

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Milan D. Stevanović

**UTICAJ TIPA CITOPLAZMATIČNE MUŠKE
STERILNOSTI I RESTORER GENA NA PRINOS
ZRNA I AGRONOMSKE OSOBINE INBRED
LINIJA KUKURUZA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Milan D. Stevanović

**INFLUENCE OF THE TYPE OF CYTOPLASMIC
MALE STERILITY AND RESTORER GENES ON
GRAIN YIELD AND AGRONOMIC TRAITS OF
MAIZE INBRED LINES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

POLJOPRIVREDNI FAKULTET, ZEMUN

MENTOR: dr Gordana Šurlan-Momirović, redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet, Zemun

ČLANOVI KOMISIJE: dr Tomislav Živanović, redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet, Zemun

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

dr Slaven Prodanović, redovni profesor,
Poljoprivredni fakultet, Zemun

dr Nenad Delić, viši naučni saradnik, “Institut za
kukuruz Zemun Polje“ Beograd-Zemu

Želeo bih da se zahvalim **Institutu za kukuruz „Zemun Polje“**, kući koja je omogućila izradu ove doktorske teze.

Hvala mentoru prof. **dr Gordani Šurlan-Momirović**, na dragocenim uputstvima i savetima tokom izrade teze. Takođe, veliku zahvalnost dugujem mentoru iz Instituta za kukuruz **dr Jeleni Vančetović** na značajnim sugestijama i uputstvima radi poboljšanja kvaliteta rada. Zahvalio bih se i **dr Snežani Mladenović-Drinić** na dragocenim savetima vezanim za ovo istraživanje.

Zahvaljujem se Grupi za Biotehnologiju, Instituta za kukuruz, pod rukovodstvom **dr Dragane Ignjatović-Micić** i **dr Kseniji Marković** koja mi je pomogla oko dela teze vezanog za genetičke markere.

Zahvaljujem se i Grupi za selekciju kasnih hibrida kukuruza na čelu sa **mr Goranom Stankovićem**, za pomoć i podršku u toku izvođenja oglada.

Posebno bi se zahvalio mojim mladim kolegama: **Jovanu Pavlovu, Zoranu Čamdžiji, Milošu Crevaru, Sofiji Božinović** i **Nikoli Grčiću** na nesebičnoj pomoći tokom izvođenja eksperimentalnog dela teze.

Najveću zahvalnost upućujem mojoj porodici, devojci Neveni i tetki Vesni na neizmernom strpljenju, razumevanju i podršci.

UTICAJ TIPA CITOPLAZMATIČNE MUŠKE STERILNOSTI I RESTORER GENA NA PRINOS ZRNA I AGRONOMSKE OSOBINE INBRED LINIJA KUKURUZA

Milan Stevanović

Rezime

U ovom radu analizirano je sedam inbred linija kukuruza različitog porekla i dužine vegetacionog perioda. Svaka linija je bila ispitivana u pet varijanti: originalna linija (N), CMS-C, RfC, CMS-S i RfS. Cilj rada je bio upoređivanje agronomskih karakteristika originalnih inbredovanih linija i njihovih CMS i Rf varijanti. Na osnovu poređenja između C i S-tipa linija cilj je bio da se utvrdi koji je od ta dva tipa sterilnosti pogodniji za semensku proizvodnju kukuruza.

Nakon dve eksperimentalne godine utvrđeno je da su svih sedam inbred linija pokazale zadovoljavajući stepen sterilnosti. Ni kod jednog tipa (C i S) nije došlo do probijanja sterilnosti (late break of sterility). Sterilne linije su dale viši prinos od svojih analoga. C-tip sterilnosti se pokazao kao nešto bolji za semensku proizvodnju jer je prinos zrna bio veći u poređenju sa S-tipom. Takođe se može reći da je poređenjem ova dva tipa sterilnosti ustanovljeno da je C-tip bio bolji od S-tipa za veći broj ispitivanih agronomskih osobina.

Na osnovu fitopatoloških analiza konstatovano je da je S-tip tolerantniji na gljivu *Fusarium verticillioides*, dok za linije C-tipa se može reći da su otpornije na napad gljive *Aspergillus flavus*.

Parametri stabilnosti po Eberhartu i Russellu govore da je na osnovu srednjih vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije za prinos zrna, S-tip nešto stabilniji od C-tipa u različitim uslovima spoljnjašnje sredine

Upotrebom izoelektričnog fokusiranja ustanovljeno je da je prevođenje skoro svih inbred linija urađeno dobro i do kraja. Razlike između originalnih i prevedenih linija su se javile samo kod sledećih linija ZPL2 RfC i ZPL5 RfC. Iz toga se može zaključiti da su razlike u agronomskim osobinama između originalnih i prevedenih linija nastale usled plejotropnog efekta CMS i/ili Rf gena, ili usled njihove interakcije sa spoljašnjom sredinom.

Ključne reči: citoplazmatična muška sterilnost, kukuruz, inbred linije, prinos zrna, UTLIEF

Naučna oblast: BIOTEHNIČKE NAUKE

Uža naučna oblast: RATARSTVO I POVRTARSTVO

UDK broj: 633.15:631.527:631.53.02 (043.3)

THE INFLUENCE OF THE TYPE OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY AND RESTORER GENES ON GRAIN YIELD AND AGRONOMIC TRAITS OF MAIZE INBRED LINES

Milan Stevanović

Summary

Seven maize inbred lines of different origin and different FAO maturity groups were analysed in the present study. Each inbred line was observed in five variants: original inbred (N), CMS-C, RfC, CMS-S and RfS. The objective of the study was to compare agronomic traits of original inbreds and their CMS and Rf variants. The C- and S-type inbreds were compared with the idea to evaluate which of these two types of sterility were more appropriate for seed production.

The two-year experimental results show that all seven maize inbred lines had satisfactory level of sterility. None of the type (C and S) showed the late break of sterility. The grain yield was higher in sterile inbreds than in their counterparts. C-type sterility was a bit more appropriate for seed production because grain yield was higher in comparison with the S-type. Furthermore, it can be underlined that the comparison of these two types of sterility showed that the C-type was better than S-type for the majority of observed agronomic traits.

According to phytopathological analyses, S-type inbreds are more tolerant to the fungus *Fusarium verticillioides*, while C-type inbreds are more resistant to the fungus *Aspergillus flavus*.

Based on stability parameters after Eberhart and Russell, i.e. on the mean squared deviation from regression for grain yield, the S-type is somewhat more stable than the C-type under various environmental conditions.

Performed isoelectric focusing showed that conversion of all inbreds lines had been done well and completely. The differences between original and converted inbreds were detected only in inbreds ZPL2 RfC and ZPL5 RfC. Hence, it can be concluded that the differences in agronomic traits between original and converted inbreds occurred due to pleiotropic effects of CMS and/or Rf gene, or due their interaction with the environment.

Key words: cytoplasmic male sterility, maize, inbred lines, grain yield, UTLIEF

Scientific field: BIOTECHNICAL SCIENCES

Especial topic: FIELD AND VEGETABLE CROPS

UDK broj: 633.15:631.527:631.53.02 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
3. RADNA HIPOTEZA.....	15
4. MATERIJAL I METODE RADA.....	16
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	24
5.1. Analiza varijanse i test najmanje značajne razlike za ispitivane osobine	
kukuruza.....	24
5.1.1 Analiza prinosa zrna kukuruza, procenta oklaska i procenta	
vlage zrna u momentu berbe.....	24
5.1.2. Analiza morfoloških osobina ispitivanih inbred linija kukuruza.....	28
5.1.3. Analiza komponenti prinosa ispitivanih inbred linija kukuruza.....	33
5.1.4. Analiza osobina semena za inbred linije kukuruza.....	36
5.1.5 Fitopatološka analiza semena kukuruza.....	46
5.1.6. Razlika datuma metličjenja i svilanja kukuruza (ASI).....	48
5.1.7. Probijanje sterilnosti kukuruza (late break of sterility).....	50
5.2. Parametri stabilnosti za prinos zrna kukuruza po Eberhart-u i Russell-u..	51
5.3 Najbolji tipovi linija kukuruza za ispitivane osobine.....	55
5.4 Primena genetičkih markera.....	57
6. DISKUSIJA.....	61
7. ZAKLJUČAK.....	71
8. LITERATURA.....	73

1. UVOD

Kukuruz predstavlja jednu od najznačajnijih ratarskih kultura kako u našoj zemlji tako i u svetu. Domestifikovan je pre oko 7.700 godina u Centralnoj Americi. Kukuruz je jedino žito koje vodi poreklo iz Amerike. Predstavlja biljnu vrstu koja je evoluciono najrazvijenija u celom biljnom carstvu. Smatra se da je nastao ukrštanjem divlje forme patuljastog kukuruza sa *Zea diploperennis* ili *Zea luxurians* koji spadaju u grupu biljaka koje se nazivaju teozinte. Predstavljao je značajan deo kulture Acteka i Maja. U periodu od 1250. do 1700. godine gajenje kukuruza se raširilo na gotovo celu Severnu i Južnu Ameriku. U Evropu je donet krajem XV veka posle Kolumbovih putovanja. Tridesetak godina je sejan u vrtovima Španije i drugim južnoevropskim zemljama kao dekorativna biljka. Tek 1525. godine u Španiji je posejan na većim površinama. Trend introdukcije kukuruza se brzo širio po celom svetu, naročito zbog njegove sposobnosti gajenja u različitim klimatskim uslovima. Do kraja XIX veka dominirali su spontano odabrani genotipovi ekološki prilagođeni određenim lokalitetima. Od prve polovine XX veka u svetu lokalne populacije rapidno nestaju sa polja i bivaju zamenjene savremenim sortama i hibridima. Ne zna se kada je tačno kukuruz donet u Srbiju. Postoji više teorija o tome. Po prvoj teoriji kukuruz su Španci doneli na Jonska ostrva oko 1572. godine a odatle je preko Soluna donešen u Srbiju. Po drugim istraživanjima kukuruz je na teritoriju Srbije donešen iz Italije preko Dalmacije. Veći privredni značaj u našoj zemlji kukuruz dobija početkom XIX veka.

Najveći proizvođači kukuruza su SAD (sa preko 330 miliona tona - 37% globalne proizvodnje), Kina (20%), Brazil (7%), Meksiko i Argentina (po 3%). Oko polovine proizvodnje kukuruza ostvaruje se u tri države: SAD, Kina i Brazil. Prema podacima FAO, tokom perioda 1996-2008, prosečan prinos kukuruza se povećao u svetu za 21%. U 2008. godini kukuruz se gajio na preko 161 milion hektara, sa globalnom proizvodnjom od 823 miliona tona i prosečnim prinosom od 5,1 t/ha. Po proizvodnji (u tonama) danas čini prvi usev u svetu (ispred pirinča i pšenice), a po površinama gajenja drugi (iza pšenice). Veliki evropski proizvođači su: Francuska, Rumunija, Mađarska i Srbija. Kukuruz je usev koji zauzima najveće površine u Srbiji. Prema podacima FAO iz 2007. godine kukuruz se gajio na 1.201.832 ha, a ukupan prinos je iznosio 3.904.825 tona. Po prosečnom prinosu od 3,25 t/ha, Srbija zaostaje za

prosečnim prinosom u svetu. Tako nizak prosečan prinos se može objasniti slabom upotrebom mineralnih đubriva i nedovoljno razvijenom agrotehnikom.

U zemljama u razvoju kukuruz se uglavnom koristi u ljudskoj ishrani, a u razvijenijim zemljama za ishranu stoke. Kukuruz ima veliku upotrebu i u hemijskoj industriji, medicini, farmakologiji i kao ukrasna biljka. U poslednje vreme prisutan je trend upotrebe kukuruza za proizvodnju bioloških goriva, kako bi se umanjio efekat staklene bašte koji nastaje usled sagorevanja fosilnih goriva i oslobađanja velike količine štetnih gasova.

Prva istraživanja vezana za citoplazmatičnu mušku sterilnost (Cytoplasmatic Male Sterility-CMS) izveo je Rhoads (1931). godine. Kod kukuruza CMS se koristi radi povećanja efikasnosti semenske proizvodnje i smanjenja troškova iste. Većina ispitivanja utvrdila je pozitivan efekat CMS-a na prinos zrna kukuruza, a naročito u nepovoljnim uslovima spoljnje sredine (manje hraniva i vode se troši, biljke ne formiraju polen, već asimilati idu za nalivanje klipa). Uočen je 5-10% veći prinos zrna muški sterilnih biljaka nego fertilnih.

Kod kukuruza su do sada poznata tri tipa CMS-a:

1. CMS-T
2. CMS-C
3. CMS-S

U komercijalnoj proizvodnji kod nas u upotrebi su druga dva navedena tipa. Prvi, CMS-T, se ne koristi zbog specifične osetljivosti na gljivicu *Helminthosporium maydis* rase T, koja je u SAD izazvala pravu epifitociju 70-ih godina prošlog veka (Duvick, 1972).

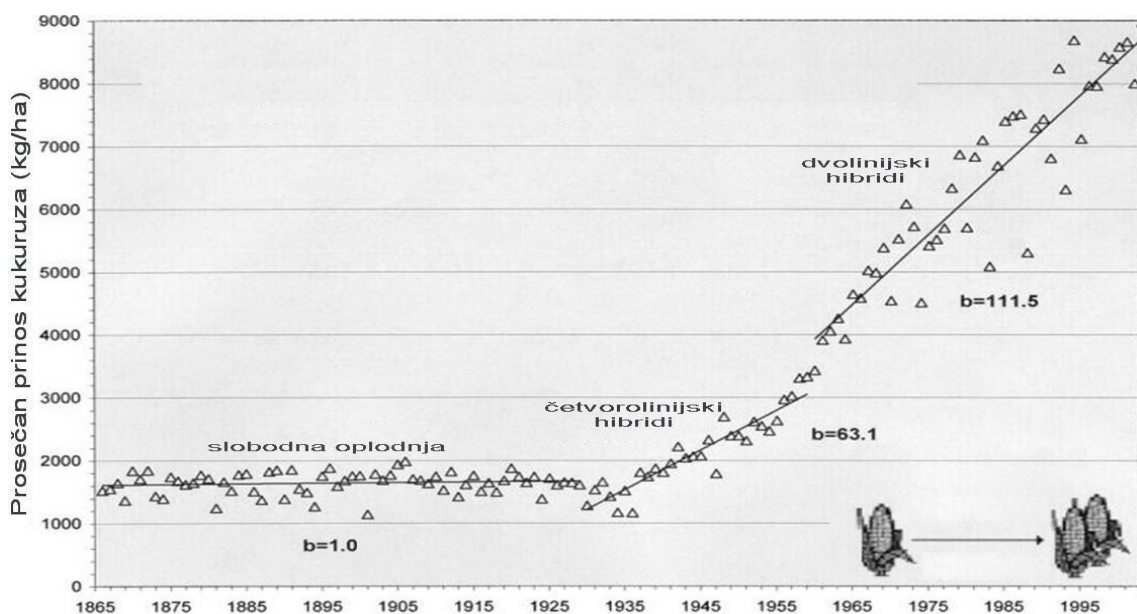
Ciljevi istraživanja u ovom radu su:

- Upoređivanje agronomskih karakteristika originalnih inbredovanih linija i njihovih CMS i Rf varijanti.
- Istraživanje genetičkih razlika između originalnih i inbredovanih linija i njihovih CMS i Rf varijanti korišćenjem izo-električnog fokusiranja (IEF).
- Poređenje CMS-C i CMS-S tipa sterilnosti u semenskoj proizvodnji kukuruza.
- Određivanje povoljnijeg CMS tipa za semensku proizvodnju u našim uslovima.

2. PREGLED LITERATURE

Revolucija u proizvodnji kukuruza počinje otkrićem heterozisa i gajenjem hibrida tridesetih godina prošlog veka u Sjedinjenim Američkim Državama. Kukuruz predstavlja prvu biljnu vrstu kod koje je heterozis iskorišćen za proizvodnju komercijalnih hibrida. Upotreba hibridnog semena kukuruza u Srbiji počinje 1953. godine i od tada se proizvodnja useva uvećala dva i po puta. Pre tog perioda gajene su slobodno-oprašujuće sorte. Najpoznatije su bile dobijene ukrštanjem američkih zubana sa našim lokalnim tvrduncima (Rumski zlatni zuban, Vukovarski zuban, Šidski zuban). Upotreba hibridne F1 generacije dovodi do povećanja prinosa za 25-30% u odnosu na slobodno oprašujuće sorte (Vančetović i sar., 2007).

Upotreba četvorolinijskih hibrida u Americi počinje tridesetih godina prošlog veka. U kukuruznom pojasu Sjedinjenih Američkih Država prosečan prinos u ovom periodu se povećavao iz godine u godinu u proseku za 63,1 kg/ha (Graf. 1). Sredinom šezdesetih godina prošlog veka počinje upotreba dvolinijskih hibrida, uz prosečno povećanje prinosa od 111,5 kg/ha (Troyer,2004).



Grafik 1. Prosečan prinos zrna kukuruza u SAD-u u periodu od 1865-2003. godine. Grafik je pruzet iz rada Troyer (2004).

Kukuruz je, zahvaljujući svojoj morfologiji, veoma pogodna biljka za proizvodnju hibridnog semena u velikim količinama, jer se hibridizacija može relativno lako ostvariti setvom roditeljskih komponenti u neizmeničnim redovima i zakidanjem muških cvasti (metlica) na majčinskim biljkama, neposredno po njihovom izbijanju, a pre prašenja. Na ovaj način se postiže da u polju cirkuliše samo polen muškog (nezakinutog) roditelja, pa je seme proizvedeno na majčinskim (zakinutim) biljkama hibridno (Sl. 1).



Slika 1. Semenska proizvodnja kukuruza.

U procesu proizvodnje hibridnog semena kukuruza najveći posao predstavlja zakidanje muških cvasti (metlica) na majčinskim biljkama. Od ukupnog ručnog rada koji se potroši u semenskoj proizvodnji na zakidanje metlica odlazi 43% (Airy, 1950). Proces zakidanja metlica znatno otežava i poskupljuje semensku proizvodnju kukuruza. Neophodno je angažovanje velikog broja sezonske radne snage u periodu od 10-30 dana

kako bi se taj posao dobro i na vreme obavio. Često problem predstavljaju loši meteorološki uslovi (kiša). Sve to je znatno poskupljivalo proces proizvodnje hibridnog semena. Sa druge strane, ukoliko metlice ne bi na vreme bile uklonjene dolazilo bi do samooplodnje majčinskih biljaka, što bi smanjilo procenat hibridizacije semenskog useva. Drugi razlog za rešavanje problema zakidanja metlica bio je zasnovan na drugim istraživanjima. Watson (1893) je radio na ispitivanju povećanja prinosa usled zakidanja metlica i došao do zaključka da se prinos uvećavao za 20-50 % pri nasilnom uklanjanju metlice. Ovu pojavu objašnjavao je time što biljka nije trošila energiju za obrazovanje polenovih zrna, već je ona mogla da se usmeri na povećanje rodosti klipa. Poehlman i Sleper (1995) su ustanovili da jedna metlica na normalnoj biljci može da proizvede 25 miliona polenovih zrna, ili u proseku 25.000 po svakoj svilki na klipu. Po drugim istraživanjima ove brojke su još i veće. Weingartner (2002) je utvrdio da jedna biljka može proizvesti od 14-50 miliona polenovih zrna, što bi iznosilo minimum 100.000 polenovih zrna po jednom semenu na klipu. Sve ovo nam govori da se velika količina energije troši za proizvodnju polena i da bi ta energija mogla da se iskoristi za povećanje prinosa zrna. Iz tog razloga se krenulo u rešavanje problema zakidanja metlica na druge načine.

Jedna od ideja bila je primena mašina za mehaničko uklanjanje metlica. Međutim, došlo se do zaključka da su mehanički sekači metlica neupotrebljivi pri nepovoljnijim vremenskim uslovima i ne rešavaju problem zakidanja metlica na zapercima i biljkama koje su zaostale u porastu. Iz tih razloga mehanički sekači metlica se retko koriste u praksi. Umesto njih najčešće se koriste pokretne platforme koje nose radnike, pa ovakav način zakidanja metlica u stvari predstavlja ručni rad (Huey, 1971).

Smatralo se da upotreba hemijskih sredstava (gametocida) može biti efikasno sredstvo za izazivanje muške sterilnosti u proizvodnji hibridnog semena kukuruza. Međutim i ovaj sistem je imao niz nedostataka, jer se gametocidima nije potpuno onesposobljavao polen. Uz to, dolazi i do oštećenja tučka i plodnika, a time i do delimične sterilnosti ženskih cvetova, što je prouzrokovalo i smanjenje prinosa. Usled toga biljke su zaostajale u rastu i period vegetacije je bio duži. Zbog svega navedenog brzo je napuštena ideja o hemijskom izazivanju muške sterilnosti.

