	137,36	1976,44	0,40
10	30	-76106,44	277,17	2113,80	2031,15	7,33
11	30	-76023,80	4271,53	82,65	NA	



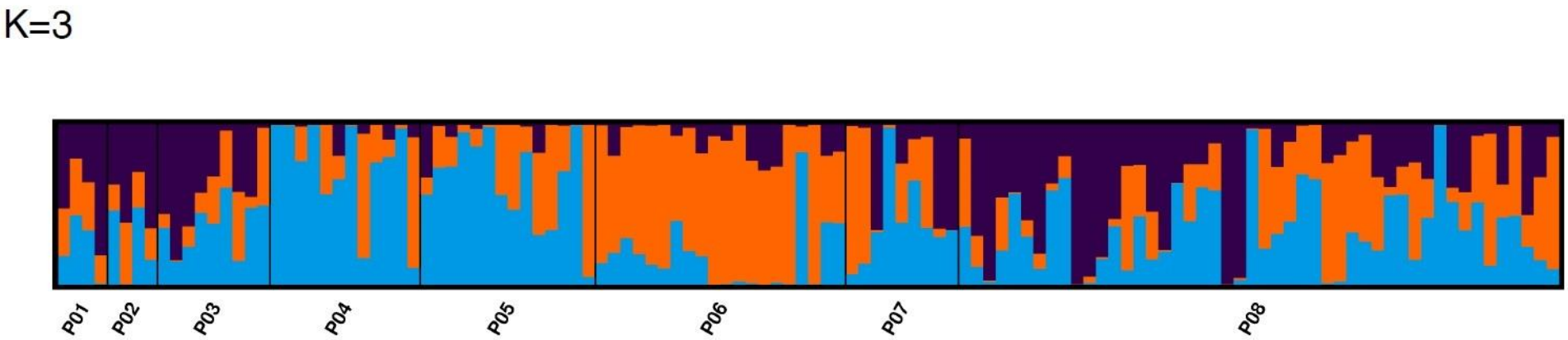
Grafikon 10. Vrijednosti Delta K za raspon K vrijednosti od 1 do 11

U Tablici 26 prikazana je raspodjela kultivara iz unaprijed definiranih populacija po genskim skupovima (K = 3). Kultivari iz populacija 1, 2 i 3 (Amerika, Azija, Australija) svrstani su uglavnom u A ili C skup. Većina kultivara iz populacija 4 i 5 (zapadna i srednja Europa) svrstana je u skup A. Kultivari iz populacije 6 (istočna Europa) svrstani su uglavnom u skup B. Kultivari iz populacije 7 (južna Europa) svrstani su najvećim dijelom u skup B ili C, dok su kultivari iz populacije 8 (Hrvatska i Srbija) bili raspodjeljeni u sva tri skupa. Rezultati analize strukture populacije prikazani su grafički na Grafikonu 11.

Tablica 26. Raspodjela kultivara unaprijed definiranih populacija po genskim skupovima

Zadane populacije	A	B	C	Broj jedinki
1	0,25	-	0,75	4
2	0,60	-	0,40	5
3	0,56	0,11	0,33	9
4	0,92	0,08	-	12
5	0,73	0,27	-	15
6	0,05	0,95	-	21
7	0,14	0,43	0,43	7
8	0,36	0,32	0,32	47
Ukupno	0,42	0,37	0,21	120

1-Sjeverna Amerika, 2-Srednja i južna Amerika, 3-Azija i Australija, 4-Zapadna Europa, 5-Srednja Europa, 6-Istočna Europa, 7-Južna Europa, 8-Hrvatska i Srbija



Grafikon 11. Struktura populacije 120 kultivara heksaploidne pšenice (K = 3)

Okomitim stupcima prikazani su kultivari pšenice (jedan stupac predstavlja jedan genotip). Plavom bojom označena je A grupa ili zapadni genski skup, narančastom bojom označena je B grupa ili istočni genski skup, a ljubičastom bojom C grupa ili južni genski skup. Duljina segmenata proporcionalna je udjelu pripadnosti pojedinog genotipa određenoj grupi. Okomite crne linije predstavljaju razgraničenja između osam zadanih populacija pšenice.

S obzirom na udio pripadnosti ispitivanih kultivara pšenice pojedinom genskom skupu kultivari su podijeljeni na reprezentativne, obične i mješovite. Reprezentativni kultivari imali su udio pripadnosti Q > 0,90 te su utvrđena 22 takva kultivara. Obični kultivari imali su udio pripadnosti 0,75 < Q < 0,90, a takvih je bilo 25 kultivara. Najveći broj kultivara, njih 73, bili su mješoviti kultivari s udjelom pripadnosti Q < 0,75. Prosječna Q vrijednost ispitivanih kultivara pšenice iznosila je ~ 0,70.

U Tablici 27 prikazani su reprezentativni kultivari pšenice za svaki pojedini genski skup. Skup A tako je imao 11 reprezentativnih kultivara, gdje su glavni predstavnici skupa bili francuski i njemački kultivari. Skup B imao je šest reprezentativnih kultivara s ruskim kultivarima kao glavnim predstavnicima. Skup C imao je pet reprezentativnih kultivara, sve redom hrvatske kultivare.

Tablica 27. Popis kultivara pšenice reprezentativnih za pojedini genski skup (K=3)

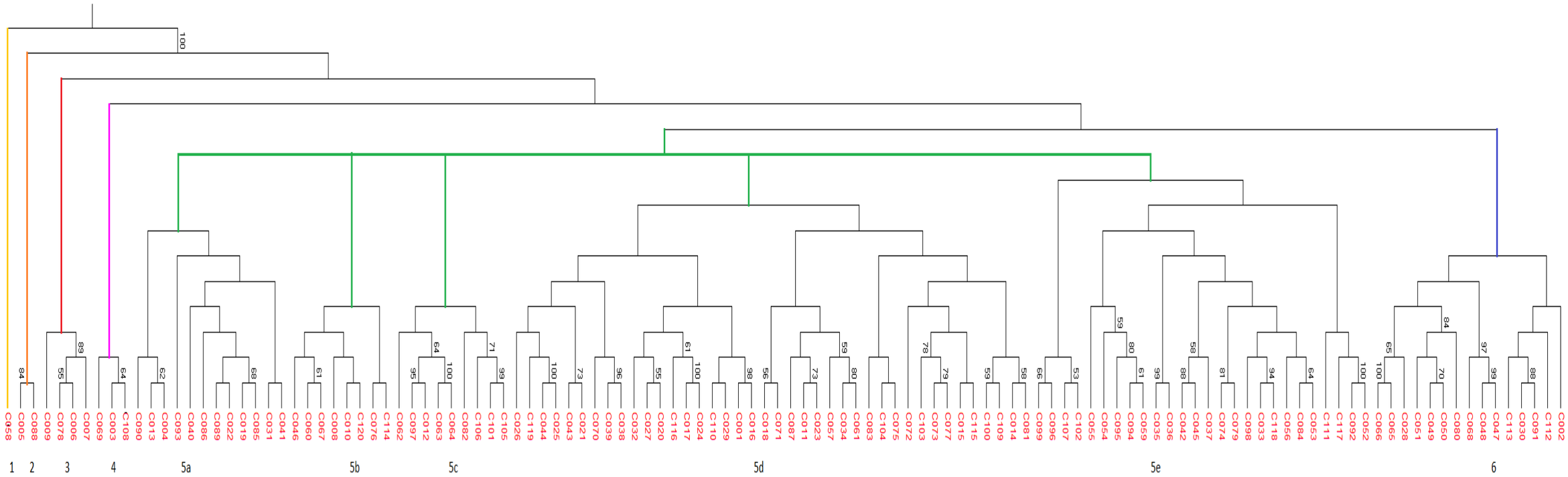
Kultivar	**Država**	**Regija**	**Udio pripadnosti (Q)**			**Genski skup**
			A	**B**	**C**	
IKARUS	AUT	5	0,95	0,04	0,00	A
SOISSONS	FRA	4	0,99	0,00	0,00	A
BASTIDE	FRA	4	0,99	0,00	0,00	A
PREMIO	FRA	4	1,00	0,00	0,00	A
CAPPELLE DESPREZ	FRA	4	0,99	0,01	0,00	A
AREZZO	FRA	4	0,98	0,02	0,00	A
RIALTO	GBR	4	0,98	0,02	0,00	A
DEKAN	GER	5	0,99	0,01	0,00	A
CONTRA	GER	5	0,99	0,00	0,00	A
ELPA	GER	5	1,00	0,00	0,00	A
HELIA	HRV	8	0,97	0,01	0,02	A
AGRON	AUT	5	0,05	0,95	0,00	B
SKOPJANKA	MKD	7	0,07	0,92	0,01	B
BEZOSTAJA	RUS	6	0,00	0,93	0,07	B
AVRORA	RUS	6	0,00	0,99	0,00	B
JUBILEJNAJA 50	RUS	6	0,00	0,99	0,00	B
UKRAINKA-ODESSKAYA	UKR	6	0,02	0,97	0,01	B
OSJEČKA 20	HRV	8	0,02	0,01	0,97	C
ZLATNA DOLINA	HRV	8	0,00	0,00	1,00	C
GOLUBICA	HRV	8	0,01	0,04	0,95	C
LARA	HRV	8	0,00	0,00	1,00	C
KARLA	HRV	8	0,03	0,01	0,96	C

3.3.3. Klaster analiza

Kako bi se dodatno ispitao način grupiranja kultivara pšenice provedena je klaster analiza korištenjem Neighbour – Joining (NJ) algoritma. NJ algoritam predstavlja multivarijatnu metodu za izradu filogenetskog stabla, koja kao ulaznu varijablu koristi matricu genetskih udaljenosti, u ovom slučaju genetsku udaljenost temeljenu na udjelu zajedničkih alela (Shared Alleles Distance). Na temelju genotipizacije s 934 DArTseq markera izrađeno je NJ stablo prikazano na Grafikonu 12.

Na grafikonu je vidljivo postojanje 6 glavnih klastera. Prvi klaster je predstavljen jednim kultivarom (PKB Sunce), koji se odvojio od svih ostalih. Drugi klaster obuhvaća dva kultivara – hrvatski Donna i mađarski Mv 24. Treći klaster čine četiri kultivara, od čega tri mađarska i jedan ruski. Četvrtim klasterom obuhvaćena su tri kultivara – Mv 16 (HUN), Talia (CRO) i Mara (ITA). Peti klaster je najveći i obuhvaća 95 kultivara pšenice. Unutar njega izdvojeno je pet manjih podklastera (5a-5e). Unutar podklastera 5a nalazi se 12 kultivara većinom hrvatskog podrijetla. Podklaster 5b obuhvaća osam kultivara uglavnom iz istočnoeuropskih zemalja. Unutar podklastera 5c nalazi se devet kultivara pšenice, većinom hrvatskog i srpskog podrijetla. Podklaster 5d je najveći s 40 kultivara pšenice, od čega 17 hrvatskih, četiri talijanska, četiri zapadnoeuropska, tri istočnoeuropska, tri sjevernoamerička, tri južnoamerička i šest azijskih. Unutar podklastera 5e obuhvaćeno je 26 kultivara pšenice uglavnom iz zapadnoeuropskih zemalja. Šesti klaster obuhvaća 15 kultivara pšenice, od čega najveći dio čine kultivari iz istočnoeuropskih zemalja uz nekoliko hrvatskih kultivara.

Genetske udaljenosti kretale su se u rasponu od 0,032 do 0,431. Najmanja genetska udaljenost zabilježena je između hrvatskih kultivara Golubica i AG Karla, dok je najveća genetska udaljenost zabilježena između ruskog kultivara Bezostaja i hrvatskog kultivara Zlatna Dolina.

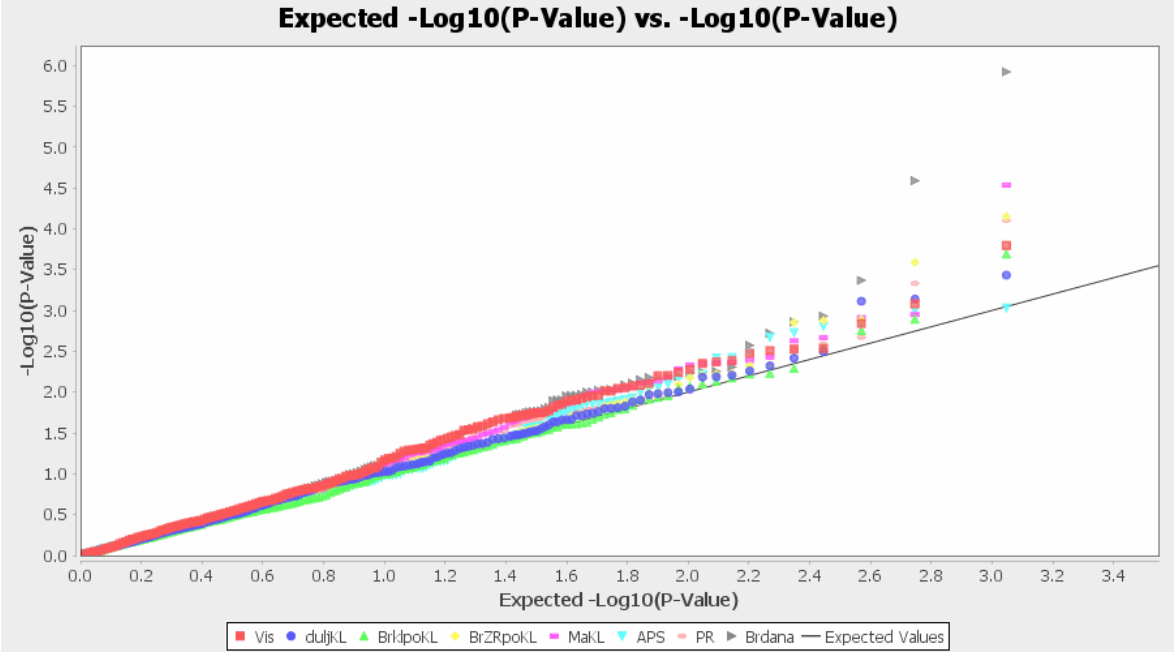


Grafikon 12. Neighbour – Joining dendrogram analiziranih kultivara pšenice

3.4. Asocijativna analiza

3.4.1. Opći linearni model

Za utvrđivanje veza između markera i srednjih vrijednosti agronomskih svojstava, primjenom GLM modela, kao kovarijabla korišteni su podatci o strukturi populacije s ciljem uklanjanja lažno pozitivnih veza. Rezultati GLM analize prikazani su grafički Q-Q (Quantile – Quantile) plotom, koji pokazuje očekivane p vrijednosti u odnosu na dobivene p vrijednosti za svaki pojedini marker. Na Grafikonu 13 vidljivo je da do odvajanja markera od linije očekivanih vrijednosti dolazi tek pri samome kraju, što znači da je samo manji dio markera uistinu bio povezan s ispitivanim svojstvima, ali i da je korišteni model pravilno postavljen.



Grafikon 13. Q-Q plot GLM analize za ispitivana agronomska svojstva

Pored Q-Q plota za prikaz rezultata GLM analize korišten je i Manhattan plot, gdje su na X osi genomskim redom prikazani kromosomi i pozicije na kromosomima, a na Y osi p vrijednosti (prikazane kao $-\log_{10}$) za svaki pojedini marker. Manhattan plot napravljen je za svako agronomsko svojstvo pojedinačno (Grafikoni 14 - 21).

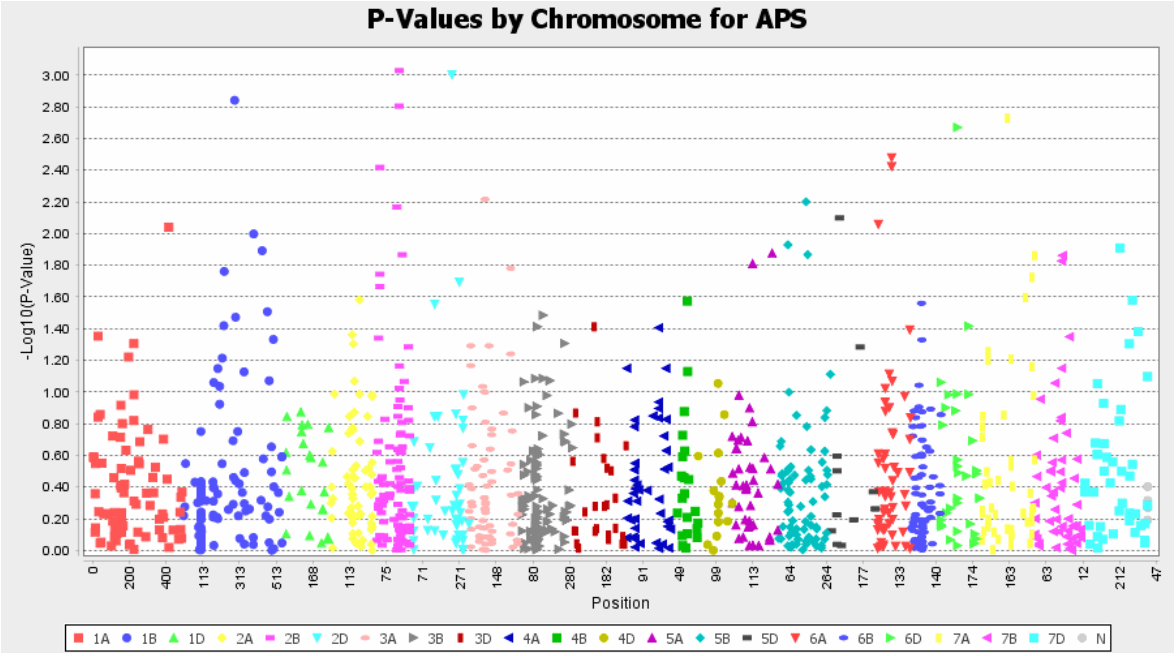
Primjenom općeg lineranog modela utvrđeno je postojanje 544 značajne veze ($p < 0,05$), odnosno 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$).

Od 544 značajne ($p < 0,05$) veze, njih 181 utvrđena je na A genomu, 232 na B genomu i 131 na D genomu pšenice. Najveći broj značajnih veza utvrđen je za svojstvo visine biljke, njih čak 87. Za svojstvo broja dana do klasanja utvrđeno je 78 značajnih veza, masu klasa 75 veza, prinos 71 veza, duljinu klasa 63 veze, masu 1000 zrna 58 veza, broj zrna po klasu 57 veza i broj klasića po klasu 55 veza.

Od 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$), njih 37 utvrđeno je na A genomu, 53 na B genomu i 37 na D genomu. Najveći broj veza utvrđen je za svojstvo broja dana do klasanja (22), a najmanji za duljinu klasa (9). Broj dana do klasanja bio je povezan s 21 DArT markerom, od čega devet na B genomu, sedam na D genomu i pet na A genomu, te jednim funkcionalnim markerom, Ppd-D1. Visina biljke bile je povezana sa 17 DArT markera, sedam na B genomu, šest na A genomu i četiri na D genomu. Također, visina je bila povezana i s tri funkcionalna markera, Ppd-D1, Rht-B1 i Rht-D1. Dvanaest markera bilo je povezano s duljinom klasa, od toga šest na B genomu, četiri na A genomu i dva na D genomu. Masa klasa bila je povezana s 20 DArT markera, od kojih osam lociranih na A genomu, sedam na B genomu i pet na D genomu. Također, masa klasa bila je povezana s funkcionalm markerom Rht-D1. Broj klasića po klasu bio je povezan s 12 markera, pet na B genomu, pet na A genomu i dva na D genomu. Dvanaest DArT markera bilo je povezano s brojem zrna po klasu, od toga šest na B genomu, četiri na D genomu i dva na A genomu. Također, broj zrna po klasu bio je povezan i s jednim funkcionalnim markerom, RhtD1. Masa 1000 zrna bila je povezana s 15 DArT markera, od čega šest na A genomu, šest na B genomu i tri na D genomu. Jedanaest DArT markera bilo je povezano s prinosom, od čega šest na B genomu, četiri na D genomu i jedan na A genomu, te jednim funkcionalnim markerom - Rht-D1. Pojedinačne R^2 vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,03 do 0,14 (Tablice 28 – 35).

Tablica 28. Markeri u visoko značajnoj vezi ($p < 0,01$) s masom 1000 zrna (GLM)

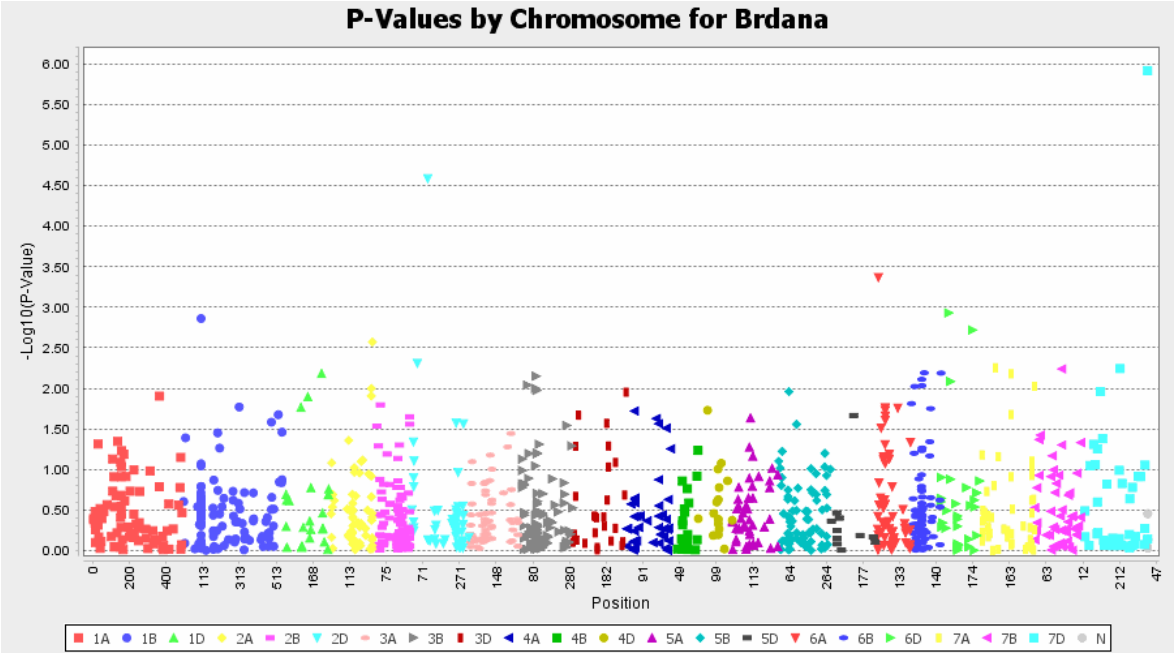
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Masa 1000 zrna	1088299	2B	147	0,00094	0,06411
	1088182	2D	230	0,00099	0,06283
	1111200	1B	287	0,00144	0,06867
	1000259	2B	146	0,00157	0,05805
	988886	7A	152	0,00188	0,06426
	3029721	6D	91	0,00214	0,06497
	2265853	6A	90	0,00332	0,06042
	1091144	6A	90	0,00378	0,05984
	1127429	2B	41	0,00382	0,05116
	1041958	3A	87	0,00609	0,04435
	996374	5B	154	0,00631	0,05458
	1090720	2B	134	0,00680	0,04390
	1162660	5D	49	0,00798	0,04308
	1081529	6A	18	0,00874	0,05009
	1069323	1A	415	0,00913	0,05170



Grafikon 14. Manhattan plot GLM analize za svojstvo mase 1000 zrna

Tablica 29. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s danima do klasanja (GLM)

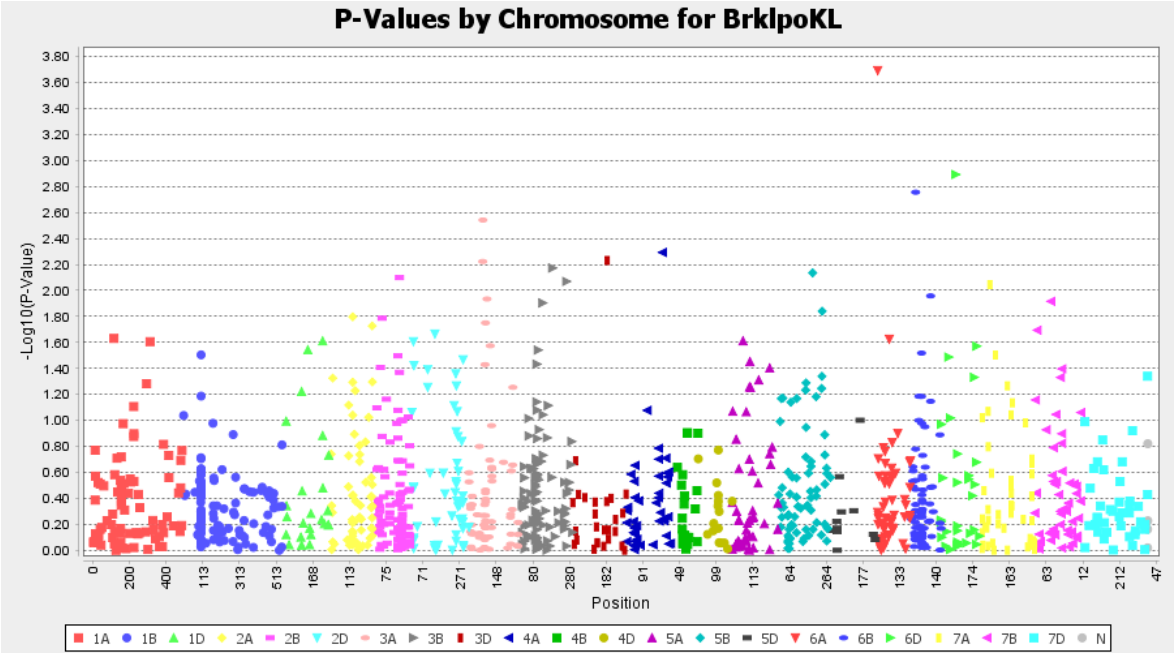
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj dana do klasanja	1088801	7D	365	0,00000	0,11418
	PpdD1	2D	98	0,00003	0,11286
	1081529	6A	18	0,00043	0,06962
	1107137	6D	43	0,00118	0,05958
	3021703	1B	104	0,00138	0,06035
	1216592	6D	173	0,00191	0,05239
	3064508	2A	238	0,00268	0,05245
	1127467	2D	41	0,00493	0,04345
	1078949	7A	86	0,00559	0,04372
	1018953	7D	215	0,00572	0,03681
	990510	7B	147	0,00577	0,03945
	3064453	6B	75	0,00645	0,04312
	1054053	6B	166	0,00648	0,03941
	1205641	1D	216	0,00656	0,04287
	989982	7A	171	0,00663	0,03922
	1862911	3B	99	0,00707	0,04135
	1024936	6B	61	0,00776	0,03777
	1046205	6D	52	0,00822	0,04307
	1061026	3B	51	0,00911	0,04103
	3020323	6B	62	0,00929	0,04001
	1165351	7A	299	0,00947	0,03576
	985609	6B	23	0,00949	0,03961



Grafikon 15. Manhattan plot GLM analize za svojstvo broja dana do klasanja

Tablica 30. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s brojem klasića/klasu (GLM)

