

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Danijela S. Ristić

**ISPITIVANJE GENETIČKE VARIJABILNOSTI  
LOKALNIH POPULACIJA KUKURUZA  
(*ZEA MAYS* L.) MOLEKULARNIM  
MARKERIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Danijela S. Ristić

**GENETIC VARIABILITY OF MAIZE LANDRACES  
(*ZEA MAYS* L.) ASSESSED BY MOLECULAR  
MARKERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**Mentori: dr Dragana Ignjatović-Mićić**, naučni savetnik,  
Institut za kukuruz “Zemun Polje“, Beograd-Zemun

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

**Član komisije za ocenu doktorske disertacije:**

**dr Violeta Anđelković**, viši naučni saradnik,  
Institut za kukuruz “Zemun Polje“, Beograd-Zemun

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

Zahvaljujem se Institutu za kukuruz "Zemun Polje" koji mi je omogućio izradu doktorske disertacije.

Želim da se iskreno zahvalim svom mentoru u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ dr Dragani Ignjatović-Mićić na ukazanim sugestijama, korisnim savetima i usmeravanjima, koji su mi pomogli u izradi doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem i svom mentoru sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu dr Marini Stamenković Radak na pokazanoj izuzetnoj profesionalnosti, pristupačnosti i brzini u rešavanju svih problema u vezi sa izradom doktorske disertacije.

Takođe, veliko hvala dr Violeti Anđelković na korisnim savetima i zalaganju prilikom izade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Jeleni Vančetović, dr Vojki Babić, mr Vesni Perić, Sofiji Božinović i Zoranu Čamdžiji na nesebičnoj pomoći prilikom statističke obrade rezultata i korisnom usmeravanju prilikom njihove interpretacije.

Veliko hvala svim članovima Laboratorije za biotehnologiju na pomoći prilikom eksperimentalnog rada u polju i laboratoriji, a posebno se zahvaljujem dr Snežani Mladenović Drinić i Mariji Kostadinović.

Mojoj porodici i prijateljima dugujem najveću zahvalnost na svakoj vrsti podrške, razumevanju i ljubavi.

## ISPITIVANJE GENETIČKE VARIJABILNOSTI LOKALNIH POPULACIJA KUKURUZA (*ZEA MAYS* L.) MOLEKULARNIM MARKERIMA

### SAŽETAK

Agronomski biodiverzitet je širok pojam koji uključuje sve komponente biološkog diverziteta od značaja za hranu i poljoprivredu. On predstavlja rezultat interakcije između genetičkih resursa, životne sredine i upravljanja sistemima i prakse koji čine poljoprivrednu proizvodnju. Biljni genetički resursi, smatraju se izuzetno značajnim u obezbeđivanju dovoljne količine hrane neophodne za ljudsku ishranu. Procenjuje se da danas ukupno 30 useva obezbeđuju 95% čovekovih potreba za hranom. Kukuruz je jedna od najznačajnijih useva koja se gaji širom sveta. Iako poseduje izuzetno veliku genetičku varijabilnost, u komercijalnoj upotrebi se nalazi svega oko 5% ukupne germplazme kukuruza, koja obezbeđuje visoke prinose.

Banka gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ održava kolekciju od 2217 lokalnih populacija kukuruza klasifikovanih u 18 agroekoloških grupa, sakupljenih na prostoru bivše Jugoslavije. Ispitivanje diverziteta lokalnih populacija predstavlja osnovni preduslov za njihovu efikasnu klasifikaciju, čuvanje i korišćenje, i ima za cilj procenu genetičke raznovrsnosti i strukture populacija

Ispitana je genetička varijabilnost 54 lokalne (po tri populacije svake agroekološke grupe) i 6 introdukovanih populacija kukuruza (po dve iz Francuske, Gruzije i Kine). Za ispitivanje genetičke varijabilnosti populacija korišćeno je 18 morfoloških osobina i 10 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) i 10 SSR (*Simple Sequence Repeat*) markera. Na osnovu morfoloških osobina urađena je analiza varijanse i uočene su značajne razlike kod svih osobina za različite izvore variranja što govori o visokom stepenu fenotipskog diverziteta između populacija. Takođe, dobijene su visoke vredosti heritabilnosti u širem smislu (preko 0,6) za skoro sve osobine, osim dužine granatog dela metlice. Rezultati PCA analize su ukazali da lokalne populacije kukuruza mogu biti okarakterisane pomoću osobina kao što su rast biljke, osobine metlice i karakteristike zrna, a zapaženo je i veće grupisanje tvrdunaca/polutvrdunaca, odnosno poluzubana/zubana. Na osnovu morfoloških osobina i molekularnih markera, pomoću UPMGA metode dobijeni su klasteri, koristeći NTSYSpc statistički program. Morfološka, SSR i RAPD analiza nisu dovele do jasnog grupisanja lokalnih populacija

prema poreklu, ali je uočeno delimično poklapanje između grupa populacija povezanih u kastere/subklaste i putevima introdukcije, odnosno njihovog nastanka od originalnih populacija. Na osnovu vrednosti dobijenih genetičkih sličnosti i grupisanja populacija u skladu sa agroekološkim grupama, zaključeno je da su SSR markeri bolji izbor od RAPD markera za analizu varijabilnosti.

**Ključne reči:** genetička varijabilnost, lokalne populacije kukuruza, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) markeri, SSR (*Simple Sequence Repeat*) markeri

**Naučna oblast:** BIOLOGIJA

**Uža naučna oblast:** MOLEKULARNA GENETIKA BILJAKA

**UDK broj:** 575.832:633.15(043.3)

# **GENETIC VARIABILITY OF MAIZE LANDRACES (*ZEA MAYS* L.) ASSESSED BY MOLECULAR MARKERS**

## **ABSTRACT**

Agricultural biodiversity is a broad term which includes all components of biological diversity of relevance to food and agriculture. It represents the result of interaction between genetic resources, environmental protection and both management systems and practices that make agricultural production. Plant genetic resources are considered to be very important in providing sufficient amounts of food for human consumption. It is estimated that today a total of 30 crops provide 95% of human needs for food. Corn is one of the most important crops that are grown around the world. Although it has a very high genetic variability, only about 5% of the germplasm is in the commercial use, which provides high yields.

Maize Research Institute „Zemun Polje“ genebank maintains a collection of 2217 maize landraces classified into 18 agro-ecological groups, collected in the former Yugoslavia. Evaluation of genetic diversity of the local population represents basic precondition for their effective classification, storage and use. It aims to assess the genetic diversity and population structure.

Assessment of genetic variability was done on 54 maize landraces (three landraces from each agro-ecological group) and six introduced maize landraces (two of each from France, Georgia and China). In order to analyze genetic variability of maize landraces, 18 morphological traits, 10 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and 10 SSR (*Simple Sequence Repeat*) markers were used. Analysis of variance was performed for evaluate morphological traits. Significant differences were observed for all traits for different sources of variation which indicates a high degree of phenotypic diversity between populations. Also, high broad-sense heritability (over 0.6) were obtained for almost all the traits except branched tassel length. The results of PCA analysis indicated that local maize populations can be characterized by traits such as plant growth, tassel traits and kernel characteristics. It was also observed the larger grouping of flint/semi-flint respectively to semident/dent. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) method was applied for cluster analysis. All marker data analyses were performed using NTSYSpc statistical program.

Morphological, SSR and RAPD analysis did not lead to a clear grouping of the landraces by origin, but was observed partial correlation between groups of landraces connected in cluster/subcluster and ways of introducing from their origin. Based on the obtained values of genetic similarity and grouping landraces according to agro-ecological groups, it was concluded that SSR markers are a better choice than RAPD markers for estimation of genetic variability of maize landraces.

**Key words:** genetic variability, maize landraces, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) markeri, SSR (*Simple Sequence Repeat*) markeri

**Scientific field:** BIOLOGY

**Special topic:** MOLECULAR GENETICS OF PLANTS

**UDK number:** 575.832:633.15(043.3)



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Biljni genetički resursi .....	1
1.1.1. Banke gena .....	1
1.2. Značaj kukuruza.....	2
1.2.1. Introdokcija kukuruza u Evropu.....	3
1.2.2. Introdokcija kukuruza na prostor bivše Jugoslavije.....	4
1.3. Banka gena Instituta za kukuruz “Zemun Polje” .....	5
1.3.1. Lokalne populacije kukuruza .....	5
1.3.2. Klasifikacija lokalnih populacija.....	6
1.3.3. Karakterizacija lokalnih populacija kukuruza.....	7
1.4. Molekularno genetički pristup u proučavanju diverziteta biljnih genetičkih resursa .....	8
1.4.1. Genetički markeri .....	9
1.4.1.1. Morfološki markeri .....	9
1.4.1.2. Biohemijski markeri.....	10
1.4.1.3. Molekularni markeri .....	10
1.4.2. Primena genetičkih markera u proučavanju diverziteta lokalnih populacija kukuruza .....	16
1.5. Upotreba genetičkih resursa kukuruza.....	19
2. CILJ RADA.....	21
3. MATERIJAL I METODE .....	22
3.1. Biljni materijal .....	22
3.2. Statistička analiza fenotipskih osobina .....	29
3.2.3. Molekularne analize .....	31
3.2.3.1. Izolacija DNK .....	31
3.2.3.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK.....	32
3.2.3.3. Genetička karakterizacija RAPD markerima.....	33
3.2.3.4. Genetička karakterizacija SSR markerima .....	34
3.2.3.5. Statističke metode za molekularne markere.....	37
4. REZULTATI .....	38
4.1. Analiza fenotipskih osobina.....	38

4.1.1. Srednje vrednosti i parametri varijabilnosti ispitivanih osobina.....	38
4.1.2. Analiza varijanse osobina ispitivanih populacija.....	40
4.1.3. Komponente varijanse i heritabilnosti u širem smislu za analizirane osobine populacija .....	44
4.1.4. Odnosi između analiziranih osobina i klasifikovanje populacija.....	46
4.1.5. Klaster analiza na osnovu morfoloških osobina.....	50
4.2. Analiza molekularnih podataka .....	53
4.2.1. Rezultati RAPD analize .....	53
4.2.2. Rezultati SSR analize .....	57
4.2.3. Poređenje genetičkih sličnosti unutar agroekoloških grupa i intodukovanih populacija .....	61
4.2.4. Grupisanje populacija na osnovu morfoloških, RAPD i SSR analiza.....	65
5. DISKUSIJA .....	68
6. ZAKLJUČCI .....	85
7. LITERATURA .....	87

## 1. UVOD

### 1.1. Biljni genetički resursi

Biljni genetički resursi su kao pojam prvi put upotrebljeni na *Technical Conference on the Exploration, Utilization and Conservation of Plant Genetic Resources* u okviru *International Biological Program* (Frankel i Bennett, 1970). Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (*Food and Agriculture Organisation – FAO*) je 1989. godine dala sledeću definiciju biljnih genetičkih resursa: „Biljni genetički resursi se odnose na nasledne osobine unutar i između vrsta, koje su od značaja u naučnom, ekonomskom i društvenom smislu“. U poljoprivredi i proizvodnji hrane oni predstavljaju genetički materijal biljnog porekla sa stvarnim ili potencijalnim značajem i obuhvataju raznolikost u genetičkom materijalu koji je sadržan u lokalnim populacijama, savremenim sortama i divljim srodnicima useva (Brochaus i Oetmann, 1996).

Diverzitet gajenih kultura predstavlja izvor poželjnih svojstava neophodnih za suočavanje sa postojećim i budućim globalnim zahtevima u proizvodnji hrane, izazvanim klimatskim promenama, narušavanjem životne sredine i rastom ljudske populacije. Genetička raznovrsnost pruža oplemenjivačima mogućnost da razviju nove i produktivnije sorte, koje su otporne na štetočine i bolesti i prilagođene na promene sredinskih uslova. Procenjuje se da danas ukupno 30 useva obezbeđuju 95% čovekovih potreba za hranom, od čega samo četiri (pirinač, pšenica, kukuruz i krompir) snabdeva 60% ovih potreba ([www.fao.org](http://www.fao.org)). S obzirom na relativno mali broj useva u obezbeđivanju dovoljnih količina kvalitetne hrane, izuzetno je značajno očuvanje diverziteta unutar njih.

#### 1.1.1. Banke gena

Postoje dva glavna načina čuvanja biljnih genetičkih resursa. *Ex situ* konzervacija predstavlja čuvanje genetičkih resursa u posebnim objektima koji se nazivaju banke gena, a u okviru njih, u baznim i aktivnim kolekcijama. U baznim kolekcijama biljni genetički resursi se čuvaju duže vreme (najmanje 50 godina) na

temperaturama od -18°C ili -20°C, da bi se očuvala klijavost semena. Aktivne kolekcije sadrže uzorke koji su dostupni za korišćenje. U njima se uzorci čuvaju srednjeročno (najmanje 20 godina) na temperaturama od 0 do 10°C. Drugi način čuvanja genetičkih resursa je *in situ* konzervacija. Ovaj način čuvanja podrazumeva gajenje na poljima ili u prirodnoj sredini i odnose se na divlje srodnike gajenih biljaka.

Kolekcije germplazme biljnih vrsta se nalaze širom sveta, sa više od sedam miliona uzoraka koji se čuvaju u preko 1700 banaka gena, od čega oko 130 njih održava po 10000 uzoraka. Oko 50% svetske *ex situ* germplazme se sastoji od samo 10 biljnih vrsta sa tri najveće kolekcije (pšenica, pirinač i ječam), što čini 28% svetske germplazme. U najveće kolekcije spada banka gena osnovana od strane CGIAR (*Consultative Group on International Agricultural Group*) i obuhvata 40% čuvane germplazme FAO (1998).

Različita istraživanja u oblasti poljoprivrede i oplemenjivanja biljaka su doprinela sakupljanju, očuvanju i evaluaciji gajenih biljaka. Smanjenje genetičkog diverziteta kod mnogih gajenih useva, uzrokovalo je sakupljanje germplazme biljnih vrsta, u cilju podrške oplemenjivačima u stvaranju novih sorti (Loskutov, 1999).

## **1.2. Značaj kukuruza**

Kukuruz je jedna od najznačajnijih žitarica koja se gaji širom sveta. Evropa je treći najveći proizvođač i potrošač kukuruza posle SAD i Kine (USDA/NASS, 2007).

Kukuruz može da se koristi na tri načina: u ljudskoj ishrani, kao hrana za stoku i kao sirovina u industriji. Oko 80% svetske proizvodnje kukuruza se koristi za stočnu ishranu. U nerazvijenim i zemljama u razvoju, kao što su zemlje Afrike i Južne Amerika, proizvodnja kukuruza ima ogroman značaj pošto je ova žitarica osnovna (glavna) hrana u ljudskoj ishrani. Predviđa se da će potreba za hranom u svetu rasti 1,3% na godišnjem nivou (Ortiz i sar., 2010), a da će do tada potreba za kukuruzom prevazići ukupne potrebe za pšenicom i pirinčem – do 2050. godine kukuruz će postati usev sa najvećom globalnom proizvodnjom (Rosengrant i sar., 2008).

Postoji više načina za upotrebu kukuruza u ljudskoj ishrani. Griz, brašno, skrob, sirupi, kao i alkohol se proizvode od kukuruza, a takođe su često i komponente različitih tipova hrane (hleb, kolači, supe, sosevi, kaše, pahuljice, kokice). Takođe, čitava biljka se koristi za silažu i kao i sirov materijal za industrijske namene (u farmaceutskoj

industriji i za proizvodnju biogoriva). Pored agronomskog značaja, kukuruz služi i kao model organizam za osnovna istraživanja – najdetaljnije je istražen genetički sistem među žitaricama.

Iako poseduje izuzetno veliku genetičku varijabilnost, u komercijalnoj upotrebi se nalazi svega oko 5% ukupne germplazme kukuruza, koja obezbeđuje visoke prinose. Upotreba ovako uske genetičke osnove može imati negativne posledice na adaptaciju biljaka na različite biotičke i abiotičke stresove, pogotovo u kontekstu postojećih klimatskih promena. Genetička varijabilnost se može koristiti za identifikaciju novih izvora poželjnih alela, koji ukrštanjem sa postojećim komercijalnim varijetetima mogu dovesti do povećanja tolerantnosti na stres, uz istovremeno održavanje ili povećanje prinosa kukuruza.

### **1.2.1. Introdokcija kukuruza u Evropu**

Kukuruz je domestifikovan od divlje trave teozinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*) u Centralnoj Americi pre oko 9000 godina. U vreme otkrića Novog Sveta posebno je bio rasprostranjen kod Asteka i Inka, odakle se širio do Severne Amerike i Kanade, kao i prema Južnoj Americi do Čilea. Ovo je dovelo do stvaranja velikog broja tipova i varijeteta koji su bili prilagođeni različitim namenama i ekološkim uslovima - od tropskih do niskih temperature i na različitim nadmorskim visinama (Mastuoka i sar., 2002).

Kukuruz je prvi put u Evropu, odnosno na jug Španije, sa Karipskih ostrva doneo Kolumbo 1493. godine. Iako je kasnije došlo do introdokcije kukuruza iz različitih delova Amerike (Brandolini, 1970; Rebourg i sar., 2003), njihovi relativni doprinosi uspostavljanju genetičkog diverziteta uglavnom su nepoznati. Od tada je nastao veliki broj lokalnih populacija kukuruza u Evropi, putem prirodne selekcije i oplemenjivanja, što je dovelo do adaptacije na različite ekološke uslove, agronomske potrebe i lokalnu upotrebu (Camus-Kulandaivelu i sar., 2006). Usled različitih klimatskih uslova u Evropi, u odnosu na Centralnu i Južnu Ameriku, kukuruz je morao da se prilagodi hladnijoj klimi i drugačijem fotoperiodu. Introdokcije tvrdunaca iz Severne Amerike imale su ključnu ulogu u nastanku evropskih sorti kukuruza. Iako ove sorte kukuruza pokazuju veliku raznovrsnost, one takođe imaju neke zajedničke

karakteristike, kao sto su neosetljivosti na fotoperiod, zrno tipa tvrdunca i nizak do srednji prinos (Gay, 1999).

Posle Drugog svetskog rata je počela ekspanzija hibridnih varijeteta, što je savim promenilo način gajenja kukuruza. Došlo je do upotrebe malog broja visokoprinosnih hibrida na velikim površinama, za razliku od tradicionalne poljoprivrede koja se odlikuje gajenjem genetički heterogenih sorti sa umerenim i slabim prinosom (Bertolini i sar.,1998).

### **1.2.2. Introdokcija kukuruza na prostor bivše Jugoslavije**

Kukuruz je stizao na ove prostore iz različitih pravaca. Na njegovo širenje i gajenje uticali su različiti faktori, a pre svega migracija stanovništva usled ratova. Različiti klimatski uslovi pogodovali su gajenju velikog broja kukuruznih tipova. Podaci o gajenju kukuruza na prostoru bivše Jugoslavije, kao i podaci o njegovom poreklu, doprineli su utvrđivanju načina introdokcije kukuruza u ovaj region. Različiti tipovi kukuruza na prostoru bivše Jugoslavije vode poreklo od kukuruza Sverne Amerike, Južne Amerike i Meksika, a njihova introdokcija je trajala od XVI do XX veka.

Prvi pisani dokumenti govore o uvođenju kukuruza u naše krajeve preko Turske i Grčke ili duž Jadranske obale preko Venecije (Pavličić i Trifunović, 1966). Pojavljivanje kukuruza na prostoru bivše Jugoslavije zabeleženo je 1572. godine u Dalmaciji gde je stigao iz Italije, dok je u Srbiji njegovo gajenje počelo 1576 (Radić, 1872). Introdokovane sorte kukuruza koje su se prve pojavile bile su pretežno tvrdunci, koji nisu bili dovoljno adaptirani na tipove zemljišta i klimatske uslove.

Druga introdokcija donela je tvrdunce sa Meksičke visoravni i padina Anda koji su se zatim ukrštali sa ranije intodokovanim materijalom, čime su nastale bolje adaptirane sorte sa većom varijabilnošću. Pretpostavlja se da su se ove prve dve introdokcije dešavale u XVI veku. U ovim prvim introdokcijama više su bili zastupljeni tipovi tvrdunca i kokičara, zbog svojstva da duže očuvaju vitalnost semena pri dugotrajnom transportu.

U XVIII veku desio se veći talas introdokcije tvrdunaca koji su doneti iz Kanade i Nove Engleske u centralnu Evropu. Oni su stigli u ove krajeve preko Slovenije i

Hrvatske, što je doprinelo formiranju sorti koje predstavljaju ranije tipove kukuruza, koje uspevaju u nešto hladnijim uslovima i jedinstvene su genetičke osnove.

Poslednja introdukcija se desila krajem XIX veka i početkom XX veka. Introdukovani su zubani iz Severne Amerike, a najznačajni za proizvodnju su bili zubani američkog kukuruznog pojasa. To su bile najproduktivnije sorte kukuruza i brzo su se širile, potiskujući manje produktivne tvrdunce. Spontanom ukrštanjem između ova dva tipa, nastao je tip evropskog kukuruznog pojasa, što je bila poslednja veća prirodna hibridizacija značajna za evoluciju kukuruza u Evropi (Trifunović, 1978).

### **1.3. Banka gena Instituta za kukuruz “Zemun Polje”**

Prema podacima FAO (2010) banka gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ nalazi se, po broju uzoraka koji čuva, na devetom mestu u svetu. Ona održava kolekciju od 2217 lokalnih populacija kukuruza, sakupljenih na prostoru bivše Jugoslavije i 3258 uzoraka intodukovanih iz 40 zemalja. Introdukovani materijal obuhvata inbred linije, sintetike i varijetete. Od 1977. godine uzorci se čuvaju u kontrolisanim uslovima (temperatura 0-4°C i vlažnost vazduha 50-60%), čime je omogućeno dugoročno čuvanje kolekcije.

#### **1.3.1. Lokalne populacije kukuruza**

Lokalne populacije su autohtone populacije određenog regiona adaptirane na specifične lokalne uslove spoljašnje sredine, što dovodi do srednjeg nivoa prinosa i njegove visoke stabilnosti (Zeven, 1998). Ove populacije se razlikuju od sorti nastalih modernim oplemenjivanjem, jer nisu prošle kroz proces intenzivne selekcije. Od introdukcije kukuruza u Evropu, pre pet vekova, lokane populacije kukuruza su nastale kao rezultat mutacija, rekombinacije, genetičkog drifta i selekcije (Falconer i Mackay, 1996). Promenljive su i odlikuju se varijabilnošću, koja se može uočiti između i unutar populacija. Lokalne populacije kukuruza predstavljaju važan izvor poželjnih osobina i koriste se kao početni materijal za različite potrebe oplemenjivanja. Iako poseduju brojne ekonomski važne osobine, nedovoljno se koriste u procesima oplemenjivanja, jer nisu dovoljno okarakterisane.

### 1.3.2. Klasifikacija lokalnih populacija

Plansko prikupljanje lokalnih populacija kukuruza sa teritorije bivše Jugoslavije urađeno je u periodu od 1962. do 1964. od strane USDA (*United States Department of Agriculture*) i Federal Funding for Scientific Research. U to vreme, koristeći metod prirodne klasifikacije, oko 1000 uzorka lokalnih populacija kukuruza je sakupljeno i svrstano u 16 glavnih, morfo-genetički različitih grupa prema Anderson i Cutler (1942). Klasifikacija je obuhvatila 392 uzorka i obavljena je na osnovu sledećih morfoloških i bioloških osobina: vreme do svilanja, visina do kliapa, visina biljke, broj listova iznad kliapa, broj primarnih grana metlice, kondenzacioni indeks, poslednji list, oblik kliapa, broj redova na zrnu, broj zrna po redu, dužina kliapa, prečnik kliapa, tip zrna (tvrđunci, polutvrđunci, zubani), dužina, širina i debljina zrna, tvrdoća zrna, boja. Na osnovu tipa zrna (tvrđunci, polutvrđunci i zubani) kod lokalnih populacija kolekcije utvrđeno je da dominiraju tvrđunci koji su prvi introdukovani. Određeni tipovi kukuruza pokazuju velika variranja u ovim svojstvima. Osobine su bile relativno stabilne sa maksimumom variranja između grupa (Pavličić i Trifunović, 1966). Analiza ostatka prikupljenih populacija je sprovedena u kasnijem periodu, a finalna klasifikacija svih lokalnih populacija je definisala 18 agroekoloških grupa (Pavličić i Trifunović, 1968):

1. Crnogorski tvrđunci
2. Bosanski rani zubani
3. Kosovski polutvrđunci
4. Makedonski tvrđunci
5. Osmak tipa Severoistočne Amerike
6. Prelazni tvrđunci
7. Mediteranski tvrđunci
8. Sitnozrni tvrđunci
9. Osmoredi meki zubani
10. Rumunski tvrđunci
11. Dugoklipi tvrđunci
12. Beli poluzuban Moravac
13. Zubani kukuruznog pojasa SAD-a
14. Prelazni zubani
15. Južni zubani



16. Srbijanski zubani

17. Tvrdi zubani

18. Meki tvrdunci

Svaka klasifikaciona grupa je okarakterisana nekim naslednim osobinama, koje se razlikuju od ostalih lokalnih populacija, karakteristične su za određene uslove sredine i mogu se koristiti kao donori poželjnih alela u procesu selekcije kukuruza

Od 1991. godine za evaluaciju i karakterizaciju se koristi CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*) / IBPGR (*International Board for Plant Genetic Resources*) deskriptor sa 113 osobina. Reklasifikacija lokalnih populacija na osnovu CIMMYT/IBPGR deskriptora je urađena krajem devedesetih godina i potvrdila je originalnu klasifikaciju iz 1968. godine. Na osnovu morfoloških osobina, porekla i evolucije domaćih sorti kukuruza dobijena je kompletna slika o varijabilnosti autohtonog materijala i njihova klasifikacija (Radović i sar., 2000).

### **1.3.3. Karakterizacija lokalnih populacija kukuruza**

Tvrdunci

Ranija i veća introdukcija tvrdunca u odnosu na zubane, rezultirala je njihovim većim genetičkim divrzitetom. Najveća varijabilnost u Evropi nađena je između tvrdunaca iz Italije, a iza njih slede tvrdunci sa prostora bivše Jugoslavije (Brandolini, 1969). Crnogorski tvrdunci, Makedonski tvrdunci, Mediteranski tvrdunci, Osmaci tipa Severnoistočne Amerike i Prelazni tvrdunci odlikuju se ranim zrenjem, niskim biljkam, malim klipom i malom masom zrna (Pavličić i Jelenić, 1977).

Crnogorski tvrdunci i Makedonski tvrdunci su i najudaljenije grupe, iako vode poreklo od tipova kukuruza Južne Amerike. Značajna razlika postoji između Makedonskih tvrdunaca i Mediteranskih tvrdunaca, dok su Crnogorski tvrdunci i Kosovski polutvrdunci pokazali najveću sličnost. Prelazni tvrdunci, Dugoklipi tvrdunci, Rumunski tvrdunci, Sitnozrni tvrdunci su povezani sa Osmacima tipa Svernoistočne Amerike. Kod ovih grupa uočena je značajna varijabilnost u visini biljke, visini do klipa i dužini klipa, dok su osobine kao što su broj listova i broj redovana zrnju pokazali najmanje variranje (Pavličić i sar., 1975).

### Polutvrđunci / poluzubani

Ovaj tip kukuruza je introdukovan na prostor bivše Jugoslavije ili je nastao ukrštanjem tvrdunaca i zubana. Bosanski rani zubani, Kosovski polutvrđunci, Beli poluzuban Moravac, Tvrdi zubani i Meki tvrdunci spadaju u ovaj tip kukuruza. Tvrdi zubani i Meki tvrdunci su evolutivno najmlađe grupe nastale ukrštanjem već postojećih grupa (Pavličić i Trifunović, 1968). Sve populacije se odlikuju krupnim zrnom, dugačkim, cilindričnim ili blago konusnim klipom i srednje kasnim i kasnim grupama zrenja.

### Zubani

Introdukcija zubana se desila najkasnije. Ovaj tip kukuruza je prvi upotrebljen za stvaranje hibrida. Oni su manje genetički divergentni u odnosu na tvrdunce. U zubane se ubrajaju: Osmoredi meki zubani, Zubani kukuruznog pojasa SAD, Južni zubani, Prelazni zubani i Srbijanski zubani. Osobine koje karakterišu ovu grupu su: srednje kasne i kasne grupe zrenja, velika dužina lista, srednje dugački klipovi i veća težina zrna. Južni zubani se odlikuju visokim prinosom (Pavličić i sar., 1976). Prelazni zubani su bili široko rasprostranjeni u Vojvodini (Jelenić i sar, 1976). Oni su bili važni za oplemenjivanje kukuruza, jer su njihove inbred linije visoke kombinacione sposobnosti i visokog prinosa.

## **1.4. Molekularno genetički pristup u proučavanju diverziteta biljnih genetičkih resursa**

Konzervacija i korišćenje genetičkih resursa su neophodni za kontinuirano održavanje i unapređivanje poljoprivredne proizvodnje. Karakterizacija genotipova koji se čuvaju u bankama gena, kao i određivanje njihove divergentnosti, predstavlja osnovni korak za njihovu upotrebu u različitim programima selekcije i oplemenjivanja, a može se vršiti primenom različitih vrsta genetičkih markera.

Upotreba morfoloških svojstava kao genetičkih markera kod biljaka datira odavno. Karl Line koristio je broj i raspored polnih organa kod biljaka, da bi utvrdio njihove sistematske odnose (Linnaeus, 1758). Gregor Mendel je uveo svoja pravila nasleđivanja tako što je pratio vidljive, fenotipske osobine u potomstvu dobijenom ukrštanjem roditeljskih linija sa odvojenim, različitim osobinama

(<http://www.mendelweb.org/archive/Mendel.Experiments.txt>). Upotreba morfoloških markera je prisutna i danas, mnoge morfološke osobine se koriste za procenu varijabilnosti biljnih genetičkih resursa (Rebourg i sar., 2001; Zeng i sar., 2007).

U poslednje dve decenije došlo je do porasta primene metoda molekularne genetike u očuvanje i korišćenju biljnih genetičkih resursa (Ayad i sar., 1995). Razvoj metoda molekularne genetike omogućio je bližu identifikaciju gena odgovornih za poželjene osobine. Danas je dostupno mnoštvo različitih metoda za detekciju i analizu varijacija na molekularnom nivou, što poboljšava efikasnost procene genetičkog diverziteta.

### **1.4.1. Genetički markeri**

Genetički markeri su geni ili sekvence DNK koji se nalaze na specifičnim mestima na hromozomima i povezani su sa javljanjem određenih osobina. Oni odražavaju genetičke razlike između različitih vrsta ili jedinki iste vrste, na osnovu kojih se indirektno dobija informacija o genima (ili delovima genoma) odgovornih za ispitivane osobine. Prema Smith-u (1987) idealan marker mora da poseduje sledeća svojstva: 1) da je polimorfan, tj. mora da postoji u različitim oblicima tako da se mogu razlikovati različite varijante alela, 2) da se lako i brzo uočava u ranim fazama razvića, 3) da je ravnomerno raspoređen po genomu, 4) da se kodominatno nasleđuje i 5) da nema negativan efekat na rast i razviće jedinke. Markeri igraju važnu ulogu u proučavanju varijabilnosti, konstrukciji mapa i detektovanju povezanih gena kod različitih genotipova.

Genetičke markere je moguće klasifikovati kao morfološke, biohemijske i molekularne.

#### **1.4.1.1. Morfološki markeri**

Morfološki markeri su vezani za morfološke i agronomske osobine čije je nasleđivanje moguće pratiti posmatranjem pojave određenog fenotipa (Tanksley, 1983). Oni su pod uticajem spoljašnje sredine i varijabilnost koja se kod njih procenjuje ne odgovara uvek varijabilnosti na nivou genoma usled interakcije genotipa i sredine na fenotipsko ispoljavanje. Zbog toga je ova vrsta markera nepouzdana i subjektivna. Ograničen je i broj morfoloških markera koji se mogu koristiti. Neki od njih se

pojavljuju kasno u razviću biljke (boja cvetova) i nemoguće je sprovesti rano merenje osobine. Pored toga, jedan morfološki marker može da utiče na drugi marker ili svojstvo od interesa usled plejotropnog efekta (Poehlman, 1995).

Upotrebom ovih markera nije moguće razlikovati heterozigote od homozogota, a nije moguće ni identifikovati sve genotipove. Ipak, morfološki markeri su od značaja za proučavanje populacija kukuruza. Najvažnije osobine koje ukazuju na ukupnu varijansu u morfološkim analizama genotipova kukuruza su osobine vezane za klip i veličinu biljke, metlice i zrna (Hartings i sar., 2008).

Relevantnost morfoloških osobina u klasifikaciji populacija ograničena je prvenstveno zbog efekta spoljašnje sredine na njihovo ispoljavanje. Ovaj problem je moguće prevazići evaluacijom diverziteta na nivou individualnih lokusa, odnosno primenom biohemijskih i molekularnih markera.

#### **1.4.1.2. Biohemijski markeri**

Biohemijski markeri se zasnivaju na polimorfizmu proteina i obuhvataju strukturne proteine, rezervne proteine semena i izoenzime. Izoenzimi predstavljaju različite molekulske forme jednog enzima sa istom katalitičkom funkcijom, a razlikuju se u pH vrednosti i koncentraciji supstrata pri kojoj pokazuju enzimski efekat. Izoenzimi su alelne varijante enzima kodirane od strane strukturnih gena.

Od pojave elektroforeze proteina šezdesetih godina prošlog veka, izoenzimi su se intenzivno koristili za procenu genetičke varijabilnosti unutar i među biljnim populacijama (Brown, 1979; Gerić i sar., 1989). Imali su široku primenu kao markeri u proučavanju diverziteta kukuruza sve do pojave DNK markera.

Osnovni nedostatak izoenzima je njihov relativno mali broj i nizak nivo polimorfizma.

#### **1.4.1.3. Molekularni markeri**

Molekularni markeri predstavljaju DNK sekvence čije se nasleđivanje može jednostavno pratiti. Upotreba molekularnih markera je zasnovana na DNK polimorfizmu, koji čini osnovu u dizajniranju strategija za njihovo korišćenje u određene svrhe.