Do sada najviše korišćen metod za izazivanje muške sterilnosti kod biljaka jeste upotreba citoplazmatične muške sterilnosti (CMS). CMS je do sad opisana kod više od 150 biljnih vrsta (Laser i Lersten, 1972), kao i kod mnogih ratarskih biljaka kao što su: repa, šargarepa, kukuruz, luk, pirinač, sirak, suncokret i pšenica.

Kod kukuruza genotip koji je ispoljavao mušku sterilnost otkriven je još davne 1931. godine u populaciji kukuruza iz Perua. Rhodes (1933) je otkrio da je ovaj tip sterilnosti uslovljen faktorima citoplazme, tj. da se materinski nasleđuje. Međutim, taj tip je kasnije izgubljen. Mangelsdorf i Rogers 1944. godine pronalaze novi tip citoplazmatične muške sterilnosti u Teksaskoj sorti *Golden june*, tako da je 1952. godine ustanovljen T-tip sterilnosti (CMS-T), poznat kao Teksaski tip. Mangelsdorf-ov i Rogers-ov mentor Jones (1957) otkriva još jedan tip citoplazmatične muške sterilnosti koji naziva CMS-S ili USDA-tip.

Kasnijim ispitivanjima ovih tipova CMS-a ustanovljeno je postojanje nuklearnih gena koji utiču na supresiju sterilnosti. Ti geni su označeni kao restorer geni (Rf geni). U okviru restorer sistema utvrđeno je da postoji veći broj restorer gena i u nekim sistemima jedan ili dva glavna gena dovode do potpunog povraćaja fertilitnosti, dok u drugim potpuni povraćaj fertilitnosti zavisi od većeg broja minor gena od kojih svaki ima mali efekat (Schnable i Wise, 1998; Chase, 2007). Takođe je ustanovljeno da geni koji izazivaju povraćaj fertilitnosti kod T-tipa to isto ne čine kod S-tipa i obrnuto.

Biljke koje imaju citoplazmu T-tipa sintetišu polipeptid koji dovodi do sterilnosti metlice (Forde i sar., 1978). Utvrđeno je da povraćaj fertilitnosti kod T-tipa CMS-a izaziva gen Rf-1 (Rogers, 1952; Rogers i Edvardson, 1952). Ovaj gen je lociran na trećem hromozomu kukuruza. Duvick (1956) je pokazao da su za povraćaj fertilitnosti kod CMS-T odgovorna dva dominantno-recesivna gena, Rf-1 i Rf-2, koji deluju komplementarno, tako da je prisustvo oba gena u dominantnom obliku neophodno za potpuni povraćaj fertilitnosti (Newton, 1988). Rf-1 može biti zamenjen sa dva druga restorer gena, Rf-8 ili Rf*, koji posreduju u formiranju istog mitohondrijalnog transkripta kao i Rf-1 (Dill i sar., 1997; Wise i sar., 1999). Utvrđeno je da je Rf-2, koji je lociran na hromozomu 9, gotovo univerzalno prisutan u skoro svim linijama kukuruza, što nije slučaj sa Rf-1 genom, i pokazano je da većina linija nikada nije imala T-citoplazmu. Ovo otkriće ukazuje na to da je gen Rf-2 očuvan tokom evolucije i da

mora imati značajnu funkciju nezavisno od uloge u povraćaju fertilitnosti (Schnable i Wise, 1998). Wise i sar. (1999) su pronašli da gen Rf-2 kodira protein koji je veoma sličan mitohondrijalnoj aldehid dehidrogenazi.

Jones (1950) je ustanovio da je za povraćaj fertilitnosti kod CMS-S tipa zadužen dominantni alel gena Rf-3. U kasnijim istraživanjima otkriveno je postojanje još jednog termo-osetljivog dominantnog alela Rf-9 koji utiče na obnavljanje fertilitnosti kod S-tipa (Gabay-Laughnan i sar., 2009).

Buchert (1961) je otkrio glavnu razliku u mehanizmu povraćaja fertilitnosti između CMS-T i CMS-S tipa. Kod CMS-T tipa ono je sporofitno, a kod CMS-S tipa gametofitno. Sporofitni restoreri su aktivni u sporofitnom tkivu, odnosno pre mejoze, dok su gametofitni restoreri aktivni nakon mejoze u mikrosporama ili polenovim zrnima. Ove razlike dovode do veoma različitog načina obrazovanja polenovih zrna. Naime, diploidna biljka koja ima CMS citoplazmu i heterozigot je za restorer gen (RF/rf) davaće dve vrste polenovih zrna: RF i rf. U slučaju sporofitnog restorer sistema oba polenova zrna će biti funkcionalna, a u slučaju gametofitnog sistema samo polen RF će biti vijabilan.

Ova dva tipa sterilnosti imaju svoje i prednosti i mane. Kod CMS-S tipa javlja se takozvana reverzija muški sterilnih u muški fertile biljke (Gabay-Laughnan i Laughnan, 1983), što može predstavljati ozbiljan problem u semenskoj proizvodnji. Ova pojava najviše zavisi od genotipa majke. Pokazano je da teksaški tip citoplazmatične muške sterilnosti pokazuje niz prednosti u odnosu na CMS-S tip, superiorniji je u pogledu prinosa zrna i tolerantniji na stresne uslove gajenja, posebno u uslovima suše, te da je pogodniji za primenu u praksi (Duvick, 1958; Chinwuba i sar., 1961). Rezultat svega toga bilo je uvođenje T-tipa CMS-a u proizvodnju hibridnog semena kukuruza sredinom pedesetih godina prošlog veka u SAD (Duvick, 1959). Oko 90% proizvodnje 1965. godine u Sjedinjenim Američkim Državama baziralo se na citoplazmatičnoj muškoj sterilnosti T-tipa. U to vreme smatralo se da je T-tip sterilnosti savršen i da ne postoji nikakva opasnost zbog smanjenja genetičke divergentnosti usled korišćenja uniformne citoplazme u proizvodnji hibridnog semena. Rezultati istraživanja Merkad-a i Lantican-a (1961) su ostali nezapaženi. Oni su ispitivali nekoliko CMS-T linija i utvrdili da linije koje su ispitivane na Filipinima pokazuju izuzetnu netolerantnost na gljivu

Helmithosporium maydis koja je izazivač sive pegavosti lista kukuruza. Ovi rezultati su pripisani specifičnim klimatskim uslovima na Filipinima. Shielfe i sar. (1969) su primetili da genotipovi sa CMS-T tipom citoplazme pokazuju povećanu osetljivost na lisnu pegavost koju izaziva *Philosticta maydis*. Hooker (1970) objavljuje rad u kome je potvrđena osetljivost genotipova koji su nosili T-tip sterilnosti, pri čemu piše: „Najveći deo površina najvrednije američke biljne kulture je sada uniformno osetljiv i izložen patogenu sposobnom da dostigne razmere epifitocije“. Godine 1971. ova predviđanja se ostvaruju. *Helmithosporium maydis* rase „T“ se širio od Floride prema severu kontinenta nanoseći veliku štetu farmerima i privredi Sjedinjenih Američkih Država. U toj godini prinos je smanjen za 50%, a šteta se procenila na tadašnjih 1,5 milijardi dolara. Smatra se da bi posledice bile još veće, ali je ta godina bila prilično nepovoljna za razvoj ovog patogena.

Gubici koji su nastali rezultirali su odbacivanjem T-tipa citoplazme u proizvodnji semenskog kukuruza i prelazak na korišćenje normalne (N) citoplazme, što je problem zakidanja metlica vratilo na početak. Jedno od rešenja ovog problema bilo je pronalaženje novog tipa CMS-a. Tako je Beckett (1971) uspeo da pronade treći tip CMS-a, koji je označen kao CMS-3 ili CMS-C tip. Daljim analizama ovog tipa sterilnosti utvrđeno je da je za restauraciju fertilitnosti neophodan bar po jedan dominantni restorer gen Rf-4 i Rf-5, koji deluju komplementarno (Josephson i Morgan, 1978). Mehanizam povraćaja fertilitnosti kod ovog tipa CMS-a je sporofitan. Gracen i sar. (1979) dolaze do rezultata koji su u suprotnosti sa rezultatima Josephson-a i Morgan-a. Oni zaključuju da na povraćaj fertilitnosti kod CMS-C tipa deluje samo jedan restorer gen Rf-4 sa dominantno-recesivnim nasleđivanjem. Vidaković (1988) dokazuje postojanje bar još dva gena, Rf-5 i Rf-6, koji zajedno sa genom Rf-4 deluju komplementarno, tako da je potpuni povraćaj fertilitnosti jedino moguć uz prisustvo sva tri dominantna gena. Kasnije se došlo do saznanja da postoji i gen inhibitor Rf-I za gen Rf-5 koji je lociran na hromozomu 7 (Hu i sar., 2006), tako da povraćaj fertilitnosti zavisi od dva dominantna gena, Rf-4 i Rf-5. Rf-4 vrši povraćaj fertilitnosti kod svih CMS-C linija, dok gen Rf-5 vrši supresiju sterilnosti kod linija koje ne poseduju gen inhibitor.

Što se tiče CMS-C tipa, problem je što postoji veliki broj linija koje su prirodni restoreri, pa je ugrađivanje non-restorer gena i njihovo preobraćanje u sterilne verzije (ukoliko se ove linije koriste kao majke) veoma složen proces.

Istraživanja Duvick-a (1972), Cochran-a (1975) i Josephson-a i Morgan-a (1978) pokazala su da je CMS-C tip pogodniji za proizvodnju hibridnog semena od CMS-S tipa, a manje pogodan od CMS-T tipa.

Wych (1988) je došao do zaključka da se 66% hibridnog semena u SAD proizvodilo upotrebom normalnog tipa germplazme, dok se 22% proizvodilo na CMS-C osnovi, a 12% na CMS-S osnovi. Konstantovano je da se proizvodnja hibridnog semena kukuruza na CMS-C i CMS-S osnovi stalno povećava. Ovo je trend i u našoj zemlji.

Probijanje muške sterilnosti (tzv. late break of sterility) predstavlja pojavu antera oko 7 dana posle svilanja sterilne majke, pa čak i pojavu delimično funkcionalnog polena. Ona se javlja kod oba tipa sterilnosti (CMS-C i CMS-S), i zavisi od genotipa majke i faktora spoljašnje sredine (kvantitativna osobina). Duvick (1972), Cochran (1975), Trifunović (1975). Na probijanje utiču i nuklearni geni, što se može videti iz primera ZP linije S-61 CMS-C kod koje je eliminacijom jednog gena dobijena verzija iste linije koja je apsolutno sterilna u svim uslovima ispitivanja.

Veoma bitno kod preobraćanja linija na CMS i Rf verzije jeste da se dobiju linije koje će imati identične, ili bar ne lošije, agronomске karakteristike od originalnih linija. Ovo je bitno kako hibrid proizveden na muški sterilnoj osnovi ne bi bio lošiji od originalnog hibrida, pošto bi onda ušteda u semenskoj proizvodnji bila kontraproduktivna.

Prevođenje linije A (majke) i linije B (oca) na sistem semenske proizvodnje na sterilnoj osnovi po modifikovanoj šemi *Eckhardt-a* (Vančetović i sar., 2006) vrši se serijom povratnih ukrštanja, uz korišćenje srodne linije (jedna za liniju A, a druga za liniju B), tzv. univerzalnog testera, kao izvora. Po svojoj genetičkoj konstituciji univerzalni tester predstavlja *cms-Rf/rf*, tj. u svojoj citoplazmi nosi gene za citoplazmatičnu mušku sterilnost, a u jedru je heterozigotan za Rf gene. Linije A i B se sa svojim univerzalnim testerima ukrštaju (C-cross) u prvoj generaciji kao očevi (univerzalni tester je majka). Iz ovog ukrštanja postoje dva moguća potomstva:

1. 100% fertilno potomstvo, što znači da su linije A i/ili B prirodni restoreri (Rf/Rf) za dati tip CMS-a;

2. Potomstvo segregira, odnosno cepa se na sterilne i fertile biljke, što znači da su linije A i/ili B prirodni nonrestoreri (rf/rf).

Kod prvog slučaja treba biti oprezan kada se vrši prevođenje na CMS-C osnovu zato što se može desiti da data linija ipak nije restorer, jer na ovu osobinu utiču 3 komplementarna gena (Vidaković, 1988). Iz tog razloga se radi bar jedno povratno ukrštanje. Ukoliko se ustanovi da je i ovo povratno ukrštanje fertilno, linija je restorer, a ukoliko potomstvo segregira ta linija predstavlja prirodni nonrestorer.

Ako je linija A (linija majke) prirodni restorer moguće je njeno dalje prevođenje u nonrestorer verziju, ali zbog velikog obima selekcionog rada ono nije preporučljivo, te se ovakve kombinacije uglavnom ne upotrebljavaju. Sa druge strane, ukoliko je linija A prirodni nonrestorer, prelazi se na njeno dalje prevođenje. Ono se vrši putem povratnih ukrštanja sa 100% sterilnim potomstvom, sve dok se u potpunosti ne povрати fenotip (i genotip) linije A. Smatra se da je 5-6 povratnih ukrštanja dovoljno za ovu svrhu.

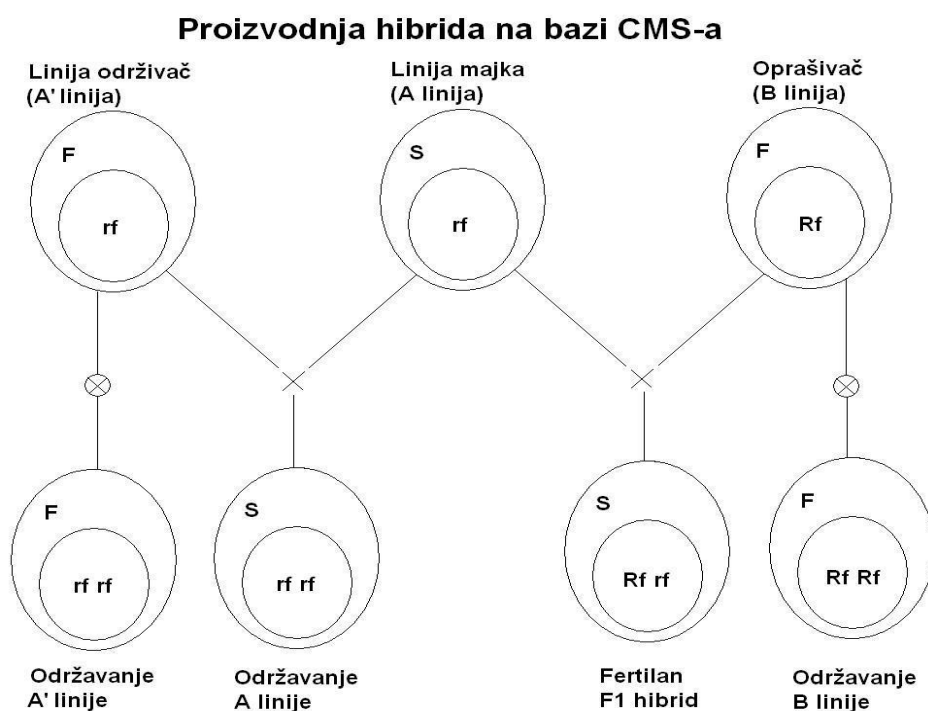
Ukoliko se desi da je linija B prirodni restorer (linija oca), tada nije potrebno nikakvo dalje prevođenje. Međutim, ukoliko je linija B prirodni nonrestorer prelazi se na njeno povratno ukrštanje sa fertilnim biljkama u segregirajućim potomstvima. Posle 5-6 povratnih ukrštanja vrši se samooplodnja fertilnih biljaka u potomstvu. Prva samooplodnja se cepa u odnosu 3:1 fertilnih:sterilnih biljaka, odnosno u jedru se formiraju tri tipa genotipova: 1Rf/Rf (ono što se traži): 2Rf/rf (fertilan heterozigot, nepoželjno): 1rf/rf (sterilne biljke). Fenotipski, čak i kod CMS-S tipa, Rf/Rf i Rf/rf biljke se teško razlikuju, pa se vrši još jedna samooplodnja, i potomstva u sledećoj generaciji seju klip na red. 100% fertilna potomstva predstavljaju traženi genotip Rf/Rf, i time je prevođenje linije B završeno.

Za svaku prevedenu hibridnu kombinaciju neophodno je izvršiti proveru povraćaja fertilnosti (ukrštanjem linija A CMS x B Rf/Rf), kao i stabilnosti sterilnosti linije A CMS, po mogućstvu u većem broju spoljašnjih sredina (probijanje sterilnosti je kvantitativna osobina, koja zavisi od dejstva velikog broja minor gena i njihovog međudejstva sa faktorima spoljašnje sredine).

Osnovna razlika između prevođenja linija na CMS i Rf/Rf varijante je ta da što se tzv. prevođenje na CMS nikada ne završava. Naime, svako kasnije umnožavanje ovakvog osnovnog semena je ujedno i novo povratno ukrštanje. S druge strane, pri prevođenju na Rf varijante, u jednom trenutku se prekida serija povratnih ukrštanja i vrši samooplodnja, što samim tim zaustavlja „povraćaj“ originalnog genotipa.

Proizvodnja hibridnog semena kukuruza baziranog na CMS-u zasniva se na ukrštanju biljkaka koje su citoplazmatično muški sterilne (majke) sa biljkama koje su muški fertile (očevi) i nose restorer (Rf) dominantne gene (Graf. 2).

U svetu se danas dosta koristi prevođenje putem marker asistiranе selekcije (MAS), pri čemu se posle 2-3 povratna ukrštanja radi DNK analiza pojedinačnih biljaka u segregirajućim potomstvima (Babu i sar., 2004). Biljke koje sadrže više od 90% genoma originalnog roditelja koriste se za samooplodnju (Rf geni), odnosno za komercijalnu proizvodnju (CMS). Tako se dobijaju skoro potpuno izogene linije (NIL – near isogenic lines) pogodne za semensku proizvodnju. Kod nas je ovaj sistem još uvek u eksperimentalnoj fazi.



Grafik 2. Šematski prikaz primene CMS-a u proizvodnji osnovnog i komercijalnog semena u Institutu za kukuruz u Zemun Polju.

Legenda:

S - označava sterilnu citoplazmu

F – označava fertilnu citoplazmu koja se ne prenosi preko oca na potomstvo

Rf – predstavlja simbol za gene koji služe za restauraciju muške fertilnosti

rf – je oznaka za gene koji ne vrše povraćaj muške fertilnosti (tzv. održivači – maintainer-i CMS-a)

x – simbol koji označava ukrštanje

⊗ - znak za samooplodnju

Za pojavu citoplazmatične muške sterilnosti zaduženi su plazmageni, locirani na mitohondrijama, koji se prenose jedino preko jajne ćelije, dok otac preko polena vrši prenošenje samo jedra i ne utiče na pojavu CMS-a. Da bi proizveli hibridno seme na bazi CMS-a neophodno je stvoriti liniju majke (linija A) koja će biti nosilac citoplazmatične muške sterilnosti. Zatim tu liniju treba održavati ukrštanjem sa njenim fertilnim analogom (linija A'). Takođe, u liniju oprašivača (linija B) moramo uneti Rf gen(e) koji služi za povraćaj fertilnosti. Ovoj liniji ćemo povratiti prvobitnu germplazmu povratnim ukrštanjima, nakon čega ćemo je održavati samooplodnjom. Sve ovo predstavlja proces prevođenja osnovnog semena na sistem CMS-a, što je u predhodnom tekstu objašnjeno. Za dobijanje jednostrukih komercijalnih hibrida koji su fertilni neophodno je ukrštanje CMS linije A i linije oprašivača (linija B) koja u sebi nosi Rf gen za restauraciju fertilnosti.

Epidemija gljive *helmitosporium maydis* sedamdesetih godina prošlog veka koja je nastala usled primene T-tipa citoplazme nas je navela da više vodimo računa o zdravstvenom stanju semena. Fitopatološke analize semena su veoma značajne iz razloga što se primenom CMS-a umnogome uniformiše citoplazma kako u semenskoj, tako i u merkantilnoj proizvodnji. Zbog lošeg iskustva sa CMS-T tipom mora se obratiti pažnja na osetljivost preostala dva tipa sterilnosti na razne patogene među kojima su i različite vrste gljiva. Neke od njih su potencijalni proizvođači mikotoksina i njihovo

prisustvo je nepoželjno zbog smanjenja bezbednosti hrane za ljude i životinje (Lević i sar., 2012)

Veoma bitno kada je semenska proizvodnja u pitanju jestu parametri kvaliteta semena, kao što je pojava primarnog korena i klijavost. Ispitivanje klijavosti semena na različitim temperaturnim režimima istraživali su mnogi naučnici u našoj zemlji (Dačić i sar. 1997., Sabovljević i sar., 1997). Danas se ispitivanje klijavosti semena radi po ISTA (International Seed Testing Association) standardima.

