

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Mazur, dipl. ing.

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KOMPARATIVNA ANALIZA
DIHAPLOIDNIH I F₂ SAMOOPLODNIH LINIJA U SELEKCIJI
KUKURUZA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Mazur, dipl. ing.

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KOMPARATIVNA ANALIZA
DIHAPLOIDNIH I F₂ SAMOOPLODNIH LINIJA U SELEKCIJI
KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Mazur, dipl. ing.

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KOMPARATIVNA ANALIZA
DIHAPLOIDNIH I F₂ SAMOOPLODNIH LINIJA U SELEKCIJI
KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. Doc. dr. sc. Domagoj Šimić, znanstveni savjetnik, Poljoprivredni institut Osijek, predsjednik**
- 2. Prof. dr. sc. Sonja Vila, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, mentorica i član**
- 3. Dr. sc. Ivan Brkić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Poljoprivredni institut Osijek, član**

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Maja Mazur, dipl. ing.

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KOMPARATIVNA ANALIZA
DIHAPLOIDNIH I F₂ SAMOOPLODNIH LINIJA U SELEKCIJI
KUKURUZA**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Sonja Vila

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 24. ožujka 2017. godine pred
Povjerenstvom za obranu:**

- 1. Prof. dr. sc. Darko Kiš, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, predsjednik**
- 2. Prof. dr. sc. Sonja Vila, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, mentorica i član**
- 3. Doc. dr. sc. Domagoj Šimić, znanstveni savjetnik, Poljoprivredni institut Osijek,
član**
- 4. Dr. sc. Ivan Brkić, znanstveni savjetnik u trajnom zvanju, Poljoprivredni institut
Osijek, član**
- 5. Izv. prof. dr. sc. Sonja Petrović, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, član**

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama

Morfološka i molekularna komparativna analiza dihaploidnih i F₂ samooplodnih linija u selekciji kukuruza

Maja Mazur, dipl. ing.

Disertacija je izrađena na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Sonja Vila

U radu je procijenjena pogodnost metode indukcije haploida *in vivo* za uporabu u oplemenjivanju i selekciji kukuruza. Ciljevi istraživanja bili su: 1. utvrditi postojanje razlika u strukturi svojstava i varijabilnosti između dihaploidnih linija i biljaka F₂ generacije, kao i nepravilnosti u omjeru razdvajanja kod dihaploida, 2. ocijeniti pogodnost dihaploidne metode dobivanja linija kukuruza za uporabu u oplemenjivanju kukuruza i 3. ispitati mogućnost prijenosa segmenata genoma induktora u genom haploida tijekom *in vivo* indukcije haploida. Kao početni materijal za indukciju haploida odabrano je 11 jednostrukih hibrida kukuruza koji obuhvaćaju elitnu germplazmu Poljoprivrednog instituta Osijek. Indukcija je napravljena pomoću induktora ZMK, a udvostručenje kromosoma metodom injektiranja otopine kolhicina. Odabrane su 3 populacije haploida i F₂ generacije iz istog početnog materijala za komparativnu analizu. U analizu, na osnovi agronomskih i morfoloških podataka, uključeno je 10 svojstava, a molekularna analiza pomoću SNP markera napravljena je na dihaploidnim linijama iz 3 odabrane populacije, njihovim roditeljskim inbred linijama i induktoru haploida. Ispitani genotipovi razlikovali su se po prosječnoj frekvenciji induciranih haploida, ali su se prosječne relativne frekvencije haploida kretale u rasponu karakterističnom za induktor ZMK te je kod svih ispitanih genotipova preciznost ekspresije markera *R-nj* bila vrlo visoka. Za sva ispitana svojstva utvrđene su značajne razlike između dihaploidnih linija te je bilo moguće izdvojiti linije poboljšane za određeno svojstvo u odnosu na roditeljske inbred linije. Varijabilnost agronomskih i morfoloških svojstava bila je manja u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F₂ generaciju za sva svojstva osim intervala između polinacije i svilanja, dok su odstupanja od očekivanog omjera razdvajanja utvrđena u sve tri populacije dihaploidnih linija, a posebno u populaciji Os 2703. Segmenati kromosoma induktora pronađeni su u vrlo niskom postotku kod većine dihaploidnih linija.

Broj stranica: 126

Broj slika: 11

Broj tablica: 43

Broj literaturnih navoda: 185

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kukuruz, *in vivo* indukcija haploida, induktor haploida, dihaploidne linije, F₂ generacija, SNP analiza

Datum obrane: 24. ožujka 2017.

Povjerenstvo za obranu:

1. **Prof. dr. sc. Darko Kiš - predsjednik**
2. **Prof. dr. sc. Sonja Vila** - mentorica i član
3. **Doc. dr. sc. Domagoj Šimić** - član
4. **Dr. sc. Ivan Brkić** - član
5. **Izv. prof. dr. sc. Sonja Petrović** - član

Disertacija je pohranjena u:

Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agriculture in Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course:

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch: Genetics and breeding of plants, animals and micro-organisms

Morphological and molecular comparative analysis of doubled haploid and F₂ inbred lines in maize selection

Maja Mazur, dipl.ing.

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

Supervisor: Prof. dr. sc. Sonja Vila

In this study advantages of *in vivo* haploid induction method are estimated for applying in breeding and selection of maize. The main objectives of the study were: 1. to detect if there were differences in structure of traits and variability between doubled haploid lines and F₂ generation plants, as well as irregularities in segregation ratio in doubled haploids, 2. to evaluate suitability of creating maize lines by doubled haploid method for usage in maize breeding and 3. to estimate the possibility of transferring genome segments of inducer to genome of haploids during the *in vivo* haploid induction. As a donor material, we selected 11 single crossed maize hybrids that contained elite germplasm of Agricultural Institute Osijek. The haploid induction was performed by inducer ZMK, and doubling of chromosomes by colchicine injection method. For the comparative analysis, 3 populations of both haploids and F₂ generations were chosen from the same starting material. Based on agronomic and morphologic data, 10 traits were involved in analysis, and molecular analysis using SNP markers was performed on doubled haploid lines from 3 chosen populations, their parental inbred lines and haploid inducer. There were differences among tested genotypes in average frequencies of induced haploids, but average relative frequencies of haploids were in the range which is typical for inducer ZMK, and the accuracy of *R-nj* marker expression was very high in all tested genotypes. For all tested traits, significant differences were found among doubled haploid lines and it was possible to isolate lines improved for specific trait in comparison with parental inbred lines. Variability of agronomic and morphologic traits was lower in doubled haploid lines in comparison with F₂ generation for all traits except for an interval between pollination and silking, while deviations from expected segregation ratio were estimated for all of tree populations of doubled haploid lines, particularly for the population Os 2703. Segments of inducer chromosomes were found in a very low percentage, in the most of doubled haploid lines.

Number of pages: 126

Number of figures: 11

Number of tables: 43

Number of references: 185

Original in: croatian

Key words: maize, *in vivo* haploid induction, haploid inducer, doubled haploid lines, F₂ generation. SNP analysis.

Date of the thesis defense: 24 March 2017

Reviewers:

1. **Prof.dr.sc. Darko Kiš - president**
2. **Prof. dr. sc. Sonja Vila - mentor and member**
3. **Doc. dr. sc. Domagoj Šimić - member**
4. **Dr. sc. Ivan Brkić - member**
5. **Izv. prof. dr. sc. Sonja Petrović - member**

Thesis deposited in:

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

KAZALO

1.	Uvod	1
1.1.	Pregled literature	4
1.1.1.	Spontani haploidi	4
1.1.2.	Metode dobivanja haploida	4
1.1.2.1.	<i>In vitro</i> metode dobivanja haploida	4
1.1.2.2.	<i>In vivo</i> indukcija haploida	5
1.1.3.	Induktori haploida	6
1.1.3.1.	Induktori majčinskih haploida	6
1.1.3.2.	Induktori očinskih haploida	9
1.1.4.	Izbor početnog materijala za indukciju haploida	10
1.1.5.	Mehanizam razvoja haploida metodom indukcije <i>in vivo</i>	11
1.1.6.	Odabir haploida i obilježja haploidnih biljaka	14
1.1.7.	Udvostručenje kromosoma kod haploida	16
1.1.7.1.	Spontano udvostručenje kromosoma	16
1.1.7.2.	Udvostručenje kromosoma izazvano različitim tretmanima	17
1.1.8.	Prednosti i nedostaci upotrebe haploida	20
1.1.9.	Komparativna analiza dihaploidnih i samooplodnih linija	22
1.1.10.	Segregacijska distorzija	24
1.2.	Cilj istraživanja	27
1.2.1.	Ciljevi istraživanja	27
1.2.2.	Hipoteza	27
2.	Materijal i metode rada	28
2.1.	Biljni materijal	28
2.2.	Metode istraživanja	30
2.2.1.	Indukcija i odabir haploida	30
2.2.2.	D ₀ generacija haploida	32
2.2.2.1.	Formiranje D ₀ generacije haploida, udvostručenje kromosoma i izvođenje samooplodnje	32
2.2.2.2.	Svojstva D ₀ generacije	34
2.2.3.	Formiranje D ₁ generacije i umnažanje dihaploidnih linija	34
2.2.4.	Poljski pokusi i pedoklimatski uvjeti	35

2.2.4.1.	Agromorfološka svojstva u poljskim pokusima	36
2.2.5.	Formiranje F ₂ samooplodne generacije i agromorfološka svojstva	37
2.2.6.	Molekularna analiza dihaploidnih linija	37
2.2.7.	Statistička obrada podataka	38
2.2.7.1.	Statistička obrada podataka o indukciji i haploidima D ₀ generacije	38
2.2.7.2.	Statistička obrada morfološko-agronomskih podataka	39
2.2.7.2.1.	Statistička obrada podataka iz poljskih pokusa	39
2.2.7.2.2.	Statistička obrada podataka o F ₂ generaciji	40
2.2.7.3.	Statistička obrada molekularnih podataka	40
3.	Rezultati istraživanja	42
3.1.	Frekvencija navodnih haploida	42
3.2.	Analiza svojstava D ₀ generacije	43
3.3.	Analiza agromorfoloških svojstava u populacijama dihaploidnih linija	45
3.3.1.	Analiza agromorfoloških svojstava u populaciji Os 2702	45
3.3.1.1.	Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2702	50
3.3.2.	Analiza svojstava u populaciji Os 2703	51
3.3.2.1.	Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2703	58
3.3.3.	Analiza svojstava u populaciji Os 2709	59
3.3.3.1.	Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2709	64
3.3.4.	Heritabilnost ispitanih svojstava i uporabljivost populacija dihaploidnih linija	65
3.3.4.1.	Heritabilnost svojstava u populacijama dihaploidnih linija	65
3.3.4.2.	Uporabljivost populacija dihaploidnih linija	66
3.4.	Komparativna analiza F ₂ generacije i populacija dihaploidnih linija	68
3.4.1.	Komparativna analiza svojstava cvatnje	68
3.4.2.	Komparativna analiza visine stabljike do baze klipa i visine do vrha metlice	69
3.4.3.	Komparativna analiza za svojstva klipa	71
3.4.4.	Koeficijent varijacije ispitanih svojstava u populacijama dihaploidnih linija i F ₂ generaciji	74
3.5.	Molekularna analiza populacija dihaploidnih linija	76
3.5.1.	Raspodjela markera	76

3.5.2.	Polimorfnost u tri populacije dihaploidnih linija	76
3.5.3.	Procjena heterozigotnosti u populacijama dihaploidnih linija	77
3.5.4.	Klaster analiza	77
3.5.5.	Raspodjela alela podrijetlom od roditelja kod različitih tipova potomstva	79
3.5.5.1.	Raspodjela alela podrijetlom od svakog roditelja u tri populacije dihaploidnih linija	79
3.5.5.2.	Raspodjela genoma podrijetlom od majke u populacijama dihaploidnih linija	79
3.5.5.3.	Simulacija raspodjele genoma podrijetlom od jednog roditelja u F ₂ i DH populaciji	80
3.5.6.	Segregacijska distorzija u populacijama dihaploidnih linija	81
3.6.	Analiza prisutnosti segmenata genoma induktora u genomu dihaploidnih linija	89
4.	Rasprava	92
4.1.	Indukcija haploida <i>in vivo</i> i dobivanje dihaploidnih linija	92
4.1.1.	Odabir početnog materijala za indukciju haploida	92
4.1.2.	Frekvencija induciranih haploida	93
4.1.3.	Ekspresija markera <i>RI-nj</i>	94
4.1.4.	Udvostručenje kromosoma u D ₀ generaciji	94
4.1.5.	Utjecaj drugih faktora na uspješnost metode dihaploida	96
4.2.	Usporedba dihaploidnih i roditeljskih inbred linija	97
4.2.1.	Prinos i komponente prinosa	98
4.2.2.	Interval između polinacije i svilanja	98
4.2.3.	Odabir plana pokusa	99
4.3.	Komparativna analiza dihaploidnih i samooplodnih F ₂ linija	100
4.4.	Segregacijska distorzija kod dihaploidnih linija	103
4.5.	Prisutnost genoma induktora u genomu dihaploidnih linija	104
4.6.	Pogodnost dihaploidne metode dobivanja linija kukuruza za korištenje u oplemenjivanju	106
5.	Zaključci	108
6.	Literatura	109
7.	Sažetak	125
8.	Summary	126

1. UVOD

Kukuruz je u ekonomskom smislu vrlo važan usjev u svijetu. Osim što zauzima velike površine, ima visok biološki potencijal i široku mogućnost korištenja. Zbog važnosti i značenja kukuruza velika se pozornost posvećuje oplemenjivanju koje za glavni cilj ima stvaranje poboljšanih populacija, linija i hibrida za razne namjene prilagođenih uzgoju u različitim agroekološkim uvjetima. Dobar izbor germplazme i metode oplemenjivanja te pažljiva procjena oplemenjivača vrlo su važni za razvoj linija i hibrida kukuruza. Moderno oplemenjivanje kukuruza počinje se razvijati početkom 20. stoljeća. Zbog sve većih zahtjeva tržišta razvile su se različite metode oplemenjivanja kako bi se povećala uspješnost selekcije kvantitativnih svojstava u različitim okolinama. Svojstva kontrolirana manjim brojem gena, koji nisu pod značajnim utjecajem okoline, vrlo se lako mogu poboljšati. Međutim, većina svojstava koja su glavni predmet rada oplemenjivača, kao što su prinos i kvaliteta, te tolerantnost na abiotski i biotski stres, ekonomski su vrlo značajna, kontrolirana velikim brojem gena s malim efektom te pod značajnim utjecajem okoline.

Prvi korak u stvaranju novoga hibrida je razvoj linija te pronalazak kombinacija linija koje križanjem daju superiorni hibrid u odnosu na standard. Iako se koncept inbred linija – hibrid, koji se koristi u oplemenjivanju, i dalje smatra jednim od najvećih postignuća u oplemenjivanju bilja, dogodile su se mnoge promjene u metodama oplemenjivanja, tehnici, dostupnim alatima i informacijama, te korištenoj germplazmi.

Dobivanje linija kukuruza klasičnim metodama oplemenjivanja i selekcije dugotrajan je proces. Za dobivanje inbred linija kukuruza najčešće se koristi pedigre metoda koja zahtijeva više generacija samooplodnje i odabira biljaka unutar i između potomstava. Razvoj homozigotnih linija kukuruza znatno se može ubrzati korištenjem tehnologije haploida. Ova tehnologija omogućava dobivanje u potpunosti homozigotnih linija u samo dvije generacije nakon čega slijedi testiranje novih linija. Haploidi sadrže samo jedan set kromosoma, za razliku od diploida koji jedan set nasljeđuju od majke, a jedan od oca, pa prema tome i polovičan broj kromosoma jednak broju kromosoma u gametama te su u potpunosti homozigotni na sva svojstva. Kao takvi pogodni su za korištenje u genetici i oplemenjivanju bilja. Primjena haploida u oplemenjivanju kukuruza jedna je od novijih metoda koja se u svijetu intenzivno koristi tek posljednjih petnaestak godina iako su sami

haploidi poznati puno duže. Prva je haploidna biljka kod viših biljaka pronađena još 1922. godine kod vrste *Datura stramonium* (Blakeslee i sur., 1922.), a kod kukuruza 1929. (Lashermes i Beckert, 1988., prema Randolph, 1932.). Međutim, haploidi su prvi puta u oplemenjivanju kukuruza primijenjeni tek sredinom prošloga stoljeća (Chase, 1947.). Šira upotreba haploida dugo je bila ograničena zbog raznih problema vezanih uz nizak postotak javljanja spontanog haploida i sterilnost haploidnih biljaka te nizak postotak spontanog udvostručenja kromosoma. Međutim, nakon što je Coe (1959.) razvio inbred liniju Stock 6 s postotkom indukcije 2-3%, oplemenjivanje pomoću haploida dobiva praktičan značaj.

Danas postoje indukcijske linije i populacije s visokim postotkom indukcije, a razvijene su i vrlo uspješne metode udvostručenja kromosoma kojima se savladava problem sterilnosti haploida što je otvorilo put primjeni haploida u oplemenjivanju. Njihova primjena u oplemenjivanju kukuruza donosi niz prednosti kao što su povećana efikasnost selekcije (Röber i sur., 2005., Geiger, 2009., Geiger i Gordillo, 2009.), skraćivanje trajanja oplemenjivačkog ciklusa (Chang i Coe, 2009., Geiger i Gordillo, 2009.), lakše i jednostavnije održavanje gotovih linija (Röber i sur., 2005.) i mogućnost jednostavne primjene molekularnih markera.

Iako su prepreke za primjenu dihaploidnih linija u oplemenjivanju kukuruza savladane, potrebno je daljnje poboljšavanje kao i razvoj novih metoda. Prvenstveno se to odnosi na poboljšanje agroekoloških svojstava induktora, kao i razvoj novih induktora s većim postotkom indukcije i većim brojem svojstava koja se mogu koristiti kao markeri za razlikovanje haploida od diploida. Osim toga, neophodno je i usavršavanje postojećih metoda udvostručenja kromosoma s ciljem postizanja većeg postotka preživljavanja tretmana kao i većeg postotka udvostručenja kromosoma te pronalaska učinkovite, a manje opasne zamjene za kolhicin. Osim poboljšanja u samom načinu izvođenja metode, važno je i utvrditi dolazi li do smanjenja genetske varijabilnosti i gubitka poželjnih gena iz populacije upotrebom ove metode u oplemenjivanju. Poznato je da kod kukuruza (Bentolila i sur., 1992., Murigneux i sur., 1993., Pereira i Lee, 1995., Lu i sur., 2002.), kao i kod drugih biljnih vrsta (Faris i sur., 1998.), dolazi do odstupanja od očekivanog razdvajanja po Mendelu, odnosno do poremećaja u razdvajanju. Ovom problematikom kod kukuruza bavilo se više autora (Gardiner i sur., 1993., Coe, 1994., Lu i sur., 2002., Vančetović, 2008.) i kao uzroci poremećaja u razdvajaju navode se različiti genetski i

vanjski čimbenici, no malo je istraživanja o utjecaju samog procesa indukcije na poremećaje u razdvajanju kod kukuruza.

U komercijalnoj proizvodnji hibrida kukuruza u Republici Hrvatskoj do sada nisu korištene dihaploidne linije. Budući da uspjeh primjene dihaploidne metode ovisi o nizu čimbenika, od kojih izbor početnog materijala za indukciju ima velik utjecaj (Smith i sur., 2008., Bernardo i sur., 2009., Wilde i sur., 2010.), potrebno je ispitati pogodnost domaće germplazme za primjenu ove metode.

1.1. Pregled literature

1.1.1. Spontani haploidi

Pojava spontanih haploida zabilježena je kod mnogih biljnih vrsta, a prva takva biljka citološki je potvrđena kod vrste *Datura stramonium* (Blakeslee i sur., 1922.). Ubrzo su pronađeni haploidi i kod drugih biljnih vrsta pa tako i kod poljoprivrednih kultura kao što su *Nicotiana tabacum* (Wedzony i sur., 2009., prema Clausen i Mann, 1924.) i *Triticum compactum* (Wedzony i sur., 2009., prema Gains i Aase, 1926.). Proučavanje haploidnosti kukuruza započelo je 1920-tih godina, a tu su pojavu prvi uočili Stadler i Randolph (Lashermes i Beckert, 1988., prema Randolph, 1932.).

Zanimanje za haploide kukuruza raste sredinom 20. stoljeća kada je Chase izveo prvu uspješnu samooplodnju haploida kukuruza (Chase, 1949.) i počeo proizvoditi elitne dihaploidne linije za dobivanje komercijalnih hibrida (Chase 1947., 1949.). Njegov prvi značajan hibrid dobiven križanjem dihaploidnih linija bio je DeKalb 640, dvostruki hibrid nastao križanjem tri dihaploidne linije i jedne inbred linije (Forster i Thomas, 2005.).

Spontani se haploidi kukuruza pojavljuju u vrlo niskim frekvencijama i uglavnom nisu značajni u istraživanjima vezanim uz genetiku i oplemenjivanje. Prema Chaseu (1949.) spontano se pojavljuje jedno haploidno zrno na svakih 145 do 3275 diploidnih. Istraživanja većeg broja autora utvrdila su da se partenogenetski haploidi spontano javljaju u 0,01% do 0,1% slučajeva (Chase 1947., 1951., Chalyk i sur., 2003., Röber, 2005., Melchinger i sur., 2005., Zhang i sur., 2008., Chang i Coe, 2009.), dok su spontani androgenetski haploidi još rjeđi i javlja ih se oko jedno na svakih 100000 zrna (Randolph i Fisher, 1939., Chase, 1949.), a frekvencije ovise o genetskoj osnovi.

1.1.2. Metode dobivanja haploida

1.1.2.1. *In vitro* metode dobivanja haploida

Metode *in vitro* obuhvaćaju ginogenezu i androgenezu. Ginogenezom se haploidi dobivaju iz oplođene plodnice kulturom tkiva dok se androgeneza odnosi na dobivanje haploida iz nezrelog polena kulturom prašnika ili mikrospora. Kod kulture prašnika mikrospore se izoliraju iz prašnika i uzgajaju na mediju kako bi se dobile tvorevine nalik na embrij, a

zatim se te strukture mogu ili neposredno regenerirati u haploidne biljke ili posredno formiranjem kalusa (Prasanna i sur., 2012.).

Iako se protokoli za dobivanje haploida androgenezom rutinski koriste kod nekih kultura, kod kukuruza se nisu pokazali učinkovitima. Pokazalo se da je androgeneza kod kukuruza jako ovisna o genotipu te da većina genotipova kukuruza nije pogodna za dobivanje haploida kulturom mikrospora (Brettell i sur., 1981., Genovesi i Collins, 1982., Miao i sur., 1981., Spitkó i sur., 2006.). Čak i kod genotipova koji dobro reagiraju na androgenezu, više autora navodi da je proces pod velikim utjecajem brojnih čimbenika pa rezultati često izostaju (Wan i sur., 1991., Chu i sur., 1975., Genovesi i Collins, 1982., Spitkó i sur., 2006.). Zbog toga se *in vitro* metode razvoja haploida rijetko koriste kod kukuruza.

1.1.2.2. *In vivo* indukcija haploida

Kod kukuruza se najčešće koristi *in vivo* indukcija haploida za koju je potreban specifičan genotip – induktor. Obzirom na podrijetlo genoma haploida postoje dva modela indukcije haploida *in vivo* (Röber i sur., 2005.). Tako indukcija haploida može biti uzrokovana roditeljem oprašivačem i dobivaju se haploidi koji nose genom iz majčinske biljke. Drugi je model u kojemu oprašivač služi kao donor genoma, a majčinska komponenta kao induktor te se dobivaju očinski haploidi.

Indukcija očinskih haploida temelji se na djelovanju mutantnog gena *igl* (*indeterminate gametophyte*) koji može povećati frekvenciju haploida u potomstvu (Kermicle, 1969.). Homozigotni *igl* mutanti pokazuju nekoliko nepravilnosti u mejozi uključujući razvoj jajnih stanica bez jezgre. Nakon oplodnje takva se jajna stanica može razviti u haploidan embrij koji sadrži majčinsku citoplazmu, ali samo očinske kromosome (Kermicle, 1969., 1971., Lin, 1981). Kermicle (1994.) je kod odabranih genotipova zabilježio indukcijske stope 1-2% primjenom ove metode. Budući da se kod razvoja očinskih haploida induktor koristi kao majčinska komponenta, očinski haploidi sadrže citoplazmu induktora, a kromosome donora. Zbog niskih frekvencija indukcije haploida i promjena u konstituciji citoplazme u odnosu na genotip donora, ovaj se model nije pokazao prihvatljivim u razvoju dihaploidnih linija za oplemenjivanje, ali može biti korisan kod prevođenja inbred linija na citoplazmatski sterilnu osnovu (Prasanna i sur., 2012.). Dihaploidi dobiveni ovom metodom su izogeni s ocem, osim što nose muško sterilnu citoplazmu. Primjenom ovog

pristupa stvorene su indukcijske linije koje se mogu koristiti za prevođenje novih linija na citoplazmatski sterilnu osnovu (Pollacsek, 1992., Schneerman i sur., 2000.).

Kod kukuruza se uglavnom koristi metoda dobivanja majčinskih haploida *in vivo* križanjem odabranih genotipova sa specifičnim induktorom kao očinskom komponentom. U usporedbi s *in vitro* indukcijom haploida, *in vivo* indukcija je jednostavnija i pouzdanija te je u posljednjih 30 godina znatno unaprijeđena razvojem novih i poboljšanih induktora s porastom postotka indukcije od 2-3% ranih šezdesetih godina prošloga stoljeća (Coe, 1959.), 3-5% osamdesetih (Lashermes i Berkert, 1988.), 6% devedesetih (Shatskaya i sur., 1994.), do više od 10% haploida u današnje vrijeme (Rotarencu i sur., 2010., Shatskaya, 2010.). Za odvajanje haploidnih zrna najčešće se kao marker koristi dominantni gen *RI-nj* (*RI-navajo*) za obojanost endosperma i embrija antocijaninom (Zhang i sur., 2008.). Ekspresija ovog gena pod jakim je utjecajem genotipa majke te je odabir haploida pomoću ovog svojstva ponekad onemogućen, posebno u slučajevima kada ženski genotip nosi inhibitorne (*CI-I*) gene što je čest slučaj kod tvrdunaca (Rotarencu i sur., 2010.). Čak i u slučaju kada ne postoje inhibitorni geni, ali je vlaga zrna tijekom berbe visoka, odabir haploida je ponekad znatno otežan (Rotarencu i sur., 2010.).

1.1.3. Induktori haploida

Induktori haploida specifični su genotipovi koji u križanju s normalnim diploidnim biljkama kukuruza u potomstvu daju klipove s mješavinom diploidnih (2n) i haploidnih (n) zrna u određenom postotku. Zrna s haploidnom klicom imaju normalan triploidan (3n) endosperm te klijavost sličnu zrnima s diploidnom klicom (Coe i Sarkar, 1964.).

1.1.3.1. Induktori majčinskih haploida

Razvoj induktora haploida započinje 1950. godine kada je Coe počeo proučavati pigmente u sjemenu meksičkog kukuruza s bijelim endospermom i ljubičasto obojenom klicom u tipu brašnastog tvrdunca te ga imenovao Stock 6. Samooplodnjom Stock 6 u potomstvu je dobio prosječno 2,52% haploida (Coe, 1959.). Coe je razvio nekoliko sustava markera, kao što su *CI-I* i *RI-nj*, koje je kasnije Sarkar primijenio kako bi olakšao identifikaciju haploidnih zrna (Coe i Sarkar, 1964., Sarkar i Coe, 1966., 1971.). Razvoj induktora Stock 6 otvorio je vrata široj upotrebi haploida kukuruza u oplemenjivanju. Kasnije su iz Stock 6 razvijene i druge indukcijske linije i populacije s većim postotkom indukcije.

Proučavanje pojave haploida kod kukuruza u Rusiji je započelo 1967. godine (Shatskaya, 2010.). Za stvaranje novog induktora haploida koristili su PEM (*Purple Embryo Marker*), Stock 6 (Coe, 1959.) i linije ZM 4, ZM 17 i ZM 97 (Tyrnov i Zavalishina, 1984.). Iz križanja između ovih materijala i selekcijom unutar potomstva dobili su nekoliko induktora pod imenom ZMK (*Zarodyshevyi Marker Krasnodarskii*) s prosjekom indukcije 6-13% haploida koji nose marker gene *A1*, *Cl*, *R-nj* (Shatskaya, 2010.). Induktor haploida ZMK 1, koji se u literaturi pojavljuje i pod nazivom KEMS (*Krasnodar Embryo Marker Synthetic*), s prosječnom indukcijom od 5-7%, razvijen je selekcijom iz križanja populacije PEM 48II s linijom ZM 97. Selekcijom unutar 6 populacija induktora ZMK 1 kroz tri selekcijska ciklusa dobiven je induktor ZMK 1U s prosjekom indukcije 8-15%. Linija ZMK 3 dobivena je samooplodnjom potomstva hibrida PEM 48II x ZM 97, a odlikuje se prosječnom frekvencijom indukcije haploida 10-14% (Shatskaya 2010.). Mnogi registrirani hibridi u Rusiji dobiveni su križanjem dihaploidnih linija kako navodi autor.

Tyrnov (1997.) je preveo AT-1, liniju razvijenu 1982. godine na Sveučilištu u Saratovu koja se u 90-100% slučajeva pojavljivala u haploidnoj formi i bila vrlo osjetljiva na *Ustilago maydis*, u otporni oblik u kojem je postotak indukcije haploida bio 2-3%. Smolkina i Tyrnov (2003.) utvrdili su da rana oplodnja haploida linija AT-1 i AT-3 s normalnim polenom rezultira pojavom 3,6% i 2,7% haploida, a kasna oplodnja sa 78% i 75% haploida.

Indukcijske linije ZMS (*Zarodyshevyi Marker Saratovsky*) i KMS (*Korichnevy Marker Saratovsky*) razvijene su na osnovi Stock 6. Linija ZMS, s prosječnim postotkom indukcije od 3%, nosi marker gene *A1*, *Cl* i *R-nj* koji omogućuju identifikaciju haploidnih zrna pomoću obojenja endosperma antocijaninom i izostanka obojenja u klici (Tyrnov i Zavalishina, 1984.). Linija KMS nosi gene *a1*, *B1* i *P11* koji omogućuju identifikaciju haploida u fazi 3 do 5 dana starih klijanaca po izostanku obojenja antocijaninom u korijenu (Chalyk, 1999.). Chalyk (1999.) je križanjem ovih dviju indukcijskih linija dobio transgresivne genotipove čiji je postotak indukcije bio više nego duplo veći u odnosu na roditeljske linije te smatra da se roditeljske linije KMS i ZMS razlikuju u dva gena za indukcijsku sposobnost, a transgresivni genotipovi nose oba gena te imaju sposobnost indukcije 7-9% haploida.

Chalyk i suradnici (1994.) razvili su indukcijsku liniju MHI (*Moldovian Haploid Inducer*) iz potomstva križanja KMS i ZMS s prosječnim postotkom indukcije 6,5%.

Eder i Chalyk (2002.) su korištenjem indukcijske linije M741H dobili prosječno 2,2% haploida. Autori navode da linija M741H (Stock 6) nosi gene *AI*, *A2*, *BI*, *CI*, *C2*, *PII* i *RI-nj* koji omogućuju odabir haploida na osnovi obojenja antocijaninom u zrnu i obojenja koleoptile i korijena kod biljaka u ranim fazama rasta.

Lashermes i Beckert (1988.) razvili su liniju WS14 iz križanja W23ig x Stock 6 koja ima postotak indukcije 2-5%, ovisno o genotipu.

Barret i sur. (2008.) razvili su liniju PK6 iz linija Stock 6, WS14, FIGH1 i MS1334 s visokom sposobnošću indukcije haploida *in vivo* (u prosjeku 6%).

Indukcijska linija RWS (Röber i sur., 2005.) s prosjekom indukcije od 8% dobivena je križanjem ruskog induktora KEMS (*Krasnodar Embryo Marker Synthetic*) i francuske indukcijske linije WS14. Iz recipročnog križanja dobivena je sestrinska linija RWK-76 sa sličnim postotkom indukcije, oko 9% (Geiger, 2009.). Križanac ovih dviju indukcijskih linija ima postotak indukcije 9-10%, a glavna prednost u odnosu na linije RWS i RWK-76 je bolji vigor biljaka i veća produkcija polena (Geiger, 2009.).

Indukcijska linija UH400 (*University of Hohenheim 400*) je inbred linija izravno dobivena iz ruskog induktora KEMS. Prigge i sur. (2012.) navode da je prosječna frekvencija haploida kod indukcije ovom linijom 8%, a omogućuje odabir haploida pomoću markera *RI-nj*.

Mirdita i sur. (2014.) razvili su indukcijsku liniju UH600 (*University of Hohenheim 600*) s visokim sadržajem ulja u zrnu (u prosjeku 10,8%). Postotak indukcije kod ove linije je 10,2%, a omogućuje odabir haploida pomoću sadržaja ulja u zrnu, te markera *RI-nj* i *BI*. Razvijena je i linija UH601 (*University of Hohenheim 601*) s postotkom indukcije 6,6% i još većim sadržajem ulja (11,7%).

Liu i Song (2000.) razvili su induktor CAU (*China Agricultural University*) selekcijom potomstva iz križanja Stock 6 i BHO (*Beijing High Oil Population*) koji ima postotak indukcije 5-6%. Iz potomstva križanja Stock 6 x BHO dobiven je i CAUHOI (*China Agricultural University High Oil Inducer*), induktor haploida s visokim sadržajem ulja u zrnu (78 g/kg) i postotkom indukcije od oko 2% (Li i sur., 2009.).

Rotarenco i sur. (2010.) razvili su induktor PHI (*Procera Haploid Inducer*). Kao početni materijal za križanje odabrali su MHI, kao izvor poželjnih svojstava biljke i visoke frekvencije indukcije haploida, i Stock 6, kao izvor marker gena *BI* i *PII* koji omogućuju odabir haploida po izostanku obojenja antocijaninom kod klijanaca. Od 92 F₅ linije odabrano je 9 novih induktora koji su po fenotipu i drugim karakteristikama podijeljeni u 4 skupine, PHI-1, PHI-2, PHI-3 i PHI-4, s prosjekom indukcije 12,1%, 13%, 14,5% i 12,8% redom.

Zhang i sur. (2008.) su za indukciju haploida kod četiri inbred linije koristili indukcijsku liniju HZI1. Frekvencija haploida je bila viša od 10%.

Većina današnjih induktora haploida namijenjeni su indukciji na kukuruzu umjerenog pojasa i nisu prilagođeni uzgoju u tropskom i subtropskom području te se s ciljem optimizacije dihaploidne tehnologije za uvjete tropske i subtropske klime u CIMMYT-u (International Maize and Wheat Improvement Center) od 2007. radi na razvoju induktora prilagođenih uzgoju u tom području (Prasanna i sur., 2012.). Razvijene su indukcijske linije prilagođene tropima s 8-10% indukcije haploida koje bi trebale značajno povećati učinkovitost dobivanja dihaploidnih linija i smanjiti troškove održavanja indukcijskih linija i proizvodnje sjemena (Prigge i sur., 2011.).

Kao metodu dodatnog povećanja stope indukcije neki autori predlažu kemijska sredstva. Dankov i sur. (1997.) upotrijebili su herbicid Basagran (aktivna tvar: bentazon) i zabilježili povećanje indukcijske stope od 4 do 5% nakon što su za oprašivanje koristili metlice induktora koje su prethodno bile uronjene u 0,1% otopinu herbicida u trajanju od 24 sata. Slične rezultate dobili su i Wan i sur. (1991.) te Hansen i Andersen (1998.) upotrebom dugih herbicida.

1.1.3.2. Induktori očinskih haploida

Androgeneza kod viših biljaka znači razvoj potomstva koje sadrži samo očinske kromosome što omogućuje izravan prijenos citoplazme (Chase, 1951., Chase, 1963.). Induktori androgenetskih haploida nose mutantni gen *igl* (*indeterminate gametophyte*) koji može povećati frekvenciju androgenetskih haploida u potomstvu (Kermicle 1969., Kermicle, 1971., Lin 1981.). Djelovanje *igl* gena na razvoj sjemena očituje se u poremećaju diobe jezgre i stanica ženskog gametofita zbog čega je broj stanica koje imaju

funkciju jajne stanice neodređen. Kermicle (1969.) je utvrdio više anomalija kod genotipova koji nose *igl* gen, kao što su poliembrija (6%), heterofertilizacija (7%), povećana razina ploidnosti endosperma (45%) te pojava očinskih haploida (oko 3%). Kao izvor gena *igl* koristi se inbred linija W23 (*Wisconsin 23*), a praktična primjena materijala koji nosi *igl/igl* gene je u prevođenju inbred linija u citoplazmatski sterilni oblik (Pollacsek, 1992.).