DNK markeri su se pokazali kao najbolji alat za efikasnu evaluaciju i selekciju biljnog materijala. Za razliku od proteinskih markera, DNK markeri nisu pod uticajem spoljašnje sredine, lako se izoluju iz biljnog materijala, a analize su prilično jednostavne i efikasne.

Širok opseg molekularnih tehnika je na raspolaganju za detekciju polimorfizma na nivou DNK. Zavisno od tipa ispitivanja, treba odabrati marker sistem koji će ispuniti nekoliko karakteristika idealnog markera (Weising i sar., 1995). Različite vrste molekularnih markera se koriste za procenu DNK polimorfizma i generalno su klasifikovani kao markeri zasnovani na hibridizaciji i markeri zasnovani na lančanoj reakciji polimeraze.

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) je jedna od prvih tehnika u širokoj upotrebi za detekciju varijabilnosti na nivou DNK sekvenci. Princip ove metode se zasniva na mogućnosti poređenja profila traka nastalih nakon digestije DNK sekvenc različitih genotipova restrikcionim enzimima. Promene u sekvenci DNK mogu generisati varijacije u dužini restrikcionih fragmenta dobijenih nakon digestije enzimom. Ove razlike u dužinama fragmenata moguće je uočiti posle elektroforeze, hibridizacije i detekcije.

RFLP markeri su prvi DNK markeri pomoću kojih je rađena analiza genetičkog diverziteta između i unutar populacija kukuruza (Dubreuil i Charcosset, 1998). Velika diferencijacija između populacija i veliki genetički diverzitet je dobijen u radu na populacijama kukuruza iz Evrope koje su analizirane RFLP markerima (Rebourg i sar., 2001). Trinaest lokalnih populacija kukuruza je analizirano pomoću RFLP markera radi utvrđivanja potencijalnih duplikata uzoraka lokalnih populacija iz kolekcije banke gena Instituta za kukuruz (Ignjatovic-Micic i sar., 2003).

Iako su se RFLP markeri pokazali kao efikasni za utvrđivanje genetičke strukture i diverziteta unutar i između populacija, glavni nedostaci ove tehnike su što zahteva veliku količinu čiste DNK, što je dugotrajna i kompleksna, pa samim tim i neadekvatna za rutinske analize. Uspešna primena RFLP markera može biti ograničena za datu vrstu zbog nepostojanja odgovarajućih proba.

Molekularni markeri zasnovani na lančanom umnožavanju

Reakcija lančanog umnožavanja (engl. PCR – *Polymerase Chain Reaction*) je metod selektivnog *in vitro* umnožavanja DNK sekvenci. PCR metod je razvio Mullis (1980) i zasniva se na korišćenju sposobnosti DNK polimeraze da sintetiše novi komplementarni lanac na osnovu ponuđenog šablona. Ovaj proces predstavlja imitaciju replikacije DNK, koji se normalno odvija u živim organizmima. DNK polimeraza je termostabilna, koristi DNK kao šablon i odgovarajuće prajmere za sintezu novog lanca DNK. Za otpočinjanje replikacije DNK neophodan je prajmer (oligonukleotid dužine od 10 do 40 nukleotida) na koji se dodaje prvi nukleotid. Na ovaj način moguće je višestruko umnožiti željeni region DNK, pri čemu se dobija  $10^6$ - $10^9$  kopija DNK sekvence.

Koriste se dve grupe PCR metoda: sa nasumičnim prajmerima (RAPD i AFLP) i sa prajmerima koji umnožavaju poznate sekvence (SSR).

Markeri sa nasumičnim prajmerima

PCR metoda sa nasumičnim prajmerima (RAPD - eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*) se zasniva na enzimskom umnožavanju DNK sekvenci sa proizvoljnim prajmerima. Razvili su je Welsh i McClelland (1990), kao PCR metod nasumičnog umnožavanja polimorfne DNK. Postupak otkriva polimorfizam u DNK sekvenci pomoću jednog prajmera sa proizvoljnim redosledom nukleotida. U ovoj reakciji prajmer se vezuje za genomsku DNK na dva različita kraja komplementarnih lanaca DNK uzorka. Svaki prajmer usmerava amplifikaciju na nekoliko odvojenih lokusa u genomu, omogućavajući prikazivanje polimorfizma između različitih jedinki (Williams i sar., 1993). Međutim, za DNK amplifikaciju sa prajmerima nasumične sekvence, važno je da se optimizuju i održavaju konzistentni uslovi reakcije za reproducibilno DNK umnožavanje. Najčešće se koriste prajmeri nasumične sekvence dužine oko 10bp, koji služe kao *forward* i *reverse* sekvence u odnosu na redosled i smer nukleotida. Umnoženi fragmenti su dužine između 0,5 i 5 kb, razdvajaju se na agaroznim gelovima i detektuju se kao prisustvo i odsustvo trake (Jones i sar., 1997). Dobijeni polimorfizam potiče pre svega zbog varijacija u mestima vezivanja prajmera, ali takođe može biti posledica različitih dužina umnoženih sekvenci.

Glavna prednost RAPD markera je brzina izvođenje analize i jednostavnost. Oni se odlikuju veoma velikom rasprostranjenošću u genomu. Analiza RAPD markerima je korišćena od strane nekoliko grupa istraživača, kao efikasno sredstvo za identifikaciju markera povezanih sa agronomski važnim osobinama (Agwanda i sar., 1997; Garcia i sar., 1998). Glavni nedostatak RAPD markera je njihova niska reproducibilnost, zbog čega je potrebna visoka standardizacija eksperimentalne procedure usled osetljivosti na uslove reakcije (Schierwater i Ender, 1993). Zbog toga je onemogućeno poređenje rezultata između različitih laboratorija (Jones i sar., 1997). To su dominantni markeri i stoga imaju ograničen značaj kao markeri za mapiranje. RAPD analize zahtevaju da DNK bude dovoljno čista, neophodna je predostrožnost da bi se izbegla kontaminacija uzoraka, jer se koriste kratki nasumični prajmeri koji su u stanju da umnože fragmente DNK u različitim vrstama. Ovi markeri nisu lokus specifični i samim tim profil traka se ne može predstaviti kao lokus i alel.

Markeri zasnovani na polimorfizmu dužinski umnoženih fragmenata (eng. AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*) metoda predstavlja korak između RFLP markera i markera zasnovanih na PCR analizi. Ova metoda se zasniva na selektivnom umnožavanju podskupa restrikcionih fragmenta iz smeše DNK fragmenata dobijenih nakon digestije genomske DNK sa restrikcionom endonukleazom. Polimorfizam se detektuje na osnovu razlike u dužini umnoženih fragmenata. Ova tehnika podrazumeva četiri koraka: (1) sečenje DNK molekula i spajanje sa oligonukleotidnim adapterima (2) preselektivno umnožavanje (3) selektivno umnožavanje i (4) analizu umnoženih fragmenata na gelu. Umnoženi DNK fragmenti su dužine od 80 do 500bp. Polimorfizam se detektuje kroz prisustvo/odsustvo produkata amplifikacije, što ih svrstava među dominantne markere.

Prednosti AFLP markera se zanjavaju na njihovoj velikoj zastupljenosti širom genoma, visokoj reproducibilnosti, velikom broju informativnih traka po reakciji, kao i činjenici da nije potrebna baza podataka sekvenci za dizajniranje prajmera. AFLP markeri nisu sasvim nasumično raspoređeni u genomu, već se grupišu u određenim regionima, poput centromera (Alonso-Blanco i sar., 1998, Young i sar., 1999; Saal i Wricke, 2002). Upotreba AFLP markera je postala značajna metoda molekularne genetike, usled sposobnosti da u jednoj reakciji detektuje visok stepen polimorfizma

(Vos i sar., 1995; Agrama i sar., 2002). Nedostaci ove metode su što zahteva DNK visoke čistoće, kao i dominantnost alela.

Jednostavni ponovci kao markeri

Izraz *mikrosateliti* potiče od Litt i Luty (1989), a ovi markeri poznati su i kao jednostavni ponovci sekvence (eng. SSR - *Simple Sequence Repeat*). To su delovi DNK koji se sastoje od tandemskih ponovaka mono-, di-, tri-, tetra- ili pentanukleotida raspoređenih kroz genom većine vrsta eukariota (Powell i sar. 1996). SSR markeri, nastali iz genomskih biblioteka, mogu pripadati ili transkribovanom ili netranskribovanom regionu genoma, i retko postoji dostupna informacija u vezi sa njihovom funkcijom. Sekvence mikrosatelita su posebno pogodne za razlikovanje srodnih genotipova, zbog njihovog visokog stepena varijabilnosti, i zato se često koriste u analizama varijabilnosti populacija (Smith i Devey, 1994), kao i za identifikaciju blisko povezanih sorti (Vosman i sar., 1992).

Prednosti SSR markera predstavljaju kodominantnost alela, njihova velika prisutnost u genomu eukariota i njihova slučajna distribucija širom genoma (Morgante i sar., 2002; Barcaccia i sar., 2006). Male količine DNK (10-100 ng po reakciji) su potrebne za PCR analizu. Zbog upotrebe dugih.sekvenci PCR prajmera, reproducibilnost SSR markera je visoka i ne zahteva visok kvalitet DNK.

Jedan od glavnih nedostataka SSR markera su visoki troškovi za dizajniranje prajmera, ukoliko su adekvatni prajmeri za određene vrste nedostupni, što otežava njihovu primenu na nedovoljno proučavanim vrstama. Iako su mikrosateliti u principu kodominantni markeri, mutacije na mestima vezivanja prajmera mogu dovesti do pojave „*null*“ alela (nema umnožavanja PCR proizvoda), što može da dovede do grešaka u oceni genotipa. Zapažena je i pojava „*stutter*“ traka koje su posledica DNK proklizavanja tokom PCR umnožavanja. Ovo može da oteža tumačenje profila traka zbog određivanja veličine fragmenata i heterozigoti mogu biti pomešani sa homozigotima.

SSR markeri pokazuju visok nivo polimorfizma. Kao rezultata toga, oni su veoma informativni markeri koji mogu da se koriste za mnoge genetičke analize, od nivoa jedinke, pa do blisko povezanih vrsta. Nasuprot tome, njihov visoka stopa mutacije ih čini nepodobnim za izučavanje diverziteta viših taksonomskih kategorija.



SSR markeri se smatraju idealnim markerima za mapiranje gena (Jarne i Lagoda, 1996). Oni su korisni za procenu genetičke varijabilnosti kolekcija germplazme (Mohammadi i Prasanna, 2003). SSR markeri vezani za gene poznate funkcije mogu biti testirani za povezanost sa fenotipskim varijacijama i nekim drugim biološkim funkcijama (Ayers i sar., 1997).

#### Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida kao marker

Nova vrsta DNK markera (eng. SNP - *Single Nucleotid Polymorphism*) je postala veoma prihvaćena u proučavanju genoma. Činjenica da je u mnogim organizmima polimorfizam uglavnom rezultat promene u jednom nukleotidu (tačkaste mutacije), dovela je do razvoja SNP tehnika za proučavanje ove vrste polimorfizma. Ove promene u jednoj bazi se mogu koristiti kao molekularni markeri za gene od interesa. SNP lokus može imati dva, tri ili četiri alela u populaciji, ali su najčešći bialelni lokusi. Ovi markeri predstavljaju najzastupljeniji genetički polimorfizam kod viših eukariota, uključujući biljke. Mnogobrojna istraživanja su pokazala da se učestalost SNP kreće od 1/25 bp kod krompira, do 1/7000 bp kod paradajza. Najčešće je jedan SNP prisutan na 200 do 500 bp, a njihova gustina je veća u intergenskim i intronskim regionima nego u egzonima (Weising i sar., 2005). Analitičke procedure zahtevaju informacije o sekvenci za dizajniranje specifičnih PCR prajmera ili oligonukleotidnih proba. Identifikacija SNP-ova obuhvata dva pristupa. Jedan od njih podrazumeva pretraživanje sekvenci iz baze podataka, kada su oni označeni kao *in silico* ili elektronski SNP-ovi. Drugi pristup je konvertovanje ostalih tipova molekularnih markera u SNP-ove. Kada se jednom utvrdi lokacija, identifikuje i dizajnira odgovarajući SNP marker, ova metoda nudi visok stepen automatizacije.

Važna prednost SNP markera je da se njihova detekcija ne zasniva na gel elektroforezi. Kod velikih genotipizacija koje se zahtevaju u marker asistiranom oplemenjivanju, tehnologije zasnovane na gel elektroforezi su često suviše intenzivne i dugotrajane. Velika gustina SNP markera povećava verovatnoću pronalaženja polimorfizma u ciljnom genu, što obezbeđuje veliku prednost u odnosu na ostale markere koji su najčešće tesno povezani sa lokusom od interesa. Iako je upotreba SNP markera kod biljaka još uvek u razvoju, očekuje se da će postati najkorišćeniji markeri u bliskoj budućnosti, posebno kada cele sekvence genoma biljaka postanu dostupne

(Ganal i sar., 2011). SNP analiza je od posebne koristi za diskriminaciju gajenih biljaka koje imaju nizak nivo polimorfizma, kao što je paradajz. Razvoj SNP markera kod kukuruza nudi primenu DNK markera u mnogim novim oblastima populacione genetike, identifikaciji gena, oplemenjivanju i karakterizaciji germplazme. Kukuruz poseduje visoku učestalost SNP markera, od 1/31bp u nekodirajućim do 1/124bp u kodirajućim regionima (Tenailon i sar., 2001; Ching i sar., 2002; Vroh Bi i sar., 2006). Pošto predstavljaju najčešći tip genetičkih varijacija u biljkama, SNP markeri mogu imati značajnu ulogu u proučavanju otpornosti na bolesti, abiotičkih i biotičkih stresova i ekonomski važnih osobina.

Tabela 1. Pregled relevantnih karakteristika tehnika molekularnih markera najčešće korišćenih u analizi genetičkih resursa kukuruza (Spooner, 2005)

	Izoenzimi	RFLP	RAPD	SSR	AFLP
Zastupljenost u genomu	Niska	Visoka	Visoka	Visoka	Visoka
Nivo polimorfizma	Nizak	Srednji	Srednji	Visok	Srednji
Specifični za lokus	Da	Da	Ne	Da	Ne
Kodominantnost alela	Da	Da	Ne	Da	Ne /da
Reproducibilnost	Visoka	Visoka	Niska	Visoka	Srednja-visoka
Kompleksnost	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Srednja
Zahtevnost tehnike	Niska	Visoka	Niska	Niska - srednja	Srednja
Troškovi analize	Niski	Visoki	Niski	Niski	Srednji
Troškovi razvoja tehnike	Niski	Srednji - visoki	Niski - srednji	Visoki	Niski
Količina potrebne DNK	-	Visoka	Niska	Niska	Srednja
Mogućnost automatizacije	Ne	Ne	Da	Da	Da

#### 1.4.2. Primena genetičkih markera u proučavanju diverziteta lokalnih populacija kukuruza

Različite metode se mogu koristiti za procenu genetičke varijabilnosti kod biljnih vrsta, kao što su podaci iz rodoslova, kvalitativne i kvantitativne morfološke

osobine i polimorfizam na nivou DNK. Fenotipske osobine su od velikog značaja za ispitivanje lokalnih populacija kukuruza. Odnosi između osobina se statistički određuju izračunavanjem koeficijenta korelacije PCA metodom (eng. PCA - *Principal Component Analysis*) metodom.

Kukuruz sa svojim ogromnim varijacijama u morfološkim osobinama i velikim DNK polimorfizmom predstavlja usev sa najvećim genetičkim diverzitetom (Matsuoka i sar., 2002). Genetička raznovrsnost lokalnih populacija kukuruza ima ključnu ulogu u procesu oplemenjivanja (William i Michael, 2002), pa je proučavanje njihovog diverziteta od izuzetnog značaja. Od šezdesetih godina prošlog veka rađena je karakterizacija kolekcija da bi se formirale „jezgrovne“ (eng. *core*) kolekcije, utvrdila veza između grupa sa specifičnim svojstvima od interesa za oplemenjivanje, kao i da bi se potvrdila postojeća klasifikacija. Formiranje jezgrovne kolekcije predstavlja stvaranje početnog materijala odabiranjem genotipova koji predstavljaju reprezentativnu varijabilnost velike kolekcije (Brown, 1989). Ovaj proces omogućava potpuniju karakterizaciju manjeg broja značajnih uzoraka, kao i integraciju najznačajnijih osobina – prilagodljivost, varijabilnost, divergentnost i heterotični potencijal.

Morfološka deskripcija i klasifikacija je urađena na lokalnim populacijama kukuruza iz Španije (Sanchez-Monge, 1962), Italije (Brandolini i Mariani, 1968), Jugoslavije i Rumunije (Pavličić i Trifunović, 1966), Portugalije (Costa-Rodrigues, 1971) i Francuske (Gouesnard i sar., 1997). Poređenje kolekcija iz različitih zemalja je urađeno na populacijama Italije, Mađarske, Jugoslavije i Rumunije (Leng i sar., 1962) i populacijama iz Italije, Jugoslavije i Rumunije (Pavlicic, 1971).

Izoenzimi su takođe korišćeni za karakterizaciju uzoraka različitih lokalnih populacija kukuruza (Gerić i sar., 1989; Lefort-Buson i sar., 1991; Revilla i sar., 1998; Gimenes i Lopes, 2000). Na odabranim populacijama svih agroekoloških grupa iz banke gena Instituta za kukuruz analizirano je 12 enzimskih sistema koje kontroliše 21 enzimski lokus (Gerić i sar., 1989). Na osnovu broja alela po lokusu, učestalosti alela, broja polimorfnihih lokusa i očekivane heterozigotnosti, utvrđeno je da se grupe manje ili više razlikuju. Rezultate je bilo teško interpretirati, a alozimska varijabilnost je dala samo približnu sliku genetičke strukture populacija.

Za izučavanje genetičkog diverziteta postepeno su počeli da se koriste DNK markeri, posebno RFLP. Pokazalo se da su RFLP markeri efikasniji od izoenzima u

izučavanju lokalnih populacija kukuruza (Dubreuil i Charcosset, 1998). Veći polimorfizam je dobijen sa RFLP markerima i veći broj lokusa je doprineo većoj diskriminativnoj sposobnosti RFLP markera. U cilju analize velikog broja populacije kukuruza RFLP markerima, razvijen je metod grupnog DNK uzorka (Dubreuil i sar., 1999). Prvo je urađena analiza na reprezentativnom uzorku kolekcije populacija INRA-PROMAIS banke gena iz Francuske (Rebourg i sar., 1999). Zatim je usledila analiza više od 450 evropskih populacija kukuruza (Rebourg i sar., 2001; Gauthier i sar., 2002). U cilju ispitivanja introdukcije i širenja kukuruza u Evropi, okarakterisan je reprezentativan broj od 131 populacije kukuruza poreklom iz Amerike i Evrope RFLP markerima (Rebourg i sar., 2003). Pokazalo se da je polimorfizam bio veći za populacije iz Amerike nego za evropske, a samo nekoliko alela je specifično za evropske populacije.

U poređenju sa RFLP markerima, RAPD markeri su pogodniji za rad, kada se uzme u obzir jednostavnost i troškova. U radu Ignjatović-Micić i sar. (2003) korišćeni su RFLP i RAPD markeri da bi se otkrili eventualni duplikati lokalnih populacija. Duplikati nisu otkriveni, jer su oba marker sistema detektovala dovoljnu količinu polimorfizma. Kod kukuruza RAPD markeri su se koristili za procenu diverziteta germplazme. U radu Carvalho i sar. (2004) analizirano je 79 lokalnih populacija kukuruza i dve poboljšane sorte sa RAPD markerima. Obrada rezultata je pokazala da se ove populacije odlikuju velikom varijabilnošću. Sprovedena je i uporedna karakterizacija 17 populacija tvrdunaca pomoću RAPD markera i uočen je visok nivo varijabilnosti usled ukrštanja različitih izvora germplazme (Okumus, 2007).

AFLP markeri su se pokazali kao efikasno sredstvo u otkrivanju polimorfizma na nivou DNK i pravljenju velikog seta markera za mapiranje kod kukuruza (Castiglioni i sar., 1999; Vuysteke i sar., 1999). Oni su pored SSR markera najinformativniji i dobar su izbor u izučavanju diverziteta (Pejić i sar., 1998; Lubberstedt i sar., 2000). Rezultati rada Hartings i sar. (2008) su potvrdili da AFLP markeri imaju visoku učestalost polimorfnihih traka i da daju genetički otisak lokalnih populacija. Populacije tvrdunaca sa prostora bivše Jugoslavije takođe su analizirane sa AFLP i SSR markerima, da bi se uradila njihova karakterizacija, identifikacija i klasifikacija (Ignjatović-Micić i sar., 2007).

Među različitim tipovima molekularnih markera, SSR markeri se smatraju najboljim izborom u proučavanju genetičke varijabilnosti zbog njihovog visokog nivoa polimorfizma (Senior i sar., 1998). SSR markeri predstavljaju dobar alat za mapiranje genoma, genotipizaciju i evaluaciju germplazme (Smith i sar., 1997; Senior i sar., 1998). Novije studije sa SSR markerima obuhvataju opis autohtonih lokalnih populacija kukuruza Portugala (Patto i sar., 2004), Etiopije (Beyene i sar., 2006), Kine (Yao i sar., 2007; Qi-Lun i sar., 2008), Argentine (Bracco i sar., 2009) i Indije (Prasanna, 2010; Sharma i sar., 2010).

Karakterizacija pomoću molekularnih markera može da predstavlja dugotrajan i skup proces, ukoliko je potrebno analizirati veliki broj jediniki populacije, zbog velike varijabilnosti unutar same populacije. Potrebno je analizirati između 15 i 30 individualnih jedinki da bi populacija bila pouzdano okarakterisana (Dubreuil i sar., 2006; Warburton i sar., 2010). Od strane CGIAR 2003. godine započet je destogodišnji *Generation Challenge Program (GCP)* sa ciljem iskorišćavanja genetičkog diverziteta radi poboljšanja useva u procesu oplemenjivanja. U okviru GCP projekta korišćenjem strategije grupnog uzorka i pažljivo odabranog seta SSR markera, okarakterisano je oko 800 lokalnih populacija kukuruza.

Do danas se SNP markeri nisu koristili u proučavanju genetičkih resursa kukuruza. Razlog za ovo je što su postojeće metode markera koje se koriste isplativije, a daju i zadovoljavajuće rezultate. Dvadeset lokalnih populacija kukuruza koje se obnavljaju i čuvaju u pet različitih banaka gena ispitivane su radi procene genetičkog integriteta, koristeći 1,150 SNP markera i 235 SNP haplotipova (Wen i sar., 2011). Promene detektovane u genetičkom integritetu, u smislu prisustva i odsustva gena (alela) od strane SNP i SNP haplotip analize, bile su dinamične tokom regeneracije. Pokazano je da se SNP markeri mogu koristiti za određivanje genetičkog integriteta lokalnih populacija kukuruza.

### **1.5. Upotreba genetičkih resursa kukuruza**

Očuvanje genetičkih resursa bez njihovog korišćenja nema mnogo smisla; biljni genetički resursi se održavaju zbog moguće upotrebe u ljudskoj ishrani, kao hrana za

stoku, za farmaceutsku industriju i kao biogorivo. Koncept prebridginga uspostavlja vezu između genetičkih resursa i oplemenjivanja. On obuhvata evaluaciju, adaptaciju i poboljšanje genetičkih resursa koji će se dalje koristiti u procesu oplemenjivanja. Suština ovog koncepta je da učini germplazmu upotrebljivom za dobijanje novih sorti, odnosno da identifikuje odgovarajuće poželjne osobine koje bi bile uključene u programe oplemenjivanja (Nass i Paterniani, 2000).

U lokalnim populacijama kukuruza mogu se naći izvori različitih morfoloških i agronomskih poželjnih osobina kao što su: ranostasnost, dužinu klipa, veliki broj redova zrna, dužinu zrna, masa zrna. Takođe, one mogu poslužiti i kao izvor prirodne otpornosti na bolesti, štetočine i abiotički stres ili kao izvori za različita specifična svojstva. U poslednjih desetak godina sve više se radi na identifikaciji poželjnih svojstava, kao što su tolerantnost na sušu (Hayano - Kanashiro i sar., 2009; Ndiso i sar., 2008; Gement i sar., 2010; Vančetović i sar., 2010; Babić i sar., 2011), hemijski sastav zrna (Pinto i sar., 2009; Vázquez-Carillo i sar., 2011; Mladenović Drinić i sar., 2009; Mladenović Drinić i sar., 2011) i rezistentnost na patogene (Diniz, 2002; Iglesias i sar., 2006). Analizirajući lokalne populacije iz Latinske Amerike na otpornost prema insektu *Chilo partellus*, Tamiru i sar. (2011) su otkrili specifičan, do sada nepoznat, način odbrane ovih genotipova. Odmah nakon što *Chilo partellus* položi jaja biljke kukuruza započinju proizvodnju određenih hemijskih materija koje privlače parazitske ose, koje uništavaju jaja ovog moljca čime se sprečava oštećenje biljke. Identifikacija alela uključenih u ovaj mehanizam će biti iskorišćena za poboljšanje otpornosti elitnih genotipova, sa ciljem smanjivanja upotrebe insekticida.

Uspešni programi korišćenja lokalnih populacija u oplemenjivanju kukuruza su malobrojni, zbog toga što je proces identifikacije poželjnih alela u kolekcijama germplazme i njihova inkorporacija u komercijalne genotipove dugotrajan i skup. Za realizaciju ovakvih programa neophodna su finansijska podrška, kao i kooperacija između naučnika i selekcionera iz javnih i privatnih institucija. Jedan od uspešnih primera je korišćenje germplazme kukuruza za poboljšanje kvaliteta zrna, realizovan kroz GEM projekat. Rezultat GEM projekta je stvorenih 65 varijeteta sa poboljšanim sastavom aminokiselina (lizin, metionin i triptofan), povećanim sadržajem ulja i proteina, kao i poboljšanim termalnim svojstvima skroba.

## 2. CILJ RADA

Korišćenje lokalnih populacija kukuruza u procesima selekcije i oplemenjivanja ima za cilj proširivanje genetičke osnove postojeće elitne germplazme. Na ovaj način bi trebalo da se poveća adaptibilnost hibrida kukuruza na abiotičke i biotičke faktore stresa i/ili povećanje kvaliteta zrna za ljudsku i stočnu ishranu. S obzirom na postojeće klimatske promene i rast ljudske populacije, odnosno sve veće potrebe za hranom, stvaranje hibrida poboljšanih performansi predstavlja jedan od glavnih ciljeva savremene poljoprivrede. Karakterizacija i određivanje varijabilnosti lokalnih populacija kukuruza predstavlja prvi korak u procesu pre-bridginga, odnosno prvi korak u omogućavanju njihovog efikasnog korišćenja u programima oplemenjivanja.

Cilj ovog rada je ispitivanje varijabilnosti lokalnih populacija kukuruza iz banke gene Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, primenom morfoloških i molekularnih markera. Na ovaj način će se uraditi karakterizacija i utvrditi odnosi populacija iz različitih agroekoloških grupa.

Primenom RAPD i SSR molekularnih markera utvrdiće se efikasnost različitih marker sistema u proceni genetičke varijabilnosti populacija kukuruza. Takođe će se proceniti i mogućnost korišćenja metode grupnih uzoraka u odnosu na analizu pojedinačnih biljaka.

Introdukovane populacije iz Francuske, Gruzije i Kine koristiće se kao kontrole, radi provere genetičke sličnosti lokalnih i introdukovanih populacija, kako za morfološke tako i za molekularne analize.

Na osnovu rezultata morfoloških i molekularnih analiza, proceniće se najbolji način sveobuhvatnog kombinovanja ovih metoda u izučavanju genetičke varijabilnosti populacija kukuruza. Očekuje se da će dobijeni rezultati dati potpuniju sliku o međusobnom odnosu lokalnih populacija, što će omogućiti njihovo efikasnije održavanje i korišćenje u budućim programima selekcije i oplemenjivanja.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Set od 54 lokalne populacije prikupljene sa teritorije bivše Jugoslavije i šest introdukovanih populacija, a koje sve pripadaju Banci gena Instituta za kukuruz, je analiziran radi utvrđivanja genetičke varijabilnosti lokalnih genotipova. Lokalne populacije predstavljaju svih 18 agro-ekoloških grupa (po tri populacije iz svake grupe). Pošavši od pretpostavke da bi lokalne populacije trebalo da budu genetički sličnije između sebe u odnosu na populacije poreklom iz drugih delova sveta, u eksperiment su uključene i introdukovane populacije. One obuhvataju dve populacije poreklom iz Azije (Kina), a četiri iz dva različita regiona Evrope (po dve iz Gruzije i Francuske). Spisak analiziranih populacija je dat u Tabeli 2.



Tabela 2. Lista 54 lokalne i šest introdukovanih populacija korišćenih za ispitivanje fenotipskih osobina i molekularnu analizu

	Ime agroekološke grupe	Skraćenica grupe	Broj grupe	Skraćenica populacije	Tip zrna	Uzorak	Poreklo
1				cT1	Tvrđunac	Beli domaći	Srbija
2	Crnogorski tvrđunci	cT	1	cT2	Polutvrđunac	Beli kosovski brzak	Bosna i Hercegovina
3				cT3	Tvrđunac	Domaći žuti	Bosna i Hercegovina
4					brZ1	Polutvrđunac	Narandžasti višeredi tvrđunac
5	Bosanski rani zubani	brZ	2	brZ2	Poluzuban	Svetložuti zuban	Bosna i Hercegovina
6				brZ3	Tvrđunac	Žuti polutvrđunac	Bosna i Hercegovina
7					kPT1	Zuban	Tetovac bjeli
8	Kosovski polutvrđunci	kPT	3	kPT2	Poluzuban	Beli osmak	Srbija
9				kPT3	Zuban	Beli polutvrđunac	Srbija
10	Makedonski tvrđunci	makT	4	makT1	Tvrđunac	Belo žito	Crna Gora
11				makT2	Tvrđunac	Visoko seme	Makedonija
12				makT3	Poluzuban	Žolti tvrdi	Makedonija
13	Osmak tipa severnoistočne Amerike	Osm	5	Osm1	Poluzuban	Crveno žuti osmak	Srbija
14				Osm2	Zuban	Brdski osmak	Srbija
15				Osm3	Polutvrđunac	Beli tvrđunac	Srbija

Tabela 2. *Nastavak*

	Ime agroekološke grupe	Skraćenica grupe	Broj grupe	Skraćenica populacije	Tip zrna	Uzorak	Poreklo
16	Prelazni (izvedeni) tvrduci	PT	6	PT1	Tvrduac	Žuti tvrduac	Slovenija
17				PT2	Tvrduac	Ječmenka	Slovenija
18				PT3	Polutvrduac	Beli stodanac	Srbija
19	Meditranski tvrduci	medT	7	medT1	Tvrduac	Pješak	Bosna i Hercegovina
20				medT2	Tvrduac	Rumena gorenka	Slovenija
21				medT3	Tvrduac	Kukuruz domaći	Hrvatska
2	Sitnozrni tvrduci	sT	8	sT1	Tvrduac	Žuti staklarac	Srbija
23				sT2	Tvrduac	Kvarantin K-49	Hrvatska
24				sT3	Tvrduac	Koroška hitrica	Slovenija
25	Osmoredi meki zubani	omZ	9	omZ1	Zuban	Žuti stodanac	Srbija
26				omZ2	Zuban	Beli pločan	Srbija
27				omZ3	Zuban	Staklenac žolti	Srbija
28	Rumunski tvrduci	rT	10	rT1	Polutvrduac	Žuti murt optak	Srbija
29				rT2	Tvrduac	Žuti osmak	Srbija
30				rT3	Poluzuban	Žuti osmak	Srbija
31	Dugoklupi tvrduci	dT	11	dT1	Tvrduac	Žuti tvrduac	Srbija
32				dT2	Tvrduac	Žuti osmak	Hrvatska
33				dT3	Tvrduac	Tinska rumena	Slovenija

Tabela 2. *Nastavak*

	Ime agroekološke grupe	Skraćenica grupe	Broj grupe	Skraćenica populacije	Tip zrna	Uzorak	Poreklo
34	Beli poluzuban Moravac	mPZ	12	mPZ1	Polutvrđunac/ poluzuban	Beli moravac	Srbija
35				mPZ2	Zuban	Beli abavac	Srbija
36				mPZ3	Zuban	Beli	Srbija
37	Zubani kukuruznog pojasa SAD-a	kpZ	13	kpZ1	Zuban	Topčiderac	Srbija
38				kpZ2	Zuban	Šidski zuban	Srbija
39				kpZ3	Poluzuban	Šumadijski beli	Srbija
40	Prelazni zubani	PZ	14	PZ1	Poluzuban	Moravac zuban	Srbija
41				PZ2	Poluzuban	NS 26	Srbija
42				PZ3	Poluzuban	NS 29	Srbija
43	Južni zubani	jZ	15	jZ1	Zuban	Žuti zuban	Hrvatska
44				jZ2	Zuban	Bjeli kukuruz	Hrvatska
45				jZ3	Zuban	Dentože	Hrvatska
46	Srbijanski zubani	srbZ	16	srbZ1	Zuban	Moravac kolomeći kuc	Hrvatska
47				srbZ2	Polutvrđunac	Bjelac zuban	Srbija
48				srbZ3	Zuban	Zlatni zuban	Srbija
49	Tvrđi zubani	tZ	17	tZ1	Zuban	Stopanka beli osmak	Srbija
50				tZ2	Poluzuban	Beli polutvrđunac	Srbija
51				tZ3	Zuban	Tamnožuti poluzuban	Srbija

Tabela 2. *Nastavak*

	Ime agroekološke grupe	Skraćenica grupe	Broj grupe	Skraćenica populacije	Tip zrna	Uzorak	Poreklo
52				mT1	Polutvrđunac	Stopanka beli osmak	Srbija
53	Meki tvrđunci	mT	18	mT2	Tvrđunac	Beli polutvrđunac	Srbija
54				mT3	Poluzuban	Tamnožuti poluzuban	Srbija
<i>Introdukovane populacije</i>							
55				G1	Tvrđunac	285 razuk	Gruzija
56	----	G	--	G2	Zuban	Kartuli krugi	Gruzija
57				F1	Tvrđunac	Pyrenees france10	Francuska
58	---	F	--	F2	Tvrđunac	Pyrenees france3	Francuska
59				K1	Zuban	Qinshanbeimaja	Kina
60	---	K	--	K2	Tvrđunac	Uparjagerda	Kina

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Analize morfoloških osobina, prinosa i komponenti prinosa

Poljski ogledi su izvedeni u 2007. i 2008. godini. Sve populacije su posejane u Zemun Polju (44° 52' 14'' severna geografska širina 20° 19' 48'' istočna geografska dužina, 82m nadmorska visina), u dve gustine (44 640 i 64 935 biljaka po hektaru, sa razmakom između redova 70cm). Ogled je postavljen po slučajno popunjenom bloku (eng. RCB - *Randomized Complete Block*) u dva ponavljanja, četiri reda od svake populacije po ponavljanju i po 20 biljaka po redu. Nicanje biljaka je bilo ujednačeno. Za analize morfoloških osobina uzeta su dva srednja reda. Ukupno je analizirano 18 morfoloških osobina (fenotipskih parametara) na 20 kompetitivnih biljaka po ponavljanju, 40 po gustini, tj 80 biljaka po populaciji. Spisak svih fenotipskih osobina, jedinice u kojima su izražene vrednosti merenja, kao i opis načina merenja su prikazani u Tabeli 3.