Zbog kvaliteta semenske proizvodnje neophodno je utvrditi da li je prevođenje linija urađeno kvalitetno i do kraja. Postoji nekoliko genetičkih i molekularnih metoda kojima to možemo utvrditi. Marker koji se u ove svrhe mogu koristiti mogu biti proteini ili DNK sekvence. Jedna od metoda koja podrazumeva analizu proteina u semenu je izo-električno fokusiranje (IEF). Primenom ove metode se utvrđuje genetička čistoća / homogenost genotipova kukuruza na osnovu elektroforetskog razdvajanja proteina rastvorljivih u alkoholu (zeini) ili vodi (albumini). IEF metoda se zasniva na činjenici da su proteini kada dostignu svoju izoelektričnu tačku stabilni. Ova metoda podrazumeva elektroforezu proteina u gradijentu pH i s obzirom da različiti proteini imaju različito neto naelektrisanje u odgovarajućim pH uslovima, pozitivni proteini će se kretati ka katodi, a negativni ka anodi, sve dok ne dostignu svoju izoelektričnu tačku, gde će se zaustaviti (Westermeier, 2001).

3. RADNA HIPOTEZA

Linije ispitivane u ovom istraživanju su gotovo sve Lancaster osnove, veoma tolerantne na sušu. One se u proizvodnji hibridnog semena najčešće koriste kao očevi, ali zbog izražene tolerancije prema suši i relativno visokog prinosa zrna upotrebljavaju se i kao majke. Institut za kukuruz se bavi proizvodnjom hibrida koja se bazira na CMS osnovi. Stoga je bilo neophodno uporediti verzije linija sa različitim tipovima CMS-a i genima za restauraciju fertilitnosti i utvrditi ima li značajnih razlika između njih i njihovih originalnih (N) verzija.

U istraživanju se polazi od pretpostavke da se kod sedam linija menjaju samo geni koji utiču na sterilnost (CMS), odnosno povraćaj fertilitnosti (R).

Očekuje se pojava, da će linije koje u sebi imaju citoplazmu koja izaziva pojavu CMS-a dati veći prinos zrna u odnosu na njihovu originalnu i restorer (Rf) varijantu, iz razloga što ne obrazuju polen pa troše manje energije i preusmeravaju je u povećanje težine zrna po klip.

Primenom proteinskih (IEF) markera proveriće se da li postoji razlika između genotipova (linija) iste genetičke osnove, koje se razlikuju samo u tipu sterilnosti i genima koji služe za obnavljanje fertilitnosti. Stoga, će se utvrditi postoji li razlika samo u tim genima koji utiču na CMS, odnosno povraćaj fertilitnosti, ili su te razlike u germplazmi u okviru iste linije veće.

Ukoliko se potvrdi predviđanje da je razlika samo u genima koji utiču na pojavu sterilnosti, odnosno povraćaj fertilitnosti, moglo bi se reći da je proces prevodjenja linija urađen kako treba i do kraja. Otuda bi eventualno dobijene značajne razlike u agronomskim osobinama između N i prevedenih linija mogle da se objasne plejotropnim efektom CMS i/ili Rf gena, što je veoma bitno za svaku pojedinačnu liniju pre njene upotrebe u semenskoj proizvodnji. Suprotni rezultati bi pokazali da linije nisu dobro preobraćene te da bi taj postupak trebalo završiti do kraja (uraditi još 1-3 povratna ukrštanja).

4. MATERIJAL I METODE RADA

Za izvođenje eksperimenta odabrano je sedam inbred linija kukuruza različitog porekla i dužine vegetacionog perioda (FAO 300-500). Linije su označene kao: ZPL-1, ZPL-2, ZPL-3, ZPL-4, ZPL-5, ZPL-6 i ZPL-7.

Sve linije su stvorene u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“.

Linija ZPL-1, ZPL-2, ZPL-3, ZPL-6, ZPL-7 pripadaju Lancaster heterotičnoj grupi

Linija ZPL-4 pripada nezavisnoj heterotičnoj osnovi

Linija ZPL-5 je dobijena iz Lancaster x BSSS heterotičnih grupa

Svaka linija je bila ispitivana u pet varijanti:

1. Originalna linija (N)
2. CMS-C
3. Rf-C
4. CMS-S
5. Rf-S

Citoplazmatični muški sterilne i restorer verzije linija dobijene su preobraćanjem linija sa normalnom citoplazmom u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“. Seme svih linija koje su korišćene u ovom istraživanju je proizvedeno u ručnoj oplodnji.

Ogled je postavljen po slučajnom split-plot eksperimentalnom dizajnu u periodu od dve godine (2010 i 2011) u tri lokacije. Svi ogledi su postavljeni u uslovima suvog ratarenja. Setva je uvek vršena u optimalnom roku (druga dekada aprila) uz primenu uobičajene agrotehnike. Lokacije na kojima su sprovedeni ogledi su sledeće: Zemun Polje, Školsko dobro (lokacija u okviru oglednih polja Instituta za kukuruz Zemun Polje) i Srbobran. Lokacija Školsko Dobro u 2011-oj godini odbačena je zbog lošeg sklopa biljaka. Ogled se sastojao od tri ponavljanja u pet setova (blokova). Svaki od blokova predstavljao je po jedan tip ispitivanih linija:

I blok – N (normalna) citoplazma, tj. originalne linije

II blok – CMS-C linije

III blok – RfC linije

IV blok – CMS-S linije

V blok – RfS linije.

Parcele u okviru ponavljanja bile su sačinjene od 4 reda. Dva rubna reda predstavljala su originalne linije u svih 5 blokova, što je posebno bitno u CMS blokovima, jer su N linije služile kao polinatori za svoje sterilne analoge. Svaki red je imao 12 kućica na rastojanju od 40 cm. Sejano je ručno, po četiri biljke u kućici. Između redova rastojanje je iznosilo 70 cm. Površina elementarne parcele bila je 7,28 m², a gustina useva 71.429 biljaka/ha. U fazi razvoja od 5 listova izvršeno je raščupavanje na po 2 biljke u kućici. Za analizu prinosa zrna i agronomskih osobina korišćene su biljke iz unutrašnjih 10 kućica (izbegavanje efekta rubne kućice).

U ogedima su se pratile sledeće osobine:

- Datum metličanja (u Zemun Polju)
- Datum svilanja (u Zemun Polju)
- Razlika datuma metličanja i svilanja, ASI (anthesis-silk interval)
- Visina biljke do vrha metlice (cm)
- Visina gornjeg klipa (cm)
- % poleglih i slomljenih biljaka
- % vlage u zrnu u momentu berbe
- % oklaska u momentu berbe
- Broj klipova po biljci (pokazatelj eventualne jalovosti linija)
- Prinos zrna u t/ha sa 14% vlage
- Komponente prinosa:
 - a) Dužina klipa (cm)
 - b) Broj redova zrna
 - c) Broj zrna u redu

d) Dubina zrna (cm)

e) Masa 1000 zrna (g) sa 14% vlage

f) Broj zrna po m²

- Osobine semena

a) Pojava primarnog korena (%)

b) Klijavost semena (%)

c) Procentualni odnos frakcija semena

d) Hektolitarska masa (kg)

e) Broj zrna sitne frakcije semena po m²

- Fitopatološki pregled semena (utvrđivanje zdravstvenog stanja)

- Probijanje sterilnosti (late break of sterility)

Neposredno po završetku oplodnje slučajan uzorak od po 20 biljaka upotrebljen je za određivanje visine do vrha metlice i visine gornjeg klipa.

Procenat polegih i slomljenih biljaka određen je neposredno pred berbu, pri čemu su kao slomljene tretirane sve biljke polomljne ispod nodusa koji nosi gornji klip, a polegle biljke one koje su nagnute za više od 30 stepeni u odnosu na vertikalnu.

Berba je obavljena u vreme pune zrelosti, što je u zavisnosti od godine i lokacije variralo za oko petnaest dana (između 15 i 30-og oktobra). Prinos svežeg klipa bez komušine meren je po elementarnoj parceli, a zatim preračunat u t/ha, dok je procenat oklaska i vlaga u zrnu određena na prosečnim uzorcima uzetim iz svih ponavljanja.

Broj klipova po parceli je određen neposredno posle berbe i ovaj podatak je korišćen za izračunavanje broja klipova po biljci. Ova osobina je rađena u 2010-oj godini, a u 2011-oj ne.

Uzorak od po 20 slučajno odabranih klipova sa elementarne parcele korišćen je za određivanje komponenti prinosa i semenarske karakteristike linija. Za ostale osobine poslužile su nam sve biljke po elementarnoj parceli.

Postupak ispitivanja pojave primarnog korena i klijavosti semena kukuruza određen je na uzorcima sa lokacija Zemun Polje i Školsko dobro u 2011-oj godini. Analize su vršene na osnovu ISTA (2012b) pravilnika po sledećem postupku:

Iz frakcije čistog semena postavljaju se četiri ponavljanja od po 50 semena (2 x 100) na vlažan filter papir. Seme se može ređati u četiri reda (13, 12, 13 i 12 semena), sa klicom okrenutom na dole na filter papiru. Zatim se seme pokriva drugim filter papirom, uvije u rolnu i postavi uspravno u plastičnu kesu kako bi se sprečilo njegovo sušenje. Seme se postavlja na traženu temperaturu. U ovim ispitivanjima temperatura je vrlo značajan faktor i stoga se mora redovno pratiti i beležiti, a ponavljanja jednog uzorka se moraju postaviti na istu policu u termostatu. Preporučuje se da se uzorci okreću - rotiraju u vremenskim intervalima od 24 h. Svako ispitivanje mora da uključi i partiju semena za kontrolu. Ispitivanje se može raditi na $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 66 h (± 15 min), npr. seme se postavi u 14 h (ponedeljak, utorak, petak), a ocenjuje se u 8 h tri dana kasnije (četvrtak, petak, ponedeljak). Tačan izbor momenta ocenjivanja je posebno značajan na temperaturi od 20°C jer se na toj temperaturi pojava i porast primarnog korena dešavaju vrlo brzo. Broj semena kod kojih se razvio primarni koren dužine od najmanje 2 mm (vidljiv golim okom) se beleži za svako ponavljanje kao seme sa primarnim korenom i izražava se kao procenat (2x50 semena kao jedno ponavljanje). Ocena završnog klijanja obavlja se 7 dana po postavljanu oglada. Tom prilikom se određuje: % normalnih klijanaca, % nenormalnih klijanaca i % mrtvog semena (ISTA, 2012).

Procentualni odnos frakcija semena određen je u 2010-oj godini, na tri lokacije u tri ponavljanja. Za određivanje ove osobine korišćeno je dve vrste sita. Prvo sito je imalo prečnik rupe 8,5 mm i poslužilo je za određivanje krupne frakcije semena dok je drugo sito imalo rupe prečnika 6,5 milimetara i služilo je za određivanje sitne frakcije i otpada semena.

Fitopatološke analize su urađene po sledećoj metodologiji: Od svakog genotipa ispitivano je po 30 semena. Semena korišćena za fitopatološku analizu dobijena su iz oglada koji su rađeni na dve lokacije, Srbobran i Zemun Polje, u dva ponavljanja tokom 2011. godine. Semena su sterilisana u 1% natrijum hipohloritu u trajanju od 3 min, a zatim tri puta isprana destilovanom vodom i prosušena između dva sloja mekog papira.

Sterilisana semena su raspoređena, po pet, u Petrijevoj kutiji na krompir dekstroznu podlogu i inkubirana pri sobnim uslovima temperature i svetlosti. Nakon sedam dana urađena je identifikacija gljiva pregledom razvijenih kolonija semena pod malim uvećanjem (8-13x) mikroskopa Opton. Identifikacija gljiva izvešena je prema Burgess i sar. (1994) i Singh i sar. (1991).

Posebno je značajno praćenje probijanja sterilnosti, koje se ocenjuje skalom 1-5:

- 1 – 100% sterilno
- 2 – pojava praznih antera na centralnoj grani metlice
- 3 – pojava antera na centralnoj i bočnim granama metlice kao i pojava vidljivog polena, ali ne na celoj metlici
- 4 – pojava antera i vidljivog polena na celoj metlici
- 5 – 100% fertilno.

Ovo je veoma bitna osobina za semensku proizvodnju, pošto aprobator odbija usev kada se pojavi i najmanje probijanje sterilnosti. Pošto je u ovih 7 ispitivanih linija obuhvaćen dobar deo germplazme kukuruza koji se koristi u semenskoj proizvodnji Instituta za kukuruz, poređenje njihovog eventualnog probijanja u dva ispitivana tipa CMS-a može ukazati na pogodniji tip za semensku proizvodnju u našim uslovima.

Statistička obrada podataka obuhvatila je analizu varijanse - ANOVA slučajnog blok dizajna (RCB) za faktore G (genotip) i L (lokacija) sa faktorom T (tip linije-blok) kao split-plotom nad G i L. Programski paket korišćen za analizu varijanse je MSTAT (MSTAT Development Team, 1989). Na osnovu F testa izvršena su grupna poređenja za ocenu ispitivanih faktora i njihovih interakcija u celini za ispitivane osobine. Takođe je korišćen test najmanje značajne razlike (LSD) za poređenje originalnih i prevedenih linija. Oba testa su primenjivana za nivoe značajnosti od 5 i 1%. Urađeni su i parametri stabilnosti za prinos zrna po Eberhart-u i Russell-u (1966), kao pokazatelj pouzdanosti semenske proizvodnje na fertilnoj i sterilnoj osnovi u različitim uslovima spoljašnje sredine.

Princip i formule koje su upotrebljene su sledeće:

$$b_i = \sum Y_{ij} I_j / \sum I_j^2$$

$$S^2 d_i = (\sum \delta_{ij} / (n-2)) - S_e / r$$

gde je:

b_i – standardizovani koeficijent linearne regresije za svaki genotip u odnosu na spoljašnju sredinu

$S^2 d_i$ – standardna greška odstupanja od regresije

Y_{ij} – vrednost posmatrane i-te sorte u j-toj eko-sredini

I_j – ekološki indeks $I_j = (\sum Y_{ij} / s) - \sum \sum Y_{ij} / (s \times n)$, koji se određuje za svaki od ekoloških uslova, pri čemu s = broj sorti u ogledu, n = broj eko-sredina (ogleda)

S_e – ekološka greška iz analize varijanse

r – broj ponavljanja u ogledima

δ_{ij} – devijacija od regresije

Regresioni koeficijent (b_i) pokazao je odgovor genotipa na spoljašnju sredinu. Kada je $b_i=1$ tada je prosečna adaptibilnost i stabilnost ispitivanog genotipa ujednačena i pod uticajem povoljnih i loših faktora spoljašnje sredine; kada je $b_i>1$ genotip je prosečno stabilan samo u povoljnijim uslovima spoljašnje sredine, a kada je $b_i<1$ genotip se bolje ponaša u lošijim uslovima spoljašnje sredine. Kada je u značajnom stepenu $S^2 d_i>0$ osobina nepravilno varira u različitim ekološkim uslovima

Biohemijska karakterizacija originalnih i prevedenih linija kukuruza urađena je primenom metode ultra-tankoslojnog izoelektričnog fokusiranja (Ultrathin Layer Isoelectric Focusing-UTLIEF) rezervnih proteina semena kukuruza. UTLIEF je efikasna i jednostavna metoda za analizu genetičke strukture germplazme i verifikaciju genotipova kukuruza.

Priprema uzoraka

Po pedeset pojedinačnih semena sedam analiziranih originalnih linija i njihovih preobraćenih varijanti je samleveno korišćenjem mlina Kataskapt Mach. 1/2010 (LUFA Augustenberg). Za izolaciju albuminske frakcije proteina iz mlevenih uzoraka pojedinačnih semena korišćeno je 250 ul destilovane vode. Nakon inkubacije od 60 minuta, na sobnoj temperaturi u mraku, ekstrakcija proteina iz mlevenog semena je stimulirana ultrasonikacijom od 40 MHz u trajanju od 30 sekundi. Bistar supernatant, sa albuminskom frakcijom proteina je dobijen centrifugiranjem na 2000 rpm, uz hlađenje na 15°C u trajanju od 20 minuta.

Ultratankoslojno izoelektrično fokusiranje

Razdvajanje albuminske frakcije rezervnih proteina semena rađeno je na poliakrilamidnim UTLIEF-PAGE gelovima, debljine 0,12 mm, pripremljenim na potpurnoj foliji (GelBond film, Serva) prema metodi Radole (1980). Polimerizacioni rastvor za 10 gelova sastojao se od 16 g uree, 50 ml akrilamid/bis rastvora (T = 6,8%, C = 2,5%), 4.4 ml amfolita (SinuLyte) pH 2-11, 40 µL TEMED i 300 µL of 20% (w/v) amonijum persulfata. Polimerizacija gelova je trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi.

Elektrodna traka saturisana katodnim rastvorom (0,47% L-arginin, 0,36% L-lizin, 12% ethylenediamin) je postavljena na sredinu gela, a dve elektrodne trake saturisane anodnim rastvorom (0,33% L-asparaginska kiselina, 0,37% L-glutaminska kiselina) su postavljene na gornju i donju ivicu gela. Trake za nanošenje uzoraka, su postavljene na gel sa 5 mm razmaka od anodnih elektrodnih traka. U bunarčice aplikatora unešeno je po 19 ml supernatanta sa albuminskom frakcijom proteina pojedinačnih semena ispitivanih genotipova kukuruza. Izoelektrično fokusiranje je izvođeno prema programu prikazanom u tabeli 1. u *multiphor II* komorama za elektroforezu (*Multiphor II, GE Helathcare*) uz konstantno hlađenje na 5°C.

Tabela 1. Program za duplo ultratankoslojno izoelektrično fokusiranje rezervnih proteina semena kukuruza

Faza	Volt	Miliamper	Wat	Trajanje (min)
1	1000	50	3	10
2	1000	70	5	10
3	1000	80	15	10
4	1500	100	30	10
5	2000	120	45	10
6	2500	140	60	10
7	3000	150	70	10
8	1000	50	10	

Nakon završetka elektroforeze gel je inkubiran 15 minuta u 12% rastvoru trihlor sirćetne kiseline, a zatim bojen u Coomassie Brilliant Blue (CBR) rastvoru (0,015% CBR R250; 0,045% CBR G250; 11% sirćetne kiseline; 18% etanola; 72% ddH₂O) 60 minuta. Nakon odbojavanja 15 minuta u odbojivaču (30% etanola; 5% sirćetne kiseline, 65% ddH₂O), gel je ispiran destilovanom vodom i sušen na sobnoj temperaturi tokom noći.

Čitanje gelova i prikaz rezultata

Za verifikaciju varijeteta koristi se poređenje proteinske slike uzorka sa referentnim uzorkom, u ovom radu referentne uzorke su predstavljale originalne linije kukuruza. Na istom gelu se radi izoelektrično fokusiranje po 50 semena aktuelnog i odgovarajućeg referentnog uzorka. Da bi se ocenilo da je aktuelni uzorak autentičan ove dve analizirane proteinske slike treba da budu identične.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1 Analiza varijanse i test najmanje značajne razlike između tipova linija za ispitivane osobine kukuruza

5.1.1 Analiza prinosa zrna kukuruza, procenta oklaska i procenta vlage zrna u momentu berbe

Analiza varijanse ove tri posmatrane osobine pokazuje da postoji značajna razlika u prinosu, procentu oklaska i procentu vlage za sve ispitivane faktore izuzevši ponavljanja (tab. 2). Na prinos zrna sve interakcije faktora uticale su vrlo značajno (G x L, G x T, L x T, G x L x T), dok na procenat oklaska veoma značajno je uticala interakcija L x T, značajno G x L x T, a interakcije G x L i G x T nisu signifikantno uticale na ispitivanu osobinu. Na procenat vlage zrna u vreme berbe veoma značajno su uticali svi vidovi interakcija.