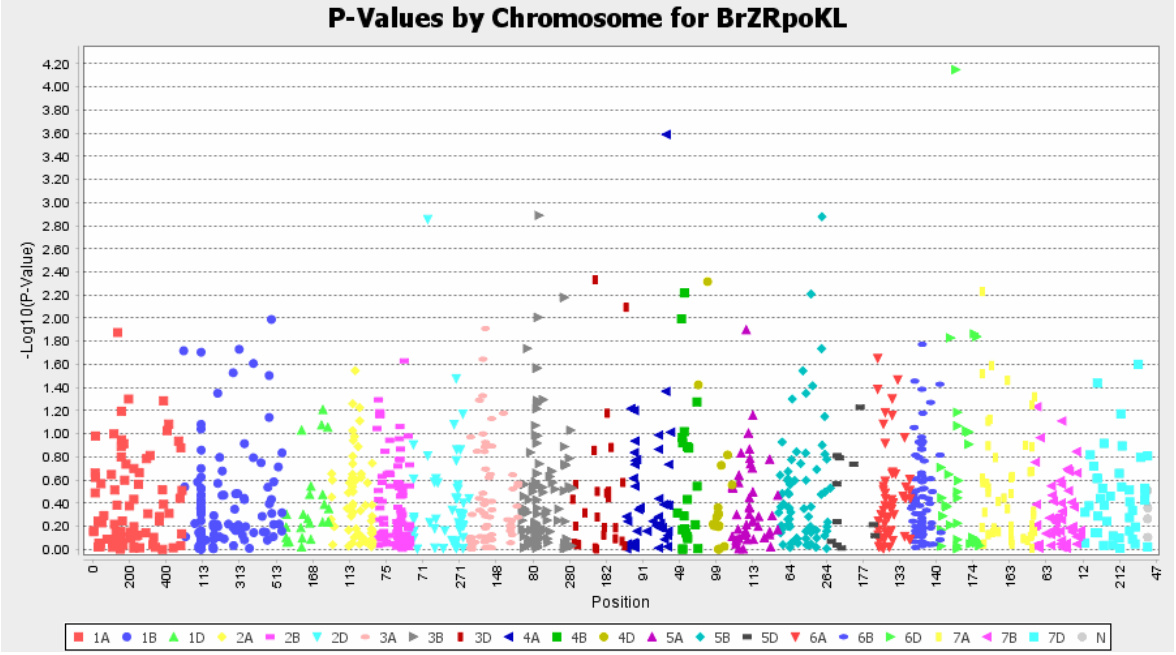
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj klasića po klasu	1025472	6A	14	0,00020	0,11508
	1666805	6D	81	0,00128	0,09036
	1033342	6B	28	0,00175	0,08331
	1200629	3A	76	0,00287	0,07972
	2281710	4A	198	0,00510	0,07133
	1214792	3D	188	0,00588	0,06689
	996545	3A	75	0,00598	0,06364
	1032223	3B	188	0,00672	0,06787
	1237690	5B	190	0,00733	0,06101
	1095108	2B	148	0,00797	0,05941
	993055	3B	265	0,00852	0,06325
	1102373	7A	56	0,00901	0,07380



Grafikon 16. Manhattan plot GLM analize za svojstvo broja klasića po klasu

Tablica 31. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s brojem zrna/klasu (GLM)

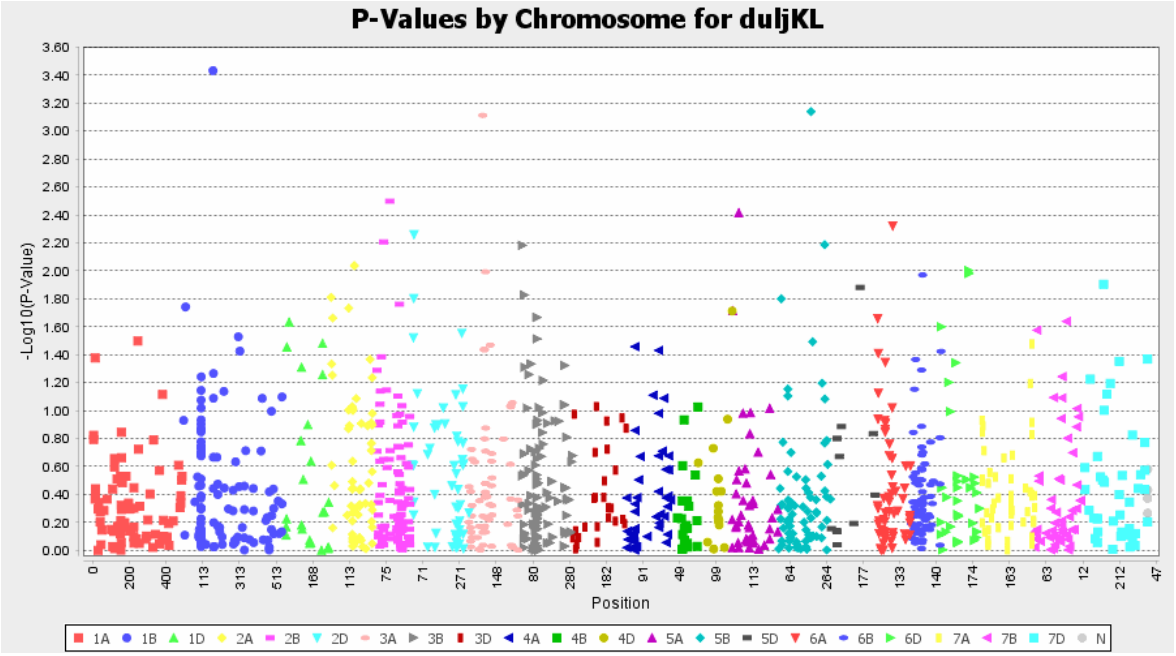
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj zrna po klasu	1666805	6D	81	0,00007	0,12676
	1009966	4A	218	0,00026	0,10495
	3025278	3B	115	0,00129	0,08468
	2246622	5B	241	0,00133	0,08274
	3023733	2D	98	0,00140	0,08507
	3945116	3D	122	0,00465	0,06339
	RhtD1	4D	52	0,00483	0,06613
	3030074	7A	14	0,00590	0,06011
	1012604	4B	76	0,00605	0,06949
	3028852	5B	181	0,00618	0,06327
	1097596	3B	252	0,00664	0,05850
	3020731	3D	291	0,00805	0,05585
	1018393	3B	110	0,00982	0,05312



Grafikon 17. Manhattan plot GLM analize za svojstvo broja zrna po klasu

Tablica 32. Markeri u visoko značajnoj vezi ($p < 0,01$) s duljinom klasa (GLM)

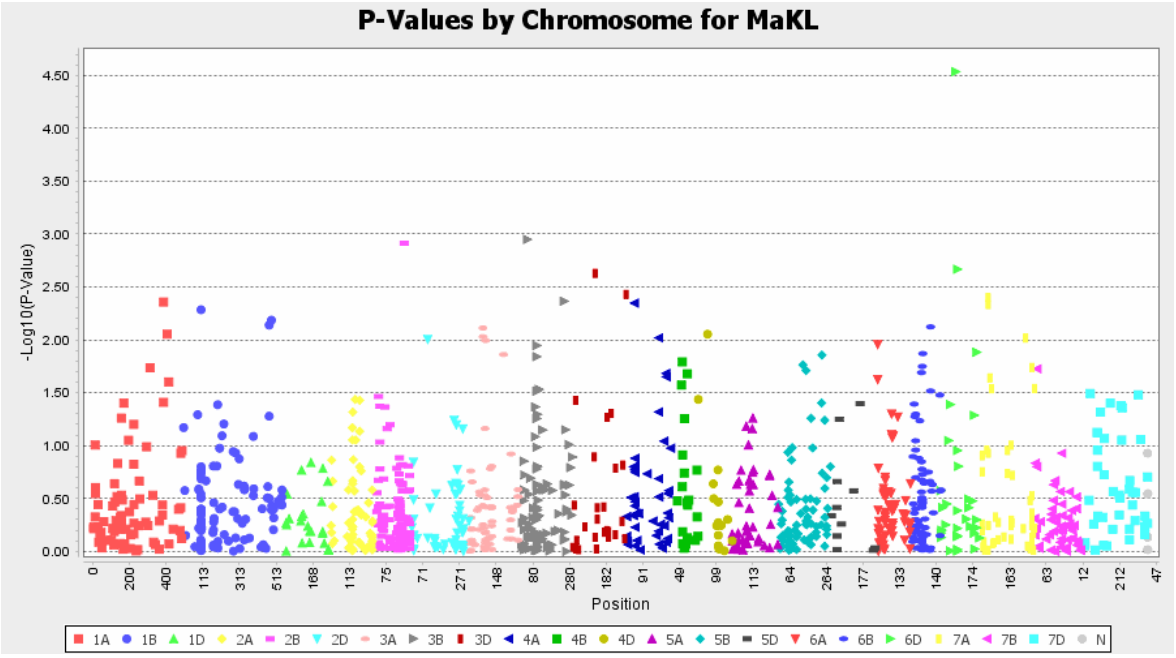
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Duljina klasa	3020368	1B	169	0,00037	0,08515
	3028852	5B	181	0,00073	0,07866
	996545	3A	75	0,00077	0,07645
	1130006	2B	95	0,00318	0,06560
	3028654	5A	36	0,00384	0,05858
	979978	6A	96	0,00478	0,05673
	1088586	2D	23	0,00551	0,05524
	1078389	2B	62	0,00621	0,05243
	1085685	5B	256	0,00651	0,05104
	1061426	3B	24	0,00657	0,05589
	3024651	2A	140	0,00920	0,04691
	1142450	6D	152	0,00996	0,04638



Grafikon 18. Manhattan plot GLM analize za svojstvo duljine klasa

Tablica 33. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s masom klasa (GLM)

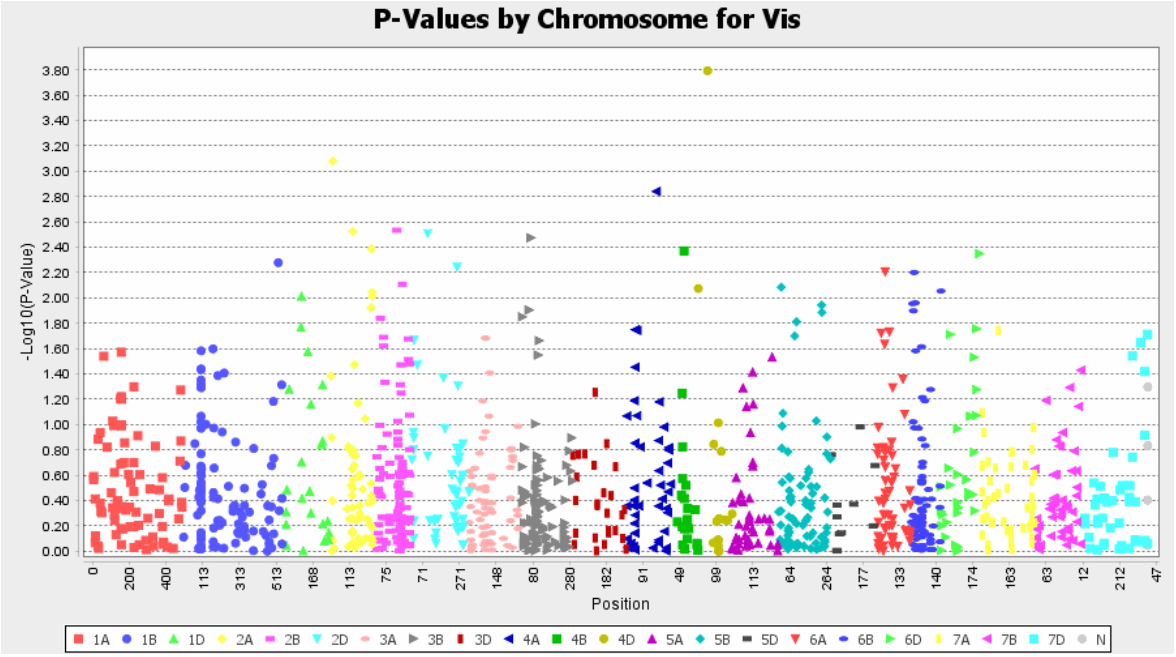
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Masa klasa	1666805	6D	81	0,00003	0,14415
	1061026	3B	51	0,00112	0,09645
	1046334	2B	174	0,00122	0,08666
	3029721	6D	91	0,00215	0,08707
	3945116	3D	122	0,00235	0,07596
	3020731	3D	291	0,00372	0,06938
	3028330	7A	46	0,00398	0,08121
	1097596	3B	252	0,00431	0,06726
	3570150	1A	386	0,00440	0,08058
	1106520	4A	45	0,00450	0,06744
	1060134	1B	104	0,00520	0,06481
	1096191	1B	488	0,00653	0,06482
	3025068	1B	475	0,00726	0,05979
	3025705	6B	109	0,00754	0,06446
	996545	3A	75	0,00773	0,05888
	RhtD1	4D	52	0,00883	0,06087
	1089370	1A	406	0,00884	0,06587
	1200629	3A	76	0,00934	0,06023
	1011384	4A	177	0,00959	0,06173
	1076983	7A	250	0,00962	0,06214
	3023733	2D	98	0,00992	0,05771



Grafikon 19. Manhattan plot GLM analize za svojstvo mase klasa

Tablica 34. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s visinom biljke (GLM)

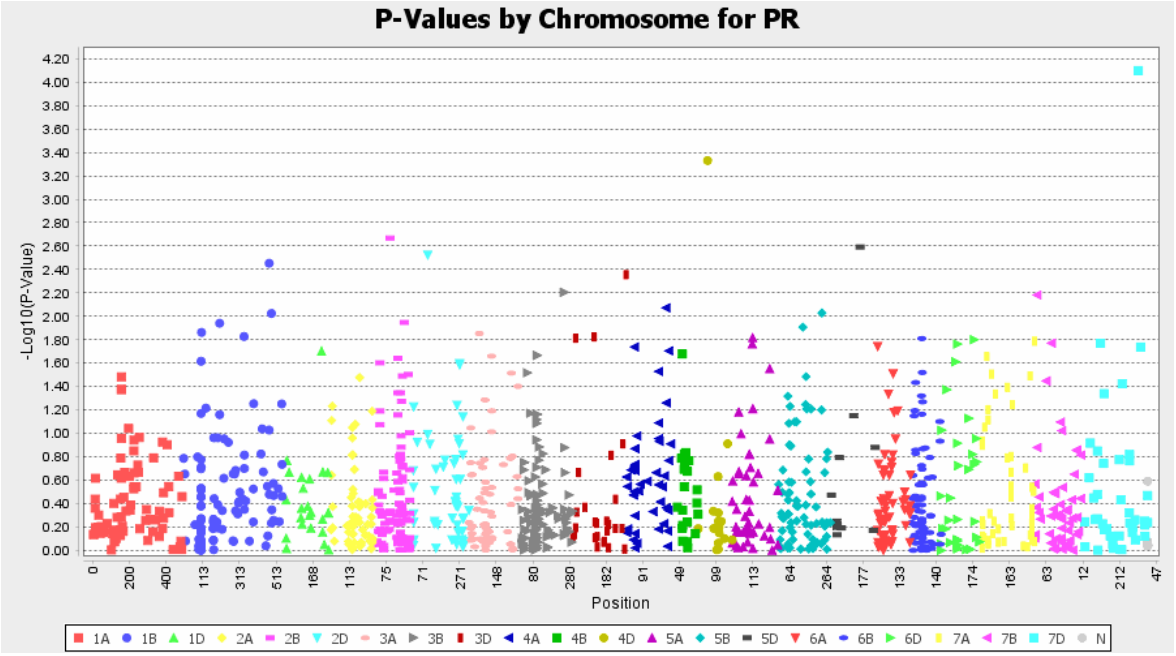
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Visina	RhtD1	4D	52	0,00016	0,06624
	1090563	2A	22	0,00083	0,05166
	3025121	4A	164	0,00144	0,05460
	977751	2B	134	0,00292	0,04044
	1202263	2A	132	0,00298	0,03928
	PpdD1	2D	98	0,00311	0,04647
	3023116	3B	71	0,00335	0,04009
	1062662	2A	232	0,00410	0,03888
	RhtB1	4B	74	0,00426	0,03995
	1107840	6D	211	0,00447	0,03755
	1668341	1B	525	0,00527	0,03949
	3956776	2D	258	0,00571	0,03665
	1219440	6A	55	0,00623	0,03842
	1021887	6B	20	0,00630	0,03386
	1050529	2B	164	0,00781	0,03311
	999166	5B	19	0,00822	0,04194
	1264929	4D	1	0,00841	0,03336
	1054053	6B	166	0,00882	0,03203
	987055	2A	237	0,00901	0,03783
	1071344	1D	107	0,00971	0,03182



Grafikon 20. Manhattan plot GLM analize za svojstvo visine biljke

Tablica 35. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s prinosom (GLM)

Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Prinos	982908	7D	314	0,00008	0,12610
	RhtD1	4D	52	0,00047	0,09087
	1090190	2B	96	0,00214	0,06450
	1017508	5D	162	0,00256	0,06351
	3023733	2D	98	0,00300	0,07058
	3025068	1B	475	0,00353	0,05853
	3020731	3D	291	0,00441	0,05586
	1097596	3B	252	0,00622	0,05173
	1005381	7B	12	0,00657	0,06406
	1017687	4A	217	0,00848	0,04802
	2246622	5B	241	0,00936	0,04808
	1096191	1B	488	0,00945	0,04769



Grafikon 21. Manhattan plot GLM analize za svojstvo prinosa

Na temelju GLM modela utvrđeno je postojanje 17 markera s pleiotropnim učinkom, a navedeni su u Tablici 36. Funkcionalni marker RhtD1 bio je povezan s čak četiri ispitivana svojstva. Za pet DArT markera utvrđena je povezanost sa po tri ispitivana svojstva, dok je 11 DArT markera bilo povezano s dva ispitivana svojstva.

Tablica 36. Pleiotropni markeri prema GLM modelu

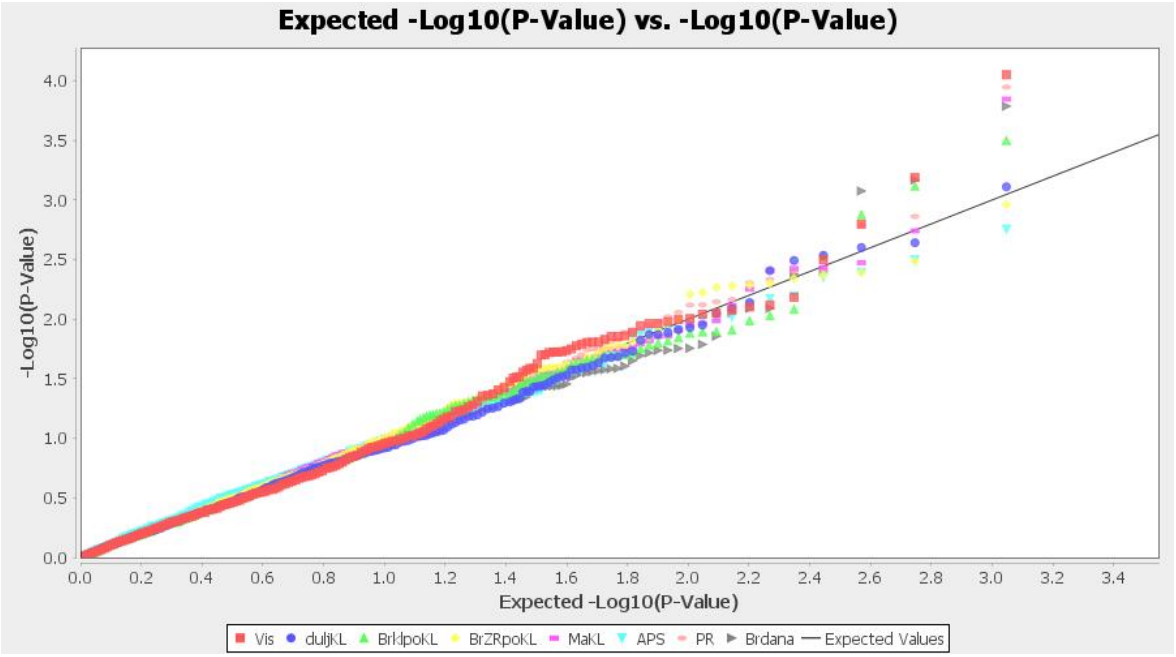
Marker	Pozicija	Svojstvo	p	R^2
4D |RhtD1	52	Broj zrna/klas	0,00483	0,06613
		Masa klasa	0,00883	0,06087
		Prinos	0,00047	0,09087
		Visina	0,00016	0,06624
2D |3023733	98	Broj zrna/klas	0,00140	0,08507
		Masa klasa	0,00992	0,05771
		Prinos	0,00300	0,07058
3A |996545	75	Broj klasića/klas	0,00598	0,06364
		Duljina klasa	0,00077	0,07645
		Masa klasa	0,00773	0,05888
3B |1097596	252	Broj zrna/klas	0,00664	0,05850
		Masa klasa	0,00431	0,06726
		Prinos	0,00622	0,05173
3D |3020731	291	Broj zrna/klas	0,00805	0,05585
		Masa klasa	0,00372	0,06938
		Prinos	0,00441	0,05586
6D |1666805	81	Broj klasića/klas	0,00128	0,09036
		Broj zrna/klas	0,00007	0,12676
		Masa klasa	0,00003	0,14415
1B |1096191	488	Masa klasa	0,00653	0,06482
		Prinos	0,00945	0,04769
1B |3025068	475	Masa klasa	0,00726	0,05979
		Prinos	0,00353	0,05853

Tablica 36. (nastavak)

Marker	Pozicija	Svojstvo	p	R^2
2D |PpdD1	**98**	Dani do klasanja	0,00003	0,11286
		Visina	0,00311	0,04647
3A |1200629	76	Broj klasića/klas	0,00287	0,07972
		Masa klasa	0,00934	0,06023
3B |1061026	51	Dani do klasanja	0,00911	0,04103
		Masa klasa	0,00112	0,09645
3D |3945116	122	Broj zrna/klas	0,00465	0,06339
		Masa klasa	0,00235	0,07596
5B |2246622	241	Broj zrna/klas	0,00133	0,08274
		Prinos	0,00936	0,04808
5B |3028852	181	Broj zrna/klas	0,00618	0,06327
		Duljina klasa	0,00073	0,07866
6A |1081529	18	Masa 1000 zrna	0,00874	0,05009
		Dani do klasanja	0,00043	0,06962
6B |1054053	166	Dani do klasanja	0,00648	0,03941
		Visina	0,00882	0,03203
6D |3029721	91	Masa 1000 zrna	0,00214	0,06497
		Masa klasa	0,00215	0,08707

3.4.2. Mješoviti linearni model

Za utvrđivanje veza između markera i srednjih vrijednosti agronomskih svojstava, primjenom MLM modela, pored podataka o strukturi populacije korišteni su i podatci o srodnosti. Rezultati MLM analize prikazani su grafički Q-Q (Quantile – Quantile) plotom, radi usporedbe očekivanih p vrijednosti s dobivenim p vrijednostima za svaki pojedini marker. Na Grafikonu 22 vidljivo je da do odvajanja markera od linije očekivanih vrijednosti dolazi pri samome kraju, što ponovno ukazuje na činjenicu da je manji dio markera uistinu bio povezan s ispitivanim svojstvima i da je korišteni model pravilno postavljen.



Grafikon 22. Q-Q plot MLM analize za ispitivana agronomska svojstva

Pored Q-Q plota za prikaz rezultata MLM analize korišten je i Manhattan plot, gdje su na X osi genomskim redom prikazani kromosomi i pozicije na kromosomima, a na Y osi p vrijednosti (prikazane kao $-\log_{10}$) za svaki pojedini marker. Manhattan plot napravljen je za svako agronomsko svojstvo pojedinačno (Grafikoni 23 - 30).

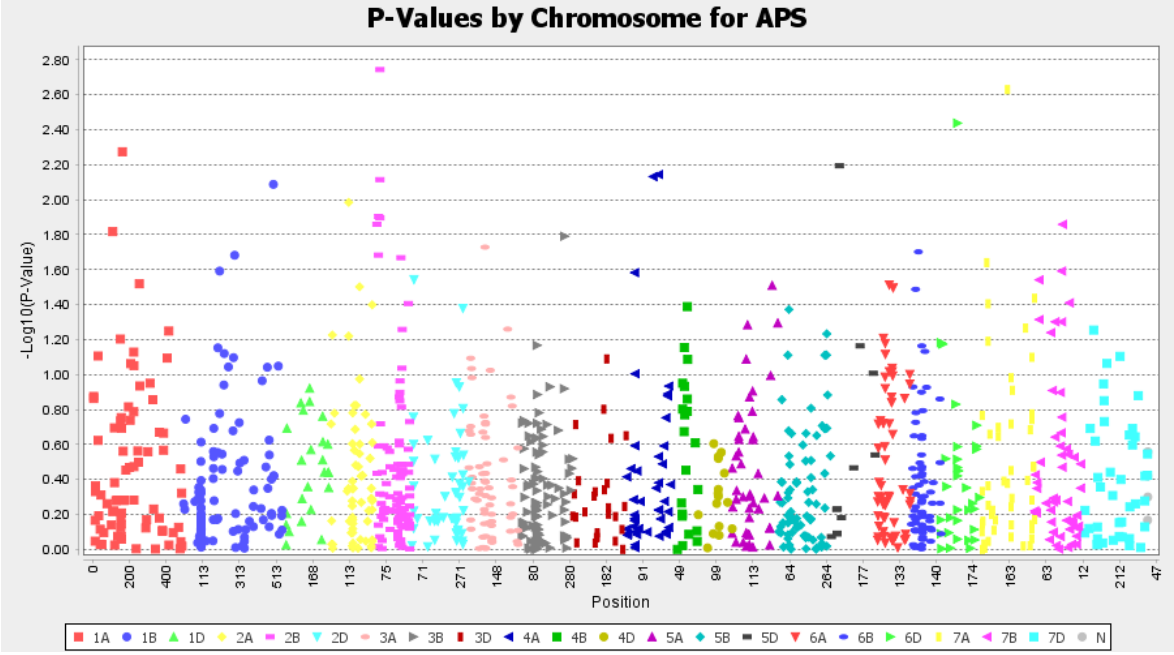
Primjenom mješovitog lineranog modela utvrđeno je postojanje 363 značajne veze ($p < 0,05$), odnosno 71 visoko značajna veza ($p < 0,01$).

Od 363 značajne veze, njih 131 utvrđeno je na A genomu, 146 na B genomu i 86 na D genomu pšenice. Najveći broj značajnih veza utvrđen je za svojstvo visine biljke, njih 61. Za svojstvo prinosa utvrđene su 54 značajne veze, masu klasa 47 veza, broj dana do klasanja 45 veza, masu 1000 zrna 44 veze, duljinu klasa i broj zrna po klasu 39 veza, te za broj klasića po klasu 34 veze.