U polju u fazi cvetanja su izmerene morfološke osobine i izražene kao srednja vrednost na 80 biljaka po populaciji.

U berbi su obrana srednja dva reda svake populacije u svim ponavljanjima i gustinama i izmerena je težina klipova po populaciji. Takođe je određen broj klipova u srednja dva reda. Odabrano je pet klipova za određivanje sadržaja vlage i težine oklasaka. Preračun prinosa zrna sa parcele na prinos u t/ha sa 14 % vlage radio se prema sledećoj formuli:

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

gde je P - površina elementarne parcele, M<sub>ep</sub> - prinos zrna (masa) dobijen sa elementarne parcele, M<sub>uz</sub> - masa uzorka od 5 klipova, M<sub>ok</sub> - masa oklasaka uzorka od 5 klipova i % VI - procenat vlage u zrnu u trenutku berbe.

Nakon berbe uzeto je 20 klipova po ponavljanju za merenje komponenti prinosa i prinosa. Dimenzije zrna su izmerene pomoću šublera, a uzimano je 10 zrna sa sredine klipa. Masa 1000 zrna je određena tako što su odbrojana zrna, a zatim sušena na 65°C 26h i izmerena na analitičkoj vagi.

Izračunate su srednje vrednosti odabranih biljaka svih populacija za analizirana svojstva.

Tabela 3. Analizirane morfološke osobine, komponente prinosa i prinos

Tip osobine	Osobina	Skraćenica	Jedinica	Opis merenja
Morfološke osobine	Visina biljke	VB	cm	Visina biljka od tla do vrha metlice
	Visina do klipa	VK	cm	Visina biljke od tla do primarnog klipa
	Broj listova	BL		Ukupan broj listova na biljci
	Dužina lista do klipa	DLK	cm	Dužina lista do primarnog klipa
	Dužina metlice	DM	cm	Od nodusa ispod najniže primarne grane pa do vrha osovine metlice
	Broj grana metlice	BPGM		Broj primarnih grana metlice
	Dužina granatog dela metlice	DGM	cm	Dužina dela metlice sa kog polaze primarne grane metlice
	Dužina ose metlice	DOM	cm	Dužina od poslednje primarne grane metlice do vrha
	Period između metličanja i svilanja	ASI	dani	Razlika između pojave polena i svile kod više od 50% biljaka odabranih za analizu po familiji
Komponente prinosa	Broj redova zrna	BRZ		Ukupan broj redova zrna na klipu
	Broj zrna u redu	BZR		Ukupan broj zrna u redu
	Dužina klipa	DK	cm	Dužina klipa do vrha
	Prečnik klipa	PK	cm	Dijametar izmeren na sredini klipa
	Širina zrna	ŠZ	cm	Širina zrna sa sredine klipa
	Debljina zrna	DEZ	cm	Debljina zrna sa sredine klipa
	Dužina zrna	DZ	cm	Dužina zrna sa sredine klipa
	Masa 1000 zrna	MZ	g	Prosečna masa 1000 zrna sa sredine klipa
Agronomske osobine	Prinos	PR	t/h	Preračun prinosa zrna sa parcele na prinos u t/ha sa 14 % vlage

### 3.2.2. Statistička analiza fenotipskih osobina

Od osnovnih statističkih pokazatelja za svako svojstvo je utvrđena srednja vrednost ( $\bar{X}$ ) minimalna vrednost (min), maksimalna vrednost (max), standardna devijacija ( $\sigma$ ), koeficijent varijacije (CV) i varijansa ( $\sigma^2$ ). Pomenuti parametri su izračunati po sledećim formulama (Hadživuković, 1991):

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

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

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

#### *Analiza varijanse*

Obrada rezultata ispitivanih osobina populacija izvršena je metodom analize varijanse (ANOVA). Radi testiranja značajnosti varijacija između populacija urađena je trofaktorijalna analiza varijanse po modelu koji je prikazan u Tabeli 4 (Anderson i Bancroft, 1952):

Tabela 4. Model trofaktorijalne analize varijanse

Izvori varijacija	Stepeni slobode	Sredine kvadrata	Očekivana vrednost sredine kvadrata
Ponavljanja – R	(r-1)		
Godine – Y	(y-1)	M <sub>8</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + rg\delta_{DY} + ry\delta_{DG} + ryg\delta_D$
Gustine (varijante) – D	(d-1)	M <sub>7</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + rg\delta_{DY} + rd\delta_{GS} + rdg\delta_Y$
Genotipovi – G	(g-1)	M <sub>6</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + ry\delta_{DG} + rd\delta_{YG} + rdy\delta_G$
Gus. x god. – D x Y	(d-1)(y-1)	M <sub>5</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + rg\delta_{DY}$
Gus. x gen – D x G	(d-1)(y-1)	M <sub>4</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + rg\delta_{DG}$
God. x gen – Y x G	(y-1)(g-1)	M <sub>3</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG} + rd\delta_{YG}$
D x Y x G	(d-1)(y-1)(g-1)	M <sub>2</sub>	$\delta_E + r\delta_{DYG}$
Pogreška – E	(r-1)(ryg-1)	M <sub>1</sub>	$\delta_E$

Komponente varijanse izračunate su po sledećim formulama:

$$\delta_E = M_1$$

$$\delta_{DYG} = (M_2 - M_1) / r$$

$$\delta_{YG} = (M_3 - M_2) / rd$$

$$\delta_{DG} = (M_4 - M_2) / ry$$

$$\delta_{DY} = (M_5 - M_2) / rg$$

$$\delta_G = (M_6 + M_2 - M_3 + M_4) / rdy$$

$$\delta_Y = (M_6 + M_2 - M_3 + M_5) / rdg$$

$$\delta_D = (M_6 + M_2 - M_4 + M_5) / ryg$$

Za ovaj model fenotipska varijansa glasi:

$$\delta_F = \delta_E + \delta_E / rgy + \delta_{DYG} / dy + \delta_{DG} / d + \delta_{YG} / y$$

Koeficijent heritabilnosti (u širem smislu) ispitivanih osobina ( $h^2$ ) za sve navedene modele izračunat je na osnovu odnosa genotipske ( $\delta_G$ ) i fenotipske ( $\delta_F$ ) varijanse:

$$h^2 = \frac{\delta_G}{\delta_F}$$

*Analiza principalnih komponenti* (eng. PCA - *Principal Component Analysis*) je urađena na osnovu fenotipske korelacione matrice prilagođenih srednjih vrednosti analiziranih osobina svih populacija. Matrica distanci između populacija je izračunata na osnovu standardizovanih osnovnih komponenti za eigen vrednosti veće od jedan.

ANOVA i PCA analiza su urađene u statističkom programu *SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version*.

#### *Klaster analiza*

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



### 3.2.3. Molekularne analize

Molekularna karakterizacija odabranih populacija kukuruza je urađena sa 30 RAPD i 30 SSR markera. Ovi markeri su odabrani iz javne baze podataka MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org>) na osnovu stepena polimorfizma, pozicije na hromozomu i čitljivosti traka.

Po 20 pojedinačnih biljaka iz pet slučajno odabranih populacija (jZ1, mT1, medT3, Osm2 i K1) je testirano sa RAPD i SSR markerima, radi poređenja rezultata grupnih i pojedinačnih uzoraka.

#### 3.2.3.1. Izolacija DNK

DNK je izolovana iz semena populacija, pri čemu je svaki genotip predstavljen sa po 30 zrna koja su samlevena u mlinu za simultano mlevenje pojedinačnog zrna (Kataskapt). Vreme mlevenja je iznosilo dva puta po tri minuta. Od svakog zrna izmereno je po 100mg i napravljen je grupni uzorak DNK za izolaciju. Takođe je pripremljeno tkivo za analizu pojedinačnih uzoraka.

Izolacija DNK je urađena prema protokolu Rogers-a i Bendich-a (1988). Izmereno je po 250mg prethodno pripremljenog grupnog i pojedinačnih uzoraka. U svaki uzorak dodato je 2 x CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 1% PVP; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl, pH 8,0) pufera za izolaciju, u odnosu tkivo:pufer 1:1 i 1 x CTAB pufer (dva puta razblažen 2 x CTAB pufer) u odnosu tkivo:pufer 1:2. Oba pufera su prethodno zagrejana na 65°C u vodenom kupatilu. Uzorak sa puferom je homogenizovano laganim okretanjem ependorf tube i inkubirano u vodenom kupatilu na 65°C 30 minuta. Nakon inkubiranja dodata je jedna zapremina Sevagovog reagensa (hloroform i izoamil alkohol u odnosu 24:1), radi denaturacije proteina, i uzorci su mućkani do dobijanja emulzije. Uzorci su zatim centrifugirani 2 minuta na 12 000 rpm na +4°C. Nakon centrifugiranja gornja faza je prebačena u novu ependorf tubu, a donja faza je odbačena. U uzorak je zatim dodata 1/10 zapremine 10% CTAB pufera, prethodno zagrejanog u vodenom kupatilu na 65°C. Zatim je dodata jedna zapremina Sevagovog reagensa i uzorci su mućkani do dobijanja emulzije, nakon čega su centrifugirani 2 minuta na 12 000 rpm na +4°C. Nakon centrifugiranja, gornja faza je prebačena u novu ependorf tubu, a donja je

odbačena. U uzorak je zatim dodata jedna zapremina pufera za precipitaciju (1% CTAB, 50mM Tris, pH 8,0; 10mM EDTA, pH 8,0). Uzorci su lagano promućkani i inkubirani na sobnoj temperaturi 20 minuta, do taloženja DNK. Nakon precipitacije izvršeno je centrifugiranje 2 minuta na 12 000 rpm na +4°C. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u „*high-salt*“ TE puferu (10 mM Tris, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0; 1M NaCl) i inkubiran u vodenom kupatilu na 65°C 10 minuta. Nakon inkubacije dodato je dve zapremine hladnog 96% etanola, sadržaj ependorf epruvete je promućkan i ostavljen 30 minuta na -20°C. Uzorci su zatim centrifugirani 15 minuta na 12 000 rpm na +4°C. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a talog ispran dva puta u 1 mL hladnog 75% etanola. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen. Talog DNK je sušen na sobnoj temperaturi oko 30 minuta, a zatim resuspendovan u 20-30 µL 0.1 x TE puferu (10mM TRIS, 1mM EDTA pH8,0).

### 3.2.3.2. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK

Koncentracija i kvalitet DNK su određeni spektrofotometrijski i gel-kvantifikacijom.

#### *Spektrofotometrijski*

Uzorak je razblažen u 0,1 x TE puferu 1000 puta i merena je apsorbancija na talasnim dužinama  $\lambda=230\text{nm}$ ,  $\lambda=260\text{nm}$  i  $\lambda=280\text{nm}$  (spektrofotometar Shimadzu UV-1601). Koncentracija DNK je izračunata po formuli:

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

$\text{OD}_{260}$  – apsorbancija na talasnoj dužini od 260 nm

R – razblaženje uzorka

50 – koncentracija 50 µg/µL koja ima apsorbancu OD= 1

Jedna jedinica optičke gustine odgovara koncentraciji DNK od 50 µg/mL. Uobičajeno je da DNK bude kontaminirana sa drugim molekulima (proteini, organska jedinjenja i dr). Odnos apsorbanci na 260nm i 280nm se koristi da bi se procenila čistoća DNK.  $A_{260}$  pokazuje koncentraciju nukleinskih kiselina u uzorku, dok proteini apsorbuju svetlost na 280 nm. DNK se smatra dovoljno čistom za marker analizu ako je

ovaj odnos 1,8-2,0. Odnos  $A_{260}/A_{230}$  bi trebalo da se kreće u opsegu 1,8-2,2 i pokazuje prisustvo fenola, koji apsorbuje na 230 nm.

#### *Kvantifikacija na gelu*

Genomska DNK je analizirana na 0,8% agaroznom gelu. Kao standard za poređenje koncentracija korišćena su različita razblaženja  $\lambda$  DNK (5, 10, 50, 100, 250ng/ $\mu$ L). Koncentracija DNK uzoraka je određena vizuelnim poređenjem sa koncentracijama standarda.

Kvalitet DNK, odnosno stepen razgradnje pri ekstrakciji, procenjen je poređenjem traka uzoraka sa  $\lambda$  DNK. Razmaz ispod traka ukazuje na mehaničku ili hemijsku degradaciju (loš kvalitet).

### **3.2.3.3. Genetička karakterizacija RAPD markerima**

RAPD reakcija je rađena po protokolu Williams-a (1990), sa 30 proba (Tabela 5). Amplifikacija je izvedena u 25  $\mu$ L reakcione smeše sa 5 mM  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ M dNTPs, 0,2  $\mu$ M prajmerom, 2,5 U *Taq* polimeraze (Fermentas) i 50 ng genomske DNA. Reakcija je izvedena u PCR mašini Biometra TProfessional Standard 96, u sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94°C/2 min, praćena sa 45 ciklusa koji se sastoje od denaturacije na 94°C/30sek, vezivanja prajmera na 40°C/1min i elongacije na 72°C/1min. Poslednji korak je završna elongacija u trajanju od 7 minuta.

Po završenoj reakciji uzorci su mešani sa 0.2 % rastvorom brom-fenol plave boje i nanošeni na agarozni gel (1,5% agroza u 1 x TBE). U kadicu za elektroforezu je sipano 2L 0,5 x TBE pufera (napravljen razblaženjem 5 x TBE pufera – 445mM Tris; 445mM borna kiselina, 0,5M EDTA, pH 8,0). Na gel je nanošeno po 10 $\mu$ L PCR smeše. Kao marker je korišćen 1kb DNK marker (Fermentas). Elektroforeza je trajala 2h na 40mA na aparatu DNA Sub-Cell Bio Rad. Po završenoj elektroforezi gelovi su inkubirani u rastvoru etidijum bromida (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L), a zatim su fotografisani digitalnim fotoapartom pod UV svetlom na transiluminatoru. Profili traka su zapisani u binarnom kodu kao odsustvo (0) ili prisustvo (1) određene trake.

Tabela 5. Naziv i sekvence RAPD prajmera korišćenih u analizi populacija

	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')		Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')
1	GEN 2-80-7	GCAGGTCGCG	16	GEN 4-70-4	GGACCGCTAG
2	GEN 4-70-3	CTGTCCGGCTC	17	GEN 2-80-2	CGACGGGTGC
3	GEN 2-80-10	CGCGAACGGC	18	OPB01	GTTTCGCTCC
4	GEN 1-80-5	ACCCCAGCCG	19	OPB04	GGACTGGAGT
5	GEN 1-80-4	CGCCCGATCC	20	OPB05	TGCGCCCTTC
6	GEN 2-80-5	CGAGACGGGC	21	OPB08	GTCCACACGG
7	GEN 1-70-5	GAGATCCGCG	22	OPB09	TGGGGGACTC
8	GEN 1-80-4	CGCCCGATCC	23	OPB11	GTAGACCCGT
9	GEN 1-70-9/1	GGACTCCACG	24	OPB12	CCTTGACGCA
10	GEN 1-70-9/2	TGCAGCACCG	25	OPB13	TTCCCCCGCT
11	GEN 2-80-1	GCAGCAGCCG	26	OPB15	GGAGGGTGTT
12	GEN 2-80-9	GCACGTGAGG	27	OPB16	TTTGCCCGGA
13	GEN 1-80-9	GCACGGTGGG	28	OPB17	AGGGAACGAG
14	GEN 1-70-10	CAGACACGGC	29	OPB19	ACCCCCGAAG
15	GEN 4-70-2	GGACCGACTG	30	OPB20	GGACCCTTAC

#### 3.2.3.4. Genetička karakterizacija SSR markerima

SSR analiza je urađena metodom po Edwards-a i sar. (1991), sa 30 pari prajmera (Tabela 6). PCR reakciona smeša je sadržala 25 µL reakcione smeše koja se sastojala od DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) - Fermentas, 0,5µM prajmera (*forward* i *reverse*) i 50ng DNK.

Reakcija je izvedena po sledećem programu: inicijalna denaturacija na 95°C/5 min, zatim sledi 15 ciklusa denaturacije na 95°C/30sek, nakon toga vezivanje prajmera na 63,5°C/1min (smanjivanje temperature za -0,5°C) i elongacija na 72°C/1min.

Sledeća 22 ciklusa su se odvijala na 95°C/30 sek, 56°C/1min i 72°C/1min, sa finalnom elongacijom na 72°C/7min.

PCR produkti su razdvojeni na 8% poliakrilamidnom gelu (30% akrilamid, 5 x TBE, 10% amonijumpersulfat i TEMED). Na gel je nanošeno po 8 µL PCR smeše.

Kao DNK marker korišćen je 100bp DNK marker (Fermentas). Elektroforeza u 1xTBE (napravljen od 5xTBE pufera - 445mM Tris; 445mM Borna kiselina, 0,5M EDTA, pH 8,0) je trajala 1,5h na 40mA na vertikalnom gel sistemu (Mini Protean Tetra-Cell BioRad). Nakon elektroforeze gelovi su bojeni 20 minuta u rastvoru 0,5 µg/µL etidijum bromida, a zatim fotografisani pod UV svetlom transiluminatora digitalnim fotoaparatom. Korišćene probe detektuju pojedinačne lokuse, tako da je svaka traka smatrana alelom. SSR profili za svaki prajmer su očitani merenjem frekvencije alela, koja je izražena kao procenat individualnih traka unutar uzorka. Za određivanje frekvencije korišćen je UN-SCAN-IT gel 6.1 programski paket.

Tabela 6. Naziv, pozicija na hromozomu (bin), ponovak i sekvenca SSR prajmera korišćenih u analizi populacija

	Naziv prajmera	Bin	Ponovak	Sekvenca prajmera ( <i>forward</i> i <i>reverse</i> )
1	umc1282	1.01	(AT)6	5'-TACACTACACGACTCCCAACAGGA-3' 5'-GCGAGGGTTCTTTCCATAGAGAAT-3'
2	umc2047	1.09	(GACT)4	5'-GACAGACATTCCTCGCTACCTGAT-3' 5'-CTGCTAGCTACCAAACATTCCGAT-3'
3	umc1418	4.08	(GGAAG	5'-TCACACACACACTACACTCGCAAT-3' 5'-GAGCCAAGAGCCAGAGCAAAG-3'
4	umc1109	4.10	(ACG)4	5'-TCACACACACACTACACTCGCAAT-3' 5'-GAGCCAAGAGCCAGAGCAAAG-3'
5	umc1274	5.03	(TGC)5	5'-TTGAGTCTGGTACTGCGTATGAGG-3' 5'-TAGCACTCCAACAGCAAGAGTTTG-3'
6	phi087	5.06	ACC	5'-GAGAGGAGGTGTTGTTGACACAC-3' 5'-ACAACCGGACAAGTCAGCAGATTG-3'
7	umc1393	7.02	(GTC)4	5'-CCTTCTTCTTATTGTCACCGAACG-3' 5'-GCCGATGAGATCTTTAACAACCTG-3'
8	umc1324	7.03	(AGC)5	5'-ATCCATCATCATCATCATTGCTTG-3' 5'-ATGTCATCATGTACCAGGTGTTGG-3'
9	umc1492	9.04	(GCT)4	5'-GAGACCAACCAAACTAATAATCTCTT-3' 5'-CTGCTGCAGACCATTTGAAATAAC-3'

Tabela 6. *Nastavak*

	Naziv	Bin	Ponovak	Sekvenca prajmera (forward i reverse)
10	umc1827	10.05	(GAC)6	5'-GCAAGTCAGGGAGTCCAAGAGAG-3' 5'-CCACCTCACAGGTGTTCTACGAC-3'
11	phi033	9.01	AAG	5'-ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC-3' 5'-ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT-3'
12	umc126	5.06	AG	5'-CAACAGGGTGAACCCTCTGTACTT-3' 5'-AATATGGTGTGTGATTTGCATCG-3'
13	umc1400	3.06	(TTTG)6	5'-TTACCAATTGTATCCATCACACCG-3' 5'-ACAACATAGCAGCCATCCTACTCG-3'
14	bnlg1526	10.04	AG(15)	5'-ACGAGCGAGTGGAGAATAGG-3' 5'-AGCCCAGTACGTGGGGTC-3'
15	bnlg1695	5.07	AG(30)	5'-ACCAAATCCTCATCTCGGAA-3' 5'-CAATCTCCCCAAAATCTCGA-3'
16	bnlg1643	1.08	AG(24)	5'-ACCACCGTCCACCTCCAC-3' 5'-ATTGACCCCGTGACCCTC-3'
17	umc1013	1.08	(GA)9	5'-TAATGTGTCCATACGGTGGTGG-3' 5'-AGCTGGCTAGTCTCAGGCACTC-3'
18	bnlg2235	8.02	AG(23)	5'-ATCCGGAGACACATTCTTGG-3' 5'-CTGCAAGCAACTCTCATCGA-3'
19	umc1695	7.00	(CA)8	5'-CAGGTAATAACGACGCAGCAGAA-3' 5'-GTCCTAGGTTACATGCGTTGCTCT-3'
20	umc2129	2.07	(CGC)5	5'-ACGTGGTCATCACTCACCGC-3' 5'-AAGGAGGAGCGTTCTCGTGG-3'
21	bnlg1443	6.05	AG(25)	5'-TACCGGAATCCTCTTTGGTG-3' 5'-TTTGACAACCTCTTCCAGGG-3'
22	umc1506	10.05	AG(19)	5'-AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG-3' 5'-ATAAAGGTTGGCAAACGTAGCCT-3'
23	umc1040	9.01	(CT)11	5'-CATTCACTCTCTTGCCAACTTGA-3' 5'-AGTAAGAGTGGGATATTCTGGGAGTT-3'
24	umc1859	6.06	(TC)8	5'-ATATACATGTGAGCTGGTTGCCCT-3' 5'-GCATGCTATTACCAATCTCCAGGT-3'
25	umc1070	1.02	(TC)7	5'-TTCCAGTAAGGGAGGTGCTG-3' 5'-TAAGCAACATATAGCCGGGC-3'
26	umc1782	7.04	(GAC)4	5'-CGTCAACTACCTGGCGAAGAA-3' 5'-TCGCATACCATGATCACTAGCTTC-3'
27	phi080	8.08	AGGAG	5'-CACCCGATGCAACTTGCGTAGA-3' 5'-TCGTACGTTCCACGACATCAC-3'
28	umc1944	7.04		5'-GAAGAAGGATCGCACACATGG-3'- 5'-AGACTGTCGCGCTGTACTATACCC-3'
29	umc2039	4.03	(CAG)5	5'-CATCTCCTACCAGCTCACCCC-3' 5'-GCTCGGGTAGTAGTGTCTCCTT-3'
30	umc1357	9.05	(CTG)8	5'-TAGACATGTTGAAACCAGGACCG-3' 5'-ACGACGTCAACAACAGCATGA-3'

### 3.2.3.5. Statističke metode za molekularne markere

Na osnovu rezultata RAPD i SSR analiza utvrđena je struktura polimorfizma populacija. Genetička srodnost između populacija, na osnovu genetičkih sličnosti i klaster analiza određena je korišćenjem NTSYS statističkog paketa verzija 2.1 (Rofhl, 2000).

Za određivanje genetičke sličnosti analiziranih populacija na osnovu RAPD binarne matrice korišćen je Jaccard-ov (1908) koeficijent sličnosti:

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

gde je:

$GS_{ij}$  - indeks genetičke sličnosti

$a$  - prisustvo trake u oba genotipa  $i$  i  $j$  (1,1)

$b$  - prisustvo trake kod genotipa  $i$  a odsustvo kod genotipa  $j$  (1,0)

$c$  - prisustvo trake kod genotipa  $j$  a odsustvo kod genotipa  $i$  (0,1)

Genetičke distance između analiziranih populacija na osnovu SSR matrice alelnih frekvenci su određene korišćenjem Nei i Li-ovog (1979) koeficijenta:

$$GS_{ij} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

$N_{ij}$  - broj zajedničkih alela za genotip  $i$  i genotip  $j$

$N_i$  - broj alela genotipa  $i$

$N_j$  - broj alela genotipa  $j$

Radi poređenja rezultata, vrednosti genetičkih distanci dobijenih SSR analizom su transformisane u vrednosti genetičke sličnosti prema formuli:  $GS_{ij} = 1 - GD_{ij}$ .

Dendrogrami su konstruisani na osnovu matrica genetičkih sličnosti po *Jaccard*-u za RAPD i po *Nei* i *Li*-u za SSR markere, korišćenjem UPGMA (*Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean*) metode u NTSYS statističkom paketu verzija 2.1 (Rofhl, 2000).Primenom Pearson-ovog koeficijenta korelacije urađeno je poređenje matrica sličnosti po *Jaccard*-u za RAPD markere i *Nei* i *Li*-u za SSR markere (Microsoft Office, 2003).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza fenotipskih osobina

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

Srednje vrednosti ( $\bar{X}$ ) i parametri varijabilnosti 18 analiziranih fenotipskih i agronomskih osobina su dati u Tabeli 7, a prikazane vrednosti se odnose na svih 60 analiziranih populacija. Koeficijent varijacije (CV) je izračunat na osnovu srednjih vrednosti i standardne devijacije ( $\sigma$ ) da bi se uporedila variranja osobina.

Najmanji koeficijenti varijacije su izračunati za dužinu metlice (8%) i debljinu zrna (9%), dok je najveće variranje nađeno kod ASI (29%). Koeficijent varijacije veći od 20% je utvrđen i kod prinosa (21%), broja primarnih grana metlice (22%) i visine do klipa (26%).



Tabela 7. Skraćenice, srednje vrednosti ( $\bar{X}$ ), rang, standardna devijacija ( $\sigma$ ), koeficijent variranja (CV) i varijansa ( $\sigma^2$ ) analiziranih osobina

Osobine	Skraćenice	$\bar{X}$	Rang		$\sigma$	CV	$\sigma^2$
			Min	Max			
Visina biljke (cm)	VB	208,28	121,86	293,82	28,48	13%	811,297
Visina do klipa (cm)	VDK	78,74	31,66	142,60	20,68	26%	427,947
Broj listova do klipa	BLI	12,79	9,17	17,42	1,60	12%	2,584
Dužina lista (cm)	DL	76,18	51,08	93,57	8,16	11%	66,695
Dužina metlice (cm)	DM	45,42	36,33	51,03	3,46	8%	11,966
Dužina ose metlice (cm)	DOM	24,30	17,79	30,35	2,73	11%	7,470
Broj primarnih grana metlice	BPGM	15,58	7,82	23,78	3,44	22%	11,819
Dužina granatog dela metlice (cm)	DGM	9,97	5,88	13,46	1,62	16%	2,619
Dužina klipa (cm)	DK	14,94	7,86	17,80	1,73	12%	3,024
Broj redova zrna	BRZ	12,02	8,40	18,08	2,28	19%	5,217
Broj zrna u redu	BZR	30,39	15,36	38,06	4,03	13%	16,188
Prečnik klipa (cm)	PK	3,89	3,13	4,71	0,41	11%	0,167
Dužina zrna (cm)	DZ	0,91	0,67	1,31	0,12	17%	0,014
Širina zrna (cm)	ŠZ	0,87	0,64	1,17	0,12	14%	0,013
Debljina zrna (cm)	DEZ	0,42	0,37	0,55	0,04	9%	0,001
Period između metličjenja i svilanja (dani)	ASI	5,16	2,00	9,75	1,5	29%	2,342
Prinos (t/ha)	PR	3,59	1,30	5,50	0,74	21%	0,543
Masa 1000 zrna (g)	MZ	235,92	152,50	328,75	37,47	16%	1404,013

#### 4.1.2. Analiza varijanse osobina ispitivanih populacija

Analiza varijanse za lokalne populacije je pokazala značajne razlike između analiziranih genotipova kod svih osobina za različite izvore variranja. U Tabeli 8. prikazani su nivoi značajnosti za sredine kvadrata za tri faktora (godina, gustina i genotip) i njihovih interakcija.

Značajna varijabilnost je postojala između godine i svih analiziranih osobina, osim za debljinu zrna – DEZ. Visina biljke –VB, visina do klipa – VDK, broj listova – BLI, dužina metlice – DM, dužina ose metlice – DOM, broj primarnih grana metlice – BPGM, dužina granatog dela metlice –DGM, dužine klipa – DK, broj redova zrna – BRZ, dužine zrna – DZ, širine zrna – ŠZ prečnik klipa – PK, period između metličenja i svilanja – ASI, prinos – PR i masa 1000 zrna – MZ pokazali su visoko značajno variranje ( $P<0,001$ ) po godinama. Srednje značajno variranje ( $P <0,01$ ) uočeno je kod dužine lista – DL, dok je broj zrna u redu – BZR pokazao slabo značajno variranje ( $P<0,05$ ).

Gustina nije bila značajan izvor variranja za: visinu do klipa – VDK, broj listova – BLI, dužinu lista – DL, dužinu metlice – DM, dužinu zrna – DZ, širinu zrna – ŠZ, period između metličenja i svilanja – ASI i masu 1000 zrna – MZ. Visoko značajno variranje ( $P<0,001$ ) između gustina pokazale su: visina biljke –VB, dužina granatog dela metlice – DGM, broj primarnih grana metlice – BPGM, dužina klipa – DK, debljina zrna – DEZ i prinos – PR. Dužina ose metlice – DOM, , broj zrna u redu – BZR, broj redova zrna – BRZ i prečnik klipa – PK su pokazali slabo značajno variranje ( $P<0,05$ ).

Genotip je bio značajan izvor variranja za sve ispitivane osobine. Visoko značajno variranje ( $P<0,001$ ) je uočeno kod svih osobina.

Interakcija godina x gustina nije značajno uticala na: broj listova – BLI, dužinu klipa – DK, broj zrna u redu – BZR, prečnik klipa – PK, dužinu zrna – DZ, širinu zrna – ŠZ, debljinu zrna – DEZ i masu 1000 zrna – MZ. Nasuprot tome, visoko značajno variranje ( $P<0,001$ ) uočeno je kod: visine biljke –VB, visine do klipa – VDK, dužine lista – DL, prinosa - PR i perioda između metličenja i svilanja – ASI. Srednje značajno

variranje ( $P < 0,01$ ) dobijeno je za: dužinu metlice – DM, dužinu ose metlice – DOM, broj primarnih grana metlice – BPGM, dužinu granatog dela metlice – DGM i broj redova zrna – BRZ.

Interakcija godina  $\times$  genotip je imala značajan efekat na variranje većine osobina, osim za dužinu granatog dela metlice – DGM, broj zrna u redu – BZR, širinu zrna – ŠZ, period između metličanja i svilanja – ASI i masu 1000 zrna – MZ. Visina biljke – VB, visina do klipa – VDK, broj listova – BLI, dužina lista – DL, dužina klipa – DK, broj redova zrna – BRZ i prečnik klipa – PK pokazali su visoko značajno variranje ( $P < 0,001$ ). Srednje značajno variranje ( $P < 0,01$ ) uočeno je kod dužine metlice – DM, dužine ose metlice – DOM, broja primarnih grana metlice – BPGM, dužine granatog dela metlice – DGM i mase 1000 zrna – MZ, dok su dužine zrna – DZ, debljina zrna – DEZ i prinos – PR imali slabo značajno variranje ( $P < 0,05$ ).

Interakcije godina  $\times$  gustina i godina  $\times$  gustina  $\times$  genotip nisu pokazale značajno variranje ni za jednu osobinu.

Tabela 8. Nivoi značajnosti za sredine kvadrata analiziranih osobina populacija kukuruza dobijene iz rezultata trofaktorijalne ANOVA-e

Osobine	Izvor variranja						
	Godina	Gustina	Genotip	Godina x gustina	Godina x genotip	Genotip x gustina	Godina x gustina x genotip
VB	***	***	***	***	***	ns	ns
VDK	***	ns	***	***	***	ns	ns
BLI	***	ns	***	ns	***	ns	ns
DL	**	ns	***	***	***	ns	ns
DM	***	ns	***	**	**	ns	ns
DOM	***	*	***	**	**	ns	ns
BPGM	***	***	***	**	**	ns	ns
DGM	***	***	***	**	ns	ns	ns
DK	***	***	***	ns	***	ns	ns
BRZ	***	*	***	**	***	ns	ns
BZR	*	*	***	ns	ns	ns	ns
PK	***	*	***	ns	***	ns	ns

Tabela 8. *Nastavak*

Osobine	Izvor variranja						
	Godina	Gustina	Genotip	Godina x gustina	Godina x genotip	Genotip x gustina	Godina x gustina x genotip
DZ	***	ns	***	ns	*	ns	ns
ŠZ	***	ns	***	ns	ns	ns	ns
DEZ	ns	***	***	ns	*	ns	ns
ASI	***	ns	***	***	ns	ns	ns
PR	***	***	***	***	*	ns	ns
MZ	***	ns	***	ns	ns	ns	ns

\*, \*\* i \*\*\* statistički značajno na nivou od 0,05; 0,01 i 0,001, respektivno; ns- statistički nesignifikantno

VB - visina biljke; VDK - visina biljke do klipa; BLI - broj listova; DL - dužina lista; DM – dužina metlice; DOM – dužina ose metlice; BPGM - broj primarnih grana metlice; DGM – dužina dranatog dela metlice; DK – dužina klipa; BRZ – broj redova zrna; BZR – broj zrna u redu; PK – prečnik klipa; DZ – dužina zrna; ŠZ – širina zrna; DEZ – debljina zrna; ASI – period između metličanja i svilanja; PR – prinos; MZ – masa 1000 zrna.