Tabela 2. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za prinos zrna kukuruza, procent oklaska i procent vlage u zrnu na svih 5 lokacija

Osobina		Prinos zrna (t/ha)	% oklaska	% vlage
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	0,021ns	14,984 ns	2,680 ns
Genotip (G)	6	37,303**	371,834 **	448,620 **
Lokacija (L)	4	64,968**	55,715 *	99,776 **
G x L	24	2,188 **	24,609 ns	21,221 **
Greška (E-1)	68	0,32	19,046	2,827
Tip linije (T)	4	7,341 **	117,499 **	35,987 **
G x T	24	1,781 **	19,025 ns	9,212 **
L x T	16	4,158 **	25,785 **	8,918 **
G x L x T	96	0,897 **	24,181 *	7,868 **
Greška (E-2)	280	0,223	16,854	2,994
Ukupno	524			

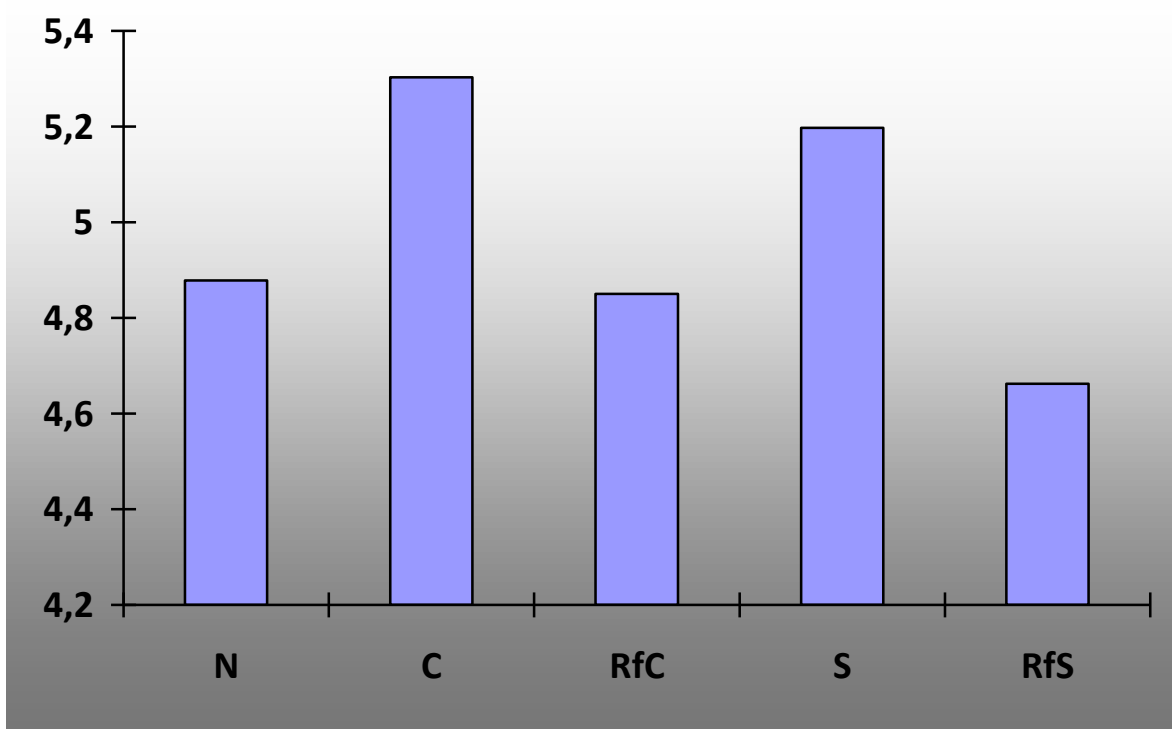
*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

U ovom istraživanju vršena su poređenja originalnih i prevedenih linija. Ocena značajnosti razlike prosečnih vrednosti prinosa zrna kukuruza, procenta oklaska i procenta vlage izvedena je na osnovu LSD-testa za nivoe značajnosti od 5% i 1%. (tab. 3). Za oba nivoe značajnosti, od svih sedam ispitivanih inbred linija najviši prinos su dale linije sa C i S citoplazmom, 5,303 t/ha i 5,197 t/ha, respektivno, dok su najniži prinos dale linije RfS-tipa, 4,662 t/ha. Procenat oklaska je na oba nivoe značajnosti bio najveći kod RfS-tipa (18,08%), dok u grupu sa najvećim procentom oklaska na nivou značajnosti 5% spadaju i linije RfC-tipa. Najniži procenat oklaska imale su linije C i S tipa (15,79% i 15,98%, respektivno), na oba nivoe značajnosti. Procenat vlage zrna u momentu berbe je bio najveći kod linija sa RfC i normalnom citoplazmom (19,84 i 19,42%), dok su najniži procenat vlage sadržale linije C-tipa (18,34%), takođe na oba nivoe značajnosti.

Tabela 3. Test najmanje značajne razlike za prosečan prinos zrna kukuruza, procenat oklaska i procenat vlage u zrnu na svih 5 lokacija

		Prinos zrna (t/ha)			% oklaska				% vlage			
Rang	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01
1	C	5,303	A ¹	A ¹	RfS	18,08	A ¹	A ¹	RfC	19,84	A ¹	A ¹
2	S	5,197	A	A	RfC	17,86	A	AB	N	19,42	A	AB
3	N	4,878	B	B	N	16,60	B	BC	S	18,84	B	BC
4	RfC	4,850	B	B	S	15,98	B	C	RfS	18,81	B	BC
5	RfS	4,662	C	C	C	15,79	B	C	C	18,34	C	C
		Lsd	0,1283	0,2230	Lsd		1,115	1,469	Lsd		0,4701	0,6193

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo



Grafik 3. Prinos zrna (t/ha) različitih tipova inbred linija kukutuza

5.1.2. Analiza morfoloških osobina ispitivanih inbred linija kukuruza

Analiza varijanse visina klipa, biljke i procenta pleglih i slomljenih biljaka obuhvatila je podatke dobijene sa svih pet lokacija (tab. 4). Ona je pokazala da su genotip (G) i lokacija (L), kao i njihova interakcija (G x L) veoma značajno uticale na sve tri ispitivane osobine. Tip linije (T) je veoma značajno uticao na osobine visina klipa i visina biljke, a nije uočena statistička značajnost za osobinu procenat pleglih i slomljenih biljaka. Interakcija genotipa i tipa linije (G x T) veoma značajno je uticala na sve tri praćene osobine. Interakcija lokacije i tipa linije (L x T) je pokazala visoko signifikantan uticaj na visinu klipa i biljke, dok na vrednosti procenta pleglih i slomljenih biljaka nije imala uticaja. Interakcija genotipa, lokacije i tipa linije (G x L x T) je značajno uticala na osobine visina klipa i procenat pleglih i slomljenih biljaka, a ne i na visinu biljke.

Tabela 4. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVE za visinu klipa, visinu biljke i % pleglih i slomljenih biljaka na svih 5 lokacija

Osobina		Visina klipa (cm)	Visina biljke (cm)	% pleglih i slomljenih biljaka
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	30,023 ns	216,603 ns	9,518 ns
Genotip (G)	6	177778,625 **	39864,032 **	569,614 **
Lokacija (L)	4	346,055 **	8944,838 **	1742,770 **
G x L	24	236,218 **	555,937 **	89,781 **
Greška (E-1)	68	36,522	72,137	19,397
Tip linije (T)	4	451,863 **	635,572 **	37,351ns
G x T	24	141,657**	352,685 **	44,854 **
L x T	16	702,205 **	302,583 **	30,059 ns
G x L x T	96	29,696 *	64,872 ns	27,256 *
Greška (E-2)	280	21,366	51,631	19,683
Ukupno	524			

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

LSD-test između tipova linija za oba ispitivana nivoa značajnosti (5% i 1%), pokazao je najveću visinu klipa kod linija RfC i C tipa, 81,23 cm i 81,1 cm, respektivno, a najmanju kod linija sa normalnom citoplazmom, 76,33 cm (tab. 5). Najveću visinu biljke imale su linije RfC-tipa (195,2 cm), a najniže RfS-tipa (188,4 cm) na oba nivoa značajnosti. Za nivo značajnosti od 5%, najveći procenat poleglih i slomljenih biljaka je zabeležen kod biljaka sa N i S citoplazmom (7,209 i 7,071%, respektivno), dok za nivo značajnosti od 1% nisu zabeležene značajne razlike kod ispitivanih linija za ovu osobinu.

Tabela 5. Test najmanje značajne razlike za srednje vrednosti visine klipa, visine biljke i procenata polegih i slomljenih biljaka na svih pet lokacija

Rang	Visina klipa (cm)				Visina biljke (cm)				% polegih i slomljenih biljaka			
	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01
1	RfC	81.23	A ¹	A ¹	RfC	195.2	A ¹	A ¹	N	7.209	A ¹	A ¹
2	C	81.10	A	A	N	192.2	B	B	S	7.071	A	A
3	RfS	79.43	B	B	C	192.2	B	B	C	6.870	AB	A
4	S	78.10	C	B	S	190.7	B	BC	RfC	6.750	AB	A
5	N	76.33	D	C	RfS	188.4	C	C	RfS	5.702	B	A
		Lsd	1.256	1.655		Lsd	1.952	2.572		Lsd	1.205	1.588

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

Analiza varijanse za osobinu broj klipova po biljci obuhvatila je podatke dobijene sa 3 lokacije u sezoni 2010 (tab. 6). Pokazano je da genotip (G), lokacija (L) i tip linije (T), kao i sve interakcije (G x L, G x T, L x T, G x L x T) veoma značajno utiču na ovu osobinu.

Tabela 6. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za broj klipova po biljci na tri lokacije u 2010. godini

Osobina	Broj klipova po biljci	
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	0,060 ns
Genotip (G)	6	0,796 **
Lokacija (L)	2	0,580 **
G x L	12	0,014 **
Greška (E-1)	40	0,015
Tip linije (T)	4	0,062 **
G x T	24	0,058 **
L x T	8	0,056 **
G x L x T	48	0,025 **
Greška (E-2)	168	0,012
Ukupno	314	

*, ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

LSD-test (tab. 7) je za oba nivoa značajnosti pokazao da je najveći broj klipova po biljci zabeležen kod RfC-tipa linija (1,019). Sa druge strane, najmanji broj klipova po biljci je ustanovljen kod linija sa S i normalnom citoplazmom (0,9787 i 0,9379, respektivno).

Tabela 7. Test najmanje značajne razlike srednjih vrednosti za broj klipova po biljci

Rang	Tip	Vrednost	Broj klipova po biljci	
			0,05	0,01
1	RfC	1,0190	A ¹	A ¹
2	RfS	1,0040	AB	AB
3	C	1,0000	AB	AB
4	S	0,9787	B	B
5	N	0,9379	C	C
Lsd			0,02985	0,03939

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

5.1.3. Analiza komponenti prinosa ispitivanih inbred linija kukuruza

Kod svih sedam ispitivanih linija izmerene su sledeće komponente prinosa: dužina klipa, broj redova zrna, broj zrna u redu, dubina zrna, masa 1000 zrna, i broj zrna po m² na svih pet lokacija. Analiza varijanse za sve ispitivane komponente prinosa data je u tabeli 8. i tabeli 9. Genotip (G), lokacija (L) i tip linije (T), kao i sve njihove interakcije (G x L, G x T, L x T, G x L x T) veoma značajno su uticale na osobinu dužina klipa. Na osobinu broj redova zrna genotip i tip linije su uticale visoko signifikantno, dok je uticaj lokacije bio „samo“ značajan. Sve interakcije (G x L, G x T, L x T, G x L x T) su veoma značajno uticale na broj redova zrna. Na osobine broj zrna u redu i broj zrna po m², kao i kod osobine dužina klipa, svi parametri i njihove interakcije imaju veoma značajan uticaj. Kod osobine dubina zrna svi parametri (G, L i T) veoma značajno utiču, dok su interakcije G x L, L x T i G x L x T takođe veoma značajne, a interakcija G x T značajno utiče na ovu osobinu. Na osobinu masa 1000 zrna veoma značajno su uticala dva faktora, genotip i lokacija, dok tip linije nije imao statistički značajan uticaj. Sve interakcije analiziranih faktora, G x L, G x T, L x T, G x L x T, su visoko signifikantno uticale na masu 1000 zrna.

Tabela 8. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za dužinu klipa, broj redova zrna i broj zrna u redu

Osobina		Dužina klipa (cm)	Broj redova zrna	Broj zrna u redu
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	0,099 ns	0,045 ns	4,198 ns
Genotip (G)	6	639,597**	71,662 **	976,108 **
Lokacija (L)	4	31,120 **	1,224 *	313,891 **
G x L	24	6,593**	1,195 **	34,086 **
Greška (E-1)	68	0,605	0,427	5,268
Tip linije (T)	4	12,253 **	1,433 *	112,015 **
G x T	24	5,443 **	1,687 **	23,712 **
L x T	16	1,678 **	0,965 **	21,793 **
G x L x T	96	1,243 **	0,632 **	9,563 **
Greška (E-2)	280	0,439	0,348	4,013
Ukupno	524			

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

Tabela 9. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za dubinu zrna, masu 1000 zrna i broj zrna po m²

Osobina		Dubina zrna (cm)	Masa 1000 zr. (g)	Broj zrna po m ²
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	0,001 ns	1900,761 ns	10662,699
Genotip (G)	6	0,209 **	82082,388 **	5990750,315**
Lokacija (L)	4	0,107 **	45087,432 **	9094470,578**
G x L	24	0,012 **	6502,028 **	496720,679**
Greška (E-1)	68	0,004	2259,665	114790,442
Tip linije (T)	4	0,023 **	925,231 ns	905006,216**
G x T	24	0,006 *	1878,430 **	327235,962**
L x T	16	0,011 **	1497,452 *	296015,146**
G x L x T	96	0,005 **	1527,760 **	159265,371**
Greška (E-2)	280	0,004	716,015	89176,995
Ukupno	524			

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0.01, respektivno

Na osnovu LSD-testa (tab. 10 i tab. 11), za nivoe značajnosti od 5% i 1% najveća dužina klipa izmerena je kod linija sa originalnom, S i C citoplazmom, 15,57, 15,56 i 15,46 cm, respektivno, a najmanja kod linija sa RfS i RfC germplazmom, 14,98 i 14,58 cm, respektivno. Najveći broj redova zrna za oba praga značajnosti su imale linije sa C-tipom citoplazme, 12,98, a najmanji linije sa normalnom germplazmom, 12,67. Na oba nivoa značajnosti je izmeren najveći broj zrna u redu kod linija sa S-tipom citoplazme, 33,92, dok je takođe na oba nivoa značajnosti najnižu vrednost ovog parametra imala grupa linija RfC-tipa, 31,45. Najveća dubina zrna na oba nivoa značajnosti izmerena je kod linija sa C i S citoplazmom, 0,8212 cm i 0,8196 cm, respektivno. Najniža vrednost ovog parametra je ustanovljena takođe na oba nivoa značajnosti, za linije RfS-tipa, 0,7870 cm. Najveću masu 1000 zrna na oba nivoa značajnosti su ostvarile linije sa normalnom citoplazmom. Najveći broj zrna po m² je bio kod linija sa C i S tipom citoplazme, 2716 i 2676, respektivno, a najmanji broj zrna je izmeren kod linija RfS-tipa, 2496, i to na oba nivoa značajnosti.

Tabela 10. Test najmanje značajne razlike za dužinu klipa, broj redova zrna i broj zrna u redu

Rang	Dužina klipa (cm)				Br. redova zrna				Br. zrna u redu					
	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01		
1	N	15,57	A ¹	A ¹	RfC	12,98	A ¹	A ¹	S	33,92	A ¹	A ¹		
2	S	15,56	A	A	RfS	12,87	AB	AB	C	33,65	AB	AB		
3	C	15,46	A	A	C	12,79	BC	AB	N	33,14	B	B		
4	RfS	14,98	B	B	S	12,76	BC	B	RfS	32,19	C	C		
5	RfC	14,85	B	B	N	12,67	C	B	RfC	31,45	D	D		
		Lsd	0,1800	0,2372			Lsd	0,1603	0,2112			Lsd	0,5442	0,7170

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

Tabela 11. Test najmanje značajne razlike za dubinu zrna, masu 1000 zrna i broj zrna po m²

Rang	Dubina zrna (cm)				Masa 1000 zrna (g)				Broj zrna po m ²					
	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	Lsd0,01		
1	C	0,8212	A ¹	A ¹	N	261,3	A ¹	A ¹	C	2716	A ¹	A ¹		
2	S	0,8196	A	A	S	260,5	AB	A	S	2676	AB	A		
3	RfC	0,8104	AB	AB	RfC	258,0	AB	A	N	2610	BC	AB		
4	N	0,7967	BC	BC	C	257,0	AB	A	RfC	2533	CD	BC		
5	RfS	0,7870	C	C	RfS	253,9	B	A	RfS	2496	D	C		
		Lsd	0,0172	0,02264			Lsd	7,270	9,578			Lsd	81,13	106,9

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

5.1.4. Analiza osobina semena za inbred linije kukuruza

Analiza varijanse osobina semena: ocena pojave primarnog korena, ocena završne klijavosti, procenat nenormalnih klijanaca i procenat mrtvih klijanaca, obuhvatila je podatke iz 2011. godine sa lokacija Zemun Polje i Srbobran (Tab. 12). Analizom ovih podataka ustanovljeno je da genotip (G) veoma značajno utiče na sve četiri ispitivane osobine. Faktor lokacije (L) je takođe veoma signifikantno uticao na sve osobine, osim na procentualni udeo nenormalnih klijanaca. Interakcija ova dva faktora (G x L) značajno utiče na vrednosti prve dve osobine, ocenu primarnog korena i završnu klijavost, dok je interakcija ova dva faktora veoma značajno uticala na druge dve ispitivane osobine, procenat nenormalnih klijanaca i procenat mrtvih klijanaca. Tip linije (T) je veoma značajno uticao na sve četiri osobine. Interakcije faktora G x T, L x T, G x L x T su veoma značajno uticale na pojavu primarnog korena i procenat mrtvih klijanaca. Na završnu klijavost interakcije faktora G x T i G x L x T su veoma značajno uticale, a interakcija faktora L x T uticala je značajno. Interakcije faktora L x T i G x L x T su imale visoko signifikantan uticaj na procentualni udeo nenormalnih klijanaca, dok je interakcija G x T značajno uticala na ovu osobinu.

Tabela 12. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za 4 semenarske osobine: Pojava primarnog korena, završna klijavost, udeo nenormalnih i mrtvih klijanaca

osobina		Pojava prim. kor. (%)	Završna klijavost (%)	% nenormalnih klijanaca	% mrtvih klijanaca
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljanje (R)	3	26,680 ns	8,486 ns	6,356 ns	13,429 ns
Genotip (G)	6	640,215 **	1188,82 **	101,714 **	560,574 **
Lokacija (L)	1	3339,604 **	0,514 **	18,004 ns	30,229 **
G x L	6	93,104 *	37,923 *	21,629 **	45,695 **
Greška (E-1)	39	36,734	14,393	4,482	10,682
Tip linije (T)	4	909,693 **	205,571 **	25,298 **	102,370 **
G x T	24	224,678 **	91,515 **	9,182 **	45,074 **
L x T	4	544,139 **	83,836 **	3,066 **	103,898 **
G x L x T	24	258,671 **	116,088 **	12,837 **	72,594 **
Greška (E-2)	168	70,614	18,826	4,112	14,132
Ukupno	279				

*, ** - Statistički značajno na nivou od 0,05; 0,01, respektivno

LSD testa za nivoe značajnosti 5 i 1% (tab. 13), prikazao je da su najveći procenat pojave primarnog korena imali genotipovi sa RfC i RfS tipom germplazme, 81,50 i 81,39%, respektivno. Najniži procenat klijavosti zabeležen na oba nivoa značajnosti je bio kod linija normalnog tipa citoplazme. Procenat završne klijavosti na oba nivoa značajnosti je bio najviši kod linija S i RfS tipa 93,02 i 92,66%, respektivno, dok je najniža vrednost ovog parametra, takođe na oba nivoa značajnosti, zabeležena kod linija N-tipa 88,23%. Analizom procentualnog udela nenormalnih klijanaca zaključeno je da je najviša vrednost ovog parametra ostvarena kod linija sa normalnom germplazmom 4,321% i to na oba nivoa značajnosti, dok su preostali genotipovi imali približno iste vrednosti. Takođe je konstatovano da je procenat mrtvih klijanaca bio najviši kod genotipova sa normalnom germplazmom 7,768%, na oba nivoa značajnosti, a najnižu vrednost ove osobine su imale linije RfS-tipa 4,286%.

Tabela 13. Test najmanje značajne razlike za četiri semenarske osobine: pojava primarnog korena, završna klijavost, udeo nenormalnih i mrtvih klijanaca

Rang	Pojava prim. kor. (%)				Završna klijavost (%)				% nenormalnih klijanaca				% mrtvih klijanaca			
	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01
1	RfC	81,50	A ¹	A ¹	S	93,02	A ¹	A ¹	N	4,321	A ¹	A ¹	N	7,768	A ¹	A ¹
2	RfS	81,39	A	A	RfS	92,66	A	A	C	3,696	B	A	C	5,482	B	B
3	C	75,43	B	B	RfC	92,04	AB	AB	S	2,946	C	B	RfC	5,357	B	BC
4	S	75,00	B	BC	C	91,20	B	B	RfS	2,875	C	B	S	4,679	BC	BC
5	N	72,63	C	C	N	88,23	C	C	RfC	2,750	C	B	RfS	4,286	C	C
		Lsd	1,983	2,617		Lsd	1,024	1,351		Lsd	0,4785	0,6315		Lsd	0,8870	0,050

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

Analizom varijanse obuhvaćeni su podaci iz 2010. godine sa tri lokacije o procentualnom odnosu frakcija semena (tab. 14). Ovom analizom je pokazano da sva tri faktora, genotip (G), lokacija (L) i tip linije, visoko signifikantno utiču na sve tri posmatrane osobine: procenatualni udeo krupne frakcije semena, udeo sitne frakcije semena i procenat otpada. Takođe je konstatovano da svi tipovi interakcija ovih faktora, G x L, G x T, L x T i G x L x T, visoko signifikantno utiču na sve tri posmatrane osobine, dok je jedini izuzetak bila interakcija L x T koja je značajno uticala na procentualni udeo sitne frakcije.