1.1.4. Izbor početnog materijala za indukciju haploida

Odabir izvorne germplazme, odnosno donora genoma, za indukciju haploida ovisi o ciljevima oplemenjivačkih programa (Prasanna i sur., 2012.). Haploidi se uobičajeno induciraju u F₁ generaciji nakon križanja dvije inbred linije. Međutim, Frisch i Melchinger (2007.) navode da kod dihaploidnih linija dobivenih iz F₁ generacije dolazi do manjeg broja rekombinacija u usporedbi s inbred linijama dobivenim iz uzastopnih generacija samooplodnje, što smanjuje odgovor na selekciju zbog gubitka gena kada se veliki segmenti kromosoma prenose s roditelja na potomstvo i mali broj individua odabire za križanja (Riggs i Snape, 1977., Jannink i Abadie, 1999., Bernardo, 2009.). Zbog toga Bernardo (2009.) kao početni materijal za indukciju haploida predlaže F₂ generaciju. Međutim, ograničena rekombinacija kod dihaploidnih linija dobivenih iz F₁ generacije može očuvati superiorne epistatične kombinacije alela i olakšati selekciju potomstva genotipski bližeg jednom od roditelja, nego što bi to bilo kod potomstva odabranog nakon više uzastopnih generacija samooplodnje, što u nekim slučajevima može biti poželjno (Bernardo i Kahler, 2001.).

Gallais (1990.) procjenjuje da dihaploidne populacije razvijene nakon indukcije u F₂ generaciji mogu sadržavati gotovo 50% više poželjnih rekombinanata u odnosu na populacije razvijene iz F₁ generacije. Razlika u frekvenciji poželjnih rekombinanata između populacija induciranih iz F₂ i F₃ generacija je mala i nema značaj kao razlika između F₁ i F₂. Zbog toga neki autori smatraju da indukcija dihaploida u F₂ generaciji ima prednost kada se promatra veza između gena (Gallais, 1990., Bernardo, 2009.).

Smith i sur. (2008.) su u svojim istraživanjima ustanovili da svaka dihaploidna linija dobivena indukcijom iz F₁ generacije prosječno ima 1,1 netaknut kromosom od jednog roditelja, što je kod rekombinantnih inbred linija F₅ generacije dobivenih uzastopnim

generacijama samooplodnje metodom potomstva jednog sjemena 0,4 kromosoma, a za biljke F₂ generacije 0,0.

Wilde i sur. (2010.) predlažu indukciju haploida iz starih sorti kukuruza kao metodu za uklanjanje štetnih mutantnih alela. Autori smatraju da bi tako dobivene dihaploidne linije mogle biti vrijedan genetski izvor u povratnim križanjima uz pomoć molekularnih markera ili kod križanja za razvoj početnog materijala u oplemenjivanju. U usporedbi s elitnim inbred linijama, dihaploidne linije dobivene iz starih sorti su bliže Hardy-Weinbergovoj ravnoteži što omogućava otkrivanje i kartiranje lokusa kvantitativnih svojstava (QTL-ova) s visokom preciznošću i rezolucijom.

1.1.5. Mehanizam razvoja haploida metodom indukcije *in vivo*

Mehanizam koji dovodi do razvoja majčinskih haploida nije u potpunosti razjašnjen. Postoji više hipoteza o mehanizmu razvoja majčinskih haploida kod kukuruza, a kao mogući uzroci pojave haploida navode se različite nepravilnosti u oplodnji.

Budući da do indukcije haploida dolazi kada se indukcijska linija koristi kao oprašivač, Chase (1969.) pretpostavlja da dolazi do poremećaja u normalnoj dvostrukoj oplodnji nakon oprašivanja polenom induktora, odnosno da se jedna spermalna stanica spaja s centralnom jezgrom dok se druga ne spaja s jajnom stanicom, ali oplodena centralna jezgra svojom diobom potiče neoplođenu haploidnu jajnu stanicu da se razvije u haploidni embrij. Jednostruka oplodnja može biti rezultat morfoloških defekata polenovih zrnaca ili postojanja samo jedne normalne spermalne stanice u polenovom zrncu.

Pogna and Marzetti (1977.) su usporedbom naklijanih polenovih zrnaca indukcijskih i neindukcijskih linija *in vitro* zapazili da se iz polenovih zrnaca indukcijskih linija u visokim frekvencijama razvijaju dvije polenove cjevčice. Autori smatraju da takva abnormalnost u rastu polenove cjevčice može biti povezana sa sposobnošću indukcije haploida.

Chang (1992.) opaža dvije nepravilnosti u dvostrukoj oplodnji kod kukuruza te ih navodi kao moguće mehanizme razvoja haploida. Prva nepravilnost je da središnja jezgra bude oplodena dok jajna stanica ostaje neoplođena i razvija se u embrij zahvaljujući staničnoj diobi oplodene središnje jezgre. Kao drugu mogućnost navodi da je jajna stanica uništena

tijekom prodora polenove cjevčice te jedna generativna jezgra oploduje središnju jezgru, a druga se razvija u haploidni embrij.

Neki su autori pretpostavili da se kod indukcijskih linija dvije generativne jezgre razvijaju različitom brzinom (Enaleeva i sur., 1996., Eder i Chalyk, 2002., prema Bylich i Chalyk, 1996.). Jedna se jezgra razvija do stadija spremnog za oplodnju, dok druga zaostaje u razvoju te zbog toga ne dolazi do dvostruke oplodnje i razvijaju se zrna s haploidnim embrijem. Međutim, Mahendru i Sarkar (2000.) nisu pronašli nikakve razlike između dvije generativne jezgre.

Wedzony i sur. (2002.) razvoj haploida objašnjavaju pretpostavkom da je jedna od dvije spermalne stanice iz polena induktora defektna, ali ipak sposobna spojiti se s jajnom stanicom. Za vrijeme stanične diobe kromosomi podrijetlom iz induktora propadaju te se eliminiraju iz stanica primordija.

U istraživanjima u kojima su proučavali polen, Chalyk i sur. (2003.) zapazili su da se aneuploidi kod indukcijskih linija MHI i M741H pojavljuju u znatno većem postotku (do 14,7%), nego kod normalnih inbred linija A619 i MC3. S obzirom na to, pretpostavili su da indukcijske linije stvaraju određen dio gameta s aneuploidnim brojem kromosoma. Aneuploidne stanice narušavaju dvostruku oplodnju što može dovesti do razvoja jajne stanice u haploidni embrij bez oplodnje. Na temelju dobivenih rezultata, smatraju da je moguće postaviti hipotezu da indukcijske linije imaju genetski faktor ili faktore koji uzrokuju nenormalnu diobu kromosoma tijekom formiranja mikrospora. Taj faktor dovodi do razvoja aneuploidne gamete koja može prekinuti dvostruku oplodnju i potaknuti diobu jajne stanice bez oplodnje, odnosno aktivirati haploidnu embriogenezu.

Fischer (2004.) je upotrebom mikrosatelita kod haploida induciranih pomoću induktora RWS kod 1,4% genotipova opazio da sadrže jedan, a ponekad i nekoliko segmenata kromosoma induktora koji zamjenjuju homologne segmente majčinskih kromosoma što ukazuje da bi indukcija haploida mogla biti rezultat eliminacije kromosoma induktora nakon oplodnje.

Zang i sur. (2008.) dokazali su da se segmenti kromosoma induktora ugrađuju u genom haploida i dihaploida te također smatraju da je za indukciju haploida odgovorna eliminacija kromosoma.

Do sličnih rezultata došli su i Li i sur. (2009.). Molekularna analiza mikrosatelitima - SSR (*Simple Sequence Repeat*) markerima pokazala je da 43,18% haploida induciranih iz hibrida ZD958 pomoću induktora CAUHOI nosi segmente genoma induktora, odnosno da je prosječno 1,84% genoma CAUHOI uneseno u haploide.

Qiu i sur. (2014.) su kod haploida induciranih pomoću induktora HZI1 pronašli segmente kromosoma induktora u 7,37% haploidnih embrija.

Ravi i Chan (2010.) kao moguću teoriju navode da centromere iz dvije roditeljske komponente nejednako djeluju s diobenim vretenom u mitozu, uzrokujući selektivni gubitak kromosoma.

Odvajena istraživanja više autora (Lashermes i Beckert, 1988., Deimling i sur., 1997.) i QTL analize (Röber, 1999.) pokazali su da je *in vivo* indukcija haploida kod kukuruza kvantitativno svojstvo pod kontrolom velikog broja nepoznatih lokusa.

Prigge i sur. (2012.) pronašli su jedan glavni QTL na kromosomu 1 (qhir1, bin 1.04) koji objašnjava do 66% genetske varijance za sposobnost indukcije haploida kod tri ispitane populacije uključujući i neindukcijskog roditelja. Rezultati pokazuju da je svojstvo sposobnosti indukcije haploida *in vivo* kontrolirano s jednim ili nekoliko glavnih lokusa, te nekoliko modificirajućih i/ili lokusa malog efekta.

Qiu i sur. (2014.) napravili su morfološku, citološku i molekularnu analizu haploida induciranih pomoću induktora HZI1. Rezultati su pokazali pojavu aneuploidije, miksploidije i abnormalnih kromosoma u određenom postotku što ukazuje na gubitak kromosoma induktora tijekom mitoze i mejoze, odnosno da potpuna ili djelomična eliminacija kromosoma induktora HZI1 kontrolira *in vivo* indukciju haploida.

Smatra se da je i heterofertilizacija, obično uzrokovana kasnom oplodnjom, povezana s mehanizmom indukcije haploida i stopama indukcije. Visoka frekvencija heterofertilizacije zabilježena je kod Stock 6 (Sarkar i Coe, 1966., 1971.). Rotarencu i Eder (2003.) otkrili su više od tri puta veću učestalost heterofertilizacije kada su koristili indukcijsku liniju MHI kao oprašivača u usporedbi s „normalnom“ inbred linijom. Smatraju da je heterofertilizacija povezana s mehanizmom indukcije haploida i može imati utjecaj na postotak induciranih majčinskih haploida.

Unatoč svim postavljenim hipotezama Prasanna i sur. (2010.) ističu da mehanizam indukcije haploida još uvijek nije potpuno razjašnjen, ali je sigurno da uključuje neke reproduktivne abnormalnosti. Autori smatraju da je moguće da se kod različitih induktora događaju različite reproduktivne abnormalnosti koje dovode do indukcije majčinskih haploida.

1.1.6. Odabir haploida i obilježja haploidnih biljaka

Indukcija majčinskih haploida *in vivo* temelji se na prisutnosti dominantnog markera za obojenost antocijaninom, nazvanog *RI-navajo* (*RI-nj*), kod induktora haploida (Nanda i Chase, 1966., Greenblatt i Bock, 1967.). Dominantni gen *RI-nj* u kombinaciji s drugim dominantnim genima (*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C1* i *C2*), koji sudjeluju u sintezi antocijanina, uzrokuje pigmentaciju aleurona i skuteluma klice (Coe, 1994.). Za razliku od induktora, kod donorskih populacija obično se ne pojavljuje antocijanin u endospermu i klici. Zbog toga se ovaj marker najčešće koristi kao pomoć u razlikovanju haploidnih od nehaploidnih zrna. Kod hibrida, odnosno diploida, obojenost se pojavljuje u aleuronskom sloju endosperma i skutelumu klice. Endosperm je triploidan, a klica diploidna. Haploidi imaju obojan aleuronski sloj, ali neobojan skutelum, odnosno imaju normalan triploidan endosperm i haploidnu klicu. Jalova zrna su zrna s obojanim skutelumom i neobojanim endospermom. Do pojave ovakvih zrna dolazi kada je oplođena jajna stanica, ali ne i centralna jezgra, te imaju normalnu diploidnu klicu i abnormalan diploidan endosperm (Coe, 1994.). Normalno razvijena zrna bez obojenja u endospermu i klici nastaju kao rezultat stranooplodnje ili slučajne samooplodnje.

Međutim, više autora ističe da je ekspresija markera *RI-nj* pod velikim utjecajem genetske osnove genotipa donora, genetske osnove samog induktora kao i pod utjecajem okoline (Chase, 1952., Röber i sur., 2005., Kebede i sur., 2011., Prigge i sur., 2011.). Kako bi ovaj sustav bio učinkovit, majčinski roditelj mora imati neobojena zrna, a induktor mora biti homozigotan na *RI-nj* gen. Iako stopa pogrešne klasifikacije pomoću ovog markera može iznositi do 80% (Nanda i Chase, 1966.), ipak je njegova upotreba bitno ubrzala identifikaciju majčinskih haploida. Kao glavni uzrok pogrešne klasifikacije navodi se prisutnost dominantnih inhibitora antocijanina kao što su *C1-I*, *C2-Idf* i *In1-D* u genomu donora (Coe, 1994.). Kako bi se pojednostavila identifikacija haploida i smanjile pogreške u klasifikaciji, koriste se i drugi genski markeri, ali *RI-nj* se zasad pokazao kao najkorisniji te je dobra metoda za identifikaciju haploida u fazi suhog zrna (Chang i Coe, 2009.).

Rotarencu i sur. (2010.) navode da se upotreba induktora haploida s genima *BI* (*Booster1*) i *PII* (*Purple1*), odgovornima za pojavu ljubičastog obojenja u biljnom tkivu koleoptile i korijena, pokazala korisnom u slučajevima kada izbor haploida nije moguć pomoću obojenja suhog zrna. U ovom slučaju, obojena koleoptila ili korijen u ranim fazama razvoja ukazuju na diploide, dok se biljke bez obojenja smatraju haploidima (Geiger i Gordillo, 2009., Rotarencu i sur., 2010.).

Kako bi se izbjegle moguće pogreške kod izbora haploida zbog loše ekspresije antocijaninskog markera u suhom zrnu, Rotarencu i sur. (2007.) predlažu da se za identifikaciju haploida koristi sadržaj ulja u zrnu, čije bi se određivanje moglo automatizirati korištenjem metoda na bazi nuklearne magnetske rezonance (NMR). Mirdita i sur. (2014.) ispitali su ovaj model za odvajanje haploidnih i diploidnih zrna nakon indukcije pomoću UH600, induktora s visokim sadržajem ulja. Rezultati su pokazali da je odabir haploida na osnovi sadržaja ulja bio pouzdaniji i precizniji u usporedbi s odabirom pomoću markera *R-nj* nakon indukcije induktorom UH400.

Li i sur. (2009.) su iz Stock 6 razvili CAUHOI, induktor s postotkom indukcije oko 2% i visokim sadržajem ulja, koji omogućava identifikaciju haploida i pomoću markera *RI-nj* i prema niskom sadržaju ulja u zrnu.

Jones i sur. (2012.) ispitali su upotrebu NIR (*near-infrared*) spektroskopije za razlikovanje haploidnih od hibridnih zrna kod tri različita donorska genotipa nakon majčinske indukcije haploida. Uporaba dvofaktorijske kemometrijske analize u kojoj su zrna prvo klasificirana prema genotipu, a zatim kao haploidna ili hibridna, pokazala se kao najuspješniji pristup. Ovom metodom iz smjese zrna svih genotipova točno je klasificirano 11 od ukupno 13 analiziranih haploidnih i svih 25 hibridnih zrna.

Geiger i sur. (1994.) ispitali su mogućnost primjene transgene otpornosti na herbicide kao što je BASTA (aktivna tvar: glufozinat-amonij). Ta se otpornost nasljeđuje kao monogenetsko dominantno svojstvo, a otporni i osjetljivi genotipovi mogu se razlikovati primjenom herbicida BASTA u koncentraciji od 1% na terminalnu polovicu lista u mlađim razvojnim stadijima. Zbog svoje neovisnosti o genetskoj osnovi ženskog roditelja autori smatraju da bi otpornost na herbicid BASTA kao marker svojstvo za odabir haploida u budućnosti mogla imati prednost u odnosu na *RI-nj* gen.

Haploidne biljke kukuruza morfološki se jasno razlikuju od diploidnih. Chase (1969.) opisuje majčinske haploide dobivene procesom *in vivo* indukcije kao biljke uskih listova, često s bijelim prugama, koji su nešto kraći od odgovarajućih listova diploidnih biljaka. Otpornost haploida na stres je znatno manja u odnosu na diploide te su uglavnom sterilni, a ponekad se pojavljuju fertilni segmenti na metlici i klipju. Međutim, spontano udvostručeni haploidi mogu pokazivati visoku stopu fertilnosti kako kod metlice, tako i na klipju (Kato, 2002.).

Haploidne biljke nakon udvostručjenja kromosoma pomoću kolhicina i samooplodnje daju klipove s malim brojem zrna (Chalyk, 1994., Geiger, 2009.). Chalyk (1994.) je zabilježio prosječno 27 zrna po klipju kod udvostručjenih haploida, odnosno dihaploida, dok je maksimalan broj zrna iznosio 107. Geiger i sur. (2006.) dobili su veći prosječni broj zrna po klipju i iznosio je 80.

Izraz dihaploid prvi je upotrijebio Bender (1963.) kako bi jednom riječju označio broj kopija genoma (diploid) i njihovo podrijetlo (haploid). Danas se najčešće koristi kod haploidizacije tetraploidnih kultura (Nogler, 1984., Pehu, 1996.), dok se u oplemenjivanju kukuruza za linije dobivene metodom udvostručjenja kromosoma haploida koristi izraz udvostručeni monoploidi ili udvostručeni haploidi, koji je u stranoj literaturi postao standardni izraz za homozigotne primke nastale nakon udvostručjenja kromosoma haploida (Sprague i sur., 1960.), dok je u hrvatskoj znanstvenoj literaturi i dalje prihvaćen izraz dihaploidi u istom značenju (Kozumplik i Pejić, 2012.).

1.1.7. Udvostručjenje kromosoma kod haploida

1.1.7.1. Spontano udvostručjenje kromosoma

Iako su haploidi uglavnom sterilni, u određenom postotku dolazi do spontanog udvostručjenja kromosoma u pojedinim segmentima biljke. Ako se spontano udvostručjenje dogodi u metlici ili klipju, dolazi do pojave fertilnosti kod haploidnih biljaka. Spontano udvostručjenje kromosoma haploida, kao i niska frekvencija njihovog spontanog javljanja, ovisni su o genotipu te su dugo bili ograničavajući čimbenik šire upotrebe haploida u oplemenjivanju kukuruza (Zabirova i Chumak, 2009.).

Spontana pojava muške i ženske fertilnosti istovremeno se javlja kod 0 do 10% haploida (Chase, 1969., Beckert, 1994., Deimling i sur., 1997., Kato, 2002.). Kato (2002.) je u

svojim istraživanjima opazio da je 11% haploida formiralo sjeme nakon samooplodnje zahvaljujući spontanom udvostručenju kromosoma. Također navodi da linija B73 pokazuje visoku frekvenciju spontanog udvostručenja kromosoma. Postotak spontanog udvostručenja kromosoma tijekom androgeneze kukuruza također je relativno nizak i kreće se između 4,5 i 22% s prosjekom od 10% (Mohammadi i sur., 2007., prema Buter, 1997.). Antoine-Michard i Beckert (1997.) navode da frekvencija spontanog udvostručenja kromosoma kod *in vitro* kulture antera može kod nekih genotipova biti i viša od 40%.

Spontano udvostručenje kromosoma kod muške cvati haploida kukuruza kreće se od 2,8 do 46%, izraženo kao postotak metlica koje stvaraju normalna polenova zrnca, i ovisno je o genotipu (Liu i Song, 2000., Wei i Chen, 2006., Han i sur., 2006.). Postotak spontanog udvostručenja kromosoma kod ženske cvati, izražen kao broj klipova s najmanje jednim zrncom, veći je i kreće se od 25 do 94% (Chalyk i sur., 1994., Liu i Song, 2000., Han i sur., 2006.).

Spontano udvostručenje kromosoma može biti rezultat raznih mehanizama, a kao neki od njih navode se fuzija somatskih stanica i endoreduplikacija, odnosno endomitoza (Jensen, 1974., Testillano i sur., 2004.).

Fuzija somatskih stanica ili fuzija protoplasta odvija se u nekoliko faza. Prva je razgradnja staničnih stijenki pomoću enzima celulaze. Protoplasti se zatim spajaju te od dvije jezgre nastaje jedna. Nakon što je ovaj proces završen, oslobađaju se hormoni koji aktiviraju rast stanične membrane oko novoformirane stanice (Vanous, 2011.).

Do endoreduplikacije, poznate i kao endomitoza, dolazi kada se uspori proces mitoze (Scanlon i Takaes, 2009.), odnosno 10 do 14 dana nakon oplodnje (Kowles i Phillips, 1985.). Endoreduplikacija je obilježena naizmjeničnim ciklusima replikacije i nereplikacije DNA kada ne dolazi do razdvajanja kromatida, diobe jezgre i citokineze (Scanlon i Takaes, 2009.). Protočno-citometrijska analiza pokazala je da se cijeli genom udvostručuje tijekom bilo kojeg ciklusa endoreduplikacije (Kowles i sur., 1990.) te se vjeruje da endoreduplikacija ima važnu ulogu u spontanom udvostručenju kromosoma.

1.1.7.2. Udvostručenje kromosoma izazvano različitim tretmanima

Budući da frekvencija spontanog udvostručenja kromosoma može značajno varirati i ovisi o genotipu, potrebno ju je povećati, pogotovo kod genotipova kod kojih je spontano

udvostručenje ispod 20% (Chang i Coe, 2009.). Za udvostručenje kromosoma predlažu se različite metode s različitom razinom uspjeha. Uspješnost metoda za udvostručenje kromosoma u zadnje je vrijeme povećana i umjetno udvostručenje kromosoma postalo je pouzdano sredstvo za postizanje fertilnosti kod haploida (Geiger, 2009.).

Za udvostručenje kromosoma najčešće se koriste metode koje uključuju antimikrotubulno sredstvo kolhicin. Do 1990-tih kolhicin se smatrao nepouzdanim sredstvom za udvostručenje kromosoma jer su rezultati njegove primjene uvelike ovisili o genotipu. Osim toga, kolhicin ima mali afinitet za mikrotubule biljaka (Eigsti i Dustin, 1955.), te su bile potrebne veće koncentracije koje su štetno djelovale na tretirane biljke (Jensen, 1974.). Većina oplemenjivačkih kuća razvila je i primjenjuje vlastite metode koje nisu toliko štetne za biljno tkivo i opasne za ljude koji ih primjenjuju (Geiger i Gordillo, 2009.).

Gayen i sur. (1994.) opisali su metodu udvostručenja kromosoma pomoću kolhicina u kojoj su ispitali tri različite koncentracije kolhicina, 0,03%, 0,06% i 0,1%, u otopini 0,5% DMSO (*dimetil sulfoksid*). Haploidne klijance, kojima je prethodno uklonjen vrh koleoptile, stavili su na podloge natopljene otopinom kolhicina različitih koncentracija u trajanju od 6, 12 i 24 sata na 18 °C. Rezultati su pokazali da je najveći postotak udvostručenja kromosoma (18,05%) bio kod klijanaca tretiranih s 0,06% otopinom kolhicina u trajanju od 12 sati.

Deimling i sur. (1997.) su poboljšali metodu po Gayen i sur. (1994.) i postigli veći uspjeh u udvostručenju kromosoma. Klijanci su ostavljeni na naklijavanju dok koleoptila nije bila najmanje 1 cm dugačka i zatim su vrhovi koleoptila uklonjeni i klijanci potopljeni u 0,06% otopinu kolhicina s 0,5% DMSO u trajanju od 12 sati na sobnoj temperaturi i u mraku. Ovu su metodu testirali Eder i Chalyk (2002.) na većem broju genotipova te postigli udvostručenje kromosoma oko 50%. Za usporedbu testirali su uz ovu i drugu metodu udvostručenja pomoću kolhicina (Zabirova i sur., 1996.). Haploidne biljke uzgajane su do faze 3-4 razvijena lista te je otopina kolhicina koncentracije 0,125% s 0,5% DMSO injektirana u biljke tri do pet milimetara iznad točke rasta stabljike. Primjenom ove metode Eder i Chalyk (2002.) dobili su prosječnu stopu udvostručenja od 16%.

Zabirova i Shatskaya (1999.) opisuju metodu udvostručenja kromosoma injektiranjem 0,125% otopine kolhicina u fazi 3-5 razvijenih listova i navode uspjeh udvostručenja kromosoma u prosjeku 25-35%, a kod nekih genotipova i do 60%.

Chalyk (2000.) je usporedio tri metode udvostručenja kromosoma pomoću kolhicina (Gayen i sur., 1994., Deimling i sur., 1997., Zabirowa i Shatskaya, 1999.). Upotrebom metode koju su opisali Deimling i sur. (1997.), dobili su 28,8% i 31,8% haploida s fertilnim polenom kada je temperatura nakon tretmana bila 18 °C, odnosno 26 °C. Injektiranje otopine kolhicina (Zabirowa i Shatskaya, 1999.) rezultiralo je pojavom 27,5% haploidnih biljaka s fertilnim polenom.

Tretman kolhicinom nije uvijek u potpunosti djelotvoran, a osim toga kolhicin je visoko karcinogen te zahtijeva pažljivo rukovanje i sigurno odlaganje nakon uporabe (Prasanna, 2012.). Postoje i druga sredstva koja djeluju kao inhibitori mitoze i mogu poslužiti kao alternativno rješenje. Većina ovih sredstava aktivni su sastojci herbicida kao što su pronamid, APM (amiprofosmetil), trifloralin i orizalin (Häntzschel i Weber, 2010.). Ova su sredstva jeftinija i manje otrovna u odnosu na kolhicin te su rukovanje njima i sigurno odlaganje lakši.

Wan i sur. (1991.) su na haploidima kukuruza dobivenim iz kulture prašnika ispitali djelovanje antimikrotubulnih herbicida amiprofosmetila (APM), pronamida, orizalina i trifloralina na udvostručenje kromosoma. Nakon tretiranja haploidnih kalusa s 5 ili 10 μM APM ili 10 μM pronamida u trajanju od 3 dana broj kromosoma je bio udvostručen kod više od 50% kalusa, bez inhibicije rasta kalusa i s visokim postotkom regeneracije. Orizalin se pokazao vrlo djelotvornim u udvostručenju kromosoma, ali je u nekim slučajevima inhibirao rast kalusa i regeneriranje biljke. Trifloralin se nije pokazao učinkovitim u manjim koncentracijama, a u većoj koncentraciji je izazvao inhibiciju rasta kalusa.

Häntzschel i Weber (2010.) također su ispitali djelovanje različitih herbicida na udvostručenje kromosoma. Rezultati njihovog istraživanja pokazuju da se herbicidi APM, orizalin i pronamid u smanjenim koncentracijama mogu koristiti kao efektivna, a manje toksična, zamjena za kolhicin.

Drugačiji pristup dao je Kato (2002.) koji je tretirao haploidne biljke kukuruza dušikovim oksidom. Koristio je različito trajanje tretmana, tlak plina i razvojne faze biljaka kako bi razvio standardnu metodu. Najuspješnijim se pokazalo tretiranje haploidnih biljaka u fazi cvjetnog primordija u trajanju od dva dana na 600 kPa. Prosječna stopa udvostručenja kromosoma primjenom ove metode iznosila je 44%, međutim velik je bio utjecaj genotipa

donora na stopu udvostručenja te se ona kretala od 17 do 90%. Osim toga, ovakav pristup zahtjeva puno rada i posebnu opremu kako bi se prilagodio tlak zraka.

Za razliku od *in vivo* metoda kod kojih udvostručenje kromosoma čini zaseban korak, kod *in vitro* metoda kao što su kultura prašnika, kultura embrija i kultura mikrospora, tretmani za udvostručenje kromosoma uključeni su izravno u kulture (Wan i sur., 1991., Barnabás i sur., 1999.). Iako su stope udvostručenja kromosoma primjenom metoda *in vitro* velike, ove metode imaju druge nedostatke. Veći su tehnički zahtjevi za izvođenje metoda te zahtijevaju više vremena, a rezultati jako ovise o genotipu (Barnabás i sur., 1999.).

1.1.8. Prednosti i nedostaci upotrebe haploida

Napredak u razvoju tehnika indukcije haploida *in vivo* te samih induktora kod kukuruza je omogućio proizvodnju velikog broja dihaploidnih linija neovisno o genotipu te dihaploidi mogu biti korisni u različitim koracima oplemenjivačkog procesa za poboljšanje materijala, pedigre selekciju i rekurentnu selekciju.

Kao osnovnu prednost haploida, odnosno dihaploida, u oplemenjivanju Zabirova i Shatskaya (1999.) ističu mogućnost dobivanja potpuno homozigotnih biljaka u samo dvije generacije čime se znatno skraćuje proces dobivanja novih linija kukuruza.

Chalyk i Rotarenco (1999.) navode da je frekvencija poželjnih genetskih kombinacija znatno veća kod haploida u odnosu na diploide te da haploidi mogu biti korisni u povećanju uspješnosti rekurentne selekcije kod kukuruza jer do izražaja dolaze i recesivni geni te je potpuno isključena superdominacija što olakšava selekciju gena s aditivnim i epistatičnim djelovanjem.

Bouchez i Gallais (2000.) napravili su teorijsku usporedbu rekurentne selekcije na kombinatornu sposobnost u kojoj su korišteni test križanci dihaploidnih linija s rekurentnom selekcijom u kojoj su korišteni test križanci S_0 , S_1 ili S_2 linija. Kod jednakog intenziteta selekcije, bez korištenja zimske vegetacije, četverogodišnji ciklus rekurentne selekcije s dihaploidnim linijama pokazao se kao najuspješnija metoda. Uspješnost rekurentne selekcije rasla je što je bila manja heritabilnost, te je kod niske heritabilnosti ($h^2 < 0,15$) iznosila 40-50% više u odnosu na test križance S_0 linija. Zbog toga autori ističu da dihaploidi u rekurentnoj selekciji imaju najveću prednost kada je heritabilnost niska jer

dihaploidizacija povećava varijancu između potomstava iz test križanja, a samim time i heritabilnost.

Eder i Chalyk (2002.) ističu da haploidi djeluju kao prirodni filter koji uklanja štetne gene iz oplemenjivačkog materijala iz kojega su dobiveni jer haploidne biljke koje nose takve gene ugibaju ili su nerazvijene i sterilne.

Bernardo (2002.) kao jednu od prednosti dihaploida ističe veću genetsku varijancu između dobivenih linija.

Rotarencu i Mihailov (2002.) navode da haploidne biljke mogu olakšati procjene heritabilnosti u užem smislu jer kod njih nema intraalelne interakcije gena te do izražaja dolaze samo efekti aditivnog i epistatičnog djelovanja gena.

Röber i sur. (2005.) navode da haploidi omogućuju brzo fiksiranje gena za poželjna svojstva kod linija te brzo i jednostavno mapiranje gena unutar populacija.

Bordes i sur. (2007.) navode da dihaploidi omogućuju bolje korištenje genetske različitosti što povećava uspješnost selekcije povećanjem genetske varijance između populacija i smanjenjem preostale varijance. Također ističu da je zbog izostanka epistaze moguće predvidjeti vrijednost dihaploidnih linija, koje se mogu dobiti iz neke heterozigotne biljke, u test križanju na osnovi vrijednosti te same biljke u test križanju.

Osim toga, haploidi olakšavaju identifikaciju mutantnih gena kod induciranih mutacija (Rotarencu i sur., 2007.).

Wędzony i sur. (2009.) kao prednost dihaploida ističu bržu i precizniju ocjenu linija, posebno u pogledu kvantitativnih svojstava kao što su prinos i kvaliteta.

Jumbo i sur. (2011.) navode da dihaploidna metoda dugoročno može napraviti velike uštede zbog smanjenih troškova koji su rezultat pojednostavljene logistike kao što su izvođenje samooplodnje, obrada materijala i trošak slanja u zimsku vegetaciju. Osim toga, ističu da metoda dihaploida omogućuje bržu zaštitu, komercijalizaciju i ponovnu upotrebu (recikliranje) najboljih linija.

Budući da tehnologija dihaploida omogućuje brže dobivanje potpuno homozigotnih linija, značajno može uštedjeti vrijeme i resurse potrebne za provođenje genetičkih istraživanja i/ili molekularnih analiza u oplemenjivanju (Prasanna i sur., 2012.).

Uz niz istaknutih prednosti dihaploida u oplemenjivanju, postoje i određeni nedostaci. Nizak postotak spontanog javljanja haploida, sterilnost i problemi vezani uz udvostručenje kromosoma velikim su dijelom savladani razvojem modernih induktora i pronalaskom učinkovitih metoda za udvostručenje kromosoma (Shatskaya, 2004.). Međutim, haploidi su općenito osjetljiviji na vanjske utjecaje od diploida te je za njihov uspješan uzgoj potrebna jako dobra priprema tla, navodnjavanje tijekom vegetacije i održavanje polja čistim od korova (Prasanna i sur., 2012.).

Osim toga, preostaje ispitati utječe li proces indukcije haploida na smanjenje genetske varijabilnosti. Zbog različite mogućnosti gameta za oplodnju pod utjecajem gametofitnih gena, čije djelovanje dolazi do izražaja u haploidnoj gameti, može doći do poremećaja u razdvajanju (Faris i sur., 1998.). Odstupanja od očekivanog razdvajanja po Mendelu zabilježena su kod kukuruza (Bentolila i sur., 1992., Murigneux i sur., 1993., Gardiner i sur., 1993., Pereira i Lee, 1995.), ječma (Devaux i sur., 1995.), riže (Yamagishi i sur., 1996.), kao i kod mnogih drugih biljnih vrsta (Faris i sur., 1998.).

Jumbo i sur. (2011.) kao ograničavajući čimbenik metode dihaploida ističu potrebne vještine i opremu za udvostručenje kromosoma kod velikog broja biljaka te mogući negativni utjecaj smanjenog broja rekombinacija i selekcije tijekom razvoja dihaploidnih linija.

1.1.9. Komparativna analiza dihaploidnih i samooplodnih linija

Usporedba dihaploidnih i samooplodnih linija napravljena je za različita kvantitativna svojstva kod nekoliko ratarskih kultura. Ispitivanja kvantitativnih svojstava većinom su pokazala da nema značajnih razlika kod dihaploidnih populacija ječma (Choo, 1982.), kukuruza (Lashermes i sur., 1988.), kelja pupčara (Kubba i sur., 1989.) i uljane repice (Chen i Beversdorf, 1990.) u odnosu na samooplodne linije. Mjerenjem morfoloških svojstava, upotrebom izozima, proteina ili polimorfizma dužine restriksijskih ulomaka (RFLP) segregacijska distorzija pronađena je kod brokule (Orton i Browsers, 1985.) i riže (Guiderdoni i sur., 1989.), dok He i sur. (2001.) nisu dobili značajne razlike usporedbom

molekularnih mapa i agronomskih svojstava između dihaploidnih i rekombinantnih inbred linija riže dobivenih iz istog križanja.

Thomson (1953.) je kod kukuruza zapazio gotovo jednaku varijabilnost u prinosu zrna između spontanih dihaploidnih linija i komercijalnih inbred linija proučavanih u hibridnim kombinacijama.

Lashermes i sur. (1988.), kao rezultat istraživanja, dobili su da je vrijednost različitih morfoloških svojstava dihaploidnih linija, dobivenih metodom indukcije *in vivo*, ispitanih *per se* slična vrijednosti konvencionalnih inbred linija.

Bentolila i sur. (1992.) usporedili su razdvajanja i rekombinacije 94 RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) markera u F₂ populaciji i populaciji dihaploidnih linija dobivenih iz kulture prašnika. Redoslijed markera bio je isti u obje populacije te je 97% pokrivenosti genetske mape kod dihaploida odgovaralo mapi F₂ populacije.

Murigneux i sur. (1993.) napravili su usporednu analizu kvantitativnih svojstava i analizu RFLP markerima dihaploidnih linija i linija iz potomstva jednog zrna. Molekularna analiza napravljena je na više od 100 RFLP markera kako bi se dobio što precizniji prikaz frekvencije alela i rekombinantnih ulomaka, no na osnovi dobivenih podataka autori nisu mogli donijeti zaključak jesu li razlike u nekim morfološkim svojstvima posljedica razlika u omjeru razdvajanja i/ili frekvenciji rekombinacija. Agromorfološka procjena pokazala je vrlo male razlike u dva tipa linija.

Marhic i sur. (1998.) ispitali su odstupanja u genetskoj varijabilnosti dviju dihaploidnih populacija kukuruza dobivenih metodom *in vitro* upotrebom seta morfoloških i molekularnih markera. Rezultati su pokazali da povećanje odgovora na *in vitro* indukciju nije bilo povezano sa smanjenjem ukupne genetske varijabilnosti. Mjerenja fenotipskih i morfoloških svojstva pokazala su da proces *in vitro* razvoja haploida nije utjecao na agronomsku vrijednost populacije.

Seitz (2005.) je usporedio vrijednosti test križanaca dihaploidnih linija s konvencionalno razvijenim linijama i zaključio da je varijabilnost između njih jednaka.