#### **4.1.3. Komponente varijanse i heritabilnosti u širem smislu za analizirane osobine populacija**

Iz analize varijanse izračunate su genotipska i fenotipska varijansa, kao i heritabilnost u širem smislu za analizirane osobine, a njihove vrednosti su prikazane u Tabeli 9.

Procenjena heritabilnost je bila visoka za sve ispitivane osobine, osim za dužinu granatog dela metlice –DGM (0,46). Koeficijent heritabilnosti je bio najveći za visinu biljke - VB, visinu do klipa - VDK, dužina lista do klipa – DLK, , dužinu klipa – DK, broj primarnih grana metlice – BPGM, broj redova zrna - BRZ, broj zrna u redu –BZR, prečnik klipa – PK i širinu zrna – ŠZ. Kod ovih osobina koeficijent heritabilnosti je bio vrlo visok, preko 0,90. Za ostale ispitivane osobine vrednost koeficijenta heritabilnosti se kretala od 0,63 (period između metličjenja i svilanja – ASI) do 0,86 (dužina metlice – DM).

Tabela 9. Genetička varijansa ( $\delta_G$ ), fenotipska varijansa ( $\delta_F$ ) i heritabilnost u širem smislu ( $h^2$ ) ispitivanih osobina

Osobina	$\delta_G$	$\delta_F$	$h^2$
VB	803,2006	825,6863	0,98
VDK	424,4416	434,1334	0,98
BL	1,62225	1,995	0,81
DLK	67,37413	71,312	0,94
DM	11,8755	13,8087	0,86
DOM	5,8004	7,5329	0,77
BPGM	11,8155	13,0625	0,90
DGM	2,11275	4,546	0,46
DK	3,046	3,27185	0,93
BRZ	5,2125	5,2955	0,98
BZR	13,427	14,58375	0,92
PK	0,1655	0,1815	0,91
DZ	0,0145	0,018	0,80
ŠZ	0,01325	0,013375	0,99
DEZ	0,001	0,00125	0,80
ASI	2,281	3,61825	0,63
PR	0,4645	0,63	0,74
MZ	958,51	1297,697	0,74

#### 4.1.4. Odnosi između analiziranih osobina i klasifikovanje populacija

Radi klasifikovanja populacija na osnovu morfoloških i agronomskih osobina urađena je PCA analiza (*Principal Component Analysis*). Odnosi između analiziranih osobina su prikazani u Tabeli 10. Eigen vrednosti za prvih pet glavnih komponenti (PC) bile su veće od jedan i činile su 82,59% od ukupnih varijacija. U prvoj PC (37,32%) najvažnije osobine su bile visina do klipa i broj listova. Takođe su bile važne visina biljke, dužina lista do klipa i broj primarnih grana metlice. U drugoj PC (18,43%) najveće eigen vrednosti pripale su dužini metlice i dužini ose metlice. Treća PC (11,20%) je opisala varijacije u vezi sa prečnikom klipa i debljinom zrna. U četvrtoj i petoj PC (8,57% i 7,07%) dominantne osobine su bile broj redova zrna, širina zrna, masa 1000 zrna i debljina zrna. Zaključuje se da lokalne populacije kukuruza mogu biti okarakterisane pomoću osobina kao što su: rast biljke, osobine metlice i karakteristike zrna.

Analizirane populacije su prikazane na grafikonu koji je definisan sa prve dve ose, PC1 i PC2 (Slika 1). Sve dT, PZ i tZ lokane populacije, kao i introdukovane populacije iz Kine i Gruzije imale su pozitivnu vrednost PC1. Negativnu vrednost PC1 imale su sve populacije PT, sT i kpT i introdukovane populacije iz Francuske. Po dve populacije iz cT (cT2 i cT3), brZ (brZ2 i brZ3), makT (makT1 i makT2), medT (medT2 i medT3), mT (mT1 i mT2), rT (rT2 i rT3), mPZ (mPZ1 i mPZ2), jZ (jZ1 i jZ3), kpZ (kpZ1 i kpZ3) i Osm (Osm2 i Osm3) imale u negativne vrednosti PC1, dok su cT1, brZ1, makT3, medT1, mT3, rT1, mPZ3, jZ2, kpZ2 i Osm1 imale pozitivne vrednosti PC1. Nasuprot tome, po dve populacije iz srbZ (srbZ1 i srbZ3) i omZ (omZ1 i omZ2) imale su pozitivnu vrednost PC1, a srbZ2 i omZ3 negativne vrednosti za PC1.

PCA metoda je dovela do nešto većeg grupisanja zubana i poluzubana na pozitivnoj strani PC1 ose, dok se veći broj tvrdunaca i polutvrdunaca našao sa negativne strane PC1.

Kod populacija koje su zauzele mesto na pozitivnoj strani PC1 izmerene su veće vrednosti od prosečnih za visinu biljke, dužinu lista do klipa i broj listova. Prosečna vrednost visine biljke iznosila je 208,28cm, dok su je prosečne vrednosti ove osobine kod populacija na pozitivnoj vrednosti PC1 iznosila 230,86cm. Dužina lista svih populacija je imala prosečnu vrednost 76,18cm, dok je prosek ove osobine bio 95,49cm

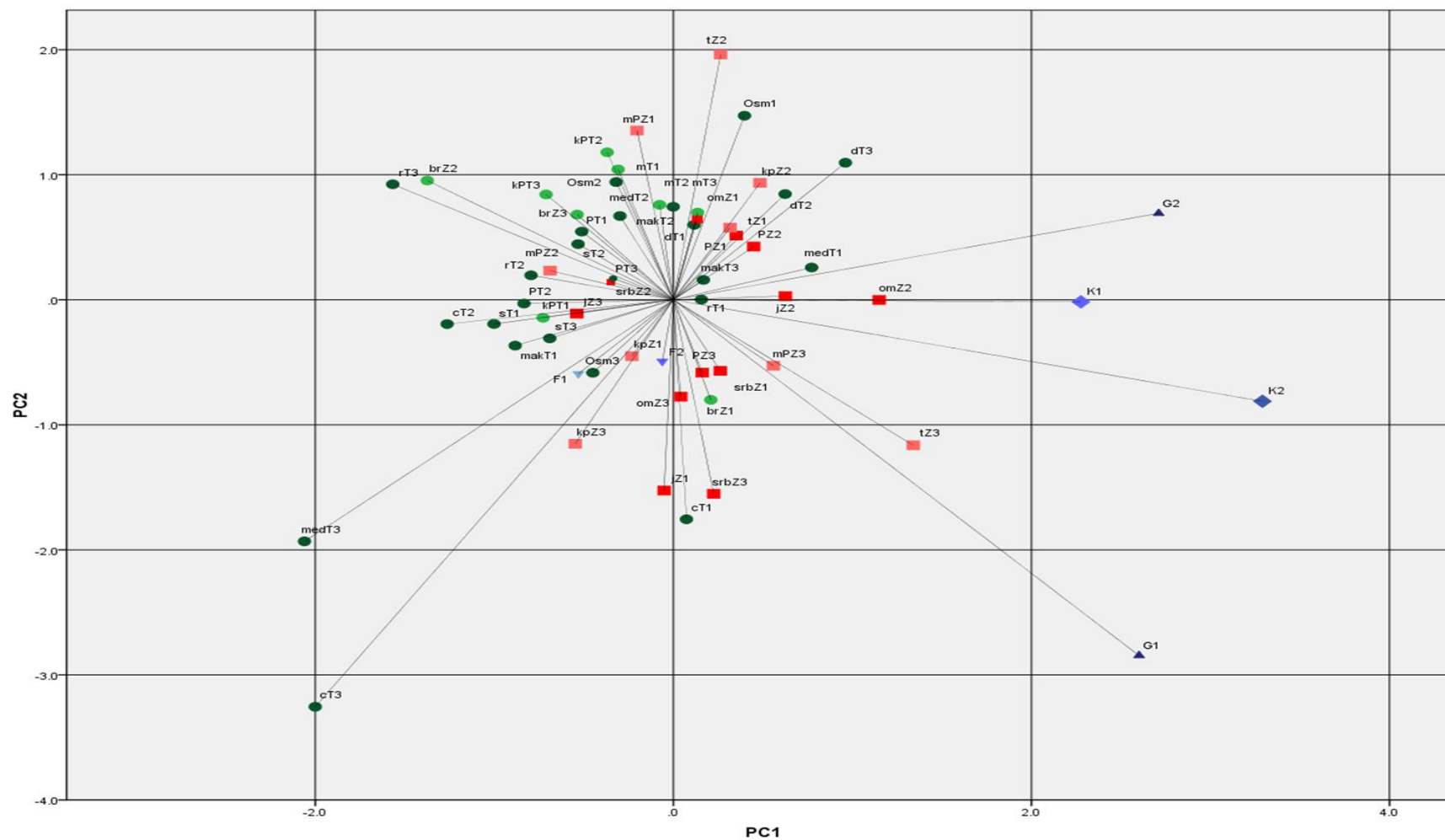


kod populacija na pozitivnoj strani PC1. Prosečna vrednost svih populacija za broj listova iznosila je 12,79, dok su populacije na pozitivnoj strani PC1 imale prosečnu vrednost date osobine od 14,06.

Populacije na negativnoj strani PC1 ose karakterisala je niža vrednost broja primarnih grana metlice i visine do klipa. Prosečna vrednost broja primarnih grana metlice iznosila je 15,58, a prosek ove osobine kod populacija na negativnoj strani PC1 ose je bio 13,88. Visina biljke do klipa imala je prosečnu vrednost od 78,74cm, dok su populacije na negativnoj strani PC1 ose imale prosečnu vrednost ove osobine 67,12cm.

Tabela 10. Eigen vektori, eigen vrednosti i akumulirane varijacije prvih pet glavnih komponenti (PC) korelacione matrice zasnovane na srednjim vrednostima populacija

Osobine	Skraćenice	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Visina biljke	VB	,872	,310	,236	,008	,051
Visina do klipa	VDK	,951	,035	,142	,002	,093
Broj listova	BL	,920	,003	,126	-,050	,189
Dužina lista do klipa	DLK	,847	,293	,213	,071	,060
Dužina metlice	DM	,091	,851	,221	,118	,012
Dužina ose metlice	DOM	-,325	,835	,053	,050	,108
Broj primarnih grana metlice	BPGM	,793	-,026	,287	,229	,077
Dužina granatog dela metlice	DGM	,432	,617	,002	,160	-,174
Dužina klipa	DK	,382	,691	,046	,163	-,003
Broj redova zrna	BRZ	,128	-,037	,534	-,817	-,030
Broj zrna u redu	BZR	,349	,662	,042	,025	,526
Prečnik klipa	PK	,285	,094	,913	-,038	-,070
Dužina zrna	DZ	,291	,119	,746	,151	,445
Širina zrna	ŠZ	,059	,141	,014	,963	-,095
Debljina zrna	DEZ	-,029	-,098	,029	,123	-,912
ASI	ASI	,188	-,072	,310	-,156	,529
Prinos	PR	,366	,445	,649	,007	,180
Masa 1000 zrna	MZ	-,097	,210	,306	,864	-,215
Total		6,604	2,644	1,592	1,322	1,137
Kumulativni %		37,320	55,750	67,747	76,008	82,594



Slika 1. Raspored 60 populacija kukuruza duž PC1 i PC2 na osnovu PCA fenotipskih osobina Francuska ▽, Kina ◆, Gruzija ▲, polutvrđunci ●, tvrđunci ●, poluzubani ■, zuba ■

#### 4.1.5. Klaster analiza na osnovu morfoloških osobina

Klaster analiza je urađena na osnovu srednjih vrednosti morfoloških svojstava, pri čemu je kao mera distance korišćen kvadrat euklidskog rastojanja. Na osnovu UPGMA klaster metode dobijen je dendrogram prikazan na slici 2. Populacije su se grupisale u tri glavna klastera (I, II i III). Klaster II je bio podeljen na tri subklastera: IIa, IIb i IIc.

Na dendrogramu se vidi jasno izdvajanje introdukovanih populacija iz Kine (K1 i K2) i Gruzije (G1 i G2), koje su formirale poseban klaster III. Populacije ovog klastera imale su najveće vrednosti visine do klipa, broja listova i dužine lista do klipa. Prosečna visina do klipa kod ovih populacija je iznosila 135,48cm u odnosu na prosečnu vrednostove osobine svih populacija od 78,74cm. Srednja vrednosti broja listova svih analiziranih populacija iznosila je 12,79, dok je prosečna vrednost ove osobine populacija Gruzije i Kine bila 17,16cm. Dužina lista do klipa populacija klastera III imala je prosečnu vrednost od 91,89 cm, što je iznad prosečne vrednosti ove osobine kod svih populacija (76,18cm).

Klaster I obuhvatio je samo populacije koje pripadaju agroekološkim grupama svrstanim u tvrduce. Sve populacije iz agroekoloških grupa cT i sT grupisale su se u ovaj klaster. Takođe, klaster I obuhvatio je dve populacije iz agroekološke grupe PT (PT1 i PT2), kao i makT1 i medT3. Populacije ovog klastera karakterisala je niža prosečna vrednost dužine lista do klipa (63,91cm) u odnosu na prosečnu vrednost ove osobine svih populacija (76,18cm).

Najveći broj populacija grupisao se u okviru klastera II. Ukupno 46 populacija formiralo je ovaj klaster.

Subklaster IIa čine sve populacije tZ, brZ i jZ, dve populacije PZ (PZ1 i PZ2), kao i makT3, PT3, Osm1, medT1, dT3, mT3 i kpZ2. U ovom subklasteru su dominirali poluzubani i zubani (13 od 18 populacija). Prosečna vrednost mase 1000 zrna populacija subklastera IIb bila je manja (220,97g) u odnosu na populacije subklastera IIb (253,72g). Prosečna vrednost visine biljke populacija klastera I bila je niža (168,2cm) u odnosu na prosečnu vrednost ove osobine svih populacija (208,28). Kod

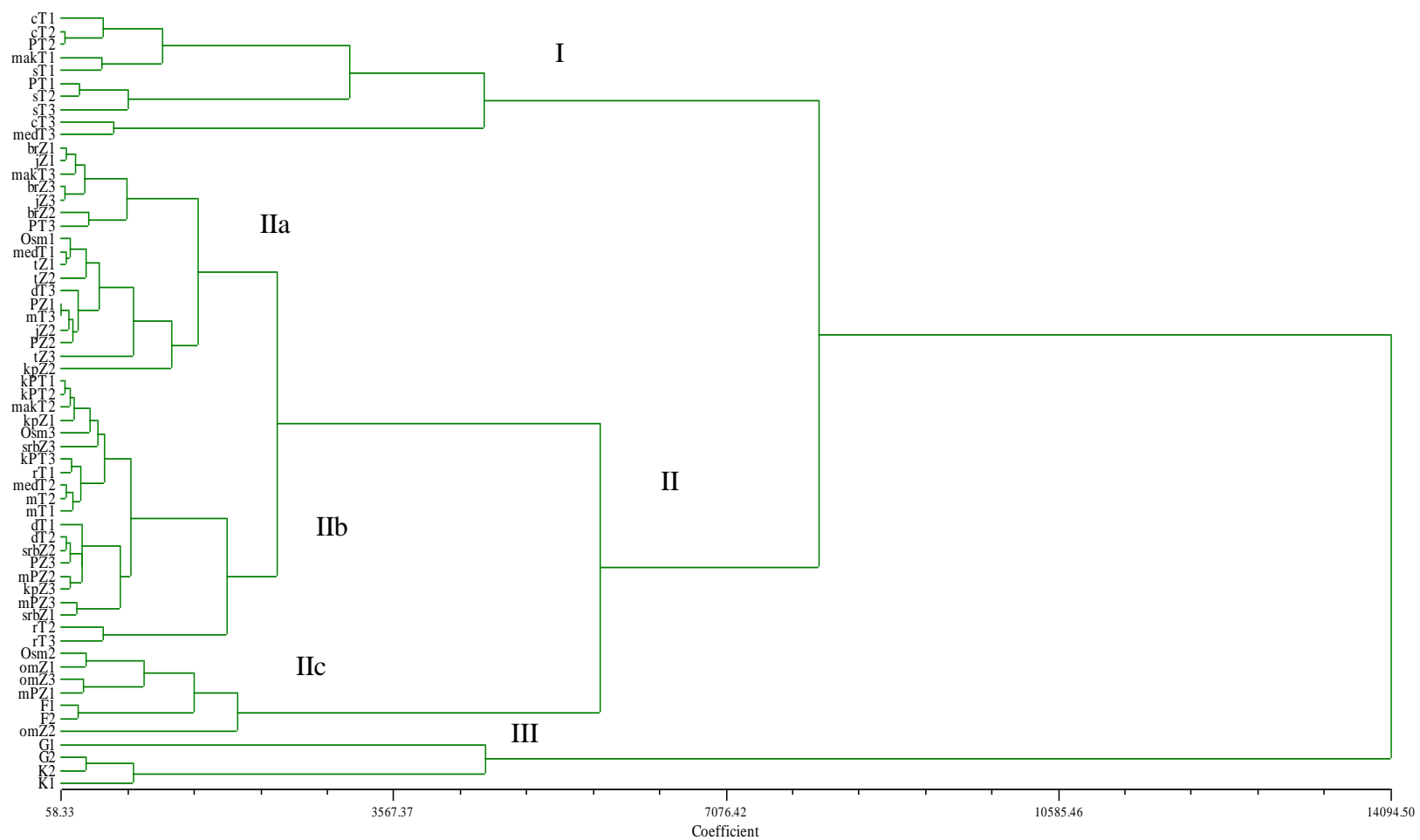
ovih populacija prosečna vrednost visine biljke do klipa je bila takođe niža (54,2cm) u odnosu na prosek svih populacija (78,74cm).

Subklaster IIb sadržao je sve kpT, rT i srbZ, po dve populacije iz mT (mT1 i mT2), dT (dT1 i dT2), mPZ (mPZ2 i mPZ3) i kpZ (kpZ1 i kpZ3), kao i makT2, Osm3, medT2 i PZ3. Ovaj klaster je obuhvatio 11 zubana i poluzubana i deset tvrdunaca i polutvrdunaca.

U subklasteru IIc našle su se introdukovane populacije Francuske (F1 i F2) zajedno sa svim populacijama agroekološke grupe omZ i populacijama Osm2 i mPZ1. Lokalne populacije subklastera IIc pripadaju zubanima i poluzubanima. U ovoj grupi su se našle populacije sa najvećom prosečnom masom 1000 zrna (304,75g), u odnosu na prosečnu vrednost ove osobine (235,92g) za sve analizirane populacije.

Najhomogenije agroekološke grupe su bile: Crnogorski tvrdunci – cT (klaster I), Sitnozrni tvrdunci - sT (klaster I), Tvrdi zubani – tZ (subklaster IIa), Južni zubani – jZ (subklaster IIa), Bosanski rani zubani – brZ (subklaster IIa), Kosovski polutvrdunci – kPT (subklaster IIb), Rumunski tvrdunci – rT (subklaster IIb) i Srbijanski zubani - srbZ (subklaster IIb).

Najheterogenije agroekološke grupe su bile: Makedonski tvrdunci – makT (klaster I, subklaster IIa i subklaster IIb), Mediteranski tvrdunci –medT (klaster I, subklaster IIa i subklaster IIb) i Osmak tipa severoistočne Amerike – Osm (subklaster IIc, subklaster IIa i subklaster IIb).



Slika 2. Dendrogram 60 populacija kukuruza dobijem UPGMA klaster metodom iz kvadrata euklidskog rastojanja na osnovu fenotipskih osobina

## 4.2. Analiza molekularnih podataka

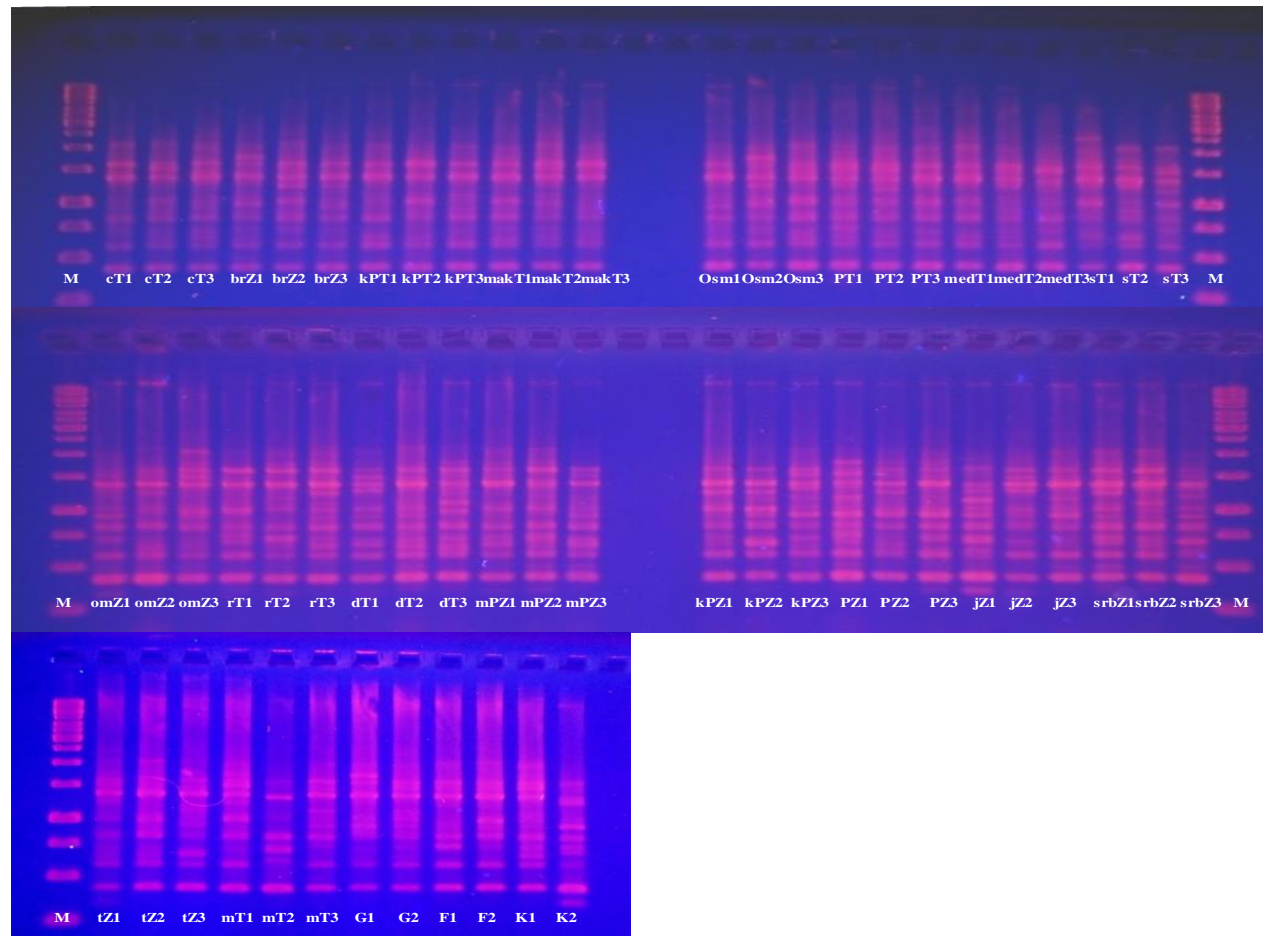
### 4.2.1. Rezultati RAPD analize

Od 30 prajmera testiranih na 21 populaciji, 11 je dalo slabu amplifikaciju (GEN 4-70-3, GEN 2-80-10, GEN 1-80-5, GEN 2-80-5, GEN 2-80-2, GEN 1-70-9/2, GEN 2-80-9, GEN 1-80-9, GEN 1-70-10, GEN 4-70-2 i GEN 4-70-4), dok devet prajmera (OPB08, OPB09, OPB11, OPB13, OPB15, OPB16, OPB17, OPB19 i OPB20) nije amplifikovalo DNK. Ovi prajmeri su odbačeni za dalji rad. Genetička varijabilnost 60 analiziranih populacija je ispitana sa preostalih 10 prajmera (GEN 2-80-7, GEN 1-80-4, GEN 1-70-5, GEN 1-70-3, GEN 1-70-9/1, GEN 2-80-1, OPB 01, OPB 04, OPB 05 i OPB 12).

Po 20 pojedinačnih biljaka iz pet slučajno odabranih populacija testirano je sa pet RAPD prajmera (GEN 2-80-7, GEN 1-80-4, GEN 1-70-5, GEN 1-70-3, GEN 1-70-9/1), radi poređenja rezultata grupnog sa pojedinačnim uzorcima. Korelacija prisustva alela između grupnog uzorka i pojedinačnih uzoraka iste populacije bila je  $r=0,80$ , tako je dalja analiza sa RAPD markerima nastavljena na grupnim uzorcima populacija.

Ukupan broj detektovanih traka je iznosio 92, od čega je 87 traka bilo polimorfno (94,6%), a pet monomorfno (5,4%). Broj traka se kretao od tri (OPB 12) do 17 (OPB 04), a prosečan broj traka po prajmeru je iznosio 9,2. %. Profil traka dobijen pomoću markera GEN 1-70-3 je prikazan na slici 3.

Na osnovu prisustva/odsustva RAPD traka između 60 lokalnih populacija izračunati su koeficijent sličnosti po Jaccard-u (1908). Vrednosti genetičkih sličnosti prikazane su u prilogu 1. Najniža vrednost izračunate genetičke sličnosti iznosila je 0,32, a dobijena je između introdukovane populacije iz Kine (K2) i lokalne populacije koja pripada Makedonskim tvrđuncima (makT1). S druge strane, najveća vrednost genetičke sličnosti (0,87), izračunata je između populacija koje pripadaju Crnogorskim tvrđuncima (cT1 i cT3). Srednja vrednost genetičke sličnosti je bila 0,52.



Slika 3. Elektroforegram RAPD fragmenata za prajmera GEN 1-70-3 analiziranih populacija  
 Redosled uzoraka s leva na desno: M – 1kb DNK marker, populacije od cT1 do K2



Na osnovu matrice genetičkih sličnosti i pomoću UPGMA metode urađena je klaster analiza i rezultati su predstavljeni u formi dendrograma (Slika 4). Svih 54 lokalnih populacija i šest introdukovanih grupisalo se u tri glavna klastera (I, II i III) i dve grane (e i d). Klaster I se sastoji od tri subklastera Ia, Ib i Ic.

Klaster I obuhvatio je najveći broj analiziranih populacija (45). Subklaster Ia formirale su dve cT populacije (cT1 i cT3) zajedno sa populacijom kpZ1. U subklasteru Ib našle su se sve lokalne populacije PZ, jZ i mT, kao i sve introdukovane populacije iz Gruzije i Francuske. U ovom subklasteru grupisale su se dve populacije iz tZ (tZ2 i tZ3), kao i populacije kpZ2, Osm1, medT3, cT2 i jedna introdukovana populacija iz Kine (K1). Subklaster Ic čine sve lokalne populacije brZ, sT i PT, po dve Osm (Osm2 i Osm3), medT (medT1 i medT2), kpT (kpT1 i kpT2), rT (rT1 i rT2) i populacije srbZ3, makT1, omZ3 i kpZ3.

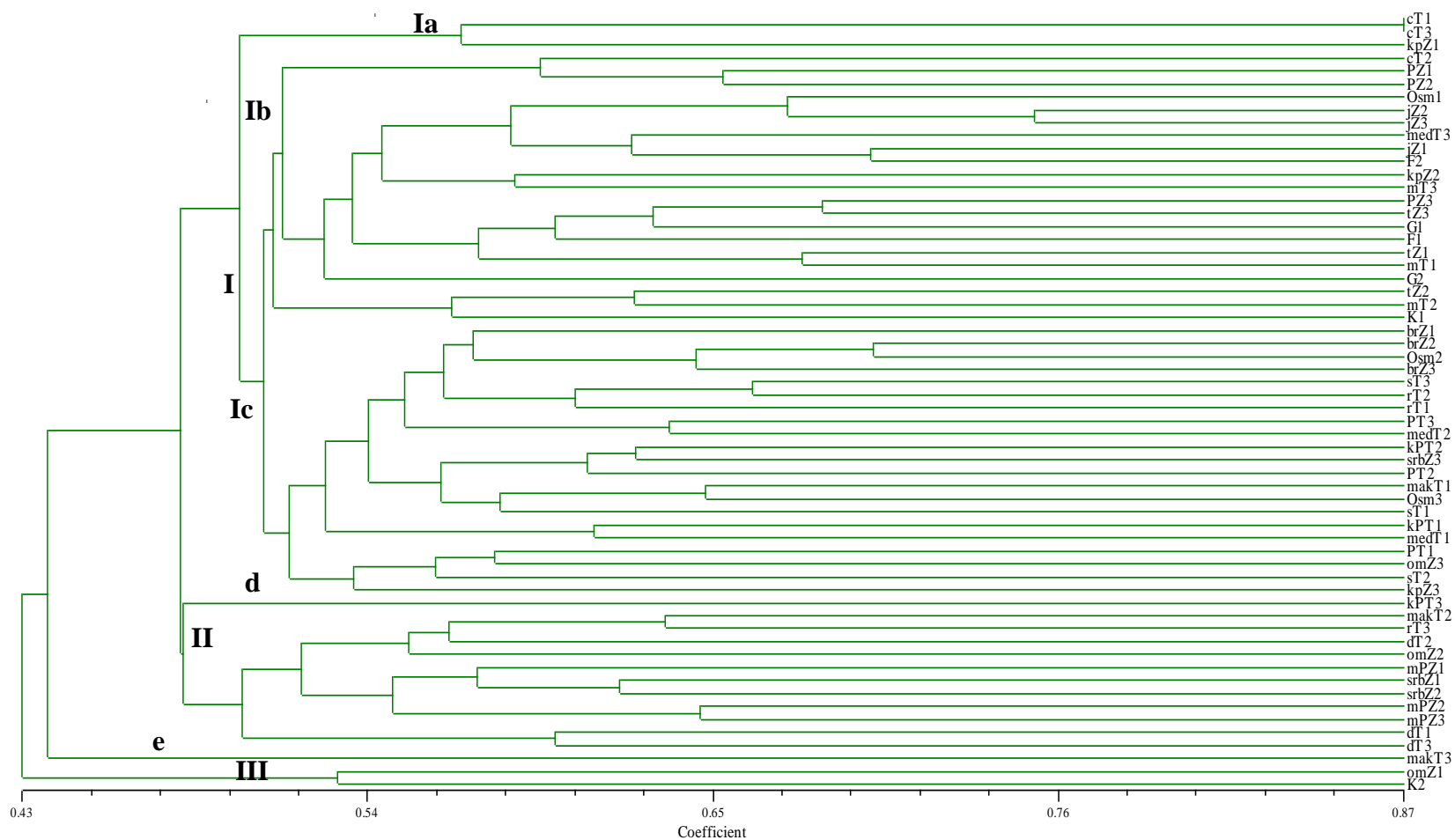
U drugi po brojnosti (11 populacija), klaster II, grupisale su se sve populacije mPZ i dT, kao i dve populacije srbZ (srbZ1 i srbZ2). Ovom klasteru pripadaju i populacije: makT2, rT3 i omZ2. Populacija kPT3 formirala je posebnu granu d koja se labavo vezala za klaster II.

Klaster III formirale su se samo dve populacije omZ1 i K2, dok je granu e predstavljala populacija makT3 koja nije pripala nijednom klasteru.

Iz dendrograma se vidi da UPGMA klaster metoda nije dovela do jasnog razdvajanja grupa tvrdunaca od grupa zubana, već su populacije iz različitih agroekoloških grupa formirale različite klasterne.

Najhomogenije agroekološke grupe, odnosno agroekološke grupe čije su se sve populacije našle u istom klasteru/subklasteru, bile su Prelazni zubani – PZ (subklaster Ib), Južni zubani – jZ (subklaster Ib), Tvrdi zubani – tZ (subklaster Ib), Meki tvrdunci – mT (subklaster Ib), Bosanski rani zubani – brZ (subklaster Ic), Sitnozrni tvrdunci – sT (subklaster Ic), Beli poluzuban Moravac – mPZ (klaster II) i Dugoklipi tvrdunci – dT (klaster II).

Najheterogenije agroekološke grupe bile su Osmoredi meki zubani – omZ (subklaster Ic, klaster II i III), Makedonski tvrdunci – makT (subklaster Ic, klaster II i grana e) i Zubani tipa kukuruznog pojasa SAD –kpZ (subklasteri Ia, Ib i Ic).