Tabela 14. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za procentualni odnos frakcija semena na tri lokacije

osobina		% krupne frakcije	% sitne frakcije	% otpada
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	12,156 ns	41,701 ns	24,962 *
Genotip (G)	6	19407,743 **	12583,282 **	942,218 **
Lokacija (L)	2	597,269 **	159,771 **	146,315 **
G x L	12	49,958 **	143,001 **	45,137 **
Greška (E-1)	40	10,678	9,360	4,069
Tip linije (T)	4	157,096 **	111,756 **	37,476 **
G x T	24	199,051 **	221,480 **	30,460 **
L x T	8	28,090 **	25,231 *	15,921 **
G x L x T	48	18,866 **	26,074 **	10,474 **
Greška (E-2)	168	9,894	9,741	3,201
Ukupno	314			

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

U tabeli 15. prikazane su vrednosti LSD-testa za ove osobine. Najveći procentualni udeo krupne frakcije semena na oba nivoa značajnosti imale su linije na S osnovi (23,27%). Najmanji udeo sitne frakcije, takođe na oba nivoa značajnosti, zabeležen je kod linija RfC-tipa (18,94%). Procentualni udeo sitne frakcije bio je najveći kod linija koje su u sebi sadržale RfC germplazmu, 74,64%, a za njima su bile linije sa C-tipom citoplazme sa 73,19%. Ovi rezultati su potvrđeni na oba nivoa značajnosti. Najmanji udeo sitne frakcije je izmeren kod linija sa S i RfS germplazmom, 71,5 i 71,45%, respektivno. Najveći procenat otpada na nivou značajnosti od 5% imale su linije RfS-tipa, 6,987%, a na nivou značajnosti 1% u grupu sa najvećim procentom otpada spadaju linije sa RfC-tipom germplazme (6,454%). U grupu sa najmanjim procentualnim udelom otpada spadaju linije sa originalnom, S i C citoplazmom sa 5,608, 5,267 i 5,263%, respektivno.

Tabela 15. Test najmanje značajne razlike za procentualni odnos frakcija semena

Rang	Tip	% krupne frakcije			% sitne frakcije				% otpada					
		Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01		
1	S	23,27	A ¹	A ¹	RfC	74,64	A ¹	A ¹	RfS	6,987	A ¹	A ¹		
2	N	22,06	B	B	C	73,19	B	B	RfC	6,454	B	A		
3	RfS	21,60	B	B	N	72,35	B	BC	N	5,608	C	B		
4	C	21,58	B	B	S	71,50	C	C	S	5,267	C	B		
5	RfC	18,94	C	C	RfS	71,45	C	C	C	5,263	C	B		
		Lsd	0,8570	1,1310			Lsd	0,8504	1,122			Lsd	0,4875	0,6433

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

Veoma bitna osobina kada su karakteristike semena u pitanju je broj zrna sitne frakcije semena po metru kvadratnom. Rezultati analize varijanse koji uključuju podatke sa tri lokacije dati su u tabeli 16. Značajan uticaj na ovu osobinu je imao genotip i faktor spoljašnje sredine. Veoma značajan uticaj je imao tip linije. Svi tipovi interakcija faktora su na ovu osobinu uticali veoma signifikantno, osim interakcije između lokaliteta i tipa linije, koja nije statistički značajno uticala.

Tabela 16. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za broj zrna sitne frakcije semena po m² na tri lokacije.

osobina	Br. zrna sitne fr. semena po m ²	
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	136011,241
Genotip (G)	6	3469022,496*
Lokacija (L)	2	5307762,956*
G x L	12	207769,619**
Greška (E-1)	40	1147445,025
Tip linije (T)	4	306762,259**
G x T	24	202449,516**
L x T	8	113693,749ns
G x L x T	48	57860,579**
Greška (E-2)	168	
Ukupno	314	

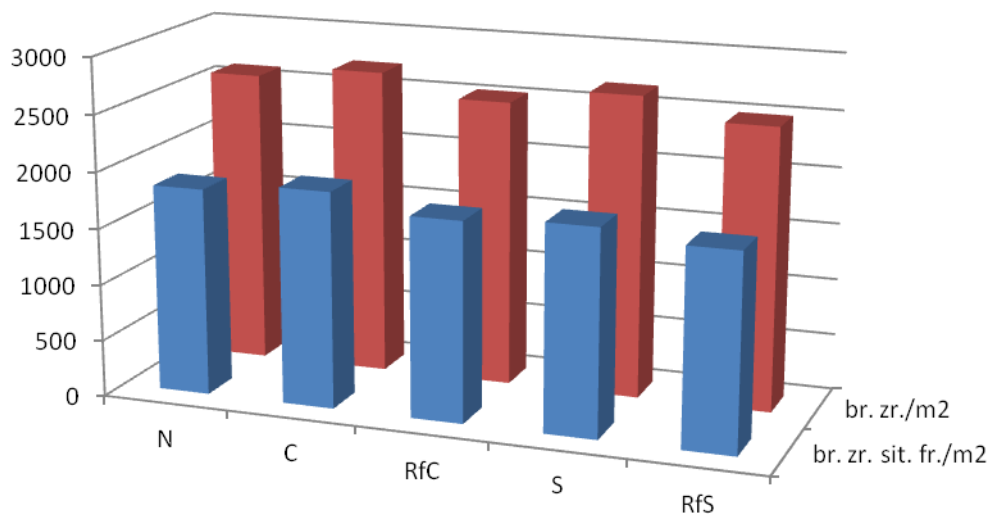
*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

U tabeli 17. je prikazana ocena značajnosti razlike za broj zrna sitne frakcije semena po m² koja je urađena putem LSD-testa. Na oba nivoa signifikantnosti najviša vrednost ovog pokazatelja zabeležena je kod linija sa C-tipom citoplazme, što je u proseku iznosilo 1915 zrna po m². Sa druge strane, najniže vrednosti su zabeležene kod linija RfS-tipa uz prosečno 1773 zrna po m².

Tabela 17. Test najmanje značajne razlike za broj zrna sitne frakcije po m²

Broj zrna sitne frakcije po m ²				
Rang	Tip	Vrednost	0,05	0,01
1	C	1915	A ¹	A ¹
2	N	1837	B	AB
3	S	1820	B	ABC
4	RfC	1768	BC	BC
5	RfS	1733	C	C
Lsd			72,91	96,23

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo



Grafik 4. Broj zrna po m² i broj zrna sitne frakcije po m² za različite tipove inbred linija kukuruza

U tabeli 18. dati su rezultati analize varijanse za hektolitarsku masu semena. Rezultati govore da su na ispitivanu osobinu svi faktori i njihove interakcije veoma značajno uticale.

Tabela 18. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za hektolitarsku masu zrna

osobina	Hektolitarska masa (kg)	
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	109,533 ns
Genotip (G)	6	18097,341 **
Lokacija (L)	4	20382,601 **
G x L	24	1104,356 **
Greška (E-1)	68	109,428
Tip linije (T)	4	1265,176 **
G x T	24	932,293 **
L x T	16	675,530 **
G x L x T	96	242,617 **
Greška (E-2)	280	122,595
Ukupno	524	

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

Na osnovu testa najmanje značajne razlike možemo ustanoviti da su na nivou značajnosti od 5% najveću prosečnu hektolitarsku masu imale linije RfC-tipa, 792,5kg (tab. 19). Na nivou značajnosti od 1% nije bilo značajne razlike između različitih tipova linija, osim za RfS-tip koji je imao nešto niže vrednosti posmatranog parametra.

Tabela 19. Test najmanje značajne razlike za hektolitarsku masu zrna na pet lokacija

Rang	Tip	Vrednost	Hekto. masa (kg)	
			0,05	0,01
1	RfC	792,5	A ¹	A ¹
2	N	792,0	AB	A
3	S	791,3	AB	A
4	C	789,4	B	A
5	RfS	784,0	C	B
Lsd			3,008	3,963

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

5.1.5. Fitopatološka analiza semena

Analiza varijanse zdravstvenog stanja semena tj. procentualnog udela gljiva *Fusarium verticillioides* i *Aspergillus flavus* vršena je iz uzoraka koji su dobijeni sa lokacija Zemun Polje i Srbobran u 2011. godini (tab. 20). Analizirajući dobijene podatke ustanovljeno je da su faktori genotip (G) i lokacija (L) veoma značajno uticali na procentualno učešće obe gljive u ispitivanim uzorcima. Zanimljivo je da interakcija između genotipa i lokacije (G x L) nije značajno uticala na procentualni udeo gljive *Fusarium verticillioides*, dok je ta interakcija veoma značajno uticala na procenat gljive *Aspergillus flavus* u ispitanim uzorcima. Tip linije (T) je značajno uticao na procenatualni udeo semena koji je bio zaražen gljivom *Fusarium verticillioides* i visokosignifikantno na procenat semena zaražen gljivom *Aspergillus flavus*. Interakcije L x T i G x L x T su veoma značajno uticale na procenat gljive *Fusarium verticillioides*, a interakcija G x T je značajno uticala na tu istu osobinu. Na procentualni udeo zaraženog semena gljivom *Aspergillus flavus* veoma značajno su uticale interakcije faktora G x T i L x T, dok je interakcija faktora G x L x T značajno uticala na ovu osobinu.

Tabela 20. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za procentualnu zaraženost gljivama

osobina		<i>Fusarium verticillioides</i> (%)	<i>Aspergillus flavus</i> (%)
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	Sredina kvadrata
Ponavljanje (R)	1	256,231 ns	15,846
Genotip (G)	6	1326,615 **	2541,684 **
Lokacija (L)	1	3010,433 **	15,180 **
G x L	6	649,555 ns	2402,949 **
Greška (E-1)	13	274,034	330,695
Tip linije (T)	4	976,183 *	2940,276 **
G x T	24	518,079 *	464,395 **
L x T	4	201,867 **	3300,219 **
G x L x T	24	231,999 **	592.431 ns
Greška (E-2)	56	288,291	503,877
Ukupno	139		

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 21. *Fusarium verticillioides* je u najvećem delu bila prisutna u linijama RfC-tipa, što je potvrđeno na oba nivoa značajnosti. Najniže zabeležen procenat ovog patogena je bio kod linija sa normalnim i S-tipom citoplazme. Najveći procenat semena zaraženog gljivom *Aspergillus flavus* su imale linije sa S-tipom citoplazme, 52,13%, i to na oba nivoa značajnosti. Konstatovano je da su linije koje su najmanje zaražene ovom gljivom pripadale grupi linija C i RfC tipa, 31,19 i 26,91%, respektivno, što je takođe utvrđeno na oba nivoa značajnosti.

Tabela 21. Test najmanje značajne razlike za procentualni udeo gljiva

Rang	<i>Fusarium verticillioides</i> (%)				<i>Aspergillus flavus</i> (%)				
	Tip	Vrednost	Lsd0,05	0,01	Tip	Vrednost	0,05	0,01	
1	RfC	33,33	A ¹	A ¹	S	52,13	A ¹	A ¹	
2	RfS	26,67	B	AB	RfS	44,87	AB	AB	
3	C	24,17	BC	BC	N	41,54	B	B	
4	N	19,42	C	BC	C	31,19	C	C	
5	S	18,95	C	C	RfC	26,91	C	C	
Lsd			5,749	7,653	Lsd			7,601	10,12

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

5.1.6. Razlika datuma metličjenja i svilanja (ASI)

Analiza varijanse razlike datuma metličjenja i svilanja vršena je na osnovu rezultata ogleđa koji su bili sprovedeni na lokaciji Zemun Polje u toku 2010. i 2011. godine (tab. 22). Na posmatranu osobinu su sva tri faktora uticala visoko signifikantno, kao i interakcije između faktora G x L, G x T i G x L x T, dok je interakcija L x T značajno uticala na ovu osobinu.

Tabela 22. Značajnost sredina kvadrata iz ANOVA za razliku datuma metličjenja i svilanja

osobina	ASI	
Izvori variranja	Stepeni slobode	Sredina kvadrata
Ponavljjanje (R)	2	0,743 ns
Genotip (G)	6	55,656 **
Lokacija (L)	1	8,005 **
G x L	6	12,671 **
Greška (E-1)	26	0,471
Tip linije (T)	4	2,969 **
G x T	24	1,566 **
L x T	4	1,279 *
G x L x T	24	1,237 **
Greška (E-2)	112	0,437
Ukupno	209	

*; ** - Statistički značajno na nivou od 0,05 i 0,01, respektivno

Najveće prosečne vrednosti ovog pokazatelja (tab. 23) su ustanovljene, na osnovu LSD-testa, na oba nivoa značajnosti, kod linija koje imaju normalnu citoplazmu (4,5 dana). Najniže vrednosti su ustanovljene, takođe na oba nivoa značajnosti, za linije sa S-tipom citoplazme (3,786 dana).

Tabela 23. Test najmanje značajne razlike za razliku datuma metlilčenja i svilanja

Razlika između datuma metlilčenja i svilanja				
Rang	Tip	Vrednost	Lsd0,05	0,01
1	N	4,500	A ¹	A ¹
2	RfC	4,190	B	B
3	RfS	4,024	BC	BC
4	C	4,000	C	BC
5	S	3,786	D	C

Lsd

0,1808

0,2391

1 – Statistički su različite vrednosti koje nemaju zajedničko slovo

5.1.7. Probijanje sterilnosti (late break of sterility)

Probijanje sterilnosti je veoma bitno sa aspekta semenske proizvodnje. U slučaju i najmanjeg probijanja sterilnosti aprobator odbija usev. Svih sedam linija se u Institutu za kukuruz koriste u proizvodnji hibridnog semena i iz tog razloga je bilo veoma bitno oceniti probijanje sterilnosti, koje kod jednog od tipova ispitivanih linija može ukazati na pogodniji tip CMS-a za semensku proizvodnju. Nakon dve godine ispitivanja na lokaciji Zemun Polje nije uočeno nikakvo probijanje sterilnosti ni kod C ni kod S-tipa linija, tako da se sa ovog aspekta oba tipa sterilnosti mogu smatrati pogodnim za semensku proizvodnju.

5.2. Parametri stabilnosti za prinos zrna kukuruza po Eberhart-u i Russell-u

Analiza parametara stabilnosti je vršena na osnovu prinosa zrna svih sedam linija unutar svakog bloka (tipa linije) ponaosob.

U tabeli 24. su date vrednosti prosečnih prinosa i parametri stabilnosti za linije koje imaju normalnu citoplazmu. Po prinosu je dominirala linija ZPL7 sa 6,5727 t/ha, a za njom je bila linija ZPL2 sa 5,3533 t/ha. Najlošiji prinos je ostvarila linija ZPL4 sa prosečnim prinosom 3,7267 t/ha. Prema vrednostima regresionog koeficijenta najstabilnija je bila linija ZPL1, dok je najlošiju vrednost ovog pokazatelja imala linija koja je imala i najniži prinos, a to je linija ZPL7. Za linije ZPL6 i ZPL7 može se reći da se bolje ponašaju u povoljnijim uslovima gajenja, dok se za linije ZPL2 i ZPL5 vidi da su produktivnije u nešto lošijim uslovima. Nešto viša vrednost parametra S_{di}^2 je zabeležena kod linije ZPL7, pa se po ovom pokazatelju ta linija može smatrati nešto manje stabilnom u odnosu na ostale linije.

Tabela 24. Prinos i parametri stabilnosti za linije sa N tipom germplazme

Linija	Prinos (t/ha)	Rang	bi	Rang	S_{di}^2
ZPL1	4,498	5	1,0451	1	-0,1675
ZPL2	5,3533	2	0,8241	4	-0,0369
ZPL3	4,772	4	1,1312	3	-0,1010
ZPL4	3,7267	7	0,6397	7	-0,0833
ZPL5	4,2333	6	0,8978	2	-0,1476
ZPL6	4,9907	3	1,2610	6	-0,1458
ZPL7	6,5727	1	1,2122	5	0,2294
Prosek					0,1302

Rezultati prosečnog prinosa linija i njihovih parametara stabilnosti za linije koje u sebi sadrže C citoplazmu su dati u tabeli 25. Prosečan prinos je najveći kod linija ZPL7 (6,5327 t/ha) i ZPL2 (5,91 t/ha), kao i u N citoplazmi. Sa druge strane, najniži prinos je takođe zabeležen kod linije ZPL4 (3,7267 t/ha). Što se tiče parametara stabilnosti, po

vrednostima regresionog koeficijenta najstabilnija linija je bila ZPL6, a najprinosnija linija u ovom slučaju je bila i najnestabilnija, ZPL7. U nepovoljnijim uslovima gajenja bolje su se pokazale linije ZPL1, ZPL4 i ZPL5. Linija ZPL2 je pokazala veću adaptibilnost u povoljnijim uslovima gajenja. Visoku vrednost kvadratnog odstupanja od regresije je imala linija ZPL2 i za nju se može reći da je po ovom parametru pokazala visoku nestabilnost u različitim uslovima gajenja. Nešto veće vrednosti ovog parametra stabilnosti je pokazala i linija ZPL3.

Tabela 25. Prinos i parametri stabilnosti za linije sa C tipom germplazme

Linija	Prinos (t/ha)	Rang	bi	Rang	S_{di}^2
ZPL1	4,826	6	0,7838	4	-0,01470
ZPL2	5,91	2	1,3003	5	2,17116
ZPL3	4,8407	5	1,0714	2	0,39108
ZPL4	4,2633	7	0,8265	3	-0,17984
ZPL5	5,2027	4	0,6826	6	-0,16896
ZPL6	5,5453	3	0,9496	1	0,00438
ZPL7	6,5327	1	1,3759	7	-0,18525
Prosek					0,4451

Kada je reč o linijama RfC-tipa (tab. 26), najviši prinos je ostvaren kod linije ZPL2 (6,0833 t/ha) dok je na drugom mestu linija ZPL7 sa 5,4107 t/ha. Najstabilnija linija, prema regresionom koeficijentu, je bila ZPL6, kao i u predhodnom slučaju. Najniža stabilnost prema ovom pokazatelju je ostvarena kod linije ZPL6. U povoljnim uslovima gajenja bolje rezultate su imale linije ZPL1 i ZPL3, dok je prilagodljivija lošijim uslovima bila linija ZPL5. Nešto više vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije su imale linije ZPL1, ZPL2 i ZPL3, pa se za njih može reći da su nešto nestabilnije u poređenju sa drugim linijama.

Tabela 26. Prinos i parametri stabilnosti za linije sa RfC tipom germplazme

Linija	Prinos (t/ha)	Rang	bi	Rang	S_{di}^2
ZPL1	4,4540	5	1,6714	6	0,32640
ZPL2	6,0833	1	0,0102	7	0,30772
ZPL3	4,7087	4	1,5396	5	0,24727
ZPL4	3,9260	7	1,0223	2	-0,22773
ZPL5	4,2080	6	0,6262	4	-0,07745
ZPL6	5,1593	3	1,0131	1	-0,11587
ZPL7	5,4107	2	1,1070	3	-0,08686
Prosek					0,1985

Kod linija koje su imale citoplazmu S-tipa najviši prosečan prinos je ostvarila linija ZPL7, 6,5373 t/ha (tab.27). Odmah iza nje sa prosečnim prinosom od 5,89 t/ha je bila linija ZPL2. Najniži prinos je opet ostvarila linija ZPL4. Najpribližniju vrednost regresionog koeficijenta jedinici je imala linija ZPL1 i kao takva se pokazala najstabilnija i ako je po prinosu bila na pretposlednjem mestu. Linije koje bolje reaguju na povoljnije uslove gajenja su ZPL2 i ZPL3. Sa druge strane, linije koje bolje reaguju na lošije uslove spoljašnje sredine su ZPL4, ZPL5, ZPL6 i ZPL7. Vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije govore da su linije ZPL6 i ZPL7 imale nešto veće vrednosti od nule te da se iz tog razloga mogu smatrati manje stabilnim.

Tabela 27. Prinos i parametri stabilnosti za linije sa S tipom germplazme

Linija	Prinos (t/ha)	Rang	bi	Rang	S_{di}^2
ZPL1	4,5127	6	1,0161	1	-0,04125
ZPL2	5,8900	2	1,5206	7	-0,11419
ZPL3	5,0793	4	1,2085	4	-0,14303
ZPL4	4,2940	7	0,8620	3	-0,22708
ZPL5	4,6600	5	0,7668	5	0,13098
ZPL6	5,4027	3	0,7605	6	0,46973
ZPL7	6,5373	1	0,8681	2	0,50118
Prosek					0,2325

Najrodnija linija iz ranijih ispitivanja ZPL7 imala je najviši prosečan prinos zrna i kada su u pitanju genotipovi sa RfS germplazmom, i to 5,7587 t/ha (tab. 28), a najlošiji prinos je takođe ostvarila linija koja je do sada imala najniži prinos, a to je ZPL4. Kao najstabilnija linija se pokazala ZPL1. Linije koje su imale vrednosti b_i veće od jedan i samim tim su pokazale da se bolje ponašaju u boljim uslovima gajenja, su ZPL3, ZPL6 i ZPL7. Bolju prilagodljivost lošijim uslovima spoljašnje sredine su pokazale linije ZPL2, ZPL4 i ZPL5. Visoku vrednost kvadratnog odstupanja od regresije je pokazala linija ZPL2 i kao takva je nestabilna sa stanovišta ovog pokazatelja. Pored nje nešto veće vrednosti od jedinice su zabeležene kod linija ZPL6 i ZPL5.