Od 71 visoko značajne veze, njih 23 utvrđene su na A genomu, 26 na B genomu i 22 na D genomu. Najveći broj veza utvrđen je za svojstva mase klasa i visine biljke (13), a najmanji za duljinu klasa (3). Broj dana do klasanja bio je povezan sa sedam DArT markera, od čega četiri na D genomu, dva na B genomu i jedan na A genomu, te jednim funkcionalnim markerom – PpdD1. Visina biljke bila je povezana s 11 DArT markera, od čega pet na A genomu, pet na B genomu i jedan na D genomu, kao i dva funkcionalna markera – PpdD1 i RhtB1. Tri markera bila su povezana s duljinom klasa, dva na A genomu i jedan na D genomu. Masa klasa bila je povezana s 13 markera, pet na A genomu i po četiri na B i D genomu. Četiri markera bila su povezana s brojem klasića po klasu, dva na B genomu i po jedan na A i D genomu. Broj zrna po klasu bio je povezan s deset DArT markera, od čega četiri na B genomu, tri na A genomu i tri na D genomu, te jednim funkcionalnim markerom – RhtD1. Devet markera bilo je povezano s masom 1000 zrna, četiri na A genomu, tri na B genomu i dva na D genomu. Prinos je bio povezan s deset markera, od čega pet na B genomu, tri na D genomu i dva na A genomu. Pojedinačne R^2 vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,05 do 0,165 (Tablice 37 – 44).

Tablica 37. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s masom 1000 zrna (MLM)

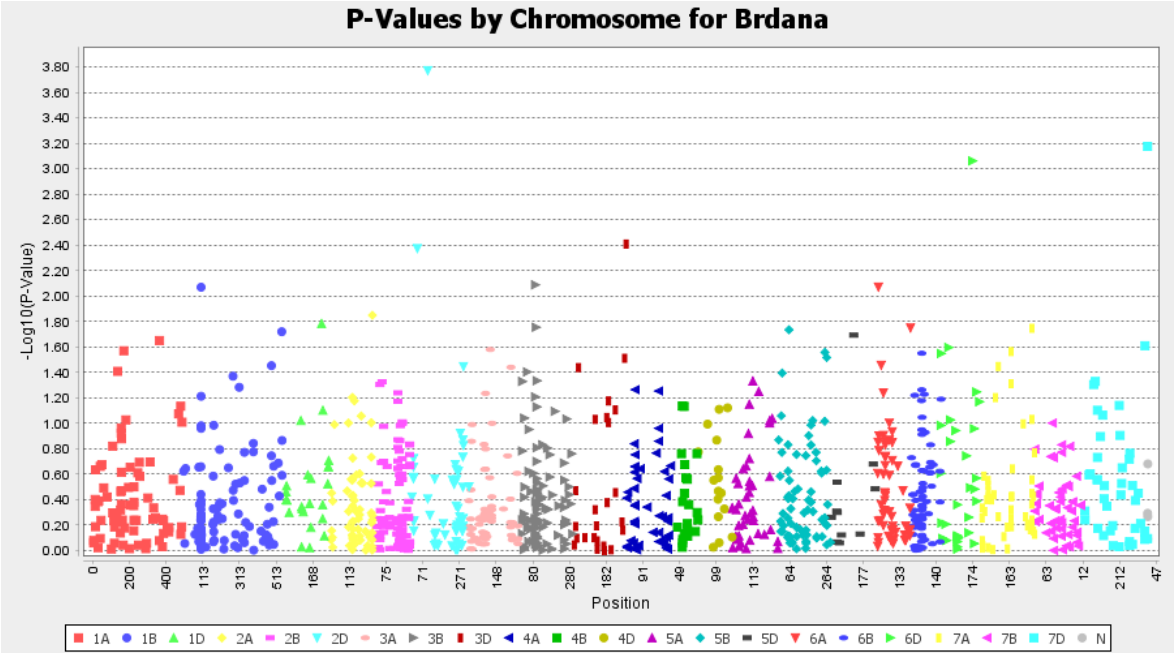
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Masa 1000 zrna	1127429	2B	41	0,00180	0,09032
	988886	7A	152	0,00235	0,09367
	3029721	6D	91	0,00364	0,08027
	1695844	1A	162	0,00532	0,06653
	1162660	5D	49	0,00639	0,06568
	1076980	4A	177	0,00718	0,07233
	1022943	4A	146	0,00738	0,06344
	3023900	2B	41	0,00767	0,06659
	982151	1B	498	0,00817	0,05971



Grafikon 23. Manhattan plot MLM analize za svojstvo mase 1000 zrna

Tablica 38. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s brojem dana do klasanja (MLM)

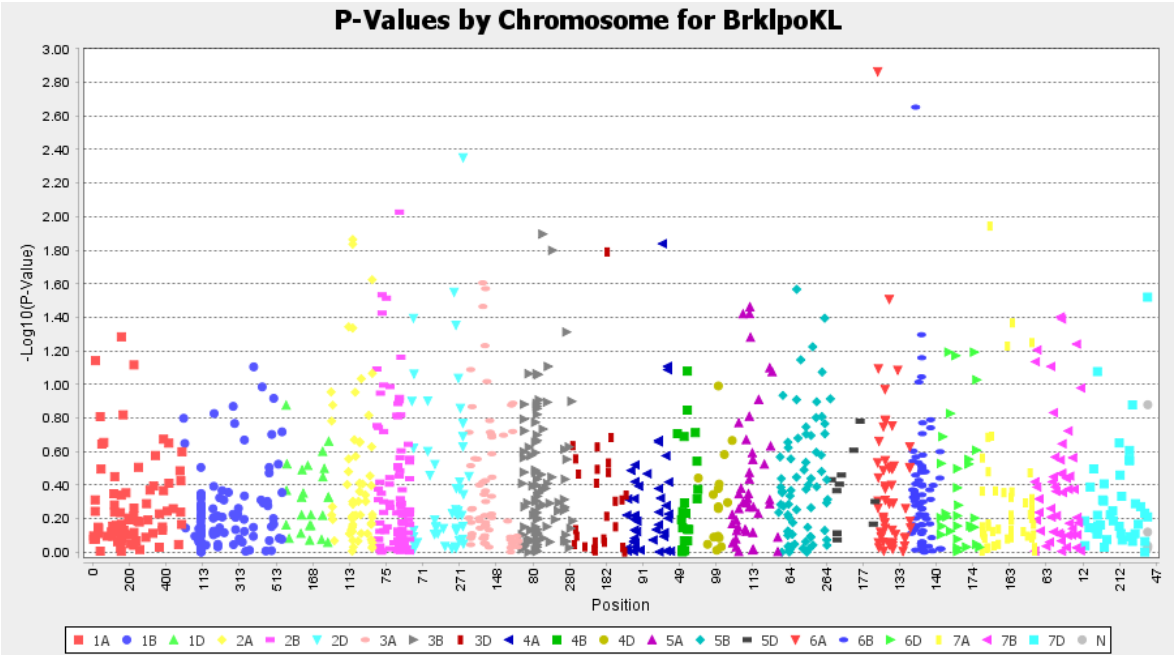
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj dana do klasanja	PpdD1	2D	98	0,00017	0,16545
	1088801	7D	365	0,00067	0,10976
	1216592	6D	173	0,00087	0,10271
	3020731	3D	291	0,00390	0,07285
	1127467	2D	41	0,00424	0,09019
	3959956	3B	95	0,00816	0,06084
	1081529	6A	18	0,00850	0,09092
	3021703	1B	104	0,00853	0,06796



Grafikon 24. Manhattan plot MLM analize za svojstvo broja dana do klasanja

Tablica 39. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s brojem klasića/klasu (MLM)

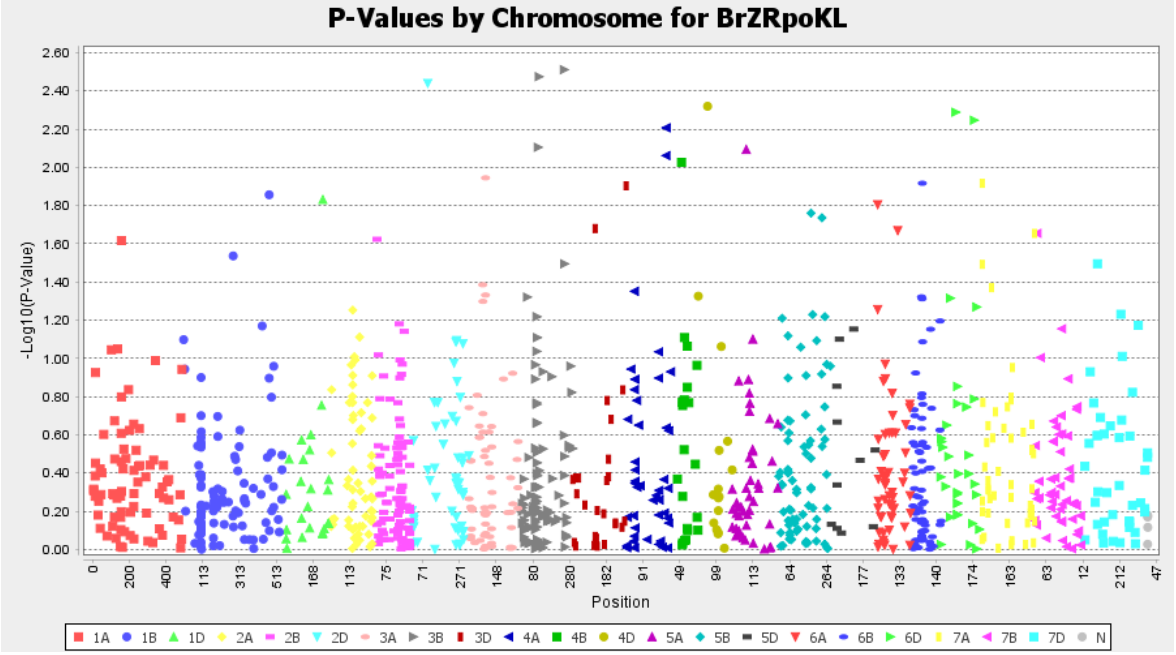
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj klasića po klasu	1025472	6A	14	0,00137	0,10375
	1033342	6B	28	0,00222	0,09892
	2251212	2D	291	0,00446	0,09310
	1095108	2B	148	0,00939	0,06840



Grafikon 25. Manhattan plot MLM analize za svojstvo broja klasića po klasu

Tablica 40. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s brojem zrna/klasu (MLM)

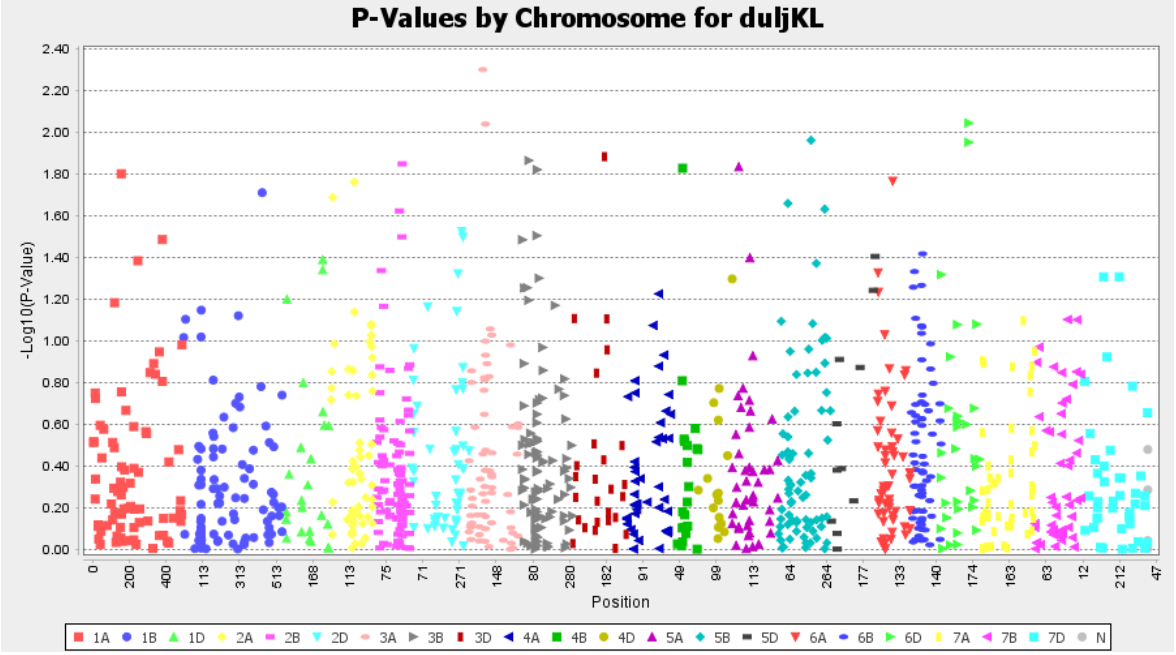
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Broj zrna po klasu	1097596	3B	252	0,00308	0,07691
	3025278	3B	115	0,00335	0,07923
	3023733	2D	98	0,00364	0,08097
	RhtD1	4D	52	0,00479	0,07315
	1666805	6D	81	0,00514	0,07310
	1009886	6D	182	0,00567	0,06757
	1009966	4A	218	0,00621	0,06550
	1018393	3B	110	0,00786	0,06158
	1023146	5A	77	0,00806	0,07888
	1017687	4A	217	0,00868	0,05997
	5579693	4B	60	0,00942	0,05866



Grafikon 26. Manhattan plot MLM analize za svojstvo broja zrna po klasu

Tablica 41. Markeri u visoko značajnoj vezi ($p < 0,01$) s duljinom klasa (MLM)

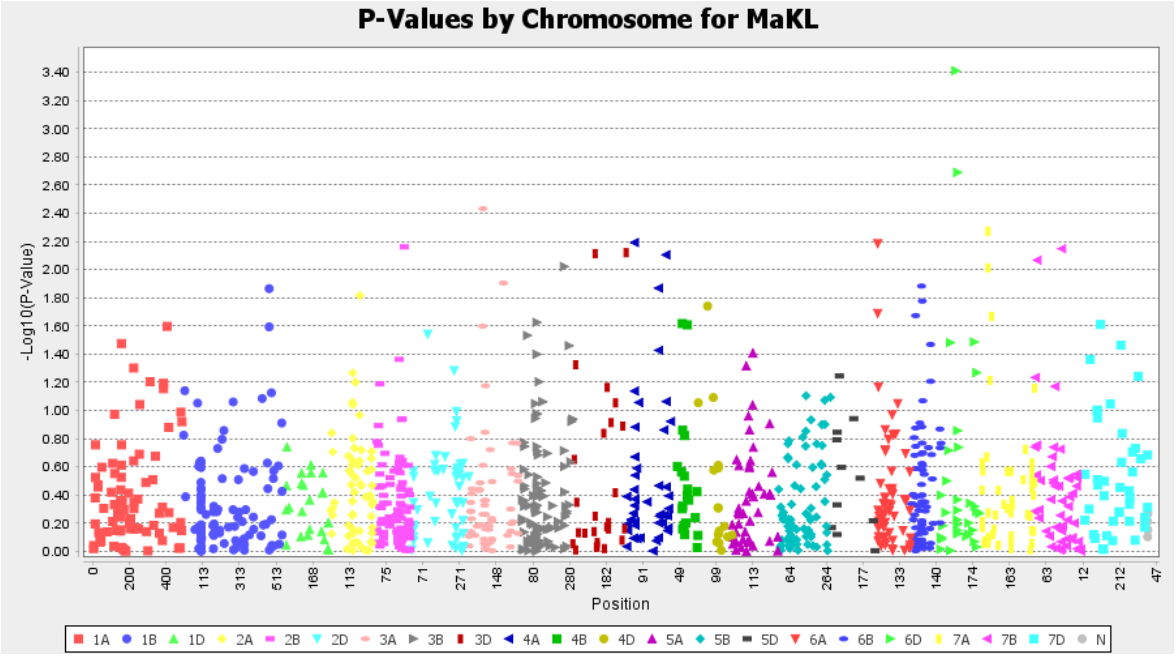
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Duljina klasa	996545	3A	75	0,00503	0,06942
	1142450	6D	152	0,00906	0,05983
	3064920	3A	90	0,00917	0,08851



Grafikon 27. Manhattan plot MLM analize za svojstvo duljine klasa

Tablica 42. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s masom klasa (MLM)

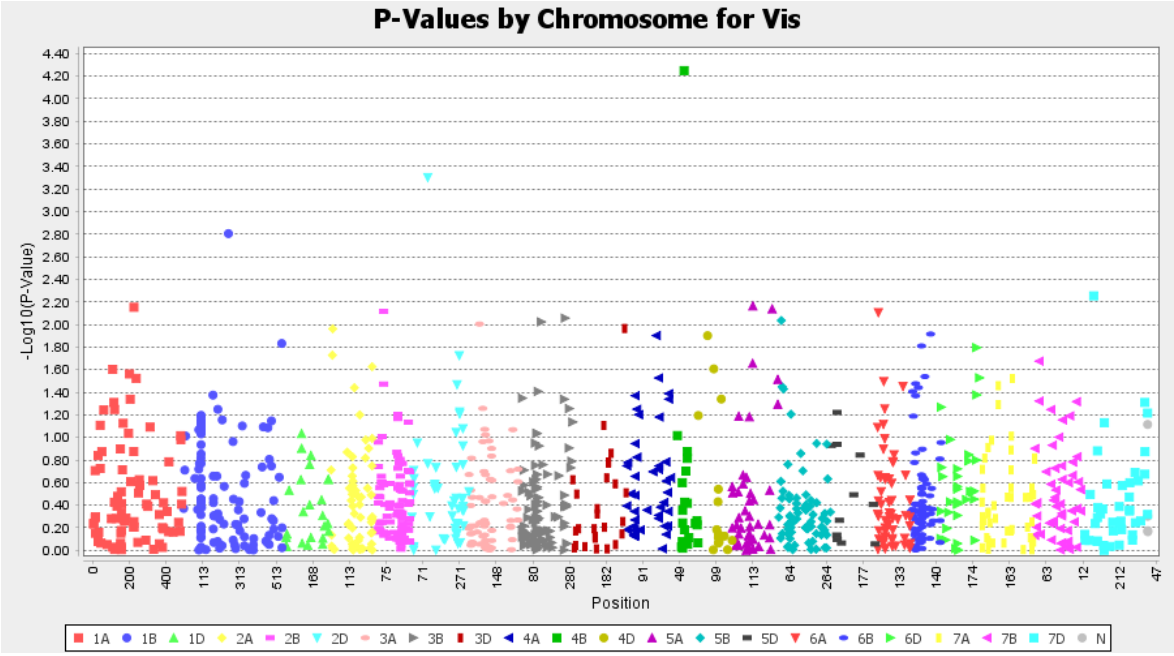
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Masa klasa	1666805	6D	81	0,00039	0,11721
	3029721	6D	91	0,00204	0,08945
	1200629	3A	76	0,00370	0,07888
	3028330	7A	46	0,00536	0,07638
	1106520	4A	45	0,00643	0,06552
	1066966	6A	14	0,00655	0,06573
	1046334	2B	174	0,00690	0,06518
	1767005	7B	147	0,00712	0,08207
	3020731	3D	291	0,00759	0,06272
	3945116	3D	122	0,00769	0,06251
	1017687	4A	217	0,00786	0,06214
	1021726	7B	13	0,00858	0,06244
	1097596	3B	252	0,00951	0,05906



Grafikon 28. Manhattan plot MLM analize za svojstvo mase klasa

Tablica 43. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s visinom biljke (MLM)

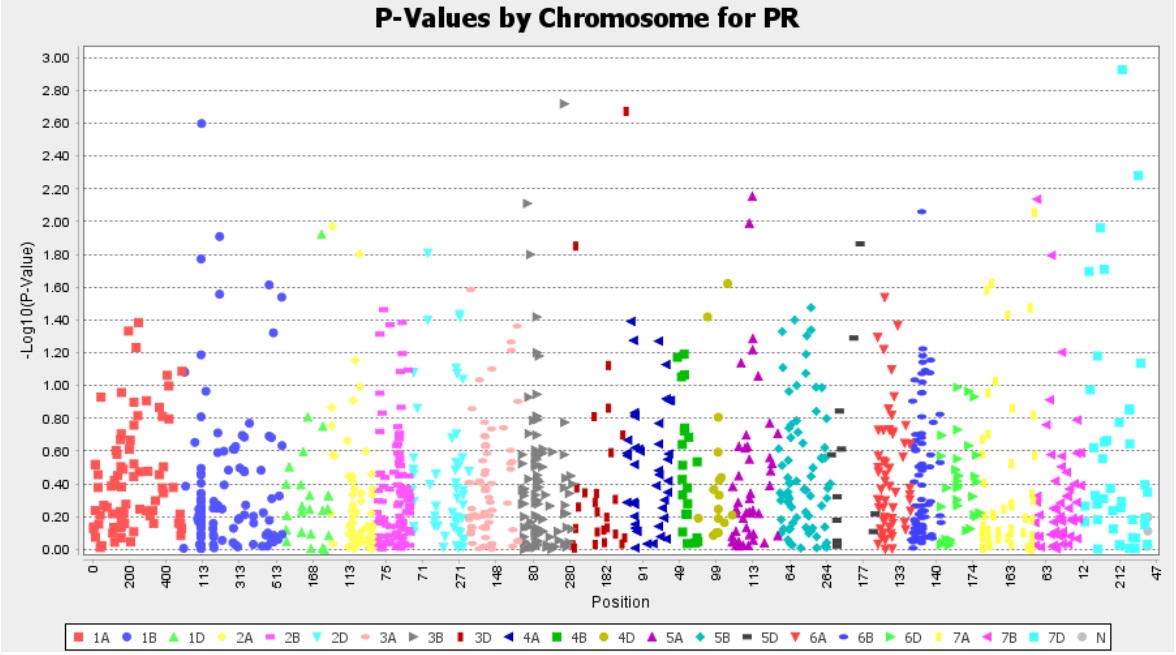
Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Visina	RhtB1	4B	74	0,00006	0,14346
	PpdD1	2D	98	0,00050	0,11501
	3025563	1B	253	0,00157	0,08135
	1022386	7D	71	0,00558	0,06798
	1093408	5A	113	0,00686	0,07879
	2252888	1A	225	0,00704	0,06004
	3026875	5A	218	0,00727	0,05689
	3029885	2B	62	0,00766	0,06646
	1046621	6A	18	0,00785	0,05570
	1020597	3B	257	0,00878	0,05408
	999166	5B	19	0,00923	0,07367
	1141633	3B	127	0,00948	0,06489
	1165624	3A	57	0,00991	0,07020



Grafikon 29. Manhattan plot MLM analize za svojstvo visine biljke

Tablica 44. Markeri u visoko značajnoj vezi (p < 0,01) s prinosom (MLM)

Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija	p	R^2
Prinos	1104573	7D	226	0,00118	0,10088
	1097596	3B	252	0,00192	0,08487
	3020731	3D	291	0,00213	0,08309
	1193859	1B	106	0,00253	0,09882
	982908	7D	314	0,00525	0,07911
	1058457	5A	110	0,00703	0,06558
	1005381	7B	12	0,00732	0,07561
	1061026	3B	51	0,00777	0,06405
	1021652	6B	61	0,00872	0,05991
	1165351	7A	299	0,00881	0,06440



Grafikon 30. Manhattan plot MLM analize za svojstvo prinosa

Na temelju MLM modela utvrđeno je postojanje šest markera s pleiotropnim učinkom, a navedeni su u Tablici 45. Za dva DArT markera utvrđena je povezanost sa po tri ispitivana svojstva. Povezanost s dva ispitivana svojstva utvrđena je za tri DArT markera te jedan funkcionalni marker (PpdD1).

Tablica 45. Pleiotropni markeri prema MLM modelu ($p < 0,01$)

Marker	Pozicija	Svojstvo	p	R^2
3B |1097596	252	Broj zrna/klas	0,00308	0,07691
		Masa klasa	0,00951	0,05906
		Prinos	0,00192	0,08487
3D |3020731	291	Dani do klasanja	0,00390	0,07285
		Masa klasa	0,00759	0,06272
		Prinos	0,00213	0,08309
4A |1017687	217	Broj zrna/klas	0,00868	0,05997
		Masa klasa	0,00786	0,06214
6D |1666805	81	Broj zrna/klas	0,00514	0,07310
		Masa klasa	0,00039	0,11721
6D |3029721	91	Masa 1000 zrna	0,00364	0,08027
		Masa klasa	0,00204	0,08945
2D |PpdD1	98	Dani do klasanja	0,00017	0,16545
		Visina	0,00050	0,11501

3.4.3. Usporedba GLM i MLM modela

Primjenom GLM i MLM modela utvrđeno je postojanje 38 visoko značajnih veza ($p < 0,01$) zajedničkih za oba modela, od čega 17 na D genomu, 13 na B genomu i osam na A genomu pšenice (Tablica 46). Najveći broj zajedničkih veza, njih šest, utvrđen je na kromosomu 6D. Broj statistički značajnih veza po pojedinim kromosomima pšenice prikazan je u Tablici 47.

Tablica 46. Broj statistički značajnih veza ($p < 0,01$) po genomima pšenice

Genom pšenice	GLM ($p < 0,01$)	MLM ($p < 0,01$)	GLM ∩ MLM ($p < 0,01$)
A genom	37	23	8
B genom	53	26	13
D genom	37	22	17
Ukupno	127	71	38

Tablica 47. Broj statistički značajnih veza ($p < 0,01$) po kromosomima pšenice

Kromosom pšenice	GLM ($p < 0,01$)	MLM ($p < 0,01$)	GLM ∩ MLM ($p < 0,01$)
1A	3	2	0
1B	9	4	1
1D	2	0	0
2A	6	0	0
2B	11	5	3
2D	9	5	4
3A	6	4	2
3B	12	9	5
3D	6	4	3
4A	6	6	2
4B	2	2	1
4D	5	1	1
5A	1	4	0
5B	8	1	1
5D	2	1	1
6A	7	4	2
6B	9	2	1
6D	10	7	6
7A	8	3	2
7B	2	3	1
7D	3	4	2
Ukupno	127	71	38

Najveći broj zajedničkih veza utvrđen je za svojstvo mase klasa, a najmanji za svojstvo duljine klasa. Primjenom oba modela utvrđeno je postojanje devet visoko značajnih veza ($p < 0,01$) za svojstvo mase klasa, sedam veza za svojstvo broja zrna po klasu, šest veza za svojstvo broja dana do klasanja, po četiri veze za svojstvo mase 1000 zrna i prinosa, po tri veze za svojstvo visine biljke i broja klasića po klasu te dvije veze za svojstvo duljine klasa (Tablica 48).

Tablica 48. Broj statistički značajnih veza ($p < 0,01$) po agronomskim svojstvima

Svojstvo	GLM ($p < 0,01$)	MLM ($p < 0,01$)	GLM ∩ MLM ($p < 0,01$)
Masa klasa	21	13	9
Broj zrna/klas	13	11	7
Dani do klasanja	22	8	6
Masa 1000 zrna	15	9	4
Prinos	12	10	4
Visina biljke	20	13	3
Broj klasića/klas	12	4	3
Duljina klasa	12	3	2
Ukupno	127	71	38

Markeri povezani s masom klasa, prema oba modela, locirani su na kromosomima 2B, 3A, 3B, 3D (2), 4A, 6D (2) i 7A. Markeri povezani s brojem zrna po klasu locirani su na kromosomima 2D, 3B(3), 4A, 4D i 6D, od čega jedan funkcionalni marker – Rht-D1. Markeri povezani s brojem dana do klasanja locirani su na kromosomima 1B, 2D (2), 6A, 6D i 7D, od čega jedan funkcionalni marker – Ppd-D1. Markeri povezani s masom 1000 zrna locirani su na kromosomima 2B, 5D, 6D i 7A. Markeri povezani s prinosom locirani su na kromosomima 3B, 3D, 7B i 7D. Markeri povezani s visinom locirani su na kromosomima 2D, 4B i 5B, od čega dva funkcionalna markera – Rht-B1 i Ppd-D1. Markeri povezani s brojem klasića po klasu locirani su na kromosomima 2B, 6A i 6B. Markeri povezani s duljinom klasa locirani su na kromosomima 3A i 6D (Tablica 49).