Slika 4. Dendrogram 60 populacija kukuruza analiziranih pomoću RAPD markera, dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih sličnosti izračunatih po *Jaccard*-u

#### 4.2.2. Rezultati SSR analize

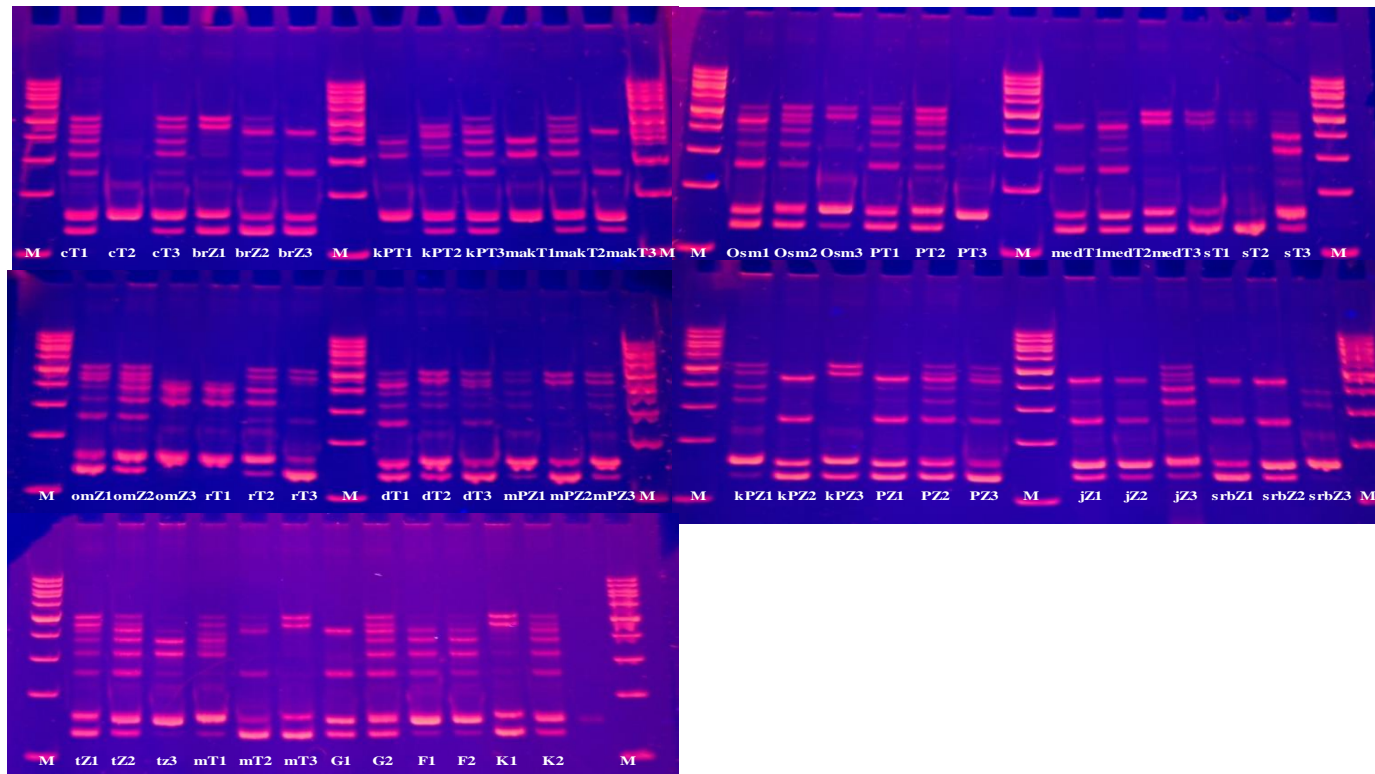
Od testiranih 30 SSR prajmera sa 21 populacijom deset prajmera (umc1282, umc2047, umc1418, umc1109, umc1274, umc087, umc1393, umc1324, umc1492 i umc1827) je dalo jasnu sliku i oni su korišćeni za anilizu genetičke divergentnosti svih 60 populacija. Prajmeri: phi033, phi126, phi196, phi557, umc1040, umc1443, bnlg1526, bnlg1695, umc1782, umc2129, umc2235, umc1070, bnlg1643, bnlg198, umc1859, umc1015 i umc1006 su dali slabu amplifikaciju DNK fragmenata, dok su prajmeri: phi080, umc1506 i umc1944 bili teški za tumačenje rezultata, zbog prisustva “stutter” traka koje otežavaju očitavanje.

Po 20 pojedinačnih biljaka iz pet slučajno odabranih populacija testirano je i sa pet SSR prajmera (umc1282, umc1109, umc1393, umc1492 i umc1827), radi poređenja rezultata grupnog sa pojedinačnim uzorcima. Korelacija frekvencije alela između grupnog uzorka i pojedinačnih uzoraka iste populacije bila je visoka  $r=0,90$ . Aleli koji nisu detektovani u grupnom uzorku bili su male frekvencije i SSR analiza je urađena do kraja na grupnim uzorcima populacija.

Svi SSR prajmeri bili su polimorfni. Broj dobijenih alela sa deset SSR prajmera je iznosio 68, od čega je četiri bilo monomorfno (5,88%), a 64 polimorfno (94,12%). Broj alela dobijen sa pojedinačnim markerima se kretao od tri (umc1418) do 11 (umc1274), prosečan broj alela je iznosio 6,8. Elektroforegram za SSR prajmer umc1492 su prikazani na slici 5.

Za svih 60 populacija na osnovu frekvencije alela izračunate su genetičke distance po Nei i Li (1979). Vrednosti genetičkih distanci su pretvorene u genetičke sličnosti i prikazane su u prilogu 2.

Koeficijenti genetičkih sličnosti su se kretali od 0,13 do 0,99, sa srednjom vrednošću 0,55. Najmanja vrednost genetičke sličnosti (0,13) je dobijena između populacije koja pripada Sitnozrnim tvrducima (sT2) i populacije koja pripada Južnim zubanima (jZ1). Najveća genetička sličnost (0,99) izračunata je između dve introdukovane populacije iz Francuske (F1 i F2).



Slika 5. Elektroforegram SSR alela za prajmer umc 1492 analiziranih populacija  
 Redosled uzoraka s leva na desno: M – 100bp DNK marker, populacije od cT1 do K2

Genetičke veze između populacija kukuruza su predstavljene u formi dendrograma na osnovu rezultata SSR analize (Slika 6). Primenom UPGMA urađena je klaster analiza na osnovu matrica genetičkih distanci po *Nei* i *Li*-u. Klaster analizom dobijen je dendrogram koji se sastoji od četiri glavna klastera (I, II, III i IV). Klaster II je bio dalje podeljen na subklastera IIA i IIB.

U klaster I grupisale su se sve populacije cT, sT i makT i introdukovane populacije Francuske. Takođe, u ovom klasteru našle su se i po dve populacije brZ (brZ2 i brZ3), PT (PT2 i PT3) i medT (medT2 i medT3), kao i populacije Osm3, dT1 i jedna introdukovana populacija iz Gruzije (G1).

Subklaster IIA formiran je od svih populacija mPZ i PZ, po dve populacije iz srbZ (srbZ1 i srbZ2), kPT (kPT2 i kPT3) i mT (mT1 i mT3). U ovom klasteru našle su se i populacije dT3, tZ2, jZ3, kpZ3 i introdukovana G2.

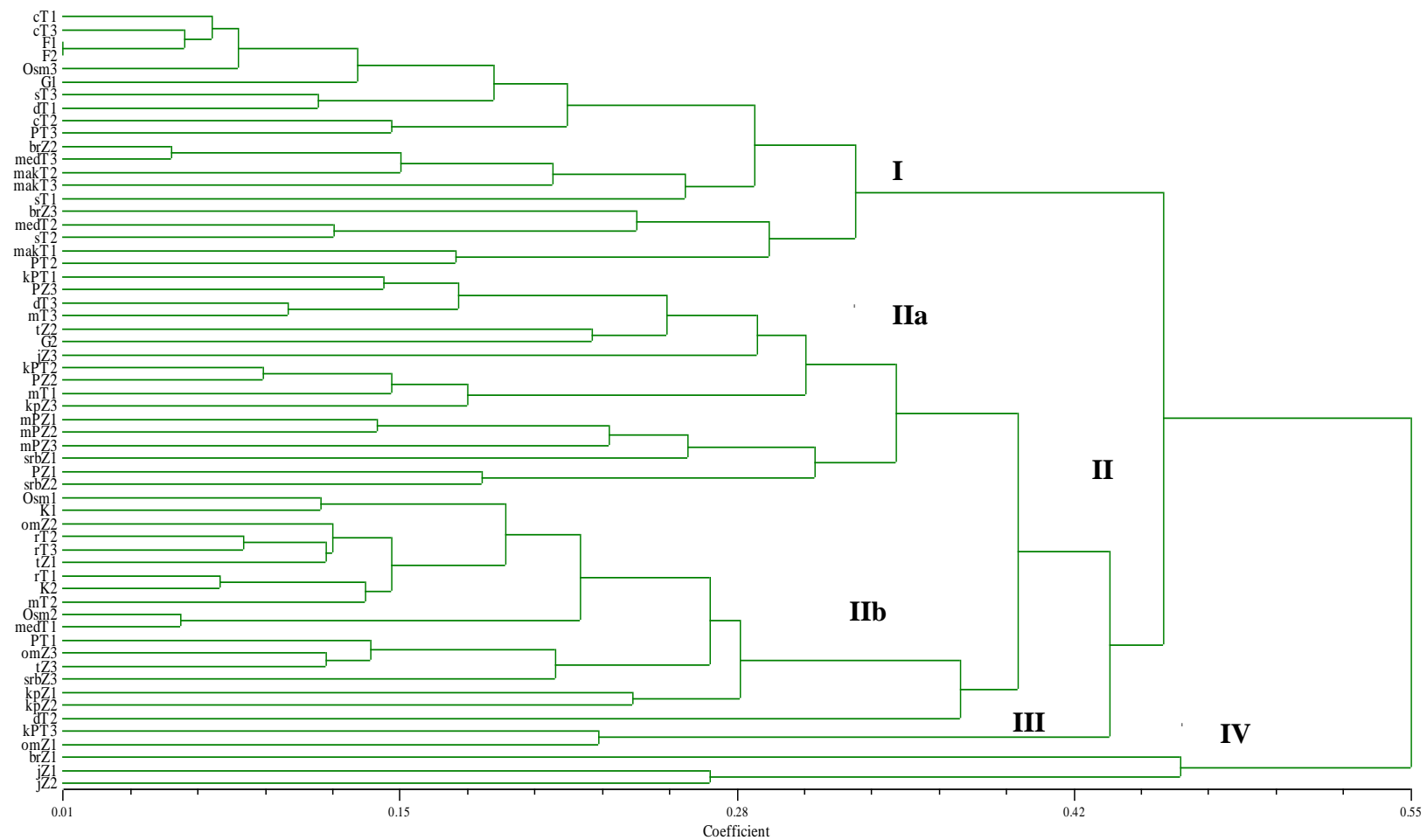
Sve populacije rT grupisale su se unutar subklastera IIB zajedno sa po dve populacije Osm (Osm1 i Osm2), omZ (omZ2 i omZ3), tZ (tZ2 i tZ3) i kpZ (kpZ1 i kpZ2). Populacije medT1, PT1, mT2, srbZ3 i dT2 takođe su pripale ovom klasteru.

Klasteri III i IV obuhvatili su sa znatno manji broj populacija, dve tj. tri populacije. U klasteru III našle su se samo populacije kPT3 i omZ1, dok je klaster IV obuhvatio dve populacije jZ (jZ1 i jZ2) i brZ1.

Najhomogenije agroekološke grupe su bile: Crnogorski tvrduci – cT (klaster I), Sitnozrni tvrduci – sT (klaster I), Makedonski tvrduci – makT (klaster I), Beli poluzuban Moravac – mPZ (subklaster IIA), Prelazni zubani – PZ, Rumunski tvrduci – rT (subklaster IIB) i Osmoredi meki zubani – omZ (subklaster IIB).

Najheterogenija agroekološka grupa je Dugoklipi tvrduci – dT (klaster I, subklasteri IIA i IIB).

Klaster analizana na osnovu SSR markera dovela je do razdvajanja tvrdunaca i zubana u okviru nekih klastera, onosno subklastera. U klasteru I od ukupno 20 populacija 15 je pripadalo tvrduncima i polutvrduncima. U okviru subklastera IIA došlo je do većeg grupisanja zubana i poluzubana (14 od 17 populacija).



Slika 6. Dendrogram 60 populacija kukuruza analiziranih pomoću SSR markera, dobijen UPGMA klaster metodom na osnovu genetičkih distanci izračunatih po *Nei* i *Li-u*

### **4.2.3. Poređenje genetičkih sličnosti unutar agroekoloških grupa i intodukovanih populacija**

Izračunate srednje vrednosti genetičkih sličnosti lokalnih populacija unutar agroekoloških grupa prikazane su u Tabeli 11. Veća varijabilnost između agroekoloških grupa je dobijena SSR markerima. Opseg sličnosti se kretao od 0,39 za Sitnozrne tvrduce (sT) do 0,89 za Rumunske tvrduce (rT). Pored populacija sT, nejheterogenije su bile populacije iz agroekološke grupe Bosanski rani zubani (brZ), sa genetičkom sličnošću 0,47. Visok stepen genetičke sličnosti su, pored Rumunskih tvrduca, pokazale i populacije iz grupe Crnogorski tvrduci (0,84), odnosno Beli poluzuban Moravac (0,80).

Srednja vrednost genetičke sličnosti za sve agroekološke grupe dobijena pomoću RAPD markera iznosila je 0,55, sa opsegom od 0,42 za Makedonske tvrduce (makT) do 0,67 za Južne zubane (jZ). Najniže vrednosti genetičke sličnosti su pokazale i populacije iz grupe Dugoklipi tvrduci (0,48), odnosno Osmoredi meki zubani (0,49). Slične vrednosti kao za Južne zubane su dobijene i kod Prelaznih zubana (0,65) i Crnogorskih tvrduca (0,64).

Srednja vrednost genetičke sličnosti između intodukovanih populacija dobijena SSR markerima iznosila je 0,7. Opseg genetičkih sličnosti se kretao od 0,53 za populacije Gruzije do 0,99 za populacije Francuske.

Niža vrednost genetičke sličnosti između intodukovanih populacija dobijena je sa RAPD markerima i iznosila je 0,55. Najniža vrednost genetičke sličnosti dobijena je između populacija Kine (0,49), a najviša između populacija Francuske (0,65). Za populacije Gruzije dobijene su slične vrednosti genetičke sličnosti (0,51) kao i za populacije Kine.

Tabela 11. Srednja vrednost genetičkih sličnosti lokalnih populacija iz iste agroekološke grupena osnovu RAPD i SSR markera

Agroekološka grupa	Skraćenica grupe	RAPD	SSR
Crnogorski tvrdunci	cT	0,64	0,84
Bosanski rani zubani	brZ	0,57	0,47
Kosovski polutvrđunci	kPT	0,53	0,61
Makedonski tvrdunci	makT	0,42	0,64
Osmaci tipa severoistočne Amerike	Osm	0,6	0,74
Prelazni tvrdunci	PT	0,53	0,62
Mediterranski tvrdunci	medT	0,51	0,65
Sitnozrni tvrdunci	sT	0,51	0,39
Osmoredi meki zubani	omZ	0,49	0,73
Rumunski tvrdunci	rT	0,53	0,89
Dugoklipi tvrdunci	dT	0,48	0,59
Beli poluzuban Moravac	mPZ	0,59	0,8
Zubani kukuruznog pojasa SAD-a	kpZ	0,54	0,58
Prelazni zubani	PZ	0,65	0,7
Južni zubani	jZ	0,67	0,63
Srbijanski zubani	srbZ	0,56	0,75
Tvrđi zubani	tZ	0,6	0,73
Meki tvrdunci	mT	0,56	0,68



Redosled agroekoloških grupa određen na osnovu srednjih vrednosti genetičkih sličnosti njihovih populacija dobijenih RAPD i SSR markerima je prikazan u Tabeli 12. Uočava se da se pozicija većine grupa razlikuje u zavisnosti od korišćenih markera. Najveća razlika u poređenju srednjih vrednosti genetičkih sličnosti dva marker sistema zabeležena je kod Rumunskih tvrdunaca (rT). Njihova genetička sličnost dobijena na osnovu SSR markera je bila najveća, dok su sa RAPD markerima zauzeli trinaesto mesto. Južni zubani (jZ) i Bosanski rani zubani (brZ) razlikovali su se za 11 mesta. Najmanje razlike su uočene kod Crnogorskih tvrdunaca (cT), Osmaka tipa severnoistočne Amerike (Osm) i Prelaznih tvrdunaca (PT), čije su se pozicije razlikovale za jedno mesto. Tvrđi zubani (tZ) i Dugoklipi tvrdunci (dT) razlikovali su za dva mesta, dok su jedino Meki tvrdunci zauzeli isti rang za oba marker sistema (deveto mesto).

Pomoću Pearson-ovog koeficijenta korelacije urađeno je poređenje genetičkih sličnosti za RAPD i SSR markere. Značajna pozitivna korelacija je nađena između ova dva seta molekularnih markera ( $r=0,419$ ;  $P<0,001$ ).

Tabela 12. Redosled agroekoloških grupa utvrđen na osnovu srednjih vrednosti genetičkih sličnosti njihovih populacija koje su dobijene RAPD i SSR

Agroekološka grupa	Skraćenica grupe	RAPD	SSR
Crnogorski tvrdunci	cT	3	2
Bosanski rani zubani	brZ	7	17
Kosovski polutvrdunci	kPT	11	14
Makedosnski tvrdunci	makT	18	11
Osmaci tipa severoistočne Amerike	Osm	4	5
Prelazni tvrdunci	PT	12	13
Mediterranski tvrdunci	medT	14	10
Sitnozrni tvrdunci	sT	15	18
Osmoredi meki zubani	omZ	16	6
Rumunski tvrdunci	rT	13	1
Dugoklipi tvrdunci	dT	17	15
Beli poluzuban Moravac	mPZ	6	3
Zubani kukurznog pojasa SAD-a	kpZ	10	16
Prelazni zubani	PZ	2	8
Južni zubani	jZ	1	12
Srbijanski zubani	srbZ	8	4
Tvrđi zubani	tZ	5	7
Meki tvrdunci	mT	9	9

#### 4.2.4. Grupisanje populacija na osnovu morfoloških, RAPD i SSR analiza

Poređenjem dendrograma dobijenih na osnovu morfoloških osobina, RAPD i SSR markera uočava se slično grupisanje nekih lokalnih populacija, odnosno agroekoloških grupa, kao i introdukovanih populacija (Tabela 13).

Populacije iz šest agroekoloških grupa se grupisalo u iste klaster/subklaster sa sva tri sistema. Crnogorski tvrdunci i Sitnozrni tvrdunci su se grupisali unutar istog klastera u okviru dendrograma dobijenog i na osnovu morfoloških podataka i SSR markera, odnosno unutar istog subklastera u dendrogramu dobijenom na osnovu RAPD markera. Nešto manja sličnost u grupisanju zapažena je kod Prelaznih zubana, Tvrdih zubana, Mekih tvrdunaca i Zubani kukuruznog pojasa SAD-a. Prelazni zubani su se grupisali unutar istog subklastera na osnovu RAPD i SSR analize, odnosno u dva subklastera istog klastera na osnovu morfoloških podataka. Tvrdi zubani su se grupisali unutar istog subklastera i na osnovu morfoloških podataka i RAPD analize, dok su na osnovu SSR analize populacije su bile raspoređene unutar dva subklastera. Kod Mekih tvrdunaca RAPD analiza je pokazala grupisanje svih populacija unutar jednog subklastera, a na osnovu morfoloških podataka i SSR analize unutar dva subklastera. Zubani kukuruznog pojasa SAD-a su bili raspoređeni unutar dva subklastera na osnovu sva tri marker sistema. Populacije Francuske su se na i osnovu morfoloških podataka i RAPD analize grupisale unutar istih subklastera, a na osnovu SSR analize u okviru istog klastera.

Nasuprot sličnom grupisanju unutar dendrograma, neke agroekološke gupe i introdukovane populacije su pokazale različito grupisanje poredeći morfološke podatke, RAPD i SSR analize. Makedonski tvrdunci su se na osnovu morfoloških markera grupisali unutar istog klastera, dok su sa SSR markerima našli unutar različitih klastera (klaster I i subklasteri IIa i IIb), kao i sa RAPD markerima (subklaster Ib, klaster II i grana e). Mediteranski tvrdunci su se, takođe, grupisali unutar različitih klastera na osnovu morfoloških podataka (klaster I, subklasteri IIa i IIb) i na osnovu SSR markera (klaster I i subklaster IIb), dok su se na osnovu RAPD markera našli unutar dva subklastera (Ia i Ib).

Tabela 13. Grupisanje populacija na osnovu morfoloških osobina, RAPD i SSR markera

Agroekološka grupa	Skraćenica grupe	Skraćenica populacije	Morfološke osobine	RAPD	SSR
Crnogorski tvrdunci	cT	cT1	I	Ia	I
		cT2	I	Ia	I
		cT3	I	Ia	I
Bosanski rani zubani	brZ	brZ1	Ia	Ib	IV
		brZ2	Ia	Ib	I
		brZ3	Ia	Ib	I
Kosovski polutvrđunci	kPT	kPT1	IIb	Ic	IIa
		kPT2	IIb	Ic	IIa
		kPT3	IIb	d	III
Makedonski tvrdunci	makT	makT1	I	Ib	I
		makT2	IIb	II	I
		makT3	IIa	e	I
Osmaci tipa severoistočne Amerike	Osm	Osm1	IIa	Ia	IIb
		Osm2	IIc	Ib	IIb
		Osm3	IIb	Ib	I
Prelazni tvrdunci	PT	PT1	I	Ib	IIb
		PT2	I	Ib	I
		PT3	IIb	Ib	I
Mediterranski tvrdunci	medT	medT1	IIa	Ib	IIb
		medT2	IIb	Ib	I
		medT3	I	Ia	I
Sitnozrni tvrdunci	sT	sT1	I	Ib	I
		sT2	I	Ib	I
		sT3	I	Ib	I
Osmoredi meki zubani	omZ	omZ1	IIc	III	III
		omZ2	IIc	II	IIb
		omZ3	IIc	Ib	IIb
Rumunski tvrdunci	rT	rT1	IIb	Ib	I
		rT2	IIb	Ib	IIb
		rT3	IIb	II	IIa
Dugoklipi tvrdunac	dT	dT1	IIb	II	I
		dT2	IIb	II	IIb
		dT3	IIa	II	IIa
Beli poluzuban Moravac	mPZ	mPZ1	IIc	II	IIa
		mPZ2	IIb	II	IIa
		mPZ3	IIb	II	IIa
Zubani kukuruznog pojasa SAD-a	kPZ	kpZ1	IIb	Ia	IIb
		kpZ2	IIa	Ib	IIb
		kpZ3	IIb	Ic	IIa

Tabela 13. *Nastavak*

Agroekološka grupa	Skraćenica grupe	Skraćenica populacije	Morfološke osobine	RAPD	SSR
Prelazni zubani	PZ	PZ1	IIa	Ia	IIa
		PZ2	IIa	Ia	IIa
		PZ3	IIa	Ia	IIa
Južni zubani	jZ	jZ1	IIa	Ia	IV
		jZ2	IIa	Ia	IV
		jZ3	IIa	Ia	IIa
Srbijanski zubani	srbZ	srbZ1	IIb	II	IIa
		srbZ2	IIb	II	IIa
		srbZ3	IIb	Ib	IIb
Tvrđi zubani	tZ	tZ1	IIa	Ia	IIb
		tZ2	IIa	Ia	IIa
		tZ3	IIa	Ia	IIb
Meki tvrdunci	mT	mT1	IIa	Ia	IIa
		mT2	IIb	Ia	IIb
		mT3	IIb	Ia	IIa

*Introdukovane grupe*

G	G1	III	Ia	I
	G2	III	Ia	IIa
F	F1	IIc	Ia	I
	F2	IIc	Ia	I
K	K1	III	Ia	IIb
	K2	III	III	IIb

## 5. DISKUSIJA

Agronomski biodiverzitet je širok pojam koji uključuje sve komponente biološkog diverziteta od značaja za hranu i poljoprivredu. On je rezultat interakcije između genetičkih resursa, životne sredine i upravljanja sistemima i prakse koji čine poljoprivrednu proizvodnju. Biljni genetički resursi, koji su osnov za poboljšanje kvaliteta i produktivnost useva, smatraju se izuzetno značajnim u obezbeđivanju dovoljne količine hrane neophodne za ljudsku ishranu. Diverzitet gajenih kultura predstavlja izvor poželjnih svojstava neophodnih za suočavanje sa postojećim i budućim globalnim zahtevima u proizvodnji hrane, izazvanim klimatskim promenama i rastom ljudske populacije. Izučavanje bogatog genetičkog diverziteta sadržanog u gajenim kulturama i njihovim divljim srodnicima je ključni preduslov za poboljšanje elitnih genotipova (Hoisington i sar., 1999; Fernie i sar., 2006; Taster, 2010). Biljni genetički resursi divljih srodnika gajenih kultura i lokalne populacije sadrže bogat skup alela koji su izgubljeni stvaranjem elitnih sorti kroz proces selekcije, a ovi aleli su neprocenjivi u suočavanju sa održivim razvojem poljoprivrede i u proizvodnji hrane (Varshney i sar., 2011).

Kukuruz se danas proizvodi na bilzu 100 miliona hektara obradive površine u 125 zemalja u razvoju, i nalazi se među tri useva koji se najviše gaje u više od polovine ovih zemalja (FAOSTAT 2010). Glavni izazov, koji ugrožava dugoročni rast proizvodnje kukuruza je globalna promena klime (Cairns i sar., 2012). Kukuruz poseduje ogroman genetički diverzitet koji pruža mogućnosti za značajna unapređenja njegovog kvaliteta i prinosa u novonastalim uslovima. Poželjni aleli vezani za osobine kao što su povećanje prinosa, tolerantnost na abiotičke stresove, otpornost na bolesti i poboljšanje hranljive vrednosti, često su rasuti unutar širokog spektra lokalnih populacija. Mogućnost proširivanja genetičke osnove kukuruza i razvijanje varijeteta sa visokim prinosom i adaptiranih na različite klimatske uslove gde se kukuruz gaji, zavisi od otkrivanja i uvođenja novih/poželjnih alela.

Selekcija hibrida u Evropi je počela pedesetih godina 20.og veka. Kao posledica razvoja savremenih hibrida došlo je do značajnog gubitka genetičkog diverziteta kukuruza. Značaj kolekcija iz banaka gena se uglavnom ocenjuje na osnovu stepena njihovog korišćenja u programima oplemenjivanja. Tokom ranih faza oplemenjivanja,

deo genetičke raznovrsnosti evropskih lokalnih populacija kukuruza nalazio se u inbred linijama heterotične grupe tvrdunaca, ali je mali broj njih korišćen u stvaranju hibrida (Messmer i sar., 1992). Nasuprot tome, lokalne populacije kukuruza koja nisu služile za stvaranje inbred linija sadrže veliki broj neiskorišćenih alelnih formi. Oplemenjivači kukuruza postali su svesni da je potrebno očuvati genetičku raznovrsnost hibridnih sorti korišćenjem genetičkih resursa (Goodman, 1994), odnosno da je uvođenje novih alela iz lokalnih populacija kukuruza izuzetno bitno radi proširenja genetičke osnove elitnog materijala (Reif i sar., 2004).

Sveobuhvatnu definiciju lokalnih populacije je teško jasno formulisati, zbog njihove kompleksne prirode (Zeven, 1998). Autohtone lokalne populacije su populacije koje se u dužem vremenskom periodu gaje u istim agrotehničkim uslovima, a koje se kontinuirano adaptiraju usled promena spoljašnje sredine i namerne ili slučajne kontaminacije genotipovima drugih lokalnih populacija ili kultivara. S druge strane, alohtone lokalne populacije (populacije stranog porekla koje su introdukovane u određeni region), posle nekoliko generacija gajenja u lokalnim uslovima spoljašnje sredine i usled kontaminacije postojećim lokalnim populacijama se takođe mogu smatrati autohtonim populacijama. Lokalne populacije kukuruza koje se čuvaju u banci gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ su upravo nastale introdukcijama kukuruza iz različitih regiona sveta i adaptacijom usled dugog perioda gajenja u specifičnim uslovima spoljašnje sredine, kao i protoka gena kroz različit broj generacija između introdukovanih populacija.

Genetički povezane lokalne populacije formiraju grupe populacija. Ispitivanje diverziteta lokalnih populacija i grupa populacija predstavlja osnovni preduslov za njihovu efikasnu klasifikaciju, čuvanje i korišćenje, i ima za cilj procenu genetičke raznovrsnosti i strukture populacija. U ovom radu ispitana je varijabilnost 54 lokalne i 6 introdukovanih populacija kukuruza, koristeći morfološke osobine i molekularne markere. Populacije su prikupljene iz različitih regiona bivše Jugoslavije i delova sveta, a nalaze se u banci gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“.

Stabilnost genotipa u različitim uslovima spoljne sredine je od velikog značaja u oplemenjivanju, zbog čega ih je potrebno testirati u različitim godinama i lokacijama da bi se utvrdila interakcija genotipa sa sredinom. Određivanje odnosa prinosa i sredine, gde sredinu predstavlja godina (sezona uzgoja) je važno u odabiranju germlazme koja je

prilagođena različitim uslovima gajenja (Trethowan i sar., 2001). U ovom radu analizom varijanse 60 populacija iz banke gena Instituta za kukuruz, uočene su značajne razlike kod svih osobina za različite izvore variranja (godina, genotip, godina  $\times$  gustina i godina  $\times$  genotip) što govori o visokom stepenu fenotipskog diverziteta između ovih populacija. Sve osobine su pokazale i značajno variranje između različitih genotipova, što je uočeno i u radu Harada i sar. (2009). Slični rezultati su dobijeni i u radu Beyene i sar. (2005) na 62 lokalne populacije kukuruza testirane za 15 morfoloških osobina, u kome je analiza varijanse pokazala visoko značajne razlike između populacija za sve osobine, sugerišući visok stepen fenotipske različitosti između genotipova. U ovom radu značajno variranje je ustanovljeno i između godina i analiziranih lokalnih populacija za sve osobine, osim za debljinu zrna. Interakcije godina  $\times$  gustina i godina  $\times$  genotip značajno su uticale na većinu osobina.

Sve analizirane populacije su pokazale značajna variranja, a visoke vredosti heritabilnosti u širem smislu (preko 0,6) su dobijene za skoro sve osobine, osim dužine granatog dela metlice. Najveću vrednost heritabilnosti pokazale su osobine visina do klipa, broj redova zrna i širina zrna. Broj redova zrna i širina zrna pokazale su najveću heritabilnost i u radovima na populacijama Francuske, odnosno iz različitih delova Evrope (Llaurado i Moreno-Gonzalez, 1993; Gouesnard i sar., 1997; Rebourg i sar., 2001). Broj redova zrna na klipu smatra se kvalitativnom osobinom kod kukuruza, čime se objašnjava najveća vrednost heritabilnosti ove osobine. Najniže vrednosti heritabilnosti su uočene za dužinu granatog dela metlice i period između metličenja i svilanja. Visoke vrednosti heritabilnosti (preko 0,60) za morfološke osobine (visina biljke, visina do klipa, broj primarnih grana metlice, prečnik klipa, masa 1000 zrna, širina zrna, dužina zrna) dobijene su i drugim radovima na lokalnim populacijama (Gouesnard i sar., 1997; Hartings i sar., 2008). Visoku heritabilnost Rebourg i sar. (2001) objašnjava velikom genetičkom varijabilnošću ispitivanih osobina kod većine lokanih populacija.

U ovom radu, grupisanje, odnosno klasifikacija populacija na osnovu morfoloških osobina je urađena je pomoću PCA i klaster analiza. PCA analiza je pokazala da su najistaknutije osobine u prvoj PC osi bile visina biljke do klipa, broj listova, visina biljke i dužina lista do klipa, dok je druga PC osa bila definisana dužinom metlice i dužinom ose metlice. Ovi rezultati govore da su osobine vezane za veličinu



biljke one osobine koje najviše doprinose fenotipskoj varijabilnosti između populacija. U radu na 262 lokalne populacije Francuske (Gouesnard i sar., 1997) je ustanovljeno da su osobine vezane za veličinu biljke takođe najviše uticale na fenotipsku varijabilnost, a do istih zaključaka su došli Hartings i sar. (2008) analizirajući 54 lokalne populacije kukuruza iz Lombardije.

Grupisanje populacija je dobijeno na osnovu osobina koje definišu PC1 i PC2 ose. Kod populacija koje su zauzele mesto na pozitivnoj strani PC1 ose, izmerene su veće vrednosti od prosečnih za visinu biljke, dužinu lista do klipa i broj listova, dok su populacije na negativnoj strani PC1 ose karakterisale niže vrednosti broja primarnih grana metlice i visine do klipa. Zapaženo je veće grupisanje tvrdunaca i polutvrdunaca na negativnoj strani PC1 ose, odnosno poluzubana i zubana na pozitivnoj strani PC1 ose. Introdikovane populacije iz Gruzije i Kine izdvojile su se u odnosu na ostale populacije na pozitivnoj strani PC1 ose, kao populacije sa najvećim vrednostima za visinu do klipa i broj listova. Na negativnoj strani ose izdvojile su se dve populacije medT3 i cT3, sa najnižim vrednostima za visinu biljke, visinu do klipa, broj listova i dužinu lista. PCA analiza nije dovela do jasnog razdvajanja agroekoloških grupa, kao ni pojedinačnih populacija po tipu zrna, iako se dve trećine analiziranih populacija tvrdunaca, odnosno zubana, grupisalo na istoj strani PC1 ose.

Rezultati PCA analize ukazuju da lokalne populacije kukuruza mogu biti okarakterisane pomoću osobina kao što su rast biljke, osobine metlice i karakteristike zrna. Udeo neke osobine u klasifikovanju populacija zavisi od porekla, kao i od genetičke osnove same populacije. Varijabilnosti između lokalnih populacija doprineli su adaptacija na klimatske uslove sredine za ranostasnost, kao i intenzivna selekcija za osobine zrna i klipa od strane uzgajivača (Gouesnard i sar., 1997).