Bordes i sur. (2007.) napravili su usporedbu agronomskih i morfoloških svojstava dihaploidnih i samooplodnih linija dobivenih iz slučajno odabranih potomstava S₁

populacije u test križanjima. Srednje vrijednosti populacija bile su slične za svojstva prinosa zrna, vlage zrna, visine biljke, visine klipa i dužine lista. Genetska varijanca dihaploidnih linija bila je gotovo dvostruko veća od genetske varijance S_1 populacije, dok je genetska varijanca između linija dobivenih metodom potomstva jednog zrna bila 1,5 puta veća od genetske varijance S_1 populacije. Heritabilnost je za sva svojstva bila viša kod samooplodnih i dihaploidnih linija u odnosu na S_1 populaciju.

Jumbo i sur. (2011.) usporedili su pogodnost četiriju metoda, između kojih i metodu dihaploida, za dobivanje superiornih linija i hibrida iz 3 križanja u GEM (Germplasm Enhancement of Maize) programu. Pokusi s test križancima 50 odabranih linija iz svake kombinacije križanja i metode oplemenjivanja izvedeni su na više lokacija i nisu pokazali razlike između oplemenjivačkih metoda.

Strigens i sur. (2013.) su uspoređivali dihaploidne linije dobivene iz starih varijeteta europskih tvrdunaca s elitnim inbred linijama europskog tvrdunca. Prinos dihaploidnih linija bio je usporediv s prinosom elitnih linija te nije utvrđeno smanjenje fenotipske raznolikosti kod dihaploidnih linija.

1.1.10. Segregacijska distorzija

Segregacijska distorzija odnosi se na odstupanja promatranih frekvencija gena od njihovih očekivanih vrijednosti (Lu i sur., 2002.). Pod utjecajem je različitih faktora, kao što su genetska pozadina roditelja (Wang i sur., 2012.), selekcija muškog gametofita (Ottaviano i sur., 1982.), različita sposobnost polena za oplodnju (Pfahler, 1975.), propadanje muških ili ženskih gameta ili zigota, nehomologna rekombinacija, transpozoni i različiti okolinski čimbenici (Liu i sur., 2011.). Kod kukuruza su je prvi puta zabilježili Mangelsdorf i Jones (1926.), a zatim i drugi autori (Burhman, 1936., Rhoades, 1942., Longley, 1945., Wendel i sur., 1987., Gardiner i sur., 1993., Lu i sur., 2002.). Također je pronađena i kod drugih kultura kao što su ječam (Devaux i sur., 1995., Liu i sur., 2011.), riža (Xu i sur., 1997., Zhang i sur., 2010., Yamagishi i sur., 2010.), sirak (Pereira i sur., 1994.), rajčica (Paterson i sur., 1988.), kava (Ky i sur., 2000.), pšenica (Kumar i sur., 2007., Adamski i sur., 2014.) i djetelina (Echt i sur., 1994.).

Wendel i sur. (1987.) proučavali su razdvajanje gena kod dvije inbred linije kukuruza na više od 1900 biljaka F₂ generacije. Uočili su statistički značajnu segregacijsku distorziju kod 11 od 17 razdvajajućih alozimskih lokusa.

Lashermes i sur. (1988.) pomoću izozimskih markera proučavali su razdvajanje kod dihaploida i napravili usporedbu razdvajanja fenotipskih svojstava kod dihaploidnih linija i samooplodnih linija. Rezultati su pokazali da populacija haploidnih biljaka predstavlja slučajan set genotipova. Izravna eliminacija pojedinačnih genotipova, kao i selekcija jajne stanice, nisu zabilježeni uslijed indukcije haploida.

Bentolila i sur. (1992.) usporedili su dihaploidne linije i F₂ generaciju dobivene iz istog križanja kod kukuruza te zapazili segregacijsku distorziju na 72% RFLP markera kod dihaploidnih linija u odnosu na F₂ linije kod kojih nije bilo distorziranih markera.

Gardiner i sur. (1993.) su kod kukuruza pronašli kromosomske regije povezane sa segregacijskom distorzijom na kromosomima 1, 2, 3 i 5.

Rotarencu (2000.) nije zabilježio segregacijsku distorziju marker gena *ral* kod haploida dobivenih iz F₁ generacije heterozigotne na promatrani gen.

Lu i sur. (2002.) usporedili su segregacijsku distorziju kod dihaploidne populacije LH200/LH216 F₂Syn3 sa segregacijskom distorzijom u tri javno dostupne genetske mape. Od 1820 kodominantnih markera u četiri mapirane populacije, 301 (17%) pokazalo je segregacijsku distorziju ($p < 0,05$).

Yan i sur. (2003.) pronašli su 14 regija s odstupanjem u razdvajanju na 9 kromosoma u F₂ populaciji kukuruza dobivenoj iz elitnog hibrida. Od ukupno 174 markera, raspoređenih po cijelom genomu, 49 markera (28,1%) pokazalo je distorziju ($p < 0,05$). Od svih distorziranih markera, 11 markera (22,5%) imalo je odklon prema muškom roditelju, a 12 markera (24,5%) prema ženskom roditelju, dok je 25 markera (51,0%) bilo heterozigotno. Samo jedan marker imao je odklon prema oba roditelja.

Yamagishi i sur. (2010.) proučavali su segregacijsku distorziju kod riže i zapazili da se distorzirane regije razlikuju u F₂ populaciji u odnosu na dihaploidnu populaciju iz istog križanja. U dihaploidnoj populaciji 19% markera pokazalo je odklon u razdvajanju, dok je u F₂ populaciji odklon imalo 7% markera.

Zhang i sur. (2010.) su uočili da se segregacijska distorzija češće događa kod dihaploida i rekombinantnih inbred linija u odnosu na F₂ populacije.

Wang i sur. (2012.) su pronašli velika područja segregacijske distorzije na kromosomima 1, 2, 3, 5, 6, 7 i 10 u F₂ populaciji iz križanja B73 x *Z. mays* ssp. *parviglumis* i na kromosomima 1-5 i 8-10 u populaciji povratnog križanja iz križanja B73 x *Z. mays* ssp. *diploperennis*.

Xu i sur. (2013.) promatrali su segregacijsku distorziju za vrijeme indukcije majčinskih haploida *in vivo* kod kukuruza. Rezultati su pokazali da su selekcija muškog gametofita i zigotna selekcija doprinjele značajnoj distorziji lokusa, nazvanog *sed1* (*segregation distortion 1*), tijekom indukcije haploida.

Adamski i sur. (2014.) su kod dihaploidnih linija pšenice dobivenih *in vitro* metodom kod 5 od ispitanih 6 kombinacija pronašli segregacijsku distorziju, dok je kod samooplodnih linija i dihaploidnih linija dobivenih oprašivanjem s polenom kukuruza distorzija uočena samo u jednom slučaju. Segregacijska distorzija kod dihaploidnih linija razvijenih kulturom tkiva bila je uzrokovana razvojem više od jedne biljke istog genotipa iz jednog kalusa.

1.2. Cilj istraživanja

1.2.1. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovoga istraživanja su sljedeći:

1. Utvrditi postoje li značajne razlike u genetskoj strukturi između dihaploidnih linija i biljaka F₂ generacije dobivenih samooplodnjom iz istog početnog materijala, odnosno događaju li se neke nepravilnosti, odstupanja od očekivanog razdvajanja po Mendelu, u procesu dobivanja dihaploidnih linija koje bi utjecale na smanjenje frekvencije pojedinih gena i genetske varijabilnosti u takvoj populaciji.
2. Ocijeniti pogodnost dihaploidne metode dobivanja linija kukuruza za korištenje u oplemenjivanju.
3. Ispitati dolazi li do prijenosa nekog segmenta genoma induktora kao očinske komponente u genom majčinskih haploida tijekom *in vivo* indukcije haploida.

1.2.2. Hipoteza

Rezultati fenotipske i genotipske analize pokazat će značajne razlike u genetskoj varijabilnosti unutar populacija dihaploidnih linija u odnosu na genetsku varijabilnost unutar populacija biljaka F₂ generacije dobivenih samooplodnjom iz istog početnog materijala, te će kod dihaploidnih linija doći do odstupanja od očekivanog razdvajanja.

2. MATERIJAL I METODE RADA

2.1. Biljni materijal

Kao početni materijal za indukciju haploida odabrano je 11 jednostrukih hibrida kukuruza. Odabrani su hibridi koji obuhvaćaju elitnu germplazmu Poljoprivrednog instituta Osijek, a prema dužini vegetacije pripadaju različitim FAO skupinama (Tablica 1.)

Tablica 1. Pedigre i dužina vegetacije hibrida kukuruza

Broj	Genotip	Pedigre	FAO skupina
1	OS 298P	2748 CO/Os 2-48	280
2	OS 378	Os 2340-8/Os 27488	360
3	DRAVA 404	Os 942/Os 84-28 A	420
4	OS 430	Os 946/Os 84-28 A	430
5	OSSK 444	Os135-88/Os 3-48	420
6	OSSK 515	Os 84-28 A/Os 990	520
7	OS 499	Os 87-24/Os 5-23	520
8	OSSK 552	Os 84-44/Os 1-44	550
9	OSSK 5717	Os 84-28 A/Os 2695 CO	550
10	OSSK 596	Os 438-95/Os 1-44	600
11	OSSK 617	Os 438-95/Os 6-2	610

Indukcija haploida napravljena je pomoću induktora dobivenog višestrukim križanjem iz ruskog induktora ZMK (Shatskaya, 2010.). Induktor je homozigotan na dominantni gen *R-nj* (*R-navajo*) koji kontrolira obojanost endosperma i klice antocijaninom te omogućuje

razlikovanje haploidnih od diploidnih zrna (Zhang i sur., 2008.). Odlikuje se prosječnim postotkom indukcije 6-8%, metlicama s velikim brojem bočnih grana, te prosječnim periodom cvatnje metlice 5-7 dana. Po duljini vegetacije i vremenu cvatnje induktor pripada u FAO skupinu 200.

2.2. Metode istraživanja

2.2.1. Indukcija i odabir haploida

U prvoj godini istraživanja napravljena je indukcija haploida *in vivo*. Hibridi odabrani za indukciju ručno su posijani 2010. godine na selekcijskom polju u dvoredne parcele duljine 5 metara na razmak od 20 cm unutar reda, odnosno ukupno je posijano 50 zrna svakog hibrida na 11 dvorednih parcela. Induktor je posijan u dva roka sjetve na dvije parcele od kojih je svaka imala po 5 redi. Prvi rok sjetve induktora podudara se s datumom sjetve hibrida, a drugi rok je posijan dva tjedna nakon prvog roka. Ovakav način sjetve bio je nužan kako bi se uskladilo vrijeme cvatnje induktora s cvatnjom hibrida iz različitih FAO skupina te omogućilo njihovo križanje.

Indukcija haploida *in vivo* napravljena je križanjem odabranih hibrida kao majčinskih komponenti s induktorom haploida. Na svim biljkama majčinskih hibrida iščupane su metlice te je gornji klip zaštićen plastičnom vrećicom prije izlaska svile. Kada je svila izrasla u duljini 2 do 3 cm, napravljena je oplodnja smjesom polena prikupljenog na induktoru. Oplodnja je ponovljena 2-3 dana nakon prve oplodnje kako bi se dobio što veći broj zrna po klipu (Tablica 2.).

Nakon berbe klipovi su osušeni na zraku te je napravljen odabir haploidnih zrna pomoću markera *R-nj*. Na svakom se klipu pojavljuje više tipova zrna. Najveći dio činila su hibridna zrna koja imaju obojanu i klicu i endosperm. U određenom postotku pojavila su se haploidna zrna s obojanim endospermom i neobojanom klicom. Na većini klipova pojavila su se i jalova zrna s obojanim endospermom, ali bez klice, a kao rezultat samooplodnje ili nekontrolirane stranooplodnje na pojedinim su se klipovima razvila zrna bez obojenja antocijaninom u endospermu i klici. Takva su zrna odbačena i nisu ušla u izračun postotka pojave haploida.

Tablica 2. Datumi oplodnje majčinskih hibrida s polenom induktora

Broj	Genotip	Datum 1. oplodnje	Datum 2. oplodnje
1	OS 298P	07.07.	10.07.
2	OS 378	09.07.	12.07.
3	DRAVA 404	10.07.	13.07.
4	OS 430	11.07.	13.07.
5	OSSK 444	11.07.	13.07.
6	OSSK 515	12.07.	14.07.
7	OS 499	12.07.	15.07.
8	OSSK 552	13.07.	15.07.
9	OSSK 5717	13.07.	16.07.
10	OSSK 596	14.07.	16.07.
11	OSSK 617	14.07.	17.07.

Za računanje postotka pojave haploida prebrojana su sva zrna s izraženim *R-nj* markerom, odnosno haploidna, hibridna i jalova zrna, po svakom klipu pojedinog genotipa. Postotak haploida po pojedinom klipu izračunat je kao postotni udio haploidnih zrna u odnosu na sva zrna s izraženim *R-nj* markerom, koja uključuju hibridna, haploidna i jalova zrna, a zatim i prosječan postotak haploida po svakom hibridu te se naziva postotak „navodnih“ haploida jer se izračun temelji samo na ekspresiji markera *R-nj* koja u nekim slučajevima nije dovoljno izražena za preciznu klasifikaciju.

2.2.2. D₀ generacija haploida

2.2.2.1. Formiranje D₀ generacije haploida, udvostručenje kromosoma i izvođenje samooplodnje

U drugoj godini istraživanja odabrana haploidna zrna iz svih 11 kombinacija križanja s induktorom posijana su na selekcijskom polju Poljoprivrednog instituta u Osijeku na odvojene parcelice. Zbog velikog ukupnog broja haploida, sjetva je obavljena u dva roka kako bi se omogućilo pravovremeno tretiranje kolhicinom svih haploidnih biljaka. Prvi je rok posijan 28. travnja, a drugi rok 10. svibnja 2011. godine. Haploidi su posijani ručno na međuredni razmak od 70 cm i razmak unutar reda 20 cm, po jedno zrno u svaku kućicu. Tako je formirano 11 višerednih parcela dužine 5 metara s biljkama D₀ generacije. Parcele su bile različite površine ovisno o broju haploida dobivenih po svakom induciranom hibridu (Tablica 3.).

Nakon nicanja postavljen je sustav navodnjavanja kap po kap kako bi se osigurao optimalni vodno zračni odnos u tlu za rast osjetljivih haploidnih biljaka. Za udvostručenje kromosoma korištena je metoda injektiranja otopine kolhicina (Zabirova i Shatskaya, 1999.). Kolhicin je alkaloid formule C₂₂H₂₅O₆ izoliran iz biljke mrazovac (*Colchicum autumnale*) koji sprječava stvaranje diobenog vretena što ima za posljedicu nepravilnu mitozu, odnosno kromosomi se ne mogu kretati do ekvatorijalne ravnine, nego se rasporede po cijeloj stanici. Nakon diobe centromera, kromatide ne odlaze na suprotne polove stanice, već ostaju u jednoj stanici. Takva stanica ima dvostruki broj kromosoma i mitozom daje stanice kćeri također s dvostrukim brojem kromosoma.

Prije tretiranja haploidnih biljaka kolhicinom iz polja su na osnovi fenotipske ocjene uklonjeni hibridi koji su kod odabira haploidnih zrna pogrešno označeni kao navodni haploidi. Od pravih haploida hibridi se razlikuju po boji, razvijenosti, kutu koje listovi zatvaraju u odnosu na stabljiku te obliku vrha prvog lista. Hibridi su tamnije zelene boje i razvijeniji od haploida. Kod pravih haploida listovi zatvaraju manji kut sa stabljikom, nego kod hibrida, a vrh prvog lista je nepravilnog oblika.

Haploidne biljke tretirane su otopinom kolhicina koncentracije 0,125% s 3% dimetil-sulfoksida i 0,7% metil-celuloze u fazi 3-5 razvijenih listova, odnosno 10-18 dana nakon nicanja. Otopina kolhicina injektirana je 3-5 mm iznad vršnog meristema stabljike dva puta

u danu, u ranim jutarnjim i kasnim poslijepodnevnim satima zbog osjetljivosti kolhicina na svjetlost i visoku temperaturu. Tjedan dana nakon tretmana kolhicinom, prebrojane su haploidne biljke koje su preživjele tretman.

Tablica 3. Datum sjetve i tretiranja kolhicinom, te veličina parcele populacija D₀ generacije

Broj	Populacija	Pedigre	Površina parcele (m ²)	Datum sjetve	Tretiranje kolhicinom
1	Os 2701	2748 CO/Os 2-48	115,5	28.04.2011.	20.-26.05.2011.
2	Os 2702	Os 2340-8/Os 27488	115,5	28.04.2011.	20.-26.05.2011.
3	Os 2703	Os 942/Os 84-28 A	210,0	28.04.2011.	21.-26.05.2011.
4	Os 2704	Os 946/Os 84-28 A	108,5	28.04.2011.	22.-26.05.2011.
5	Os 2705	Os 135-88/Os 3-48	84,0	28.04.2011.	22.-26.05.2011.
6	Os 2706	Os 84-28 A/Os 990	112,0	10.05.2011.	25.-30.05.2011.
7	Os 2707	Os 87-24/Os 5-23	73,5	10.05.2011.	25.-30.05.2011.
8	Os 2708	Os 84-44/Os 1-44	56,0	10.05.2011.	25.-30.05.2011.
9	Os 2709	Os 84-28 A/Os 2695 CO	98,0	10.05.2011.	26.-30.05.2011.
10	Os 2710	Os 438-95/Os 1-44	59,5	10.05.2011.	26.-30.05.2011.
11	Os 2711	Os 438-95/Os 6-2	77,0	10.05.2011.	27.-30.05.2011.

Na svakoj biljci D₀ generacije gornji je klip zaštićen plastičnom vrećicom prije pojave svile, kako bi se spriječila stranooplodnja, te je kod fertilnih haploidnih biljaka napravljena samooplodnja. Fertilnim se smatraju samo one biljke kod kojih su zadovoljeni uvjeti za izvođenje samooplodnje, a to znači da istovremeno imaju najmanje jednu nit svile na klipu i najmanje jedan razvijeni prašnik iz kojeg je moguće osloboditi polen. Kod većine

fertilnih biljaka bilo je potrebno pripremiti svilu za oplodnju zbog velikog intervala između cvatnje metlice i svilanja. Priprema je napravljena tako da je odrezan vrh listova omotača klipa do pojave svile, a zatim su listovi pažljivo razmaknuti i uklonjeni u dužini oko 2 cm da se oslobode niti svile. Oprašivanje svake biljke ponovljeno je 2-3 puta jer je produkcija polena kod takvih biljaka uglavnom mala.

Berba je obavljena ručno. Svaki je klip odvojen u posebnu papirnu vrećicu koja je označena brojem parcele i rednim brojem klipa.

2.2.2.2. Svojstva D_0 generacije

U D_0 generaciji haploida određeni su nicanje, preciznost $R-nj$ markera, preživljavanje tretmana kolhicinom, uspješnost metode udvostručenja kromosoma te uspješnost izvođenja samooplodnje. Nicanje je određeno kao postotni omjer broja niknulih biljaka u odnosu na ukupan broj posijanih zrna po svakoj parceli. Preciznost markera $R-nj$ izračunata je kao omjer broja haploidnih biljaka nakon ocjenjivanja i uklanjanja hibrida i ukupnog broja niknulih biljaka po svakoj parceli. Preživljavanje tretmana kolhicinom dobiveno je kao odnos broja preživjelih haploidnih biljaka i ukupnog broja stvarnih haploida po parceli. Uspješnost metode udvostručenja kromosoma izražena je kao postotni udio fertilnih haploida u odnosu na ukupan broj biljaka koje su preživjele tretman kolhicinom, a uspješnost izvođenja samooplodnje kao omjer broja haploida koji su formirali barem jedno zrno na klipu i broja fertilnih haploida.

2.2.3. Formiranje D_1 generacije i umnažanje dihaploidnih linija

U trećoj godini istraživanja linije dobivene samooplodnjom haploidnih biljaka D_0 generacije posijane su svaka u zaseban red. Ovisno o broju zrna dobivenih po klipu posijano je 1-20 zrna svake dihaploidne linije. Tijekom vegetacije pratila se ujednačenost linije i pojava atipičnih biljaka ukoliko je to bilo moguće s obzirom na broj biljaka po svakoj dihaploidnoj liniji.

Na svim linijama napravljena je samooplodnja. Na osnovi ocjene fenotipa i osjetljivosti na bolesti, te broja linija po populaciji izdvojene su tri populacije za daljnja istraživanja: Os 2702, Os 2703 i Os 2709. Linije iz tri odabrane populacije posijane su u zimskoj vegetaciji u Čileu 2012./2013. godine radi umnažanja materijala za poljske pokuse u narednoj godini istraživanja.

2.2.4. Poljski pokusi i pedoklimatski uvjeti

Dihaploidne linije iz tri odabrane populacije uključene su u četvrtoj godini istraživanja u pokuse postavljene na pokusnom polju Poljoprivrednog instituta Osijek. Linije iz svake odabrane populacije su posijane u zasebnom pokusu postavljenom po α -dizajnu, modificiranom planu s nepotpunim blokovima (Patterson i Williams, 1976.) u jednorednim parcelama dužine 6 metara i tri ponavljanja. Međuredni razmak bio je 70 cm, a razmak unutar reda 25 cm. Kao standardi u svakom su pokusu korištene roditeljske linije početnog hibrida na kojem je napravljena indukcija. Sveukupno, tri pokusa je uključivalo 36, 75 i 54 pokusnih članova, od kojih su 33, 71 i 50 bile dihaploidne linije odnosnih populacija plus roditelji u promjenjivom višekratnom broju do popune lattice plana. Sjetva sva tri pokusa je obavljena 28. travnja 2013., a berba 24. listopada 2013. kada su sve linije dosegle tehnološku zrelost.

Tip tla je humofluvisol černozemni, srednje duboko oglejeni, nekarbonatan, praškasto glinasto ilovast, a kemijski sastav je bio sljedeći: pH 6,24/1M KCl, humus 2,73%, dušik 0,13%, 16,39 mg P₂O₅/100 g tla, 32,41 mg K₂O/100 mg tla (Romić i sur., 2006.).

Na području Osijeka prema Köppenovoj klasifikaciji klime prevladava umjereno topla kišna klima (Penzar i Penzar, 2000.). Srednja temperatura najtoplijeg mjeseca u godini najčešće je viša od 10 °C, a niža od 22 °C s dosta oborina početkom ljeta, a malo krajem ljeta. Klimatski podaci o srednjim mjesečnim temperaturama i oborinama za razdoblje od travnja do listopada 2013. dobiveni su s meteorološke postaje Pinova Meteo postavljene u blizini poljskog pokusa. Za prikaz višegodišnjih prosjeka korišteni su podatci za razdoblje 1971.-2000. godine. Prema preporuci Svjetske meteorološke organizacije klimatski atlas izrađuju se za standardna tridesetogodišnja razdoblja što bi obuhvaćalo period 1961.-1990. godine (Zaninović i sur., 2008.), no obzirom na vremensku varijabilnost klimatskih parametara i uočeno zatopljenje u posljednjoj dekadi dvadesetog stoljeća, prikazani su podatci za klimatsko razdoblje 1971.-2000. godine.

U 2013. godini tijekom vegetacije kukuruza srednje mjesečne temperature zraka nisu odstupale od višegodišnjeg prosjeka osim u srpnju i kolovozu kada su prosječne srednje mjesečne temperature zraka bile više za 2 °C (Tablica 4.). Ukupna količina oborina od travnja do listopada 2013. godine bila je nešto veća od višegodišnjeg prosjeka. U svibnju, u fazi nicanja i ranog porasta kukuruza, i rujnu, u fazi dozrijevanja zrna, palo je dvostruko

više oborina u odnosu na višegodišnji prosjek, dok je manje oborina palo u lipnju i srpnju kada je kukuruz u fazi brzog vegetativnog porasta i cvatnje.

Tablica 4. Srednje mjesečne temperature zraka (°C) i mjesečne količine oborina (mm) u Osijeku za 2013. godinu i višegodišnji prosjek (1971.-2000.)

	Srednja mjesečna temperatura zraka (°C)		Količina oborina (mm)	
	2013.	1971.-2000.	2013.	1971.-2000.
Travanj	13,5	11,2	74,3	51,0
Svibanj	17,2	16,7	125,4	59,2
Lipanj	20,4	19,7	27,0	82,0
Srpanj	23,8	21,3	43,1	65,4
Kolovoz	23,5	20,8	62,8	61,9
Rujan	16,1	16,5	129,3	51,0
Listopad	13,6	11,0	42,4	56,6

2.2.4.1. Agromorfološka svojstva u poljskim pokusima

Ocjenjivanje linija u svakom je pokusu napravljeno u sva tri ponavljanja. Za vrijeme vegetacije ocijenjeni su polinacija i svilanje. Cvatnja metlice i svilanje određeni su kao suma efektivnih toplinskih jedinica (GDD, *growing degree days*) od sjetve do pojave prašenja polena i svile na više od 50% biljaka unutar jedne parcele, posebno. Minimalne i maksimalne dnevne temperature potrebne za izračunavanje GDD dobivene su s Pinova Meteo meteorološke postaje postavljene u blizini poljskih pokusa. Osnovna temperatura u izračunavanju GDD postavljena je na 10 °C. Na osnovi GDD potrebnih za cvatnju muške i ženske cvati, određen je interval između cvatnje i svilanja (*ASI, anthesis-silking interval*) izražen kao razlika GDD u cvatnji između ženske i muške cvati.

Od morfoloških svojstava izmjerena je visina stabljike do baze klipa i visina cijele biljke do vrha metlice. Visina je mjerena nakon završetka cvatnje svih linija u sva tri ponavljanja na uzorku od 10 slučajno odabranih biljaka po parceli što je iznosilo ukupno 30 mjerenja po svakoj dihaploidnoj liniji i linijama kontrole (roditeljske komponente hibrida iz kojih su razvijene dihaploidne linije).

Na svakoj liniji u sva tri ponavljanja napravljeno je po 5 samooplodnji kako bi se izbjegle ksenije, a ostale biljke su prepuštene slobodnoj oplodnji. Ubrani su svi klipovi sa svih biljaka na pokusnoj parceli. Izmjeren je prinos po svakoj pokusnoj parceli, vlaga zrna i postotak oklaska.

Nakon berbe odvojeni su klipovi iz samooplodnje za daljnju analizu. Izmjerena je masa klipa s oklaskom, duljina klipa, promjer u sredini klipa i broj redi zrna. Mjerenja su napravljena na uzorku od 5 klipova po svakom članu pokusa u sva tri ponavljanja.

2.2.5. Formiranje F₂ samooplodne generacije i agromorfološka svojstva

U zimskoj vegetaciji u Čileu 2012./2013. godine posijani su jednostruki hibridi koji su korišteni kao početni materijal za indukciju haploida za tri odabrane populacije dihaploidnih linija. Na njima je napravljena samooplodnja kako bi se dobila F₂ generacija.

Četvrte godine istraživanja posijano je po 800 zrna F₂ generacije od tri odabrane populacije. Ocijenjeni su cvatnja metlice i svilanje na cijeloj populaciji F₂ biljaka kako je prethodno opisano za dihaploidne linije. Slučajnim odabirom u svakoj populaciji F₂ izdvojeno je 200 biljaka. Na odabranim biljkama napravljena je samooplodnja. Nakon cvatnje izmjerena je visina stabljike do baze klipa i visina cijele biljke do vrha metlice na svim odabranim biljkama.

Ubrani su svi klipovi sa svih biljaka na svakoj parceli. Izmjeren je prinos po svakoj pokusnoj parceli, vlaga zrna i postotak oklaska. Klipovi iz samooplodnje korišteni su za analizu svojstava. Na uzorku od 200 klipova po F₂ populaciji izmjereni su masa klipa, duljina klipa, promjer u sredini klipa i broj redi zrna.

2.2.6. Molekularna analiza dihaploidnih linija

Na induktoru, dihaploidnim linijama iz tri odabrane populacije i roditeljskim inbred linijama dihaploidnih linija napravljena je molekularna analiza pomoću SNP markera

(*single nucleotide polymorphism*) (Ganal i sur., 2009.). Molekularna analiza bazirana je na Illumina Infinium MaizeSNP50K čipu (Ganal i sur., 2011.), koji uključuje 56110 SNP markera izvedenih iz referencijalne sekvence inbred linije kukuruza B73, razvijenom u suradnji tvrtki TraitGenetics i Syngente, te Francuskoga nacionalnog instituta za poljoprivredna istraživanja (INRA). Ekstrakcija DNA napravljena je po standardnom cetiltrimetil amonij bromid (CTAB) protokolu za genotipizaciju. Kao kontrole korištene su linije B73 i Mo17. Ova analiza napravljena je u TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Njemačka.

Podatci o genotipu pojedinog alela dobiveni su pomoću GenomeStudio Genotyping Module v1.0 (Illumina) programskog paketa potpuno automatiziranom obradom sirovih podataka pomoću algoritma za grupiranje podataka. Kao dodatna provjera kvalitete dobivenih podataka napravljena je analiza dosljednosti genotipskih odaziva određenih u tehničkim kopijama (ista DNA analizirana dva puta – po 2 uzorka B73, Mo17 i nasumično odabrane OS linije). Mjesta SNP markera uzduž fizikalne mape određena su prema njihovim kromosomskim koordinatama kod referentnog genoma linije B73. Svi SNP markeri kod kojih je bilo nepoznato mjesto na fizikalnoj mapi uklonjeni su iz seta podataka kao i svi polimorfni markeri kod kojih su na više od 10% lokusa nedostajali podatci o genotipu.

2.2.7. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobivenih rezultata obuhvaćala je obradu podataka o D₀ generaciji, agromorfoloških podataka dobivenih mjerenjem svojstava u poljskim pokusima i na F₂ generaciji te molekularnih podataka.

2.2.7.1. Statistička obrada podataka o indukciji i haploidima D₀ generacije

Podaci o indukciji haploida obuhvaćali su frekvenciju navodnih haploida po klipu i prosječnu frekvenciju haploida po genotipu, a podaci dobiveni u D₀ generaciji obuhvaćali su frekvenciju nicanja, preciznost markera *R-nj*, preživljavanje tretmana kolhicinom, uspješnost udvostručenja kromosoma i uspješnost izvođenja samooplodnje.

Izračunat je koeficijent varijacije za svojstvo frekvencije navodnih haploida kao relativni pokazatelj varijabilnosti. Za utvrđivanje razlika opaženih od očekivanih frekvencija ispitanih svojstava korišten je χ^2 test (na razini $p < 0,05$ i $p < 0,01$).

Za statističku obradu korišten je Analyse-it programski paket za Microsoft Excel (version 3.91).

2.2.7.2. Statistička obrada morfološko-agronomskih podataka

2.2.7.2.1. Statistička obrada podataka iz poljskih pokusa

Statistička obrada morfološko-agronomskih podataka uključivala je srednje vrijednosti pojedinačnih mjerenja visine stabljike do klipa, visine do vrha metlice, mase klipa, dužine i promjera klipa, broja redi zrna na klipu, vrijednosti cijele obračunske parcele za svojstva cvatnje metlice i svilanja, te vrijednost cijele obračunske parcele za prinos zrna prevedene na prinos po hektaru.

Za svako je svojstvo izračunat koeficijent varijabilnosti kao relativni pokazatelj varijabilnosti ispitivanih svojstava. Napravljena je analiza varijance (ANOVA) za sva ispitana svojstva. Genotipovi su za svako svojstvo uspoređeni Fisherovim LSD testom na razini $p < 0,05$ i $p < 0,01$. Napravljena je procjena heritabilnosti u širem smislu te su izračunati koeficijenti korelacije između svojstava u sve tri populacije dihaploidnih linija. Statistička analiza napravljena je korištenjem statističkog programskog paketa PLABSTAT (Utz, 1995.).

Na osnovi srednje vrijednosti pojedine populacije, heritabilnosti i genotipske varijance izračunat je kriterij uporabljivosti (U) pojedine populacije prema Schnell (1983.) po formuli:

$$U_p = \mu + \Delta G(\alpha)$$

gdje je μ srednja vrijednost ispitanog svojstva, a $\Delta G(\alpha)$ predviđeni odgovor na selekciju koji je produkt intenziteta selekcije ($i_{\alpha;N}$), standardne devijacije (σ_x) i drugog korijena iz heritabilnosti (h) (Falconer i Mackay, 1996.):

$$\Delta G(\alpha) = i_{\alpha;N} \sigma_x h$$

Selekcijski intenzitet u maloj populaciji ($i_{\alpha;N}$) procijenjen je preko selekcijskog intenziteta (i_α) u velikim populacijama prema Burrows (1972.):

$$i_{\alpha;N} \approx i_\alpha - \frac{1 - \alpha}{2i_\alpha \alpha (N + 1)}$$

gdje je N veličina populacije, a α postotak odabranih genotipova.

2.2.7.2.2. Statistička obrada podataka o F₂ generaciji

Podatci o F₂ generaciji obuhvaćali su srednje vrijednosti pojedinačnih mjerenja visine stabljike do klipa, visine do vrha metlice, mase klipa, dužine i promjera klipa, broja redi zrna na klipu, vrijednosti cijele obračunske parcele za svojstva cvatnje metlice i svilanja, i vrijednost cijele obračunske parcele za prinos zrna prevedene na prinos po hektaru.

Nulta hipoteza o jednakosti srednjih vrijednosti ispitanih svojstava ($H_0: \mu_1 = \mu_2$) u F₂ generaciji i pripadajućoj populaciji dihaploidnih linija ispitana je pomoću t-testa po formuli (Snedecor i Cochran, 1989.):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma} * \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

gdje je:

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2}$$

$$\sigma^2 = \frac{(n_1 - 1) * \sigma_1^2 + (n_2 - 1) * \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

te interval prihvatanja nulte hipoteze:

$$-t_{\frac{\alpha}{2}; n_1 + n_2 - 2} < t < t_{\frac{\alpha}{2}; n_1 + n_2 - 2}$$

gdje su \bar{X}_1 i \bar{X}_2 srednje vrijednosti ispitivanih svojstava; n_1 i n_2 veličine uzorka; σ^2 varijanca; σ standardna devijacija.

2.2.7.3. Statistička obrada molekularnih podataka

U svakoj populaciji dihaploidnih linija izdvojeni su markeri polimorfni između roditeljskih linija, a zatim su oznake parova baza na svakom lokusu zamijenjene oznakom „A“ za nukleotid podrijetlom od linije majke, odnosno „B“ za nukleotid podrijetlom od linije oca. Svi heterozigotni markeri označeni su s „H“. Svi su lokusi podvrgnuti χ^2 testu kako bi se utvrdili lokusi s odstupanjem od uobičajenog omjera razdvajanja po Mendelu. Smjer distorzija određen je unošenjem frekvencija genotipova svakog markera uzduž fizikalne mape.

Različitość genotipova izračunata je kao udio SNP markera koji su se razlikovali između dva genotipa, pri čemu je svaki mogući genotip markera na svakom SNP lokusu smatran jednako različitim od bilo kojeg drugog. Klaster analiza napravljena je koristeći UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic means*) metodu pri čemu je kao mjera genetske različitości korištena očekivana supstitucija nukleotida po lokusu. Analiza različitości i klaster analiza napravljene su u TASSEL version 3 programskom paketu (Bradbury i sur., 2007.).

Kako bi se utvrdilo sadrže li dihaploidne linije pored genetske informacije roditelja i segmente kromosoma induktora, izdvojeni su svi markeri na kojima se induktor razlikovao od obje roditeljske linije u svakoj od tri ispitane populacije dihaploidnih linija. Sve baze podrijetlom od bilo kojeg roditelja označene su s „0“, a baze induktora oznakom „1“. Zatim su prebrojani svi segmenti s oznakom „1“ po dihaploidnoj liniji te je izračunata veličina segmenata.

Simulacija raspodjele genotipova za dva tipa potomstva (F_2 generaciju i dihaploidne linije) napravljena je pomoću programa MapDisto (Lorieux, 2012.).

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Frekvencija navodnih haploida

Indukcijskim križanjem dobiven je različit broj (26-45) oplodjenih klipova po genotipu te je ovisno o broju klipova i frekvenciji haploida po klipu dobiven i različit broj haploidnih zrna. Postotak navodnih haploida dobivenih *in vivo* indukcijom kretao se od 6,89% kod genotipa OSSK 552 do 15,80% kod genotipa OS 298P (Tablica 5.).

Frekvencija navodnih haploida po klipu najmanje je varirala kod genotipa OS 289P (20,91%), a najviše kod genotipa OSSK 596 (45,18%). Analizom rezultata mjerenja frekvencije pojavljivanja navodnih haploida po klipu utvrđene su značajne razlike između pojedinih klipova kod genotipova OS 378, DRAVA 404, OS 430, OSSK 444, OS 499, OSSK 552 i OSSK 5717, dok kod genotipova OS 298P, OSSK 515, OSSK 596 i OSSK 617 nije bilo značajnih razlika.