Tablica 49. Markeri u statistički značajnoj vezi ($p < 0,01$) s ispitivanim agronomskim svojstvima, prema GLM i MLM modelu

Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija
Masa klasa	1046334	2B	174
	1200629	3A	76
	1097596	3B	252
	3945116	3D	122
	3020731	3D	291
	1106520	4A	45
	1666805	6D	81
	3029721	6D	91
	3028330	7A	46
Broj zrna/klas	3023733	2D	98
	3025278	3B	115
	1097596	3B	252
	1018393	3B	110
	1009966	4A	218
	Rht-D1	4D	52
	1666805	6D	81
Dani do klasanja	3021703	1B	104
	Ppd-D1	2D	98
	1127467	2D	41
	1081529	6A	18
	1216592	6D	173
	1088801	7D	365
Masa 1000 zrna	1127429	2B	41
	1162660	5D	49
	3029721	6D	91
	988886	7A	152

Tablica 49. (nastavak)

Svojstvo	Marker	Kromosom	Pozicija
Prinos	1097596	3B	252
	3020731	3D	291
	1005381	7B	12
	982908	7D	314
Visina	Ppd-D1	2D	98
	Rht-B1	4B	74
	999166	5B	19
Broj klasića/klas	1095108	2B	148
	1025472	6A	14
	1033342	6B	28
Duljina klasa	996545	3A	75
	1142450	6D	152

Za pet markera utvrđeno je da su pleiotropni prema oba modela. Od toga četiri DArT markera povezana sa po dva ili tri ispitivana svojstva, te jedan funkcionalni marker, Ppd-D1, povezan s dva ispitivana svojstva (Tablica 50).

Tablica 50. Pleiotropni markeri, prema GLM i MLM modelu ($p < 0,01$)

Marker	Kromosom	Pozicija	Svojstvo
1097596	3B	252	Broj zrna/klas
			Masa klasa
			Prinos
3020731	3D	291	Dani do klasanja
			Masa klasa
			Prinos
1666805	6D	81	Broj zrna/klas
			Masa klasa
3029721	6D	91	Masa 1000 zrna
			Masa klasa
Ppd-D1	2D	98	Dani do klasanja
			Visina

4. RASPRAVA

4.1. Fenotipska analiza

Od samih početaka oplemenjivanja bilja prirodno prisutna varijabilnost i raznolikost intenzivno je korištena za poboljšanje biljnih vrsta, a danas u kontekstu sve izraženijih klimatskih promjena na nju je stavljen poseban fokus (Bhandari i sur., 2017.). Genetska varijabilnost ili raznolikost predstavlja osnovu uspješnog oplemenjivačkog procesa (Naheed i sur., 2016.) budući da efikasnost selekcije uvelike ovisi o rasponu genetske varijabilnosti koja je prisutna u nekoj biljnoj populaciji (Farshadfar i sur., 2013.). Ispitivanja genetske varijabilnosti daju nam vrijedne podatke o variranju pojedinih svojstava u nekom eksperimentalnom materijalu (Wani i sur., 2018.), a koji mogu biti od velike koristi prilikom planiranja oplemenjivačkih programa.

Na temelju koeficijenata varijacije (%) dobivenih u provedenom istraživanju može se zaključiti da postoji velika varijabilnost unutar odabranog biljnog materijala u pogledu svih ispitivanih fenotipskih svojstava. Najveći koeficijent varijacije među ispitivanim svojstvima zabilježen je kod prinosa (25,67 %), što je i očekivano s obzirom da se radi o kompleksnom kvantitativnom svojstvu, koje je pod utjecajem velikog broja minor gena, ali i velikim utjecajem okoline.

Iz klimatoloških podataka prikazanih u radu vidljivo je da su se četiri vegetacijske godine znatno razlikovale. Ispitivanje genotipova pšenice u različitim klimatskim uvjetima može nam dati dobar uvid u adaptabilnost istih te pomoći u odabiru roditelja za buduća križanja i razvoju novih kultivara široke adaptabilnosti. Thillainathan i Fernandez (2001.) navode da su adaptabilni genotipovi oni koji pokazuju kontinuitet u svojim performansama u širokom rasponu okruženja, dok se oni genotipovi kod kojih je izražen utjecaj interakcije genotip x okolina smatraju neadaptabilnima.

Varijacije u proizvodnji žitarica direktno su povezane s variranjem oborina i temperatura, što je vidljivo i iz povijesnih zapisa (Hatfield i Dold, 2018.). Prema Ray i sur. (2015.) klimatske promjene mogu objasniti 31-51 % varijabilnosti u prinosu pšenice na području zapadne Europe, 23-66 % varijabilnosti na području istočne Europe te 15-45 % varijabilnosti na području južne Europe.

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj godine pokusa na sva ispitivana agronomska svojstva pšenice. Na temelju post hoc testa utvrđeno je da se 2013./2014. godina

značajno razlikovala od svih ostalih u pogledu čak pet agronomskih svojstava – duljine klasa, mase klasa, mase 1000 zrna, prinosa i broja dana do klasanja.

U 2013./2014. godini zabilježen je najmanji prosječni prinos, čak za 40 % manji u odnosu na ostale ispitivane godine. Također, u istoj godini zabilježene su i najmanje prosječne vrijednosti za pojedine komponente prinosa, kao što su broj zrna po klasu, masa 1000 zrna i masa klasa. Razlog tomu leži u specifičnim vremenskim prilikama koje su obilježile spomenutu vegetacijsku godinu. Naime, proljeće su obilježile prekomjerne oborine i poplave, a visoke temperature nakon obilnih kiša pogodovale su razvoju bolesti. Zampieri i sur. (2017.) navode da suprotno uvriježenom mišljenju, suvišak vode može imati veći utjecaj na produktivnost pšenice nego suša, te može dovesti do širenja bolesti i štetnika, ispiranja hraniva, anoksije, ali i nemogućnosti obavljanja radova u polju (sjetva, zaštita, žetva). Drezner (2014.) navodi značajne štete na usjevima pšenice nastale uslijed nezapamćene epidemije žute hrđe u istočnoj Hrvatskoj i u susjednim zemljama u 2014. godini.

Prvu vegetacijsku godinu obilježile su i iznadprosječne temeprature. Asseng i sur. (2015.) navode da na globalnoj razini povećanje temperature za jedan stupanj (°C) dovodi do smanjenja prinosa pšenice za do 6 %. Smanjenje prinosa uslijed rasta temperatura posljedica je ubrzanog razvoja pšenice i kraćeg trajanja faze nalijevanja zrna (Mäkinen i sur., 2018.). Za pšenicu je nepovoljnije kada se visoke temperature pojave tijekom reproduktivne faze nego vegetativne, budući da visoka temperatura ima direktan utjecaj na broj i masu zrna pšenice (Narayanan, 2018.). Španić (2016.) navodi da je pšenica najosjetljivija na visoke temperature u fazi nalijevanja zrna i pred zriobu.

Zhang i sur. (2010.b) utvrdili su da je povećanjem temperature za 2,3°C došlo do ranijeg klasanja pšenice za 9-14 dana. Modarresi i sur. (2010.) navode da je visoka temperatura značajno utjecala na smanjenje prinosa (46,63 %), mase 1000 zrna (20,61 %) i trajanje faze nalijevanja zrna (20,42 %), a nešto manje na smanjenje broja klasića po klasu (11,77 %). Tian i sur. (2014.) s druge strane navode da je utvrđeno povećanje prinosa pšenice uslijed povećanja temperature zraka za 1,5°C što objašnjavaju smanjenjem negativnog utjecaja niskih temperatura i ranijom cvatnjom.

U 2013./2014. godini zabilježen je i najmanji prosječni broj dana do klasanja, ali i velika visina biljaka. Razlog tomu mogu biti i visoke temperature u zimskom periodu, koje su potaknule bujni razvoj pšenice. Li i sur. (2013.) navode da je ozima pšenica posebno

osjetljiva na povećanje temperature tijekom zimskog perioda zbog svoje potrebe za vernalizacijom.

Za razliku od 2013./2014. godine, u 2016./2017. zabilježene su najveće prosječne vrijednosti prinosa, broja zrna po klasu, mase 1000 zrna i mase klasa. Godinu su obilježile nešto niže temperature zraka u periodu od listopada 2016. do veljače 2017., za razliku od istog perioda vegetacijske godine 2013./2014. Tako je primjerice u siječnju 2017. zabilježena prosječna temperatura zraka od – 5,5 ºC, dok je u siječnju 2014. ona iznosila + 3,2 ºC. Pored hladne zime, razvoju pšenice pogodovale su i umjerene oborine u svibnju i lipnju 2017. godine.

Najmanje variranje agronomskih svojstava između godina zabilježeno je kod njemačkih, talijanskih, francuskih i hrvatskih kultivara. Ovdje se posebno ističe njemački kultivar Altos, koji se pokazao najstabilnijim u pogledu svih ispitivanih agronomskih svojstava, a prvenstveno prinosa.

S obzirom na razdoblje priznavanja utvrđeno je da kultivari koji su priznati ranije, do 50-ih godina prošloga stoljeća, imaju manji prosječni broj zrna po klasu, gustoću klasa, masu 1000 zrna, prinos, ali i veću prosječnu visinu. Najveće prosječne vrijednosti broja zrna po klasu, gustoće klasa, mase 1000 zrna i prinosa zabilježene su kod kultivara koji su priznati kasnije, u periodu od 2000. godine do danas. Kod kasnije priznatih kultivara zabilježena je i najmanja prosječna visina biljaka.

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj godine priznavanja na sva ispitivana svojstva pšenice, izuzev broja klasića po klasu, broja dana do klasanja i osjatosti. U pogledu visine biljaka utvrđene su statistički značajne razlike između svih perioda priznavanja, izuzev zadnja dva, 1980.- 2000. i 2000. do danas. Duljina klasa i gustoća klasa kultivara priznatih u prvom periodu (1900. – 1950.), značajno se razlikovala od svih ostalih. U pogledu broja zrna po klasu i mase klasa, utvrđeno je da se prvi period priznavanja značajno razlikovao od svih ostalih, ali i da se period 1950. – 1980. značajno razlikovao od perioda 1980. – 2000. Kod mase 1000 zrna utvrđeno je da postoje značajne razlike između prvog perioda priznavanja (1900. – 1950.) i razdoblja od 1980. pa do danas. Za svojstvo prinosa utvrđene su statistički značajne razlike između svih perioda priznavanja, izuzev zadnja dva, 1980.- 2000. i 2000. do danas.

Značajan iskorak u povećanju prinosa pšenice dogodio se 60-ih godina prošloga stoljeća kada je došlo do „zelene revolucije“ i razvoja modernih visokoprinosnih kultivara pšenice.

Veći prinos postignut je snižavanjem visine stabljike (introdukcijom Rht gena iz japanskih kultivara pšenice), zbog čega su novi kultivari postali otporniji na polijeganje te bolje podnosili uvjete intenzivne gnojidbe. Davies (2003.) navodi da je svjetska proizvodnja pšenice 1966. godine iznosila 308 milijuna tona, a 1990. godine 541 milijun tona. Prosječni prinos pšenice 1961. godine iznosio je 1,09 t/ha, a trideset godina kasnije, 1991. godine, čak 2,47 t/ha (Briggs, 2009.). Fischer i Edmeades (2010.) navode da je u periodu od 1988. do 2007. na globalnoj razini utvrđen linerani trend porasta prinosa pšenice od 25 kg/ha/god. Iako je prinos žitarica rastao gotovo linearno od vremena „zelene revolucije“ postoje naznake da je prinos pšenice dosegao plato u pojedinim područjima (Lin i sur., 2012.).

Introdukcijom Rht gena u oplemenjivačke programe diljem svijeta nekada visoke pšenice (120 - 140 cm) zamjenjene su patuljastim (60 - 90 cm) i polupatuljastim (90 - 120 cm) kultivarima (Bonjean i Angus, 2001.). Berry i sur. (2015.) su ispitivanjem engleskih kultivara pšenice utvrdili da su kultivari introducirani između 1970. i 1980. godine smanjili visinu pšenice sa 110 cm na 95 cm, a do 90-ih godina visina je smanjena na 88 cm. Između 1990. i 2013. godine nisu utvrđene značajne promjene u visini biljaka. Ormoli i sur. (2015.) su ispitivanjem talijanskih kultivara utvrdili da postoji trend smanjenja visine (> 80 cm) i broja dana do klasanja od starijih prema novijim kultivarima, ali i trend povećanja gustoće klasa uz smanjenje veličine zrna. Promjene u broju klasića po klasu nisu utvrđene, kao i u predmetnom istraživanju.

Istraživanjem je utvrđen i statistički značajan utjecaj grupe, odnosno geografskog podrijetla, na sva ispitivana svojstva pšenice, izuzev broja zrna po klasu. Grupe su se međusobno najviše razlikovale u pogledu prinosa i visine.

Najmanje prosječne visine zabilježene su kod kultivara iz zapadne Europe, južne Europe i Hrvatske i Srbije, a najveće kod onih iz Sjeverne Amerike. Najmanji prosječni broj dana do klasanja imali su kultivari iz južne Europe, Hrvatske i Srbije, a najveći oni iz srednje i zapadne Europe.

Borojević i Borojević (2005.a) navode da je Rht8 gen (podrijetlom iz japanskog kultivara Akakomugi) prvotno prenešen u talijanske kultivare pšenice, koji su 50-ih godina prošloga stoljeća došli na područje bivše Jugoslavije, srednje i južne Europe, a gdje su intenzivno korišteni u oplemenjivačkim programima pšenice. Zajedno s Rht8 genom u kultivare je nehotice unešen i Ppd-D1a alel (zbog uske vezanosti na kromosomu), a koji uvjetuje neosjetljivost na fotoperiod (Kowalski i sur., 2016.). Također, u sjevernijim krajevima

selekcija pšenice provodi se u smjeru kasnijeg klasanja/cvatnje, kako bi se klas zaštitio od hladnoće, dok u južnijim krajevima selekcija ide u smjeru ranijeg klasanja/cvatnje pšenice, kako bi se izbjegao temperaturni stres (Grogan i sur., 2016.).

Najmanju prosječnu masu 1000 zrna imali su kultivari iz Sjeverne Amerike, Azije i Australije, a najveću kultivari iz istočne Europe. Najmanji prosječni prinos također je zabilježen kod kultivara iz Sjeverne Amerike, Azije i Australije, a najveći kod kultivara iz zapadne Europe. Uzrok lošijem prinosu kultivara iz Sjeverne Amerike, Azije i Australije može biti i njihova godina priznavanja, budući da se mahom radi o starijim kultivarima, ali i njihova prilagođenost na drugačije uvjete okoline.

Dabi i sur. (2019.) navode da direktna selekcija za svojstvo prinosa može biti varljiva, budući da se radi o kompleksnom poligenskom svojstvu, te je za efikasno provođenje oplemenjivačkog procesa nužno poznavati veze između prinosa i komponenti prinosa. Korelacijskom analizom moguće je razložiti kompleksnost svojstava te utvrditi utječe li selekcija za određeno svojstvo i na neka druga svojstva te koje su indirektne dobiti od selekcije koreliranih svojstava (Wani i sur., 2018.).

Najveći broj korelacija između svojstava ispitivanih u provedenom istraživanju bio je vrlo slab ili slab. Najjača pozitivna korelacija utvrđena je između broja zrna po klasu i mase klasa. Prinos je bio u pozitivnoj korelaciji s masom klasa, brojem zrna po klasu, brojem dana do klasanja i masom 1000 zrna, te negativnoj korelaciji s visinom biljke. Slične rezultate navodi Desheva (2016.) koji je utvrdio pozitivnu korelaciju prinosa s brojem zrna po klasu, masom zrna po klasu i masom 1000 zrna, ali i brojem klasića po klasu. Akram i sur. (2008.) navode negativnu korelaciju visine biljke i prinosa zrna, što je u skladu s dobivenim rezultatima. Ayer i sur. (2017.) potvrđuju pozitivnu korelaciju prinosa zrna s masom 1000 zrna i brojem zrna po klasu, ali navode i pozitivnu korelaciju s visinom biljke, što nije slučaj u provedenom istraživanju. Bhattarai i sur. (2017.) također navode da je prinos u pozitivnoj korelaciji s visinom biljke. Pozitivnu korelaciju prinosa zrna s brojem klasića i masom 1000 zrna navode i Janmohammadi i sur. (2014.). Bazzaz i sur. (2014.) utvrdili su pozitivnu korelaciju između broja dana do klasanja i prinosa, što je u skladu s dobivenim rezultatima, dok Wani i sur. (2018.) navode negativnu korelaciju između istih. Iako je iz dostupnih istraživanja vidljivo da pojedina agronomska svojstva zbilja imaju utjecaja na prinos pšenice, korelacije između pojedinih komponenti prinosa mogu se razlikovati, što se uglavnom pripisuje utjecaju okolišnih čimbenika (Asseng i sur., 2002.; Petrović i sur., 2017.).

Na temelju regresijske analize utvrđeno je da najveći dio varijabilnosti prinosa pšenice objašnjavaju svojstva broja zrna po klasu, visine, mase klasa i mase 1000 zrna. Visina biljke i masa 1000 zrna ušle su u regresijski model sve četiri godine pokusa, a masa klasa i broj zrna po klasu u regresijski model tri godine pokusa. Dobiveni regresijski modeli imali su relativno niske R^2 vrijednosti što može biti posljedica velikih razlika između ispitivanih kultivara, ali i činjenice da je prinos kompleksno svojstvo na koje utječe i veliki broj drugih svojstava i vanjskih činitelja. Neka od svojstava koja su ušla u regresijske modele navode i drugi autori u svojim radovima. Shamsi i sur. (2011.) tako navode da regresijski model koji uključuje broj zrna po klasu, broj klasova po m^2 i masu 1000 zrna može objasniti 98 % varijabilnosti prinosa pšenice. Soleymanifard i sur. (2012.) utvrdili su da regresijski model koji uključuje broj klasova po m^2, masu 1000 zrna i visinu biljke može objasniti 75 % varijabilnosti u prinosu pšenice, od čega 43 % broj klasova po m^2, 19 % masa 1000 zrna i 13 % visina. Leilah i Al-Khateeb (2005.) su na temelju regresijske analize utvrdili da svojstvo mase zrna po klasu može objasniti 60 % varijabilnosti u prinosu pšenice. Fouad (2018.) navodi da regresijski model u koji ulaze broj zrna po klasu, broj klasova po biljci i masa 1000 zrna može objasniti 93 % varijabilnosti prinosa pšenice u uvjetima navodnjavanja i 97 % varijabilnosti prinosa pšenice u uvjetima suše. Nešto niže R^2 vrijednosti navode Siahbidi i sur. (2013.) čiji model uključuje masu 1000 zrna, duljinu vrata, broj klasova po m^2 i broj fertilnih vlati, a objašnjava 50 % varijabilnosti prinosa pšenice.

Abderrahmane i sur. (2013.) navode da korelacijski koeficijenti samo ukazuju na stupanj povezanosti svojstava, dok path analiza omogućava razdvajanje korelacijskih koeficijenata na njihove direktne i indirektne učinke kroz druga svojstva. Path analizom utvrđen je direktan pozitivan utjecaj mase klasa, broja zrna po klasu i mase 1000 zrna na prinos, kao i direktan negativan utjecaj broja klasića po klasu na prinos. Najveći indirektan pozitivan utjecaj na prinos imao je broj zrna po klasu preko mase klasa. Slične rezultate navode El-Mohsen i sur. (2014.) koji su utvrdili da najveći direktan pozitivan utjecaj na prinos imaju broj vlati po biljci (0,59), žetveni indeks (0,49), broj zrna po klasu (0,41) i masa 1000 zrna (0,32), a najveći direktan negativni utjecaj broj klasića po klasu. Direktan pozitivan utjecaj mase 1000 zrna i broja zrna po klasu na prinos zrna potvrđuju i drugi autori (Shamsi i sur., 2011.; Poor i sur., 2015.). Carvalho i sur. (2017.) utvrdili su da najveći direktan pozitivan utjecaj na prinos imaju broj zrna po klasu i masa zrna po klasu, a najveći indirektan pozitivan utjecaj masa zrna po klasu preko broja zrna po klasu.

Na temelju korelacijske, regresijske i path analize zaključeno je da su masa klasa, broj zrna po klasu i masa 1000 zrna svojstva koja imaju najveći utjecaj na prinos te se kao takva mogu koristiti u selekciji s ciljem povećanja prinosa pšenice.

4.2. PCR analiza

Otkriće DNA kao molekule nasljeđa dovelo je do razvoja novih tehnologija za njenu analizu te razvoja markera koji se baziraju na DNA polimorfizmu. Variranje DNA sekvenci unutar genoma predstavlja izvor gotovo neograničenog broja markera, koji omogućavaju ispitivanje raznolikosti između organizama direktno na temelju njihova genotipa (Burg, 2017.). Za oplemenjivanje bilja od posebnog su značaja funkcionalni markeri razvijeni iz polimorfnih regija unutar gena, koje imaju direktan utjecaj na varijabilnost određenog svojstva. Funkcionalni markeri točnije opisuju genetsku varijabilnost i raznolikost prirodnih i oplemenjivačkih populacija te se mogu koristiti za „screening“ poznatih alela unutar istih (Andersen i Lübberstedt, 2003.).

Provedenim istraživanjem utvrđena je veća varijabilnost na Rht-B1 lokusu u odnosu na Rht-D1 lokus, gdje je većina kultivara (84 %) bila nositelj Rht-D1a alela. Nešto drugačije rezultate navode Gao i sur. (2015.) koji su ispitivanjem 102 kultivara pšenice utvrdili frekvenciju Rht-B1b alela od 32,4 % te Rht-B1a alela od 70,6 %. Na Rht-D1 lokusu utvrđena je prisutnost Rht-D1b alela kod 58,8 % ispitivanih kultivara te Rht-D1a alela kod njih 42,2 %. Tošović-Marić i sur. (2008.) su na uzorku od 172 genotipa heksaploidne pšenice, iz preko 20 zemalja svijeta, utvrdili frekvencije Rht-B1b, Rht-D1b i Rht8 gena od redom 40 %, 22 % i 62 %. Autori navode da razlike u frekvenciji gena između različitih istraživanja mogu među ostalim biti i posljedica neodgovarajuće metode za detekciju te nespecifičnog vezanja početnica što može dovesti do lažno pozitivnih rezultata.

Na Ppd-B1 lokusu nije utvrđeno postojanje alelne varijabilnosti budući da kod nijednog od ispitivanih kultivara nije utvrđena prisutnost Ppd-B1a alel. S druge strane, na Ppd-D1 lokusu utvrđeno je postojanje alelne varijabilnosti. Na Vrn lokusima utvrđena je vrlo mala varijabilnost, budući da je većina kultivara bila nositelj recesivnih alela, što je i očekivano s obzirom da se radi o mahom ozimim kultivarima pšenice. Distribuciju alela na Vrn-1 i Ppd-1 lokusima ispitivali su Whittal i sur. (2018.), na uzorku od 203 kultivara ozime pšenice. Najveća varijabilnost utvrđena je za Ppd-D1 lokus, a nakon njega za Ppd-A1 lokus. Na Ppd-B1 lokusu nije utvrđeno postojanje alelne varijabilnosti, budući da su svi genotipovi nosili

Ppd-B1b alel, što je u skladu s našim rezultatima. Ppd-D1b alel utvrđen je kod 62 % kultivara, a Ppd-D1a kod njih 33 %. Ppd-A1b i Ppd-A1a aleli bili su zastupljeni s 83 % i 15 %. Na Vrn-A1, Vrn-B1 i Vrn-D1 lokusima prevladavali su recesivni aleli s redom 79 %, 99 % i 99 %. Petrović i sur. (2012.) navode frekvencije Ppd-D1a i Ppd-D1b alela od 77,5 % i 22,5 %, što odgovara rezultatima dobivenim u provedenom istraživanju. Zhang i sur. (2010.c) su ispitivanjem distribucije Vrn-A1, Vrn-B1 i Vrn-D1 gena, na uzorku od 326 kineskih kultivara pšenice, utvrdili frekvencije recesivnih alela od redom 95 %, 81 % i 33 %.

Prisutnost 1RS translokacije utvrđena je primjenom funkcionalnih markera kod samo manjeg broja ispitivanih kultivara (8 % – 19 %), gdje je redoslijed varijabilnosti bio sljedeći: RIS > PAW 161 > SEC A2/A3 > RYE-NOR. Denčić i sur. (2008.) ispitivali su distribuciju 1RS translokacije na 150 genotipova heksaploidne pšenice podrijetlom iz 18 država. Prisutnost translokacije utvrđena je kod 20,7 % genotipova. Među srpskim kultivarima prisutnost translokacije utvrđena je s frekvencijom od 25,2 %, dok je kod stranih kultivara translokacija utvrđena kod njih 9,3 %. Kumar i sur. (2003.) navode da je 1BL/1RS translokacija bila prisutna s frekvencijom od 47 % unutar germplazme indijske krušne pšenice. Landjeva i sur. (2006.) su ispitivanjem distribucije 1BL/1RS translokacije, na 31 kultivaru bugarske ozime pšenice, utvrdili prisutnost iste kod njih 17 (54 %). Na temelju molekularne analize 107 genotipova turske pšenice Yediay i sur. (2010.) utvrdili su prisutnost 1BL/1RS translokacije od svega 4 %, dok prisutnost 1AL/1RS translokacije nije utvrđena.

TaCwi-A1 lokus pokazao je veću razinu varijabilnosti u odnosu na TaSus2-2B lokus, gdje je haplotip Hap-H utvrđen kod samo jednog od ispitivanih kultivara. Slične rezultate navode i Famina i sur. (2017.). S druge strane, Gao i sur. (2015.) navode frekvenciju Hap-H haplotip od 56,9 % te Hap-L haplotip od 43,1 %.

Među Dreb-1 lokusima utvrđen je sljedeći redoslijed varijabilnosti: Dreb-B1 > Dreb-A1 > Dreb-D1. Huseynova i sur. (2013.) navode frekvencije Dreb-A1 i Dreb-B1 gena od 91,6 % i 8,3 %, dok Dreb-D1 početnice nisu dale očekivane produkte amplifikacije.

Na temelju dobivenih rezultata o distribuciji alela na ispitivanim lokusima pšenice uočeno je da su se distribucije pojedinih alela razlikovale s obzirom na geografsko podrijetlo kultivara i period njihova priznavanja.

Kod novijih kultivara pšenice uočen je trend smanjenja frekvencije divljeg Rht alela i povećanja frekvencije patuljastog alela, u odnosu na starije kultivare pšenice, posebice u

slučaju Rht-B1 lokusa. Do sličnih zaključaka došli su i Guedira i sur. (2010.), koji su ispitivanjem distribucije Rht gena kod modernih i starih kultivara ozime pšenice utvrdili da svi kultivari priznati prije 1964. godine imaju divlji tip alela, dok kod onih priznatih nakon tog perioda dolazi do naglog povećanja frekvencije Rht-B1b i Rht-D1b alela.