Klaster analiza na osnovu morfoloških osobina je razdvojila analizirane populacije u tri grupe. U klasteru I našli su se isključivo tvrdunci. Ovaj klaster je obuhvatio Crnogorske tvrdunce, Sitnozrne tvrdunce, dve populacije Prelaznih tvrdunaca i po jednu populaciju Makedonskih tvrdunaca i Mediteranskih tvrdunaca. Osobine koje su dovele do izdvajanja ovih populacija u zaseban klaster bile su dužina lista do klipa, visina biljke i visina do klipa, sa nižim vrednostima od prosečnih za sve populacije. Grupisanje ovih populacija može se objasniti njihovim poreklom. Crnogorski tvrdunci, Mediteranski tvrdunci, Prelazni tvrdunci i Makedonski tvrdunci nastali su prvih

introdukovanih varijeteta iz Centralne i Južne Amerike (Pavličić, 1973). Sitnozrni tvrdunci potiču od Italijanskih „Chinquanto“ snitnozrnih tipova kukuruza i razlikuju se po poreklu od ostalih populacija, međutim sa njima su se u klasteru bliže grupisale populacije koje je takođe karakterisalo sitno zrno.

Klaster II, najveći po broju grupisanih populacija, bio je podeljen na tri subklastera (IIa, IIb i IIc). U subklasteru IIa bilo je više zubana i poluzubana u odnosu na tvrdunce i polutvrdunce. Populacije Bosanskih ranih zubana, Južnih zubana i Tvrđih zubana, dve populacije Prelaznih zubana, kao i po jedna populacija iz Makedonskih tvrdunaca, Prelaznih tvrdunaca, Osmaka severoistočne Amerike, Mediteranskih tvrdunaca, Dugoklipih tvrdunaca, Mekih tvrdunaca i Zubana kukuruznog pojasa SAD-a grupisale su se u ovom subklasteru. Južni zubani i Zubani kukuruznog pojasa SAD-a su imali uticaja na razvoj ostalih grupa zubana, čija se introdukcija desila kasnije, pa se tako i Prelazni zubani na osnovu svojih osobina nalaze između Zubana kukuruznog pojasa SAD-a i Južnih zubana. Predstavnici Tvrđih zubana su heterogena grupa koja se sastoji uglavnom od zubana sa elementima tvrdunaca. Bosanski rani zubani pripadaju tvrduncima, odnosno polutvrduncima po tipu zrna, ali je jedna populacija (brZ2) po tipu zrna poluzuban. Kao što je ranije navedeno Makedonski tvrdunci, Mediteranski tvrdunci i Prelazni tvrdunci imaju isto poreklo. Osmaci tipa severoistočne Amerike i Dugoklipi tvrdunci su nastali iz kasnijih introdukcija od originalnih severoistočnih tvrdunaca. Meki tvrdunci, evoluciono najmlađi kao i Tvrđi zubani, uglavnom su tvrdunci sa introgresijom zubana.

Subklaster IIb formirao je skoro jednak broj zubana/poluzubana (11) i tvrdunaca/polutvrdunaca (10). Sve populacije Rumunskih tvrdunaca, Kosovskih polutvrdunaca, Srbijanskih zubana, po dve populacije Zubana kukuruznog pojasa SAD-a, Belog poluzubana Moravca, Dugoklipih tvrdunaca i Mekih tvrdunaca, kao i po jedna populacija Makedonskih tvrdunaca, Osmaka tipa severoistočne Amerike i Mediteranskih tvrdunaca nalaze se u subklasteru IIb. Srbijanske zubane karakterišu osobine koje osciliraju između Južnih zubana i Zubana kukuruznog pojasa SAD-a (Pavličić i sar., 1976). Ova grupa kukuruza je gajena na prostoru Vojvodine. Karakterizacija varijeteta ove grupe je pokazala značajnu varijabilnost prinosa po biljci, visine biljke i visine biljke do klipa (Jelenić i sar., 1976). Zajedničkog porekla su Rumunski tvrdunci, koji vode poreklo od kasnije introdukovanih grupa, sa ranije

pomenutim Dugoklipim tvrduncima i Osmacima tipa severoistočne Amerike. Kosovski polutvrđunci potiču od rano introdukovanih tvrdunaca, ali sa kasnijom introgresijom germplazme zubana.

Introdukovane populacije iz Francuske grupisale su se u okviru subklastera IIc sa Osmoredim mekim zubanima i po jednom populacijom Osmaka tipa severoistočne Amerike i Belog poluzubana Moravca. Ove populacije je karakterisala velika masa 1000 zrna i krupno, odnosno široko zrno, što je u saglasnosti sa ranijom karakterizacijom ovih grupa (Radović i sar., 2000). Lokalne populacije ovog subklastera spadaju u zubane i poluzubane po tipu zrna. Osmoredi meki zubani su poreklom od originalnog tipa južnih SAD zubana, gajeni su nepromenjeni na malim površinama. Beli poluzuban Moravac spada u poluzubane nastale introdukcijom na prostor bivše Jugoslavije ili ukrštanjem tvrdunaca i zubana, dok su Osmaci tipa severoistočne Amerike nastali od originalnih severoistočnih zubana.

Klaster analiza na osnovu morfoloških podataka je pokazala jasno razdvajanje introdukovanih populacija Gruzije i Kine u odnosu na lokalne populacije. Osobine koje su izdvojile ove populacije od ostalih vezane su za rast biljke (visina biljke, visina do klipa, broj listova i dužina lista do klipa).

Analizom genetičkog diverziteta na osnovu morfoloških osobina nije uočeno jasno grupisanje lokalnih populacija prema poreklu, mada se uočava delimično poklapanje između grupa populacija unutar kastera/subklastera i puteva introdukcije, odnosno njihovog nastanka od originalnih populacija.

Analize genetičkog diverziteta na osnovu morfoloških i agronomski osobina karakterišu se brojnim nedostacima. Procena genetičke sličnosti na osnovu ovih osobina zavisi od uticaja spoljašnje sredine, što se može prevazići upotrebom molekularnih markera. Ova vrsta markera omogućava otkrivanje razlika na DNK nivou i odlikuju se visokim nivoom polimorfizma, predstavljajući efikasno i pouzdano sredstvo za karakterizaciju, konzervaciju i procenu diverziteta germplazme kukuruza (Dubreuil i sar., 2006). Metode molekularne genetike se sve više koriste u cilju zaštite i boljeg korišćenja biljnih genetičkih resursa. Jedno od važnih pitanja je nalaženje metode molekularnih markera koja je najprikladnija za ispitivanje i razumevanje diverziteta biljnih genetičkih resursa. Način da se prevaziđe problem brojnih pojedinačnih uzoraka po populaciji je da se analiziraju jedan ili nekoliko grupnih uzoraka (15-30 objedinjene

DNK pojedinačnih biljaka) po populaciji (Dubreuil i sar., 2006; Warburton sar., 2010). Ovaj pristup je dao pozitivne rezultate u istraživanju populacije kukuruza korišćenjem AFLP markera (Beyene i sar., 2006), SSR markera (Reif i sar., 2005) i RAPD markera (Carvalho i sar., 2004). RAPD i SSR analiza grupnih uzoraka populacija je dokazano efikasnija od genotipizacije pojedinačnih uzoraka populacija (Warburton i sar., 2002; Dubreuil i sar., 2006).

U ovom radu su poređene dve tehnike molekularnih markera, RAPD i SSR, radi procene efikasnosti i informativnosti u određivanju varijabilnosti 54 lokalne populacije i šest introdukovanih populacija (koje su korišćene kao kontrola). Poređenje rezultata dobijenih analizom grupnog i pojedinačnih uzoraka DNK populacija, poslužilo je za verifikaciju izbora odgovarajućeg tipa uzorka za dalji rad. Na osnovu RAPD i SSR analize izračunata je genetička sličnost i urađena je klaster analiza radi utvrđivanja odnosa između analiziranih populacija

Prednosti RAPD tehnike su jednostavnost i brzina, međutim ona je osetljiva na male promene eksperimentalnih uslova, koji moraju biti strogo kontrolisani da bi se dobili reproducibilni rezultati. Činjenica da se nalaze u nekodirajućim delovima genoma omogućava ovoj tehnici da otkrije visok nivo polimorfizma i unutar i između vrsta (Williams i sar., 1990). Sa druge strane, SSR markeri su veoma precizni i ponovljivi i odlikuju se visokim nivoom polimorfizma. Oni se često primenjuju u proceni genetičkog diverziteta lokalnih populacija kukuruza (Matsuoka i sar., 2002).

Po 20 pojedinačnih biljaka iz pet slučajno odabranih populacija testirano je sa pet RAPD i pet SSR prajmera radi poređenja rezultata pojedinačnih sa grupnim uzorcima. Korelacija prisustva traka između grupnih i pojedinačnih uzoraka, analiziranih RAPD markerima iste populacije bila je  $r=0,80$ , tako da je nastavljena analiza na grupnim uzorcima. Analiza grupnog uzorka lokalnih populacija RAPD markerima pokazala se kao efikasna metoda u radu Carvalho i sar. (2004). Poređenjem grupnog i pojedinačnih uzoraka istih populacija za SSR markere dobijena takođe značajna korelacija za učestalost alela ( $r=0,90$ ). Slični rezultati su dobijeni u radu Reif i sar. (2005) na evropskim populacijama tvrdunaca. Nedetektovani aleli grupnog uzorka bili su male učestalosti, zbog čega je SSR analiza je urađena na grupnim uzorcima populacija.

RAPD analiza 60 populacija je urađena sa deset odabranih prajmera i ukupan broj detektovanih traka iznosio je 92, od čega je 87 (94,6%) bilo polimorfno. Visok nivo polimorfizma objašnjava se širokom genetičkom osnovom lokalnih populacija. Ona je nešto veća u odnosu na rezultate drugih autora. Okumus (2007) je RAPD analizom 17 populacija tvrdunaca iz severnog dela Turske dobio 89% polimorfni traka, dok je niži nivo polimorfizma (72,2%) detektovan u radu Carvalho i sar. (2004) na 79 lokalnih populacija iz Brazila i dva hibrida.

Prosečan broj amplifikovanih DNK fragmenata sa deset RAPD markera iznosio je 9,2. Sličan broj prosečnih fragmenata po prajmeru (8,9) dobijen je u pomenutom radu Okumus (2007). U nekim drugim radovima prosečan broj fragmenata po prajmeru bio je manji. Ukupno 13 populacija sa prostora bivše Jugoslavije je okarakterisano sa 17 RAPD prajmera zbog eliminacije eventualnih duplikata i prve procene genetičke varijabilnosti kolekcije, a prosečan broj dobijenih fragmenata je bio 7,6 (Ignjatović-Micić i sar., 2003). U radu Carvalho i sar. (2004) urađena je procena genetičkog diverziteta sa 32 prajmera i prosečan broj traka je iznosio osam po prajmeru. Nasuprot ovim rezultatima, u radu Molin i sar. (2013) na 48 lokalnih populacija Brazila sa 30 RAPD markera prosečan broj traka je bio 13,6.

Genetička sličnost 60 populacija kukuruza u ovom radu dobijena na osnovu RAPD analize utvrđena je primenom koeficijenta sličnosti po *Jaccard*-u. S obzirom na genetičku osnovu RAPD markera, odsustvo amplifikovanih fragmenata kod dva genotipa ne mora da znači i sličnost između njih. *Jaccard*-ov koeficijent isključuje odsustvo trake (0,0 parove), pa je samim tim podesan za obradu rezultata dobijenih na osnovu RAPD markera. Dobijene vrednosti koeficijenta sličnosti su se kretale od 0,32 do 0,87. Srednja vrednost genetičke sličnosti RAPD analizom bila je 0,52 i bila je slična (0,57) rezultatu koji su dobili Molin i sar. (2013). U drugim radovima dobijene su više srednje vrednosti genetičke sličnosti. Prosečna vrednost genetičke sličnosti u radu u kome su analizirane populacije koje pripadaju istoj agroekološkoj grupi (Ignjatović-Micić i sar., 2003) iznosila je 0,68, dok je kod Carvalho i sar. (2004) bila znatno veća (0,84). Suprotno ovim radovima, niža vrednost prosečne genetičke sličnosti (0,46) dobijena je u radu Okumus (2007), autor objašnjava visoku varijabilnost poreklom turskih tvrdunaca od različitih izvora germplazme.

Različite vrednosti polimorfizma, prosečnog broja traka po prajmeru i genetičke sličnosti koje su dobijene u istraživanjima različitih lokalnih populacija RAPD markerima, mogu se objasniti sa nekoliko faktora. Sama RAPD metoda je veoma osetljiva i rezultati zavise od laboratorijskih uslova. Priroda i poreklo, odnosno genetička pozadina genotipova (tropska, suptropska ili germplazma umerenog klimata), kao i genomski region obuhvaćen marker analizom u velikoj meri utiču na rezultate (Molin i sar., 2013). Broj analiziranih uzoraka, u kombinaciji sa genetičkom raznovrsnošću, može takođe uticati na navedena parametre. Analiziranih 60 populacija iz banke gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ pokazale su relativno visok nivo polimorfizma, broja traka po prajmeru i genetičke sličnosti, što se dodatno može objasniti odabirom deset RAPD prajmera za analizu koje je karakterisala visok stepen polimorfnosti.

Na osnovu matrica sličnosti urađena je klaster analiza radi utvrđivanja načina grupisanja 60 populacija. One su se grupisale u tri glavna klastera (I, II i III) i dve grane. Klaster I bio je podeljen na subklastera Ia, Ib i Ic. Unutar klastera nije došlo do značajnog razdvajanja tvrđunaca i zubana, kao ni razdvajanje introdukovanih grupa od lokalnih populacija.

Subklaster Ia formiralo je samo tri populacije, dve iz Crnogorskih tvrđunaca (poreklom od rano introdukovanih grupa) i jedna Zubana kukuruznog pojasa SAD-a (poreklom od kasnije intodukovanih grupa kukuruznog pojasa Amerike).

Subklasteri Ib i Ic obuhvatili su najveći broj populacija (42). U subklasteru Ib našle su sve populacije Prelaznih zubana, Južnih zubana i Mekih tvrđunaca, kao i introdukovane populacije Gruzije i Francuske. Takođe, u ovom klasteru je bilo dve populacije Tvrđih zubana i po jedna populacija Zubana kukuruznog pojasa SAD-a, Osmaka tipa severoistočne Amerike, Mediteranskih tvrđunaca, Crnogorskih tvrđunaca i jedna populacija iz Kine. Grupisanje Prelaznih zubana zajedno sa Južnim zubanima i jednom populacijom Zubana kukuruznog pojasa SAD-a, je u skladu sa nastakom Prelaznih zubana od druge dve grupe. Takođe, Mediteranski tvrđunci i Crnogorski tvrđunci vode iste poreklo. Meki tvrđunci i Tvrđi zubani su najkasnije nastale grupe kroz proces rekombinacije originalnih populacija. Sve introdukovane populacije su se našle u ovom klasteru (osim jedne populacije Kine). Po tipu zrna populacije Francuske i

jedna populacija Gruzije su tvrdunci, dok su populacija Kine i druga populacija Gruzije zubani.

Subklaster Ic formirale su sve populacije Bosanskih ranih zubana, Sitnozrnih tvrdunaca i Prelaznih tvrdunaca, po dve populacije Osmaka tipa severoistočne Amerike, Mediteranskih tvrdunaca, Kosovskih polutvrdunaca, Rumunskih tvrdunaca i po jedna populacija Srbijanskih zubana, Makedonskih tvrdunaca, Osmoredih mekih zubana i Zubana kukuruznog pojasa SAD-a. Unutar ovog subklastera najviše je bilo populacija koje su nastale od najranije introdukovanih populacija iz Centralne i Južne Amerike (Bosanski rani zubani, Prelazni tvrdunci, Kosovski polutvrdunci, Mediteranski tvrdunci i Makedonski tvrdunci). Takođe je bilo i populacija tvrdunaca iz kasnijih introdukcija (Rumunski tvrdunci i Osmaci tipa severoistočne Amerike). Po jedna populacija iz Srbijanskih zubana, Osmoredih mekih zubana i Zubani kukuruznog pojasa SAD-a su populacije zubana nastale od kasnijih introdukcija.

Klaster II formirale su sve populacije Belog poluzubana Moravaca i Dugoklipih tvrdunaca i dve populacije Srbijanskih zubana, kao i po jedna populacija Makedonskih tvrdunaca, Rumunskih tvrdunaca i Osmoredih mekih zubana. Za ovaj klaster je bila vezana jedna populacija Kosovskih polutvrdunaca. Ovaj klaster je bio heterogen po sastavu populacija, ali su neke grupe, tj. populacije istog porekla. Dugoklipi tvrdunci imaju isto poreklo kao populacija Rumunskih tvrdunaca, dok populacije Srbijanskih zubana i populacija Osmoredih zubana vode poreklo od originalnih južnih zubana.

Dve populacije su formirale klaster III, jedna populacija iz Kine i Osmoredih mekih zubana. Po tipu zrna ove dve populacije nisu bile iste.

RAPD analizom nije uočeno jasno grupisanje lokalnih populacija prema poreklu, iako postoje delimična poklapanja između grupa populacija povezanih u kastere/subkastere i putevima introdukcije, odnosno njihovog nastanka od originalnih populacija.

U drugom delu molekularnih analiza urađena je karakterizacija 60 populacija kukuruza sa deset odabranih SSR prajmera i detektovano je ukupno 68 alela, od čega je 64 (94,12%) bilo polimorfno. Kao i kod RAPD markera, visok nivo polimorfizma objašnjava se širokom genetičkom osnovom ispitivanih populacija. Visok nivo polimorfizma u saglasnosti je i sa rezultatima drugih autora koji su proučavali lokalne populacije. U radu Ignjatović-Mićić i sar. (2007) analizirano je 18 lokalnih populacija sa

25 SSR markera i svih 224 amplifikovanih alela je bilo polimorfno. Sa 42 SSR markera na 54 lokalne populacije detektovano je 256 alela sa polimorfizmom od 96,8% (Yao i sar., 2007).

Prosečan broj amplifikovanih alela sa deset SSR markera je iznosio 6,8. Sličan broj alela (6,99) dobijen je u radu Barcaccia i sar. (2003) na deset lokalnih populacija kukuruza. Niža vrednost prosečnog broja alela (4,9) dobijena je u radu Beyene i sar. (2006) na 62 lokalne populacije kukuruza Etiopije sa 20 SSR markera. Jedan od razloga niže vrednosti prosečnog broja alela može biti upotreba agaroznog gela, čija je moć razdvajanja amplifikovanih fragmenata slabija u odnosu na poliakrilamidne gelove (Molin i sar., 2013). Nasuprot tome, veću vrednost prosečnog broja alela dobili su Dubreuil i sar. (2006) sa 24 SSR markera na 275 populacija sakupljenih iz različitih regiona Evrope i Amerike (7,8). Takođe, Sharama i sar. (2010) su dobili 13 alela po prajmer paru, analizirajući 48 populacija iz pet agroekoloških zona Indije, sa 42 SSR markera. Ovako visoke vrednosti se mogu objasniti velikom heterogenošću analiziranih populacija, kao i brojem SSR markera. Pored navedenog, u oba rada korišćeni su fluorescentno obeleženi SSR prajmeri i DNK sekvencer, koji imaju veoma visoku moć razdvajanja i detektovanja amplifikovanih fragmenata.

Broj dobijenih alela u SSR analizi zavisi i od izbora prajmera, odnosno broja ponovaka. U ovom radu su odabrani prajmeri sa tri-nukleotidnim ponovcima ili sa više ponovaka, osim prajmera umc1282. Ovakvi prajmeri su manje polimorfni u odnosu na one sa dinukleotidnim ponovcima, ali se koriste da bi se izbegla pojava "stutter" traka koje se češće javljaju kod prajmera sa dinukleotidnim ponovcima (Warburton i sar., 2002).

Genetička sličnost 60 populacija kukuruza na osnovu SSR analize utvrđena je primenom koeficijenta sličnosti po *Nei i Li*-u. Genetičke sličnosti su se kretali od 0,13 do 0,99, a srednja vrednost je iznosila 0,55. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima genetičkih sličnosti lokalnih populacija tvrdunaca sa prostora bivše Jugoslavije (Ignjatović-Micić i sar., 2007, Ignjatović-Micić i sar., 2008). Srednja vrednost genetičke sličnosti 18 lokalnih populacija je iznosila 0,58, odnosno 21 populacije je iznosila 0,52. Znatno niža vrednost genetičke sličnosti od 0,38 je dobijena u analizi više od 200 populacija iz Amerike i Evrope, što se može objasniti velikom heterogenošću analiziranih genotipova (Dubreuil i sar., 2006). S druge strane, Wietholter i sar. (2008)



su utvrdili visoku genetičku sličnost (0,74) između 37 populacija iz Južnog Brazila, što objašnjavaju njihovim bliskim poreklom i kratkim periodom diferencijacije koji je uslovio nizak nivo alelnih varijacija. Na osnovu navedenih podataka iz literature može se zaključiti da su 54 lokalne populacije iz banke gena Instituta za kukuruz manje heterogene u odnosu na populacije iz Amerike i Evrope, ali su ipak pokazale relativno visok stepen varijabilnosti usled adaptacija na specifične uslove sredine kao i različite namene.

Na osnovu matrice genetičkih distanci urađena je klaster analiza radi utvrđivanja genetičkih veza 60 analiziranih populacija. Dobijen je dendrogram koji se sastojao iz četiri klastera (I, II, III i IV), pri čemu je klaster II bio sastavljen od dva subklastera (IIa i IIb).

Klaster I formirale su sve populacije Crnogorskih tvrdunaca, Sitnozrnih tvrdunaca i Makedonskih tvrdunaca i intodukovane populacije Francuske. U ovom klasteru našle su se i po dve populacije Bosanskih ranih zubana, Prelaznih tvrdunaca i Mediteranskih tvrdunaca, kao i po jedna populacija Osmaka tipa severoistočne Amerike, Dugoklipih tvrdunaca i Gruzije. Uočljivo je veće grupisanje tvrdunaca i polutvrdunaca nastalih od rano intodukovanih grupa Centralne i Južne Amerike (Crnogorskih tvrdunaca, Makedonskih tvrdunaca, Mediteranskih tvrdunaca, Bosanskih ranih zubana i Prelaznih tvrdunaca). Tvrdunci nastali iz kasnijih intodukcija takođe su se našli u ovom klasteru (Osmak tipa severoistočne Amerike i Dugoklipi tvrdunci). Sitnozrni tvrdunci nezavisnog porekla, a populacije iz Francuske i populacija iz Gruzije takođe spadaju u tvrdunce po tipu zrna.

Subklaster IIa bio je formiran od svih populacija Belog poluzubana Moravca i Prelaznih zubana, kao i po dve populacije Srbijanskih zubana, Kosovskih polutvrdunaca i Mekih tvrdunaca. Takođe, unutar ovog klastera našle su se i po jedna populacija Dugoklipih tvrdunaca, Tvrdih zubana, Južnih zubana, Zuban kukuruznog pojasa SAD-a i intodukovana populacija Gruzije. U ovom klasteru zapaženo je veće grupisanje zubana i poluzubana nastalih kasnijim intodukcijama od originalnih populacija kukuruznog pojasa Amerike i južnog tipa zubana (Beli poluzuban Moravac, Prelazni zubani, Srbijanski zubani, Južni zubani i Zubani kukuruznog pojasa SAD-a). Tvrdi zubani, nastali kasnije ukrštanjem postojećih populacija, takođe su se našli unutar ovog klastera i njihove populacije spadaju u zubane/poluzubane. Lokalnim populacijama u

ovom subklasteru bila je pridružena jedna introdukovana populacija iz Gruzije, koja je po tipu zrna zuban. Populacije Kosovskih polutvrđunaca, jedna populacija Dugoklipih tvrđunaca i jedna od dve populacije Mekih tvrđunaca bile su zubani, ali su sve nastale iz različitih introdukcija, tj. od postojećih populacija.

Subklaster IIb je grupisao šest tvrđunaca/polutvrđunaca i deset zubana/poluzubana na osnovu tipa zrna populacija. Zapaženo je grupisanje svih populacija Rumunskih tvrđunaca, sa po dve populacije Osmaka tipa severoistočne Amerike, Osmoredih mekih zubana, Tvrđih zubana i Zuban kukuruznog pojasa SAD-a. U ovom klasteru su se našle i po jedna populacija Mediteranskih tvrđunaca, Prelaznih tvrđunaca, Mekih tvrđunaca, Srbijanskih zubana i Dugoklipih tvrđunaca. Populacije Rumunskih tvrđunaca, Osmaka tipa severoistočne Amerike i populacija Dugoklipih tvrđunaca su tvrđunci nastali iz kasnije introdukcije Severoistočnih tvrđunaca. Tvrđi zubani i populacija Mekih tvrđunaca evolutivno su najmlađe i nastale su ukrštanjem postojećih populacija. Osmoredi meki zubani, Zubani kukuruznog pojasa SAD-a i Srbijanski zubani nastali su iz kasnijih introdukcija, dok su populacije Mediteranskih tvrđunaca i Prelaznih tvrđunaca nastale iz ranije introdukovanih sorti.

Klasteri III i IV bili su formirani od dve, tj tri populacije. Jedna populacija Kosovskih polutvrđunaca i jedna Osmoredih mekih zubana formirale su klaster III. Obe populacije su po tipu zrna bile zubani, iako Kosovski polutvrđunci vode poreklo od ranih introdukovanih tvrđunaca sa kasnijom introgresijom zubana. Klaster IV su formirale dve populacije Južnih zubana i jedna Bosanskih ranih zubana. Ove populacije takođe vode različito poreklo i po tipu zrna su različite, populacije Južnih zubana su zubani, a populacija Bosanskih ranih zubana polutvrđunac.

SSR analizom, isto kao ni RAPD ni morfološkom analizom, nije uočeno jasno grupisanje lokalnih populacija prema poreklu, ali je uočeno delimično poklapanje između grupa populacija povezanih u klastere/subklaste i putevima introdukcije, odnosno njihovog nastanka od originalnih populacija.

Poređenjem genetičkih sličnosti unutar agroekoloških grupa ustanovljeno je da je veća varijabilnost dobijena SSR markerima, čiji se opseg kretao od 0,39 do 0,89. Opseg genetičkih sličnosti između agroekoloških grupa dobijenih RAPD analizom se kretao od 0,42 do 0,67. Ovo je u saglasnosti sa činjenicom da se SSR markeri odlikuju većim polimorfizmom u odnosu na RAPD markere (Garcia i sar., 2004).

Dobijena genetička sličnost unutar nekih agroekoloških grupa odgovara njihovom grupisanju u klasterima. Makedonski tvrđunci i Osmoredi meki zubani na osnovu RAPD analize imaju niže vrednosti genetičke sličnosti, što odgovara njihovoj heterogenosti u pogledu grupisanja u različite klastere. Nasuprot tome, Dugoklipi tvrđunci su takođe sa nižom vrednošću genetičke sličnosti, a grupisani su u okviru jednog klastera. Takođe, na osnovu rezultata RAPD analize, Južni zubani i Prelazni zubani se odlikuju većom vrednošću genetičke sličnosti, što je u skladu sa njihovim rasporedom u dendrogramu, jer spadaju među homogenije grupisane agroekološke grupe. Na osnovu SSR analize agroekološke grupe sa najvećim vrednostima genetičke sličnosti bile su ujedno i najhomogenije po grupisanju unutar klastera. Jedini izuzetak su populacije Sitnozrnih tvrđunaca, koje su imale najnižu vrednost  $gs$ , a grupisale su se u isti klaster.

Lokalne populacije su grupisane u agroekološke grupe na osnovu pedigre podataka i morfoloških karakteristika, i očekivalo se da genetičke sličnosti dobijene na osnovu molekularnih analiza opišu genetičke odnose između lokalnih populacija, odnosno agroekoloških grupa. Značajno podudaranje sa poreklom populacija nije dobijeno ni sa jednim marker sistemom. Nije postignuto isto rangiranje agroekoloških grupa na osnovu genetičkih sličnosti za oba marker sistema. Pozicija većine grupa se razlikuje u zavisnosti od korišćenog markera. Najveća razlika je bila kod Rumunskih tvrđunaca, poredeći srednju vrednost genetičkih sličnosti, dok je najmanja razlika uočena kod Crnogorskih tvrđunaca, Osmaka tipa severoistočne Amerike i Prelaznih tvrđunaca.

Raspored populacija u dendrogramima dobijenim iz morfoloških i molekularnih podatak je bio različit. Zapaženo je da populacije genetički udaljene mogu biti slične po fenotipu, što govori o prednosti molekularnih analiza u definisanju agroekoloških grupa sličnih po poreklu. Najbolji način da se opišu i klasifikuju genetički resursi, kao što su lokalne populacije kukuruza predstavlja proces u koji treba uključiti obe metode. Potrebno je uraditi klasifikaciju i procenu varijabilnosti na osnovu molekularnih analiza kombinovanjem različitih marker sistema, kao i opis svake grupe na osnovu morfoloških i agronomskih osobina. Na osnovu ovog principa neke agroekološke grupe su se jasno grupisale shodno njihovom poreklu i morfološkim osobinama. Na osnovu rezultata molekularne analize i morfoloških karakteristika šest agroekoloških grupa se

grupisalo u iste klastere/subklaster (Crnogorski tvrđunci, Sitnozrni tvrđunci, Beli poluzuban Moravac, Prelazni zubani, Tvrđi zubani i Meki zubani).

Crnogorski tvrđunci su pored grupisanja u iste klastere na osnovu molekularnih markera i morfoloških osobina pokazali i visoke vrednosti genetičke sličnosti. Srednja vrednost genetičke sličnosti unutar ove agroekološke grupe bila je visoka za oba sistema molekularnih markera. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima na 13 populacija ove agroekološke grupe sa RFLP i RAPD markerima (Ignjatović – Micić i sar., 2003).

Sitnozrni tvrđunci su nasuprot grupisanju u iste klastere pokazali manju srednju vrednost genetičke sličnosti na osnovu SSR analize. Ovakvo grupisanje unutar klastera može se objasniti njihovim jedinstvenim poreklom (Chiquantino tip) u odnosu na druge agroekološke grupe, kao i tipom zrna sve tri populacije – tvrđunci.

Beli poluzuban Moravac su pokazali i visoke srednje vrednosti genetičke sličnosti unutar grupe dobijene na osnovu SSR markera. I pored velike varijabilnosti ove grupe za neke morfološke osobine, što je opisano i u ranijim radovima (Jelenić i sar., 1975), populacije ove grupe su se bile unutar istih klastera. Po tipu zrna sve tri populacije su bile zubani/poluzubani.

Prelazni zubani su gajeni u Vojvodini, a sve tri populacije su prikupljene na prostoru Srbije. Odlikuje ih visok prinos i to su poluacije koje su bile od značaja u selekciji kukuruza.

Tvrđi zubani i Meki tvrđunci, iako heterogene grupe, koje su evolutivno najmlađe i nastale kroz proces rekombinacije originalnih populacija, grupisale su se unutar istih klastera na osnovu morfoloških osobina i molekularnih analiza. Populacije obe grupe su sakupljene u Srbiji.

Ostale populacije su pokazale različito grupisanje u zavisnosti od marker sistema. Neke populacije su za dva marker sistema dale isto grupisanje. Južni zubani su se grupisali unutar istih subklastera na osnovu morfoloških i RAPD markera, dok su sa SSR markerima bili raspoređeni unutar dva klastera. Po tipu zrna sve populacije su zubani sakupljeni na prostoru Hrvatske. Mediteranski tvrđunci spadaju u agroekološku grupu koja se grupiše u različite klastere na osnovu morfoloških i SSR markera, a unutar različitih subklastera istog klastera na osnovu RAPD analize. Ova grupa je bila

predstavljena sa sve tri populacije tipa tvrdunci, ali su sve tri sakupljene u različitim regionima (Bosna i Hercegovina, Slovenija i Hrvatska).

U ovom radu ni morfološki ni molekularni markeri nisu jasno izdvojili populacije po agro-ekološkim grupama, kao ni introdukovane od lokalnih populacija. Ograničena mogućnost fenotipskih podataka (prvenstveno njihova zavisnost od uslova spoljašnje sredine) u razrešenju genetičke strukture heterogenih lokalnih populacija uočena je i od strane drugih autora (Rebourg i sar., 2001, Sharama i sar, 2010). Bez obzira na nedostatke ovakve karakterizacije, fenotipske osobine lokalnih populacija imaju važnu ulogu u oblasti genetičkih proučavanja i oplemenjivanja i kao takave su korisne u preliminarnoj proceni diverziteta. Takođe, procena diverziteta pomoću molekularnih markera zavisi od osobina markera, kao što su dominantnost/kodominantnost i stepen polimorfnosti (Gauthier i sar., 2002).

Uzroci različitog grupisanja dela populacija odnosno agroekoloških grupa može se, pored ograničenosti fenotipskih osobina i različitih osobina RAPD i SSR markera, objasniti i prirodom odabranog materijala. Jedan od razloga može biti i mali broj populacija po agroekološkoj grupi (po tri lokalne populacije), što istovremeno ukazuje i na značajnu varijabilnost unutar agroekoloških grupa. Sve populacije, uključujući i pripadnike iste agroekološke grupe, su prikupljane za kolekciju banke gena Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ sa različitih prostora bivše Jugoslavije. Neke od njih su gajene na malom prostoru i ostale su nepromenjene u novim sredinskim uslovima (np. Sitnozni tvrdunci), dok su druge bile rasprostranjene u različitim regionima bivše Jugoslavije (np. Meki tvrdunci). Takođe, unutar jedne agroekološke grupe postoje populacije različite po tipu zrna, a slučajnim uzorkovanjem za ovaj rad su odabirane populacije iste grupe a različitog tipa zrna (np. Kosovski polutvrdunci – dva zubana i jedan poluzuban). Na kraju, populacije su prošle različit broj ciklusa umnožavanja u polju za potrebe banke gena, što je dovelo do promena u učestalosti alela unutar populacija, a samim tim i unutar agroekoloških grupa.

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na nedostatke postojaće klasifikacije lokalnih populacija u agroekološke grupe, kao i na nedostatke različitih marker sistema u izučavanju genetičkog diverziteta lokalnih populacija. Međutim, pokazano je da ispitivanje varijabilnosti lokalnih populacija kukuruza pomoću različitih marker sistema

daje sveobuhvatniju i precizniju sliku odnosa lokalnih populacija i agroekoloških grupa.