Tablica 5. Broj, prosječni postotak ± standardna pogreška i raspon navodnih haploida, te koeficijent varijabilnosti i χ^2 test za frekvenciju navodnih haploida po genotipu

Genotip	Broj klipova	Navodni haploidi			Koeficijent varijacije	χ^2 test
		Broj	Prosjek	Raspon		
			%	%	%	
OS 298P	26	765	15,80±0,65	9,75 - 22,65	20,91	n.s.
OS 378	37	700	11,74±0,65	3,33 - 20,27	33,51	**
DRAVA 404	43	1253	14,56±0,56	5,98 - 22,70	25,24	*
OS 430	45	710	11,62±0,70	0,00 - 21,60	40,41	**
OSSK 444	32	557	10,74±0,64	2,45 - 19,31	33,96	**
OSSK 515	45	730	12,94±0,55	5,88 - 22,58	28,32	n.s.
OS 499	39	492	8,30±0,57	2,29 - 18,52	42,72	**
OSSK 552	36	382	6,89±0,51	0,00 - 14,46	44,53	**
OSSK 5717	42	655	10,22±0,59	0,00 - 20,37	37,57	**
OSSK 596	30	407	7,98±0,66	0,00 - 14,01	45,18	n.s.
OSSK 617	32	526	9,02±0,45	4,42 - 15,70	28,32	n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

3.2. Analiza svojstava D₀ generacije

Rezultat χ^2 testa pokazao je statistički značajnu razliku (na razini $p < 0,01$) između genotipova za svojstva nicanja, preživljavanja tretmana kolhicinom i fertilitnost haploidnih biljaka, odnosno uspješnost udvostručenja kromosoma, dok nije bilo statistički značajne razlike za svojstva preciznosti markera *R-nj* i uspješnosti izvođenja samooplodnje kod fertilnih biljaka (Tablica 6.).

Relativna frekvencija nicanja kretala se od 26,44% u populaciji Os 2708 do 65,62% u populaciji Os 2706. Hibridi su se u najvećoj relativnoj frekvenciji pojavili u populaciji Os 2711 što ukazuje na najmanju preciznost markera *R-nj* prilikom odabira haploidnih zrna (80,24%), dok je preciznost markera *R-nj* u odabiru haploida bila potpuna (100,00%) u populaciji Os 2708. Najbolji oporavak nakon tretmana kolhicinom imale su haploidne biljke u populaciji Os 2705 (97,14%), dok je kod populacije Os 2708 tretiranje kolhicinom preživjelo 50,50 % biljaka. Udvostručenje kromosoma bilo je najuspješnije u populaciji Os 2709 što je rezultiralo najvećom relativnom frekvencijom fertilnih biljaka (31,06%), a najmanja frekvencija fertilnih biljaka, odnosno dihaploida, zabilježena je u populaciji Os 2707 (8,07%). Izvođenje samooplodnje dihaploidnih biljaka D₀ generacije najveći je uspjeh imalo u populaciji Os 2703 u kojoj je ostvareno 69,23% oplodnji u odnosu na broj fertilnih biljaka.

Od svojstava ispitanih u D₀ generaciji najviše je varirala fertilitnost haploidnih biljaka (39,93%), a namanje preciznost markera *R-nj* (5,50%) (Tablica 6.).

Tablica 6. Relativna frekvencija svojstava D₀ generacije

Populacija	Pedigre	Nicanje	Preciznost markera <i>R-nj</i>	Preživljavanje tretmana kolhicinom	Fertilnost	Uspješnost izvođenja samooplodnje
		%	%	%	%	%
Os 2701	OS 298P	46,14	98,87	96,56	26,11	40,91
Os 2702	OS 378	47,57	98,50	93,60	21,82	61,19
Os 2703	DRAVA 404	57,62	98,61	89,19	20,47	69,23
Os 2704	OS 430	37,75	96,64	94,59	13,06	62,50
Os 2705	OSSK 444	44,34	99,19	97,14	21,01	62,00
Os 2706	OSSK 515	65,62	98,33	94,48	9,89	43,18
Os 2707	OS 499	56,71	98,57	81,09	8,07	50,00
Os 2708	OSSK 552	26,44	100,00	50,50	11,76	50,00
Os 2709	OSSK 5717	52,98	97,98	94,71	31,06	56,00
Os 2710	OSSK 596	40,29	95,12	87,18	12,50	64,71
Os 2711	OSSK 617	48,10	80,24	63,55	26,36	67,65
	Prosjek	47,60	96,55	85,69	18,37	57,03
	SD	10,22	5,31	14,50	7,34	9,26
	CV	21,46	5,50	16,93	39,93	16,24
	SS	10	10	10	10	10
	χ^2	145,39	8,31	48,78	85,93	10,55
		**	n.s.	**	**	n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

3.3. Analiza agromorfoloških svojstava u populacijama dihaploidnih linija

Analizom varijance procijenjeni su učinci ponavljanja, genotipova i blokova kao izvora variranja za sva ispitana svojstva u sve tri populacije dihaploidnih linija.

3.3.1. Analiza agromorfoloških svojstava u populaciji Os 2702

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike ($p < 0,01$) između dihaploidnih linija u populaciji Os 2702 za svojstva polinacije, svilanja i intervala između polinacije i svilanja (ASI, *anthesis silking interval*) kao i za procjenu prinosa zrna po hektaru (Tablica 7.).

Tablica 7. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2702 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test							
		Polinacija		Svilanje		ASI		Prinos	
Ponavljanje	2	0,65	n.s.	1,22	n.s.	0,71	n.s.	0,32	n.s.
Genotip	35	32,28	**	31,80	**	6,75	**	9,48	**
Blok	15	0,73	n.s.	0,69	n.s.	0,90	n.s.	0,61	n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Srednje vrijednosti sume toplinskih jedinica u populaciji Os 2702 varirale su od 709,3 do 872,7 GDD za polinaciju, odnosno od 716,0 do 886,7 GDD za svilanje. Prosječna vrijednost intervala između polinacije i svilanja kretala se između 0,0 i 56,7 GDD, dok se prinos kretao od 0,6 do 9,3 t/ha (Tablica 8.). Vrijednost LSD testa ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) za značajnost razlika između srednjih vrijednosti pojedinih linija za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja i prinosa prikazana je u Tablici 8. Za svojstvo polinacije 16 dihaploidnih linija imalo je veću potrebnu sumu toplinskih jedinica za polinaciju, a 14 za svilanje u odnosu na roditeljsku liniju Os 2340-8 s višom srednjom vrijednosti svojstva, dok je šest, odnosno tri linije, imalo manju vrijednost u odnosu na ranijeg roditelja Os 27488 za ista svojstva. Jedna dihaploidna linija imala je statistički značajno manju vrijednost intervala između polinacije i svilanja u odnosu na roditeljsku liniju s manjom srednjom vrijednosti intervala, te su dvije dihaploidne linije imale veći prinos od prinosa roditeljske linije Os 2340-8.

Tablica 8. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa zrna u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2702 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
		GDD	GDD	GDD	t/ha
1	Os 2702-01	796,3	813,0	16,7	1,8
2	Os 2702-02	845,3	863,3	18,0	2,8
3	Os 2702-03	709,3	716,0	6,7	8,0
4	Os 2702-04	872,7	886,7	14,0	1,6
5	Os 2702-05	767,0	771,0	4,0	7,1
6	Os 2702-06	809,3	821,0	11,7	3,9
7	Os 2702-07	726,7	771,0	44,3	2,5
8	Os 2702-08	716,3	730,3	14,0	3,2
9	Os 2702-09	805,0	825,3	20,3	2,5
10	Os 2702-10	821,7	821,7	0,0	9,3
11	Os 2702-11	800,7	829,0	28,3	1,5
12	Os 2702-12	792,0	800,7	8,7	3,1
13	Os 2702-13	737,7	763,0	25,3	1,9
14	Os 2702-14	796,3	804,3	8,0	1,9
15	Os 2702-15	796,3	817,3	21,0	3,8
16	Os 2702-16	833,7	886,7	53,0	0,8
17	Os 2702-17	771,0	787,7	16,7	2,9
18	Os 2702-18	763,0	779,3	16,3	2,9
19	Os 2702-19	845,3	886,7	41,3	1,5
20	Os 2702-20	737,3	748,7	11,3	3,8
21	Os 2702-21	748,3	805,0	56,7	0,9
22	Os 2702-22	775,3	800,7	25,3	2,0
23	Os 2702-23	792,0	813,0	21,0	4,1
24	Os 2702-24	817,3	846,0	28,7	3,1
25	Os 2702-25	730,3	755,0	24,7	5,8
26	Os 2702-26	730,3	734,0	3,7	3,5
27	Os 2702-27	809,3	833,3	24,0	0,6
28	Os 2702-28	817,3	859,0	41,7	2,1
29	Os 2702-29	737,3	759,0	21,7	4,0
30	Os 2702-30	817,3	821,0	3,7	2,9
31	Os 2702-31	837,0	854,3	17,3	2,8
32	Os 2702-32	723,0	751,7	28,7	5,2
33	Os 2702-33	763,0	771,0	8,0	5,4
34	Os 2340-8-1	767,0	787,7	20,7	6,3
35	Os 27488	751,7	767,0	15,3	3,0
36	Os 2340-8-2	775,3	800,7	25,3	5,5
Prosjek		781,5	802,3	20,7	3,4
LSD _{0,05}		18,4	19,9	13,5	1,7
LSD _{0,01}		24,6	26,4	18,0	2,3

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini p<0,01

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini p<0,05

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini p<0,01

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini p<0,05

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike između dihaploidnih linija za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine do vrha metlice (Tablica 9.), kao i za duljinu, promjer i masu klipa, te broj redi zrna na klipu (Tablica 10.). Učinak ponavljanja kao izvora variranja bio je statistički značajan za svojstva visine do klipa i metlice (Tablica 9.) te broj redi zrna na klipu (Tablica 10.), dok je učinak bloka bio značajan samo za svojstvo visine do baze klipa (Tablica 9.).

Tablica 9. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2702 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test	
		Visina klipa	Visina metlice
Ponavljanje	2	6,75 **	30,27 **
Genotip	35	25,70 **	25,33 **
Blok	15	2,62 **	1,24 n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 10. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2702 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test			Stupnjevi slobode	F-test Br. redi zrna
		Duljina	Promjer	Masa		
Ponavljanje	2	0,93 n.s.	1,42 n.s.	1,22 n.s.	2	7,84 **
Genotip	35	9,32 **	5,79 **	9,29 **	35	3,02 **
Blok	15	1,15 n.s.	1,28 n.s.	0,72 n.s.	-	-

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Prosječna vrijednost mjerenja visine stabljike do baze klipa u populaciji Os 2702 varirala je između 54,5 cm i 106,2 cm, dok se prosječna visina do vrha metlice kretala od 149,0 do 249,8 cm (Tablica 11.). Vrijednosti LSD testa ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) za svojstva visine stabljike prikazane su u Tablici 11. Tri dihaploidne linije imalo je nižu stabljiku do baze klipa u odnosu na roditeljsku liniju Os 27488 s manjom prosječnom vrijednosti ovog svojstva, a jedna linija višu u odnosu na roditeljsku liniju Os 2340-8. Kod dvije dihaploidne linije

visina stabljike do vrha metlice bila je statistički značajno manja u odnosu na oba roditelja te kod dvije linije statistički veća.

Duljina klipa u populaciji Os 2702 varirala je između 9,0 i 17,9 cm, a promjer klipa između 3,9 i 4,8 cm. Prosječan broj redi zrna na klipu kretao se od 13,7 do 18,8, a prosječna masa klipa iznosila je između 57,0 g i 188,9 g (Tablica 11.). U usporedbi s roditeljskim linijama 15 dihaploidnih linija imalo je statistički značajno manju duljinu klipa u odnosu na oba roditelja, a dvije dihaploidne linije statistički značajno veću duljinu klipa. Za svojstvo promjera klipa pronađena je jedna dihaploidna linija sa statistički značajno većom i četiri linije sa značajno manjom vrijednosti u odnosu na oba roditelja. Četiri dihaploidne linije imale su veću prosječnu masu klipa u odnosu na oba roditelja te dvije linije veći broj redi zrna po klipu (Tablica 11.).

Tablica 11. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva visine stabljike i svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2702 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Visina do klipa <i>cm</i>	Visina do metlice <i>cm</i>	Duljina klipa <i>cm</i>	Promjer klipa <i>cm</i>	Broj redi zrna	Masa klipa <i>g</i>
1	Os 2702-01	59,0	174,7	11,2	3,9	15,6	65,2
2	Os 2702-02	90,2	207,7	14,5	4,1	14,8	91,8
3	Os 2702-03	99,7	222,5	16,2	4,6	17,6	163,9
4	Os 2702-04	83,8	196,8	9,9	4,3	16,8	61,1
5	Os 2702-05	90,2	217,3	17,3	4,3	16,2	148,2
6	Os 2702-06	80,2	186,2	15,4	4,0	15,0	107,8
7	Os 2702-07	60,7	162,3	13,3	4,3	15,1	88,8
8	Os 2702-08	57,5	165,5	12,2	4,6	17,8	98,6
9	Os 2702-09	90,5	216,5	13,5	4,3	13,7	102,9
10	Os 2702-10	106,2	249,8	17,9	4,6	16,4	188,7
11	Os 2702-11	68,0	199,5	14,4	4,2	17,4	94,2
12	Os 2702-12	71,3	196,8	13,3	4,4	16,3	100,3
13	Os 2702-13	75,3	176,2	12,3	4,0	15,6	74,8
14	Os 2702-14	78,7	175,8	11,9	4,3	17,4	78,9
15	Os 2702-15	99,5	242,3	12,1	4,5	17,7	104,6
16	Os 2702-16	65,6	198,9	12,7	4,4	16,7	73,3
17	Os 2702-17	78,2	181,3	11,9	4,5	17,2	95,0
18	Os 2702-18	79,5	180,5	13,4	4,4	17,7	109,1
19	Os 2702-19	86,0	198,7	12,1	4,5	17,6	90,1
20	Os 2702-20	74,7	175,7	14,5	4,3	16,9	105,8
21	Os 2702-21	54,5	149,0	9,0	4,3	16,3	57,0
22	Os 2702-22	59,3	154,7	11,7	3,9	15,9	74,3
23	Os 2702-23	78,8	187,2	12,5	4,5	18,8	105,1
24	Os 2702-24	88,3	219,5	16,5	4,5	15,0	124,6
25	Os 2702-25	83,0	221,2	14,5	4,4	18,2	124,3
26	Os 2702-26	68,3	166,2	12,0	4,1	17,4	91,7
27	Os 2702-27	64,2	179,3	9,9	4,8	15,7	58,2
28	Os 2702-28	72,7	171,5	12,0	4,3	16,3	74,7
29	Os 2702-29	89,0	223,8	15,4	4,6	16,7	145,3
30	Os 2702-30	72,3	178,2	14,0	4,3	17,7	103,9
31	Os 2702-31	88,8	206,0	12,9	4,4	16,8	100,7
32	Os 2702-32	82,7	187,3	13,6	4,5	17,3	119,3
33	Os 2702-33	88,8	203,2	14,2	4,5	17,0	122,4
34	Os 2340-8-1	93,5	213,3	14,6	4,4	15,7	114,4
35	Os 27488	66,3	170,2	15,0	4,2	16,4	115,3
36	Os 2340-8-2	90,3	207,7	14,8	4,5	16,0	119,9
	Prosjek	78,8	193,4	13,4	4,4	16,6	102,6
	LSD_{0,05}	7,1	11,3	1,9	0,2	1,8	25,0
	LSD_{0,01}	9,5	15,0	2,5	0,3	2,4	33,3

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$


statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$


3.3.1.1. Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2702

Vrlo jaka pozitivna korelacija u populaciji Os 2702 utvrđena je između polinacije i svilanja ($r = 0,95$), mase klipa i prinosa zrna po hektaru ($r = 0,90$), mase i duljine klipa ($r = 0,89$) te visine stabljike do baze klipa i visine do vrha metlice ($r = 0,87$). Koeficijenti korelacije između prinosa i visine stabljike do baze klipa, prinosa i visine do vrha metlice, te prinosa i duljine klipa, kao i visine do baze klipa i visine do vrha metlice s duljinom i masom klipa ukazuju na srednje jaku pozitivnu korelaciju između navedenih svojstava. Između prinosa zrna i intervala između polinacije i svilanja utvrđena je srednje jaka negativna korelacija, kao i između prinosa i svilanja, te mase i duljine klipa s intervalom između polinacije i svilanja (Tablica 12.).

Tablica 12. Koeficijenti korelacije između ispitivanih svojstava u populaciji Os 2702

	Polinacija	Svilanje	ASI	VKL	VMET	DKL	PRKL	BRRED	Masa klipa
Prinos	-0,34	-0,47	-0,51	0,67	0,61	0,75	0,31	0,16	0,90
Polinacija		0,95	0,07	0,20	0,24	-0,14	-0,07	-0,22	-0,27
Svilanje			0,36	0,07	0,15	-0,25	-0,07	-0,25	-0,40
ASI				-0,37	-0,26	-0,41	-0,01	-0,15	-0,48
VKL					0,87	0,58	0,36	0,01	0,68
VMET						0,61	0,41	0,00	0,68
DKL							0,16	-0,11	0,89
PRKL								0,36	0,40
BRRED									0,15

 statistički značajno na razini $p < 0,01$

 statistički značajno na razini $p < 0,05$

ASI -interval između polinacije i svilanja (anthesis-silking interval)

DKL -duljina klipa

VKL -visina stabljike do baze klipa

PRKL -promjer klipa

VMET -visina stabljike do vrha metlice

BRRED -broj redi zrna na klipu

3.3.2. Analiza svojstava u populaciji Os 2703

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike između dihaploidnih linija u populaciji Os 2703 za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja i prinos zrna po hektaru. Učinak ponavljanja bio je statistički značajan za svojstva prinosa (na razini $p < 0,01$) i svilanja ($p < 0,05$), dok su blokovi bili statistički značajan izvor variranja za svojstvo svilanja ($p < 0,05$) (Tablica 13.).

Tablica 13. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2703 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test			
		Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
Ponavljanje	2	2,19 n.s.	3,93 *	1,62 n.s.	6,43 **
Genotip	74	20,91 **	24,50 **	9,45 **	8,19 **
Blok	12	1,57 n.s.	1,97 *	1,47 n.s.	0,51 n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Srednje vrijednosti prinosa zrna u populaciji Os 2703 kretale su se između 0,5 t/ha i 9,6 t/ha. Suma toplinskih jedinica potrebnih za polinaciju bila je najmanja kod linije Os 2703-58 te je iznosila 734,0 GDD, a najveća (872,7 GDD) kod linije Os 2703-52. Suma toplinskih jedinica potrebnih za svilanje varirala je između 748,0 i 891,3 GDD, a interval između polinacije i svilanja kretao se između -15,7 GDD i 58,3 GDD. Kod šest dihaploidnih linija zabilježen je negativan interval između svilanja i cvatnje metlice, od toga je kod jedne dihaploidne linije ASI bio statistički značajno manji u odnosu na oba roditelja. Pet dihaploidnih linija imalo je značajno veću sumu toplinskih jedinica potrebnih za polinaciju, a šest linija za svilanje u odnosu na obje roditeljske inbred linije. Dihaploidna linija Os 2703-38 imala je statistički značajno viši prinos u usporedbi s oba roditelja (Tablica 14.).

Tablica 14. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa zrna u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2703 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
		GDD	GDD	GDD	t/ha
1	Os 2703-01	796,3	809,3	13,0	3,1
2	Os 2703-02	764,0	792,3	28,3	3,9
3	Os 2703-03	771,0	787,7	16,7	4,6
4	Os 2703-04	755,7	759,0	3,3	5,2
5	Os 2703-05	783,3	817,3	34,0	5,2
6	Os 2703-06	823,5	845,3	24,0	2,8
7	Os 2703-07	818,0	849,7	31,7	1,7
8	Os 2703-08	817,3	845,3	28,0	3,1
9	Os 2703-09	737,7	755,7	18,0	5,2
10	Os 2703-10	779,3	821,3	42,0	4,1
11	Os 2703-11	841,3	863,3	22,0	4,2
12	Os 2703-12	779,3	813,0	33,7	4,9
13	Os 2703-13	800,7	800,7	0,0	5,9
14	Os 2703-14	737,7	751,7	14,0	4,7
15	Os 2703-15	863,3	877,3	14,0	1,0
16	Os 2703-16	751,7	767,0	15,3	4,7
17	Os 2703-17	829,3	845,3	16,0	4,8
18	Os 2703-18	804,3	821,3	17,0	4,1
19	Os 2703-19	783,7	788,0	4,3	4,7
20	Os 2703-20	837,0	858,7	21,7	5,3
21	Os 2703-21	829,0	845,3	16,3	3,8
22	Os 2703-22	821,7	817,3	-4,3	6,0
23	Os 2703-23	833,0	829,3	-3,7	5,3
24	Os 2703-24	809,3	821,0	11,7	5,3
25	Os 2703-25	841,3	833,3	-8,0	6,7
26	Os 2703-26	775,0	783,7	8,7	4,2
27	Os 2703-27	783,3	775,3	-8,0	5,6
28	Os 2703-28	796,3	829,0	32,7	2,9
29	Os 2703-29	748,0	763,0	15,0	3,7
30	Os 2703-30	796,3	829,0	32,7	3,4
31	Os 2703-31	809,3	841,0	31,7	2,3
32	Os 2703-32	771,0	779,3	8,3	4,7
33	Os 2703-33	800,7	805,0	4,3	5,7
34	Os 2703-34	755,7	763,0	7,3	6,8
35	Os 2703-35	787,7	837,7	50,0	4,5
36	Os 2703-36	783,7	796,3	12,7	4,4
37	Os 2703-37	792,0	813,0	21,0	5,1
38	Os 2703-38	787,7	809,3	21,7	9,6
39	Os 2703-39	767,0	771,3	4,3	4,6
40	Os 2703-40	792,0	800,7	8,7	4,8

Broj	Genotip	Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
		GDD	GDD	GDD	t/ha
41	Os 2703-41	829,0	855,0	26,0	3,6
42	Os 2703-42	813,0	841,3	28,3	2,7
43	Os 2703-43	763,0	821,3	58,3	4,8
44	Os 2703-44	741,3	763,0	21,7	5,0
45	Os 2703-45	759,0	800,7	41,7	2,7
46	Os 2703-46	813,0	825,7	12,7	5,0
47	Os 2703-47	787,7	805,0	17,3	3,2
48	Os 2703-48	771,3	792,0	20,7	5,2
49	Os 2703-49	833,0	817,3	-15,7	3,5
50	Os 2703-50	854,3	863,3	9,0	2,6
51	Os 2703-51	813,0	829,0	16,0	5,4
52	Os 2703-52	872,7	891,3	18,7	3,7
53	Os 2703-53	821,7	837,0	15,3	4,4
54	Os 2703-54	800,7	813,7	13,0	3,6
55	Os 2703-55	767,0	783,3	16,3	7,4
56	Os 2703-56	759,0	751,7	-7,3	5,1
57	Os 2703-57	813,0	845,3	32,3	4,4
58	Os 2703-58	734,0	748,7	14,7	4,4
59	Os 2703-59	809,3	837,0	27,7	3,4
60	Os 2703-60	829,0	849,7	20,7	3,0
61	Os 2703-61	825,0	845,3	20,3	4,5
62	Os 2703-62	813,0	825,0	12,0	5,0
63	Os 2703-63	841,3	858,7	17,3	2,4
64	Os 2703-64	787,7	809,3	21,7	4,4
65	Os 2703-65	779,0	809,3	30,3	4,2
66	Os 2703-66	800,7	833,0	32,3	4,5
67	Os 2703-67	837,0	858,7	21,7	2,7
68	Os 2703-68	829,3	849,7	20,3	2,7
69	Os 2703-69	858,7	886,7	28,0	0,5
70	Os 2703-70	804,3	808,7	4,3	2,8
71	Os 2703-71	868,0	886,7	18,7	1,8
72	Os 942-1	744,7	748,0	3,3	6,7
73	Os 84-28-A-1	825,3	841,0	15,7	4,0
74	Os 942-2	755,0	759,0	4,0	5,7
75	Os 84-28-A-1	808,7	829,3	20,7	4,5
Prosjek		798,9	816,4	17,6	4,3
LSD_{0,05}		19,9	20,0	11,7	1,4
LSD_{0,01}		26,3	25,4	15,5	1,8

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike između dihaploidnih linija u populaciji Os 2703 za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice (Tablica 15.) te za duljinu i promjer klipa, broj redi zrna na klipu i masu klipa (Tablica 16.). Ponavljanja su se također pokazala kao statistički značajan izvor variranja za svojstva visine, dok nije bilo značajnih razlika između blokova (Tablica 15.). Statistički značajna razlika utvrđena je i između ponavljanja za sva svojstva klipa te između blokova za svojstva promjera klipa i broja redi zrna na klipu (Tablica 16.).

Tablica 15. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2703 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test	
		Visina klipa	Visina metlice
Ponavljanje	2	26,80 **	9,73 **
Genotip	74	16,44 **	31,94 **
Blok	12	1,11 n.s.	1,50 n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 16. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2703 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test			Stupnjevi slobode	F-test Masa klipa
		Duljina klipa	Promjer klipa	Br. redi zrna		
Ponavljanje	2	7,08 **	8,28 **	7,81 **	2	9,23 **
Genotip	74	11,28 **	9,66 **	16,30 **	74	7,48 **
Blok	12	1,09 n.s.	2,58 **	3,31 **	-	-

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Srednje vrijednosti visine stabljike do baze klipa u populaciji Os 2703 varirale su između 43,7 cm i 111,2 cm, a visine stabljike do vrha metlice između 135,7 cm i 269,0 cm. Jedna dihaploidna linija imala je statistički značajno višu, a dvije linije statistički značajno nižu stabljiku do baze klipa u odnosu na obje roditeljske linije. Kod jedne dihaploidne linije

visina stabljike do vrha metlice bila je statistički značajno veća u odnosu na oba roditelja, a kod osam linija statistički značajno manja (Tablica 17.).

Prosječna duljina klipa u populaciji Os 2703 kretala se od 8,3 cm do 17,3 cm, a promjer klipa od 4,1 cm do 5,1 cm. Prosječan broj redi zrna na klipu varirao je između 10,7 i 19,2, dok je prosječna masa klipa kod linije s najmanjom vrijednosti za ovo svojstvo iznosila 54,0 g, a kod linije s najvećom prosječnom masom klipa 195,3 g. U usporedbi s roditeljskim linijama 11 dihaploidnih linija imalo je statistički značajno manju duljinu klipa, a 16 linija manji promjer klipa u odnosu na oba roditelja, dok su statistički značajno veće vrijednosti ovih svojstava u odnosu na roditelje imale jedna, odnosno osam dihaploidnih linija redom. Značajno veći broj redi zrna po klipu u odnosu na oba roditelja imalo je 17 dihaploidnih linija, dok niti jedna dihaploidna linija nije imala značajno manji broj redi zrna u usporedbi s roditeljskim linijama (Tablica 17.).

Tablica 17. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva visine stabljike i svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2703 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Visina do klipa	Visina do metlice	Duljina klipa	Promjer klipa	Broj redi zrna	Masa klipa
		cm	cm	cm	cm		g
1	Os 2703-01	53,8	154,7	12,4	4,4	13,7	99,8
2	Os 2703-02	58,2	182,3	16,0	5,0	18,5	140,3
3	Os 2703-03	64,5	178,5	13,4	4,5	14,0	120,7
4	Os 2703-04	76,5	182,5	13,6	4,5	14,8	113,3
5	Os 2703-05	79,3	188,3	12,2	4,7	14,8	114,3
6	Os 2703-06	60,2	151,7	12,4	4,6	17,4	109,9
7	Os 2703-07	56,3	169,5	12,0	4,2	15,2	69,7
8	Os 2703-08	88,3	197,8	13,1	4,7	15,1	110,5
9	Os 2703-09	52,0	142,5	14,8	4,4	13,0	120,1
10	Os 2703-10	70,3	191,8	15,3	4,2	13,7	100,9
11	Os 2703-11	105,2	219,8	12,4	4,3	14,6	112,6
12	Os 2703-12	47,3	142,8	12,5	4,5	18,1	108,6
13	Os 2703-13	92,3	204,3	13,2	4,4	13,7	100,0
14	Os 2703-14	59,0	196,5	14,5	4,3	14,5	104,4
15	Os 2703-15	108,3	234,8	13,0	4,4	15,6	90,3
16	Os 2703-16	82,2	198,2	13,4	4,7	15,4	115,6
17	Os 2703-17	99,3	229,7	11,8	4,6	16,3	101,1
18	Os 2703-18	105,8	269,0	14,6	4,7	14,4	116,7
19	Os 2703-19	82,3	196,3	12,6	4,2	14,1	90,2
20	Os 2703-20	103,3	219,2	15,1	4,1	14,3	85,0
21	Os 2703-21	79,7	179,7	14,9	4,2	13,2	98,1
22	Os 2703-22	78,3	193,0	14,4	4,7	15,3	135,0
23	Os 2703-23	70,0	170,3	13,6	4,3	14,4	112,9
24	Os 2703-24	90,7	211,7	16,5	4,8	14,8	139,2
25	Os 2703-25	98,5	214,5	13,2	4,4	14,4	101,1
26	Os 2703-26	63,5	183,3	13,7	4,6	16,7	121,3
27	Os 2703-27	93,0	233,2	15,8	5,1	16,0	157,1
28	Os 2703-28	83,0	205,7	13,6	4,9	14,8	113,8
29	Os 2703-29	73,7	198,3	14,2	4,3	13,9	96,3
30	Os 2703-30	69,7	190,3	12,8	4,5	16,8	94,6
31	Os 2703-31	69,5	186,0	15,1	4,6	16,5	99,6
32	Os 2703-32	91,5	217,3	13,0	5,1	14,1	127,6
33	Os 2703-33	73,2	178,0	15,3	4,9	19,1	145,0
34	Os 2703-34	97,0	221,8	15,4	4,5	16,4	145,7
35	Os 2703-35	67,5	182,5	13,5	4,5	16,2	116,4
36	Os 2703-36	75,3	175,8	14,1	4,5	13,1	99,8
37	Os 2703-37	79,7	188,5	11,7	4,8	18,7	115,9
38	Os 2703-38	100,2	231,2	17,2	4,8	15,2	195,3
39	Os 2703-39	57,5	157,3	14,2	4,3	12,7	109,5
40	Os 2703-40	84,8	216,2	14,1	4,9	17,6	140,7

Broj	Genotip	Visina do	Visina do	Duljina	Promjer	Broj redi	Masa klipa
		klipa	metlice	klipa	klipa	zrna	
		cm	cm	cm	cm		g
41	Os 2703-41	107,3	214,2	14,5	4,6	15,0	108,0
42	Os 2703-42	49,2	144,7	11,5	4,1	14,4	80,4
43	Os 2703-43	61,7	166,3	15,8	4,4	16,7	116,7
44	Os 2703-44	66,7	197,7	13,4	4,6	14,7	115,9
45	Os 2703-45	65,3	181,2	13,0	4,7	14,6	116,8
46	Os 2703-46	89,5	194,7	12,8	4,4	12,9	97,4
47	Os 2703-47	43,7	135,7	11,0	4,1	13,7	81,4
48	Os 2703-48	54,8	154,3	17,3	4,5	15,8	130,4
49	Os 2703-49	87,0	223,7	11,5	4,2	14,6	82,1
50	Os 2703-50	83,2	196,7	11,2	4,3	13,7	83,4
51	Os 2703-51	76,7	194,0	15,2	4,4	15,7	120,7
52	Os 2703-52	94,8	220,3	16,2	4,0	13,9	95,1
53	Os 2703-53	87,0	189,3	14,7	4,5	17,2	109,8
54	Os 2703-54	85,3	216,2	12,9	4,8	16,9	113,8
55	Os 2703-55	68,0	180,2	14,9	5,0	18,3	143,4
56	Os 2703-56	61,2	165,0	13,3	4,7	15,2	122,2
57	Os 2703-57	85,7	200,7	12,2	4,7	14,9	105,4
58	Os 2703-58	53,5	149,5	14,1	4,6	15,8	117,1
59	Os 2703-59	77,5	212,8	15,8	4,6	15,0	116,1
60	Os 2703-60	86,0	204,8	13,6	4,7	14,3	93,8
61	Os 2703-61	84,0	207,2	15,4	4,7	17,9	124,8
62	Os 2703-62	79,7	184,2	13,5	4,5	19,2	115,1
63	Os 2703-63	89,2	210,7	11,9	4,7	15,3	96,0
64	Os 2703-64	69,3	182,0	13,9	5,0	17,0	123,9
65	Os 2703-65	54,5	145,0	13,2	4,6	15,8	98,8
66	Os 2703-66	111,2	240,7	15,2	4,6	16,5	126,0
67	Os 2703-67	65,3	175,2	12,1	4,5	15,2	86,3
68	Os 2703-68	90,5	198,8	13,8	4,6	15,4	105,2
69	Os 2703-69	73,2	179,5	8,3	4,3	10,7	54,0
70	Os 2703-70	60,0	150,7	11,7	4,8	18,5	104,4
71	Os 2703-71	84,0	191,5	12,4	4,5	16,7	94,8
72	Os 942-1	66,8	173,7	14,3	4,7	15,5	133,2
73	Os 84-28-A-1	97,5	223,5	15,9	4,5	14,0	112,0
74	Os 942-2	62,7	168,2	13,4	4,6	15,2	118,6
75	Os 84-28-A-1	97,3	228,3	15,9	4,6	14,0	119,9
Prosjek		77,5	191,8	13,7	4,6	15,4	111,4
LSD_{0,05}		10,9	14,3	1,3	0,2	1,1	21,1
LSD_{0,01}		14,5	18,9	1,7	0,3	1,5	27,9

- statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$
- statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$
- statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$
- statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$

3.3.2.1. Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2703

Vrlo jaka pozitivna korelacija pronađena je između polinacije i svilanja ($r = 0,93$) te visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice ($r = 0,91$). Masa klipa i prinos zrna bili su u jakoj pozitivnoj korelaciji, dok su polinacija i svilanje bili u srednje jakoj negativnoj korelaciji s prinosom i masom klipa (Tablica 18.).

Tablica 18. Koeficijenti korelacije između ispitivanih svojstava u populaciji Os 2703

	Polinacija	Svilanje	ASI	VKL	VMET	DKL	PRKL	BRRED	Masa klipa
Prinos	-0,45	-0,54	-0,32	0,11	0,11	0,50	0,28	0,16	0,73
Polinacija		0,93	-0,02	0,51	0,35	-0,25	-0,24	-0,09	-0,43
Svilanje			0,35	0,42	0,28	-0,22	-0,25	-0,05	-0,46
ASI				-0,17	-0,14	0,04	-0,07	0,08	-0,13
VKL					0,91	0,19	0,12	-0,09	0,13
VMET						0,26	0,19	-0,06	0,20
DKL							0,23	0,16	0,66
PRKL								0,54	0,58
BRRED									0,41

 statistički značajno na razini $p < 0,01$

 statistički značajno na razini $p < 0,05$

ASI -interval između polinacije i svilanja (anthesis- silking interval)

DKL -duljina klipa

VKL -visina stabljike do baze klipa

PRKL -promjer klipa

VMET -visina stabljike do vrha metlice

BRRED -broj redi zrna na klipu

3.3.3. Analiza svojstava u populaciji Os 2709

Analizom varijance za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinos zrna u populaciji Os 2709 utvrđene su statistički značajne razlike između dihaploidnih linija. Statistički značajne razlike pronađene su i između ponavljanja za prinos ($p < 0,01$) i ASI ($p < 0,05$), te između blokova za svojstvo polinacije i svilanja ($p < 0,01$) (Tablica 19.).

Tablica 19. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2709 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test			
		Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
Ponavljanje	2	1,39 n.s.	0,36 n.s.	3,93 *	8,18 **
Genotip	52	18,22 **	16,48 **	6,27 **	10,54 **
Blok	15	2,26 **	2,88 **	1,38 n.s.	1,43 n.s.





**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Prosječna suma toplinskih jedinica za polinaciju kretala se u populaciji Os 2709 između 678,7 GDD i 886,7 GDD, a za svilanje između 696,3 GDD i 906,0 GDD. Jedna dihaploidna linija imala je značajno manju, a 14 značajno veću sumu toplinskih jedinica za polinaciju u odnosu na oba roditelja. Za svojstvo svilanja statistički značajno manju vrijednost od roditelja imale su četiri dihaploidne linije, a veću 15 linija. Srednja vrijednost intervala između polinacije i svilanja varirala je između -16,3 GDD i 58,7 GDD, a statistički značajno kraći interval između polinacije i svilanja imalo je osam dihaploidnih linija, od čega je negativnu srednju vrijednost intervala imalo šest dihaploidnih linija. Najmanji prinos imala je linija Os 2709-03 (0,6 t/ha), a najveći linija Os 2709-26 (6,4 t/ha). Dihaploidna linija Os 2709-11 nije bila klijava u uvjetima poljskog pokusa (Tablica 20.).