Tabela 28. Prinos i parametri stabilnosti za linije sa RfS tipom germplazme

Linija	Prinos (t/ha)	Rang	b_i	Rang	S_{di}^2
ZPL1	4,3930	4	0,8641	1	0,22975
ZPL2	4,2667	6	0,8264	2	1,14202
ZPL3	4,9253	2	1,3161	4	0,11621
ZPL4	4,0847	7	0,6613	5	-0,13285
ZPL5	4,3060	5	0,5495	7	0,31859
ZPL6	4,8960	3	1,2079	3	0,40046
ZPL7	5,7587	1	1,5938	6	0,01884
Prosek					0,3370

5.3. Najbolji tipovi linija kukuruza za ispitivane osobine

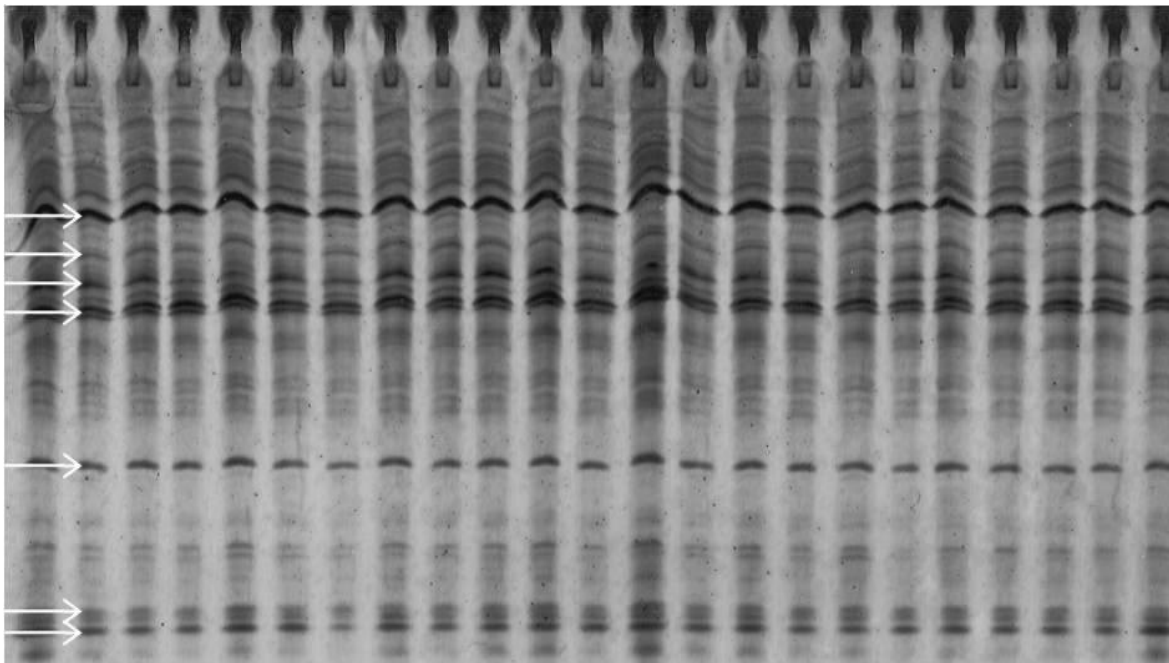
Na osnovu rezultata iz tabele 29. može se reći da su za neke od ispitivanih osobina pogodniji za semensku proizvodnju C i S-tip citoplazme u odnosu na N. Osobine kod kojih su C i S-tip bili bolji od N-tipa su sledeće: prinos zrna, procenat oklaska, broj zrna u redu, dubina zrna, broj zrna po m² i razlika između datuma metličanja i svilanja. Poređenjem C i S-tipa linija došlo se do zaključka da se C-tip bolje pokazao kada su u pitanju sledeće osobine: prinos zrna, procenat oklaska, procenat vlage, broj klipova po biljci, dubina zrna, broj zrna po m², procenat sitne frakcije, procenat otpada, broj zrna sitne frakcije po m², i zaraženost gljivom *Aspergillus flavus*. Sa druge strane, S-tip je pokazao bolje rezultate za: broj zrna u redu, završnu klijavost, procenat nenormalnih klijanaca i manje je bio zaražen gljivom *Fusarium verticillioides*. Što se tiče parametara stabilnosti prinosa zrna, S-tip je stabilniji od C-tipa, što je veoma bitno za semensku proizvodnju kukuruza koja se bazira na inbred linijama, veoma nestabilnim u različitim uslovima spoljne sredine.

Tabela 29. Najbolji tipovi linija za ispitivane osobine

Osobina	Najbolji tip linija za ispitivanu osobinu
Prinos zrna kukuruza (t/ha)	C, S
Procenat oklaska	C, S
Procenat vlage	C
Visina klipa	N
Visina biljke	RfS
Procenat poleglih i slomljenih biljaka	Svi su slični
Broj klipova po biljci	RfC, RfS i C
Dužina klipa (cm)	N, S i C
Broj redova zrna	RfC, RfS
Broj zrna u redu	S, C
Dubina zrna (cm)	C, S
Masa 1000 zrna (g)	Svi su slični
Broj zrna po m ²	C, S
Pojava primarnog korena (%)	RfC, RfS
Završna klijavost (%)	S, RfS i RfC
Procenat nenormalnih klijanaca	RfC, RfS, S
Procenat mrtvih klijanaca	RfS
Procenat krupne frakcije	RfC
Procenat sitne frakcije	RfC, C
Procenat otpada	C, S i N
Broj zrna sitne frakcije po m ²	C
Hektolitarska masa (kg)	RfC, N, S, C
<i>Fusarium verticillioides</i> (%)	S
<i>Aspergillus flavus</i> (%)	RfC, C
Razlika između datuma metličenja i svilanja	S, C
Stabilnost na osnovu srednje vrednosti Sdi ²	RfC, S

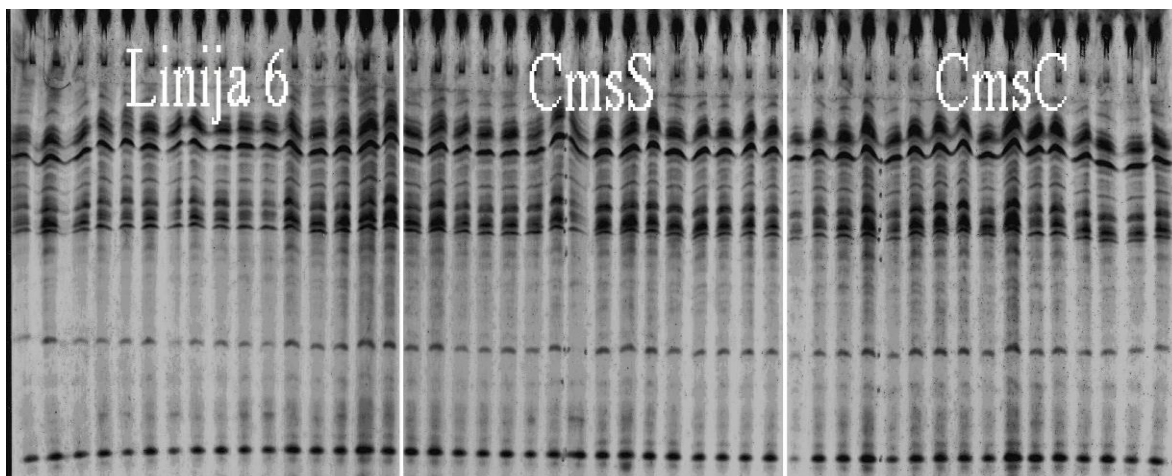
5.4. Primena genetičkih markera

Analizom proteinskih profila dobijenih primenom UTLIEF metode identifikovano je po sedam proteinskih marker traka, karakterističnih za svaku od ispitivanih originalnih linija kukuruza. Proteinske marker trake birane su prema intenzitetu i čitljivosti na gelu. Primer elektroforegrama i identifikovanih marker traka prikazan je na slici 2.

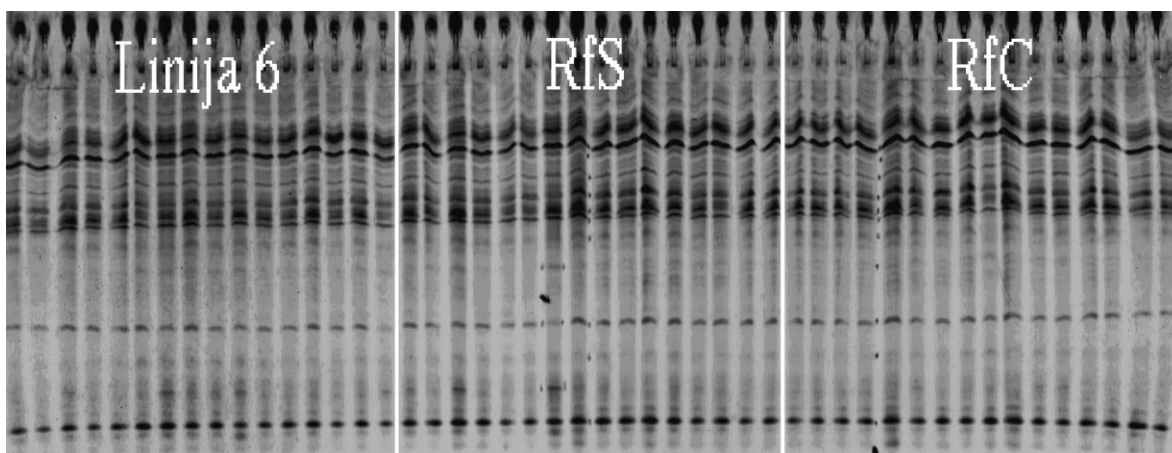


Slika 2. Deo elektroforegrama originalne linije ZPL4 sa obeleženim proteinskim marker trakama.

Na osnovu prisustva/odsustva proteinskih marker traka, odnosno identičnosti proteinskih profila originalnih linija sa njihovim preobraćenim varijantama urađena je verifikacija novonastalih genotipova. Ustanovljeno je da su proteinski profili CMS-Rf varijanti linija 1, 3, 4, 6 i 7 identični sa originalnim linijama (sl. 3 i 4).



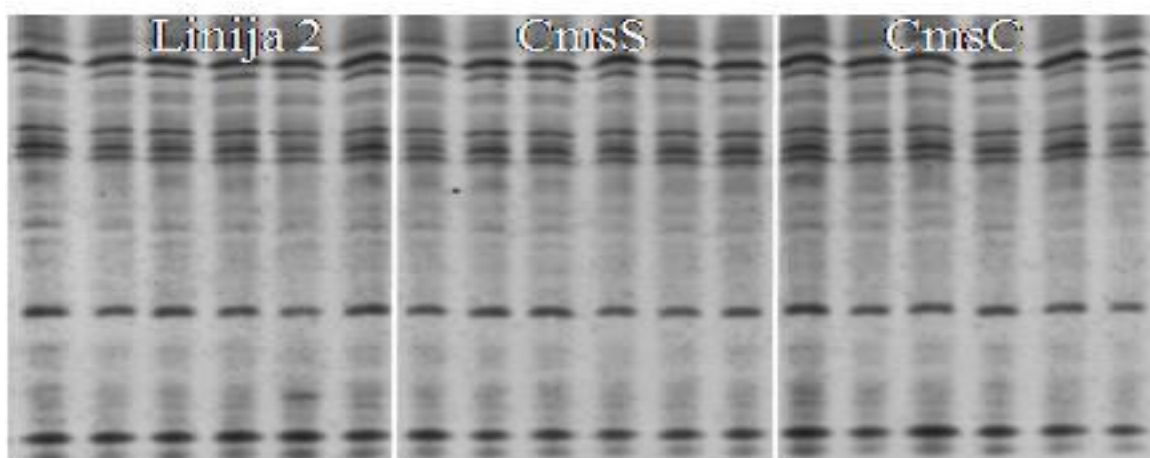
Slika 3. Deo elektroforegrama originalne linije ZPL6 sa njenim CMS-S i CMS-C varijantama



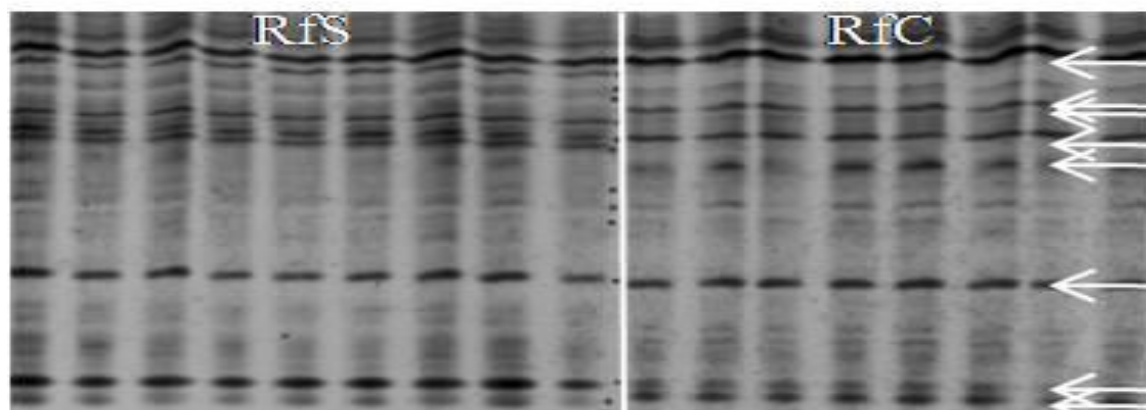
Slika 4. Deo elektroforegrama originalne linije ZPL6 sa njenim RfS i RfC varijantama

Poređenjem elektroforegrama originalne linije ZPL2 sa elektroforegramima njenih CMS-Rf varijanti utvrđeno je da varijanta RfC odstupa po prisustvu-odsustvu proteinskih marker traka kako od originalne linije tako i od ostalih CMS-Rf varijanti te linije (sl. 5 a i b). Broj marker traka po kojima se ova varijanta razlikuje od ostalih varijanti kao i linije od koje su nastale je osam.

a.



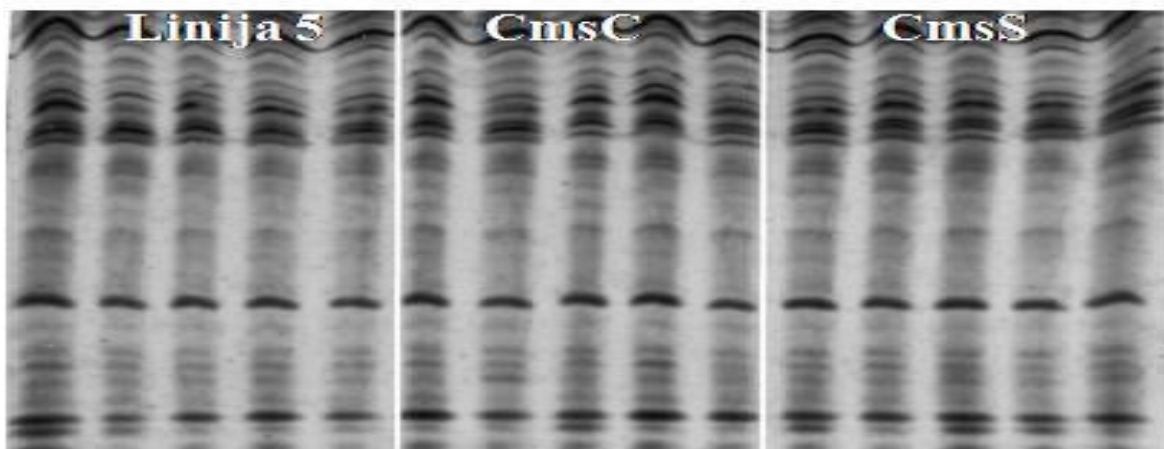
b.



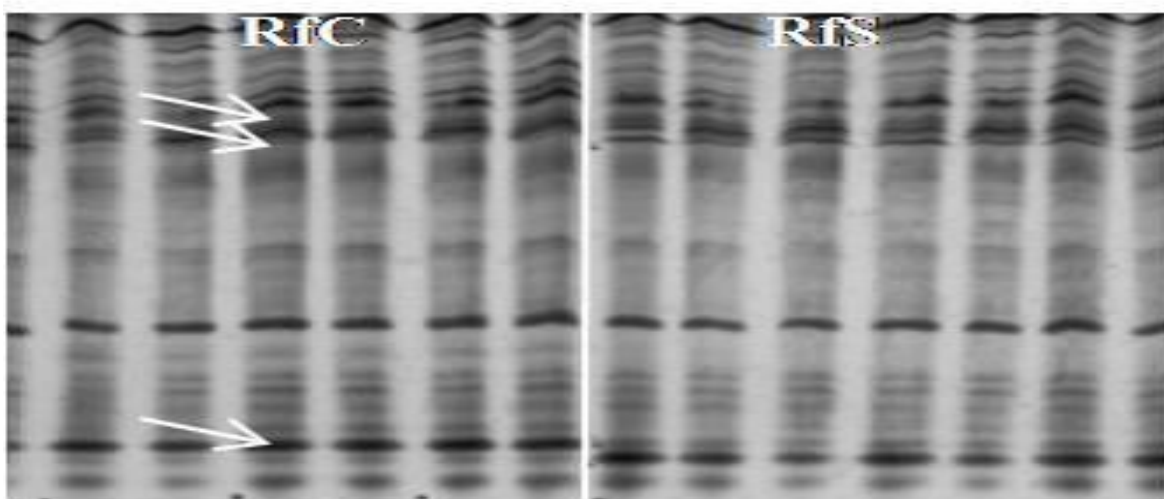
Slika 5. Delovi elektroforegrama originalne linije ZPL2 sa njenim CMS-Rf varijantama.
a. proteinski profili originalne linije ZPL2 i njenih CMS-S i CMS-C varijantama
b. proteinski profili RfS i RfC varijanti linije ZPL2
strelicama su označene proteinske trake po kojima se RfC varijanta razlikuje od marker traka identifikovanih za liniju ZPL2.

Analizom proteinskih profila linije ZPL5 utvrđeno je da se RfC varijanta ove inbred linije razlikuje od ostalih CMS i Rf varijanti u tri proteinske trake (sl. 6 a i b).

a.



b.



Slika 6. Delovi elektroforegrama originalne linije ZPL5 sa njenim CMS-Rf varijantama.

a. proteinski profili originalne linije ZPL5 i njenih CMS-C i CMS-S varijantama

b. proteinski profili RfC i RfS varijanti linije ZPL5

strelicama su označene proteinske trake po kojima se RfC varijanta razlikuje od marker traka identifikovanih za liniju ZPL5.

6. DISKUSIJA

Upotreba C i S tipa citoplazme u proizvodnji hibridnog semena kukuruza zahteva da ovi tipovi citoplazme kao i njihove restorer verzije ne utiču nepovoljno na važne agronomske osobine kukuruza. Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka su sprovedene kontraverzne debate o uticaju CMS-a na prinos zrna. Neke od tih rasprava se vode i danas a pitanje je i dalje da li upotreba CMS-a može dovesti do povećanja prinosa zrna modernih hibrida.

Rf verzije ispitivanih linija dobijene su dopunjenom metodom Eckhardta od strane Vančetović i sar. (2006), pa sadrže i CMS citoplazmu u sebi. Postavlja se pitanje da li one kao takve mogu poslužiti za određivanje uticaja CMS-a (pošto su fertile), ili interakcije CMS i Rf jedarnih gena na ispisivane agronomske osobine.