Na Ppd-D1 lokusu, Ppd-D1a alel bio je dominantan kod većine ispitivanih kultivara pšenice, osim kod onih podrijetlom iz Sjeverne Amerike. Također, uočeno je da frekvencija Ppd-D1a alela kroz godine lagano raste, a Ppd-D1b alela lagano opada. Yang i sur. (2009.) su utvrdili da zastupljenost Ppd-D1a alela postupno raste od sjevera prema jugu, što ukazuje na vezu fotoperioda i okoline. Također, navode da je Ppd-D1a alel bio prisutan kod većine kultivara priznatih nakon 1970. godine. Veću frekvenciju Ppd-1 osjetljivih alela u sjevernijim geografskim širinama navode Guo i sur. (2010.) te Whittal i sur. (2018.).

Što se tiče Vrn lokusa, kod većine kultivara bili su prisutni recesivni aleli. Na Vrn-A1 lokusu prisutnost dominantnih alela uglavnom je utvrđena kod ne-europskih kultivara pšenice. Kiss i sur. (2014.) su svojim istraživanjem utvrdili da su dominantni aleli Vrn1 gena najmanje bili zastupljeni kod europskih kultivara pšenice. Također, navode da su dominantni Vrn-A1 i Vrn-B1 aleli bili zastupljeniji kod američkih kultivara, a dominantni Vrn-D1 aleli kod azijskih kultivara pšenice.

Prisutnost 1RS translokacije uglavnom je zabilježena kod kultivara podrijetlom iz istočne Europe, ali i onih iz južne Europe, Hrvatske i Srbije. Također, uočeno je da je translokacija bila prisutna većinom kod kultivara priznatih nakon 1980. godine. Wenjun i sur. (1993.) navode da su se kultivari pšenice s 1RS translokacijom raširili diljem svijeta 70-ih i 80-ih godina prošloga stoljeća. 1RS translokacija široko je korištena u oplemenjivačkim programima pšenice preko ruskih kultivara Kavkaz i Aurora te njihovih potomaka (Ren i sur., 2012.).

Unatoč brojnim prednostima funkcionalnih markera određeni nedostatci ograničavaju njihovu primjenu. Andersen i Lübberstedt (2003.) navode da je kod ne-modelnih vrsta, kao što je pšenica, manje od 5 % svih gena opisano kao funkcionalno, ali i da kriterij za opisivanje gena kao funkcionalnih nije dovoljan za uspostavljanje funkcije gena u agronomskom smislu. Bagge i sur. (2007.) navode da je samo manji broj funkcionalnih markera korišten u praktičnom oplemenjivanju te za mnoge od njih veze između polimorfizama i fenotipskih varijacija još treba dodatno potvrditi. Međutim, potvrđivanje veza otežano je zbog aloheksaploidne prirode pšenice i produženog LD-a.

4.3. DArTseq analiza

DArTseq tehnologija, koja se zasniva na GBS pristupu, predstavlja brzu, visoko-propusnu i isplativu metodu za analizu genetske raznolikosti, posebice kod ne-modelnih vrsta i kolekcija germplazme, a DArTseq/SNP markeri pokazali su se kao robusni markeri za analizu genetske raznolikosti i genetsko mapiranje (Baloch i sur., 2017.).

Različite vrste markera međusobno se razlikuju po opsegu svoje informativnosti, a koja ovisi o stupnju polimorfizma (Chesnokov i Artemyeva, 2015.). Shete i sur. (2000.) navode da se marker smatra polimorfnim ako ima najmanje dva alela, a njegov najzastupljeniji alel u populaciji ima frekvenciju od najviše 99 %. Stupanj polimorfizma se obično mjeri pomoću dva parametra. Prvi se naziva PIC (Polymorphic Information Content) ili sadržaj polimorfnih informacija (Botstein i sur., 1980.), a drugi je očekivana heterozigotnost – He (Nei i Roychoudhury, 1974.).

Botstein i sur. (1980.) navode da se markeri s PIC vrijednostima većima od 0,5 smatraju visoko informativnima, oni s PIC vrijednostima između 0,5 i 0,25 srednje informativnima, a oni s PIC vrijednostima manjima od 0,25 slabo informativnima. Prema Hildebrand i sur. (1994.) PIC vrijednosti mogu se kretati u rasponu od 0 do 1, gdje bi vrijednost 0 značila da marker ima samo jedan alel, a vrijednosti 1 da marker može imati beskonačan broj alela. Također, navodi da marker koji ima samo dva alela može imati maksimalnu PIC vrijednost od 0,375 dok markeri s većim brojem alela imaju i veće PIC vrijednosti pa su samim time i informativniji. Chen i sur. (2018.) navode da kod bialelnih markera, kao što su DArT i SNP, maksimalna PIC vrijednost iznosi 0,5, što znači da su manje informativni nego primjerice SSR markeri. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti također se kreću u rasponu 0 - 1, gdje 0 označava nepostojanje heterozigotnosti, a 1 prisutnost velikog broja alela istih frekvencija. (Chesnokov i Artemyeva, 2015.)

U provedenom istraživanju PIC vrijednost kretala se u rasponu od 0,09 do 0,375, s prosjekom od 0,237. Vrijednost He kretala se u rasponu od 0,095 do 0,5, s prosjekom od 0,289. PIC i He vrijednosti nisu bitno varirale između genoma i pojedinih kromosoma pšenice.

Nešto niže PIC i He vrijednosti navode Alipour i sur. (2017.) koji su analizirali 369 genotipova hekasploidne pšenice korištenjem SNP markera. He vrijednost kretala se u rasponu od 0,144 do 0,200, a PIC vrijednosti u rasponu od 0,003 do 0,375 s prosjekom od 0,172. Robbana i sur. (2019.) navode prosječne PIC vrijednosti od 0,165, te prosječne He

vrijednosti od 0,25 za DArTseq markere kod durum pšenice, a što ukazuje na umjerenu razinu genetske raznolikosti.

Vrijednosti slične dobivenima u provedenom istraživanju navode Eltaher i sur. (2018.) koji su za SNP markere utvrdili prosječne He vrijednosti od 0,3 te PIC vrijednosti od 0,25. Autori navode da se SNP markeri smatraju umjereno do slabo informativnima zbog njihove bialelne prirode koja ograničava maksimalnu PIC vrijednost na 0,5. Chao i sur. (2009.) navode prosječne PIC vrijednosti za SNP markere od 0,23, što je u skladu s našim rezultatima. Također, navode da je PIC vrijednost markera na D genomu bila upola manja od onih na A i B genomu, što nije bio slučaj u provedenom istraživanju.

Nešto veće PIC i He vrijednosti navode Lopes i sur. (2015.) koji su ispitivali genetsku raznolikost pšenice na uzorku od 287 linija korištenjem SNP markera. Utvrđena je prosječna He vrijednost od 0,34 te prosječna PIC vrijednost od 0,27. Na D genomu su uočene manje vrijednosti PIC i He u odnosu na A i B genom. El-Esawi i sur. (2018.) ispitivali su genetsku raznolikost austrijske i belgijske germplazme pšenice korištenjem DArT markera. Očekivana heterozigotnost austrijske i belgijske germplazme iznosila je 0,411 i 0,375, a PIC vrijednosti 0,337 i 0,298. Istraživanjem je utvrđena visoka razina genetske raznolikosti. Novoselović i sur. (2016.) su korištenjem DArT markera ispitivali genetsku raznolikost 89 hrvatskih kultivara pšenice te utvrdili prosječne PIC vrijednosti od 0,299, te prosječne He vrijednosti od 0,375.

DArTseq analizu ozime krušne pšenice proveli su Chen i sur. (2018.) te utvrdili da je prosječna PIC vrijednost SNP markera iznosila 0,28 (uz simetričnu distribuciju vrijednosti), a DArT markera 0,33 (uz asimetričnu distribuciju prema većim vrijednostima) te je istraživanjem utvrđena intermedijarna razina genetske raznolikosti. Baloch i sur. (2017.) su na temelju DArTseq i SNP analize durum pšenice utvrdili prosječne PIC vrijednosti od 0,265 i 0,302.

U provedenom istraživanju najveći broj DArTseq markera lociran je na B genomu pšenice, nešto manji na A genomu, a najmanji broj markera na D genomu pšenice. Raspored markera po pojedinačnim kromosomima i homeolognim grupama kromosoma bio je neujednačen. Najveći broj markera lociran je na kromosomu 3B. Slične rezultate kod pšenice potvrđuju i brojni drugi autori.

Francki i sur. (2009.) su radili usporedbu genetskih i citogentskih mapa heksaploidne pšenice korištenjem SSR i DArT marekera te utvrdili da je distribucija markera bila najveća na B

genomu, a najmanja na D genomu pšenice na svakoj od ispitivanih mapa. Jednaku raspodjelu markera po genomima utvrdili su i Nielsen i sur. (2014.) koji su pomoću DArT markera analizirali europske kultivare heksaploidne krušne pšenice. Također, navode da manji broj polimorfnih markera na D genomu upućuje na nižu frekvenciju efektivnih rekombinacija u odnosu na A i B genom.

Zhang i sur. (2011.) navode da je najveći dio DArT markera bio lociran na B genomu pšenice, a najmanji na D genomu, kao i da je raspodjela markera po homeolognim grupama kromosoma bila neujednačena, što je slučaj i u provedenom istraživanju.

Alipour i sur. (2017.) su utvrdili da je najveći broj SNP markera bio mapiran na B genomu pšenice te na 3B kromosomu što je u skladu s ranije navedenim rezultatima. Kao objašnjenje manjeg broja markera lociranih na D genomu navode činjenicu da je D genom najmlađi od ukupno tri genoma pšenice te je izvjesno da su stariji genomi pšenice iskusili duplikacije gena i akumulirali više mutacija, a što je posljedično dovelo do polimorfizma DNA sekvenci. Jednake rezultate navode i Eltaher i sur. (2018.).

Dubcovsky i Dvorak (2007.) navode da kod poliploidnih vrsta kao što je pšenica dolazi do pojave tzv. uskog grla poliploidnosti, gdje mali broj biljaka doprinosi stvaranju nove vrste poliploida te na taj način ograničava početnu genetsku raznolikost. Budući da je mali broj *Aegilops tauschii* genotipova (donor D genoma) sudjelovao u nastanku *Triticum aestivum* za očekivati je da će raznolikost D genoma biti ograničena. Također, učestala križanja i dobra fertilnost hibrida omogućili su kontinuirani prijenos gena između *Triticum aestivum* i tetraploidnih vrsta pšenice što je dovelo do povećanja raznolikosti A i B genoma.

4.4. Analiza strukture populacije

Genetska struktura populacije predstavlja prisutnost genetske diferencijacije između podpopulacija unutar iste. Jedinke unutar podpopulacija sličnije su jedna drugoj nego jedinkama izvan podpopulacije, a kao rezultat različitih genetskih procesa (migracija, mutacija, selekcije, genetskog drifta). Neotkrivena struktura populacije može stvoriti LD između nevezanih lokusa te tako dovesti do povećanja broja lažno pozitivnih veza između markera i svojstava od interesa (Stich i Melchinger, 2010.). Postoje različite metode za analizu strukture populacije pa tako pojedine proučavaju genetsku povezanost pretpostavljenih podpopulacija (F- statistika, AMOVA), filogenezu, ili grupiraju jedinke na temelju genetskih podataka prema genetskoj udaljenosti ili modelu. Zadnjih godina

dominantna je primjena upravo ovih posljednjih, koje se zasnivaju na određenom modelu (Sethuraman, 2013.; Greenbaum i sur., 2016.).

Na temelju dobivenih F_{ST} vrijednosti utvrđeno je da između većine geografskih regija pšenice postoje statistički značajne razlike. Međutim, F_{ST} vrijednosti kretale su se u uskom rasponu, od 0,06 do 0,18. Analizom molekularne varijance utvrđeno je da je najveći dio varijabilnosti (~90 %) uzrokovan razlikama između jedinki. Ovakve rezultate kod pšenice potvrđuju i brojni drugi autori (Zhang i sur., 2011.; Mir i sur., 2012.; Arora i sur., 2014.; Novoselović i sur., 2016. i El-Esawi i sur., 2018.).

Na temelju rezultata Evanno metode zaključeno je da je optimalni broj grupa K = 3, a drugi najbolji K = 4. Porras-Hurtado i sur. (2013.) navode da nije moguće uvijek odrediti točnu vrijednost K te je preporuka izabrati najnižu vrijednost K, a koja maksimalno obuhvaća strukturu prisutnu u određenoj populaciji. Budući da je K = 3 izabran kao optimalan, utvrđeno je postojanje tri glavne grupe ili genska skupa. Najveći broj kultivara pšenice (42 %) bio je svrstan u A grupu, nešto manji broj (37 %) u B grupu, a najmanji broj kultivara (21 %) u C grupu.

Unatoč neujednačenoj raspodjeli kultivara po državama i regijama može se uočiti određena pravilnost u grupiranju kultivara s obzirom na njihovo geografsko podrijetlo. U prvoj grupi tako se nalazila većina francuskih, njemačkih i austrijskih kultivara te dobar dio hrvatskih kultivara (16 od ukupno 38). Također, u prvoj grupi našli su se kultivari iz zemalja zapadne i srednje Europe, kao što su Velika Britanija, Švedska i Slovačka, ali i kultivari podrijetlom iz Argentine, Australije i Indije. S obzirom na geografsko podrijetlo kultivara prvu grupu možemo smatrati zapadnoeuropskim genskim skupom. U drugu grupu svrstani su svi mađarski, ukrajinski, rumunjski i makedonski kultivari, te većina ruskih i srpskih kultivara. Također, u drugoj grupi nalazilo se osam hrvatskih kultivara (od njih 38) te dva talijanska kultivara (od njih šest). S obzirom na navedeno, druga grupa zapravo predstavlja istočnoeuropski genski skup. U trećoj grupi našao se dobar dio hrvatskih kultivara (14 od ukupno 38), tri talijanska kultivara (od njih šest), te kineski i kanadski kultivari. Treća grupa nazvana je južnim ili sredozemnim genskim skupom zbog velikog udjela hrvatske i talijanske germplazme u istoj.

Na temelju analize pedigrea ispitivanih kultivara pšenice (http://wheatpedigree.net/) utvrđeno je da se u svakoj od triju skupina javljaju kultivari dominantno prisutni u pedigreima iste. Tako je uočeno da se kod kultivara koji pripadaju prvoj grupi u pedigreima

najčešće pojavljuje francuski kultivar Cappelle Desprez sa svojim potomcima Nord Desprez i Maris Huntsman te kultivari Hybride Du Joncquois i Vilmorin 27 čijim križanjem je nastao kultivar Cappelle Desprez. Također, u pedigreima prve grupe bio je dominantno prisutan američki kultivar Wisconsin 245, te njemački kultivari Carstens V, VI i VIII.

U drugoj grupi dominantan je bio ruski kultivar Bezostaya-1, njegov sestrinski Bezostaya-4 te njihove roditeljske komponente - ruski kultivar Skorspelka-2 i ukrajinski kultivar Lutescens-17. U pedigreima su bili učestali i potomci Bezostaye-1, ruski kultivar Lutescens-314-H-147 i ukrajinski kultivar Odesskaya-51. Također, dominatno je bio prisutan japanski kultivar Akakomughi koji se nalazi u pedigreu Bezostaye-1 (preko talijanskog kultivara Ardito), te u pedigreima talijanskih kultivara Mara i San Pastore.

U pedigreima treće skupine bio je prisutan hrvatski kultivar Zlatna Dolina te kultivari Leonardo (ITA) i ZG-414-57 (CRO) čijim križanjem je nastala Zlatna Dolina. Također, u pedigreima se učestalo pojavljivao hrvatski kultivar Osječka šišulja ili U-1. Dominantno su bili prisutni i talijanski kultivari Libellula i S-13, američki Thatcher te kanadski Regent, Reward i Marquis (prisutan i u pedigreima U-1, Zlatne Doline i Thatcher-a). Japanski kultivar Akakomughi bio je također široko zastupljen u pedigreima treće skupine preko talijanske germplazme.

Grupiranje kultivara na temelju geografskog podrijetla i pedigrea potvrđuju i drugi autori. Tako Zhang i sur. (2010.a) navode da je analizom elitnih američkih linija pšenice, pomoću 245 SSR markera, utvrđeno postojanje četiri podpopulacije koje su bile strukturirane prema geografskom podrijetlu i klasi pšenice (meka/tvrda). Chen i sur. (2012.) su pomoću 269 SSR markera analizirali kineske kultivare ozime pšenice te utvrdili postojanje tri podpopulacije koje su bile u korelaciji s geografskim podrijetlom. Strukturu argentinske germplazme ispitivali su Vanzetti i sur. (2013.), pomoću 38 markera (biokemijskih, funkcionalnih, neutralnih i usko vezanih za gene), gdje je utvrđeno postojanje tri podpopulacije koje su bile razdvojene u skladu s podrijetlom germplazme korištene u pojedinim oplemenjivačkim programima. Nielsen i sur. (2014.) su analizom europske heksaploidne krušne pšenice, pomoću 1849 DArT markera, utvrdili postojanje dvije podpopulacije koje su bile razdvojene na temelju podrijetla.

Najveći broj ispitivanih kultivara pšenice bio je mješovitog tipa ($Q < 0,75$). Rufo i sur. (2019.) navode da mješovitost kultivara može biti posljedica migracija, inkorporacije alela iz različitih genskih skupova, razmjene germplazme te prisutnosti pojedinih genotipova u

pedigreima kultivara. Kultivari mješovitog tipa mogu predstavljati izvorišne kultivare, poput japanskog kultivara Akakomughi, koji je široko korišten u oplemenjivanju pšenice, pa tako ima udjele pripadnosti u sve tri grupe, posebice u B i C grupi, gdje se očigledno intenzivno koristio u oplemenjivačkim programima. S druge strane, reprezentativni kultivari (Q > 0,90), kojih je bilo 18 %, su oni nastali izraženom selekcijom, a koja je posljedično dovela do sužavanja njihove genetske osnove. Kod mješovitih kultivara podjeljeni udjeli pripadnosti ukazuju na unos novog genetskog materijala. Primjerice, kultivar Zlatna Dolina je reprezentativni kultivar s udjelom pripadnosti od 99 % (grupa C), dok je njegov potomak kultivar Sana mješoviti kultivar kod kojega je očigledno došlo do unosa nove germplazme. Budući da su analizom utvrđena 22 reprezentativna kultivara pšenice u teoriji je moguće zadržavanjem samo tih genotipova obuhvatiti sve gene prisutne u navedena tri genska skupa.

Hrvatski kultivari rasporedili su se u sve tri grupe, najveći broj u A grupu (42 %), potom C grupu (37 %), a najmanji u B grupu (21 %). Najveći broj hrvatskih kultivara (68 %) također je bio mješovitog tipa s udjelima pripadnosti u dvije ili tri grupe. Navedeno ukazuje na korištenje različitih izvora varijabilnosti u oplemenjivačkim programima hrvatske germplazme pšenice.

Talijanski kultivari široko su korišteni u oplemenjivačkim programima zemalja bivše Jugoslavije budući da su bili polupatuljasti, ranozreli i visokoprinosni, za razliku od ondašnjih domaćih kultivara pšenice, a sve zahvaljujući genima podrijetlom od japanskih kultivara Akakomughi i Saitama 27. Veliku ulogu u razvoju talijanskih kultivara imao je Nazareno Strampelli (1932.) koji je prvi u Europi koristio japanski kultivar Akakomughi za povećanje produktivnosti pšenice te je iz njegovog oplemenjivačkog rada proizašao veliki broj kultivara (San Pastore, Libellula, Mara, Fortunato, Ardito i dr.), koji su se koristili diljem Europe pa tako i u zemljama bivše Jugoslavije. Neovisno o Strampellijevim kultivarima pšenice Pavel Lukyanenko (1973.) je u bivšem Sovjetskom Savezu stvorio polupatuljasti kultivar pšenice Bezostaya-1 kojeg je odlikovala visoka kvaliteta zrna. Bezostaya-1 je intenzivno korištena u oplemenjivačkim programima zemalja bivše Jugoslavije kako bi se poboljšala kvaliteta zrna pšenice, ali i otpornost na niske temperature. Svoju adaptabilnost Bezostaya-1 dugovala je vezi Rht8 i Ppd1 gena (podrijetlom iz kultivara Akakomughi), iako izvor navedenih gena u to vrijeme nije bio poznat (Bonjean i Angus, 2001.; Borojević i Borojević, 2005.b). Značaj spomenutih kultivara navode i Jošt i Cox (1990.), koji su ispitivali genetski doprinos predaka jugoslavenskim kultivarima pšenice priznatima između 1967. i 1986. godine, gdje su utvrdili su da je od svih predaka japanski

kultivar Akakomughi imao najveći genetski doprinos, dok su se kultivari Bezostaya-1,-4 i Strampelli najčešće pojavljivali u rodoslovljima ispitivanih kultivara pšenice.

Na temelju klaster analize utvrđeno je postojanje šest glavnih klastera, što znači da je došlo do diferencijacije u odnosu na rezultate metode structure. Međutim, unutar klastera i podklastera uočeno je grupiranje kultivara s obzirom na njihovu pripadnost ranije utvrđenim genskim skupovima (A, B, C). Razdvajanje ranije utvrđenih genskih skupova na manje grupe može ukazivati na postojanje šire genetske varijabilnosti unutar istih. Istočni genski skup (B) tako se razdvojio na čak pet klastera, K1, K2, K3, K4 i K6, a čiji su kultivari sve redom pripadnici B genskog skupa. Reprezentativni predstavnici genskog skupa B smjestili su se u klaster K6. Klaster K5 koji je ujedno i najveći okupio je kultivare iz zapadnog (A) i južnog (C) genskog skupa. Podklasteri 5a i 5e obuhvaćali su najvećim dijelom kultivare iz genskog skupa A. Kultivari reprezentativni za genski skup A smjestili su se u podklaster 5e. Podklaster 5d činili su većinom kultivari iz genskog skupa C (uključujući i reprezentativne kultivare), uz dio kultivara iz skupa A. Unutar podklastera 5b i 5c miješali su se kultivari iz genskog skupa B i A. Prisutnost kultivara istočnog genskog skupa u klasteru K5 vjerojatno je posljedica mješovite genetske osnove istih. Naime, na temelju metode structure za najveći dio kultivara utvrđeno je da su upravo mješovitog tipa. Rufo i sur. (2019.) navode da visok udio mješovitih kultivara može dovesti do nastanka kompleksnije distribucije genotipova po grupama. S druge strane, kod genotipova s izraženom pripadnošću pojedinoj grupi primjena različitih metoda grupiranja obično daje podudarne rezultate. Novoselović i sur. (2016.) tako navode da su kod vrijednosti K=2 svi kultivari imali izraženu pripadnost pojedinoj grupi te su rezultati kao takvi bili podudarni s onima klaster analize. Međutim, kod vrijednosti K=5 došlo je do povećanja broja mješovitih kultivara, što je rezultiralo razdvajanjem ranije utvrđenih grupa. Podudaranje rezultata klaster analize s onima dobivenim metodom structure navode Arora i sur. (2014.) te El-Esawi i sur. (2018.). Prasad i sur. (2009.) navode podudaranje rezultata klaster analize s pedigreima i genetskom pozadinom kultivara.

4.5. Asocijativna analiza

Asocijativno mapiranje, točnije GWA pristup, omogućava postizanje znatno veće rezolucije mapiranja te pruža bolji uvid u genetsku strukturu kompleksnih svojstava u odnosu na klasično QTL mapiranje. Za razliku od QTL mapiranja, GWA pristup kao materijal koristi dostupnu germplazmu čime se izbjegava gubitak vremena za razvoj segregirajuće populacije. Također, koristi se za fenotipizaciju većeg broja svojstava u jednom ciklusu

genotipizacije za razliku od QTL mapiranja, gdje je fokus na specifičnim svojstvima (Li i sur., 2019.). GWA pristup kod pšenice u posljednje vrijeme postaje sve važniji, s posebnim fokusom na svojstvo prinosa i komponente prinosa (Sheoran i sur., 2019.). Relativno malo GWA analiza za prinos i komponente prinosa je provedeno kod pšenice uopće, a još manje kod ozime pšenice. Asocijativne analize učestalije su kod jare pšenice, iako se većina istih odnosi na „candidate gene“ pristup (Ward i sur., 2019.). Liu i sur. (2017.b) navode da identifikacija markera, koji su u značajnoj vezi s genomskim regijama koje kontroliraju agronomska svojstva od interesa, pomaže boljem razumijevanju genetske vrijednosti pojedinih genotipova unutar kolekcija germplazmi.

U provedenom istraživanju na temelju GLM modela utvrđeno je postojanje 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$), a na temelju MLM modela utvrđena je 71 visoko značajna veza ($p < 0,01$). Trideset i osam veza bilo je visoko značajno ($p < 0,01$) u oba primijenjena modela. Broj visoko značajnih veza kod MLM modela tako je bio manji za 44 % u odnosu na GLM model. Rasheed i sur. (2014.) navode smanjenje broja identificiranih lokusa za 60 %, sa 197 kod GLM modela na 79 kod MLM modela. Brbaklić i sur. (2015.) utvrdili su smanjenje broja marker-svojstvo veza sa 192 kod GLM modela na 76 kod MLM modela. Neumann i sur. (2011.) također navode smanjenje broja značajnih veza kod MLM modela u odnosu na GLM za 60 %. Autori navode da razlike između modela ovise o svojstvu koje se ispituje pa tako za analizu određenog svojstva jedan model može biti pogodniji od drugoga. Primjena oba modela korisna je i radi usporedbe rezultata kod već poznatih lokusa.

Najveći broj visoko značajnih veza utvrđen je na B genomu i 3B kromosomu pšenice, a najmanji na D genomu. Slične rezultate navode i Rasheed i sur. (2014.) koji su identificirali 197 marker-svojstvo veza, 60 na A genomu, 109 na B genomu i 28 na D genomu pšenice Jamil i sur. (2019.) navode 139 značajnih marker-svojstvo veza od čega 56 na A genomu, 55 na B genomu i 28 na D genomu pšenice. Bhatta i sur. (2018.) navode nešto drugačije rezultate, gdje je od ukupno 90 značajnih marker-svojstvo veza njih 45 locirano na A genomu, 11 na B genomu i 34 na D genomu pšenice.

Za svojstvo mase 1000 zrna, na temelju oba modela, utvrđene su četiri visoko značajne veze na kromosomima 2B, 7A, 6D i 5D. Deng i sur. (2017.) navode 18 QTL-ova za masu 1000 zrna identificiranih na kromosomima 1A, 1B, 2B, 2D, 3A, 4B, 4D, 5B, 6A, 6D i 7D. Liu i sur. (2014.) su identificirali 15 QTL-ova za masu 1000 zrna na 11 kromosoma pšenice (3A, 3B, 3D, 4A, 4B, 4D, 5A, 5B, 5D, 6A, i 7B). Li i sur. (2019.) navode 12 lokusa povezanih s

masom 1000 zrna na kromosomima 1B, 2A, 2B, 4B (3), 5A, 5B, 6B (2), 6D i 7D, a koji objašnjavaju 6,7 – 13,0 % fenotipske varijacije. Jamil i sur. (2019.) su utvrdili 21 značajnu marker-svojstvo vezu za masu 1000 zrna, s rasponom R^2 vrijednosti 0,09 – 0,18. Yu i sur. (2014.) pronašli su 13 DArT markera povezanih s masom 1000 zrna na kromosomima 1B (76,3 cM), 2B (22,8, 100,8 cM), 3B (53,1, 59,7 cM), 4B (93,8 cM), 5B (16,3, 92,4, 187,4 cM)), 6B (66,1 cM) i 7B (50,4, 55,1, 60,4 cM).