Tablica 20. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva polinacije, svilanja, intervala između polinacije i svilanja (ASI) i prinosa zrna u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2709 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
		GDD	GDD	GDD	t/ha
1	Os 2709-01	821,0	854,3	33,3	4,0
2	Os 2709-02	821,3	868,0	46,7	2,1
3	Os 2709-03	886,7	906,0	19,3	0,6
4	Os 2709-04	808,3	846,0	37,7	3,7
5	Os 2709-05	833,0	886,7	53,7	2,2
6	Os 2709-06	792,0	825,3	33,3	2,6
7	Os 2709-07	775,0	805,0	30,0	4,0
8	Os 2709-08	837,0	882,0	45,0	2,6
9	Os 2709-09	854,0	891,3	37,3	1,1
10	Os 2709-10	800,7	825,7	25,0	3,4
11	Os 2709-11	-	-	-	-
12	Os 2709-12	805,0	863,7	58,7	2,8
13	Os 2709-13	767,3	792,0	24,7	3,9
14	Os 2709-14	837,0	850,0	13,0	5,7
15	Os 2709-15	829,3	813,0	-16,3	6,2
16	Os 2709-16	741,3	763,0	21,7	3,0
17	Os 2709-17	796,3	813,0	16,7	4,4
18	Os 2709-18	837,7	837,3	-0,3	3,3
19	Os 2709-19	809,3	800,7	-8,7	3,2
20	Os 2709-20	808,3	825,7	17,3	1,8
21	Os 2709-21	841,3	863,3	22,0	3,4
22	Os 2709-22	833,3	849,7	16,3	1,3
23	Os 2709-23	748,3	775,0	26,7	4,3
24	Os 2709-24	792,0	817,0	25,0	2,0
25	Os 2709-25	821,0	837,0	16,0	4,9
26	Os 2709-26	825,0	850,3	25,3	6,4
27	Os 2709-27	812,3	861,0	48,7	1,9
28	Os 2709-28	787,7	808,7	21,0	4,0
29	Os 2709-29	771,0	783,7	12,7	4,2
30	Os 2709-30	813,7	817,3	3,7	3,4
31	Os 2709-31	877,3	872,7	-4,7	3,7
32	Os 2709-32	767,0	787,7	20,7	2,7
33	Os 2709-33	779,3	813,7	34,3	3,4
34	Os 2709-34	842,0	850,3	8,3	1,3
35	Os 2709-35	817,3	846,0	28,7	2,6
36	Os 2709-36	825,7	821,3	-4,3	3,8
37	Os 2709-37	837,7	855,0	17,3	2,9
38	Os 2709-38	800,7	825,0	24,3	2,1
39	Os 2709-39	788,0	809,3	21,3	3,3
40	Os 2709-40	818,0	829,3	11,3	3,1

Broj	Genotip	Polinacija	Svilanje	ASI	Prinos
		<i>GDD</i>	<i>GDD</i>	<i>GDD</i>	<i>t/ha</i>
41	Os 2709-41	813,0	825,7	12,7	3,7
42	Os 2709-42	833,0	854,3	21,3	3,9
43	Os 2709-43	800,7	825,7	25,0	3,6
44	Os 2709-44	763,0	775,0	12,0	3,7
45	Os 2709-45	809,3	805,0	-4,3	3,3
46	Os 2709-46	792,0	816,7	24,7	3,0
47	Os 2709-47	813,0	817,3	4,3	5,5
48	Os 2709-48	868,0	875,0	14,0	3,1
49	Os 2709-49	678,7	696,3	17,7	2,5
50	Os 2709-50	787,7	813,7	26,0	3,0
51	Os 84-28-A-1	775,3	800,7	25,3	5,4
52	Os 2695 CO-1	800,7	821,7	21,0	4,0
53	Os 84-28-A-2	783,7	821,3	37,7	5,8
54	Os 2695 CO-2	805,0	825,7	20,7	4,3
	Prosjek	807,2	828,2	21,1	3,3
	LSD_{0,05}	22,6	24,2	15,9	1,1
	LSD_{0,01}	30,0	32,0	21,0	1,5

	statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini p<0,01
	statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini p<0,05
	statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini p<0,01
	statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini p<0,05

Analizom varijance utvrđene su statistički značajne razlike za visinu stabljike do baze klipa i visinu stabljike do vrha metlice (Tablica 21.) te ispitana svojstva klipa (Tablica 22.) između dihaploidnih linija u populaciji Os 2709. Statistički značajne razlike pronađene su i između ponavljanja za svojstvo visine do vrha metlice (Tablica 21.), kao i između ponavljanja i blokova za svojstvo promjera klipa (Tablica 22.) dok za ostala svojstva ponavljanja i blokovi nisu bili statistički značajan izvor variranja.

Tablica 21. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2709 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test	
		Visina klipa	Visina metlice
Ponavljanje	2	3,07 n.s.	7,57 **
Genotip	52	25,42 **	21,55 **
Blok	15	1,12 n.s.	1,35 n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 22. Vrijednosti F-testa iz analize varijance za svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2709 i njihovim roditeljima

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F-test			
		Duljina klipa	Promjer klipa	Br. Redova zrna	Masa klipa
Ponavljanje	2	1,24 n.s.	6,66 **	0,18 n.s.	0,39 n.s.
Genotip	52	7,63 **	8,12 **	18,81 **	5,42 **
Blok	15	1,15 n.s.	2,42 **	1,45 n.s.	1,17 n.s.

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Srednja vrijednost visine stabljike do baze klipa u populaciji Os 2709 varirala je između 43,8 cm i 108,0 cm, dok se srednja vrijednost visine stabljike do vrha metlice kretala od 128,8 cm do 237,0 cm. Statistički značajno veću srednju vrijednost visine do baze klipa imale su četiri dihaploidne linije, a visine do vrha metlice jedna linija, dok je značajno manje vrijednosti za ista svojstva imalo pet, odnosno 11 linija (Tablica 23.).

Duljina klipa u populaciji Os 2709 varirala je između 8,9 cm i 17,3 cm, a promjer klipa između 3,9 i 4,9 cm. Prosječan broj redi zrna na klipu kretao se između 12,1 i 22,7, a prosječna masa klipa od 53,0 g do 160,7 g. Po jedna dihaploidna linija imala je statistički značajno veću srednju vrijednost broja redi zrna na klipu i mase klipa u odnosu na roditeljske inbred linije (Tablica 23.).

Tablica 23. Srednje vrijednosti i najmanje značajne razlike (LSD) za svojstva visine stabljike i svojstva klipa u pokusu s dihaploidnim linijama populacije Os 2709 i njihovim roditeljima

Broj	Genotip	Visina do klipa	Visina do vrha metlice	Duljina klipa	Promjer klipa	Broj redi zrna	Masa klipa
		cm	cm	cm	cm		g
1	Os 2709-01	103,8	223,3	12,7	4,4	15,3	98,9
2	Os 2709-02	72,2	182,0	12,6	4,1	15,9	83,9
3	Os 2709-03	74,8	173,5	11,8	4,4	17,2	80,3
4	Os 2709-04	91,5	224,3	14,5	4,6	15,6	125,4
5	Os 2709-05	88,0	227,8	15,0	4,5	15,6	103,4
6	Os 2709-06	75,7	197,0	13,3	4,2	17,8	107,3
7	Os 2709-07	73,2	180,3	16,2	4,2	14,9	116,4
8	Os 2709-08	84,5	220,7	14,1	4,4	15,4	111,0
9	Os 2709-09	70,2	169,5	8,9	3,9	12,9	53,0
10	Os 2709-10	62,8	163,3	12,0	4,1	16,9	85,1
11	Os 2709-11	-	-	-	-	-	-
12	Os 2709-12	77,8	181,2	13,3	4,1	14,1	86,7
13	Os 2709-13	85,2	195,2	14,3	4,3	15,5	104,3
14	Os 2709-14	100,3	219,8	15,3	4,3	14,4	106,7
15	Os 2709-15	89,0	186,8	15,5	4,1	12,7	97,4
16	Os 2709-16	55,5	162,2	11,3	4,4	17,3	96,6
17	Os 2709-17	93,3	220,8	12,7	4,7	16,1	121,3
18	Os 2709-18	81,5	214,7	16,5	4,0	15,6	101,7
19	Os 2709-19	90,5	215,3	12,8	4,6	15,9	113,7
20	Os 2709-20	100,3	204,3	12,9	4,3	13,3	98,7
21	Os 2709-21	94,8	237,0	14,5	4,2	13,8	87,6
22	Os 2709-22	69,2	199,2	13,4	4,0	13,0	87,7
23	Os 2709-23	57,8	157,7	12,5	4,5	16,5	113,0
24	Os 2709-24	57,7	178,3	13,8	4,0	16,9	91,3
25	Os 2709-25	91,7	199,2	12,6	4,5	16,3	106,8
26	Os 2709-26	103,2	211,8	17,3	4,5	14,0	160,7
27	Os 2709-27	79,5	179,5	10,5	4,6	19,1	85,2
28	Os 2709-28	70,8	179,2	14,0	4,5	18,3	108,4
29	Os 2709-29	71,3	172,7	13,6	4,1	15,1	105,2
30	Os 2709-30	87,2	208,8	12,4	4,4	15,3	96,6
31	Os 2709-31	108,0	229,0	13,7	4,4	14,6	113,1
32	Os 2709-32	78,2	187,2	13,1	4,9	22,7	113,2
33	Os 2709-33	79,2	199,0	15,3	4,3	15,0	101,8
34	Os 2709-34	96,3	213,3	11,6	4,1	12,3	74,0
35	Os 2709-35	78,3	209,0	13,9	4,1	12,1	90,2
36	Os 2709-36	107,3	223,5	12,8	4,6	15,3	113,5
37	Os 2709-37	101,8	226,5	15,1	4,8	16,7	136,7
38	Os 2709-38	79,0	187,3	13,5	4,5	14,7	96,3
39	Os 2709-39	80,8	220,7	15,2	4,2	15,4	118,0
40	Os 2709-40	69,8	179,2	14,6	4,1	15,5	87,3

Broj	Genotip	Visina do klipa	Visina do vrha metlice	Duljina klipa	Promjer klipa	Broj redi zrna	Masa klipa
		cm	cm	cm	cm		g
41	Os 2709-41	66,7	173,0	13,1	4,5	15,7	109,2
42	Os 2709-42	87,5	182,7	11,7	4,5	16,8	87,4
43	Os 2709-43	76,8	180,5	12,1	4,8	18,3	113,5
44	Os 2709-44	66,5	172,7	15,1	4,2	15,0	107,3
45	Os 2709-45	43,8	128,8	13,5	4,0	15,1	92,2
46	Os 2709-46	71,0	165,2	14,7	4,4	15,3	110,3
47	Os 2709-47	91,2	207,3	15,1	4,7	16,7	134,9
48	Os 2709-48	91,0	193,7	12,9	4,3	16,7	99,4
49	Os 2709-49	48,2	158,3	12,9	3,9	13,9	72,7
50	Os 2709-50	92,5	221,3	14,5	4,6	16,1	105,9
51	Os 84-28-A-1	94,8	218,7	16,8	4,7	14,6	138,4
52	Os 2695 CO-1	73,8	192,7	11,9	4,3	18,8	102,9
53	Os 84-28-A-2	91,7	222,5	17,2	4,5	14,5	135,4
54	Os 2695 CO-2	77,5	192,0	12,2	4,3	18,7	107,9
	Prosjek	81,2	195,7	13,6	4,4	15,7	103,7
	LSD_{0,05}	7,7	13,6	1,7	0,2	1,2	21,5
	LSD_{0,01}	10,2	18,1	2,2	0,3	1,6	28,5

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$

statistički značajno veća vrijednost svojstva od najviše vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$

statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,01$


statistički značajno manja vrijednost svojstva od najmanje vrijednosti roditelja na razini $p < 0,05$


3.3.3.1. Koeficijenti korelacije između svojstava u populaciji Os 2709

Vrlo jaka pozitivna korelacija u populaciji Os 2709 utvrđena je između polinacije i svilanja ($r = 0,91$) te visine stabljike do baze klipa i visine do vrha metlice ($r = 0,86$). Između prinosa zrna i svilanja, te prinosa i intervala između polinacije i svilanja utvrđena je slaba negativna korelacija, a svojstva prinosa i duljine klipa te prinosa i mase klipa, kao i mase klipa i duljine, odnosno promjera klipa bila su u srednje jakoj pozitivnoj korelaciji (Tablica 24.).

Tablica 24. Koeficijenti korelacije između ispitivanih svojstava u populaciji Os 2709

	Polinacija	Svilanje	ASI	VKL	VMET	DKL	PRKL	BRRED	Masa klipa
Prinos	-0,18	-0,29	-0,27	0,31	0,20	0,55	0,28	-0,01	0,68
Polinacija		0,91	-0,14	0,51	0,38	-0,12	-0,03	-0,16	-0,13
Svilanje			0,28	0,43	0,36	-0,15	-0,02	-0,11	-0,16
ASI				-0,12	-0,01	-0,08	0,04	0,12	-0,09
VKL					0,86	0,27	0,45	-0,18	0,44
VMET						0,39	0,37	-0,19	0,43
DKL							0,10	-0,25	0,66
PRKL								0,50	0,65
BRRED									0,18

 statistički značajno na razini $p < 0,01$

 statistički značajno na razini $p < 0,05$

ASI -interval između polinacije i svilanja (anthesis- silking interval)

DKL -duljina klipa

VKL -visina stabljike do baze klipa

PRKL -promjer klipa

VMET -visina stabljike do vrha metlice

BRRED -broj redi zrna na klipu

3.3.4. Heritabilnost ispitanih svojstava i uporabljivost populacija dihaploidnih linija

3.3.4.1. Heritabilnost svojstava u populacijama dihaploidnih linija

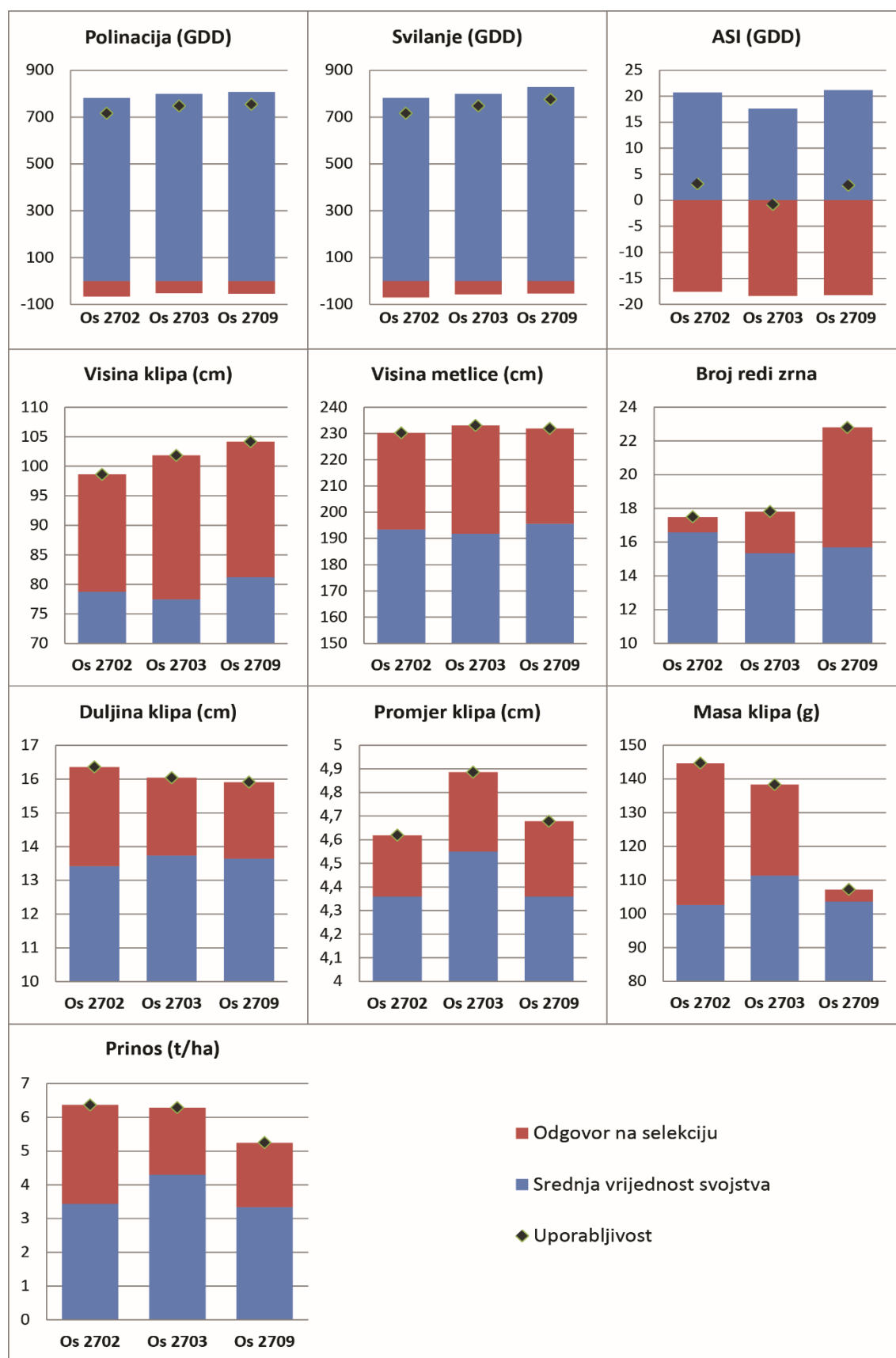
Procijenjeni koeficijenti heritabilnosti bili su srednje visoki do vrlo visoki za većinu svojstava u sve tri populacije. Najniži koeficijent heritabilnosti imao je broj redi zrna na klipu u populaciji Os 2702, dok je isto svojstvo u populacijama Os 2703 i Os 2709 imalo visoku heritabilnost. Svojstva polinacije i svilanja imala su višu heritabilnost u sve tri populacije u odnosu na interval između polinacije i svilanja (Tablica 25.).

Tablica 25. Heritabilnost svojstava u tri populacije dihaploidnih linija

	Os 2702	Os 2703	Os 2709
Prinos	0,79	0,71	0,75
Polinacija	0,93	0,87	0,84
Svilanje	0,93	0,88	0,82
ASI	0,70	0,74	0,64
Visina klipa	0,86	0,80	0,90
Visina metlice	0,90	0,86	0,87
Duljina klipa	0,76	0,77	0,71
Promjer klipa	0,63	0,71	0,66
Broj redi zrna	0,36	0,81	0,92
Masa klipa	0,77	0,66	0,78

3.3.4.2. Uporabljivost populacija dihaploidnih linija

Procjena uporabljivosti populacija dihaploidnih linija napravljena je za sva ispitana svojstva u sve tri populacije dihaploidnih linija (Slika 1.). Najveći odgovor na selekciju procijenjen je za svojstvo intervala između polinacije i svilanja i kretao se između 84,8% u populaciji Os 2702 i 104,6% u populaciji Os 2703. Najveći odgovor na selekciju za svojstva polinacije i svilanja imala je populacija Os 2702, dok su populacije Os 2703 i Os 2709 imale približno jednak odgovor na selekciju za navedena svojstva. Procijenjena uporabljivost za svojstva duljine i promjera klipa bila je približno jednaka u sve tri populacije. Odgovor na selekciju kretao se između 16,6% i 21,9% za svojstvo duljine klipa i 5,9-7,4% za svojstvo promjera klipa. Najveću procijenjenu uporabljivost za broj redi zrna na klipu imala je populacija Os 2709 u kojoj je odgovor na selekciju bio 45,3%, dok je u populaciji Os 2702 odgovor na selekciju bio znatno manji i iznosio 5,5%. Odgovor na selekciju i uporabljivost za svojstvo mase klipa znatno su se razlikovali između populacija dihaploidnih linija. Najveću uporabljivost za svojstvo mase klipa imala je populacija Os 2702, dok je populacija Os 2709 imala vrlo nisku vrijednost odgovora na selekciju i uporabljivosti. Za svojstvo prinosa zrna vrlo visok odgovor na selekciju imala je populacija Os 2702 (85,1%).



Slika 1. Odgovor na selekciju i procjena uporabljivosti ispitanih svojstava u tri populacije dihaploidnih linija ($\alpha = 10\%$)

3.4. Komparativna analiza F₂ generacije i populacija dihaploidnih linija

3.4.1. Komparativna analiza svojstava cvatnje

Prosječna suma toplinskih jedinica potrebnih za polinaciju i svilanje bila je manja u sve tri populacije biljaka F₂ generacije u odnosu na populacije dihaploidnih linija. Raspon intervala između polinacije i svilanja bio je najveći u populaciji Os 2709, a najmanji u populaciji OSSK 5717 F₂ (Tablica 26.).

Tablica 26. Raspon srednjih vrijednosti za svojstva polinacije, svilanja i intervala između polinacije i svilanja (ASI) izraženih u toplinskim GDD jedinicama u trima populacijama dihaploidnih linija i odnosnim F₂ generacijama

Populacija	Polinacija	Svilanje	ASI
Os 2702	709,3 - 872,7	716,0 - 886,7	0,0 - 56,7
OS 378 F ₂	660,0 - 779,0	674,0 - 818,0	0,0 - 58,0
Os 2703	734,0 - 872,7	748,0 - 891,3	-15,7 - 58,3
Drava 404 F ₂	660,0 - 779,0	674,0 - 818,0	0,0 - 50,0
Os 2709	678,7 - 886,7	696,3 - 906,0	-16,3 - 58,7
OSSK 5717 F ₂	674,0 - 792,0	688,0 - 818,0	0,0 - 45,0

Razlike između prosječnih vrijednosti sume toplinskih jedinica potrebnih za cvatnju metlice i svilanje bile su statistički značajne između sve tri populacije dihaploidnih linija i odgovarajućih populacija biljaka F₂ generacije (Tablica 27. i 28.), dok su razlike u prosječnom intervalu između polinacije i svilanja bile statistički značajne samo između populacije Os 2703 i Drava 404 F₂ (Tablica 29.).

Tablica 27. Srednje vrijednosti za svojstvo polinacije i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Prosjek	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	781,5 ± 6,5	9,636 **	t _{0,025;234} = 1,970
OS 378 F ₂	722,6 ± 2,3		t _{0,005;234} = 2,597
Os 2703	798,9 ± 7,1	15,861 **	t _{0,025;273} = 1,969
Drava 404 F ₂	727,2 ± 2,4		t _{0,005;273} = 2,594
Os 2709	807,2 ± 8,1	13,249 **	t _{0,025;252} = 1,969
OSSK 5717 F ₂	752,6 ± 1,7		t _{0,005;252} = 2,596

**=statistički značajno na razini p<0,01; *=statistički značajno na razini p<0,05; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 28. Srednje vrijednosti za svojstvo svilanja i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Prosjek	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	802,3 ± 7,0	9,677 **	$t_{0,025;234} = 1,970$
OS 378 F ₂	742,6 ± 2,3		$t_{0,005;234} = 2,597$
Os 2703	816,4 ± 7,2	14,819 **	$t_{0,025;273} = 1,969$
Drava 404 F ₂	748,0 ± 2,4		$t_{0,005;273} = 2,594$
Os 2709	828,2 ± 8,6	12,714 **	$t_{0,025;252} = 1,969$
OSSK 5717 F ₂	773,8 ± 1,8		$t_{0,005;252} = 2,596$

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 29. Srednje vrijednosti za interval između polinacije i svilanja i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Prosjek	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	20,7 ± 4,8	0,439 n.s.	$t_{0,025;234} = 1,970$
OS 378 F ₂	19,9 ± 0,7		$t_{0,005;234} = 2,597$
Os 2703	17,6 ± 4,2	-2,504 *	$t_{0,025;273} = 1,969$
Drava 404 F ₂	20,8 ± 0,5		$t_{0,005;273} = 2,594$
Os 2709	21,1 ± 5,6	-0,035 n.s.	$t_{0,025;252} = 1,969$
OSSK 5717 F ₂	21,2 ± 0,5		$t_{0,005;252} = 2,596$

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

3.4.2. Komparativna analiza visine stabljike do baze klipa i visine do vrha metlice

Prosječna visina do baze klipa bila je veća u populacijama biljaka F₂ generacije u odnosu na populacije dihaploidnih linija. U populacijama F₂ biljaka kretala se u rasponu od 60,00 cm u populacijama Drava 404 F₂ i OS 378 F₂ do 145,0 cm u populaciji Drava 404 F₂, dok se kod dihaploidnih linija kretala između 43,7 i 111,2 cm u populaciji Os 2703. Prosječna visina do vrha metlice također je bila veća u populacijama F₂ biljaka gdje je najveća izmjerena visina iznosila 270,0 cm u populaciji OS 378 F₂, 285,0 cm u populaciji OSSK 5717 F₂ i 310,0 cm u populaciji Drava 404 F₂. Maksimalna izmjerena visina do vrha

metlice u populacijama dihaploidnih linija iznosila je 269,0 cm u populaciji Os 2703 (Tablica 30.).

Tablica 30. Raspon srednjih vrijednosti za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice u trima populacijama dihaploidnih linija i odnosnim F₂ generacijama

Populacija	Visina klipa	Visina metlice
Os 2702	54,5 - 106,2	149,0 - 249,8
OS 378 F ₂	60,0 - 120,0	160,0 - 270,0
Os 2703	43,7 - 111,2	135,7 - 269,0
Drava 404 F ₂	60,0 - 145,0	135,0 - 310,0
Os 2709	43,8 - 108,0	128,8 - 237,0
OSSK 5717 F ₂	70,0 - 120,0	170,0 - 285,0

Razlike između srednjih vrijednosti za svojstva visine stabljike do baze klipa i visine stabljike do vrha metlice bile su statistički značajne između sve tri ispitane populacije dihaploidnih linija i njihovih pripadajućih F₂ generacija. U populacijama dihaploidnih linija prosječna izmjerena visina bila je za oba svojstva manja u odnosu na odgovarajuću populaciju F₂ (Tablica 31. i 32.).

Tablica 31. Srednje vrijednosti za visinu stabljike do baze klipa i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Visina do klipa (cm)	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	78,8 ± 2,5	-4,106 **	t _{0,025;234} = 1,970
OS 378 F ₂	87,5 ± 0,8		t _{0,005;234} = 2,597
Os 2703	77,5 ± 3,9	-9,422 **	t _{0,025;273} = 1,969
Drava 404 F ₂	98,0 ± 1,1		t _{0,005;273} = 2,594
Os 2709	81,2 ± 2,8	-9,639 **	t _{0,025;252} = 1,969
OSSK 5717 F ₂	98,7 ± 0,8		t _{0,005;252} = 2,596

**=statistički značajno na razini p<0,01; *=statistički značajno na razini p<0,05; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 32. Srednje vrijednosti za visinu stabljike do vrha metlice i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Visina do vrha metlice (cm)	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	193,4 ± 4,0	-7,003 **	$t_{0,025;234} = 1,970$
OS 378 F ₂	219,0 ± 1,4		$t_{0,005;234} = 2,597$
Os 2703	191,8 ± 5,1	-14,510 **	$t_{0,025;273} = 1,969$
Drava 404 F ₂	243,7 ± 1,9		$t_{0,005;273} = 2,594$
Os 2709	195,7 ± 4,9	-19,891 **	$t_{0,025;252} = 1,969$
OSSK 5717 F ₂	251,5 ± 1,2		$t_{0,005;252} = 2,596$

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

3.4.3. Komparativna analiza za svojstva klipa

Raspon srednjih vrijednosti za sva ispitana svojstva klipa bio je veći u F₂ generacijama u odnosu na odgovarajuće populacije dihaploidnih linija. Ukupno gledano, duljina klipa se u populacijama dihaploidnih linija kretala između 8,3 cm kod populacije Os 2703 i 17,9 cm kod populacije Os 2702, dok se u F₂ generaciji kretala između 6,5 cm i 21,5 cm u populacijama OS 378 F₂ i Drava 404 F₂. Promjer klipa je u F₂ generaciji varirao između 3,5 cm u populacijama OS 378 F₂ i Drava 404 F₂ te 5,5 cm u populacijama Drava 404 F₂ i OSSK 5717 F₂, za razliku od populacija dihaploidnih linija u kojima je najmanji prosječan promjer klipa iznosio 3,5 cm, a najveći 5,1 cm. Broj redi zrna na klipcu se u populacijama dihaploidnih linija kretao između 10,7 i 22,7, dok je u F₂ generaciji varirao u rasponu od 12,0 do 26,0 cm. Masa klipa se u F₂ generaciji kretala između 24,0 g u populaciji OS 378 F₂ i 298,0 g u populaciji Drava 404 F₂, a u populacijama dihaploidnih linija između 53,0 g i 160,7 g u populaciji Os 2709 (Tablica 33.).

Tablica 33. Raspon srednjih vrijednosti za svojstva duljine i promjera klipa, broj redova zrna na klipu i masu klipa u trima populacijama dihaploidnih linija i odnosnim F₂ generacijama

Populacija	Duljina klipa (cm)	Promjer klipa (cm)	Broj redova zrna	Masa klipa (g)
Os 2702	9,0 - 17,9	3,86 - 4,83	13,7 - 18,8	57,0 - 188,7
OS 378 F ₂	6,5 - 21,5	3,50 - 5,00	12,0 - 22,0	24,0 - 226,0
Os 2703	8,3 - 17,3	4,05 - 5,13	10,7 - 19,2	54,0 - 195,3
Drava 404 F ₂	6,5 - 21,5	3,50 - 5,50	12,0 - 22,0	36,0 - 298,0
Os 2709	8,9 - 17,3	3,86 - 4,92	12,1 - 22,7	53,0 - 160,7
OSSK 5717 F ₂	8,5 - 20,0	4,00 - 5,50	12,0 - 26,0	30,0 - 238,0

Pronađene su statistički značajne razlike između sve tri populacije dihaploidnih linija i odgovarajuće F₂ populacije za svojstva duljine i mase klipa (Tablica 34. i 37.). Razlika između promjera klipa i broja redi zrna bila je statistički značajna između populacije Os 2709 i OSSK 5717 F₂ (Tablica 35. i 36.).

Tablica 34. Srednje vrijednosti za svojstvo duljine klipa i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Duljina klipa (cm)	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	13,4 ± 0,7	-2,676 **	t _{0,025;234} = 1,970
OS 378 F ₂	14,8 ± 0,2		t _{0,005;234} = 2,597
Os 2703	13,7 ± 0,5	-3,849 **	t _{0,025;273} = 1,969
Drava 404 F ₂	15,0 ± 0,2		t _{0,005;273} = 2,594
Os 2709	13,6 ± 0,6	-2,846 **	t _{0,025;252} = 1,969
OSSK 5717 F ₂	14,6 ± 0,2		t _{0,005;252} = 2,596

**=statistički značajno na razini p<0,01; *=statistički značajno na razini p<0,05; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 35. Srednje vrijednosti za svojstvo promjera klipa i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Promjer klipa (cm)	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	4,36 ± 0,08	-0,256 n.s.	$t_{0,025;234} = 1,970$
OS 378 F₂	4,37 ± 0,02		$t_{0,005;234} = 2,597$
Os 2703	4,55 ± 0,08	1,649 n.s.	$t_{0,025;273} = 1,969$
Drava 404 F₂	4,48 ± 0,02		$t_{0,005;273} = 2,594$
Os 2709	4,36 ± 0,08	-5,194 **	$t_{0,025;252} = 1,969$
OSSK 5717 F₂	4,59 ± 0,02		$t_{0,005;252} = 2,596$

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Tablica 36. Srednje vrijednosti za broj redi zrna na klipu i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Broj redova zrna	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	16,6 ± 0,6	-1,701 n.s.	$t_{0,025;234} = 1,970$
OS 378 F₂	17,1 ± 0,1		$t_{0,005;234} = 2,597$
Os 2703	15,4 ± 0,4	-1,177 n.s.	$t_{0,025;273} = 1,969$
Drava 404 F₂	15,7 ± 0,1		$t_{0,005;273} = 2,594$
Os 2709	15,7 ± 0,4	-2,830 **	$t_{0,025;252} = 1,969$
OSSK 5717 F₂	16,6 ± 0,2		$t_{0,005;252} = 2,596$

**=statistički značajno na razini $p < 0,01$; *=statistički značajno na razini $p < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

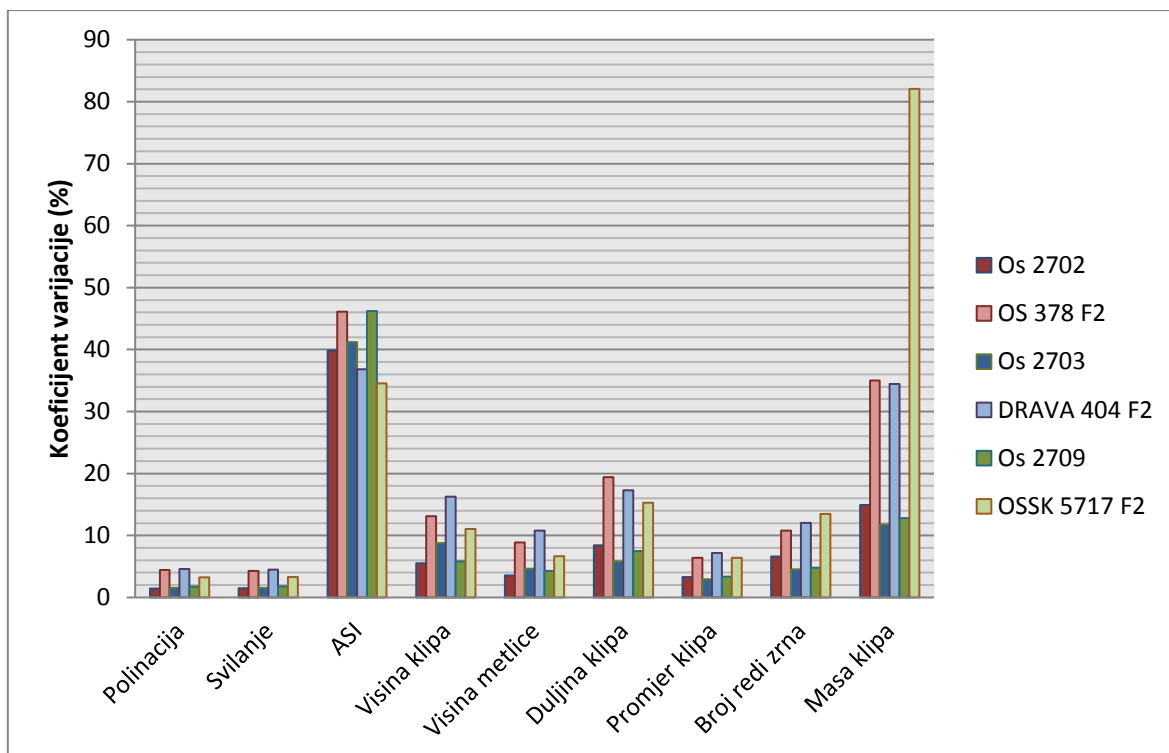
Tablica 37. Srednje vrijednosti za masu klipa i t-test za značajnost razlike srednjih vrijednosti u populacijama dihaploidnih linija i odgovarajućim populacijama F₂ biljaka

Populacija	Masa klipa (g)	t-test	Granična t-vrijednost
Os 2702	102,6 ± 8,8	-3,053 **	t _{0,025;234} = 1,970
OS 378 F ₂	125,9 ± 3,1		t _{0,005;234} = 2,597
Os 2703	111,4 ± 7,6	-3,984 **	t _{0,025;273} = 1,969
Drava 404 F ₂	133,3 ± 3,3		t _{0,005;273} = 2,594
Os 2709	103,7 ± 7,7	-2,403 *	t _{0,025;252} = 1,969
OSSK 5717 F ₂	142,0 ± 8,2		t _{0,005;252} = 2,596

**=statistički značajno na razini p<0,01; *=statistički značajno na razini p<0,05; n.s.=nije statistički značajno

3.4.4. Koeficijent varijacije ispitanih svojstava u populacijama dihaploidnih linija i F₂ generaciji

Koeficijent varijacije bio je niži u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F₂ generaciju za sva ispitana svojstva osim za interval između polinacije i svilanja u populacijama Os 2703 i Os 2709. Vrijednosti sume toplinskih jedinica potrebnih za polinaciju i svilanje u svim su se populacijama pokazale kao najmanje varijabilno svojstvo, dok je relativna varijabilnost intervala između polinacije i svilanja bila znatno veća i kretala se između 34,2% u populaciji OSSK 5717 F₂ i 46,2% u populaciji Os 2709. Visina stabljike do baze klipa i visina do vrha metlice imale su dosta nizak koeficijent varijacije u populacijama dihaploidnih linija. Koeficijent varijacije za visinu do klipa kretao se između 5,5% u populaciji Os 2702 i 8,8% u populaciji Os 2703, dok je varijabilnost visine do vrha metlice bila još manja i kretala se između 3,6% kod populacije Os 2702 i 4,6% kod populacije Os 2703. Promjer i duljina klipa te broj redi zrna na klipu također su imali niske koeficijente varijacije u sve tri populacije dihaploidnih linija. Koeficijenti varijacije za svojstvo promjera klipa bili su niski i u populacijama biljaka F₂ generacije, dok su svojstva duljine klipa i broja redi zrna pokazala nešto veću varijabilnost u F₂ generaciji. Velike razlike u relativnoj varijabilnosti između ispitanih populacija pojavile su se za svojstvo mase klipa za koje se koeficijent varijacije kretao između 11,8% u populaciji Os 2703 i 82,1% u populaciji OSSK 5717 F₂ (Slika 2.).



slika 2. Koeficijent varijacije za ispitana svojstva u populacijama dihaploidnih linija i F₂ generaciji

3.5. Molekularna analiza populacija dihaploidnih linija

3.5.1. Raspodjela markera

Nakon provjere kvalitete i filtriranja podataka od ukupno 56110 markera na čipu, 50074 SNP markera imalo je poznato mjesto na kromosomu. Raspodjela markera po kromosomima nije bila u potpunosti ujednačena između kromosoma (Tablica 38.). Kromosom 1 imao je najveći broj markera, dok je kromosom 4 imao znatno manji broj markera u odnosu na očekivani, iako apsolutni broj markera na kromosomu 4 nije bio najmanji. Odaziv markera bio je podjednak između svih kromosoma (97,32-98,33%), a heterozigotnost se kretala između 0,33 i 0,99%.