Takođe, visok nivo procenjenog genetičkog divrziteta između lokalnih populacija kukuruza ukazuje na njihovu prilagođenost specifičnim uslovima spoljašnje sredine i različitim namenama, odnosno na prisustvo specifičnih alela. Ukrštanjem genetički sličnih lokalnih populacija, identifikovanih pomoću sva tri marker sistema, mogu se stvoriti *sub-core* kolekcije koje će sadržati ove alele, što pruža veće mogućnosti za njihovu upotrebu u stvaranju poboljšanih elitnih genotipova kukuruza.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu proučavanja analize varijanse, heritabilnosti, kao i morfoloških i molekularnih markera (RAPD i SSR), a radi ispitivanja varijabilnosti 54 lokalne populacije kukuruza i 6 introdukovanih populacija iz banke gena Instituta za kukuruz "Zemun Polje", došlo se do sledećih zaključaka:

- Analizom varijanse uočene su značajne razlike između lokalnih populacija kod svih osobina za različite izvore variranja, što govori o visokom stepenu fenotipskog diverziteta između ovih populacija. Genotip je bio značajan izvor variranja za sve ispitivane osobine i visoko značajno variranje je uočeno kod svih osobina.
- Visoke vredosti heritabilnosti u širem smislu su dobijene za skoro sve osobine, osim dužine granatog dela metlice.
- Rezultati PCA analize ukazuju da lokalne populacije kukuruza mogu biti okarakterisane pomoću osobina kao što su rast biljke i karakteristike metlice, koje najviše doprinose fenotipskom variranju populacija. Zapaženo je veće grupisanje tvrdunaca i polutvrdunaca, odnosno poluzubana i zubana, što je u skladu sa procesima njihove introdukcije na prostore bivše Jugoslavije.
- Klaster analiza na osnovu morfoloških podataka je pokazala jasno razdvajanje introdukovanih populacija Gruzije i Kine u odnosu na lokalne populacije, kao i grupisanje većine tvrdunaca u okviru jednog klastera.
- U ovom radu ni PCA ni klaster analiza nisu mogle da naprave jasnu razliku između zubana i tvrdunaca, na osnovu morfoloških i agronomskih osobina
- Genetički udaljene populacije mogu biti slične po fenotipu, a to ukazuje na prednost analiza molekularnim markerima u izučavanju diverziteta populacija, odnosno agroekoloških grupa
- Na osnovu vrednosti dobijenih genetičkih sličnosti i grupisanju populacija u skladu sa agroekološkim grupama, zaključeno je da su SSR markeri bolji izbor od RAPD markera za analizu varijabilnosti i klasifikaciju populacija kukuruza.

- Na osnovu rezultata i njihovog tumačenja, izvedeni glavni zaključci ukazuju da fenotipske, kao i analize pomoću RAPD i SSR markera daju delimično različite odnose između populacija. Način grupisanja populacija u dendrograme na osnovu rezultata morfoloških i molekularnih markera se ne poklapa u potpunosti.
- Prošto su molekularni markeri raspoređeni prvenstveno u nekodirajućim sekvencama genoma, a morfološki markeri zavise od efekta spoljašnje sredine, najbolji način da se opišu i klasifikuju genetički resursi kukuruza predstavlja proces u koji treba uključiti oba pristupa.
- Rezultati ukazuju na veliku varijabilnost lokalnih populacija, kako i na očuvanost nekih populacija, odnosno agroekoloških grupa usled prisustva specifičnih alela odnogovornih za adaptaciju na lokalne uslove.
- Ukrštanjem genetički sličnih lokalnih populacija, identifikovanih pomoću sva tri marker sistema, mogu se stvoriti *sub-core* kolekcije koje će sadržati odgovarajuće specifične alele, što pruža veće mogućnosti za njihovu upotrebu u stvaranju poboljšanih elitnih genotipova kukuruza.



## 7. LITERATURA

Agrama, H.A., S. F. Houssin and M. A. Tarek (2002): Cloning of AFLP markers linked to resistance to *Peronosclerospora sorghi* in maize. *Mol. Genet. Genomics* 267, 814–819.

Agwanda, C.O., P. Lashermes, P. Trouslot, M.C. Combes, A. Charrier (1997). Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in Arabica coffee. *Euphytica*, 97: 241-248.

Anderson, E. and H.M. Cutler (1942): Races of *Zea mays*: Their recognition and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 29: 69-89.

Anderson, R.I. and T.A. Bancroft (1952): *Statistical theory in research*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, USA.

Alonso-Blanco, C., A.J. Peeters, M. Koornneef, C. Lister and C. Dean (1998): Development of an AFLP-based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Pl. J.* 14: 259–271

Ayad, W.G., J. Hodgkin, A. Jaradat and V.R. Rao (1995): *Molecular gene techniques for plant genetic resources*. Report of an IPGRI WC 9-11 October 1995. Rome, Italy.

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

Babić, M., V. Anđelković, S. Mladenović Drinić, K. Konstantinov (2011): The conventional and contemporary technologies in maize (*Zea mays* L) breeding at Maize Research Institut Zemun Polje, *Maydica* 56: 155-164.

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

Barcaccia, G., M. Lucchin, P. Parrini (2003): Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace: II. Genetic diversity and relatedness assessed by PCR-based molecular markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:253-271.

Beyene, Y., A. Botha, A.M. Alexander (2005): A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. *African J Biotechnol* 4:586–595.

Beyene, Y., A Botha. and A Myburg (2006): Genetic diversity in traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by AFLP markers and morphological traits. *Biodiversity and Conservation* 15: 2655-2671.

Bracco, M., V.V. Lia, A.M.J. Gottlieb, J Cámara Hernández, L Poggio (2009): Genetic diversity in maize landraces from indigenous settlements of Northeastern Argentina. *Genetica* 135: 39-49.

Brandolini, A.G. (1969): European races of maize. *Annual Corn and Sorghum Research Conference Proceedings* 24: 36-38.

Brandolini, A.G. (1970): Maize. In: Frankel O.H. and Bennett E. (eds), *Genetic Resources in Plants. Their Exploration and Conservation*. Blackwell Scientific Publications, pp. 273-309.

Brandolini, A. and G. Mariani (1968): Il germoplasma italiano nella fase attuale del miglioramento genetico del mais. *Genetica agraria* 22:189-206.

Brockhaus, R. and A. Oetmann (1996): Aspects of the documentation of in situ conservation measures of genetic resources; *Plant Genet. Res. Newsletter*. 108:1 – 16.

Bertolini, M., A. Bianchi, E. Lupotto, F. Salamini, A. Verderio and M. Motto (1998): Maize In: Scarascia Mugnozza G.T. and Pag notta M.A. (eds), Italian Contribution to Plant Genetics and Breeding. Tipolit. Quatrini A. & F. Publisher, Viterbo, Italy, pp. 209–229.

Brown, A.H.D. (1979): Enzyme polymorphism in plant population. *Theor Pop Biol* 15: 1-42

Brown, A.H.D. (1989): Core collections: A practical approach to genetic resources management. *Genome* 31:818–824.

Cairns, J.E., K. Sonder, P.H. Zaidi, N. Verhulst, G. Mahuku, R. Babu, S.K. Nair, B. Das et al. (2012): Maize production in a changing climate: impacts, adaptation and mitigation strategies. *Adv. Agron.* 114: 1–58.

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

Carvalho, V.P., C.F. Ruas, J.M. Ferreira, R.M.P. Moreira, P.M. Ruas (2004): Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 228-236.

Castiglioni, P., P. Ajmone-Marsan, R. van Wijk, M. Motto (1999): "AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution", *THEOR A GEN*, 99(3-4), pp. 425-431.

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

- Costa-Rodrigues, L. (1971): Races of maize in Portugal. *Agron Lusit* 31:239–284.
- Diniz, S.P.S.S. (2002): *Micotoxinas*, 1<sup>o</sup>ed, Livraria e Editora Rural, Campinas, 181p.
- Dubreuil, P. and A. Charcosset (1998): Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. *Theor Appl Genet* 96:577–587.
- Dubreuil, P., C. Rebourg, M. Merlino, A. Charcosset (1999): Evaluation of DNA pooled-sampling strategy for estimating the RFLP diversity of maize populations. *Plant Mol Biol Rep* 17:123–138.
- Dubreuil, P., M. Warburton, M. Chastanet, D. Hoisington, A. Charcosset (2006): More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements. *Maydica* 51:281–291.
- Edwards, A., A. Civitello, H.A. Hammond and C.T. Caskey (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49,746-756.
- Falconer, D.C. and T.F.C. Mackay (1996): Genetic constitution of a population. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Essex, England; Longman, Scientific and Technical. 1-22.
- FAOSTAT (2010): Statistical databases and data-sets of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://faostat.fao.org/default.aspx>)
- Frankel, O.H. and E.Bennett (1970): *Genetic Resources in Plants: Their Exploration and Conservation*; Blackwell, Oxford.

Fernie, A.R., Y. Tadmor, D. Zamir (2006): Natural genetic variation for improving crop quality. *Curr Opin Pl Biol.* 9: 196–202.

Ganal, M.W., G. Durstewitz, A. Polley, A. Berard, E.S. Buckler et al. (2011): A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PloS one* 6: e28334.

Garcia, A.A.F., L.L.Benchimol, A.M.M.Barbora, I.O.Geraldi, Jr.C.L.Souza, A.P. de Souza (2004): Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genet. Mol. Biol.* 27: 579-588.

Garcia, E., M. Jamilena, J.I. Alvarez, T. Arnedo, J.L. Oliver, R. Lozano (1998): Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. *Theor Appl Genet* 80: 833–84

Gouesnard, B., J. Dallard, A. Panouille, A. Boyat (1997): Classification of French maize populations based on morphological traits. *Agronomie* 17:491–498.

Gauthier, P., B. Gouesnard, J. Dallard, R. Redaelli, C. Rebourg, A. Charcosset, A. Boyat (2002): RFLP diversity within and among European traditional maize populations. *Theor Appl Genet* 105:91–99

Gay, J.P. (1999): *Maïs, mythe et réalité*. Ed Altantica. 619 pp.

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

Geric, I., M. Zlokolica, C. Geric and C. Stuber (1989): Races and populations of maize in Yugoslavia. Isozyme variation and genetic diversity. IBPGR, Rome.

Gimenes, M.A. and C.R. Lopes (2000): Isoenzymatic variation in the germplasm of Brazilian races of maize (*Zea mays* L.) *Genetics and Molecular Biology*, v.23, p.375-380.

Goodman, M.M. (1994): Evolution within maize: Relationships among germplasm sources, temperate breeding strategies, and germplasm use. *Memories of the International Maize Symposium (Maize in the Decade of the 90s)* 1:119-130. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos, Guadalajara, Jal., Mexico.

Harada, K., N. Van Huan, H. Ueno. (2009): Classification of Maize Landraces from Shikoku and Kyushu, Japan, Based on Phenotypic Characteristics. *JARQ* 43 (3); 213 - 220.

Hartings, H., N. Berardo, G.F. Mazzinelli, P. Valoti, A. Verderio, M. Motto (2008): Assessment of genetic diversity and relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. *Theor Appl Genet* 117:831–842.

Hayano-Kanashiro, C., C. Calderón-Vázquez, E. Ibarra-Laclette, L. Herrera-Estrella, J. Simpson (2009): Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS One* 4:1-19.

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

Hoisington, D., M. Khairallah, J.M. Ribaut, B. Skovmand, S. Taba, M. Warburton (1999): Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8133–8138.

Iglesias, J., D. Presello, G. Botta and G. Lori (2006): Resistance of Argentinean Landraces to Field Accumulation of Fumonisin, Deoxynivalenol and Zearalenone. In: *Advances in Research on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in South America Ensuring Food and Feed Safety in a Myco-Globe Context*, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Ignjatovic-Micic, D., S. Mladenovic Drinic, A. Nikolic, V. Lazic-Jancic (2007): Comparison of AFLP and SSR markers for genetic diversity studies in maize populations. *Maydica* 52: 399-406.

Ignjatovic-Micic, D., S. M. Drinic, A. Nikolic and V. L. Jancic (2008): SSR-analysis for genetic structure and diversity determination of maize local populations from former Yugoslavia territories. *Russian Journal of Genetics*. Vol. 44, No. 11, pp. 1317–1324, ISSN 1022-7954.

Ignjatovic-Micic, D., T. Coric, D. Kovacevic, K. Markovic (2003): RFLP and RAPD analysis of maize (*Zea mays* L.) local populations for identification of variability and duplicate accessions. *Maydica* 48: 153-159.

Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Vaud. Soc. Nat.* 44 : 233-270.

Jarne, P. and P.J.L. Lagoda. (1996): Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11 :424–429.

Jelenić, D., J Pavličić, G. Radović i V. Hadžitašković Šukalović (1976): Proučavanje nekih osobina jugoslovenskih klasifikovanih tipova kukuruza: tvrdi zubani. *Savremena poljoprivreda XXIV*: 45-53.

Jelenic, D., J. Pavlicic, V. Hadzi-Taskovic Sukalovic, G. Radovic (1975): Study on some features of Yugoslav classified types of maize: eight-row soft dent and 'Moravac' white semi-dent. *Savremena Poljoprivreda* 23(7/8): 5-15.

Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. Van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, 3, 381–390.

Leng, E.R., A. Tavčar, V. Trifunović (1962): Maize of Southeastern Europe and its potential value in breeding programs elsewhere. *Euphytica* 11: 263-272.

Lefort-Buson, M., V. Lavergne, J.J. Daudin., A.Charcosset, J.P.Sampoux, A.Gallais (1991): Genetic variability among populations of maize germplasm.2. Enzymatic polymorphism and its relationship to quantitative trait diversity. *Maydica*,36: 237–246.

Linnaeus, C. (1758): *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata.* – pp. [1–4], 1–824. Holmiæ. (Salvius)

Litt, M. and J.A. Luty (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiacmuscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401

Llaurado, M. and J. Moreno-Gonzalez (1993): Classification of northern Spanish populations of maize by numerical taxonomy. I. Morphological traits. *Maydica* 38:15-21.

Loskutov, I.G. (1999): N.I.Vavilov and his Institute. History of the world collection of plant genetic resources in Russia. IPGRI, Rome, 189p.

Lubberstedt, T., A.E. Melchinger, C. Dußle, M. Vuylsteke, M. Kuiper (2000): Relationships among early European maize inbreds. IV.Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop Sci* 40:783–79.

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



Messmer, M.M., A.E. Melchinger, J. Boppenmaier, R.G. Herrmann, E. Brunklaus Jung (1992): RFLP analyses of early-maturing European maize germ plasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. *Theor Appl Genet* 83 : 1003-1012.

Mladenovic Drinic, S., D. Ristic, S. Sredojevic, V. Dragicevic, D. Ignjatovic-Micic and N. Delic (2009): Genetic variation of phytate and ionorganic phosphorus in maize population. *Genetika*, Vol. 41, No. 1, 107 -115.

Mladenovic Drinic, S., V. Andjelkovic and D. Ignjatovic-Micic (2011): Genetic Diversity of Maize Landraces as Sources of Favorable Traits in: *Genetic Diversity*, book 2. Mahmut Caliskan Mustafa (ed), Kemal University, Department of Biology Hatay, Turkey, published by InTech (ISBN 987-953-307-1384-7).

Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna (2003): Analysis of genetics diversity in crop plants: salient statical tools and considerations. *Crop Sci* 43: 1235-1248.

Molini, D., C.J. Coelho, D.S. Máximo, F.S. Ferreira, J.R. Gardingo and R.R. Matiello (2013): Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers *Genetics and Molecular Research*. 12 (1): 99-114.

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

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. horn and H. Erlich (1986): Specific Enzymatic Amplification of Dn Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51:263-73.

Nass, L.L. and E. Paterniani (2000): Pre-breeding: link between genet resources and maiye breeding. *Scientia Agricola*57: 581-587.

Ndiso, J.B, A.M. Kibe, S. Mugo, R.S. Pathak and P. Likhayo (2008): Screening Kenyan coastal maize landraces for resistance to drought stress and storage pests. *Egerton Journal of Science and Technology* 8: 10-28.

Nei, M. and Li W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269–5273.

Okumus, A. (2007): Genetic variation and relationship between Turkish flint maize landraces by RAPD markers. *Am J Agri Biol Sci* 2 (2):49–53.

Ortiz, R., Taba S et al. (2010): Conserving and enhancing maize genetic resources as global public goods – a perspective from CIMMYT. *Crop Sci.* 50 13–28.

Patto, M.C., Z. Satovic, S. Pego and P. Fevereiro (2004): Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica* 137 63–72.

Pavlicic, J. (1971): Contribution to a preliminary classification of European open pollinated maize varieties. pp 93-107. In: I. Kovacs (Ed.), *Proc. 5th Meeting Maize Sorghum Sect. Eucarpia, Martonvasar, Hungary.*

Pavličić, J. (1973): Prilog poznavanju evolucione srodnosti domaćih tipova kukuruza iz naših brdskih rejona. *Genetika* 5: 98-108.

Pavličić, J. i D.Jelenić, (1977): Klasifikovani tipovi kukuruza u Jugoslaviji i njihov značaj za selekciju. *Savremena poljoprivreda XXV*: 31-42.

Pavličić, J., D. Jelenić, G. Radović i V. Hadži-Tašković Šukalović (1975): Proučavanje nekih osobina jugoslavenskih klasifikovanih tipova kukuruza: osmaci tipa severoistočne Amerike, prelazni tvrdunci i srodni tipovi. *Savremena poljoprivreda XXIII*: 75-84.

Pavličić, J., D. Jelenić i G. Radović (1976): Proučavanje nekih osobina jugoslovenskih klasifikovanih tipova kukuruza: zubani tipa južnih predela SAD i srbijanski zubani. *Savremena poljoprivreda XXIV*: 5-13.

Pavličić, J. i V. Trifunović (1966): Prilog poznavanju nekih značajnijih ekotipova kukuruza gajenih u Jugoslaviji i njihova klasifikacija. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 19: 44-62

Pavličić, J. and V. Trifunović (1968): Classification and Evolutionary Relationship of Yugoslav Domestic Varieties (Final Report), Edition Notes: „Grant number FG. Yu 105; Project Number E30 CR4.“, Published in Belgrade.

Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino and M. Motto (1998): Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-1255.

Pinto, A.T.B., J. Pereira, T.R. Oliveira, R.A. Prestes, R.R. Mattiello, I.M. Demiate. (2009): Characterization of corn landraces planted grown in the Campos Gerais region (Parana, Brazil) for industrial utilization. *Braz Arch Biol Technol.* 52: 17-28.

Powell, W., G.C. Machray and J. Provan (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* Vol. 1, No. 7, pp. 215-222, ISSN 1360-1385.

Poehlman, J.M. and D.A. Sleper (1995): *Breeding Field Crops*, Iowa State University Press

Prasanna, B.M. (2010): Phenotypic and molecular diversity of maize landraces: characterization and utilization. *Indian J. Genet.* 70: 315–327.

Qi-Lun, Y., F. Ping, K. Ke-Cheng, P. Guang-Tang (2008): Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. *J Genet* 87: 287–291.

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

Radović, G., J. Muminović, D. Jelovac (2000): Local maize germplasm: Potentially valuable breeding material. *Genetika* 32: 221-234.

Revilla, P., P. Soengas, R.A. Malvar, M.E. Cartea, A. Ordas (1998): Isozyme variation and historical relationships among the maize races of Spain. *Maydica* 43:175–182.

Rebourg, C., B. Gouesnard, A. Charcosset (2001): Large scale molecular analysis of traditional European maize populations – relationships with morphological variation. *Heredity* 86:574–587.

Rebourg, C., M. Chastanet, B. Gouesnard, C. Welcker, P. Dubreuil and A. Charcosset (2003): Maize introduction into Europe: the history reviewed in the light of molecular data. *Theor. Appl. Genet.* 106 895–903.

Rebourg, C., P. Dubreuil, A. Charcosset (1999): Genetic diversity among maize populations: bulk RFLP analysis of 65 accessions. *Maydica* 44:237–249.

Reif, J.C., S. Hamrit., M. Heckenberger et al.(2005): Genetic Structure and Diversity of European Flint Maize Populations Determined with SSR Analysis of Individuals and Bulks, *Theor. Appl. Genet.*, vol. 111, pp. 906–913.

Reif, J.C., X.C. Xia, A.E. Melchinger, M.L. Warburton, D.A. Hoisington, D. Beck, M. Bohn and M. Frisch (2004): Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Sci.* 44 326–334.

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

Rohlf, F.J. (2000): NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1 (New York: Exeter) Owners manuel

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

Saal, B. and G. Wricke (2002): Clustering of amplified fragment length polymorphism markers in a linkage map of rye. *Plant. Breeding* 121: 117-123.

Sanchez-Monge, E. (1962): Razas de maiz en Espana, ed. Ministerio de Agricultura, Madid, Espana

Schierwater, B. and A. Ender (1993): Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*,21, 4647–4648.

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

Sharma, L., B.M. Prasanna and B. Ramesh (2010): Phenotypic and microsatellite-based diversity and population genetic structure of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica* 138 619–631.

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

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

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

Spooner, D., R. van Trauren and M.C. de Vicon (2005): Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10, International Plant Genetic resources Institute, Rome, Italy.

Tamiru, A., T.J.A. Bruce, C. Woodcock, J.C. Caulfield, C.A.O. Midega, C.K.P.O. Ogol, P. Mayon, M.A. Birket, J. A. Pickett and Z. R. Khan (2011): Maize landraces recruit egg and larval parasitoids in response to egg deposition by a herbivore. *Ecology Letters*, 14, 1075–1083.

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

Tester, M. and P. Langridge (2010): Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*. 327: 818–22.

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

Trethowan, R.M., J. Crossa, M. van Ginkel and S. Rajaram (2001): Relationships among bread wheat international yield testing locations in dry areas. *Crop Sci* 41: 1461–1469.

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

Zeng, Y., H. Zhang, Z. Li, S. Shen, J. Sun, M. Wang., D. Liao, X. Liu, X. Wang, F. Xiao, G. Wen (2007): Evaluation of Genetic Diversity of Rice Landraces (*Oryza sativa* L.) in Yunnan, China. *Breeding Science* 57: 91–99.

Zeven, A.C. (1998) Landraces: a review of definition and classification. *Euphytica* 104:127–139.

USDA/NASS (2007): United States Department of Agriculture. 1400 Independence Ave. S.W. Washington, DC 20250.

Vančetović, J., S. Mladenović-Drinić, M. Babić, D. Ignjatović-Micić, V. Anđelković (2010): Maize Genebank collections as potentially valuable breeding material. *Genetika* 42: 9-11.

Varshney, R.K., K.C. Bansal, P.K. Aggarwal, S.K. Datta , P.Q. Craufurd (2011): Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trend Pl Sci.*; 16:363–71.

Vázquez-Carrillo, G., S. García-Lara, Y. Salinas-Moreno, D. Bergvinson. and N. Palacios-Rojas (2011): Grain and tortilla quality in landraces and improved maize grown in the highlands of Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition* 66 (2): 203-8.

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414.

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

Vroh Bi, I., M.D. McMullen, H.S. Villeda, S. Schroeder, J. Gardiner, M. Polacco, C. Soderlund, R. Wing, Z. Fang, E.H. Coe (2006): Singlenucleotide polymorphisms and

insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Sci* 46:12–21.

Vuyksteke, M., R. Mank, R. Antonise, E. Bastiaans et al. (1999): Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 921-935.

Warburton, M., P. Setimela, J. Franco, H. Cordova, K. Pixley, M. Banziger, S. Dreisigacker, C. Bedoya and J. MacRobert (2010): Toward a cost-effective fingerprinting methodology to distinguish maize open-pollinated varieties. *Crop Sci.* 50 467–477.

Warburton, M.L., X.X. Ianchun, J. C. Rossa, J. Franco, A.E. Melchinger, M. Frisch, M. Bohn, D. Hoisington (2002): Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open-pollinated populations using large-scale fingerprinting methods. *Crop Sci.* 42: 1822-1840.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer (1995): *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi* (ed. Arbor, A.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1–3.

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

Welsh, J. and M. McClelland (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213–7218.

Wen, W., S. Taba, T. Shah, V.H.C. Tovar and J. Yan (2011): Detection of genetic integrity of conserved maize (*Zea mays* L.) germplasm in genebanks using SNP markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 58 189–207.



Wietholter, P., M.J. Cruz de Melo Sereno, T. de Freitas Terra, S. Delmar dos Anjos e Silva and J.F. Barbosa Neto (2008): Genetic variability in corn landraces from southern Brazil. *Maydica* 53: 151-159

William, S.K. and R.C. Michael (2002): *Essentials of genetics*. Higher Education Press, Beijing.

Williams, J.G.K, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531–6535.

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

[www.fao.org](http://www.fao.org)

<http://www.mendelweb.org/archive/Mendel.Experiments.txt>

<http://www.maizegdb.org>

Yao, Q.L., K.C. Yang, G.T. Pan, T. Z. Rong (2007): Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) landraces from Southwest China based on SSR data. *J Genet Genom*, 34(9): 851–860.

Young, W.P., J.M. Schupp and P. Keim (1999): DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor Appl Genet* 99:785–792.

## **PRILOZI**

## PRILOG 1

Genetičke sličnosti po *Jaccard*-u dobijene iz RAPD analize

	cT1	cT2	cT3	brZ1	brZ2	brZ3	kPT1	kPT2	kPT3	makT1	makT2	makT3
cT1	1											
cT2	0,52	1										
cT3	0,87	0,52	1									
brZ1	0,52	0,5	0,55	1								
brZ2	0,51	0,55	0,54	0,54	1							
brZ3	0,49	0,44	0,46	0,53	0,64	1						
kPT1	0,52	0,44	0,52	0,47	0,55	0,59	1					
kPT2	0,42	0,44	0,48	0,51	0,54	0,58	0,58	1				
kPT3	0,39	0,46	0,42	0,43	0,47	0,5	0,45	0,56	1			
makT1	0,47	0,48	0,56	0,54	0,55	0,49	0,51	0,62	0,49	1		
makT2	0,41	0,51	0,48	0,46	0,54	0,43	0,56	0,54	0,5	0,5	1	
makT3	0,4	0,45	0,39	0,52	0,38	0,49	0,47	0,5	0,43	0,42	0,36	1
Osm1	0,48	0,35	0,48	0,46	0,57	0,55	0,49	0,54	0,53	0,46	0,48	0,48
Osm2	0,5	0,46	0,53	0,64	0,7	0,64	0,53	0,6	0,54	0,53	0,53	0,44
Osm3	0,48	0,51	0,51	0,58	0,64	0,55	0,59	0,6	0,5	0,64	0,54	0,43
PT1	0,43	0,63	0,46	0,5	0,6	0,55	0,44	0,43	0,4	0,52	0,46	0,38
PT2	0,5	0,53	0,48	0,51	0,6	0,54	0,52	0,6	0,55	0,57	0,51	0,44
PT3	0,54	0,49	0,54	0,54	0,6	0,54	0,52	0,57	0,53	0,52	0,42	0,48
medT1	0,4	0,35	0,41	0,5	0,54	0,5	0,61	0,54	0,44	0,46	0,48	0,55
medT2	0,58	0,52	0,54	0,52	0,54	0,52	0,49	0,5	0,47	0,47	0,36	0,54
medT3	0,48	0,46	0,45	0,45	0,46	0,5	0,49	0,46	0,4	0,48	0,42	0,48
sT1	0,46	0,44	0,49	0,52	0,6	0,55	0,53	0,6	0,43	0,55	0,46	0,39
sT2	0,48	0,46	0,51	0,52	0,54	0,58	0,52	0,5	0,47	0,52	0,48	0,4
sT3	0,48	0,46	0,48	0,54	0,6	0,52	0,49	0,54	0,53	0,5	0,57	0,5
omZ1	0,4	0,41	0,43	0,32	0,44	0,45	0,44	0,35	0,43	0,43	0,5	0,33
omZ2	0,48	0,4	0,51	0,38	0,45	0,43	0,52	0,48	0,42	0,42	0,51	0,37
omZ3	0,48	0,43	0,51	0,49	0,54	0,43	0,49	0,5	0,45	0,47	0,45	0,46
rT1	0,45	0,43	0,45	0,58	0,5	0,52	0,46	0,6	0,47	0,54	0,51	0,52
rT2	0,5	0,45	0,5	0,51	0,6	0,48	0,54	0,53	0,43	0,48	0,53	0,42
rT3	0,41	0,36	0,48	0,38	0,42	0,43	0,49	0,48	0,44	0,49	0,63	0,32
dT1	0,36	0,44	0,38	0,42	0,46	0,47	0,42	0,46	0,48	0,45	0,46	0,36
dT2	0,46	0,5	0,49	0,44	0,43	0,36	0,47	0,43	0,39	0,49	0,6	0,35
dT3	0,47	0,45	0,47	0,43	0,53	0,48	0,42	0,5	0,44	0,53	0,53	0,36
mPZ1	0,4	0,38	0,4	0,4	0,46	0,42	0,42	0,38	0,48	0,39	0,49	0,38
mPZ2	0,45	0,43	0,46	0,44	0,52	0,47	0,44	0,43	0,48	0,46	0,52	0,37
mPZ3	0,46	0,5	0,46	0,39	0,49	0,47	0,44	0,43	0,54	0,49	0,49	0,34
kpZ1	0,52	0,44	0,61	0,5	0,52	0,47	0,5	0,49	0,4	0,55	0,46	0,43
kpZ2	0,41	0,45	0,44	0,51	0,5	0,45	0,45	0,5	0,44	0,46	0,44	0,44
kpZ3	0,42	0,49	0,45	0,52	0,6	0,54	0,46	0,45	0,47	0,53	0,48	0,4
PZ1	0,5	0,62	0,5	0,44	0,54	0,47	0,49	0,47	0,48	0,49	0,44	0,4
PZ2	0,48	0,56	0,51	0,42	0,52	0,51	0,53	0,51	0,49	0,47	0,42	0,39
PZ3	0,51	0,52	0,54	0,58	0,6	0,58	0,52	0,57	0,59	0,6	0,51	0,46
jZ1	0,48	0,42	0,51	0,4	0,52	0,5	0,51	0,52	0,42	0,49	0,46	0,49
jZ2	0,48	0,49	0,49	0,46	0,53	0,58	0,5	0,53	0,43	0,45	0,4	0,48
jZ3	0,48	0,49	0,49	0,44	0,53	0,52	0,49	0,54	0,47	0,52	0,42	0,49
srbZ1	0,4	0,44	0,43	0,42	0,52	0,47	0,47	0,46	0,54	0,41	0,52	0,43
srbZ2	0,45	0,4	0,51	0,46	0,5	0,455	0,49	0,54	0,53	0,56	0,61	0,46
srbZ3	0,46	0,43	0,46	0,39	0,46	0,47	0,47	0,62	0,45	0,47	0,45	0,5
tZ1	0,49	0,48	0,46	0,48	0,49	0,52	0,48	0,42	0,44	0,49	0,42	0,4
tZ2	0,54	0,48	0,58	0,46	0,51	0,54	0,59	0,5	0,44	0,44	0,49	0,52
tZ3	0,54	0,49	0,54	0,52	0,48	0,49	0,49	0,48	0,53	0,48	0,45	0,37
mT1	0,48	0,41	0,45	0,44	0,41	0,46	0,54	0,44	0,43	0,42	0,4	0,42
mT2	0,44	0,51	0,48	0,39	0,49	0,42	0,51	0,45	0,45	0,44	0,51	0,41
mT3	0,35	0,47	0,44	0,45	0,49	0,45	0,44	0,56	0,51	0,53	0,43	0,42
G1	0,51	0,49	0,59	0,5	0,52	0,55	0,45	0,56	0,56	0,61	0,51	0,37
G2	0,45	0,44	0,54	0,43	0,49	0,5	0,49	0,56	0,48	0,52	0,44	0,44
F1	0,53	0,51	0,53	0,59	0,53	0,6	0,57	0,59	0,49	0,63	0,5	0,49
F2	0,48	0,49	0,54	0,52	0,54	0,52	0,55	0,57	0,45	0,54	0,51	0,49
K1	0,47	0,41	0,5	0,4	0,53	0,45	0,51	0,47	0,4	0,42	0,5	0,43