Za svojstvo mase klasa, na temelju GLM i MLM modela, utvrđeno je postojanje devet značajnih veza na kromosomima 6D (2), 3A, 7A, 4A, 2B, 3D, 3B i 7A. Li i sur. (2019.) utvrdili su pet lokusa povezanih s masom klasa na kromosomima 1A, 3A, 4B, i 5B (2), koji objašnjavaju 7,0 – 19,0 % fenotipske varijacije. García-Suárez i sur. (2010.) navode vezu mase klasa s lokusima na kromosomima 1B, 2B, 5A, i 5D.

Za svojstvo broja klasića po klasu, na temelju oba modela, utvrđene su tri visoko značajne veze na kromosomima 6A, 6B i 2B. Liu i sur. (2014.) navode 13 QTL-ova za svojstvo broja fertilnih klasića po klasu, mapiranih na kromosomima 1D, 2A, 2B, 4A, 4B, 6D, 7A i 7D. Yu i sur. (2014.) pronašli su 13 DArT markera povezanih s brojem klasića po klasu, na kromosomima 1B, 2B, 5B, 6B i 7B, čija se R^2 vrijednost kretala u rasponu od 6,15 do 11,29 %.

Za broj zrna po klasu, na temelju GLM i MLM modela utvrđeno je sedam visoko značajnih veza na kromosomima 3B (2), 2D, 4D, 6D, 4A i 3B. Deng i sur. (2017.) identificirali su osam QTL-ova za svojstvo broja zrna po klasu na kromosomima 1A, 2B, 2D, 3B, 3D, 4A, i 7A. Liu i sur. (2014.) navode 13 QTL-ova na kromosomima 2B, 4A, 4B, 4D, 5A, 5D, 6B, 6D, 7A, i 7B za svojstvo broja zrna po klasu. Li i sur. (2019.) utvrdili su devet lokusa povezanih s brojem zrna po klasu, na 1A (2), 2A, 2D, 3A (2), 5B (2) i 7A, a koji objašnjavaju 7,1 – 17,1 % fenotipske varijacije. Jamil i sur. (2019.) su utvrdili osam značajnih veza za svojstvo broja zrna po klasu, s R^2 vrijednostima 0,1 – 0,19.

Za duljinu klasa, na temelju oba modela, utvrđene su dvije visoko značajne veza na kromosomima 3A i 6D. Deng i sur. (2017.) identificirali su 11 QTL-ova za duljinu klasa na kromosomima 2A, 2D, 3A, 4B, 4D, 5D, 6B, i 7B . Liu i sur. (2014.) navode 15 QTL-ova lociranih na kromosomima 1D, 2B, 3A, 3D, 4A, 4B, 4D, 5A, 5B, 5D, 6A, i 7A, povezanih s duljinom klasa. Li i sur. (2019.) identificirali su osam lokusa povezanih s duljinom klasa na kromosomima 2B, 5A (3), 5B (2), 7B i 7D, a koji objašnjavaju 6,7 – 15,0 % fenotipske varijacije. Sheoran i sur. (2019.) utvrdili su postojanje značajnih veza za svojstvo duljine

klasa na kromosomima 1B, 2A, 3A, 3B, 3D, 5A, 7A, i 7B, koji doprinose fenotipskoj varijaciji od 8,3 do 27, 6%. Yu i sur. (2014.) identificirali su DArT markere u značajnoj vezi s duljinom klasa na kromosomima 1B (32,3 cM), 3B (44,1 cM) i 5B (62,5, 69,7 i 69,9 cM).

Za svojstvo broja dana do klasanja, na temelju GLM i MLM modela, utvrđeno je šest visoko značajnih veza na kromosomima 2D (2), 7D, 6D, 6A i 1B. Li i sur. (2019.) identificirali su osam lokusa povezanih s brojem dana do klasanja na kromosomima 2A (3), 2B, 5B, 7A (2) i 7B, koji objašnjavaju 6,6 – 13,1 % fenotipske varijacije. Sheoran i sur. (2019.) pronašli su pet SNP-ova za svojstvo broja dana do klasanja lociranih na kromosomima 4A, 5A, i 7D, a koji objašnjavaju fenotipsku varijaciju u rasponu 19,1 do 32,5 %. Jamil i sur. (2019.) su za broj dana do klasanja utvrdili 20 značajnih marker-svojstvo veza s R^2 vrijednostima u rasponu od 0,1 do 0,15.

Za svojstvo visine biljke, na temelju oba modela, utvrđene su tri visoko značajne veze na kromosomima 4B, 2D i 5B. Liu i sur. (2014.) identificirali su 15 QTL-ova za visinu biljke lociranih na kromosomima 1B, 2A, 2B, 3A, 4A, 4B, 4D, 5B, 5D, 7B, i 7D. Li i sur. (2019.) pronašli su 14 lokusa povezanih s visinom biljke na kromosomima 1A, 1B (2), 2A (2), 3A, 3B, 4D, 5A (2), 5B, 6B (2) i 7A, koji objašnjavaju 6,7–30,8 % fenotipske varijacije. Belluci i sur. (2015.) su na temelju GWA analize utvrdili 10 značajnih veza za svojstvo visine. Od toga je sedam povezano s jednim QTL-om na kromosomu 6A (1,14 – 4,89 cM), dok su ostale locirane na kromosomima 2A (34,86 cM), 6A (121,14 cM) i 7B (55,61 cM). Sheoran i sur. (2019.) navode šest značajnih veza za svojstvo visine biljke na kromosomima 1B (24,64 cM), 2A (83,23 cM), 2B (104,59 cM), 7A (29,9 cM) i dvije na 5D (1,58 cM). Jamil i sur. (2019.) su utvrdili 23 značajne marker-svojstvo veze za visinu biljke s R^2 vrijednostima u rasponu od 0,09 do 0,23. Yu i sur. (2014.) identificirali su DArT markere u značajnoj vezi s visinom biljke na kromosomima 3B (74,9 cM), 5B (94,4 cM) i 7B (142,4 cM).

Za svojstvo prinosa, na temelju GLM i MLM modela, utvrđene su četiri visoko značajne veze na kromosomima 3B, 3D, 7D i 7B. Li i sur. (2019.) identificirali su 12 lokusa povezanih s prinosom zrna na kromosomima 1A (2), 1B (2), 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 5A i 5B, koji pojedinačno objašnjavaju 6,9 – 17,7 % fenotipske varijacije. Belluci i sur. (2015.) identificirali su jednu značajnu vezu za svojstvo prinosa na kromosomu 2B (162,6 cM). Jamil i sur. (2019.) su utvrdili 33 značajne veze za svojstvo prinosa zrna s rasponom R^2 vrijednosti od 0,1 do 0,19.

Istraživanjem je utvrđeno postojanje 17 markera s pleiotropnim učinkom na temelju GLM modela, te šest pleiotropnih markera na temelju MLM modela. Pet markera bilo je pleiotropno kod oba modela, od toga četiri DArT markera (na kromosomima 3B, 3D, 6D (2)) te jedan funkcionalni marker – PpdD1 (2D). Neumann i sur. (2011.) navode da je primjenom GLM i MLM modela detektirano 385 značajnih veza, od čega ih je 118 bilo specifično za pojedinačno svojstvo, dok su ostale bile pleiotropne za i do šest različitih svojstava. Jamil i sur. (2019.) navode da je od 64 značajne veze za njih 25 utvrđeno da su specifične za pojedinačno svojstvo. Li i sur. (2019.) su na temelju asocijativne analize utvrdili 12 pleiotropnih lokusa na osam kromosoma pšenice. Prinos zrna dijelio je pet lokusa s masom 1000 zrna i visinom biljke što ukazuje na značajan utjecaj istih na oblikovanje prinosa. Dholakia i sur. (2003.) navode da nije neuobičajeno da su svojstva koja su inače međusobno korelirana, kontrolirana i zajedničkim QTL-om. U predmetnom istraživanju masa klasa, broj zrna po klasu i prinos bila su svojstva koja su najčešće dijelila zajedničke lokuse, što nije neobično obzirom da je za navedena svojstva ranije utvrđeno da su u jakoj korelaciji.

Od svih funkcionalnih markera korištenih u istraživanju samo su tri markera, Rht-B1, Rht-D1 i Ppd-D1, bila u visoko značajnoj vezi ($p < 0,01$) s nekim od ispitivanih agronomskih svojstava pšenice. Tako je, primjenom oba modela, Ppd-D1 bio u značajnoj vezi s brojem dana do klasanja i visinom biljke, Rht-D1 s brojem zrna po klasu te Rht-B1 s visinom biljke. Ovakvi rezultati samo potvrđuju važnost Rht i Ppd lokusa za razvoj adaptabilnih i visokoprinosnih kultivara pšenice. Daba i sur. (2019.) navode da je primjenom MLM modela utvrđeno postojanje 16 visoko značajnih veza za svojstvo visine biljke, među kojima i dva od ranije poznata lokusa, Rht-D1 i Rht-B1, a za koje je utvrđeno da su imali najveći utjecaj na ispitivano svojstvo. Utjecaj Rht-B1 i Rht-D1 lokusa na masu 1000 zrna i broj zrna po klasu potvrđuju Zhang i sur. (2013.) dok Wilhelm i sur. (2013.) navode vezu Rht-1 i Ppd-D1 gena s visinom biljke i brojem dana do klasanja.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem predstavljaju dobru osnovu za fino mapiranje i kloniranje gena/QTL-a. Za daljnje istraživanje svakako su zanimljivi markeri koji su se pokazali visoko značajnima u oba korištena modela, kao i pleiotropni markeri koji bi se potencijalno mogli koristiti za simultanu selekciju više koreliranih svojstava. U nastavku istraživanja trebalo bi provesti komparativnu analizu za visoko značajne lokuse pomoću alata kao što je BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritam za uspoređivanje informacija o sekvencama. Stich i Melchinger (2010.) navode da AM pruža samo statistički

odnosno indirektni dokaz funkcije neke genomske regije ili polimorfizma pa je nastavno na to potrebno napraviti i direktnu provjeru funkcije alela. Također, bilo bi zanimljivo provesti i asocijativnu analizu za svaku godinu pokusa pojedinačno kako bi se utvrdilo jesu li pojedine marker-svojstvo veze bile značajne samo u pojedinim godinama ili su bile stabilne kroz više klimatološki različitih godina.

5. ZAKLJUČCI

- Na temelju fenotipske evaluacije utvrđeno je postojanje velike varijabilnosti unutar odabranog biljnog materijala. Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$) godine pokusa na sva ispitivana agronomska svojstva pšenice. Na temelju korelacijske, regresijske i path analize zaključeno je da su masa klasa, broj zrna po klasu i masa 1000 zrna svojstva koja imaju najveći utjecaj na prinos pšenice.

- Na temelju molekularnih podataka dobivenih funkcionalnim markerima utvrđeno je postojanje genetske varijabilnosti unutar odabranog biljnog materijala s obzirom na većinu ispitivanih lokusa pšenice.

- Na temelju molekularnih podataka dobivenih DArTseq markerima utvrđeno je postojanje srednje razine genetske varijabilnosti. Najveći broj markera lociran je na B genomu, a najmanji na D genomu pšenice. Prosječna PIC vrijednost iznosila je 0,237, a prosječna He vrijednosti 0,289.

- Analizom molekularne varijance utvrđeno je da je najveći dio varijabilnosti uzrokovan razlikama između jedinki. Analizom strukture populacije utvrđeno je postojanje tri genska skupa, gdje su kultivari uglavnom bili grupirani prema geografskom podrijetlu i pedigreu.

- Na temelju općeg linearnog modela utvrđeno je postojanje 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$), a na temelju mješovitog linearnog modela njih 71. Trideset osam veza bilo je visoko značajno kod oba modela, od toga najviše za masu klasa (9), potom broj zrna po klasu (7), broj dana do klasanja (6), masu 1000 zrna (4), prinos (4), visinu biljke (3), broj klasića po klasu (3) te duljinu klasa (2).

6. LITERATURA

1. Abderrahmane, H., El Abidine, F. Z., Hamenna, B., Ammar, B. (2013.): Correlation, path analysis and stepwise regression in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under rainfed conditions. Journal of Agriculture and Sustainability, 3(2): 122-131.
2. Ahmadizadeh, M., Nori, A., Shahbazi, H., Aharizad, S. (2011.): Correlated response of morpho-physiological traits of grain yield in durum wheat under normal irrigation and drought stress conditions in greenhouse. African Journal of Biotechnology, 10(85): 19771-19779.
3. Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., Hayden, M.J., Howes, N., Sharp, P., Vaughan, P., Rathmell, B., Huttner, E., Kilian, A. (2006.): Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. Theoretical and applied genetics, 113(8): 1409-1420.
4. Akram, Z., Ajmal, S. U., Munir, M. (2008.): Estimation of correlation coefficient among some yield parameters of wheat under rainfed conditions. Pak. J. Bot, 40(4): 1777-1781.
5. Alipour, H., Bihamta, M. R., Mohammadi, V., Peyghambari, S. A., Bai, G., Zhang, G. (2017.): Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. Frontiers in plant science, 8: 1293.
6. Alvarez, M. F., Mosquera, T., Blair, M. W. (2014.): The use of association genetics approaches in plant breeding, in Plant breeding reviews: Volume 38 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
7. Andeden, E., Yediay, F., Baloch, F., Shaaf, S., Kilian, B., Nachit, M., Özkan, H. (2011.): Distribution of vernalization and photoperiod genes (Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-B3, Ppd-D1) in Turkish bread wheat cultivars and landraces. Cereal research communications, 39(3): 352-364.
8. Andersen, J. R., Lübberstedt, T. (2003.): Functional markers in plants. Trends in plant science, 8(11): 554-560.
9. Arora, A., Kundu, S., Dilbaghi, N., Sharma, I., Tiwari, R. (2014.): Population structure and genetic diversity among Indian wheat varieties using microsatellite (SSR) markers. Australian Journal of Crop Science, 8(9): 1281.

10. Asseng, S., Turner, N. C., Ray, J. D., Keating, B. A. (2002.): A simulation analysis that predicts the influence of physiological traits on the potential yield of wheat. European Journal of Agronomy, 17(2): 123-141.
11. Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R. P., Lobell, D. B., Cammarano, D., Kimball, B. A., Ottman, M. J., Wall, G. W., White, J. W., Reynolds, M. P., Alderman, P. D., Prasad, P. V. V., Aggarwal, P. K., Anothai, J., Basso, B., Biernath, C., Challinor, A. J., De Sanctis, G., Doltra, J., Fereres, E., Garcia-Vila, M., Gayler, S., Hoogenboom, G., Hunt, L. A., Izaurralde, R. C., Jabloun, M., Jones, C. D., Kersebaum, K. C., Koehler, A. K., Müller, C., Naresh Kumar, S., Nendel, C., O'Leary, G., Olesen, J. E., Palosuo, T., Priesack, E., Eyshi Rezaei, E., Ruane, A.C., Semenov, M. A., Shcherbak, I., Stöckle, C., Stratonovitch, P., Streck, T., Supit, I., Tao, F., Thorburn, P. J., Waha, K., Wang, E., Wallach, D., Wolf, J., Zhao, Z., Zhu, Y.(2015.): Rising temperatures reduce global wheat production. Nature climate change, 5(2): 143-147.
12. Ayer, D. K., Sharma, A., Ojha, B. R., Paudel, A., Dhakal, K. (2017.): Correlation and path coefficient analysis in advanced wheat genotypes. SAARC Journal of Agriculture, 15(1): 1-12.
13. Badea, A., Eudes, F., Graf, R. J., Laroche, A., Gaudet, D. A., Sadasivaiah, R. S. (2008.): Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. Euphytica, 164(3): 803-819.
14. Bagge, M., Xia, X., Lubberstedt, T. (2007.): Functional markers in wheat. Current opinion in plant biology, 10: 211-216.
15. Bagherikia, S., Karimzadeh, G., Naghavi, M. R. (2014.): Distribution of 1AL/1RS and 1BL/1RS wheat-rye translocations in Triticum aestivum using specific PCR. Biochemical systematics and ecology, 55: 20-26.
16. Baloch, F. S., Alsaleh, A., Shahid, M. Q., Çiftçi, V., de Miera, L. E. S., Aasim, M., Nadeem, M. A., Aktaş, H., Özkan, H., Hatipoğlu, R. (2017.): A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent. Plos one, 12(1), e0167821.
17. Bazzaz, M. M., Al-Mahmud, A., Khan, M. S. A. (2014.): Effects of Water Stress on Morpho-Phenological Changes in Wheat Genotypes. Global Journal of Science Frontier Research, 14(10): 93-102.
18. Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J.W., Laurie, D.A. (2007.): A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 115(5): 721-733.

19. Bellucci, A., Torp, A. M., Bruun, S., Magid, J., Anderson, S. B., Rasmussen, S. K. (2015.): Association mapping in scandinavian winter wheat for yield, plant height, and traits important for second-generation bioethanol production. Frontiers in plant science, 6:1046.
20. Berry, P. M., Kendall, S., Rutterford, Z., Orford, S., Griffiths, S. (2015.): Historical analysis of the effects of breeding on the height of winter wheat (*Triticum aestivum*) and consequences for lodging. Euphytica, 203(2): 375-383.
21. Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., Shreya, I. (2017.): Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants–An Overview. Advances in Plants & Agriculture Research, 7(3): 00255.
22. Bhatta, M., Morgounov, A., Belamkar, V., Baenziger, P. S. (2018.): Genome-wide association study reveals novel genomic regions for grain yield and yield-related traits in drought-stressed synthetic hexaploid wheat. International journal of molecular sciences, 19(10): 3011.
23. Bhattarai, R. P., Ojha, B. R., Thapa, D. B., Kharel, R., Ojha, A., Sapkota, M. (2017.): Evaluation of Elite Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Yield and Yield Attributing Traits under Irrigated Condition. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 5(2): 194-202.
24. Bonjean, A.P., Angus, W.J. (2001.): The world wheat book: a history of wheat breeding. Lavoisier (1 edition).
25. Boopathi, N. M. (2013.): Marker-assisted selection. In: Genetic mapping and marker assisted selection, pp 173-186.
26. Borojević, K., Borojević, K. (2005.a): The transfer and history of "reduced height genes"(Rht) in wheat from Japan to Europe. Journal of Heredity, 96(4): 455-459.
27. Borojevic, K., Borojevic, K. (2005.b): Historic role of the wheat variety Akakomugi in southern and central European wheat breeding programs. Breeding Science, 55(3): 253-256.
28. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980.): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32(3): 314.
29. 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(19): 2633-2635.

30. Brbaklić, L., Trkulja, D., Kondić-Špika, A., Hristov, N., Denčić, S., Mikić, S., Tomičić, M., Kobiljski, B. (2015.): Genetic associations in the detection of QTLs for wheat spike-related traits. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 50(2): 149-159.
31. Briggs, J. (2009.): Green Revolution. International Encyclopedia of Human Geography, 634–638. doi:10.1016/b978-008044910-4.00099-7
32. Burg, K. (2017.): Molecular Markers for Genetic Diversity. In Progress in Botany Vol. 79 (pp. 33-47). Springer, Cham.
33. Carvalho, I. R., Nardino, M., Follmann, D. N., Demari, G. H., Olivoto, T., Pelegrin, A. J., Szareski, V. J., Ferrari, M., da Rosa, T. C., Koch, F., Aisenberg, G. R., Pedó, T., Aumonde, T. Z., de Souza, V. Q. (2017.): Path analysis of grain yield associated characters in Brazilians wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). Australian Journal of Crop Science, 11(11): 1406.
34. Chai, J. F., Zhou, R. H., Jia, J. Z., Liu, X. (2006.): Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL1RS wheat–rye chromosome translocations. Plant Breeding, 125(3): 302-304.
35. Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M. C., Dubcovsky, J. (2009.): Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Molecular Breeding, 23(1): 23-33.
36. 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(9), e44510.
37. Chen, T., Tantasawat, P. A., Wang, W., Gao, X., Zhang, L. (2018.): Population structure of Chinese southwest wheat germplasms resistant to stripe rust and powdery mildew using the DArT-seq technique. Ciência Rural, 48(4).
38. Chesnokov, Y. V., Artemyeva, A. M. (2015.): Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Сельскохозяйственная биология*, (5 (eng)).
39. Cockram, J., Jones, H., Leigh, F. J., O'sullivan, D., Powell, W., Laurie, D. A., Greenland, A. J. (2007.): Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. Journal of Experimental Botany, 58(6): 1231-1244.
40. Collard, B. C. Y., Mackill, D. J. (2008.): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363(1491): 557-572.

41. Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. (2005.): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 142:169-196.
42. Crossa, J., Burgueno, J., Dreisigacker, 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(3): 1889-1913.
43. Daba, S. D., Tyagi, P., Brown-Guedira, G., Mohammadi, M. (2019.): Genome-wide association study in historical and contemporary US winter wheats identifies height-reducing loci. The Crop Journal.
44. Dabi, A., Mekbib, F., Desalegn, T. (2019.): Genetic variability studies on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 11: 41-54. 10.5897/JPBCS2016.0600.
45. Davies, W. P. (2003.): An historical perspective from the green revolution to the gene revolution. Nutrition Reviews, 61(suppl_6), S124-S134.
46. Denčić, S., Obreht, D., Kobiljski, B., Štatkić, S., Bede, M. (2008.): Genetska determiniranost kvalitete pšenice. In: Proceedings of 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia (Vol. 278, p. 281).
47. Deng, Z., Cui, Y., Han, Q., Fang, W., Li, J., Tian, J. (2017.): Discovery of consistent QTLs of wheat spike-related traits under nitrogen treatment at different development stages. Frontiers in plant science, 8: 2120.
48. DePauw, R., O'Brien, L. (2016.): Wheat Breeding: Exploiting and Fixing Genetic Variation by Selection and Evaluation.
49. Desheva, G. (2016.): Correlation and path-coefficient analysis of quantitative characters in winter bread wheat varieties. Trakia Journal of Sciences, 14(1): 24-29.
50. Dhaliwal, A.S., MacRitchie, F. (1990.): Contributions of protein fractions to dough handling properties of wheat-rye translocation cultivars. Journal of Cereal Science, 12(2): 113-122.
51. Dholakia, B. B., Ammiraju, J. S. S., Singh, H., Lagu, M. D., Röder, M. S., Rao, V. S., Dhaliwal, H. S., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S., Weber, W. E. (2003.): Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat. Plant Breeding, 122(5): 392-395.

52. Díaz, A., Zikhali, M., Turner, A. S., Isaac, P., Laurie, D. A. (2012.): Copy number variation affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A1 genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). PloS one, *7*(3): e33234.
53. Distelfeld, A., Li, C., Dubcovsky, J. (2009.): Regulation of flowering in temperate cereals. Current opinion in plant biology, 12(2): 178-184.
54. 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. International journal of molecular sciences, 13: 6167-6188.
55. Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987.): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
56. Drezner, G. (2014.): Ogromne štete na pšenici od žute hrđe, koje u ovom kraju nije bilo 50 godina. (http://www.glas-slavonije.hr/239899/1/Ogromne-stete-na-psenici-od-zute-hrdje-koje-u-ovom-kraju-nije-bilo-50-godina)
57. Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007.): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science, 316(5833): 1862-1866.
58. Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez, A., Yan, L. (2006.): Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. Plant molecular biology, 60(4): 469-480.
59. Earl, D. A., von Holdt, B. M. (2012.): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetics resources, 4(2): 359-361.
60. Edae, E. A., Byrne, P. F., Haley, S. D., Lopes, M. S., Reynolds, M. P. (2014.): Genome wide association mapping of yield and yield components of spring wheat under contrasting moisture regimes. Theoretical and applied genetics, 127: 791-807.
61. Ehdaie, B., Whitkus, R. W., Waines, J. G. (2003.): Root Biomass, Water – Use Efficiency, and Performance of Wheat – Rye Translocation of Chromosome 1 and 2 in spring wheat „Pavon“. Crop Science, 43: 710-717.
62. El-Esawi, M., Witczak, J., Abomohra, A., Ali, H., Elshikh, M., Ahmad, M. (2018.): Analysis of the genetic diversity and population structure of Austrian and Belgian wheat germplasm within a regional context based on DArT markers. Genes, 9(1): 47.
63. Ellis, M. H., Spielmeyer, W., Gale, K. R., Rebetzke, G. J., Richards, R. A. (2002.): ‘‘Perfect’’ markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 105(6-7): 1038-1042.

64. Ellis, M. H., Bonnett, D. G., Rebetzke, G. J. (2007.): Borlaug, Strampelli and the worldwide distribution of Rht8. Wheat Production in Stressed Environments, 787-791.
65. El-Mohsen, A. A. A., El-Shafi, M. A. A. (2014.): Regression and path analysis in Egyptian bread wheat. Journal of Agri-Food and Applied Sciences, 2(5): 139-148.
66. Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E. (2011.): A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PloS one, 6(5): e19379.
67. Eltaher, S., Sallam, A., Belamkar, V., Emara, H. A., Nower, A. A., Salem, K. F. M., Poland, J., Baenziger, P. S. (2018.): Genetic diversity and population structure of F3: 6 Nebraska winter wheat genotypes using genotyping-by-sequencing. Frontiers in genetics, 9: 76.
68. Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005.): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular ecology, 14(8): 2611-2620.
69. Evans, J.D. (1996.): Straightforward statistics for the behavioral sciences. Pacifics Grove. CA: Brooks/Cole Publishing.
70. Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010.): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources, 10(3): 564-567.
71. Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., Ihsan, M. Z., Alharby, H., Wu, C., Wang, D., Huang, J. (2017.): Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. Frontiers in plant science, 8: 1147.
72. Famina, A. A., Malyshev, S. V., Urbanovich, O. Y. (2017.): Allelic composition of the TaCwi-A1 and TaSus2-2B genes affecting grain weight in the collection of winter wheat cultivars. The EuroBiotech Journal, 1(2): 188-191.
73. FAO, 2017. FAOSTAT (http://www.fao.org/faostat/en/#data)
74. FAO, 2013. Feeding nine billion in 2050 (http://www.fao.org/news/story/en/item/174172)
75. Farshadfar, E., Romena, H., Safari, H. (2013.): Evaluation of variability and genetic parameters in agro-physiological traits of wheat under rain-fed condition. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5(9): 1015-1021.
76. Fischer, R. A., Edmeades, G. O. (2010.): Breeding and cereal yield progress. Crop Science 50 (Supplement_1), S-85-S-98.

77. Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., Buckler IV, E. S. (2003.): Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual review of plant biology, 54(1): 357-374.
78. Fouad, H. (2018.): Correlation, Path and Regression Analysis in Some Bread Wheat (*Triticum aestivum* L) Genotypes under Normal Irrigation and Drought Conditions. Egypt. J. Agron., 40(2): 133 – 144.
79. Foulkes, M. J., Sylvester-Bradley, R., Worland, A. J., Snape, J. W. (2004.): Effects of a photoperiod-response gene Ppd-D1 on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. Euphytica, 135(1): 63-73.
80. Francki, M. G., Walker, E., Crawford, A. C., Broughton, S., Ohm, H. W., Barclay, I., Wilson, R. E., McLean, R. (2009.): Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. Molecular Genetics and Genomics, 281(2): 181-191.
81. Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A., Gill, B.S. (1996.): Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: Current status. Euphytica, 91: 59-87.
82. Fu, D.L., Szücs, P., Yan, L.L., Helguera, M., Skinner, J.S., Zitzewitz, J.V., Hayes, P.M., Dubcovsky, J. (2005.): Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. Molecular genetics and genomics, 273(1): 54-65.
83. Gao, Z., Shi, Z., Zhang, A., Guo, J. (2015.): Distribution of genes associated with yield potential and water-saving in Chinese Zone II wheat detected by developed functional markers. Journal of genetics, 94(1): 35-42.
84. García-Suárez, J., Röder, M., Díaz de León, J. (2010.): Identification of QTLs and associated molecular markers of agronomic traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) under two conditions of nitrogen fertilization. Cereal research communications, 38(4): 459-470.
85. Gasperini, D., Greenland, A., Hedden, P., Dreos, R., Harwood, W., Griffiths, S. (2012.): Genetic and physiological analysis of Rht8 in bread wheat: an alternative source of semi-dwarfism with a reduced sensitivity to brassinosteroids. Journal of experimental botany, 63(12): 4419.
86. Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Hansen, L.E., Worrall, D., Shelton, D.R., Lukaszewski, A. (1993.): Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. Journal of Cereal Science, 17: 95-106.

87. Greenbaum, G., Templeton, A. R., Bar-David, S. (2016.): Inference and analysis of population structure using genetic data and network theory. Genetics, 202(4): 1299-1312.
88. Grljušić, S. (2003.): Genetska varijabilnost kultivara crvene djeteline (*Trifolium pratense* L.) nakon selekcije u brdsko – planinskim uvjetima. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
89. Grogan, S. M., Brown-Guedira, G., Haley, S. D., McMaster, G. S., Reid, S. D., Smith, J., Byrne, P. F. (2016.): Allelic variation in developmental genes and effects on winter wheat heading date in the US Great Plains. PloS one, 11(4): e0152852.
90. Guberac, S., Petrović, S., Rebekić, A., Orkić, V., Guberac, V., Vila, S. (2018.): Distribucija Dreb 1 gena u germplazmi ozime pšenice. 53. hrvatski i 13. međunarodni simpozij agronoma., 18.-23. veljače, 2018., Vodice, Hrvatska. Zbornik sažetaka, str. 82-83.
91. Guberac, S., Petrović, S., Orkić, V., Rebekić, A., Grubišić, S., Guberac, V., Vila, S. (2019.): TaCwi-A1 i TaSus2-2B geni u hrvatskom sortimentu ozime pšenice. 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture, February 17 -22, 2019, Vodice, Croatia. Book of abstracts, pp. 72-73.
92. Guedira, M., Xiong, M., Hao, Y. F., Johnson, J., Harrison, S., Marshall, D., Brown-Guedira, G. (2016.): Heading date QTL in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) coincide with major developmental genes VERNALIZATION1 and PHOTOPERIOD1. PloS one, 11(5): e0154242.
93. Guedira, M., Brown-Guedira, G., Sanford, D. V., Sneller, C., Souza, E., Marshall, D. (2010.): Distribution of Rht genes in modern and historic winter wheat cultivars from the Eastern and Central USA. Crop Science, 50(5): 1811-1822.
94. Guidet, F., Rogowsky, P., Taylor, C., Weining, S., Langridge, P. (1991.): Cloning and characterization of a new rye-specific repeated sequence. Genome, 34: 81—87.
95. Guo, Z., Song, Y., Zhou, R., Ren, Z., Jia, J. (2010.): Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat Ppd-D1 gene. New Phytologist, 185(3): 841-851.
96. Gupta, P. K., Rustgi, S., Kulwal, P. L. (2005.): Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. Plant molecular biology, 57(4): 461-485.
97. Hatfield, J. L., Dold, C. (2018.): Agroclimatology and wheat production: coping with climate change. Frontiers in plant science, 9: 224.

98. Hildebrand, C. E., David, C., Torney, C., Wagner, P. (1994.): Informativeness of polymorphic DNA markers. Los Alamos Sci, 20: 100-102.
99. Holsinger, K. E., Weir, B. S. (2009.): Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. Nature Reviews Genetics, 10(9): 639–650.
100. Hospital, F. (2009.): Challenges for effective marker-assisted selection in plants. Genetica, 136: 303-310.
101. Hou, J., Jiang, Q., Hao, C., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, X. (2014.): Global selection on sucrose synthase haplotypes during a century of wheat breeding. Plant Physiology, 164(4): 1918-1929.
102. Huang, B. E., Cavanagh, C., Rampling, L., Kilian, A., George, A. W. (2012.): iDArTs: increasing the value of genomic resources at no cost. Molecular breeding, 30: 927-938.
103. Huseynova, I. M., Rustamova, S. M. (2010.): Screening for drought stress tolerance in wheat genotypes using molecular markers. Proceedings of ANAS (Biological Sciences), 65(5-6): 132-139.
104. Huseynova, I. M., Rustamova, S. M., Mammadov, A. C. (2013.): Identification of Dreb 1 Genes Involved in Drought Tolerance in Wheat (*Triticum* L.). In Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future (pp. 552-555). Springer, Berlin, Heidelberg.
105. Huttner E., Wenzl P., Akbari M., Caig V., Carling J., Cayla C., Evers M., Jaccoud D., Peng K., Patarapuwadol S., Uszynski G., Xia L., Yang S., Kilian A. (2005.): Diversity arrays technology: a novel tool for harnessing the genetic potential of orphan crops. In Discovery to Delivery: BioVision Alexandria 2004, Proceedings of the 2004 Conference of The World Biological Forum. CABI Publishing: UK (pp. 145-155).
106. Iuoraş, M., Niculae, L., Ciucă, M., Istrate, Ş., Săulescu, N. N. (2006.): Preliminary results on use of molecular markers to identify rye introgressions into the wheat genome. Romanian Agricultural Research, 23: 21-24.
107. Iqbal, M., Shahzad, A., Ahmed, I. (2011.): Allelic variation at the Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-B3 and Ppd-D1a loci of Pakistani spring wheat cultivars. Electronic Journal of Biotechnology, 14(1): 1-2.
108. Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001.): Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic acids research, 29(4): e25-e25.
109. Jamil, M., Ali, A., Gul, A., Ghafoor, A., Napar, A. A., Ibrahim, A. M., Naveed, N. H., Yasin, N. A., Mujeeb-Kazi, A. (2019.): Genome-wide association studies of seven

agronomic traits under two sowing conditions in bread wheat. BMC plant biology, 19(1): 149.

110. Janmohammadi, M., Movahedi, Z., Sabaghnia, N. (2014.): Multivariate statistical analysis of some traits of bread wheat for breeding under rainfed conditions. Journal of Agricultural Sciences, 59(1): 1-14.
111. Jiang, Q., Hou, J., Hao, C., Wang, L., Ge, H., Dong, Y., Zhang, X. (2011.): The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (TaSus2) active in endosperm development is associated with yield traits. Functional & integrative genomics, 11(1): 49-61.
112. Jing, H.-C., Bayon, C., Kanyuka, K., Berry, S., Wenzl, P., Huttner, E., Kilian, A., Hammond-Kosack, K. E. (2009.): DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. BMC Genomics, 10: 458.
113. Jošt, M., Cox, T. S. (1990.): Relative genetic contributions of ancestral genotypes to Yugoslavian winter wheat cultivars. Euphytica, 45(2): 169-177.
114. Kage, U., Kumar, A., Dhokane, D., Karre, S., Kushalappa, A. C. (2016.): Functional molecular markers for crop improvement. Critical reviews in biotechnology, 36(5): 917-930.
115. Kalimullah, S., Khan, J., Irfaq, M., Rahman, H. U. (2012.): Genetic variability, correlation and diversity studies in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm. Journal of Animal and Plant Sciences, 22(2): 330-333.
116. Khalid, M., Khalid, Z., Gul, A., Amir, R., Ahmad, Z. (2018.): Characterization of Wheat Cell Wall Invertase Genes Associated with Drought Tolerance in Synthetic-Derived Wheat. International Journal of Agriculture and Biology, 20(12): 2677-2684.
117. Kim, W., Johnson, J. W., Baenziger, P. S., Lukaszewski, A. J., Gaines, C. S. (2004.): Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. Crop Science, 44(4): 1254-1258.
118. Kiss, T., Balla, K., Veisz, O., Láng, L., Bedő, Z., Griffiths, S., Isaac, P., Karsai, I. (2014.): Allele frequencies in the VRN-A1, VRN-B1 and VRN-D1 vernalization response and PPD-B1 and PPD-D1 photoperiod sensitivity genes, and their effects on heading in a diverse set of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Molecular Breeding, 34(2): 297-310.
119. Ko, J. M., Seo, B. B., Suh, D. Y., Do, G. S., Park, D. S., Kwack, Y. H. (2002.): Production of a new wheat line possesing the 1BL/1RS wheat-rye translocation derived

from Korean rye cultivar Paldanghomil. Theoretical and Applied Genetics, 104: 171-176.

120. Koebner, R. M. D. (1995.): Generation of PCR based markers for the detection of rye chromatin ina wheat background. Theoretical and Applied Genetics, 90: 740-745.
121. Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., Mayrose, I. (2015.): Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular ecology resources, 15(5): 1179-1191.
122. Kowalski, A. M., Gooding, M., Ferrante, A., Slafer, G. A., Orford, S., Gasperini, D., Griffiths, S. (2016.): Agronomic assessment of the wheat semi-dwarfing gene Rht8 in contrasting nitrogen treatments and water regimes. Field crops research, 191: 150-160.
123. Knopf, C., Becker, H., Ebmeyer, E., Korzun, V. (2008.): Occurrence of three dwarfing Rht genes in German winter wheat varieties. Cereal Research Communications, 36(4): 553-560.
124. Kumar, S., Kumar, N., Balyan, H. S., Gupta, P. K. (2003.): 1BL. 1RS translocation in some Indian bread wheat genotypes and strategies for its use in future wheat breeding. Caryologia, 56(1): 23-30.
125. Kumar, B., Singh, C. M., Jaiswal, K. K. (2013.): Genetic variability, association and diversity studies in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The Bioscan, 8(1): 143-147.
126. Landjeva, S., Korzun, V., Tsanev, V., Vladova, R., Ganeva, G. (2006.): Distribution of the wheat–rye translocation 1RS. 1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. Plant Breeding, 125(1): 102-104.
127. Leilah, A. A., Al-Khateeb, S. (2005.): Statistical analysis of wheat yield under drought conditions. Journal of Arid Environments, 61(3): 483–496.
128. Lelley, T., Eder, C., Grausgruber, H. (2004.): Influence of 1BL. 1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. Journal of Cereal Science, 39(3): 313-320.
129. Li, X. P., Lan, S. Q., Liu, Y. P., Gale, M., Worland, T. (2006.): Effects of different Rht-B1b, Rht-D1b and Rht-B1c dwarfing genes on agronomic characteristics in wheat. Cereal research communications, 34(2-3): 919-924.
130. Li, Y., Xiao, J., Wu, J., Duan, J., Liu, Y., Ye, X., Zhang, X., Guo, X., Gu, Y., Zhang, L., Jia, J., Kong, X. (2012.): A tandem segmental duplication (TSD) in green revolution gene Rht-D1b region underlies plant height variation. New Phytologist, 196(1): 282-291.

131. Li, G., Yu, M., Fang, T., Cao, S., Carver, B. F., Yan, L. (2013.): Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by T a VRN-A 1 at the protein level. The Plant Journal, 76(5): 742-753.
132. Li, F., Wen, W., Liu, J., Zhang, Y., Cao, S., He, Z., Rasheed, A., Jin, H., Zhang, C., Yan, J., Zhang, P., Wan, Y., Xia, X. (2019.): Genetic architecture of grain yield in bread wheat based on genome-wide association studies. BMC plant biology, 19(1): 168.
133. Lin, M., Huybers, P. (2012.): Reckoning wheat yield trends. Environmental Research Letters, 7(2): 024016.
134. Liu, Y., He, Z., Appels, R., Xia, X. (2012.): Functional markers in wheat: current status and future prospects. Theoretical and applied genetics, 125: 1-10.
135. Liu, C., Yang, Z. J., Li, G. R., Zeng, Z. X., Zhang, Y., Zhou, J. P., Liu, Ren, Z. L. (2008.): Isolation of a new repetitive DNA sequence from *Secale africanum* enables targeting of Secale chromatin in wheat background. Euphytica, 159(1-2): 249-258.
136. Liu, G., Jia, L., Lu, L., Qin, D., Zhang, J., Guan, P., Ni, Z., Yao, Y., Sun, Q., Peng, H. (2014.): Mapping QTLs of yield-related traits using RIL population derived from common wheat and Tibetan semi-wild wheat. Theoretical and applied genetics, 127(11): 2415-2432.
137. Liu, Y., Zhang, J., Hu, Y. G., Chen, J. (2017.a): Dwarfing genes Rht4 and Rht-B1b affect plant height and key agronomic traits in common wheat under two water regimes. Field Crops Research, 204: 242-248.
138. Liu, Y., Lin, Y., Gao, S., Li, Z., Ma, J., Deng, M., Chen, G., Wei, Y., Zheng, Y. (2017.b): A genome-wide association study of 23 agronomic traits in Chinese wheat landraces. The Plant Journal, 91(5): 861-873.
139. Lukyanenko, P. P. (1973.): Izabranie trudi. Selekcija i semenovodstvo ozimoj psenici, Kolos, Moskva. 447p. (in Russian).
140. Lübberstedt, T., Melchinger, A. E., Fähr, S., Klein, D., Dally, A., Westhoff, P. (1998.): QTL mapping in testcrosses of flint lines of maize: III. Comparison across populations for forage traits. Crop Science, 38(5): 1278-1289.
141. Lübberstedt, T., Zein, I., Andersen, J. R., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M., Chun, S. (2005.): Development and application of functional markers in maize. Euphytica, 146(1-2): 101-108.
142. Lopes, M. S., Dreisigacker, S., Peña, R. J., Sukumaran, S., Reynolds, M. P. (2015.): Genetic characterization of the wheat association mapping initiative (WAMI) panel for

dissection of complex traits in spring wheat. Theoretical and applied genetics, 128(3): 453-464.

143. Lorenzetti, R. (2000.): Wheat science. The green revolution of Nazareno Strampelli. Journal of Genetic Breeding (special publication) p. 40.
144. Ma, D., Yan, J., He, Z., Wu, L., Xia, X. (2012.): Characterization of a cell wall invertase gene TaCwi-A1 on common wheat chromosome 2A and development of functional markers. Molecular Breeding, 29(1): 43-52.
145. Mackay, I., Powell, W. (2007.): Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. Trends in plant science, 12(2): 57-63.
146. Madrid-Espinoza, J., Brunel-Saldias, N., Guerra, F., Gutiérrez, A., del Pozo, A. (2018.): Genome-Wide Identification and Transcriptional Regulation of Aquaporin Genes in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Stress. Genes, 9(10): 497.
147. Marić, S., Bolarić, S., Martinčić, J., Pejić, I., Kozumplik, V. (2004.): Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. Plant breeding, 123(4): 366-369.
148. Marone, D., Panio, G., Ficco, D. B. M., Russo, M. A., de Vita, P., Papa, R., Rubiales, D., Cattivelli, L., Mastrangelo, A. M. (2012.): Characterization of wheat DArT markers: genetic and functional features. Molecular genetics and genomics, 287:741-753.
149. Martinčić, J., Kozumplik, V. (1996.): Oplemenjivanje bilja. Zagreb, 1996.
150. Mäkinen, H., Kaseva, J., Trnka, M., Balek, J., Kersebaum, K. C., Nendel, C., Gobin, A., Olesen, J.E., Bindi, M., Ferrise, R., Moriondo, M., Rodríguez, A., Ruiz-Ramos, M., Takáč, J., Bezák, P., Ventrella, D., Ruget, F., Capellades, G., Kahiluoto, H. (2018.): Sensitivity of European wheat to extreme weather. Field Crops Research, 222: 209-217.
151. Merker, A. (1982.): Veery a CIMMYT spring wheat with the 1BL/1RS translocation. Cereal Research Communications, 10: 105-106.
152. McIntosh, R. A. (1983.): A catalogue of gene symbols for wheat. 1197-1255. In S.Sakamoto (ed.) Proc. Int. Wheat Genet. Symp., 6th, Kyoto, Japan. 28 Nov.- 3 Dec. 1983, Plant Germplasm Inst., Kyoto Univ., Kyoto, Japan.
153. McIntosh, R. A.,Yamazaki,Y., Dubcovsky, J., Rogers, W. J., Morris, C., Somers, D. J., Appels, R., Devos, K. M. (2012.): Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Dostupno na: [http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf].

154. McKendry, A. L., Tague, D. N., Miskin, K. E. (1996.) Effect of 1BL. 1RS on agronomic performance of soft red winter wheat. Crop science, 36(4): 844-847.
155. Mir, R. R., Kumar, J., Balyan, H. S., Gupta, P. K. (2012.): A study of genetic diversity among Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars released during last 100 years. Genetic resources and crop evolution, 59(5): 717-726.
156. Modarresi, M., Mohammadi, V., Zali, A., Mardi, M. (2010.): Response of wheat yield and yield related traits to high temperature. Cereal Research Communications, 38(1): 23-31.
157. Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M. (2003.): Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. Crop science, 43(4): 1235-1248.
158. Mohler, V., Diethelm, M., Castell, A., Albrecht, T., Friedlhuber, R., Livaja, M., Hartl, L. (2012.): CORNET Efficient wheat: The influence of Rht-D1 on agronomic performance and quality traits in common winter wheat. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzuchter und Saatgutkaufleute Osterreichs, 113-115.
159. Moreno-Sevilla, B., Baenziger, P. S., Peterson, C. J., Graybosch, R. A., McVey, D. V. (1995.): The 1BL/1RS translocation: agronomic performance of F3-derived lines from a winter wheat cross. Crop Science, 35(4): 1051-1055.
160. Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E., Buckler, E. S. (2009.): Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. The Plant Cell, 21(8): 2194-2202.
161. Naheed, H., Mohammad, F., Sohail, Q., Abid, S., Khan, N. (2016.): Genetic Diversity of Bread Wheat Lines Based on Agro-morphological Traits. International Journal of Agriculture and Biology, 18(5): 1049–1055.
162. Narayanan, S. (2018.) Effects of high temperature stress and traits associated with tolerance in wheat. Open Access J Sci, 2(3): 177-186.
163. Nei, M., Roychoudhury, A. K. (1974.): Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics, 76(2): 379-390.
164. Neumann, K., Kobiljski, B., Denčić, S., Varshney, R. K., Börner, A. (2011.): Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular breeding, 27(1): 37-58.
165. 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.

166. Novoselović, D., Bentley, A., Šimek, R., Gosman, N. (2015.): The effects of different Ppd alleles on wheat adaptability traits under conditions of eastern Croatia. Zbornik radova 50. hrvatskog i 10. međunarodnog simpozija agronoma, str. 216-220.
167. Novoselović, D., Bentley, A. R., Šimek, R., Dvojković, K., Sorrells, M. E., Gosman, N., Horsnell, R., Drezner, G., Šatović, Z. (2016.): Characterizing croatian wheat germplasm diversity and structure in a european context by DArT markers. Frontiers in plant science, 7: 184.
168. Nukasani, V., Potdukhe, N. R., Bharad, S., Deshmukh, S., Shinde, S. M. (2013.): Genetic variability, correlation and path analysis in wheat. Journal of Wheat Research, 5(2).
169. Okorogbona, A. O. M., Managa, L. R., Adebola, P. O., Ngobeni, H. M., Khosa, T. B. (2015.): Salinity and crop productivity. In Sustainable Agriculture Reviews (pp. 89-120). Springer, Cham.
170. Ormoli, L., Costa, C., Negri, S., Perenzin, M., Vaccino, P. (2015.): Diversity trends in bread wheat in Italy during the 20th century assessed by traditional and multivariate approaches. Scientific reports, 5, 8574.
171. Pandey, B., Sharma, P., Pandey, D. M., Sharma, I., Chatrath, R. (2013.): Identification of new aquaporin genes and single nucleotide polymorphism in bread wheat. Evolutionary Bioinformatics, 9, EBO-S12568.
172. Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Safar, J., Simkova, H., Dolezel, J., Bernard, M, Feuillet, C. (2008.): A physical map of the 1-Gigabase bread wheat chromosome 3B. Science, 322: 101-104.
173. Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., Harberd, N. P. (1999.): 'Green revolution'genes encode mutant gibberellin response modulators. Nature, 400(6741): 256.
174. Pestsova, E., Röder, M. (2002.): Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes. Theoretical and Applied Genetics, 106(1): 84-91.
175. Petrović, S., Marić, S., Čupić, T., Drezner, G., Karsai, I. (2012.): Distribution of allelic variants of hexaploid wheat germplasm at Xgwm261 and Ppd-D1 locus. Poljoprivreda, 18(2): 25-29.

176. Petrović, S., Dimitrijević, M., Banjac, B., Mladenov, V. (2017.): Korelacije i analiza koeficijenata putanje komponenti prinosa hlebne pšenice (*Triticum aestivum*. L). Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta, 41(2): 12-20.
177. Poor, S. A. M., Mohammadi, M., Khaniki, G. R. B., Karimizadeh, R. A. (2015.): Assessment of correlation and path analysis in wheat under drought stress. J. Bio. and Env. Sci, 6(5): 178-183.
178. Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Á., Lareu, M. (2013.): An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. Frontiers in genetics, 4: 98.
179. Prasad, B., Babar, M. A., Xu, X. Y., Bai, G. H., Klatt, A. R. (2009.): Genetic diversity in the US hard red winter wheat cultivars as revealed by microsatellite markers. Crop and Pasture Science, 60(1): 16-24.
180. Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000.): Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155(2): 945-959.
181. Pržulj, N., Perović, D. (2005.): Molekularni markeri II. Mikrosateliti. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad. „Zbornik radova“, Sveska 41.
182. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., Sham, P. C. (2007.): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. The American journal of human genetics, 81(3): 559-575.
183. Rabinovich, S.V. (1998.): Importance of wheat-rye translocation for breeding modern cultivars of Triticum aestivum L. Euphytica, 100: 323-340.
184. Rajaram, S., Ch. E. Mann, G. Ortiz-Ferrara, A. Mujeeb – Kazi (1983.): Adaptation, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. In: Sakamoto, S. (ed) Proc. 6th IWG Symp., Kyoto, Jpn.: 613-621.
185. Rao, V. R., Hodgkin, T. (2002.): Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant cell, tissue and organ culture, 68(1): 1-19.
186. 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 biology, 14(1): 128.
187. Ray, D. K., Gerber, J. S., MacDonald, G. K., West, P. C. (2015.): Climate variation explains a third of global crop yield variability. Nature communications, 6: 5989.
188. 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 Research, 126: 87-96.

189. Ren, T. H., Chen, F., Yan, B. J., Zhang, H. Q., Ren, Z. L. (2012.): Genetic diversity of wheat–rye 1BL. 1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources. Euphytica, 183(2): 133-146.
190. Robbana, C., Kehel, Z., Naceur, B., Sansaloni, C., Bassi, F., Amri, A. (2019.): Genome-wide genetic diversity and population structure of tunisian durum wheat landraces based on DArTseq technology. International journal of molecular sciences, 20(6): 1352.
191. Rufo, R., Alvaro, F., Royo, C., Soriano, J. M. (2019.): From landraces to improved cultivars: Assessment of genetic diversity and population structure of Mediterranean wheat using SNP markers. PloS one, 14(7).
192. Saal, B., Wricke, G. (1999.): Development of simple sequence repeat markers in rye *Secale cereale* L. Genome, 42: 964-972.
193. Salgotra, R. K., Gupta, B. B., Stewart Jr., C. N. (2014.): From genomics to functional markers in the era of next-generation sequencing. Biotechnology letters, 36: 417-426.
194. Sansaloni, C., Petroli, C., Jaccoud, D., Carling, J., Detering, F., Grattapaglia, D., Kilian, A. (2011.): Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. In BMC proceedings (Vol. 5, No. 7, p. P54). BioMed Central.
195. Santra, D. K., Santra, M., Allan, R. E., Campbell, K. G., Kidwell, K. K. (2009.): Genetic and molecular characterization of vernalization genes Vrn-A1, Vrn-B1, and Vrn-D1 in spring wheat germplasm from the Pacific Northwest region of the USA. Plant breeding, 128(6): 576-584.
196. Scarth, R., Law, C. N. (1983.): The location of the photoperiod gene, Ppd2 and an additional genetic factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat. Heredity, 51(3): 607.
197. Schlegel, R., Korzun, V. (1997.): About the origin of 1RS.1BL wheat-rye chromosome translocation from Germany. Plant Breeding, 116(6): 537-540.
198. Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2003.): Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. Current Opinion in Biotechnology, 14(2): 194-199.

199. Seki, M., Chono, M., Matsunaka, H., Fujita, M., Oda, S., Kubo, K., Kiribuchi-Otobe, C., Kojima, H., Nishida, H., Kato, K. (2011.): Distribution of photoperiod-insensitive alleles Ppd-B1a and Ppd-D1a and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. Breeding science, 61(4): 405-412.
200. Sethuraman, A. (2013.): On inferring and interpreting genetic population structure-applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Graduate Theses and Dissertations. 13332.
201. Shamsi, K., Petrosyan, M., Noor-mohammadi, G., Haghparast, A., Kobraee, S., Rasekhi, B. (2011.): Differential agronomic responses of bread wheat cultivars to drought stress in the west of Iran. African Journal of Biotechnology, 10(14): 2708-2715.
202. Shen, Y. G., Zhang, W. K., He, S. J., Zhang, J. S., Liu, Q., Chen, S. Y. (2003.): An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Theoretical and Applied Genetics, 106(5): 923-930.
203. Sheoran, S., Jaiswal, S., Kumar, D., Raghav, N., Sharma, R., Pawar, S., Paul, S., Iquebal, M. A., Jaiswar, A., Sharma, P., Singh, R., Singh C. P., Gupta, A., Kumar, N., Angadi, U. B., Rai, A., Singh, G. P., Kumar, D., Tiwari, R. (2019.): Uncovering genomic regions associated with 36 agro-morphological traits in Indian spring wheat using GWAS. Frontiers in plant science, 10: 527.
204. Shete, S., Tiwari, H., Elston, R. C. (2000.): On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. Theoretical population biology, 57(3): 265-271.
205. Shindo, C., Sasakuma, T. (2002.): Genes responding to vernalization in hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics, 104(6-7): 1003-1010.
206. Siahbidi, M. M. P., Aboughadareh, A. P., Tahmasebi, G. R., Teymoori, M., Jasemi, M. (2013.): Evaluation of genetic diversity and interrelationships of agro-morphological characters in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) lines using multivariate analysis. International Journal of Agriculture, 3(1): 184.
207. Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Rajaram, S., Crossa, J. (1998.): Agronomic effects from chromosome translocations 7DL. 7Ag and 1BL. 1RS in spring wheat. Crop Science, 38(1): 27-33.
208. Soleymanifard, A., Naseri, R., Meysam, M. (2012.): The study genetic variation and factor analysis for agronomic traits of Durum wheat genotypes using cluster analysis

and path analysis under drought stress condition in western of Iran. Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci, 3(3): 479-485.