Tablica 38. Raspodjela SNP markera po kromosomima

Broj	Kromosom		Raspodjela markera			
	Duljina (Mbp)	%	Broj	%	Odaziv (%)	Heterozigotnost (%)
1	301,30	14,65	7937	15,85	98,11	0,64
2	236,97	11,52	5779	11,54	97,91	0,84
3	232,09	11,28	5621	11,23	98,33	0,99
4	241,32	11,73	5483	10,95	98,32	0,63
5	217,76	10,59	5465	10,91	97,60	0,43
6	169,10	8,22	4041	8,07	97,60	0,46
7	176,15	8,56	4184	8,36	97,32	0,33
8	175,73	8,54	4314	8,62	98,33	0,49
9	156,59	7,61	3678	7,35	97,88	0,43
10	150,18	7,30	3572	7,13	97,96	0,37
Ukupno	2057,19	100,00	50074	100,00		

3.5.2. Polimorfnost u tri populacije dihaploidnih linija

Broj polimorfni markera s manje od 10% lokusa kod kojih nedostaju podatci o genotipu bio je ujednačen u populacijama dihaploidnih linija (31,80-32,53%) (Tablica 39.). Najmanje polimorfni markera u populacijama Os 2702 i Os 2703 bilo je na kromosomu 9, a u populaciji Os 2709 na kromosomu 10. Najveći broj polimorfni markera u sve tri populacije imao je kromosom 1 (Tablica 39.).

Tablica 39. Broj polimorfnih markera s poznatom pozicijom na kromosomu u tri populacije dihaploidnih linija

Kromosom	Broj polimorfnih markera					
	Os 2702		Os 2703		Os 2709	
		%		%		%
1	2498	15,69	2564	15,84	2348	14,42
2	2019	12,68	1738	10,74	1771	10,87
3	1890	11,87	1903	11,75	1953	11,99
4	1584	9,95	1787	11,04	1870	11,48
5	1937	12,16	1926	11,90	1876	11,52
6	1116	7,01	1399	8,64	1350	8,29
7	1437	9,02	1222	7,55	1495	9,18
8	1358	8,53	1368	8,45	1335	8,20
9	918	5,76	1069	6,60	1201	7,37
10	1167	7,33	1213	7,49	1089	6,69
Ukupno	15924	100,00	16189	100,00	16288	100,00
%	31,80		32,33		32,53	

3.5.3. Procjena heterozigotnosti u populacijama dihaploidnih linija

Prosječan broj heterozigotnih markera po dihaploidnoj liniji bio je vrlo nizak u sve tri populacije, međutim u populaciji Os 2702 bio je znatno veći u odnosu na populacije Os 2703 i Os 2709 (Tablica 40.).

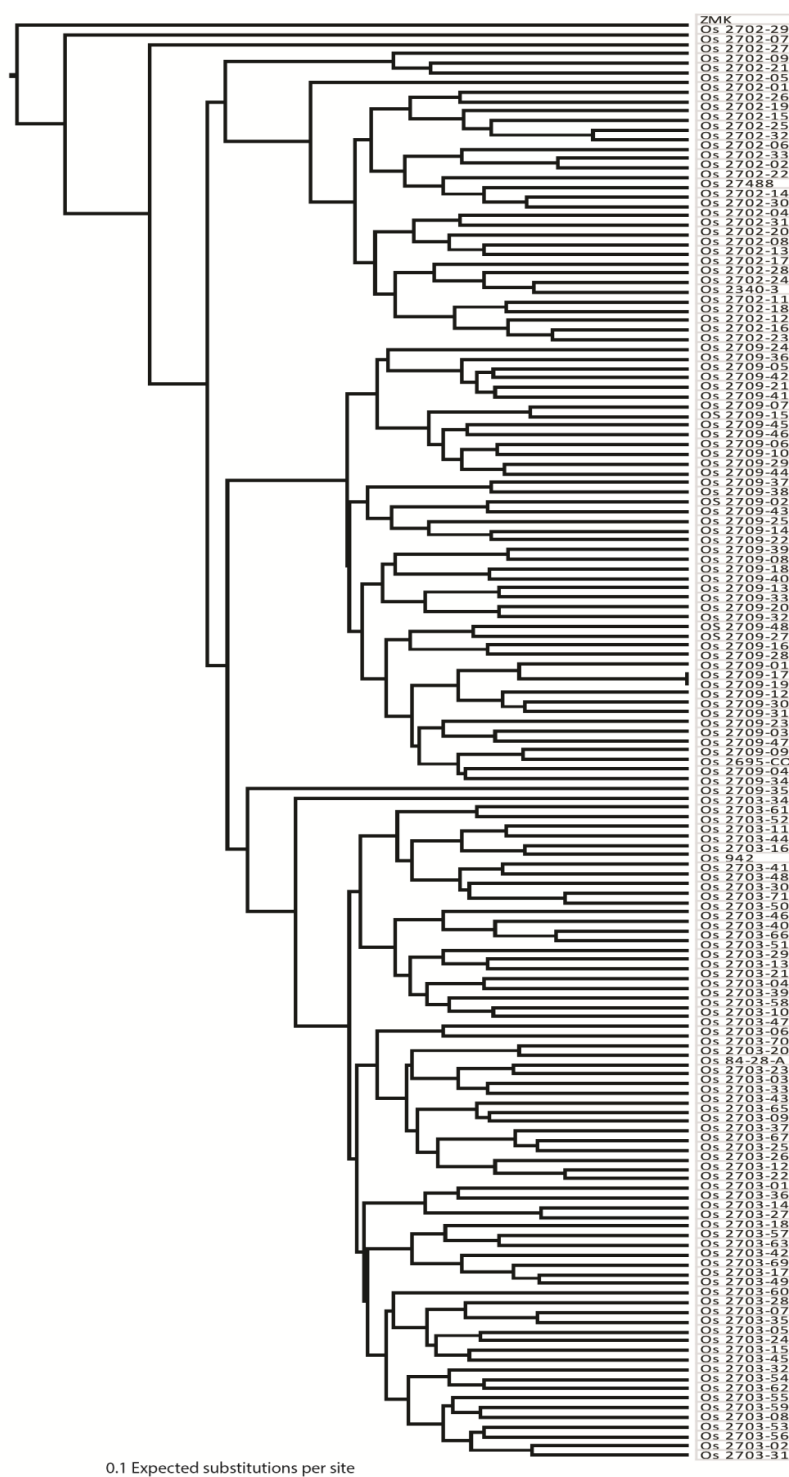
Tablica 40. Heterozigotnost u tri populacije dihaploidnih linija

Populacija	Broj heterozigotnih markera po liniji			
	Raspon		Prosjek po liniji	
				%
Os 2702	0	- 291	21,56	0,04
Os 2703	0	- 105	3,22	0,01
Os 2709	0	- 80	5,28	0,01

3.5.4. Klaster analiza

Na UPGMA dendrogramu (Slika 3.) vidi se da su se dihaploidne linije iz svake populacije grupirale u zasebnu skupinu. Jednu skupinu linija činile su dihaploidne linije iz populacije Os 2702 i roditeljske inbred linije populacije Os 2702, osim dihaploidnih linija Os 2702-29

i Os 2702-07 koje su se izdvojile iz grupe. Drugu skupinu linija činile su dihaploidne linije iz populacije Os 2709 zajedno s roditeljskom linijom Os 2695-CO, a treću dihaploidne linije iz populacije Os 2703 zajedno s obje roditeljske linije. Induktor ZMK izdvojio se kao zasebna grupa.



Slika 3. UPGMA dendrogram za 153 genotipa (147 dihaploidnih linija, 5 roditeljskih inbred linija i induktor haploida ZMK)

3.5.5. Raspodjela alela podrijetlom od roditelja kod različitih tipova potomstva

3.5.5.1. Raspodjela alela podrijetlom od svakog roditelja u tri populacije dihaploidnih linija

U populaciji Os 2702 udio alela podrijetlom od majčinske inbred linije Os 2340-8 kretao se između 40,2% na kromosomu 3 i 61,2% na kromosomu 9. Udio alela podrijetlom od majčinske inbred linije Os 942 u populaciji Os 2703 kretao se od 41,1% na kromosomu 1 do 67,4% na kromosomu 7. U populaciji Os 2709 najveći udio alela podrijetlom od majčinske linije Os 84-28-A pronađen je na kromosomu 10, a najmanji na kromosomu 2 (Tablica 41.).

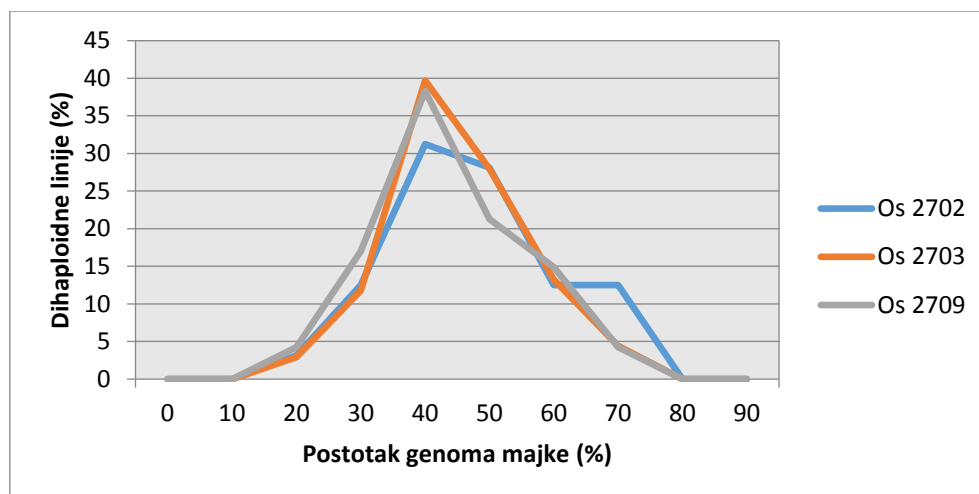
Tablica 41. Udio alela podrijetlom od svakog roditelja po kromosomu

Kromosom	Os 2702		Os 2703		Os 2709	
	Os 2340-8 %	Os 27488 %	Os 942 %	Os 84-28- A %	Os 84-28-A %	Os 2695-CO %
1	57,6	42,4	41,1	58,9	45,9	54,1
2	58,5	41,5	46,1	53,9	40,9	59,1
3	40,2	59,8	56,4	43,6	45,9	54,1
4	58,9	41,1	45,6	54,4	56,0	44,0
5	51,6	48,4	56,3	43,7	54,2	45,8
6	52,8	47,3	47,4	52,6	48,9	51,1
7	48,0	52,0	67,4	32,6	47,0	53,0
8	50,0	50,0	50,9	49,1	46,9	53,1
9	61,2	38,8	50,6	49,4	42,0	58,0
10	53,5	46,5	45,1	54,9	58,4	41,6
Prosjek	53,2	46,8	50,7	49,3	48,6	51,4

3.5.5.2. Raspodjela genoma podrijetlom od majke u populacijama dihaploidnih linija

Raspodjela genoma podrijetlom od majke u tri populacije dihaploidnih linija prikazana je na Slici 4. Najveći dio dihaploidnih linija imao je između 40 i 60% genoma podrijetlom od majke (59,4% u populaciji Os 2702, 67,7% u populaciji Os 2703 i 59,6% u populaciji Os 2709). Manje od 30% genoma podrijetlom od majke imalo je 3,1% dihaploidnih linija u populaciji Os 2702, 2,9% u populaciji Os 2703 i 4,3% u populaciji Os 2709. Više od 70% genoma podrijetlom od majke imalo je 12,5% linija u populaciji Os 2702, 4,4% u

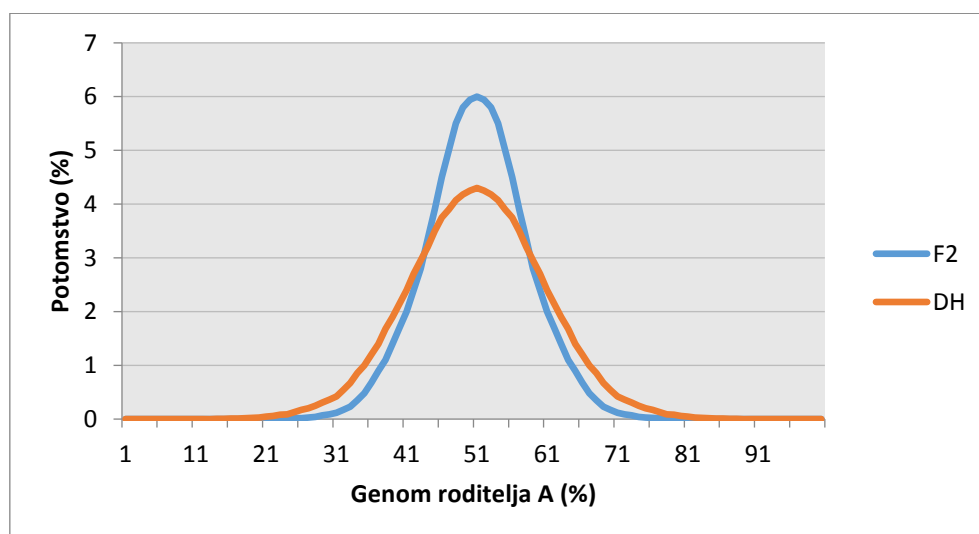
populaciji Os 2703 i 4,3% u populaciji Os 2709. Postotak genoma podrijetlom od majke kod dihaploidnih linija kretao se u rasponu 28,1-77,9% u populaciji Os 2702, 26,5-77,2% u populaciji Os 2703 i 23,0-77,5% u populaciji Os 2709.



Slika 4. Raspodjela genoma podrijetlom od majke za tri populacije dihaploidnih linija

3.5.5.3. Simulacija raspodjele genoma podrijetlom od jednog roditelja u F_2 i DH populaciji

Na Slici 5. prikazana je očekivana raspodjela genoma podrijetlom od jednog roditelja u populacijama biljaka F_2 generacije i dihaploidnih linija. Populacija dihaploidnih linija ima širu raspodjelu koja se proteže više prema roditeljskim ekstremima u odnosu na F_2 populaciju kod koje je raspodjela znatno uža.



Slika 5. Simulacija raspodjele genoma podrijetlom od jednog roditelja (A) kod dva tipa potomstva (F_2 i DH)

3.5.6. Segregacijska distorzija u populacijama dihaploidnih linija

U populaciji dihaploidnih linija Os 2709 opažena su odstupanja od uobičajenog omjera razdvajanja na vrlo malom broju markera na svim kromosomima osim kromosoma 4 i 5, a najviše je distorziranih markera (12,08%) bilo na kromosomu 2 (Tablica 42.). Distorzirane regije pronađene su na svim kromosomima u populaciji Os 2703. Najveća odstupanja bila su na kromosomu 7 kod kojeg je 84,04% markera pokazivalo statistički značajno odstupanje od očekivanog omjera razdvajanja. U populaciji Os 2702 na kromosomu 5 nije bilo distorziranih markera, dok se udio markera kod kojih je opaženo statistički značajno odstupanje u omjeru razdvajanja na ostalim kromosomima kretao između 0,77% na kromosomu 7 i 50,37% na kromosomu 3 (Tablica 42.).

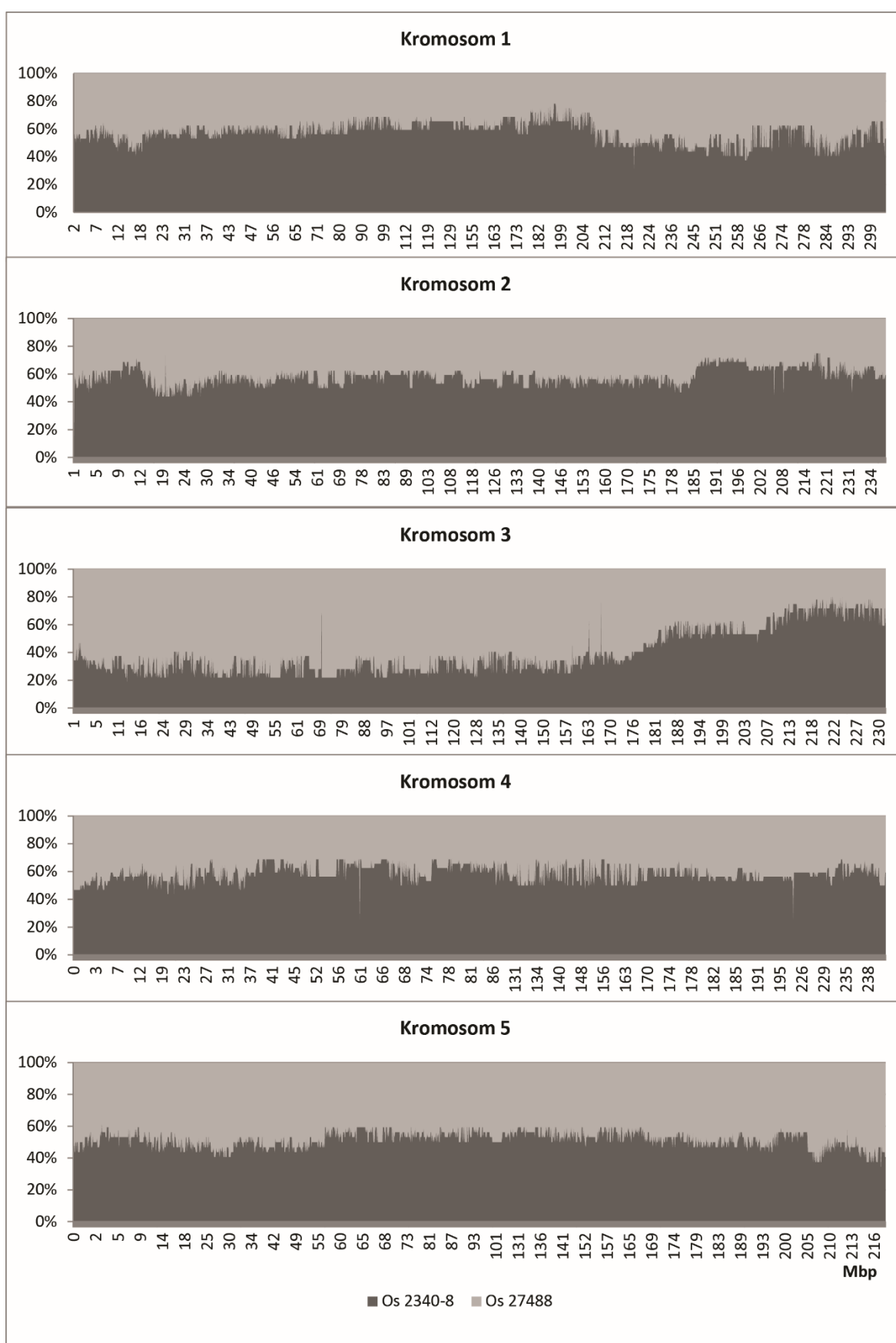
Tablica 42. Segregacijska distorzija u tri populacije dihaploidnih linija

Kromosom	Segregacijska distorzija					
	Os 2702		Os 2703		Os 2709	
	Broj markera	%	Broj markera	%	Broj markera	%
1	213	8,53	993	38,73	5	0,21
2	23	1,14	254	14,61	214	12,08
3	952	50,37	498	26,17	1	0,05
4	153	9,66	14	0,78	0	0,00
5	0	0,00	363	18,85	0	0,00
6	139	12,46	24	1,72	17	1,26
7	11	0,77	1027	84,04	1	0,07
8	50	3,68	25	1,83	13	0,97
9	238	25,93	1	0,09	5	0,42
10	12	1,03	268	22,09	56	5,14
Prosjek		11,36		20,89		2,02

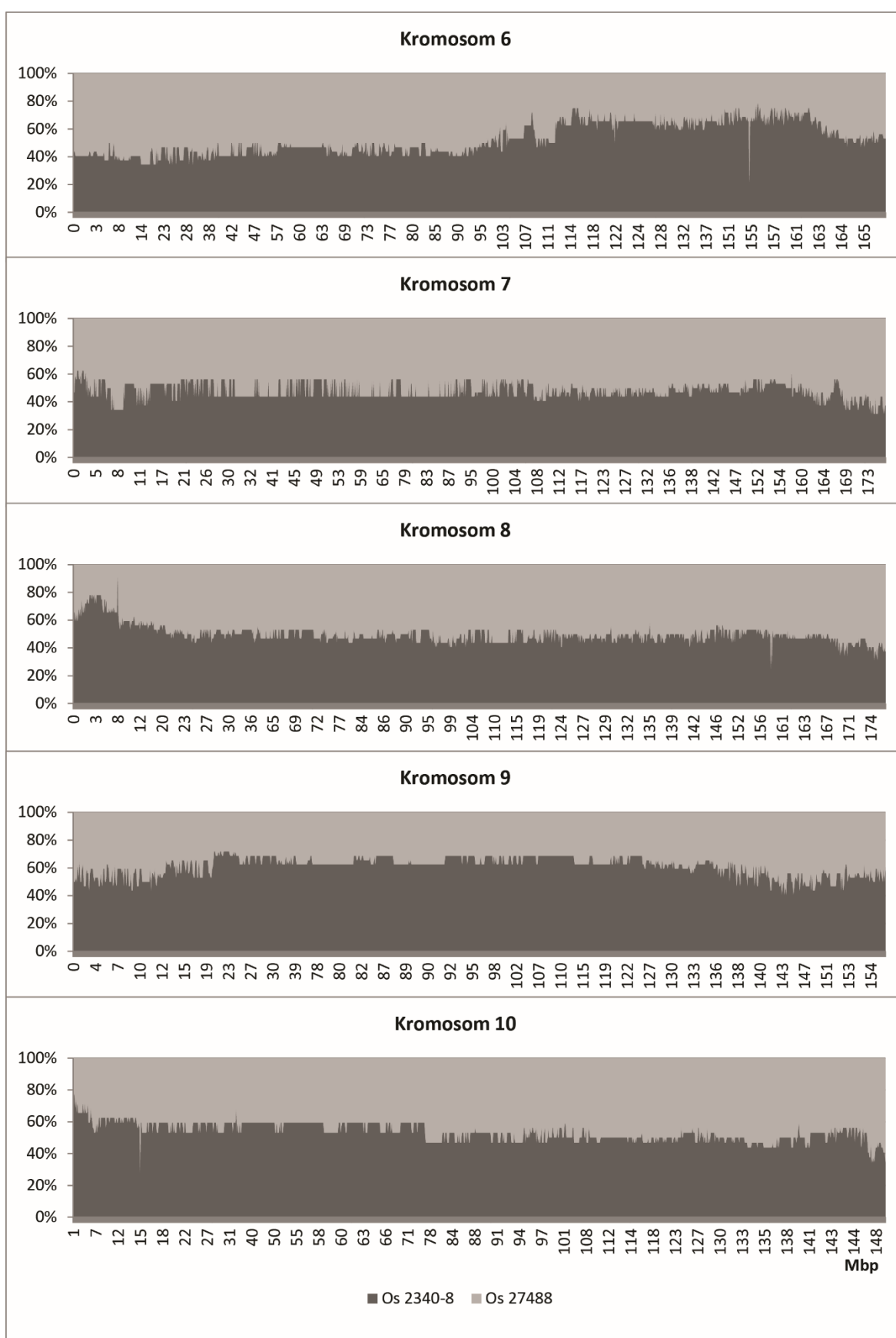
Smjer distorzija prikazan je na Slikama 6a. – 8b. U populaciji Os 2702 najveći udio distorziranih markera pronađen je na kromosomu 3. Markeri sa statistički značajnom segregacijskom distorzijom raspoređeni su jednoliko uzduž cijelog kromosoma, osim na dijelu kromosoma između 175 i 210 Mbp gdje je pronađeno svega nekoliko pojedinačnih distorziranih markera. Na kromosomima 1 i 4 pronađeno je nekoliko manjih distorziranih regija smještenih u središnjem dijelu na kromosoma 1, dok su na kromosomu 4 raspoređene jednoliko po cijelom kromosomu (Slika 6a.). Na kromosomu 6 uz nekoliko manjih pronađena je i jedna veća regija sa značajnim odstupanjem u razdvajanju smještena na udaljenosti 150-162 Mbp. Veći broj distorziranih markera pronađen je i na kromosomu 9, no nije zapažena niti jedna veća distorzirana regija, nego su markeri s odstupanjem u omjeru razdvajanja raspoređeni uzduž cijelog kromosoma (Slika 6b.).

Najveći udio markera kod kojih je opaženo značajno odstupanje od očekivanog omjera razdvajanja u populaciji Os 2703 imao je kromosom 7 (Slika 7b.). Na kromosomima 4, 6, 8 i 9 zabilježen je vrlo mali broj distorziranih markera. Velik udio distorziranih markera pronađen je i na kromosomu 1 na kojem su opažene, uz nekoliko manjih, dvije veće regije segregacijske distorzije na pozicijama 47-113 Mbp i 156-195 Mbp (Slika 7a.).

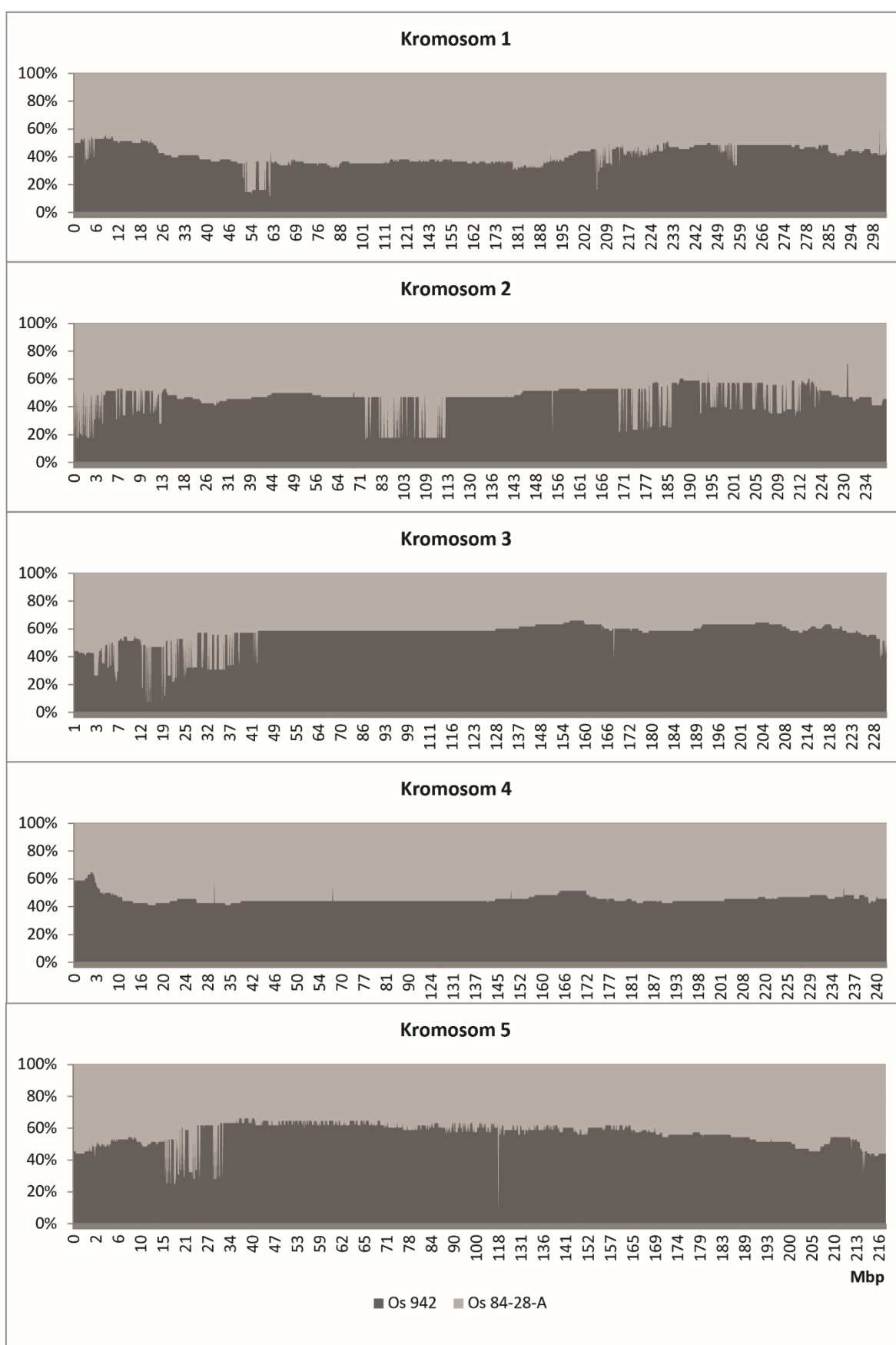
Najmanji udio markera sa značajnim odstupanjem od očekivanog omjera razdvajanja zabilježen je u populaciji Os 2709. Najveći broj distorziranih markera imao je kromosom 2, a zatim kromosom 10, dok na kromosomima 4 i 5 nije pronađen niti jedan distorzirani marker, a na ostalim kromosomima je zabilježeno po nekoliko. Na kromosomu 2 pronađeno je više manjih regija raspoređenih uzduž kromosoma (Slika 8a.), dok su kod kromosoma 10 distorzirani markeri pronađeni samo na udaljenosti između 15 i 25 Mbp i na samom kraju kromosoma (Slika 8b.).



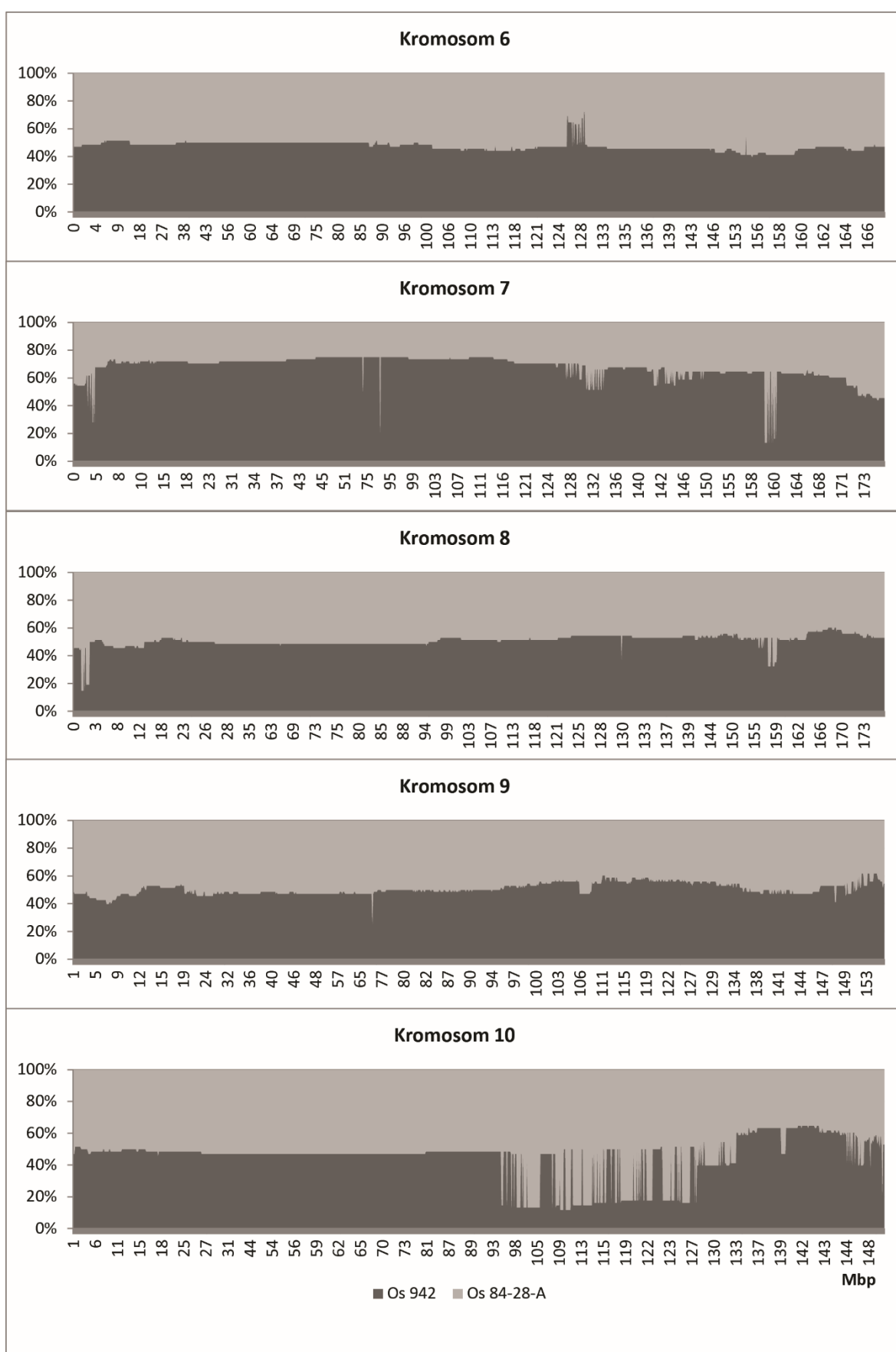
Slika 6a. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2702 (kromosomi 1 – 5)