K2	0.46	0.38	0.5	0.34	0.4	0.36	0.38	0.33	0.35	0.32	0.36	0.36
	Osm1	Osm2	Osm3	PT1	PT2	PT3	medT1	medT2	medT3	sT1	sT2	sT3
Osm1	1											
Osm2	0,58	1										
Osm3	0,6	0,61	1									
PT1	0,49	0,53	0,58	1								
PT2	0,5	0,55	0,6	0,49	1							
PT3	0,5	0,6	0,57	0,52	0,59	1						
medT1	0,49	0,5	0,6	0,48	0,5	0,55	1					
medT2	0,48	0,52	0,51	0,49	0,57	0,63	0,51	1				
medT3	0,54	0,55	0,54	0,54	0,55	0,43	0,5	0,52	1			
sT1	0,49	0,56	0,6	0,47	0,57	0,54	0,58	0,44	0,49	1		
sT2	0,45	0,52	0,6	0,55	0,48	0,48	0,5	0,448	0,43	0,54	1	
sT3	0,5	0,69	0,57	0,49	0,62	0,62	0,54	0,5	0,5	0,49	0,5	1
omZ1	0,4	0,46	0,43	0,42	0,41	0,38	0,36	0,4	0,47	0,34	0,47	0,47
omZ2	0,51	0,47	0,51	0,46	0,48	0,4	0,44	0,37	0,54	0,41	0,42	0,5
omZ3	0,54	0,55	0,54	0,58	0,48	0,54	0,5	0,48	0,5	0,49	0,57	0,54
rT1	0,48	0,61	0,57	0,46	0,54	0,5	0,47	0,48	0,49	0,44	0,54	0,57
rT2	0,53	0,57	0,56	0,48	0,56	0,59	0,53	0,56	0,47	0,48	0,5	0,66
rT3	0,45	0,47	0,48	0,4	0,45	0,34	0,43	0,36	0,4	0,36	0,45	0,48
dT1	0,52	0,5	0,58	0,53	0,46	0,49	0,46	0,43	0,54	0,5	0,49	0,52
dT2	0,4	0,46	0,46	0,41	0,4	0,36	0,43	0,48	0,49	0,37	0,43	0,46
dT3	0,53	0,56	0,59	0,5	0,5	0,47	0,46	0,42	0,55	0,53	0,47	0,53
mPZ1	0,52	0,5	0,46	0,42	0,4	0,41	0,37	0,4	0,44	0,38	0,41	0,49
mPZ2	0,49	0,6	0,49	0,47	0,4	0,46	0,42	0,43	0,4	0,47	0,46	0,58
mPZ3	0,59	0,53	0,59	0,47	0,49	0,52	0,42	0,43	0,46	0,44	0,46	0,58
kpZ1	0,52	0,53	0,52	0,47	0,46	0,49	0,47	0,52	0,44	0,42	0,46	0,49
kpZ2	0,56	0,52	0,47	0,5	0,5	0,53	0,49	0,44	0,47	0,43	0,39	0,5
kpZ3	0,5	0,5	0,54	0,55	0,5	0,45	0,48	0,45	0,46	0,52	0,54	0,54
PZ1	0,51	0,49	0,62	0,52	0,52	0,52	0,45	0,49	0,47	0,51	0,51	0,5
PZ2	0,59	0,53	0,59	0,53	0,47	0,53	0,41	0,53	0,45	0,49	0,49	0,51
PZ3	0,6	0,64	0,6	0,58	0,54	0,57	0,5	0,54	0,54	0,58	0,57	0,6
jZ1	0,68	0,5	0,49	0,47	0,45	0,46	0,52	0,52	0,57	0,43	0,45	0,5
jZ2	0,65	0,58	0,56	0,56	0,5	0,54	0,46	0,56	0,56	0,5	0,52	0,47
jZ3	0,69	0,54	0,58	0,53	0,42	0,48	0,47	0,51	0,49	0,49	0,48	0,49
srbZ1	0,48	0,48	0,46	0,44	0,49	0,52	0,48	0,449	0,41	0,39	0,49	0,58
srbZ2	0,54	0,52	0,5	0,52	0,48	0,43	0,5	0,45	0,48	0,44	0,57	0,54
srbZ3	0,55	0,48	0,52	0,44	0,62	0,55	0,48	0,49	0,49	0,47	0,49	0,55
tZ1	0,53	0,49	0,48	0,53	0,52	0,49	0,42	0,46	0,47	0,48	0,49	0,51
tZ2	0,49	0,52	0,5	0,52	0,52	0,51	0,52	0,51	0,52	0,53	0,55	0,51
tZ3	0,51	0,53	0,48	0,49	0,45	0,48	0,48	0,45	0,48	0,55	0,5	0,48
mT1	0,5	0,45	0,45	0,49	0,52	0,46	0,47	0,47	0,49	0,41	0,41	0,46
mT2	0,49	0,53	0,51	0,49	0,49	0,43	0,49	0,47	0,48	0,4	0,49	0,48
mT3	0,62	0,52	0,62	0,54	0,5	0,54	0,5	0,47	0,5	0,46	0,44	0,54
G1	0,48	0,62	0,54	0,5	0,5	0,54	0,45	0,48	0,42	0,5	0,57	0,58
G2	0,52	0,49	0,49	0,44	0,44	0,49	0,45	0,5	0,47	0,5	0,5	0,45
F1	0,53	0,62	0,56	0,54	0,43	0,47	0,47	0,53	0,6	0,448	0,56	0,5
F2	0,6	0,6	0,54	0,44	0,5	0,46	0,53	0,48	0,67	0,47	0,54	0,5
K1	0,53	0,54	0,44	0,5	0,47	0,47	0,48	0,5	0,47	0,38	0,47	0,53
K2	0,43	0,41	0,35	0,39	0,33	0,44	0,35	0,5	0,47	0,29	0,38	0,41

	omZ1	omZ2	omZ3	rT1	rT2	rT3	dT1	dT2	dT3	mPZ1	mPZ2	mPZ3
omZ1	1											
omZ2	0,47	1										
omZ3	0,47	0,54	1									
rT1	0,4	0,48	0,57	1								
rT2	0,39	0,47	0,53	0,63	1							
rT3	0,62	0,58	0,45	0,51	0,46	1						
dT1	0,45	0,52	0,44	0,43	0,45	0,43	1					
dT2	0,47	0,55	0,43	0,46	0,51	0,52	0,41	1				
dT3	0,46	0,53	0,53	0,5	0,49	0,53	0,59	0,45	1			
mPZ1	0,54	0,52	0,46	0,49	0,45	0,52	0,47	0,5	0,43	1		
mPZ2	0,44	0,49	0,55	0,52	0,54	0,49	0,41	0,4	0,54	0,53	1	
mPZ3	0,51	0,55	0,52	0,49	0,51	0,52	0,62	0,44	0,57	0,6	0,64	1
kpZ1	0,39	0,55	0,49	0,49	0,5	0,49	0,45	0,47	0,45	0,45	0,41	0,44
kpZ2	0,34	0,44	0,39	0,39	0,43	0,44	0,54	0,42	0,44	0,43	0,32	0,42
kpZ3	0,47	0,4	0,5	0,48	0,5	0,48	0,44	0,4	0,5	0,43	0,46	0,49
PZ1	0,58	0,54	0,52	0,45	0,47	0,47	0,5	0,42	0,58	0,46	0,57	0,6
PZ2	0,44	0,55	0,53	0,47	0,54	0,49	0,51	0,47	0,46	0,53	0,55	0,6
PZ3	0,47	0,54	0,57	0,54	0,53	0,51	0,55	0,49	0,59	0,46	0,59	0,62
jZ1	0,43	0,61	0,5	0,45	0,47	0,5	0,42	0,54	0,53	0,53	0,45	0,52
jZ2	0,53	0,46	0,65	0,49	0,49	0,48	0,54	0,41	0,5	0,47	0,5	0,56
jZ3	0,48	0,49	0,55	0,49	0,48	0,49	0,49	0,43	0,51	0,53	0,53	0,59
srbZ1	0,48	0,49	0,55	0,46	0,58	0,49	0,5	0,47	0,48	0,56	0,53	0,5
srbZ2	0,5	0,6	0,57	0,5	0,53	0,58	0,49	0,59	0,53	0,58	0,55	0,55
srbZ3	0,48	0,49	0,55	0,55	0,51	0,45	0,47	0,35	0,51	0,41	0,47	0,53
tZ1	0,36	0,45	0,56	0,43	0,45	0,39	0,44	0,35	0,47	0,38	0,51	0,5
tZ2	0,43	0,58	0,6	0,51	0,52	0,45	0,44	0,47	0,54	0,45	0,45	0,43
tZ3	0,4	0,45	0,48	0,39	0,44	0,39	0,52	0,46	0,47	0,43	0,52	0,59
mT1	0,36	0,47	0,45	0,39	0,43	0,38	0,38	0,37	0,4	0,35	0,44	0,4
mT2	0,43	0,51	0,53	0,47	0,47	0,46	0,39	0,45	0,48	0,51	0,5	0,46
mT3	0,39	0,49	0,5	0,44	0,52	0,43	0,56	0,38	0,49	0,42	0,42	0,51
G1	0,41	0,4	0,49	0,49	0,48	0,49	0,41	0,4	0,48	0,41	0,59	0,055
G2	0,49	0,47	0,56	0,41	0,45	0,45	0,39	0,42	0,52	0,41	0,44	0,39
F1	0,49	0,47	0,56	0,56	0,49	0,5	0,45	0,51	0,52	0,5	0,48	0,45
F2	0,44	0,54	0,57	0,57	0,5	0,51	0,46	0,52	0,53	0,46	0,43	0,46
K1	0,42	0,47	0,53	0,5	0,59	0,47	0,35	0,48	0,43	0,48	0,48	0,45
K2	0,52	0,43	0,38	0,34	0,42	0,39	0,48	0,48	0,4	0,45	0,35	0,44

	kpZ1	kpZ2	kpZ3	PZ1	PZ2	PZ3	jZ1	jZ2	jZ3	srbZ1	srbZ2	srbZ3
kpZ1	1											
kpZ2	0,57	1										
kpZ3	0,49	0,56	1									
PZ1	0,49	0,43	0,55	1								
PZ2	0,56	0,47	0,53	0,65	1							
PZ3	0,52	0,53	0,6	0,65	0,66	1						
jZ1	0,6	0,57	0,56	0,51	0,56	0,6	1					
jZ2	0,49	0,54	0,53	0,57	0,52	0,62	0,57	1				
jZ3	0,5	0,53	0,55	0,58	0,6	0,67	0,69	0,75	1			
srbZ1	0,53	0,54	0,55	0,53	0,54	0,55	0,5	0,53	0,5	1		
srbZ2	0,58	0,47	0,5	0,52	0,53	0,64	0,61	0,55	0,55	0,62	1	
srbZ3	0,47	0,48	0,46	0,61	0,48	0,55	0,51	0,64	0,53	0,53	0,52	1
tZ1	0,47	0,5	0,49	0,53	0,52	0,66	0,53	0,51	0,52	0,53	0,47	0,51
tZ2	0,51	0,42	0,51	0,51	0,53	0,6	0,52	0,49	0,46	0,57	0,57	0,53
tZ3	0,46	0,53	0,54	0,56	0,53	0,68	0,51	0,56	0,54	0,52	0,5	0,49
mT1	0,49	0,53	0,47	0,49	0,5	0,56	0,56	0,47	0,44	0,48	0,44	0,55
mT2	0,45	0,4	0,47	0,54	0,53	0,53	0,51	0,42	0,45	0,54	0,5	0,51
mT3	0,54	0,58	0,47	0,53	0,53	0,6	0,53	0,49	0,6	0,51	0,5	0,6
G1	0,53	0,42	0,49	0,51	0,52	0,66	0,47	0,48	0,48	0,41	0,58	0,51
G2	0,52	0,46	0,49	0,53	0,49	0,55	0,6	0,52	0,53	0,5	0,59	0,49
F1	0,54	0,49	0,47	0,51	0,49	0,62	0,54	0,58	0,6	0,52	0,59	0,48
F2	0,57	0,53	0,54	0,52	0,47	0,6	0,69	0,58	0,52	0,51	0,59	0,55
K1	0,5	0,49	0,44	0,44	0,49	0,5	0,51	0,5	0,51	0,51	0,56	0,51
K2	0,48	0,46	0,4	0,43	0,44	0,4	0,46	0,46	0,44	0,51	0,44	0,4

	tZ1	tZ2	tZ3	mT1	mT2	mT3	G1	G2	F1	F2	K1	K2
tZ1	1											
tZ2	0,6	1										
tZ3	0,67	0,52	1									
mT1	0,68	0,52	0,58	1								
mT2	0,54	0,62	0,48	0,54	1							
mT3	0,56	0,49	0,47	0,57	0,56	1						
G1	0,56	0,5	0,6	0,48	0,52	0,52	1					
G2	0,45	0,52	0,46	0,52	0,48	0,53	0,51	1				
F1	0,56	0,51	0,6	0,51	0,53	0,49	0,57	0,58	1			
F2	0,53	0,62	0,5	0,54	0,58	0,53	0,58	0,59	0,65	1		
K1	0,44	0,53	0,44	0,448	0,59	0,49	0,51	0,49	0,58	0,56	1	
K2	0,33	0,42	0,47	0,35	0,42	0,44	0,38	0,43	0,43	0,44	0,49	1

## PRILOG 2

Genetičke sličnosti po *Ne* i *Li*-u dobijene iz SSR analize



	cT1	cT2	cT3	brZ1	brZ2	brZ3	kPT1	kPT2	kPT3	makT1	makT2	makT3
cT1	1	1										
cT2	0,76	0,83	1									
cT3	0,93	0,21	0,37									
brZ1	0,47	0,73	0,9	1								
brZ2	0,81	0,62	0,76	0,48	1							
brZ3	0,73	0,71	0,63	0,14	0,78	1						
kPT1	0,48	0,46	0,54	0,18	0,68	0,47	1					
kPT2	0,44	0,53	0,52	0,61	0,63	0,44	0,66	1				
kPT3	0,45	0,62	0,57	0,65	0,49	0,63	0,7	0,48	1			
makT1	0,54	0,7	0,8	0,02	0,63	0,71	0,69	0,42	0,53	1		
makT2	0,8	0,61	0,75	0,55	0,89	0,65	0,64	0,57	0,56	0,66	1	
makT3	0,68	0,63	0,68	0,45	0,85	0,56	0,48	0,43	0,18	0,55	0,72	1
Osm1	0,77	0,6	0,74	0,51	0,46	0,4	0,62	0,51	0,6	0,47	0,62	0,36
Osm2	0,67	0,79	0,93	0,44	0,58	0,46	0,62	0,78	0,5	0,4	0,53	0,44
Osm3	0,92	0,6	0,7	0,42	0,82	0,74	0,56	0,49	0,37	0,62	0,69	0,7
PT1	0,64	0,7	0,72	0,19	0,55	0,65	0,64	0,71	0,61	0,54	0,46	0,37
PT2	0,7	0,86	0,81	0,16	0,81	0,74	0,77	0,57	0,65	0,83	0,82	0,59
PT3	0,8	0,64	0,74	0,2	0,71	0,82	0,53	0,35	0,41	0,68	0,59	0,6
medT1	0,68	0,67	0,81	0,44	0,59	0,52	0,56	0,79	0,45	0,28	0,49	0,5
medT2	0,78	0,71	0,85	0,3	0,82	0,84	0,55	0,51	0,52	0,65	0,75	0,61
medT3	0,79	0,61	0,66	0,4	0,47	0,77	0,65	0,51	0,42	0,67	0,82	0,76
sT1	0,66	0,53	0,61	0,56	0,71	0,46	0,48	0,7	0,16	0,42	0,76	0,71
sT2	0,57	0,87	0,89	0,28	0,68	0,68	0,44	0,46	0,47	0,6	0,69	0,43
sT3	0,87	0,57	0,56	0,15	0,77	0,71	0,72	0,5	0,61	0,7	0,74	0,56
omZ1	0,53	0,65	0,75	0,09	0,48	0,56	0,7	0,53	0,78	0,52	0,54	0,17
omZ2	0,73	0,7	0,72	0,43	0,53	0,47	0,63	0,48	0,56	0,34	0,58	0,31
omZ3	0,65	0,7	0,81	0,35	0,52	0,62	0,71	0,57	0,57	0,58	0,44	0,35
rT1	0,79	0,76	0,85	0,35	0,62	0,62	0,72	0,56	0,54	0,51	0,46	0,4
rT2	0,79	0,71	0,78	0,49	0,69	0,58	0,76	0,71	0,65	0,49	0,61	0,5
rT3	0,76	0,75	0,78	0,41	0,62	0,59	0,66	0,59	0,57	0,31	0,53	0,3
dT1	0,81	0,51	0,56	0,06	0,65	0,66	0,61	0,51	0,58	0,64	0,67	0,42
dT2	0,54	0,58	0,68	0,14	0,33	0,42	0,54	0,33	0,66	0,69	0,42	0,26
dT3	0,52	0,42	0,61	0,45	0,77	0,58	0,85	0,74	0,67	0,6	0,71	0,47
mPZ1	0,47	0,52	0,52	0,59	0,69	0,53	0,64	0,57	0,33	0,44	0,551	0,65
mPZ2	0,36	0,38	0,51	0,59	0,62	0,46	0,65	0,61	0,42	0,41	0,56	0,47
mPZ3	0,36	0,62	0,61	0,29	0,59	0,58	0,69	0,52	0,36	0,43	0,39	0,28
kpZ1	0,67	0,65	0,64	0,5	0,38	0,31	0,54	0,42	0,42	0,35	0,42	0,34
kpZ2	0,63	0,46	0,51	0,47	0,44	0,34	0,49	0,51	0,4	0,09	0,48	0,28
kpZ3	0,42	0,61	0,74	0,56	0,61	0,59	0,6	0,87	0,52	0,55	0,5	0,41
PZ1	0,6	0,41	0,51	0,49	0,68	0,51	0,73	0,74	0,48	0,38	0,57	0,57
PZ2	0,4	0,61	0,6	0,54	0,6	0,36	0,62	0,91	0,35	0,29	0,51	0,44
PZ3	0,49	0,5	0,47	0,32	0,68	0,49	0,86	0,7	0,68	0,64	0,64	0,49
jZ1	0,45	0,6	0,75	0,56	0,41	0,21	0,47	0,81	0,38	0,23	0,42	0,39
jZ2	0,76	0,61	0,71	0,53	0,63	0,52	0,14	0,61	0,26	0,23	0,55	0,58
jZ3	0,56	0,44	0,4	0,53	0,69	0,63	0,71	0,76	0,73	0,41	0,58	0,5
srbZ1	0,28	0,5	0,6	0,33	0,51	0,6	0,63	0,57	0,49	0,53	0,48	0,3
srbZ2	0,5	0,55	0,46	0,45	0,55	0,66	0,49	0,65	0,44	0,49	0,42	0,44
srbZ3	0,37	0,72	0,82	0,34	0,22	0,37	0,47	0,66	0,3	0,43	0,2	0,03
tZ1	0,71	0,5	0,54	0,27	0,65	0,49	0,76	0,59	0,59	0,4	0,55	0,5
tZ2	0,5	0,64	0,72	0,58	0,62	0,42	0,71	0,66	0,62	0,54	0,75	0,52
tZ3	0,61	0,38	0,45	0,18	0,53	0,6	0,66	0,53	0,55	0,44	0,47	0,39
mT1	0,47	0,68	0,85	0,61	0,53	0,29	0,62	0,84	0,41	0,34	0,63	0,42
mT2	0,86	0,65	0,69	0,53	0,7	0,55	0,6	0,53	0,6	0,25	0,65	0,56
mT3	0,53	0,81	0,91	0,64	0,79	0,5	0,81	0,74	0,59	0,48	0,71	0,64
G1	0,83	0,45	0,55	0,48	0,81	0,61	0,48	0,49	0,34	0,46	0,78	0,78
G2	0,66	0,79	0,94	0,74	0,64	0,49	0,69	0,71	0,54	0,46	0,72	0,49
F1	0,93	0,79	0,94	0,42	0,84	0,75	0,55	0,56	0,44	0,61	0,76	0,74
F2	0,93	0,68	0,68	0,41	0,83	0,74	0,54	0,54	0,4	0,59	0,74	0,78
K1	0,76	0,64	0,83	0,26	0,45	0,42	0,67	0,45	0,67	0,51	0,57	0,27

K2	0,86	0,38	0,5	0,56	0,66	0,6	0,6	0,56	0,52	0,37	0,55	0,51
	Osm1	Osm2	Osm3	PT1	PT2	PT3	medT1	medT2	medT3	sT1	sT2	sT3
Osm1	1											
Osm2	0,84	1										
Osm3	0,68	0,69	1									
PT1	0,68	0,85	0,66	1								
PT2	0,63	0,56	0,71	0,52	1							
PT3	0,55	0,57	0,82	0,72	0,62	1						
medT1	0,76	0,94	0,7	0,88	0,46	0,63	1					
medT2	0,57	0,6	0,8	0,52	0,77	0,7	0,6	1				
medT3	0,42	0,5	0,86	0,5	0,81	0,74	0,5	0,84	1			
sT1	0,38	0,6	0,66	0,58	0,6	0,52	0,62	0,6	0,72	1		
sT2	0,47	0,44	0,66	0,4	0,77	0,48	0,44	0,88	0,77	0,55	1	
sT3	0,76	0,68	0,89	0,72	0,85	0,79	0,67	0,81	0,79	0,64	0,74	1
omZ1	0,63	0,51	0,47	0,68	0,61	0,49	0,51	0,4	0,43	0,34	0,38	0,64
omZ2	0,86	0,77	0,71	0,74	0,51	0,62	0,78	0,62	0,53	0,41	0,53	0,76
omZ3	0,7	0,72	0,7	0,88	0,48	0,78	0,73	0,5	0,47	0,48	0,29	0,72
rT1	0,75	0,77	0,82	0,76	0,58	0,77	0,77	0,64	0,64	0,37	0,36	0,79
rT2	0,83	0,85	0,81	0,85	0,63	0,69	0,85	0,65	0,63	0,57	0,51	0,84
rT3	0,83	0,8	0,77	0,79	0,59	0,7	0,84	0,7	0,64	0,45	0,62	0,84
dT1	0,73	0,59	0,79	0,6	0,81	0,67	0,56	0,7	0,65	0,5	0,65	0,89
dT2	0,79	0,68	0,58	0,63	0,53	0,51	0,58	0,46	0,38	0,24	0,42	0,62
dT3	0,62	0,68	0,57	0,64	0,73	0,48	0,68	0,7	0,75	0,45	0,69	0,64
mPZ1	0,37	0,51	0,55	0,67	0,35	0,6	0,52	0,4	0,63	0,62	0,2	0,42
mPZ2	0,48	0,51	0,42	0,65	0,39	0,55	0,55	0,46	0,55	0,6	0,45	0,5
mPZ3	0,29	0,41	0,5	0,65	0,35	0,54	0,5	0,5	0,57	0,38	0,41	0,45
kpZ1	0,73	0,57	0,66	0,7	0,33	0,57	0,61	0,36	0,38	0,6	0,25	0,71
kpZ2	0,73	0,61	0,58	0,62	0,27	0,51	0,76	0,52	0,36	0,41	0,43	0,67
kpZ3	0,44	0,7	0,52	0,82	0,53	0,55	0,7	0,4	0,56	0,7	0,44	0,48
PZ1	0,71	0,77	0,66	0,63	0,51	0,53	0,76	0,64	0,57	0,44	0,43	0,61
PZ2	0,44	0,75	0,51	0,73	0,44	0,34	0,8	0,52	0,53	0,78	0,48	0,49
PZ3	0,62	0,64	0,57	0,68	0,77	0,46	0,63	0,59	0,68	0,6	0,6	0,72
jZ1	0,55	0,68	0,41	0,6	0,34	0,22	0,71	0,25	0,19	0,67	0,13	0,45
jZ2	0,4	0,6	0,7	0,61	0,27	0,58	0,7	0,5	0,49	0,74	0,25	0,58
jZ3	0,57	0,64	0,64	0,61	0,58	0,45	0,64	0,65	0,6	0,48	0,56	0,61
srbZ1	0,46	0,51	0,39	0,71	0,5	0,55	0,62	0,5	0,46	0,44	0,55	0,49
srbZ2	0,57	0,66	0,54	0,75	0,47	0,66	0,72	0,58	0,48	0,42	0,42	0,5
srbZ3	0,55	0,71	0,48	0,8	0,22	0,58	0,76	0,37	0,2	0,5	0,33	0,51
tZ1	0,77	0,78	0,76	0,8	0,56	0,65	0,78	0,58	0,62	0,5	0,41	0,8
tZ2	0,7	0,61	0,39	0,6	0,57	0,41	0,57	0,48	0,52	0,58	0,43	0,52
tZ3	0,68	0,7	0,62	0,86	0,4	0,74	0,76	0,54	0,49	0,33	0,39	0,7
mT1	0,6	0,78	0,46	0,73	0,48	0,33	0,79	0,47	0,49	0,72	0,51	0,46
mT2	0,82	0,77	0,77	0,74	0,45	0,66	0,79	0,54	0,63	0,48	0,26	0,71
mT3	0,63	0,7	0,66	0,65	0,66	0,55	0,72	0,63	0,77	0,63	0,68	0,65
G1	0,71	0,74	0,82	0,59	0,59	0,73	0,76	0,77	0,72	0,67	0,57	0,8
G2	0,76	0,62	0,59	0,56	0,64	0,44	0,63	0,62	0,63	0,61	0,58	0,6
F1	0,73	0,74	0,91	0,67	0,73	0,82	0,73	0,82	0,81	0,65	0,58	0,88
F2	0,71	0,72	0,92	0,68	0,72	0,82	0,74	0,81	0,8	0,65	0,6	0,88
K1	0,89	0,7	0,7	0,72	0,62	0,59	0,68	0,53	0,53	0,39	0,47	0,83
K2	0,88	0,79	0,83	0,76	0,53	0,71	0,8	0,62	0,64	0,49	0,36	0,77

	omZ1	omZ2	omZ3	rT1	rT2	rT3	dT1	dT2	dT3	mPZ1	mPZ2	mPZ3
omZ1	1											
omZ2	0,72	1										
omZ3	0,7	0,76	1									
rT1	0,63	0,83	0,86	1								
rT2	0,69	0,86	0,88	0,89	1							
rT3	0,63	0,91	0,79	0,86	0,92	1						
dT1	0,68	0,7	0,6	0,68	0,72	0,71	1					
dT2	0,58	0,72	0,6	0,64	0,67	0,62	0,41	1				
dT3	0,66	0,72	0,62	0,69	0,77	0,76	0,59	0,45	1			
mPZ1	0,46	0,47	0,78	0,61	0,64	0,51	0,47	0,5	0,43	1		
mPZ2	0,48	0,53	0,7	0,39	0,64	0,64	0,41	0,4	0,54	0,86	1	
mPZ3	0,53	0,55	0,69	0,53	0,58	0,63	0,62	0,44	0,57	0,76	0,79	1
kpZ1	0,67	0,76	0,81	0,7	0,78	0,72	0,45	0,47	0,45	0,65	0,66	0,43
kpZ2	0,57	0,87	0,67	0,63	0,77	0,85	0,54	0,42	0,44	0,36	0,63	0,54
kpZ3	0,56	0,42	0,71	0,51	0,67	0,55	0,44	0,4	0,5	0,75	0,77	0,65
PZ1	0,65	0,73	0,68	0,72	0,8	0,74	0,5	0,42	0,58	0,66	0,66	0,64
PZ2	0,51	0,57	0,61	0,56	0,68	0,62	0,51	0,47	0,46	0,64	0,65	0,58
PZ3	0,7	0,63	0,71	0,69	0,8	0,7	0,55	0,49	0,59	0,64	0,65	0,54
jZ1	0,58	0,38	0,53	0,4	0,66	0,44	0,42	0,54	0,53	0,44	0,52	0,14
jZ2	0,23	0,38	0,59	0,51	0,63	0,47	0,54	0,41	0,5	0,47	0,42	0,27
jZ3	0,63	0,62	0,66	0,67	0,8	0,66	0,49	0,43	0,51	0,63	0,62	0,51
srbZ1	0,61	0,64	0,75	0,48	0,62	0,66	0,5	0,47	0,48	0,66	0,79	0,77
srbZ2	0,66	0,65	0,8	0,62	0,71	0,68	0,49	0,59	0,53	0,74	0,75	0,67
srbZ3	0,51	0,89	0,83	0,63	0,66	0,62	0,47	0,35	0,51	0,54	0,59	0,58
tZ1	0,69	0,69	0,83	0,88	0,91	0,86	0,44	0,35	0,47	0,65	0,58	0,58
tZ2	0,71	0,81	0,61	0,45	0,65	0,59	0,44	0,47	0,54	0,69	0,82	0,59
tZ3	0,65	0,58	0,89	0,77	0,81	0,83	0,52	0,46	0,47	0,73	0,76	0,74
mT1	0,4	0,83	0,54	0,5	0,66	0,6	0,38	0,37	0,4	0,53	0,6	0,54
mT2	0,67	0,72	0,73	0,82	0,88	0,82	0,39	0,45	0,48	0,61	0,53	0,51
mT3	0,6	0,71	0,64	0,65	0,79	0,78	0,56	0,38	0,49	0,76	0,83	0,73
G1	0,35	0,74	0,62	0,65	0,77	0,73	0,41	0,4	0,48	0,55	0,61	0,32
G2	0,7	0,71	0,61	0,66	0,71	0,72	0,39	0,42	0,52	0,62	0,64	0,58
F1	0,44	0,7	0,71	0,82	0,82	0,77	0,45	0,51	0,52	0,55	0,45	0,31
F2	0,43	0,7	0,71	0,82	0,81	0,76	0,46	0,52	0,53	0,58	0,43	0,32
K1	0,72	0,81	0,72	0,79	0,85	0,83	0,35	0,48	0,43	0,35	0,42	0,26
K2	0,61	0,84	0,81	0,93	0,9	0,87	0,48	0,48	0,4	0,48	0,49	0,49

	kpZ1	kpZ2	kpZ3	PZ1	PZ2	PZ3	jZ1	jZ2	jZ3	srbZ1	srbZ2	srbZ3
kpZ1	1											
kpZ2	0,76	1										
kpZ3	0,55	0,42	1									
PZ1	0,53	0,7	0,56	1								
PZ2	0,54	0,57	0,83	0,72	1							
PZ3	0,63	0,49	0,69	0,62	0,76	1						
jZ1	0,66	0,55	0,7	0,66	0,74	0,53	1					
jZ2	0,58	0,55	0,6	0,45	0,56	0,23	0,73	1				
jZ3	0,56	0,62	0,72	0,78	0,69	0,71	0,65	0,5	1			
srbZ1	0,53	0,63	0,71	0,57	0,71	0,76	0,3	0,2	0,51	1		
srbZ2	0,6	0,62	0,71	0,82	0,7	0,64	0,59	0,49	0,62	0,82	1	
srbZ3	0,64	0,63	0,73	0,56	0,71	0,52	0,59	0,57	0,49	0,7	0,74	1
tZ1	0,74	0,75	0,57	0,81	0,65	0,76	0,44	0,42	0,76	0,6	0,68	0,63
tZ2	0,67	0,69	0,7	0,7	0,64	0,71	0,58	0,33	0,67	0,71	0,67	0,49
tZ3	0,71	0,78	0,64	0,76	0,57	0,61	0,35	0,44	0,64	0,76	0,8	0,75
mT1	0,44	0,5	0,79	0,58	0,88	0,67	0,62	0,51	0,56	0,64	0,5	0,65
mT2	0,72	0,74	0,53	0,74	0,5	0,59	0,55	0,65	0,7	0,4	0,62	0,45
mT3	0,56	0,66	0,75	0,77	0,77	0,83	0,5	0,35	0,79	0,75	0,65	0,51
G1	0,6	0,72	0,41	0,75	0,51	0,5	0,53	0,72	0,6	0,46	0,65	0,46
G2	0,67	0,66	0,62	0,74	0,77	0,77	0,6	0,38	0,65	0,71	0,68	0,47
F1	0,64	0,63	0,5	0,71	0,51	0,58	0,5	0,73	0,67	0,37	0,61	0,44
F2	0,64	0,63	0,49	0,7	0,51	0,57	0,48	0,73	0,65	0,37	0,61	0,45
K1	0,83	0,7	0,47	0,55	0,45	0,76	0,52	0,4	0,6	0,46	0,51	0,52
K2	0,77	0,7	0,55	0,72	0,58	0,66	0,52	0,63	0,68	0,47	0,66	0,57

	tZ1	tZ2	tZ3	mT1	mT2	mT3	G1	G2	F1	F2	K1	K2
tZ1	1											
tZ2	0,63	1										
tZ3	0,86	0,7	1									
mT1	0,53	0,65	0,52	1								
mT2	0,85	0,65	0,73	0,56	1							
mT3	0,75	0,8	0,7	0,78	0,7	1						
G1	0,73	0,62	0,7	0,44	0,76	0,65	1					
G2	0,64	0,78	0,55	0,79	0,69	0,8	0,53	1				
F1	0,78	0,54	0,69	0,43	0,79	0,6	0,91	0,59	1			
F2	0,78	0,51	0,71	0,44	0,77	0,61	0,9	0,58	0,99	1		
K1	0,8	0,62	0,69	0,55	0,81	0,61	0,6	0,72	0,7	0,7	1	
K2	0,86	0,53	0,73	0,56	0,92	0,67	0,72	0,75	0,84	0,84	0,83	1

## **BIOGRAFIJA**

Danijela Ristić rođena je 07.02.1976. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je 2005. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, sa prosečnom ocenom 8.59. Upisala je doktorske studije 2006/2007. školske godine na Biološkom fakultetu na studijskom programu Biologija, modul Genetika, radi sticanja zvanja doktor bioloških nauka. Ispite predviđene programom za doktorske studije je položila sa prosečnom ocenom 10. Od 2007. godine radi u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", prvo u svojstvu mlađeg istraživača, a od 2011, u svojstvu istraživača saradnika, u Laboratoriji za biotehnologiju. Bila učesnik na Projektu Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine pod nazivom: "Stvaranje i poboljšanje populacija i inbred linija kukuruza 2007. godine. Angažovana je (2011-2014) na projektu „Genetički resursi kukuruza kao izvor poboljšanog kvaliteta zrna i tolerantnosti prema suši“ Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ i projektu „Razvoj tehnoloških postupaka u šumarstvu u cilju realizacije optimalne šumovitosti“ Instituta za šumarstvo, koji su finansirani od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj. Bavi se i primenom molekularnih markera u ispitivanju genetičkog diverziteta populacija kukuruza iz banke gena Instituta za kukuruz, kao i u karakterizaciji linija i hibrida kukuruza i različitih vrsta šumskog drveća. Rezultate svojih istraživanja objavila je u 5 naučnih radova publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima, i u preko 20 naučnih saopštenja. Govori engleski jezik..

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Данијела Ристић

број уписа ГА 060077

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање генетичке варијабилности локалних популација кукуруза  
(*Zea mays* L.) молекуларним маркерима“

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 12.07.2013.

Данијела Ристић

**Прилог 2.**

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

Име и презиме аутора Данијела Ристић

Број уписа ГА 060077

Студијски програм Генетика

---

Наслов рада “Испитивање генетичке варијабилности локалних популација кукуруза (*Zea mays L.*) молекуларним маркерима“

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

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

Потписани \_\_\_\_\_

Данијела Ристић

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

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

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

У Београду, 12.07.2013.

**Потпис докторанда**

Данијела Ристић

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

“Испитивање генетичке варијабилности локалних популација кукуруза (*Zea mays* L.) молекуларним маркерима“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 12.07.2013.

Потпис докторанда

Зорица Ристић



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

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

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

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

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

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