209. Song, X. 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. Theoretical and applied genetics, 110: 550-560.
210. Stich, B., Melchinger, A. E. (2010.): An introduction to association mapping in plants. CAB Rev: 5, 1-9.
211. Strampelli, N. (1932.): Origini, sviluppi, lavori e risultati. Publicazione dell Istituto Nazionale di Genetica per la Cerealicoltora in Roma, Alfieri and Lacroix, Milano. P. 49-105.
212. Sun, Q. M., Zhou, R. H., Gao, L. F., Zhao, G. Y., Jia, J. Z. (2009.): The characterization and geographical distribution of the genes responsible for vernalization requirement in Chinese bread wheat. Journal of integrative plant biology, 51(4): 423-432.
213. Šatović, Z., Roman, B., Torres, A. M., Kolak, I., Cubero, J. I. (2000.): The analysis of molecular variance (AMOVA) and the test for the homogeneity of molecular variance (HOMOVA) with RAPD markers. Sjemenarstvo, 17(3/4): 165-183.
214. Španić, V. (2016.): Pšenica. Poljoprivredni institut u Osijeku, Osijek, 2016.
215. Tabibzadeh, N., Karimzadeh, G., Naghavi, M. R. (2013.): Distribution of 1AL/1RS and 1BL/1RS wheat rye translocations in iranian wheat using PCR based markers and SDS-PAGE. Cereal research communications, 41: 1-10.
216. Tadesse, W., Ogbonnaya, F. C., Jighly, A., Sanchez-Garcia, M., Sohail, Q., Rajaram, S., Baum, M. (2015.): Genome wide association mapping of yield and grain quality traits in winter wheat genotypes. PLOS ONE 10(10): e0141339.
217. Thillainathan, M., Fernandez, G. C. J. (2001.): SAS applications for Tai's stability analysis and AMMI model in genotype× environmental interaction (GEI) effects. Journal of Heredity, 92(4): 367-371.
218. Tian, Y., Zheng, C., Chen, J., Chen, C., Deng, A., Song, Z., Zhang, B., Zhang, W. (2014.): Climatic warming increases winter wheat yield but reduces grain nitrogen concentration in East China. PloS one, 9(4): e95108.
219. Tošović-Marić, B., Kobiljski, B., Obreht, D., Vapa, L. J. (2008.): Evaluation of wheat Rht genes using molecular markers. Genetika, 40(1): 31-38.
220. Vanzetti, L. S., Yerkovich, N., Chialvo, E., Lombardo, L., Vaschetto, L., Helguera, M. (2013.): Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. Genetics and molecular biology, 36(3): 391-399.

221. Villareal, R.L., Mujeeb-Kazi, A., Rajaram, S., del Toro, E. (1994.): Associated effects of chromosome 1B/1R translocation in agronomic traits in hexaploid wheat. Breeding science, 44: 7-11.
222. Villareal, R.L., Banuelos, O., Mujeeb–Kazi, A., Rajaram, S. (1998.): Agronomic performance of chromosomes 1B and T1BL/1RS near-isolines in the spring berad wheat Seri M82. Euphytica, 103: 195-202.
223. Wang, L., Ge, H., Hao, C., Dong, Y., Zhang, X. (2012.): Identifying loci influencing 1,000-kernel weight in wheat by microsatellite screening for evidence of selection during breeding. PLoS One, 7(2): e29432.
224. Wang, G., Leonard, J. M., von Zitzewitz, J., Peterson, C. J., Ross, A. S., Riera-Lizarazu, O. (2014.): Marker-trait association analysis of kernal hardness and related agronomic traits in a core collection of wheat lines. Molecular breeding, 34: 177-184.
225. Wani, S. H., Sheikh, F. A., Najeeb, S., Iqbal, A. M., Kordrostami, M. (2018.): Genetic Variability Study in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Temperate Conditions. Current Agriculture Research Journal, 6(3): 268-277.
226. Ward, B. P., Brown-Guedira, G., Kolb, F. L., Van Sanford, D. A., Tyagi, P., Sneller, C. H., Griffey, C. A. (2019.): Genome-wide association studies for yield-related traits in soft red winter wheat grown in Virginia. PloS one, 14(2): e0208217.
227. Wei, B., Jing, R. L., Wang, C. S., Chen, J. B., Mao, X. G., Chang, X. P., Jia, J. Z. (2009.): Dreb1 genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. Molecular Breeding, 23(1): 13-22.
228. Weir, B. S. (1996.): Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
229. Wenjun, Z., Yuxing, W., Yumei, L., Rongxuan, W., Han, H. (1993.): Transfer of Rye Genes to Wheat via Chromosome Manipulation and Anther Culture. In Biotechnology in Agriculture (pp. 418-422). Springer, Dordrecht.
230. Wenzl P., Caig V., Carling J., Cayla, C., Evers M., Jaccoud D., Patarapuwadol S., Uszynski G., Xia L., Yang S., Huttner E., Kilian A. (2004.): Diversity Arrays Technology, a novel tool for harnessing crop genetic diversity. In: Poster papers of 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September – 1 October 2004 (http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/3/4/1/1288_wenzldart.htm).
231. Wenzl P., Huttner E., Carling J., Xia L., Blois H., Caig V., Heller-Uszynska K., Jaccoud D., Hopper C., Aschenbrenner-Kilian G., Evers, M., Hok, P., Duncan, M., Miler, K., Uszynski G., Kilian A. (2008.): Diversity Arrays Technology (DArT): A

generic high-density genotyping platform. In Safflower: unexploited potential and world adaptability. 7th International Safflower Conference, Wagga Wagga, New South Wales, Australia, 3-6 November, 2008. (pp. 1-7). Agri-MC Marketing and Communication.

232. Whittal, A., Kaviani, M., Graf, R., Humphreys, G., Navabi, A. (2018.): Allelic variation of vernalization and photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes. PloS one, 13(8): e0203068.
233. Wilhelm, E. P., Boulton, M. I., Al-Kaff, N., Balfourier, F., Bordes, J., Greenland, A. J., Powell, W., Mackay, I. J. (2013.): Rht-1 and Ppd-D1 associations with height, GA sensitivity, and days to heading in a worldwide bread wheat collection. Theoretical and applied genetics, 126(9): 2233-2243.
234. Worland, A. J., Börner, 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(1-3): 385-394.
235. Würschum, T., Langer, S. M., Longin, C. F. H. (2015.): Genetic control of plant height in European winter wheat cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 128(5): 865-874.
236. Xu, S., Gupta, S., Jin, L. (2010.): PEAS V1. 0: a package for elementary analysis of SNP data. Molecular Ecology Resources, 10(6): 1085-1088.
237. Yan, L.L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J. (2004.): Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1677–1686. DOI:10.1007/s00122-004-1796-4
238. Yan, L.L., Fu, D.L., 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. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(51): 19581-19586
239. Yang, F. P., Zhang, X. K., Xia, X. C., Laurie, D. A., Yang, W. X., He, Z. H. (2009.): Distribution of the photoperiod insensitive Ppd-D1a allele in Chinese wheat cultivars. Euphytica, 165(3): 445-452.
240. Yediay, F. E., Baloch, F. S., Kilian, B., Özkan, H. (2010.): Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL. RS and 1BL. RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. Genetic resources and crop evolution, 57(1): 119-129.

241. Yu, J., Buckler, E. S. (2006.): Genetic association mapping and genome organization of maize. Current opinion in biotechnology, 17(2): 155-160.
242. Yu, H., Deng, Z., Xiang, C., Tain, J. (2014.): Analysis of diversity and linkage disequilibrium mapping of agronomic traits on B-genome of wheat. Journal of genomics, 2: 20-30.
243. Zampieri, M., Ceglar, A., Dentener, F., Toreti, A. (2017.): Wheat yield loss attributable to heat waves, drought and water excess at the global, national and subnational scales. Environmental Research Letters, 12(6): 064008.
244. Zanke, C. D., Ling, J., Plieske, J., Kollers, S., Ebmeyer, E., Korzun, V., Argillier, O., Stiewe, G., Hinze, M., Neumann, F., Eichhorn, Polley, A., Jaenecke, C., Ganal, M. W., Roder, M. S. (2015.): Analysis of main effect QTL for thousand grain weight in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by genome-wide association mapping. Frontiers in plant science, 6: 644.
245. Zecevic, V., Boskovic, J., Dimitrijevic, M., Petrovic, S. (2010.): Genetic and phenotypic variability of yield components in wheat (*Triticum aestivum* L.). Bulgarian Journal of Agricultural Science, 16(4): 422-428.
246. Zhang, X., Yang, S., Zhou, Y., He, Z., Xia, X. (2006.): Distribution of the Rht-B1b, Rht-D1b and Rht8 reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. Euphytica, 152(1): 109-116.
247. Zhang, X. K., Xiao, Y. G., Zhang, Y., Xia, X. C., Dubcovsky, J., He, Z. H. (2008.): Allelic variation at the vernalization genes Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, and Vrn-B3 in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. Crop Science, 48(2): 458-470.
248. Zhang, D., Bai, G., Zhu, C., Yu, J., Carver, B. F. (2010.a): Genetic diversity, population structure, and linkage disequilibrium in US elite winter wheat. The Plant Genome, 3(2): 117-127.
249. Zhang, B., Zheng, J., Tian, Y., Dong, W., Chen, J., Yang, F., Zhang, W. (2010.b): System design of Free Air Temperature Increased (FATI) for field nighttime warming experiment and its effects on rice-wheat cropping system. Acta Agronomica Sinica, 36(4): 620-628.
250. Zhang, Y., Liu, W. C., Jun, L. I., Wei, H. T., Hu, X. R., Li, Y. J., Lu, B. R.,Yang, W. Y. (2010.c): Distribution and selective effects of Vrn-A1, Vrn-B1, and Vrn-D1 genes in derivative varieties from four cornerstone breeding parents of wheat in China. Agricultural Sciences in China, 9(10): 1389-1399.

251. Zhang, L., Liu, D., Guo, X., Yang, W., Sun, J., Wang, D., Sourdille, P., Zhang, A. (2011.): Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers. BMC genetics, 12(1): 42.
252. Zhang, J., Dell, B., Biddulph, B., Drake-Brockman, F., Walker, E., Khan, N., Wong, D., Hayden, M., Appels, R. (2013.): Wild-type alleles of Rht-B1 and Rht-D1 as independent determinants of thousand-grain weight and kernel number per spike in wheat. Molecular breeding, 32(4): 771-783.
253. Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S., Yu, J. (2008.): Status and prospects of association mapping in plants. The plant genome, 1(1): 5-20.
254. http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/
255. https://meteo.hr
256. http://wheatpedigree.net/
257. https://www.diversityarrays.com

7. SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati genetsku varijabilnost genotipova pšenice na temelju rezultata fenotipske i molekularne evaluacije (funkcionalni i DArT markeri) te provesti asocijativnu analizu. Istraživanje je provedeno na 120 kultivara heksaploidne pšenice pordrijetlom iz 25 država. Poljski pokus postavljen je kroz četiri vegetacijske godine, na lokacijama u okolici Osijeka, gdje je izmjereno i ocjenjeno 10 morfoloških i agronomskih svojstava pšenice (osjatost, gustoća klasa, broj dana do klasanja, visina biljke, duljina klasa, broj klasića po klasu, broj zrna po klasu, masa 1000 zrna, masa klasa i prinos). Za provedbu PCR analize korišteno je šest grupa funkcionalnih markera (za identifikaciju Rht, Ppd i Vrn alela, identifikaciju gena povezanih s otpornošću na abiotski stres i masom 1000 zrna te za identifikaciju prisustva 1RS translokacije pšenica-raž). U laboratoriju *Diversity Arrays Technology* Sveučilišta u Canberri (Australija) provedena je analiza uzoraka DArTseq metodom. Najmanji koeficijent varijabilnosti zabilježen je za svojstvo broja dana do klasanja (5,95 %), a najveći za svojstvo prinosa (25,67 %). Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj ($p < 0,001$) godine pokusa na sva ispitivana agronomska svojstva pšenice. Na temelju korelacijske, regresijske i path analize zaključeno je da su masa klasa, broj zrna po klasu i masa 1000 zrna svojstva koja imaju najveći utjecaj na prinos. DArTseq analizom dobivena su ukupno 32 342 markera čiji je broj nakon selekcije sveden na 934. PIC vrijednosti markera kretale su se od 0,09 do 0,375, s prosjekom od 0,237. He vrijednosti kretale su se od 0,095 do 0,5, s prosjekom od 0,289. Analizom molekularne varijance utvrđeno je da je najveći dio varijabilnosti uzrokovan razlikama između jedinki (90,79 %). Analizom strukture populacije utvrđeno je postojanje tri genska skupa ($K = 3$), gdje su kultivari uglavnom bili grupirani prema geografskom podrijetlu i pedigreu. Na temelju općeg linearnog modela utvrđeno je postojanje 127 visoko značajnih veza ($p < 0,01$), a na temelju mješovitog linearnog modela postojanje 71 visoko značajne veze ($p < 0,01$). Trideset osam veza bilo je visoko značajno kod oba modela, od toga najviše za masu klasa (9), potom broj zrna po klasu (7), broj dana do klasanja (6), masu 1000 zrna (4), prinos (4), visinu biljke (3), broj klasića po klasu (3) te duljinu klasa (2).

8. SUMMARY

The aim of this study was to examine the genetic variability of wheat genotypes based on the results of phenotypic and molecular evaluation (functional and DArT markers) and to carry out an association analysis. The study was conducted on 120 hexaploid wheat cultivars originating from 25 countries. The field experiment was set up over four vegetation years, at locations around Osijek, where 10 morphological and agronomic traits of wheat were measured and evaluated (presence of awns, spike density, days to heading, plant height, spike length, number of spikelets per spike, number of grains per spike, 1000 kernel weight, spike weight and yield). Six groups of functional markers were used to perform PCR analysis (identification of Rht, Ppd and Vrn alleles, identification of genes associated with abiotic stress tolerance and 1000 kernel weight, identification of 1RS wheat-rye translocation). DArTseq analysis was performed in the *Diversity Arrays Technology* laboratory (University of Canberra, Australia). The lowest coefficient of variability was observed for the number of days to heading (5.95 %) and the highest for the yield (25.67 %). Analysis of variance revealed a statistically significant influence ($p < 0.001$) of the experiment year on all tested agronomic traits of wheat. Based on the correlation, regression and path analysis it was concluded that the spike weight, number of grains per spike and 1000 kernel weight are traits having the greatest influence on the yield. A total of 32 342 markers were obtained by DArTseq analysis whose number was reduced to 934 after selection. The PIC values of the markers ranged from 0.09 to 0.375, with an average of 0.237. He values ranged from 0.095 to 0.5, with an average of 0.289. Molecular variance analysis revealed that most of the variability was caused by differences between individuals (90.79 %). Analysis of population structure revealed the existence of three gene pools ($K = 3$), where cultivars were mainly grouped according to geographical origin and pedigree. Using general linear model, 127 highly significant associations ($p < 0.01$) were found, and using mixed linear model, 71 highly significant associations ($p < 0.01$) were found. Thirty-eight associations were highly significant in both models, most of them for the spike weight (9), then for the grains per spike (7), days to heading (6), 1000 kernel weight (4), grain yield (4), plant height (3), number of spikelets per spike (3) and spike length (2).

9. PRILOG

Tablica I. Aritmetičke sredine ispitivanih fenotipskih svojstava pšenice za pojedine vegetacijske godine, razdoblja priznavanja i geografske regije

		Aritmetička sredina									
		Visina biljke (cm)	Duljina klasa (cm)	Broj klasića/klas	Broj zrna/klas	Masa klasa (g)	Masa 1000 zrna (g)	Prinos (t/ha)	Dani do klasanja	Gustoća*	Osjatost*
Vegetacijske godine	1	102,54	9,42	18,26	40,23	2,03	42,13	4,97	120,13	4,31 (4)	2,34 (2)
	2	93,18	9,04	17,81	42,27	2,28	45,26	7,87	129,77	4,31 (4)	2,34 (2)
	3	104,77	8,57	16,32	38,61	2,25	46,74	7,50	129,38	4,31 (4)	2,34 (2)
	4	100,40	9,00	17,93	48,38	2,82	46,10	8,00	129,81	4,31 (4)	2,34 (2)
Razdoblja priznavanja	1	117,21	9,49	17,39	37,58	2,07	43,19	5,36	127,55	3,50 (3)	2,36 (2)
	2	104,11	8,86	17,59	40,57	2,24	44,38	6,52	127,96	4,19 (4)	2,29 (2)
	3	97,05	9,02	17,74	44,22	2,45	45,51	7,48	127,10	4,46 (4)	2,36 (2)
	4	95,63	8,88	17,43	42,73	2,36	45,57	7,54	126,99	4,48 (4)	2,34 (2)
Geografske regije	1	113,49	9,54	17,71	41,88	2,07	41,57	5,95	126,06	3,50 (2)	2,00 (2)
	2	100,35	9,06	17,63	42,90	2,48	43,50	6,40	128,20	4,00 (4)	2,60 (3)
	3	104,68	8,87	17,08	40,28	2,13	41,52	6,01	126,03	4,66 (3)	2,44 (3)
	4	95,38	8,73	17,03	42,81	2,32	45,54	8,08	131,48	4,50 (4)	2,42 (2)
	5	106,62	9,16	18,03	41,14	2,23	45,14	7,38	132,93	4,20 (4)	2,27 (2)
	6	108,20	9,46	17,78	42,00	2,40	46,57	7,18	127,17	3,66 (4)	2,48 (2)
	7	95,78	9,72	18,13	43,81	2,41	45,56	6,37	124,71	4,14 (4)	2,14 (2)
	8	94,52	8,70	17,49	42,99	2,40	45,30	7,17	125,06	4,64 (4)	2,30 (2)

- Vegetacijske godine: 1) 2013./2014., 2) 2014./2015., 3) 2015./2016., 4) 2016./2017.
- Razdoblja priznavanja: 1) 1900. - 1950., 2) 1950. - 1980., 3) 1980. - 2000., 4) 2000 - danas.
- Geografske regije: 1) Sjeverna Amerika, 2) Srednja i južna Amerika, 3) Azija i Australija, 4) Zapadna Europa, 5) Srednja Europa, 6) Istočna Europa, 7) Južna Europa, 8) Hrvatska i Srbija

* u zagradama su prikazane modalne vrijednosti svojstava

Tablica II. Rezultati Tukey-Kramer testa za efekt vegetacijske godine

Vegetacijska godina	Vegetacijska godina	Pr > |t|							
		Visina biljke (cm)	Duljina klasa (cm)	Broj klasića/klas	Broj zrna/klas	Masa klasa (g)	Masa 1000 zrna (g)	Prinos (t/ha)	Dani do klasanja
1	2	<,0001	0,0443	0,0434	0,0416	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
1	3	0,2615	<,0001	<,0001	0,1042	0,0003	<,0001	<,0001	<,0001
1	4	0,2832	0,0272	0,1438	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
2	3	<,0001	0,0119	<,0001	0,0003	0,6854	0,0256	0,032	0,6414
2	4	0,0003	0,8423	0,5749	<,0001	<,0001	0,2039	0,4442	0,9596
3	4	0,0284	0,0205	<,0001	<,0001	<,0001	0,3344	0,0037	0,6056

- Vegetacijske godine: 1) 2013./2014., 2) 2014./2015., 3) 2015./2016., 4) 2016./2017.

Tablica III. Rezultati Tukey-Kramer testa za efekt razdoblja priznavanja

Razdoblje priznavanja	Razdoblje priznavanja	Pr > |t|									
		Visina biljke (cm)	Duljina klasa (cm)	Broj klasića/klas	Broj zrna/klas	Masa klasa (g)	Masa 1000 zrna (g)	Prinos (t/ha)	Dani do klasanja	Gustoća	Osjatost
1	2	<,0001	0,0125	0,5178	0,0376	0,0701	0,1955	<,0001	0,754	0,0006	0,4169
1	3	<,0001	0,0352	0,2092	<,0001	<,0001	0,0042	<,0001	0,6897	<,0001	0,9704
1	4	<,0001	0,0083	0,8889	<,0001	0,0005	0,005	<,0001	0,6407	<,0001	0,8594
2	3	0,0002	0,3855	0,5465	0,0008	0,0017	0,1056	<,0001	0,379	0,0744	0,2628
2	4	<,0001	0,9237	0,5168	0,0595	0,0815	0,1084	<,0001	0,3544	0,0656	0,4169
3	4	0,3733	0,366	0,128	0,1037	0,1266	0,9193	0,7283	0,9029	0,8405	0,7603

- Razdoblja priznavanja: 1) 1900. - 1950., 2) 1950. - 1980., 3) 1980. - 2000., 4) 2000. - danas

Tablica IV. Rezultati Tukey-Kramer testa za efekt geografske regije

Geografska regija	Geografska regija	Pr > |t|									
		Visina biljke (cm)	Duljina klasa (cm)	Broj klasića/klas	Broj zrna/klas	Masa klasa (g)	Masa 1000 zrna (g)	Prinos (t/ha)	Dani do klasanja	Gustoća	Osjatost
1	2	0,0081	0,3257	0,8962	0,7239	0,0248	0,272	0,441	0,3672	0,1908	0,0004
1	3	0,047	0,1217	0,26	0,5355	0,7347	0,9755	0,8977	0,9869	0,0007	0,0031
1	4	<,0001	0,0532	0,205	0,7063	0,1152	0,009	<,0001	0,0081	0,0025	0,0039
1	5	0,0979	0,3478	0,5332	0,758	0,3156	0,016	0,0038	0,0006	0,0293	0,0573
1	6	0,1883	0,8387	0,8869	0,9574	0,0301	0,0005	0,0099	0,5667	0,5915	0,0005
1	7	0,0001	0,6854	0,4643	0,4736	0,0466	0,0156	0,4451	0,5426	0,0721	0,3599
1	8	<,0001	0,0253	0,6576	0,6185	0,02	0,0066	0,0074	0,5853	0,0001	0,0219
2	3	0,2928	0,6264	0,2905	0,2749	0,0195	0,1758	0,4306	0,2705	0,0362	0,2627
2	4	0,2057	0,3887	0,226	0,9709	0,2604	0,1449	0,0003	0,0816	0,0994	0,1668
2	5	0,1001	0,7997	0,3963	0,4269	0,0677	0,2283	0,0309	0,0097	0,4964	0,0097
2	6	0,0328	0,2706	0,7401	0,6761	0,5151	0,0192	0,0727	0,5567	0,2396	0,3176
2	7	0,2902	0,1192	0,3511	0,717	0,6567	0,1817	0,9479	0,0924	0,6682	0,0018
2	8	0,0936	0,28	0,7606	0,9621	0,5301	0,147	0,061	0,0592	0,0175	0,0101
3	4	0,0044	0,6708	0,9007	0,1813	0,1093	0,0006	<,0001	0,0005	0,5068	0,8002
3	5	0,5325	0,3399	0,0151	0,637	0,3916	0,0012	0,0002	<,0001	0,0523	0,0907
3	6	0,231	0,04	0,0586	0,3138	0,014	<,0001	0,0009	0,4185	<,0001	0,7488
3	7	0,017	0,019	0,0245	0,1035	0,0383	0,0024	0,4259	0,4607	0,0683	0,0165
3	8	0,0002	0,5151	0,2201	0,083	0,0056	<,0001	0,0003	0,4509	0,8911	0,106
4	5	<,0001	0,1281	0,0054	0,313	0,3723	0,6904	0,0387	0,2881	0,174	0,1201
4	6	<,0001	0,0056	0,0256	0,6026	0,4466	0,2795	0,0048	0,0008	<,0001	0,5087
4	7	0,9088	0,0041	0,0125	0,6262	0,4758	0,9901	<,0001	<,0001	0,1875	0,0211
4	8	0,7205	0,8784	0,1214	0,8972	0,3473	0,7715	0,0014	<,0001	0,4527	0,1404
5	6	0,5262	0,2172	0,4193	0,5492	0,0666	0,1069	0,5099	<,0001	0,0058	0,013
5	7	0,0014	0,0878	0,8134	0,1742	0,1351	0,7264	0,0119	<,0001	0,8264	0,2774
5	8	<,0001	0,0315	0,0503	0,1449	0,0289	0,8387	0,4298	<,0001	0,0097	0,6724
6	7	0,0001	0,4032	0,3826	0,336	0,884	0,3771	0,033	0,1121	0,0557	0,0023
6	8	<,0001	<,0001	0,2403	0,3806	0,9133	0,0648	0,9654	0,0234	<,0001	0,0065
7	8	0,6744	0,0005	0,0892	0,6393	0,931	0,8054	0,0233	0,8099	0,0321	0,1246

- Geografske regije: 1) Sjeverna Amerika, 2) Srednja i južna Amerika, 3) Azija i Australija, 4) Zapadna Europa, 5) Srednja Europa, 6) Istočna Europa, 7) Južna Europa, 8) Hrvatska i Srbija

ŽIVOTOPIS

Sunčica Guberac rođena je 27. kolovoza 1990. godine u Slavonskom Brodu (Hrvatska). Završila je Opću gimnaziju u Osijeku, a 2009. upisala je Poljoprivredni fakultet u Osijeku, sveučilišni preddiplomski studij Poljoprivrede, smjer Hortikultura. U listopadu 2012. godine upisuje sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Nakon završene prve godine diplomskog studija, Fakultetsko vijeće Poljoprivrednog fakulteta odobrava joj paralelan upis na još jedan diplomski studij, Povrćarstvo i cvjećarstvo. Tijekom studija dodijeljena joj je Rektorova nagrada za akademsku godinu 2011./2012. za izniman uspjeh na studiju. Također, dobitnica je sveučilišne stipendije za najuspješnije redovne studente sveučilišnih studija u akademskoj 2011./2012. i 2012./2013. godini. Od siječnja 2015. godine zaposlena je kao asistentica na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, Katedri za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. U isto vrijeme upisuje poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti, smjer Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Tijekom poslijediplomskog doktorskog studija usavršavala se na znanstvenim institucijama u inozemstvu: Flamanskom institutu za biotehnologiju (Sveučilište Ghent, Belgija), Sveučilištu za prirodne resurse i primijenjene bioznanosti u Beču – BOKU (Austrija) te Kmetijskom inštitutu Slovenije (Ljubljana, Slovenija). Kao autor/koautor objavila je šest radova A1 kategorije, pet radova A2 kategorije te deset radova A3 kategorije. Na međunarodnim simpozijima do sada je usmeno prezentirala pet radova. Kao suradnik sudjelovala je/sudjeluje na jednom VIP projektu Ministarstva poljoprivrede, jednom projektu Hrvatske zaklade za znanost te dva bilateralna projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Uključena je u izvođenje nastave na sljedećim modulima: Osnove oplemenjivanja i sjemenarstvo – praksa, Oplemenjivanje ratarskih kultura, Biotehnologija u oplemenjivanju bilja, Metode selekcije, Oplemenjivanje i sjemenarstvo u praksi.