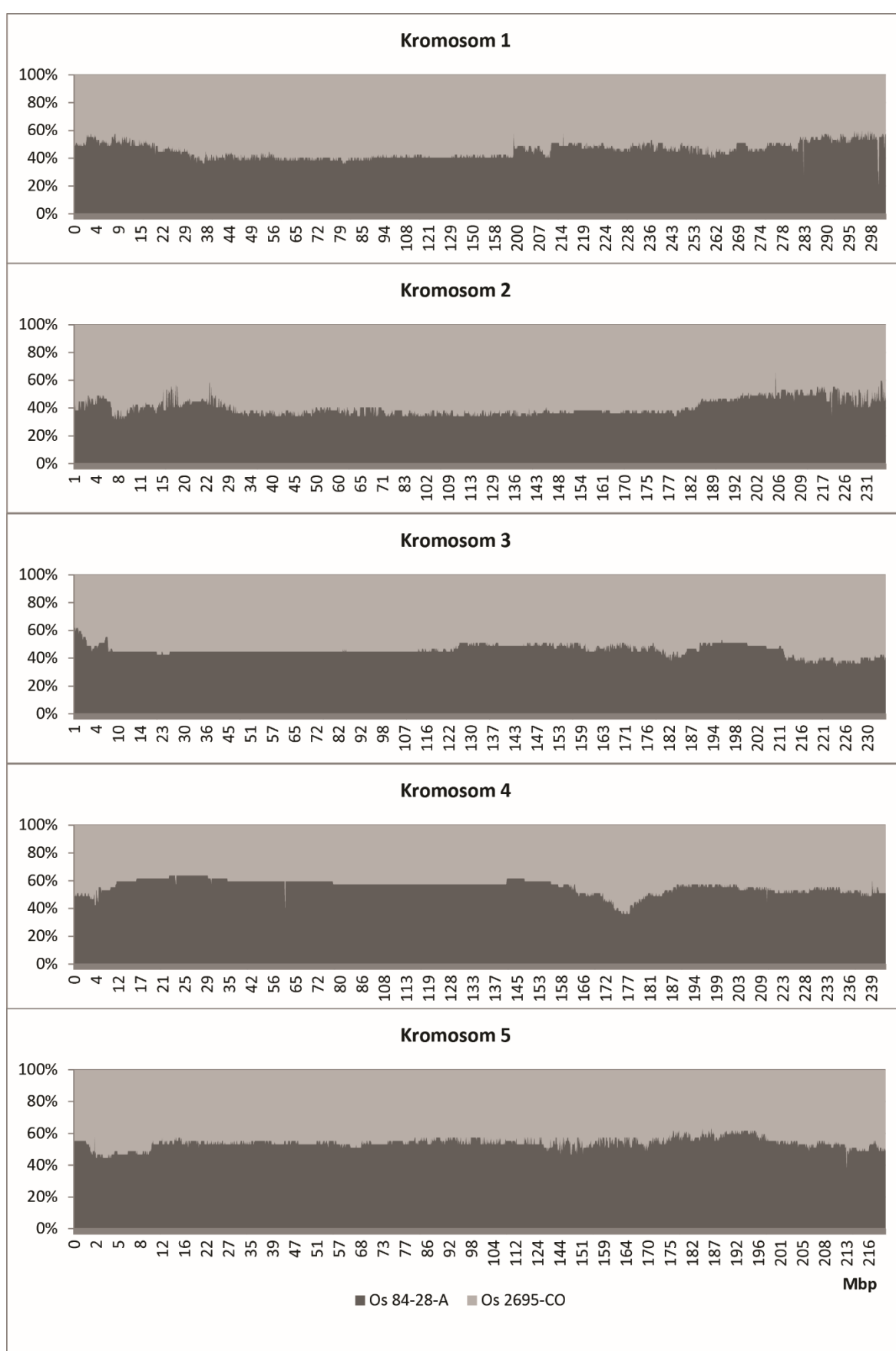
Slika 6b. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2702 (kromosomi 6 – 10)



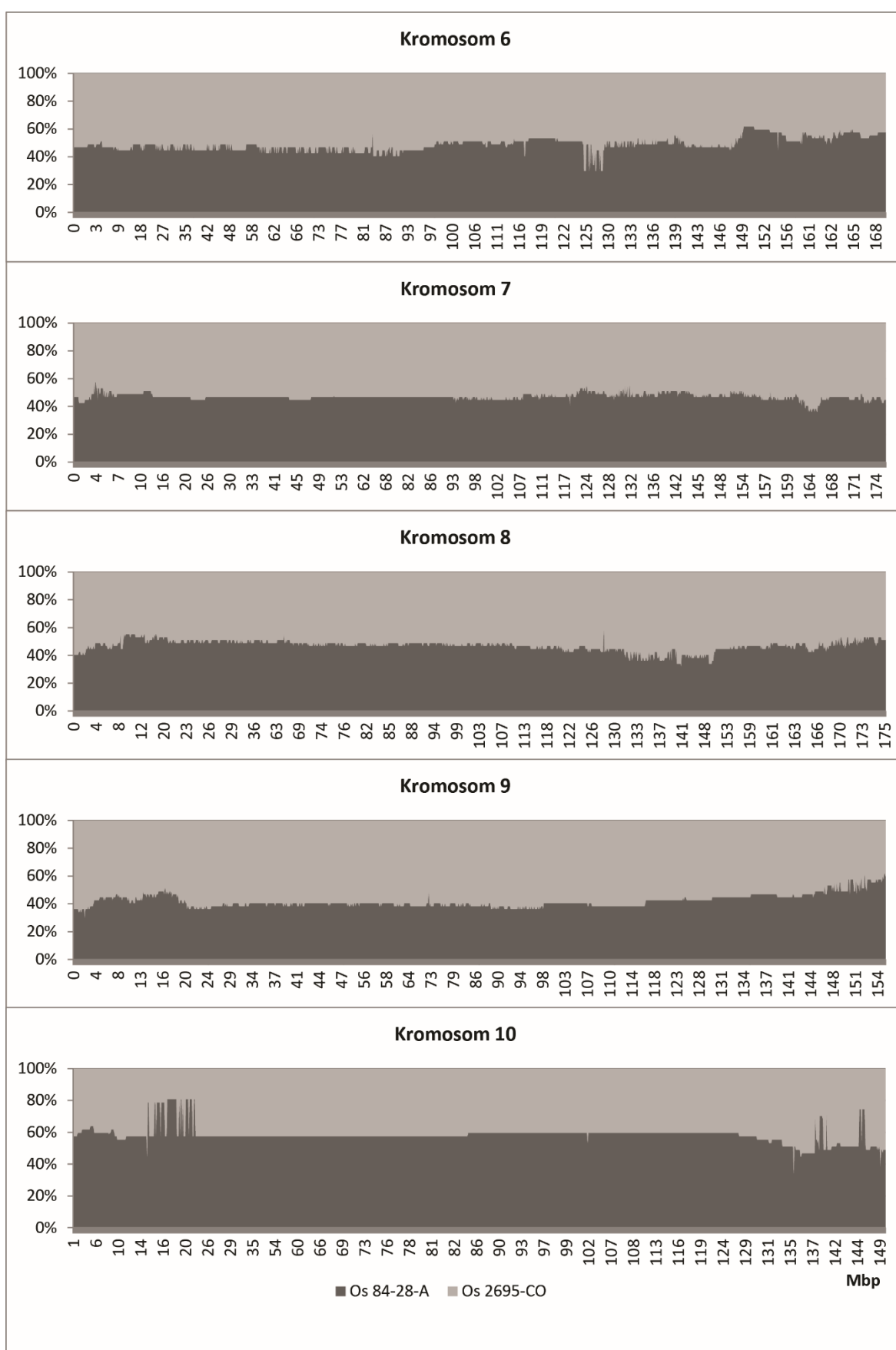
Slika 7a. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2703 (kromosomi 1 – 5)



Slika 7b. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2703 (kromosomi 6 – 10)



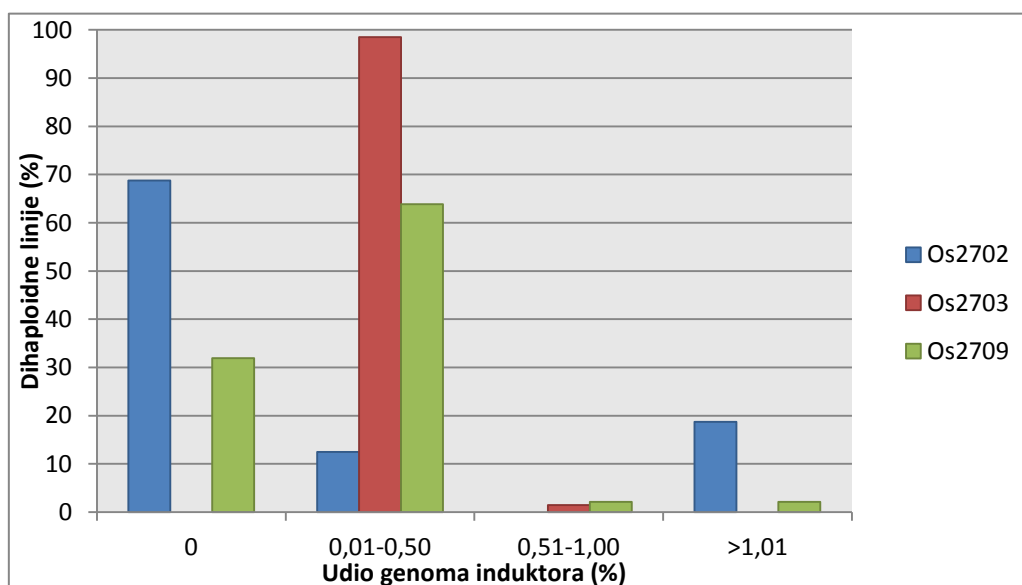
Slika 8a. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2709 (kromosomi 1 – 5)



Slika 8b. Razdvajanje po pojedinom markeru na osnovi postotnog udjela alela dvaju roditelja u dihaploidnim linijama populacije Os 2709 (kromosomi 6 – 10)

3.6. Analiza prisutnosti segmenata genoma induktora u genomu dihaploidnih linija

Analizom molekularnih podataka utvrđeno je da su u populaciji Os 2702, od ukupno 32 ispitane dihaploidne linije, 22 linije (68,75%) potpuno čiste linije koje sadrže samo genom roditeljskih komponenti hibrida na kojemu je napravljena indukcija, četiri linije (12,50%) sadrže segmente genoma induktora u vrlo malom postotku (<0,50% genoma podrijetlom od induktora), a preostalih šest linija (18,75%) sadrže više od 1% genoma podrijetlom od induktora. Od linija u kojima je dokazana prisutnost genoma induktora u dvije linije su pronađeni i heterozigotni lokusi dok su preostale potpuno homozigotne linije. U populaciji Os 2703 pronađeni su mali segmenti genoma induktora u svim dihaploidnim linijama. Izraženo u postotku genom induktora je činio manje od 0,50% genoma kod 98,53% dihaploidnih linija iz ove populacije, dok je kod jedne linije (1,47%) iznosio 0,54%. U populaciji Os 2709 15 linija (31,91%) bile su potpuno čiste dihaploidne linije, dok je preostalih 32 linije sadržavalo genom induktora u malom postotku, od toga 30 linija manje od 0,50% (Slika 9.).

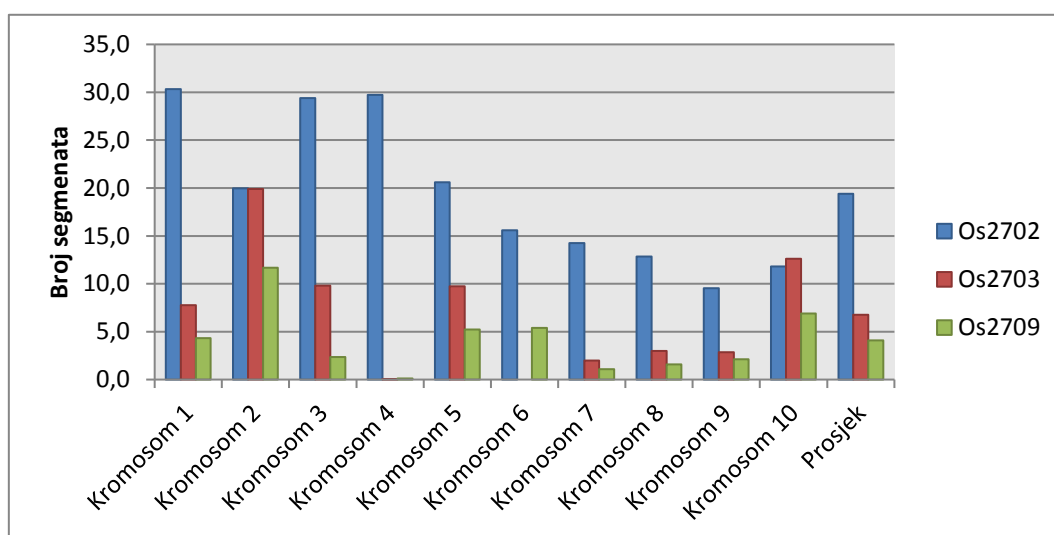


Slika 9. Udio genoma induktora (%) u genomu dihaploidnih linija triju populacija

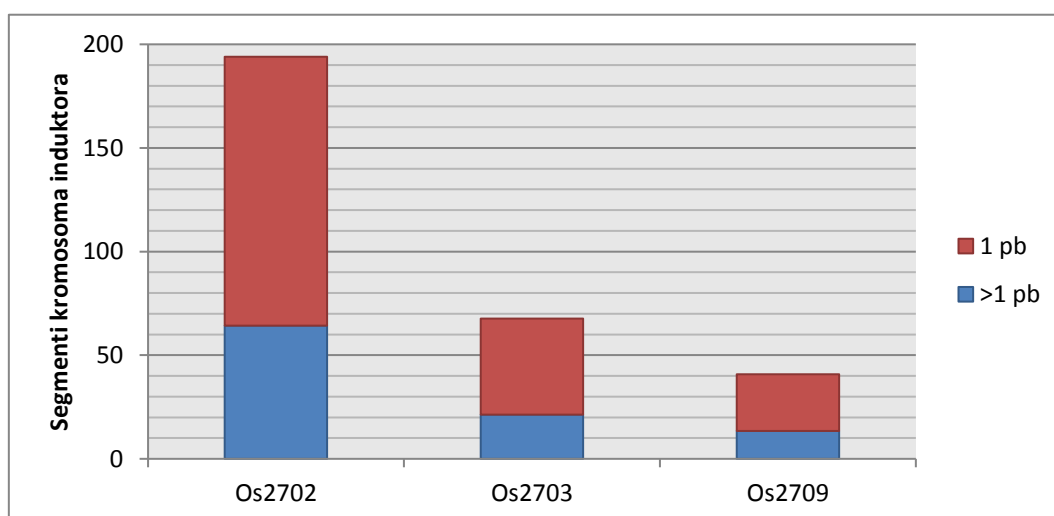
Niti u jednoj roditeljskoj liniji hibrida koji su korišteni za indukciju nisu pronađeni segmenti genoma induktora. Ako promatramo sve tri populacije zajedno, u prosjeku 93,04% dihaploidnih linija sadrži manje od 1,00% genoma induktora ili uopće ne sadrži

segmente podrijetlom od induktora (81,25% u populaciji Os 2702, 100% u populaciji Os 2703, 97,87% u populaciji Os 2709) (Slika 9.).

Prosječan broj segmenata kromosoma induktora po dihaploidnoj liniji najveći je bio u populaciji Os 2702 i iznosio prosječno 19,4 segmenata po kromosomu. U populacijama Os 2703 i Os 2709 zabilježeno je redom 6,8 i 4,1 segmenata genoma induktora po kromosomu dihaploidne linije (Slika 10.). U prosjeku 67,5% segmenata podrijetlom od induktora odnosili su se na pojedinačne parove baza (66,9% u populaciji Os 2702, 68,6% u populaciji Os 2703 i 67,1% u populaciji Os 2709) (Slika 11.).



Slika 10. Prosječan broj segmenata kromosoma induktora po kromosomu dihaploidne linije za tri populacije dihaploidnih linija



Slika 11. Prosječan broj segmenata genoma induktora po dihaploidnoj liniji u tri populacije i udio pojedinačnih parova baza podrijetlom od induktora u ukupnom broju segmenata

Prosječna veličina segmenta podrijetlom od induktora iznosila je 14083 pb u populaciji Os 2702, 8852 pb u populaciji Os 2703 i 19117 pb u populaciji Os 2709. Na kromosomu 6 u populaciji Os 2703 nije pronađen niti jedan segment genoma induktora u genomu dihaploidnih linija (Tablica 43.).

Tablica 43. Prosječna veličina segmenata genoma induktora (pb) po kromosomu dihaploidnih linija iz tri populacije

Kromosom	Prosječna veličina segmenta podrijetlom od induktora (pb)		
	Os 2702	Os 2703	Os 2709
1	13239	8087	6038
2	15555	5231	121848
3	13132	26416	6606
4	22063	85	6668
5	8666	21540	13453
6	11945	0	15221
7	9745	233	3778
8	14489	2365	214
9	17628	8175	2758
10	14369	16388	14589
Prosjek	14083	8852	19117

4. RASPRAVA

4.1. Indukcija haploida *in vivo* i dobivanje dihaploidnih linija

Primjena tehnologije dihaploida skraćuje vrijeme potrebno za dobivanje linija kukuruza za više od pola u usporedbi s tradicionalnom metodom, a osim toga ima nekoliko kvantitativno genetičkih, operacijskih, logističkih i ekonomskih prednosti (Schmidt, 2003., Melchinger i sur., 2005., Seitz, 2005., Smith i sur., 2008., Chang i Coe, 2009., Geiger, 2009., Prigge i sur., 2012.). Zbog toga dihaploidne linije kukuruza u oplemenjivačkim programima u svijetu sve više zamjenjuju inbred linije. Ključni faktori za uspješnu primjenu metode indukcije haploida *in vivo* u oplemenjivanju su visok postotak indukcije, marker koji omogućuje precizno razlikovanje haploidnih od diploidnih zrna i djelotvorna metoda udvostručenja kromosoma.

4.1.1. Odabir početnog materijala za indukciju haploida

Odabir izvorne germplazme, odnosno donora genoma, za indukciju haploida ovisi o ciljevima oplemenjivačkih programa (Prasanna i sur., 2012.). Haploidi se uobičajeno induciraju u F₁ generaciji nakon križanja dvije inbred linije. Međutim, Frisch i Melchinger (2007.) navode da kod dihaploidnih linija dobivenih iz F₁ generacije dolazi do manjeg broja rekombinacija u usporedbi s inbred linijama dobivenim iz uzastopnih generacija samooplodnje, što smanjuje odgovor na selekciju zbog gubitka gena kada se veliki segmenti kromosoma prenose s roditelja na potomstvo i mali broj individua odabire za križanja (Riggs i Snape, 1977., Jannink i Abadie, 1999., Bernardo, 2009.). Zbog toga Bernardo (2009.) kao početni materijal za indukciju haploida predlaže F₂ generaciju. Međutim, ograničena rekombinacija kod dihaploidnih linija dobivenih iz F₁ generacije može očuvati superiorne epistatične kombinacije alela i olakšati selekciju potomstva genotipski bližeg jednom od roditelja, nego što bi to bilo kod potomstva odabranog nakon više uzastopnih generacija samooplodnje, što u nekim slučajevima može biti poželjno (Bernardo i Kahler, 2001.).

Indukcija haploida napravljena je na F₁ generaciji i to na 11 komercijalnih hibrida Poljoprivrednog instituta Osijek. Iako se za razvoj novih linija uobičajeno koriste križanci linija koje pripadaju istoj heterotičnoj skupini, u posljednje se vrijeme sve više koriste jednostruki (*single cross*) hibridi kao početni materijal za razvijanje novih linija s ciljem

proširenja genetske osnove. Osim toga, hibridi koji su korišteni kao početni materijal za indukciju haploida obuhvaćaju elitnu germplazmu kukuruza Poljoprivrednog instituta Osijek na kojoj do sada nije rađena indukcija haploida te kao takvi predstavljaju vrijedan izvor informacija o pogodnosti domaćeg materijala za dobivanje haploida, odnosno dihaploidnih linija.

4.1.2. Frekvencija induciranih haploida

Postotak indukcije haploida kod današnjih modernih induktora u prosjeku iznosi oko 8% (Röber i sur., 2005., Prigge i sur., 2011b.), a prema nekim autorima i više od 10% (Zhang i sur., 2008., Rotarencu i sur., 2010., Shatskaya, 2010.). Iako frekvencija induciranih haploida prvenstveno ovisi o potencijalu induktora (Lashermes i Beckert, 1988., Sarkar i sur., 1994., Shatskaya i sur., 1994., Chalyk, 1999., Röber i sur., 2005., Kebede i sur., 2011.), bitan faktor predstavljaju odabir izvorne germplazme (Lashermes i Beckert, 1988., Eder i Chalyk, 2002.) i utjecaj vanjskih čimbenika kao što su temperatura za vrijeme indukcije (Kebede i sur., 2011.), utjecaj okoline, odnosno interakcija lokacije i godine (Röber i sur., 2005.) te biotski i abiotski stres (Geiger, 2009.).

Prosječne relativne frekvencije haploida zabilježene kod 11 ispitanih genotipova kretale su se između 6,9% i 15,8% što odgovara prosjeku indukcije karakterističnom za induktor ZMK koji se kreće između 6 i 13% (Shatskaya, 2010.). Kod izračunavanja postotka indukcije haploida za sva navodno haploidna zrna, koja nisu isključila, smatralo se da su haploidi iako postoji mogućnost da su pogrešno klasificirani hibridi. S obzirom da je točnost klasifikacije pomoću *R-nj* markera kod svih genotipova bila relativno visoka, možemo pretpostaviti da ovakav izračun nije značajno utjecao na konačan rezultat te pruža realan uvid u razlike između ispitanih genotipova. Razlike u postotku induciranih haploida između ispitanih genotipova vjerovatno su jednim dijelom rezultat genetskih razlika, ali i negenetskih čimbenika, od kojih bi najveći utjecaj mogla imati temperatura za vrijeme oplodnje. S obzirom na frekvenciju indukcije haploida i FAO skupine kojima pripadaju, genotipovi se mogu podijeliti u dvije skupine. Jednu skupinu čine raniji genotipovi (FAO 280-420), kod kojih je zabilježena prosječno viša frekvencija haploida, a drugu, s nižom frekvencijom, kasniji genotipovi (FAO 520-610), uz iznimku genotipa OSSK 515 (FAO 520) kod kojeg je frekvencija indukcije bila na razini skupine ranijih genotipova. Iako na temelju ovog istraživanja ne možemo donijeti znanstveno utemeljen zaključak, možemo pretpostaviti da je ovakva podjela genotipova dijelom uzrokovana vrlo visokim

temperaturama za vrijeme oplodnje kasnijih genotipova. Budući da oplemenjivački program nije moguće ograničiti samo na germplazmu kod koje je zabilježena visoka frekvencija indukcije haploida, na povećanje frekvencije haploida moglo bi se utjecati izborom induktora koji bolje podnosi uvjete suše i visokih temperatura ili ranijom sjetvom kasnijih genotipova za indukciju.

Značajne razlike u postotku induciranih haploida pronađene su i između pojedinih biljaka unutar jednog genotipa. Budući da je F_1 generacija genotipski uniformna, te razlike mogu biti rezultat vanjskih utjecaja kao što su vrijeme oplodnje i vremenske prilike za vrijeme oplodnje, ali i varijabilnosti unutar samog induktora budući da je molekularnom analizom induktora utvrđeno da induktor nije homozigotna linija.

4.1.3. Ekspresija markera *RI-nj*

Iako više autora ističe da je ekspresija markera *RI-nj* pod velikim utjecajem genetske osnove genotipa donora, genetske osnove samog induktora kao i pod utjecajem okoline (Chase, 1952., Röber i sur., 2005., Kebede i sur., 2011., Prigge i sur., 2012.), nije bilo statistički značajne razlike između ispitanih genotipova te je kod svih genotipova točnost markera *R-nj* bila relativno visoka, a kod nekih i potpuna. Takav rezultat ukazuje na vjerojatnost da se inhibitor antocijanina *CI-I* ne pojavljuje u ispitanom materijalu što je u skladu s istraživanjima više autora (Kato, 2002., Rober, 1999.) koji navode da se *CI-I* alel kod zubana pojavljuje u niskom postotku.

4.1.4. Udvostručenje kromosoma u D_0 generaciji

Udvostručenje kromosoma kod haploidnih biljaka i dalje je jedan od najvećih izazova u dobivanju dihaploidnih linija. Budući da su haploidi sterilni, glavna svrha udvostručenja kromosoma je dobivanje homozigotnih diploidnih biljaka koje se mogu umnožiti samooplodnjom. Za udvostručenje se najčešće koristi otopina kolhicina u različitoj koncentraciji (Gayen i sur., 1994., Barnabás i sur., 1999.) te se nastoji pronaći protokol učinkovit u udvostručenju kromosoma uz minimalne gubitke uzrokovane visokom toksičnošću kolhicina ili stresom tijekom tretmana ili rukovanja s haploidima (Kleiber i sur., 2012.). Kolhicin je alkaloid iz biljke *Colchicum autumnale* L. koji se veže za tubulin i sprječava stvaranje diobenog vretena što rezultira stanicama s udvostručenim setom kromosoma (Wan i sur., 1989.). Udvostručenje kromosoma pomoću kolhicina nikada nije

potpuno, nego se stvaraju himere diploidnog tkiva na haploidnoj biljci. Upravo zbog toga niti fertilnost takvih biljaka nije potpuna te se često događa da klip pusti svilu, no metlica ostane sterilna, a u manje slučajeva da se na biljci ne razvije klip, a na metlici se pojavljuje polen. Također se može dogoditi da pojava svile i cvatnja metlice nisu usklađeni. Kod takvih se biljaka ne može napraviti samooplodnja te se smatra da kod njih udvostručenje kromosoma nije bilo uspješno. Učinkovitost i idealna koncentracija otopine kolhicina ovise o genotipu koji se tretira te nema metode koja će kod svih genotipova dati najbolje rezultate (Castillo i sur., 2009.). Visoke koncentracije kolhicina štetne su za mlade biljke jer uzrokuju ozljede tkiva što rezultira niskom stopom oporavka nakon tretmana (Han i sur., 2006.). Više je autora ispitivalo učinkovitost različitih metoda, koristeći različite koncentracije kolhicina kako bi pronašli idealnu koncentraciju otopine (Gayen i sur., 1994., Zabirowa i sur., 1996., Deimling i sur., 1997., Zabirowa i Shatskaya, 1999., Chalyk, 2000., Eder i Chalyk, 2002.). Najbolje rezultate dale su metoda potapanja klijanaca kojima je odrezan vrh koleoptile u 0,06% otopinu kolhicina tijekom 12 sati (Deimling i sur., 1997.) i metoda injektiranja otopine kolhicina koncentracije 0,125% neposredno iznad točke rasta stabljike u fazi 3-5 razvijenih listova (Zabirowa i Shatskaya, 1999.). Eder i Chalyk (2002.) su usporedili ove dvije metode. Prva metoda po Deimling i sur. (1997.) je u polju rezultirala s 49,4% haploida s fertilnim polenom, 39,0% haploida kod kojih je bilo moguće napraviti samooplodnju, odnosno 27,3% haploida kod kojih je samooplodnja bila uspješna. Drugu metodu po Zabirowa i Shatskaya (1999.) su proveli u dvije okoline, plasteniku i polju. U plasteniku je rezultirala s 42,4% haploida s fertilnim polenom i 30,5% biljaka kod kojih se mogla napraviti samooplodnja, a u polju sa 16,1% muško fertilnih haploida, 11,3% samooplođenih haploida i 8,1% haploida koji su dali sjeme.

Uspješnost udvostručenja kromosoma pomoću otopine kolhicina kod 11 populacija haploida statistički se značajno razlikovala između populacija te se frekvencija fertilnih biljaka kretala od 8,1% do 31,1%. Zabirowa i Shatskaya (1999.) navode uspjeh udvostručenja kromosoma u prosjeku 25-35%, a kod nekih genotipova i do 60%, dok su drugi autori postigli znatno niže stope udvostručenja kromosoma ovom metodom kod primjene u polju (Eder i Chalyk, 2002.).

Udvostručenje kromosoma, odnosno pojava fertilnih biljaka često nisu dovoljni za uspješno dobivanje dihaploidne linije jer biljke tretirane otopinom kolhicina obično imaju slab vigor i dug interval između svilanja i polinacije (Dang i sur., 2012.). To potvrđuju i

rezultati ovog istraživanja. Samooplodnja je bila uspješna kod 43,2-69,2% fertilnih haploida, ovisno o populaciji. Kako bi se postigli bolji rezultati, ovu bi metodu trebalo primjenjivati u plasteniku jer bi takva primjena omogućila djelomičnu kontrolu uvjeta za vrijeme i neposredno nakon tretiranja otopinom kolhicina čime bi se ublažio stres uzrokovan tretiranjem.

4.1.5. Utjecaj drugih faktora na uspješnost metode dihaploida

Niska frekvencija nicanja također je bitno utjecala na konačan broj dihaploidnih linija. Haploidne biljke su znatno osjetljivije na vremenske uvjete u polju i imaju veće zahtjeve kod obrade tla i njege u odnosu na diploidne biljke. Zbog nepogodnih vremenskih prilika nakon sjetve došlo je do stvaranja jake pokorice na tlu što je rezultiralo slabijim i neujednačenim nicanjem. Neujednačeno nicanje je znatno otežalo tretiranje haploida kolhicinom u optimalnoj fazi rasta. Budući da je svako haploidno zrno, odnosno svaka haploidna biljka, potencijalna dihaploidna linija, ovakve je gubitke potrebno smanjiti na minimum. Zbog toga bi haploide D_0 generacije trebalo sijati u zaštićenom prostoru, kao što je plastenik ili staklenik, a zatim mlade biljke presaditi u polje nakon tretiranja kolhicinom. Tako bi se izbjegli nepovoljni vanjski utjecaji, omogućilo bolje i ujednačeno nicanje, a samim time i tretiranje kolhicinom u optimalnoj fazi za sve biljke.

4.2. Usporedba dihaploidnih i roditeljskih inbred linija

Dihaploidne linije iz određenog izvora čine populaciju linija koje su slučajan uzorak za većinu svojstava, od kojih su neka nepoželjna mogla klasičnom selekcijom biti odbačena u ranim generacijama. Više autora navodi da dihaploidi imaju nekoliko kvantitativno genetičkih i logističkih prednosti u odnosu na inbred linije te da i sami haploidi mogu pomoći u selekciji i uklanjaju štetnih gena iz populacije jer haploidne biljke koje nose takve gene ugibaju ili su nerazvijene i sterilne (Eder i Chalyk, 2002., Bernardo, 2002., Röber i sur., 2005., Bordes i sur., 2007., Wędzony i sur., 2009., Jumbo i sur., 2011., Prasanna i sur., 2012.). Hallauer i sur. (2010.) navode da je prednost dihaploidne metode mogućnost fiksiranja superiornih gameta u homozigotnom stanju u samo jednoj generaciji samooplodnje, međutim problem predstavlja identifikacija superiornih gameta za što je potrebno promatranje i ocjenjivanje u više okolina. Nakon dobivanja linija, potrebno ih je ocijeniti kako bi se ispitala njihova vrijednost što u slučaju dihaploidnih linija povećava broj hibridnih kombinacija kod testiranja linija budući da prethodno nisu prošle selekciju. Iako je najvažniji pokazatelj vrijednosti linije njezina kombinacijska sposobnost, odnosno vrijednost u test križanju, određena svojstava linije *per se* također su važna kod odabira linija koje će se kasnije koristiti kao roditeljske komponente hibrida.

Više istraživanja je pokazalo da između dihaploidnih linija i inbred linija dobivenih nekom od tradicionalnih metoda nema razlika po pitanju prinosa i vlage zrna, visine klipa i cijele biljke, odnosno da indukcija haploida ne utječe na agronomsku vrijednost dobivene populacije (Lashermes i sur., 1988., Marhic i sur., 1998., Seitz, 2005., Bordes i sur., 2007., Strigens i sur., 2013.). U ovome istraživanju ispitano je 11 svojstava dihaploidnih linija *per se* u poljskim pokusima. U analizi varijance genotip je bio statistički značajan izvor variranja za sva ispitana svojstva u sve tri populacije. Ovakavi rezultati ukazuju na postojanje genotipske varijabilnosti u populacijama dihaploidnih linija što je od velikog značaja u selekciji i oplemenjivanju. Rezultati t-testa pokazali su da za većinu svojstava u svakoj dihaploidnoj populaciji postoji jedna ili više dihaploidnih linija koje su za određeno svojstvo značajno bolje u odnosu na oba roditelja što ukazuje na mogućnost selekcije linija poboljšanih u odnosu na roditeljske linije.

4.2.1. Prinos i komponente prinosa

Neka od bitnih svojstva linije *per se* u sjemenskoj proizvodnji, koja su ispitana u ovom istraživanju, su prinos zrna i komponente prinosa te interval između polinacije i svilanja. Prinos je kvantitativno svojstvo niske heritabilnosti, ali komponente prinosa, kao što su broj redova zrna na klipu, masa zrna i duljina klipa, koje su u značajnoj pozitivnoj korelaciji s prinosom zrna, imaju veću heritabilnost od samog prinosa (Hallauer i Miranda, 1988.). Lu i sur. (2011.) dobili su statistički značajne koeficijente korelacije između prinosa zrna i broja redova zrna na klipu od 0,62 do 0,85 te smatraju da je selekciju na prinos lakše raditi preko selekcije na komponente prinosa visoke heritabilnosti, nego direktnom selekcijom na sam prinos. Autori su pronašli 13 QTL-ova, od kojih svaki objašnjava 3,0-17,9% fenotipske varijance za svojstvo broja redi zrna po klipu te su utvrdili da se ovo svojstvo nasljeđuje aditivno ili pokazuje djelomičnu dominaciju. Značajne korelacije između prinosa zrna i broja redi zrna na klipu pronašli su i drugi autori (Yousuf i Saleem, 2001., Khalily i sur., 2010., Raghu i sur., 2011.). Zbog toga je poželjno da roditeljske linije imaju veći broj redi zrna na klipu jer se očekuje da će broj redi zrna na klipu kod njihovog hibrida biti ili intermedijaran ili se približavati vrijednosti jednog od roditelja, ali da neće prelaziti tu vrijednost u bilo kojem pravcu.

Koeficijent varijabilnosti za broj redi zrna na klipu bio je relativno nizak u sve tri populacije. U odnosu na roditeljske linije genotipova koji su korišteni za indukciju haploida, koje su bile standardi u poljskim pokusima, u populaciji dihaploidnih linija Os 2703 17 linija je imalo statistički značajno veći broj redi zrna po klipu od obje roditeljske linije, dok je u populaciji Os 2702 pronađeno dvije takve linije, a u populaciji Os 2709 jedna. Međutim, koeficijenti korelacije između broja redi zrna po klipu i prinosa zrna linija nisu bili statistički značajni u populacijama dihaploidnih linija. Uzrok nepostojanja korelacije mogli bi biti nepotpuno oplođeni klipovi kod ručnog izvođenja samooplodnje, budući da su se kao uzorak za mjerenje svojstava klipa uzimali klipovi iz samooplodnje.

4.2.2. Interval između polinacije i svilanja

Važnost duljine intervala između polinacije i svilanja posebno dolazi do izražaja kada su biljke za vrijeme cvatnje pod stresom zbog nedostatka vode, hraniva, svjetla ili drugih čimbenika, zbog čega se usporava rast klipa u odnosu na metlicu te se povećava interval između polinacije i svilanja. Interval između polinacije i svilanja u negativnoj je korelaciji

s prinosom, posebno u uvjetima suše, te ima visoku heritabilnost pa se često koristi kao selekcijski kriterij u uvjetima stresa zbog nedostatka vode (Chapman i Edmeades, 1999., Setter, 2012.). Edmeades i sur. (2000.) dobili su da je korelacija između ASI i prinosa zrna procijenjena za široki spektar genotipova uzgajanih pod utjecajem suše za vrijeme cvatnje oko -0,6, a heritabilnost u širem smislu za interval između polinacije i svilanja između 0,5 i 0,7. Dug interval između cvatnje metlice i svilanja nije poželjan kod linija jer otežava oplodnju, a time i sjemensku proizvodnju. U populacijama Os 2702 i Os 2703 po jedna linija imaju statistički značajno manji interval između polinacije i svilanja u odnosu na oba roditelja, dok u populaciji Os 2709 značajno kraći interval ima 8 linija, od toga 6 linija ima negativan ASI. Prinos je bio u negativnoj korelaciji s duljinom intervala između polinacije i svilanja u sve tri populacije dihaploidnih linija. U populacijama Os 2703 i Os 2709 zabilježena je slaba, a u populaciji Os 2702 umjerena negativna korelacija s prinosom zrna.

Nasljeđivanje intervala između polinacije i svilanja proučavalo je više autora. Analizom srednjih vrijednosti kod 8 inbred linija, Hefing (2010.) je zaključio da je svojstvo kontrolirano recesivnim genima s istaknutim aditivnim djelovanjem gena. Do sličnog su zaključka došli i Sher i sur. (2012.). Pronašli su da je nasljeđivanje intervala između polinacije i svilanja pod kontrolom aditivnih i dominantnih gena, ta epistatičke interakcije aditivnih gena. Dominantno djelovanje gena ukazuje da se ovo svojstvo uspješno može koristiti kod razvijanja hibrida, a aditivni efekti i efekti interakcije aditivnih gena, odnosno epistaza, na mogućnost poboljšanja ovog svojstva.

4.2.3. Odabir plana pokusa

Izborom pokusnog plana nastojalo se smanjiti pokusnu grešku na najmanju moguću mjeru. Pokusi su postavljeni prema α -dizajnu (Patterson i Williams, 1976.), modificiranom planu s nepotpunim blokovima, svaki u tri ponavljanja. U analizi varijance ponavljanja su bila statistički značajan izvor variranja za visinu stabljike do baze klipa u populacijama Os 2702 i Os 2703, visinu stabljike do vrha metlice u sve tri populacije, svilanje u populaciji Os 2703, interval između polinacije i svilanja u populaciji Os 2709, sva svojstva klipa u populaciji Os 2703, promjer klipa u populaciji Os 2709 i prinos u populacijama Os 2703 i Os 2709. Razlike između ponavljanja uglavnom su pronađene u pokusima s populacijama Os 2703 i Os 2709 koji su imali veći broj članova (75 i 54) te su zauzimali znatno veću površinu u odnosu na pokus s linijama iz populacije Os 2702 i mogu biti uzrokovane heterogenošću tla.