Naši rezultati pokazuju da su na prinos zrna veoma jak uticaj imali kako genotip tako i spoljašnja sredina i interakcija ova dva faktora. Veoma je bitno napomenuti i to da je tip citoplazme imao veoma značajan uticaj na prinos zrna, a takođe se može reći i to da je interakcija svih faktora veoma značajno uticala na ispitivanu osobinu. Linije koje imaju C i S tip citoplazme dale su veći prinos nego linije sa N citoplazmom kao i RfC i RfS verzije. Ti rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koje su sa T i S tipom citoplazme sprovedeli Duvick (1958, 1965) i Bruce i sar. (1966). Ispitivanja vezana za C-tip citoplazme vršili su Duvick (1972) i Cochran (1975), koji su takođe došli do sličnih rezultata. Sa druge strane, bilo je istraživanja u kojima su rezultati pokazali negativan uticaj CMS-a na prinos (Stringfield, 1958). Novija istraživanja Stamp-a i sar. (2000) na novijim hibridima pokazuju da postoji značajan uticaj CMS-a na prinos zrna pod različitim uslovima spoljašnje sredine. Do sličnih rezultata su došli i Weingartner i sar. (2002), dok istraživanja Munch i sar. (2009) ukazuju na to da ne postoji značajan uticaj tipa citoplazme na prinos zrna. Povećan prinos zrna sterilnih linija u odnosu na njihove fertile analoge se može objasniti činjenicom da se kod sterilnih genotipova troši manje nutritijenata, vode i energije koji su neophodni za stvaranje polena, pa se oni mogu preusmeriti za razvoj klipa u njegovoj početnoj fazi (Criswell i sar., 1974; Sanford i sar., 1965). Posebno se može uočiti pozitivan efekat CMS-a na prinos zrna u stresnim uslovima suše (Chinwuba i sar., 1961;

Bruce i sar., 1966). Kao primer koliko se korisnih nutritijenata potroši na obrazovanje polena može se navesti podatak da suv polen u proseku sadrži 16-30% proteina dok se u jednom vlažnom polenovom zrnu nalazi $2,47 \times 10^{-7}$ g. (Hess, 1990). Dugo godina su selekcioneri stvarali linije koje su imale metlice malog habitusa (Duvick, 1997; Meghji i sar., 1984) zbog smanjene potrebe za vodom i hranivima u odnosu na metlice koje su bile robusnog habitusa. Još jedan od razloga zašto su selekcioneri stvarali takve metlice je i to što takve metlice vrše manje zasenjivanje gornjih listova i samim tim se omogućuje bolje nalivanje zrna i veći prinos (Duncan i sar., 1967). Kod fertilnih metlica gornji listovi su za vreme nalivanja zrna prekriveni delovima antera i slojem polena, što može dovesti do smanjenja prinosa zrna. CMS T-tip je dugo vremena smatran za idealan tip citoplazme (Duvick, 1965) pa je zbog njegove netolerantnosti na patogen *Helminthosporium maydis* nastao problem u proizvodnji hibridnog semena na sterilnoj osnovi. Iz tog razloga je CMS T-tip povučen iz upotrebe i proizvodnja hibrida kukuruza se vratila na korišćenje linija sa normalnom germplazmom. Čak su neki istraživači postavili pitanje o tome da li je neophodna upotreba hibrida na CMS osnovi i pored toga što su ti hibridi davali veći prinos (Everett, 1960; Lim, i sar., 1974). Kasnije se prelazi na upotrebu C i S tipa citoplazme u proizvodnji hibridnog semena. Istraživanja Duvick-a (1972), Cochran-a (1975) i Josephson-a i Morgan-a (1978) pokazala su da je CMS-C tip pogodniji za proizvodnju hibridnog semena od CMS-S tipa, a manje pogodan od CMS-T tipa. Može se reći da su se u periodu do 1970 godine vršila mnogobrojna istraživanja o uticaju CMS-a na prinos zrna i druge važne karakteristike kao što su komponente prinosa, morfološke osobine fitopatološke analize itd. Nakon toga na ovom polju, kada su istraživanja u pitanju sledi zatišje jer se T-tip citoplazme pokazao kao netolerantan na patogene i bolesti. Tek istraživanja Stamp-a i sar. (2000) nam daju informacije o uticaju CMS-a na prinos hibrida i njegove komponente. U poslednjim dekadama genetika je donela značajna unaperđenja u pogledu genetičkog potencijala rodosti (Russell, 1991). Iz tog razloga bi trebalo ponovo ispitati uticaj CMS-a na prinos i njegove komponente kod novih-modernih hibrida. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su se linije sa C-tipom citoplazme u pogledu prinosa najbolje pokazale, da su imale bolji prinos i od linija sa S-tipom citoplazme.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije pokazuju da je tip citoplazme veoma značajno uticao na procenat oklaska. Najveće vrednosti na nivoima značajnosti 0,05 i 0,01 za osobinu procenat oklaska imali su genotipovi sa RfS-tipom germplazme, dok su najniže vrednosti ovog parametra zabeležene kod linija sa S i C tipom citoplazme što je veoma dobro jer svaki selekcionar teži da dobije klipove kod kojih će što manji udeo zauzimati oklasak i time povećati prinos. Sa aspekta prinosa ova pojava se može smatrati kao pozitivna u proizvodnji hibridnog semena kukuruza.

Na procenat vlage u momentu berbe su svi faktori i sve interakcije faktora uticale veoma signifikantno. Najviša vrednost ovog pokazatelja na oba nivoa značajnosti je bila kod RfC linija. Najniži % vlage je uočen kod linija sa C-tipom citoplazme i to na oba nivoa značajnosti. Rezultat dobijeni u ovom istraživanju pokazuju da postoji indicija da se upotrebom linija sa C-tipom citoplazme smanjuje sadržaj vlage u momentu berbe i samim tim se skraćuje vegetacioni period i vreme berbe kukuruza. To je veoma bitan pokazatelj, iz razloga što svaki farmer koji bere kukuruz u zrnju (kombajnira ga) želi da tu operaciju obavi u što kraćem vremenskom periodu. Suprotno ovim nalazima, Rojc i sar. (1984) nisu utvrdili značajnu razliku između hibrida sa normalnom citoplazmom i njihovih sterilnih C analoga kada je ovaj pokazatelj u pitanju. Pošto o procentu vlage u momentu berbe nema puno podataka u kontekstu muške sterilnosti, istraživanja na ovu temu bi trebalo nastaviti.

Analiza morfoloških osobina visina klipa, visina biljke i procenat poleglih i slomljenih biljaka pokazuju da su na sva tri ispitivana parametra veoma značajan uticaj imala sva tri ispitivana faktora (G, L i T). Što se tiče osobine visine klipa, sa gledišta selekcionera i proizvođača postoji težnja da je klip na biljci što niže pozicioniran kako bi se smanjilo poleganje i pucanje stabla, a ovi trendovi se zapažaju i u istraživanjima Meghji i sar. (1984) i Duvick i sar. (2004b). Test najmanje značajne razlike za srednje vrednosti je pokazao da je na oba nivoa značajnosti najniža vrednost osobine visina klipa ostvarena kod linija sa normalnom germplazmom, tako da se može zaključiti da unošenje novih gena u linije dovodi do povećanja visine klipa.

Ako se posmatra osobina visina biljke u današnje vreme postoji težnja ka njenom snižavanju (Russell, 1984), kako bi se smanjio njen habitus i povećala gustina biljaka po jedinici površine. Samim tim unošenjem novih gena ne bi bilo poželjno povećavati visinu biljke. Rezultati testa najmanje značajne razlike za srednje vrednosti govore da je najviša visina biljke zabeležena kod genotipova sa RfC germplazmom na oba nivoa značajnosti. Razlike između genotipova sa originalnom germplazmom i C i S genotipova su za ovaj parametar bile zanemarljive što je u saglasnosti sa istraživanjima Rojc-a i sar. (1984).

Na procenat pleglih i slomljenih biljaka nije značajno uticao tip germplazme linija. Ovaj pokazatelj kao takav nije poželjan zato što dovodi do smanjenja prinosa. Najveća vrednost procenta pleglih i slomljenih biljaka zabeležena je kod linija sa originalnom germplazmom, a najmanja kod linija sa C-tipom citoplazme, pa se iz ovog može izvući zaključak da uvođenje novih gena dovodi do povećanja otpornosti na poleganje. Ispitivanja Rojc-a i sar. (1984) su pokazala suprotne rezultate. U njihovim istraživanjima sterilni hibridi su imali za 1% veći broj polomljenih biljaka u odnosu na njihove fertilne analoge.

U istraživanjima Crosbie-a (1982), Russell-a (1985) i Duvick-a (2004b) se vidi konstantno povećanje kroz dekade broja klipova po biljci, naročito u stresnim uslovima povećane gustine useva. Ovo je takođe veoma bitan pokazatelj sa stanovišta povećanja prinosa i poželjno bi bilo da se sa ubacivanjem restorer gena i gena za sterilnost ne smanji broj klipova po biljci, čak i da se taj parametar uveća. U sprovedenom istraživanju svi ispitivani faktori, kao i njihove interakcije, veoma signifikantno utiču na osobinu broj klipova po biljci. Najniža vrednost ovog pokazatelja je utvrđena kod genotipova sa N citoplazmom na oba nivoa značajnosti. Samim tim se može zaključiti da je unošenje novih gena dovelo do povećanja broja klipova po biljci. Ispitivanja Stampa i sar. (2000) govore da na broj klipova po m^2 pozitivno utiče T-tip sterilnosti u odnosu na N-tip.

Uticao sterilnih analoga na komponente prinosa bi trebao da bude pozitivan zbog manje potrošnje energije i nutrienata zbog neobrazovanja polena. Na komponente prinosa je postajao značajan uticaj svih ispitivanih faktora i njihovih interakcija. Ne može se zaključiti da postoji značajan uticaj na dužinu klipa u zavisnosti od tipa germplazme.

Dodavanjem novih gena dolazi do povećanja broja redova zrna, dok se za broj zrna u redu može reći da je on veći kod linija sa S i C tipom citoplazme. Isto se može zaključiti i kada je u pitanju dubina zrna. Sve ove pojave se mogu smatrati pozitivnim sa aspekta unapređenja i poboljšanja semenske proizvodnje, koje je nastalo usled unošenja novih gena. Masa hiljadu zrna se nije razlikovala na nivou značajnosti 1%, dok su na nivou značajnosti 5% najvišu vrednost ovog pokazatelja ostvarili genotipovi sa normalnom germplazmom, što je u saglasnosti sa rezultatima Lim-a i sar. (1974), ali su ta istraživanja rađena na hibridima gde su se poredili normalni i T genotipovi. Weingartner i sar. (2002) su uočili minimalne promene ovog pokazatelja između genotipova sa normalnim i T-tipom citoplazme, dok su istraživanja Munsch-a i sar. (2009) pokazala da T i C citoplazma nepovoljno utiču na ovaj parametar. Kada je broj zrna po metru kvadratnom u pitanju, najviše vrednosti zabeležene su kod linija sa S i C tipom citoplazme i to na oba nivoa značajnosti. Ovo je veoma bitno i pozitivno za semensku proizvodnju na CMS osnovi. Rezultati Weingartner i sar. (2002) pokazuju značajan uticaj C citoplazme na vrednosti ovog pokazatelja. Takođe, Munsch i sar. (2009) dolaze do sličnih rezultata.

Može se reći da nisu vršena iscrpna istraživanja o uticaju različitih tipova sterilnosti i njihovih restorera u poređenju sa fertilnim analogima na osobine semena. Ocena pojave primarnog korena i završna klijavost predstavljaju veoma bitne osobine semena, pa bi iz tog razloga trebalo vršiti više ispitivanja na ovu temu, tj. uticaj germplazme na ove pokazatelje. Svi faktori su značajno uticali, na osobine semena, osim na osobinu procenat nenormalnih klijanaca na koju faktor spoljašnje sredine nije značajno uticao. Interakcije svih faktora su veoma značajno uticale na sve ispitivane osobine semena. Najniži procenat pojave primarnog korena je zabeležen kod genotipova sa normalnom germplazmom i to na oba nivoa značajnosti. Odavde se može zaključiti da unošenje novih gena u ispitivane linije dovodi do povećavanja vrednosti ovog pokazatelja. Pri ocenjivanju završne klijavosti takođe najniže vrednosti na oba nivoa signifikantnosti zabeležene su kod linija sa N citoplazmom. Iz svega ovoga može se izvesti isti zaključak kao i za prethodno ispitivanu osobinu, tj. da se sa unošenjem novih gena povećava klijavost semena. Osobina koja nije poželjna, procenat nenormalnih klijanaca, je bio najviši kod N linija, dok je kod ostalih

analoga vrednost ovog pokazatelja bila niža, što je svakako veoma dobro sa stanovišta semenara. Procenat mrtvih klijanaca je takođe bio najviši kod linija sa originalnom citoplazmom, i to na oba nivoa značajnosti, što opet govori da se unošenjem novih gena povećava broj normalnih klijanaca i u isto vreme smanjuje broj nenormalnih i mrtvih semena.

U proizvodnji hibridnog semena kukuruza se teži da komponenta majke uvek ima veći procentualni udeo sitne frakcije, zbog isplativosti proizvodnje, jer samim tim imamo veći broj zrna po jedinici mase. Svih sedam ispitivanih linija se mogu koristiti kao majke i kao očeve, iako je većina njih poreklom iz Lancaster heterotične grupe, pa je iz tog razloga bila veoma bitna i analiza procentualnog učešća frakcija semena. Svi faktori i njihove interakcije su veoma značajno uticale na procentualni udeo krupne frakcije, sitne frakcije i otpada. Najveće učešće sitne frakcije je zabeleženo kod svih pet tipova linija. Po ovim podacima ne mogu se izvući jasni zaključci da li tip citoplazme i restorer geni utiču na procentualni udeo frakcija semena. Na broj zrna sitne frakcije po m^2 svi faktori i interakcije su značajno uticali osim interakcije (L x T), koja nije značajno uticala na ispitivanu osobinu. Najveće vrednosti ovog pokazatelja su ostvarene kod linija koje su u sebi imale C citoplazmu, što je pokazano na oba nivoa značajnosti. Na osnovu ovog rezultata možemo reći da se C-tip pokazao kao najpogodniji za semensku proizvodnju. Najmanju hektolitarsku masu na oba nivoa značajnosti su zabeležili genotipovi sa RfS gerplazmom. Za ovu semenarsku osobinu ne može se izvući zaključak kako tip germplazme utiče na istu.

Postoje razni razlozi za sprovođenje fitopatoloških analiza. Ako se osvrnemo na događaje koji su se dogodili sedamdesetih godina prošlog veka, Shielfe i sar. (1969) su primetili da genotipovi sa CMS-T tipom citoplazme pokazuju povećanu osetljivost na lisnu pegavost koju izaziva *Philosticta maydis*. Hooker (1970) objavljuje rad u kome kaže da je „Najveći deo površina najvrednije američke biljne kulture sada uniformno osetljiv i izložen patogenu sposobnom da dostigne razmere epifitocije“. Ova predviđanja su se ostvarila. *Helmithosporium maydis* rase „T“ 1971 godine pustoši polja pod kukuruzom u SAD-u. Iz tih razloga je neophodno konstantno proveravati tolerantnost na patogene sterilnih linija u odnosu na njihove fertilne analoge. Vršeći fitopatološke analize došli smo do zaključka da

su naši genotipovi bili izloženi napadu dveju vrsta gljiva *Fusarium verticillioides* i *Aspergillus flavus*. *Fusarium verticillioides* dovodi do smanjenja prinosa zrna i utiče na proces mokrog mlevenja gde dolazi do pojave i biosinteze mikotoksina fumonizina (Munkvold i Desjardins, 1997; Lević i sar., 2004). Istraživanja Headrick-a i Patakzy-a (1991) govore da postoji veliki materinski uticaj na heritabilnost kukuruza u pogledu nasleđivanja otpornosti zrna na napad tog patogena. *Aspergillus flavus* proizvodi aflatoksin koji je odgovoran za mnoge bolesti ljudi i životinja (Bennett i Klich, 2003; Gourama i Bullerman, 1995). Smatra se da aflatoksini izazivaju najgore oblike karcinoma. Na oba patogena veoma signifikantno utiču genotip i lokalitet, dok njihova interakcije ne utiče značajno na procentualni udeo zaraženog semena gljivom *Fusarium verticillioides*. Takođe je veoma bitno napomenuti i to da tip linije značajno utiče na procenat semena zaraženog sa *Fusarium verticillioides* i veoma značajno na udeo semena napadnutog od strane *Aspergillus flavus*. RfC-tip linija je najviše bio zaražen gljivom *Fusarium verticillioides* i to na oba nivoa značajnosti. Iz ovih rezultata se ne može zaključiti da su linije sa C i S tipom citoplazme bile više napadnute ovim patogenom od linija sa normalnom citoplazmom. Božinović i sar. (2010) su došli do zaključka da su hibridi koji u sebi sadrže sterilnu citoplazmu podložnije napadu tog patogena. Najjači napad gljive *Aspergillus flavus* je na oba nivoa značajnosti zabeležen kod linija sa S-tipom citoplazme, dok su C i RfC tip imali manje zaraženog semena od linija sa N citoplazmom, što je takođe potvrđeno na oba nivoa značajnosti. Može se izvesti zaključak da je, prema istraživanju na tolerantnost na napad tog patogena, bolje rezultate pokazao C-tip citoplazme u odnosu na S-tip, te da je kao takav pogodniji za semensku proizvodnju.

Još jedna osobina koja je analizirana u ovom istraživanju je razlika datuma metličanja i svilanja (ASI). Ukoliko je taj interval kraći smatra se da su linije tolerantnije na sušu jer im se u tom slučaju poklapa period prašenja metlica i svilanja klipa, što bi trebalo da obezbedi bolje oplodjenje. Iz tog razloga se teži da se u selekciji dobiju linije sa što kraćim ASI-jem. Cilj je bio da se ispita da li unošenje novih gena značajno utiče na promenu vrednosti tog parametra. Svi ispitivani faktori i njihove interakcije značajno su uticali na ovu osobinu. Linije sa normalnom germplazmom su pokazale najveće vrednosti

ovog parametra na oba ispitivana nivoa značajnosti. Linije sa C i S tipom citoplazme su imale kraći vremenski interval između metličanja i svilanja u poređenju sa drugim tipovima linija, a linije S-tipa su na oba nivoa značajnosti imale najniže vrednosti ove osobine, odakle se zaključuje da su linije S-tipa najtolerantnije na sušu i samim tim najpogodnije za semensku proizvodnju, po ovom parametru.

U poslednjih sedamdeset godina razvijeno je nekoliko modela za testiranje adaptibilnosti i stabilnosti prinosa (Yates i Cochran, 1938, Finlay i Wilkinson, 1963). Do sada najkorišćeniji metod za analizu stabilnosti su razvili Eberhart i Russell (1966), koji se bazira na regresionom koeficijentu b_i i standardnoj devijaciji od regresije Sd_i^2 .

Na osnovu podataka dobijenih analizom prinosa zrna metodom Eberharta i Russella može se zaključiti da je od svih sedam linija najprinosnija bila ZPL7 za sve tipove (blokove) osim za RfC-tip, u okviru kog je zauzela drugo mesto. Posmatrano iz ugla prinosa zrna linija ZPL7 je najpovoljnija za semensku proizvodnju naročito ako se koristi kao majka. Sa druge strane linija koja je imala najniži prinos u svim tipovima (blokovima) je bila linija ZPL4, pa na osnovu njenog nižeg prinosa u odnosu na druge linije može se preporučiti da ovu liniju koristimo kao oca. Za ostale ispitivane linije može se reći da imaju relativno dobar prinos, te da se mogu koristiti i kao majka i kao otac u proizvodnji hibridnog semena kukuruza. Ako se pogleda vrednosti regresionih koeficijenata dolazi se do zaključka da je linija ZPL1 bila najbolje rangirana u okviru linija sa N, S i RfS tipom germplazme, te se kao takva u okviru ovih tipova linija može smatrati najstabilnija. U okviru linija C-tipa i RfC-tipa najpribližnije vrednosti jedinici je imala linija ZPL6, dok se linija ZPL1 nalazi tek na četvrtom mestu u okviru C-tipa linija i na šestom mestu u okviru RfC-tipa linija. Ne može se izvući zaključak koja linija ima najlošije vrednosti ovog pokazatelja kroz različite tipove (blokove) linija. Na osnovu kvadratnog odstupanja od regresije su skoro sve linije u različitim tipovima bile relativno stabilne. Nešto veće vrednosti od jedinice su imale linije ZPL7 N-tipa; ZPL1; ZPL2 RfC-tipa; ZPL6 i ZPL7 S-tipa i linije ZPL1 i ZPL6 RfS-tipa, te se kao takve mogu smatrati nešto manje adaptibilnim i stabilnim, dok linije ZPL2 C-tipa i ZPL2 RfS-tipa imaju značajno više vrednosti ovog

parametra od nule i kao takve se mogu smatrati veoma nestabilnim, a samim tim i nepouzdanim za semensku proizvodnju.

Kada se posmatraju srednje vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije za prinos zrna vidi se da su linije sa S-tipom citoplazme stabilnije od C-tipa linija, pa se kao takve mogu smatrati pogodnije za semensku proizvodnju kukuruza, naročito ako se zna da su inbred linije po svojoj prirodi nestabilne u različitim uslovima spoljašnje sredine.

Poređenjem C i S-tipa sa N-tipom se uvidelo da su ova dva tipa sterilnosti pozitivno uticali na poboljšanje nekih od ispitivanih osobina kao što su na prvom mestu prinos zrna, procenat oklaska, broj zrna u redu, dubina zrna, broj zrna po m² i razlika između datuma metličenje i svilanja. Prilikom poređenja C i S-tipa linija između sebe uvidelo se da je C-tip bio bolji pre svega za prinos zrna. Iz tog razloga može se reći da je C-tip nešto povoljniji za semensku proizvodnju, što su potvrdila i dosadašnja istraživanja Duvick-a (1972), Cochran-a (1975) i Josephson-a i Morgan-a (1978). Iz ugla tolerantnosti na patogene može se reći da je S-tip povoljniji za semensku proizvodnju u rejonima koji su jako napadnuti gljivom *Fusarium verticillioides*, dok je C-tip pogodniji tamo gde je izražena zaraženost *Aspergillus flavus*-om. Kada su posmatrane apsolutne prosečne vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije za prinos zrna videlo se da je S-tip stabilniji od C-tipa i samim tim pogodniji za semensku proizvodnju. Ovaj parametar je izuzetno bitan iz razloga što su inbred linije koje se koriste u semenskoj proizvodnji po prirodi nestabilne. To što su N, RfC i RfS verzije ispitivanih linija manje rodne od svojih sterilnih analoga nije toliko bitno, pošto se u semenskoj proizvodnji koriste kao očevi, koji se vrlo često uništavaju po završenom oplodjenju.

Primena izoelektričnog fokusiranja do sada nije korišćena u ove svrhe, tako da upotreba ovih markera u budućnosti može predstavljati brz i efikasan način za poređenje originalnih i prevedenih linija, a samim tim ovi markeri mogu dati informaciju da li je proces prevođenja urađen dobro i do kraja i da li je eventualno došlo do stranooplodnje prevedenih linija. Na osnovu rezultata dobijenih primenom proteinskih markera konstatovano je da je proces prevođenja skoro svih linija urađen kako treba i do kraja.

Jedino nije došlo do poklapanja rezultata na foregramima između originalnih linija i linija ZPL2 RfC i ZPL5 RfC. Za njih se može reći da nisu prevedene do kraja i da je neophodno još 2-3 povratna ukrštanja kako bi se proces prevođenja doveo do kraja.

7. ZAKLJUČAK

Svih sedam analiziranih inbred linija kukuruza pokazale su zadovoljavajući stepen sterilnosti u obe eksperimentalne godine. Ni kod S ni kod C-tipa sterilnih linija nije došlo do probijanja sterilnosti (late break of sterility). Ovaj pokazatelj je veoma bitan sa gledišta semenske proizvodnje kukuruza, tako da se može zaključiti da su oba ispitivana tipa sterilnosti pogodna sa stanovišta probijanja sterilnosti.

Potvrđena je pretpostavka iz radne hipoteze da će sterilne linije imati viši prinos od linija sa N citoplazmom. Sterilni analozi ne samo da su bili bolji kada je prinos zrna u pitanju, već i kada su u pitanju i druge agronomske osobine.

Za veći broj ispitivanih osobina C-tip se pokazao kao povoljniji za semensku proizvodnju. Što se tiče prinosa zrna, koji je i najbitnija osobina kada je semenska proizvodnja u pitanju, C-tip je imao viši prinos od svih pet analoga.

Iz rezultata vezanih za prinos zrna može se zaključiti da su RfC i RfS verzije ispitivanih linija imale niži prinos od svojih sterilnih analoga, što nije toliko značajno u praksi jer se u semenskoj proizvodnji ove linije koriste kao očevi, koji vrlo često bivaju uništeni po završetku oplodjenja.

Veoma bitna osobina kada je semenska proizvodnja i gajenje kukuruza u pitanju je tolerantnost S i C-tipa linija na patogene. S-tip linija je podložniji napadu gljive *Aspergillus flavus*, dok je C-tip bio netolerantniji na napad gljive *Fusarium verticillioides*. Iz svega ovog može se zaključiti da u rejonima koji su podložni napadu gljive *Aspergillus flavus* u semenskoj proizvodnji treba koristiti linije C-tipa sterilnosti, dok sa druge strane na područjima koja su pod „udarom“ gljive *Fusarium verticillioides* pogodniji je S-tip sterilnosti.

Na osnovu srednjih vrednosti kvadratnog odstupanja od regresije za prinos zrna zaključeno je da je S-tip sterilnosti nešto stabilniji od C-tipa u različitim uslovima spoljašnje sredine.

Upotrebom proteinskih markera je na brz i jednostavan način utvrđeno da je prevođenje skoro svih linija urađeno dobro i do kraja. Na osnovu toga može se konstatovati da su razlike u agronomskim osobinama između N i prevedenih linija nastale usled plejotropnog efekta CMS i/ili Rf gena ili usled njihove interakcije sa spoljašnjom sredinom.

U periodu od sedamdesetih godina prošlog veka pa do danas nije vršeno mnogo istraživanja vezanih za ovu temu. Do smanjenog inteziteta istraživanja dolazi zbog epifitocije gljive *Helminthosporium maydis* i iz tog razloga se upotreba CMS-a u proizvodnji kukuruza smatra kao veoma rizična. Baš zbog svega navedenog istraživanja na ovu temu bi trebalo nastaviti i ustanoviti kako se nove (moderne) linije ponašaju ako se u semenskoj proizvodnji koriste njihovi sterilni analozi.

8. LITERATURA

- Airy, J.M. (1950) Current problems of detasseling. Rept. 5th Ann. Hybrid Corn Industry Res. Conf., 5: 7-17.
- Babu, R., Sudha K. Nair, Prasanna, B.M., Gupta, H.S. (2004) Integrating marker-assisted selection in crop breeding-Prospects and challenges. *Current Science*, 87 (5): 607-614.
- Beckett, J.B. (1971) Classification of male-sterile cytoplasm in maize. *Crop Sci.*, 11: 724-727.
- Bennett, J.W., Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 497-516.
- Božinović, S., Vančetović, J., Lević J., Stanković S. (2010) The effect of cytoplasmic male sterility and xenia on maize kernel infection with *Fusarium verticillioides*. Proceedings of 45th Croatian and 5th international Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia. pp: 380-384.
- Bruce, R.R., Sanford, J.O., Myhre, D.L. (1966) Soil water and nitrogen influence on growth and fruiting of a cytoplasmic male-sterile corn hybrid and its fertile counterpart. *Agron. J.*, 58: 631-634.
- Buchert, J.G. (1961) The stage of the genome-plasmon interaction in the restoration of fertility to cytoplasmically pollen sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47: 1436-1440.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. (1994) *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Chase, C.D. (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics*, 23:81-90.

- Chinwuba, P.M., Grogan, C.O., Zuber, M.S. (1961) Interaction of detasseling, sterility and spacing on yields of maize hybrids. *Crop Sci.*, 1: 279-281.
- Cochram, D.E. (1975) Progress of cytoplasmic and genetic sterility in hybrid seed corn production. *Proc of the 30th Ann. Corn and Sorghum Res. Conf.*, 30: 116-130.
- Criswell, J.G., Hume, D.J., Tarnner, J.W. (1974) Effect of cytoplasmic male sterility on accumulation and translocation of ¹⁴C-labelled assimilates in corn. *Crop Sci.*, 14: 252-254.
- Crosbie, T.M. (1982) Changes in physiological traits associated with long-term breeding efforts to improve grain yield of maize. pp. 206-223. *In: H.D. Loden, D. Wilkinson (Eds.), Proc. 37th Annual Corn & Sorghum Res. Conf., 5-9 Dec., 1982, Vol. 37. American Seed Trade Association, Washington, DC, Chicago, IL.*
- Dačić, V., Mirić, M., Sabovljević R., Mišić-Stanković Z. (1997) Uticaj mehaničke ujednačenosti i uslova proizvodnje na klijavost hibridnog semena kukuruza. *Zbornik izvoda II JUSEUM*, 30.
- Dill, C.L., Wise, R.P., Schnable, P.S. (1997) Rf8 and Rf* mediate unique T-urf13-transcript accumulation, revealing a conserved motif associated with RNA processing and restoration of pollen fertility in T-cytoplasm maize. *Genetics*, 147:1367-1379.
- Duncan, W.G., Williams, W.A., Loomis, R.S. (1967) Tassels and the productivity of maize. *Crop Sci.*, 7: 37-39.
- Duvick, D.N. (1956) Allelism and comparative genetics of fertile restoration of cytoplasmically pollen sterile maize. *Genetics*, 41: 544-565.
- Duvick, D.N. (1958) Yields and other agronomic characteristics of cytoplasmically pollen sterile corn hybrids, compared to their normal counterparts. *Agron. J.*, 50: 121-125.
- Duvick, D.N. (1959) The use of cytoplasmic male sterility in hybrid seed production. *Econ. Bot.*, 13:167-95.

- Duvick, D.N. (1965) Cytoplasmic pollen sterility in corn. *Advances in Genetics*, 13:1-56.
- Duvick, D.N. (1972) Potential usefulness of new cytoplasmic male steriles and sterility systems. *Proc. of the 27th Ann. Corn and Sorghum Res. Conf.*, pp. 197-201.
- Duvick, D.N. (1997) What is yield? pp. 332-335. *In: G.O. Edmeades, et al. (Eds.), Developing Drought- and Low N-Tolerant Maize. Proceedings of a Symposium, March 25-29, 1996, CIMMYT, El Batan, Mexico. CIMMYT, México, D.F.*
- Duvick, D.N., Smith, J.S.C., Cooper, M. (2004) Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. pp. 109-151. *In: J. Janick (Ed.), Plant Breeding Reviews. Part 2. Long Term Selection: Crops, Animals, and Bacteria, Vol. 24. John Wiley & Sons, New York.*
- Eberhart, S.A., Russell W.A. (1966) Stability parameters for comparing varieties. *Crop Sci.*, 6: 36-40.
- Everett, H.L. (1960) Effect of cytoplasm and Rf gene in maize. *Agron. J.*, 52: 215-216.
- Forde, B.G., Oliver, R.J.C., Leaver, C.J. (1978) Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 (8): 3841-3845.
- Gabay-Laughnan, S., Laughnan, J.R. (1983) Characteristics of low-frequency male-fertile revertants in S male-sterile inbred lines of maize. *Maydica*, 28: 251-263.
- Gourama, H., Bullerman, L.B. (1995) *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J. Food Prot.*, 58: 1395-1404.
- Gracen, V.E., Kheyr-Pour, A., Earle, E.D., Gregory, P. (1979) Cytoplasmic inheritance of male sterility and pest resistance. *Proc. of 34th Ann. Corn and Sorghum Res. Conf.*, pp. 76-91.

- Hess, D. (1990) Die Blüte. Eine Einführung in Struktur und Funktion, Ökologie und Evolution der Blüten. Mit Anleitungen zu einfachen Versuchen. Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Hooker, A.L., Smith, D.R., Lim, S.M., Beckett, J.B. (1970) Reaction of corn Seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. Plant. Dis. Rep., 54: 708-712.
- Hu, Y.M., Tang, J.H., Yang, H., Xie, H.L., Lu, X.M., Niu, J.H., Chen, W.C. (2006) Identification and mapping of Rf-I an inhibitor of the Rf5 restorer gene for Cms-C in maize (*Zea mays* L.) Theor. Appl. Genet., 113: 357-360.
- Huey, J.R. (1971) Experiences and results of mechanical topping versus detasseling in 1971. Proc. of 26th Corn Res. Conf., Amer. Seed Trade Assoc., pp. 144-147.
- ISTA (2012) International Rules for Seed Testing. Annex to Chapter 7 Seed Health Testing. Seed Health Testing Methods. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Jones, D.F. (1950) The interrelation of plasmagones and chromosomes in pollen production of maize. Genetics, 35: 509-512.
- Jones, D.F., Stinson, H. T. J., Khoo, U. (1957) Pollen restoring genes. Conn. Agrc. Exp. Stn. Bull., 610:1-43.
- Josephson, L.M., Morgan, T.E., Arnold, J.M. (1978) Genetics and inheritance of fertility restoration of male-sterile cytoplasm in corn. Proc. 33rd Ann. Corn Sorghum Res. Conf. 33:48-59.
- Laser, K.D., Lersten. N.R. (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev., 38:425-454.
- Lević, J., Stanković, S., Bočarov-Stančić, A., Škrinjar, M., Mašić, Z. (2004) Overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Serbia and Montenegro. In Logerieco, A.,

- Visconti, A. (eds), An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe, Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 201-218.
- Lević J., Stanković S., Krnjaja V., Bočarov-Stančić A., Ivanović D. (2012) Pojava i učestalost patogena semena žita i industrijskih biljaka u Srbiji. *Pestic. Phytomed.* (Belgrade), 27(1): 33–40.
- Lim, S.M., Hooker, A.L., Kinsey, J.G., Smith, D.R. (1974) Comparative grain yields of corn hybrids in normal and in Texas male-sterile cytoplasm (cms-T) infected with *Helminthosporium maydis* race T and disease components of cms-T corn hybrids. *Crop Sci.*, 14: 190-195.
- Meghji, M.R., Dudley, J.W., Lambert, R.J., Sprague, G.F. (1984) Inbreeding depression, inbred and hybrid grain yields, and other traits of maize genotypes representing three eras. *Crop Sci.*, 24: 545-549.
- Mercado, A.C., Lantican, R.M. (1961) The susceptibility of cytoplasmic male sterile lines of corn to *Helminthosporium maydis* (Nis. and Miy.). *Philippine Agriculturalist*, 45: 253-243.
- MSTAT Development Team (1989) MSTAT-C: A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. MSTAT Development Team, Michigan State University, East Lansing.
- Munsch, M., Camp, K.H., Stamp, P., Weider, C. (2009) Modern maize hybrids can improve grain yield as plus-hybrids by the combined effect of cytoplasmic male sterility and allo pollination. *Maydica*, 53: 261-268.
- Munkvold, G.P., Desjardins, A.E. (1997) Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant. Dis.*, 81: 555-565.
- Newton, K.J. (1988) Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39:503-532.

- Poehlman, J.M., Sleper, D.A. (1995) Breeding field crops. Breeding Field Crops Fourth Edition, Iowa State University Press, Ames, SB 185.7.P63, pp. 369-387.
- Radola, B.J. (1980) Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 mm polyacrylamide gels on silanized glass plate or polyester films. Electrophoresis 1:43-56.
- Rhoeds, M.M. (1931) The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. Science, 73: 340-341.
- Rhoeds, M.M. (1933) The cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. J. Genetics, 27: 71-93.
- Rogers, J.S. (1952) Use of male-sterile stocks in the production of corn hybrids. Proc of 7th Ann. Hybrid Corn Res. Conf., pp. 7-12.
- Rogers, J.S., Edwardson, J.R. (1952) The utilization of cytoplasmic male sterile inbreds in the production of corn hybrids. Agron. J., 44: 8-13.
- Rojc, M., Parlov, D., Tomičić, B., Sever, J., Majhen, J. (1984) Mogućnost korišćenja muške sterilnosti kukuruza u hibridnim kombinacijama BC kreacija. Poljoprivredne Aktuelnosti, vol 20. br. 1-2/84: 195-203.
- Russell, W.A. (1984) Agronomic performance of maize cultivars representing different eras of breeding. Maydica, 29: 375-390.
- Russell, W.A. (1985) Evaluations for plant, ear, and grain traits of maize cultivars representing seven eras of breeding. Maydica, 30: 85-96.
- Russell, W.A. (1991) Genetic improvement of maize yields. Adv. Agron., 46: 245-298.
- Sabovljević, R., Nikolić, N., Marković, D., Dačić, V., Radosavljević, N. (1997) Klijanje hibridnog semena kukuruza u odnosu na tehničku ujednačenost i temperaturu ispitivanja. Zbornik izvoda II JUSEUM, Aranđelovac, Srbija, p. 32.
- Sabovljević, R., Stevanović, S., Mišić-Stanković, Z., Popović, R., Marković, D. (1997) Varijabilnost i klijavost hibridnog semena kukuruza u odnosu na poreklo i temperaturu ispitivanja, Zbornik izvoda II JUSEUM, Aranđelovac, Srbija, p. 31.
- Sanford, J.O., Grogan, C.O., Jordan, H.V., Sarvella, P.A. (1965) Influence of male sterility on nitrogen utilization in corn, *Zea mays*. L. Agron. J., 57: 580-583.

- Scheifele, G.L., Nelson, R.R., Koons, C. (1969) Male sterile cytoplasm conditioning susceptability of resistant inbred lines of maize to yellow leaf blight caused by *Phyllosticta zeae*. *Plant Disease Reporter*, 53: 656-659.
- Schnable, P.S., Wise, R.P. (1998) The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.*, 3:175-180.
- Stamp, P., Chowchong, S., Menzi, M., Weingartner, U., Kaeser, O. (2000) Increase in the yield of cytoplasmic male sterile maize revisited. *Crop Sci.*, 40 (6): 1586-1587.
- Singh, K., Frisvad, J.C., Thrane, U., Mather, S.B. (1991) *An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne Aspergillus, Fusaria, Penicillium and Their Mycotoxins*. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, 133.
- Stringfield, G.H. (1958) Fertility restoration and yields in maize. *Agron. J.*, 50: 215-218.
- Trifunović, V. (1975) Proučavanje sterilnosti polena materinskih linija kukuruza s obzirom na dobijanje hibridnog semena. *Arh. polj. nauke*, 28 (104): 59-107.
- Troyer, A.F. (2004) Background of U.S. Hybrid Corn II: Breeding, Climate, and Food. *Crop. Sci*, 44: 370-380.
- Vančetović J., Vidaković, M., Pajić Z. (2006) Dopuna Eckhardt-ove metode prevođenja hibrida kukuruza na muški sterilnu osnovu uzimajući u obzir mogućnost probijanja sterilnosti majčinske komponente. *Selekcija i semenarstvo*, 3-4: 55-58.
- Vančetović J., Vidaković, M., Branković-Radojčić, D. (2007) Značaj i korišćenje CMS u proizvodnji hibrida kukuruza. U *Osnova održivog razvoja*, Društvo genetičara Srbije, Beograd, pp. 55-83.
- Vidaković, M. (1988) Genetics of fertility restoration in cytoplasmic male sterility of the C-type (cmsC) in maize (*Zea mays* L.). *Maydica*, 33: 51-64.
- Watson, G.C. (1893) Corn-detasselling. *Cornell Agric. Exp. Sta. Bull.*, 61: 312-316.
- Weingartner, U., Kaeser, O., Long, M., Stamp, P. (2002) Combining cytoplasmic male sterility and xenia increases grain yield of maize hybrids. *Crop Sci.* 42: 127-134.

- Westermeier, R. (2001) Electrophoresis in Practice, Third edition. WILEY-VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- Wise, R.P., Gobelman-Werner, K., Pei, D., Dill, C.L., Schnable, P.S. (1999) Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in Tcytoplasm maize. *J. Hered.*, 90:380-385.
- Wych, R.D. (1988) Production of hybrid seed corn. *In: Corn and Corn Improvement* (Sprague, G. F. and J. W. Dudley, eds.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. pp. 565-608.
- Gabay-Laughnan S., Kumi, E.V., Monroe, J., Roak, L., Newton, K.J. (2009) Characterization of a novel thermo-sensitive *restorer of fertility* for CMS-S in maize1. *Genetics*, 182 (1):91-103.

BIOGRAFSKI PODACI

Milan Stevanović rođen je 07.04.1982. u Sremskoj Mitrovici, gde je završio Osnovnu školu i Gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Nakon Gimnazije upisuje Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za ratarstvo, na kome je diplomirao 2007. godine sa prosečnom ocenom 8.1 i odbranio diplomski rad pod nazivom „Varijabilnost fizičko-mehaničkih osobina hibridnog semena kukuruza dve ZP kombinacije” sa ocenom 10. Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, smer "Ratarstvo i povrtarstvo" upisuje školske 2008/2009. godine. Na doktorskim studijama ostvaruje prosečnu ocenu 9,75. Od jula 2008. godine zaposlen je u Institutu za kukuruz „Zemun polje”. Trenutno radi na poziciji istraživača saradnika, u Grupi za selekciju kasnih hibrida kukuruza.

Autor je 38. naučno-istraživačka rada publikovana u naučnim i stručnim časopisim, kongresima i simpozijima. Govori engleski i služi se ruskim jezikom

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милан Стевановић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/21

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

“Утицај типа цитоплазматичке мушке стерилности и ресторер гена на принос зрна и агрономске особине инбред линија кукуруза”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска 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/ла интелектуалну својину
- других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 27. 2. 2013.

Милан Стевановић

Прилог 2.

**-Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора Милан Стевановић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/21

Студијски програм Ратарство и повртарство

Наслов докторске дисертације “ Утицај типа цитоплазматичке мушке стерилности и
ресторер гена на принос зрна и агрономске особине инбред линија кукуруза”

Ментор проф др Гордана Шурлан Момировић

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације 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, 27.2.2013.

Потпис докторанта

Стевановић Милан

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

“Утицај типа цитоплазматичке мушке стерилности и ресторер гена на принос зрна и агрономске особине инбред линија кукуруза”

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 крају).

У Београду, 27. 2. 2012

Потпис докторанта

Светозар Марковић

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

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

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

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

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

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