4.3. Komparativna analiza dihaploidnih i samooplodnih F₂ linija

Statistički značajne razlike pronađene su za svojstva polinacije i svilanja između sve tri populacije dihaploidnih linija i odgovarajućih F₂ populacija. Kod dihaploidnih linija nešto je veća prosječna suma toplinskih jedinica bila potrebna za polinaciju i svilanje u odnosu na prosjek F₂ generacije. Razlika u prosječnoj dužini intervala između polinacije i svilanja statistički je bila značajna samo između populacije Os 2703 i pripadajuće F₂ populacije, međutim raspon duljine intervala između cvatnje metlice i svilanja kod populacija Os 2703 i Os 2709 bio je veći u odnosu na F₂ generaciju, dok se kod populacije Os 2702 duljina intervala kretala u približno istom rasponu kao i u F₂ populaciji iz genotipa OS 378. Interval između polinacije i svilanja je kod nekih dihaploidnih linija u populacijama Os 2703 i Os 2709 poprimao i negativne vrijednosti što znači da je svilanje prethodilo polinaciji.

Razlike između srednjih vrijednosti za svojstva visine stabljike do baze klipa i vrha metlice bile su statistički značajne između sve tri ispitane populacije dihaploidnih linija i njihovih pripadajućih F₂ generacija. Prosječna visina stabljike do baze klipa i vrha metlice bila je veća u populacijama biljaka F₂ generacije u odnosu na populacije dihaploidnih linija. Budući da su dihaploidne linije potpuno homozigotne kod njih nema maskiranog djelovanja gena, nego do izražaja dolaze i recesivni geni, a izostaje kodominacija i intermedijarnost te superdominacija. U F₂ generaciji teoretski očekivana heterozigotnost je 50% te je razlika u varijabilnosti i rasponu vrijednosti za svojstva visine vjerojatno rezultat razlika u genetskoj konstituciji populacija.

Raspon srednjih vrijednosti za sva ispitana svojstva klipa bio je veći u populacijama biljaka F₂ generacije u odnosu na odgovarajuće populacije dihaploidnih linija. Pronađene su statistički značajne razlike između srednje vrijednosti sve tri populacije dihaploidnih linija i odgovarajuće F₂ populacije za svojstva duljine i mase klipa, dok je razlika između promjera klipa i broja redova zrna bila statistički značajna samo između populacije Os 2709 i OSSK 5717 F₂.

Provedeno je više istraživanja s ciljem usporedbe konvencionalnih hibrida i hibrida kojima su roditeljske komponente dihaploidne linija. Seitz (2005.) je usporedio vrijednosti testkrižanaca dihaploidnih linija s test križancima konvencionalno razvijenih linija i zaključio da je varijabilnost između njih jednaka. Bordes i sur. (2007.) napravili su usporedbu agronomskih i morfoloških svojstava dihaploidnih i samooplodnih linija

dobivenih iz slučajno odabranih potomstava S_1 populacije u test križanjima te dobili slične srednje vrijednosti populacija za svojstva prinosa zrna, vlage zrna, visine biljke, visine klipa i dužine lista. Wilde i sur. (2010.) su usporedili test križance tri populacije dihaploidnih linija razvijenih iz tri europska varijeteta s elitnim inbred linijama razvijenim iz istog početnog materijala. Križanci dihaploidnih linija imali su 22-26% manji prinos u odnosu na inbred linije, ali se nisu značajno razlikovali od prosjeka test križanaca njihovih roditeljskih varijeteta. Jumbo i sur. (2011.) usporedili su pogodnost dihaploidne metode i tri klasične metode za dobivanje superiornih linija i hibrida iz 3 križanja u GEM (Germplasm Enhancement of Maize) programu. Pokusi s test križancima 50 odabranih linija iz svake kombinacije križanja i metode oplemenjivanja izvedeni su na više lokacija i nisu pokazali razlike između oplemenjivačkih metoda. Beyene i sur. (2011.) su ispitivali u pokusu hibride dobivene križanjem dihaploidnih linija. 15 DH hibrida imalo je viši prinos u odnosu na najbolji komercijalni standard dobiven pedigre metodom, a najbolji DH hibrid imao je 29,5% viši prinos zrna u odnosu na komercijalni standard te su hibridi bili usporedivi sa standardima u svojstvima cvatnje, visine biljaka, visine klipa i osjetljivosti na bolesti, što je potvrđeno kasnijim istraživanjem u kojem su dobili da su u uvjetima stresa izazvanog sušom 15 najprinosnijih dihaploidnih test križanaca imali 1,3-2,2 t/ha viši prinos u odnosu na prosjek komercijalnih standarda (Beyene i sur., 2013.). Odiyo i sur. (2014.) ispitivali su 160 križanaca dihaploidnih linija u pokusima na 4 navodnjavane i 2 sušne lokacije. 20 test križanaca bilo je bolje od komercijalnih hibrida koji su korišteni za standarde u pokusu. Najboljih 10 test križanaca imalo je 16% viši prinos zrna od najboljeg komercijalnog standarda u uvjetima optimalne vlažnosti tla, odnosno 62% viši prinos u uvjetima suše što potvrđuje da je metodom dihaploida moguće dobiti superiorne linije.

Koeficijent varijacije bio je niži u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F_2 generaciju za sva ispitana svojstva osim za interval između polinacije i svilanja, što je relativni pokazatelj manje varijabilnosti ispitanih svojstava kod homozigotnih linija u odnosu na F_2 generaciju. Međutim, to nije pokazatelj stvarnog sužavanja genetske osnove odnosno gubitka pojedinih alela. Do manjeg koeficijenta varijacije moglo je doći zbog načina djelovanja gena koji se razlikuje kod populacija homozigotnih linija, bilo da su u pitanju dihaploidne ili inbred linije, i F_2 generacije koja je visoko heterozigotna. Vrijednosti sume toplinskih jedinica za polinaciju i svilanje u svim su se populacijama pokazale kao najmanje varijabilno svojstvo, dok je relativna varijabilnost intervala između polinacije i svilanja bila znatno veća i kretala se između 34,2% u populaciji OSSK 5717 F_2

i 46,2% u populaciji Os 2709. Velike razlike u relativnoj varijabilnosti između ispitanih populacija pojavile su se za svojstvo mase klipa za koje se koeficijent varijacije kretao između 11,8% u populaciji Os 2703 i 82,1% u populaciji OSSK 5717 F₂.

Općenito, rezultati varijabilnosti dihaploidnih populacija u provedenom istraživanju moraju se uzeti s oprezom budući da su veličine populacija bile male, te ukupna varijacija u trima populacijama nije ni približno poznata. Nadalje, na osnovi rezultata dobivenih mjerenjem vrijednosti agronomskih i morfoloških svojstava ne možemo donijeti zaključak jesu li razlike između dihaploidnih linija i F₂ generacije posljedica razlika u omjeru razdvajanja i/ili frekvenciji rekombinacija.

4.4. Segregacijska distorzija kod dihaploidnih linija

Odstupanja od očekivanog omjera razdvajanja pronađena su u sve tri populacije dihaploidnih linija na svim kromosomima osim na kromosomu 5 u populaciji Os 2702 i kromosomima 4 i 5 u populaciji Os 2709. Udio distorziranih markera po kromosomu razlikovao se između kromosoma, ali i između populacija. Vrlo velik broj distorziranih markera pronađen je na kromosomima 7 i 1 u populaciji Os 2703 i kromosomu 3 u populaciji Os 2702.

Segregacijsku distorziju kod kukuruza proučavalo je više autora (Wendel i sur., 1987., Lashermes i sur., 1988., Gardiner i sur., 1993., Wang i sur., 2012., Xu i sur., 2013.). Bentolila i sur. (1992.) su zapazili značajnu segregacijsku distorziju na 72% RFLP markera kod dihaploidnih linija u odnosu na F₂ linije kod kojih nije bilo markera sa značajnim odstupanjem od očekivanog omjera razdvajanja. Zhang i sur. (2010.) također su uočili da se segregacijska distorzija češće događa kod dihaploida i rekombinantnih inbred linija u odnosu na F₂ populacije. Xu i sur. (2013.) promatrali su segregacijsku distorziju za vrijeme indukcije majčinskih haploida *in vivo* kod kukuruza. Rezultati su pokazali da su selekcija muškog gametofita i zigotna selekcija doprinjele značajnoj distorziji lokusa, nazvanog *sed1* (*segregation distortion 1*), tijekom indukcije haploida.

Na osnovi provedenog istraživanja nije moguće donijeti zaključak je li sam proces indukcije haploida uzrokovao pojavu segregacijske distorzije kod dihaploidnih linija.

4.5. Prisutnost genoma induktora u genomu dihaploidnih linija

Haploidi nastali nakon *in vivo* indukcije u teoriji bi trebali sadržavati samo genom materijala na kojem je napravljena indukcija. Budući da mehanizam formiranja haploidnih zrna nakon *in vivo* indukcije haploida još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, važno je ispitati pojavljuju li se segmenti kromosoma induktora u genomu dihaploidnih linija. Razvijeno je nekoliko hipoteza koje nastoje objasniti ovaj mehanizam, a kao mogući uzrok pojave haploida navode se različite reproduktivne nepravilnosti (Chang, 1992., Eder i Chalyk, 2002., Wędzony i sur., 2002., Chalyk i sur., 2003.).

Segmenti genoma induktora pronađeni su u sve tri populacije dihaploidnih linija. U populaciji Os 2702 31,25% dihaploidnih linija sadržavalo je segmente kromosoma podrijetlom od induktora, dok su ostale linije sadržavale samo genom roditeljskih komponenti hibrida OS 378. U populaciji Os 2703 segmenti kromosoma induktora pronađeni su u vrlo malom postotku u svim dihaploidnim linijama, a u populaciji Os 2709 kod 68,09% dihaploidnih linija. Prosječan broj segmenata kromosoma induktora po kromosomu dihaploidne linije najveći je bio u populaciji Os 2702, dok je najveća prosječna veličina segmenta podrijetlom od induktora zabilježena u populaciji Os 2709, a najmanja u populaciji Os 2703. Nešto više od 2/3 pronađenih segmenata bili su pojedinačni parovi baza. Ovakav rezultat upućuje na pretpostavku da je do eliminacije genoma induktora došlo nakon oplodnje. Budući da je većina dihaploidnih linija bila potpuno homozigotna na lokusima na kojima se induktor razlikovao od oba roditelja, moguće da je eliminacija homolognih parova kromosoma podrijetlom od induktora potpuna, ali da je do eliminacije došlo nakon mitotske rekombinacije u kojoj su se dijelovi kromosoma induktora ugradili u genom dihaploidnih linija. Druga mogućnost je da dolazi do nepotpune eliminacije kromosoma induktora što bi uz homozigotne lokuse podrijetlom od induktora rezultiralo i pojavom heterozigotnih lokusa. Heterozigotni segmenti koji bi mogli ukazivati na nepotpunu eliminaciju genoma induktora pronađeni su kod malog broja linija i mogu biti rezultat kako nepotpune eliminacije, tako i nekontrolirane stranooplodnje u D₀ generaciji, koja je zbog visoke sterilnosti haploida i vrlo male produkcije polena češća kod haploidnih u odnosu na diploidne biljke, onečišćenja materijala prilikom umnažanja dihaploidnih linija i mutacija.

Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s rezultatima više autora. Fischer (2004.) je upotrebom mikrosatelita kod haploida induciranih pomoću induktora RWS kod 1,4% genotipova opazio da sadrže jedan, a ponekad i nekoliko segmenata kromosoma induktora koji zamjenjuju homologne segmente majčinskih kromosoma što ukazuje da bi indukcija haploida mogla biti rezultat eliminacije kromosoma induktora nakon oplodnje. Zang i sur. (2008.) dokazali su da se segmenti kromosoma induktora ugrađuju u genom haploida i dihaploida te također smatraju da je za indukciju haploida odgovorna eliminacija kromosoma. Do sličnih rezultata došli su i Li i sur. (2009.) nakon provedene molekularne analize pomoću SSR markera. Ustanovili su da 43,18% haploida nosi segmente genoma induktora, odnosno da je prosječno 1,84% genoma induktora uneseno u haploide. Zhao i sur. (2013.) ispitali su mehanizam indukcije pomoću induktora koji sadrži citogenetski marker. Marker je opažen u niskoj frekvenciji kod haploida. Većina kromosoma induktora eliminirana je iz embrionalnih stanica haploida tijekom prvog tjedna nakon polinacije. Autori su napravili i analizu induktora, inbred linija i haploida pomoću 50K SNP čipa te pronašli heterozigotni fragment veličine 44 Mb porijeklom od induktora kod haploida što podupire pretpostavku o unošenju očinskih kromosoma u genom haploida te smatraju da se haploidi formiraju nakon selektivne eliminacije kromosoma induktora. Qiu i sur. (2014.) su pronašli segmente kromosoma induktora u 7,37% haploidnih embrija te zabilježili pojavu aneuploidije, miksoploidije i abnormalnih kromosoma u određenom postotku što ukazuje na gubitak kromosoma induktora tijekom mitoze i mejoze, odnosno da potpuna ili djelomična eliminacija kromosoma induktora HZI1 kontrolira *in vivo* indukciju haploida.

4.6. Pogodnost dihaploidne metode dobivanja linija kukuruza za korištenje u oplemenjivanju

Ispitana germplazma kukuruza Poljoprivrednog instituta Osijek pokazala se kao pogodan početni materijal za indukciju haploida pomoću induktora ZMK. Osim što se na osnovi dobre ekspresije markera *R-nj* kod svih ispitanih genotipova može zaključiti da inhibitorski geni nisu prisutni u ispitanoj materijalu, prosječne relativne frekvencije haploida bile su kod svih genotipova dovoljno visoke za uspješnu primjenu metode dihaploida u oplemenjivanju. Ipak, uočeni su i određeni nedostaci same metode. Tako se uspješnost udvostručenja kromosoma kod 11 ispitanih haploidnih populacija statistički značajno razlikovala te je kod populacija Os 2707, Os 2706, Os 2708, Os 2710 i Os 2704 bila relativno niska (8,1%, 9,9%, 11,8%, 12,5% i 13,1%, redom), što ukazuje na potrebu poboljšanja metode udvostručenja kromosoma. Niska frekvencija nicanja i neujednačeno nicanje nakon direktne sjetve haploida u polje također su bitno utjecali na konačan broj dobivenih dihaploidnih linija. Za oba nedostatka rješenje bi moglo biti u djelomičnom kontroliranju uvjeta tijekom najranijih faza rasta haploidnih biljaka. Eder i Chalyk (2002.) su primjenom ove metode udvostručenja kromosoma u plasteniku dobili 30,5% fertilnih biljaka, dok je ista metoda u poljskim uvjetima rezultirala s 11,3% fertilnih haploida. Sjetvom haploida u zaštićenom prostoru, kao što su plastenik ili staklenik, omogućili bi se bolji uvjeti za nicanje i tretiranje kolhicinom u optimalnoj fazi, te smanjio stres uzrokovan vanjskim utjecajima. Iako su navedeni neki nedostaci, dio njih je logističke prirode i moguće ih je relativno lako ukloniti. I dalje ostaje prostor za poboljšanje same metode udvostručenja kromosoma, no i u ovakvom obliku, metoda indukcije haploida *in vivo* pokazala se kao pogodna metoda za dobivanje linija kukuruza.

Nadalje, iako populacija dihaploidnih linija iz određenog izvora predstavlja slučajnu uzorak za većinu svojstava, dihaploidi imaju nekoliko kvantitativno genetičkih i logističkih prednosti u odnosu na inbred linije (Bernardo, 2002., Röber i sur., 2005., Jumbo i sur., 2011., Prasanna i sur., 2012.). Rezultati ispitivanja dihaploidnih linija *per se* u poljskim pokusima ukazali su na postojanje genotipske varijabilnosti u populacijama dihaploidnih linija te da za većinu svojstava u svakoj dihaploidnoj populaciji postoji jedna ili više dihaploidnih linija značajno bolja u odnosu na oba roditelja, što ukazuje na mogućnost selekcije linija poboljšanih u odnosu na roditeljske linije.

Niži koeficijent varijacije zabilježen u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F₂ generaciju za većinu ispitanih svojstava očekivan je zbog načina djelovanja gena koji se razlikuje u populacijama homozigotnih linija, kao što je populacija dihaploidnih linija, i F₂ generaciji koja je visoko heterozigotna te kao takav ne može biti sigurni pokazatelj smanjenja genetske varijabilnosti u dihaploidnim populacijama.

Budući da je najvažniji pokazatelj vrijednosti linije, bez obzira na način dobivanja, njezina kombinacijska sposobnost, odnosno vrijednost u test križanju, pojava segmenata genoma induktora ZMK u genomu dihaploidnih linija u malom postotku ne predstavlja zapreku uspješnoj primjeni dihaploidne metode u oplemenjivanju budući da priroda samih linija ostaje nepromijenjena, odnosno i dalje se radi o potpuno homozigotnim linijama koje su kao takve vrijedan oplemenjivački materijal.

Uzevši sve navedene aspekte u obzir, dihaploidna metoda dobivanja linija kukuruza može se ocijeniti kao pogodna za primjenu u oplemenjivanju.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi provedenog istraživanja moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. Varijabilnost agronomskih i morfoloških svojstava bila je manja u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F_2 generaciju za sva svojstva osim intervala između polinacije i svilanja. Odstupanja od očekivanog omjera razdvajanja utvrđena su u sve tri populacije dihaploidnih linija, osim na kromosomu 5 u populaciji Os 2702 i kromosomima 4 i 5 u populaciji Os 2709. Udio distorziranih markera po kromosomu razlikovao se između kromosoma unutar svake populacije, ali i između populacija dihaploidnih linija.

2. Ispitani genotipovi razlikovali su se po prosječnoj frekvenciji induciranih haploida, međutim prosječne relativne frekvencije haploida kretale su se rasponu karakterističnom za induktor ZMK te su bile usporedive s prosječnim frekvencijama indukcije kod većine modernih induktora haploida. Preciznost ekspresije markera *R-nj* bila je vrlo visoka kod svih ispitanih genotipova te nije bilo statistički značajne razlike između genotipova za točnost markera *R-nj*. Uspješnost udvostručenja kromosoma pomoću otopine kolhicina statistički se značajno razlikovala između ispitanih populacija. Utvrđene su značajne razlike između dihaploidnih linija u tri populacije za sva ispitana svojstva te je bilo moguće izdvojiti linije poboljšane za određeno svojstvo u odnosu na roditeljske inbred linije. Uzevši sve aspekte u obzir, metoda indukcije haploida *in vivo* pokazala se kao pogodna metoda za dobivanje linija kukuruza.

3. Prisutnost segmenata kromosoma induktora ZMK u vrlo niskom postotku utvrđena je kod nešto manje od trećine dihaploidnih linija u populaciji Os 2702, te kod većine, odnosno svih, dihaploidnih linija u populacijama Os 2709 i Os 2703, redom. Najveći dio segmenata podrijetlom od induktora bili su pojedinačni parovi baza, te je većina dihaploidnih linija bila potpuno homozigotna na lokusima na kojima se induktor razlikovao od oba roditelja što upućuje na pretpostavku da je do eliminacije genoma induktora došlo nakon oplodnje. Mali broj heterozigotnih segmenata pronađenih kod nekoliko dihaploidnih linija mogući su rezultat nepotpune eliminacije genoma induktora, ali i nekontrolirane stranooplodnje u D_0 generaciji ili tijekom umnažanja dihaploidnih linija, te mutacija.

6. LITERATURA

1. Adamski, T., Krystkowiak, K., Kuczyńska, A., Mikołajczak, K., Ogrodowicz, P., Ponitka, A., Surma, M., Ślusarkiewicz-Jarzina, A. (2014.): Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 6-13
2. Antoine-Michard, S., Beckert, M. (1997.): Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 203-207
3. Barnabás, B., Obert, B., Kovács, G. (1999.): Colchicine, and efficient genomedoubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Reports* 18: 858-862
4. Barret, P., Brinkmann, M., Beckert, M. (2008.): A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 581-594
5. Beckert, M. (1994.): Advantages and disadvantages of the use of *in vitro/in situ* produced DH maize plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (ed: Bajaj, Y.P.S.). Vol 25. Maize. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 201-213
6. Bender, K. (1963.): Über die Erzeugung und Entstehung dihaploider Pflanzen bei *Solanum tuberosum*. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 50: 141–166
7. Bentolila, S., Hardy, T., Guitton, C., Freyssinet, G. (1992.): Comparative genetic analyses of F₂ plants and anther culture derived plants of maize. *Genome* 35 (4): 575-582
8. Bernardo, R. (2009.): Should maize doubled haploids be induced among F₁ or F₂ plants? *Theoretical and Applied Genetics* 119: 255-262
9. Bernardo, R., Kahler, A.L. (2001.): North American study on essential derivation in maize: inbreds developed without and with selection from F₂ populations. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 986-992
10. Beyene, Y., Mugo, S., Pillay, K., Tefera, T., Ajanga, S., Njoka, S., Karaya, H., Gakunga, J. (2011.): Testcross performance of doubled haploid maize lines derived from tropical adapted backcross populations. *Maydica*. 56 (4): 351-358

11. Beyene, Y., Mugo, S., Semagn, K., Asea, G., Trevisan, W., Tarekegne, A., Tefera, T., Gethi, J., Kiula, B., Gakunga, J., Karaya, H., Chavangi, A. (2013.): Genetic distance among doubled haploid maize lines and their testcross performance under drought stress and non-stress conditions. *Euphytica* 192: 379-392
12. Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E., Bergner, A.D. (1922.): A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55: 646-647
13. Bordes, J., Charmet, G., Dumas de Vault, R., Lapierre, A., Pollacsek, M., Beckert, M., Gallais, A. (2007.): Doubled-haploid versus single-seed descent and S₁-family variation for testcross performance in a maize population. *Euphytica* 154: 41-51
14. Bordes, J., Dumas de Vault, R., Lapierre, A., Pollacsek, M. (1997.): Haplodiploidization of maize (*Zea mays* L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. *Agronomie* 17: 291-297
15. Bouchez, A., Gallais, A. (2000.): Efficiency of the use of doubled-haploids in recurrent selection for combining ability. *Crop Science* 40: 23-29
16. Bradbury, P.J., Zhang, Z., Koon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S. (2007.): TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635
17. Brettell, R.I.S., Thomas, E., Wermicke, W. (1981.): Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica* 26: 101-111
18. Burhman, C.R. (1936.): Differential fertilization in the *Bt-Pr* linkage group of maize. *Journal of the American Society of Agronomy* 28: 968-975
19. Burrows, P.M. (1972.): Expected selection differentials for directional selection. *Biometrics* 28: 1091-1100
20. Castillo, A.M., Cistué, L., Vallés, M.P., Soriano, M. (2009.): Chromosome doubling in monocots. U: *Advances in haploid production in higher plants* (ed: Touraev, A., Forster, B.P., Mohan, J.S.). Springer Science and Business Media B.V., Dordrecht, str. 329-228
21. Chalyk, S.T. (1994.): Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding. *Euphytica* 79: 29-30
22. Chalyk, S.T. (1999.): Use of maternal haploids for improving maize inbred lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 73: 54-56
23. Chalyk, S.T. (2000.): Obtaining fertile pollen in maize maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 74: 17-18

-
24. Chalyk, S.T., Baumann, A., Daniel, G., Eder, J. (2003.): Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 77: 29-30
 25. Chalyk, S.T., Bylich, V.G., Chebotar, O.D. (1994.): Transgressive segregation in the progeny of a cross between two inducers of maize maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 47
 26. Chalyk, S.T., Rotarenco, V. (1999.): Using maternal haploid plants in recurrent selection in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 73: 56-57
 27. Chang, M.T. (1992.): Preferential fertilization induced from Stock 6. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 66: 99-100
 28. Chang, M.T., Coe, E.H. (2009.): Doubled haploids. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement* (eds: Kriz A.L., Larkins A.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 127-142
 29. Chapman, S.C., Edmeades, G.O. (1999.): Selection improves drought tolerance in tropical maize populations: II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Science* 39: 1315-1324
 30. Chase, S.S. (1947.): Techniques for isolating monoploid maize plants. *Journal of Botany* 34: 582
 31. Chase, S.S. (1949.): Monoploid frequencies in a commercial double cross hybrid maize and its component single cross hybrids and inbred lines. *Genetics* 34: 328-332
 32. Chase, S.S. (1951.): The monoploid method of developing inbred lines. *Proceedings of 6th annual hybrid corn industry research conference*: 29-30
 33. Chase, S.S. (1952.): Selection for parthenogenesis and monoploid fertility in maize. *Genetics* 37: 573-574
 34. Chase, S.S. (1963.): Androgenesis – its use for transfer of maize cytoplasm. *Journal of Heredity* 54: 152-158
 35. Chase, S.S. (1969.): Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Botanical Review* 35: 117-167
 36. Chebotar, O.D., Chalyk, S.T. (1996.): The use of maternal haploids for genetic analysis of the number of kernel rows per ear in maize. *Hereditas* 124(2): 173-178

-
37. Chen, J.L., Beversdorf, W.D. (1990.): A comparison of traditional and haploid-derived breeding population of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 51: 59-65
 38. Choo, T.M., Reinbergs, E., Park, S.J. (1982.): Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 61 (3): 215-218
 39. Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C., Shu, K.C., Yin, C.Y., Chu, F.Y. (1975.): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18: 659-668
 40. Coe, E.H. (1959.): A line of maize with high haploid frequency. *American Naturalist* 93: 381-382
 41. Coe, E.H. (1994.): Anthocyanin Genetics. In: *The Maize Handbook* (eds: Freeling, M., Walbot, V.). Springer-Verlag, New York: 279-281
 42. Coe, E.H., Sarkar, K.R. (1964.): The detection of haploids in maize. *Journal of Heredity* 55: 231-233
 43. Dang, N.C., Munsch, M., Aulinger, I., Renlai, W., Stamp, P. (2012.): Inducer line generated double haploid seeds for combined waxy and opaque 2 grain quality in subtropical maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 183: 153-160
 44. Dankov, T., Kruleva, M., Dimitro, B., Krapchev, B. (1997.): Increase the percentage of maternal haploids by effect of herbicide basagran. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 71: 78-79
 45. Deimling, S., Röber, F., Geiger, H.H. (1997.): Methodik und genetik der *in vivo* haploideninduktion bei mais. *Vortr Pflanzenzüchtung* 38: 203-204
 46. Devaux, P., Kilian, A., Kleinhofs, A. (1995.): Comparative mapping of barley genome with male and female recombination-derived, doubled-haploid populations. *Molecular and General Genetics* 249: 600-608
 47. Echt, C.S., Kidwell, K.K., Knapp, S.J., Osborn, T.C., McCoy, T.J. (1994.): Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37: 61-71
 48. Eder, J., Chalyk, S. (2002.): *In vivo* haploid induction in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 703-708
 49. Edmeades, G.O., Bolaños, J., Elings, A., Ribaut, J.-M., Bänziger, M., Westgate, M.E. (2000.): The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. *U:*

-
- M. Westgate, K. Boote, editors, Physiology and Modeling Kernel Set in Maize, CSSA Spec. Publ. 29. CSSA and ASA, Madison, WI. str. 43-73.
50. Eigsti, O.J., Dustin, P. (1955.): Colchicine. In: Agriculture, Medicine, Biology, and Chemistry. Iowa State College Press, Ames, Iowa
 51. Enaleeva, N.K., Tyrnov, V.S., Selivanova, L.P., Zavalishina, A.N. (1996.): Single fertilization and the problem of haploidy induction in maize. Doklady Biological Sciences 353: 225-226
 52. Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. (1996.): Introduction to quantitative genetics. Longman Scientific & Technical, New York
 53. Faris, J.D., Laddomada, B., Gill, B.S. (1998.): Molecular mapping of segregation distortion loci in *Aegilops tauschii*. Genetics 149: 319-327
 54. Fischer, E. (2004.): Molekulargenetische untersuchungen zum vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der *in vivo*-haploiderinduktion bei mais (*Zea mays* L.). PhD dissertation, University of Hohenheim. Grauer Verlag, Stuttgart, Germany
 55. Forster, B.P., Thomas, W.T.B. (2005.): Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: Plant Breed Review (ed: Janick, J.) 25: 57-88
 56. Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J., Touraev, A. (2007.): The resurgence of haploids in higher plants. Trends in Plant Science 12 (8): 368-375
 57. Frisch, M., Melchinger, A.E. (2007.): Variance of the parental genome contribution to inbred lines derived from biparental crosses. Genetics 176 (1): 477-88
 58. Gallais, A. (1990.): Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. Genetics 124: 199-206
 59. Ganal, M.W., Altmann, T., Röder, M.S. (2009.): SNP identification in crop plants. Current Opinion in Plant Biology 12 (2): 211-217
 60. Ganal, M.W., Durstewitz, G., Polley, A., Bérard, A., Buckler, E.S., Charcosset, A., Clarke, J.D., Graner, E.M., Hansen, M., Joets, J., Le Paslier, M.C., McMullen, M.D., Montalent, P., Rose, M., Schön, C.C., Sun, Q., Walter, H., Martin, O.C., Falque, M. (2011.): A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. PLoS ONE 6 (12): e28334. doi:10.1371/journal.pone.0028334
-

-
61. Gardiner, J.M., Ceo, E.H., Melia-Hancock, S., Hoisington, D.A., Chao, S. (1993.): Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F₂ population. *Genetics* 134 (3): 917-930
 62. Gayen, P., Madan, J.K., Kumar, R., Sarkar, K.R. (1994.): Chromosome doubling in haploids through colchicine. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 65
 63. Geiger, H.H. (2009.): Doubled haploids.. In: *Maize Handbook* (eds: Bennetzen, J.L., Hake, S.), Vol 2: Genetics and Genomics. Springer Verlag, Heidelberg, New York, SAD: 641-659
 64. Geiger, H.H., Braun, M.D., Gordillo, G.A., Koch, S., Jesse, J., Krützfeldt, B.A.E. (2006.): Variation for female fertility among haploid maize lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 80: 28-29
 65. Geiger, H.H., Gordillo, G.A. (2009.): Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 485-499
 66. Geiger, H.H., Roux, S.R., Deimling, S. (1994.): Herbicide resistance as a marker in screening for maternal haploids. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 99
 67. Genovesi, A.D., Collins, G.B. (1982.): *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science* 22: 1137-1144
 68. Greenblatt, I.M., Bock, M. (1967.): A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *Journal of Heredity* 58: 9-13
 69. Guiderdoni, E., Glaszmann J.C., Courtois B. (1989.): Segregation of 12 isozyme genes among doubled haploid lines derived from a *japonica* and *indica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 42: 45-53
 70. Han, X., Tang, Q., Cao, M., Rong, T. (2006.): Study on identifying methods of maize haploids induced by Stock 6. *Journal of Maize Science* 14 (1): 64-66
 71. Hansen, N.J.P., Andersen, S.B. (1998.): *In vitro* chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 102: 101-108
 72. Häntzschel, K.R., Weber, G. (2010.): Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241 (1): 99-104
 73. He, P., Li, J.Z., Zheng, X.W., Shen, L.S., Lu, C.F., Chen, Y., Zhu, L.H. (2001.): Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Science* 41: 1240-1246

-
74. Hefing, M. (2010.): Genetic control of flowering traits, yield and its components in maize (*Zea mays* L.) at different sowing dates. *African Journal of Crop Science* 2: 236-249
 75. Jannik, J.L., Abadie, T.E. (1999.): Inbreeding method effects on genetic mean, variance and structure of recurrent selection populations. *Crop Science* 39: 988-997
 76. Jensen, C.J. (1974.): Chromosome doubling techniques in haploids. In: *Proceedings of 1st International Symposium on Haploids in higher plants, advances and potential* (ed: Kasha, K.J.). University of Guelph, Guelph: 153-190
 77. Jones, R.W., Reinot, T., Frei, U.K., Tseng, Y., Lübberstedt, T., McClelland, J.F. (2012.): Selection of haploid maize kernels from hybrid kernels for plant breeding using near-infrared spectroscopy and SIMCA analysis. *Applied Spectroscopy* 66 (4): 447-450
 78. Jumbo, M., Weldekidan, T., Holland, J.B., Hawk, J.A. (2011.): Comparison of conventional, modified single seed descent, and doubled haploid breeding methods for maize inbred line development using germplasm enhancement of maize breeding crosses. *Crop Science* 51: 1534-1543
 79. Kato, A. (2002.): Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. *Plant Breeding* 121: 370-377
 80. Kebede, A.Z., Dhillon, B.S., Schipprack, W., Araus, J.L., Bänziger, M., Semagn, K., Alvarado, K., Melchinger, A.E. (2011.): Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica* 180 (2): 219-226
 81. Kermicle, J.L. (1969.): Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* 166: 1422-1424
 82. Kermicle, J.L. (1971.): Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. *American Journal of Botany* 58: 1-7
 83. Kermicle, J.L. (1994): Indeterminate gametophyte (*ig*): biology and use. In: *The Maize Handbook* (eds: Freeling, M., Walbot, V.), Springer-Verlag, New York, SAD: 388-393
 84. Khalily, M., Moghaddam, M., Kanouni, H., Asheri, E. (2010.): Dissection of drought stress as a grain production constraint of maize in Iran. *Asian Journal of Crop Science* 2(2): 60-69

-
85. Kleiber, D., Prigge, V., Melchinger, A.E., Burkard, F., Vicente, S.V., Palomino, G., Gordillo, G.A. (2012.): Haploid fertility in temperate and tropical maize germplasm. *Crop Science* 52: 623-630
 86. Kowles, R.V., Phillips, R.L. (1985.): DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *PNAS* 82: 7010-7014
 87. Kowles, R.V., Sreenc, F., Phillips, R.L. (1990.): Endoreduplication of nuclear DNA in the developing maize endosperm. *Developmental Genetics* 11: 125-132
 88. Kozumplik, V., Pejić, I. (ur) (2012.): Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu.
 89. Kubba, J., Smith, B.M., Ockendon, D.J., Setter, A.P., Werner, C.P., Kearsley, M.J. (1989.): A comparison of anther culture derived material with single seed descent lines in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Heredity* 63: 89-95
 90. Kumar, S., Gill, B.S., Faris, J.D. (2007.): Identification and characterization of segregation distortion loci along chromosome 5B in tetraploid wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 187-196
 91. Ky, C.L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louern, J., Charrier, A., Hamon, S., Noirot, M. (2000.): Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea sp.*). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 669-676
 92. Lashermes, P., Beckert, M. (1988.): A genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 405-410
 93. Li, L., Xu, X., Jin, W., Chen, S. (2009.): Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta* 230: 367-376
 94. Lin, B.Y. (1981.): Megagametogenetic alternations associated with the indeterminate gametophyte (*igl*) mutant in maize. *Revista Brasileira de Biologia* 41: 557-563
 95. Liu, X., You, J., Guo, L., Liu, X., He, Y., Yuan, J., Liu, G. (2011.): Genetic analysis of segregation distortion of SSR markers in F₂ population of barley. *Journal of Agricultural Science* 3(2): 172-177

-
96. Liu, Z.Z., Song, T.M. (2000.): Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid. *Acta Agronomica Sinica* 26 (6): 947-952
 97. Longley, A.E. (1945.): Abnormal segregation during megasporogenesis in maize. *Genetics* 30: 100-113
 98. Lorieux, M. (2012.): MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding* 30:1231-1235
 99. Lu, H., Romero-Severson, J., Bernardo, R. (2002.): Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 622-628
 100. Lu, M., Xie, C.X., Li, X.H., Hao, Z.F., Li, M.S., Weng, J.F., Zhang, D.G. Bai, L., Zhang, S.H. (2011.): Mapping of quantitative trait loci for kernel row number in maize across seven environments. *Molecular Breeding* 28: 143-152
 101. Mahendru, A., Sarkar, K.R. (2000.): Cytological Analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize (*Zea Mays* L.). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 60: 37-43
 102. Mangelsdorf, P.C., Jones, D.F. (1926.): The expression of Mendelian factors in the gametophyte of maize. *Genetics* 11: 423-455
 103. Marhic, A., Antoine-Michard, S., Bordes, J., Pollacsek, M., Murigneux, A., Beckert, M. (1998.): Genetic improvement of anther culture response in maize: relationships with molecular, Mendelian and agronomic traits. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 520-525
 104. Melchinger, A.E., Longin, C.F., Utz, H.F., Reif, J.C. (2005.): Hybrid maize breeding with doubled haploid lines: quantitative and selection theory for optimum allocation of resources. In: *Proceedings of the 41st Annual Illinois Corn Breeders School*. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana-Champaign, Illinois: 8-21
 105. Mirdita, V., Schipprack, W., Melchinger, A.E. (2014.): Identification of *in vivo*-induced haploid seeds in maize based on oil content. In: *Proceedings of the 50th Annual Illinois Corn Breeders School*. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana-Champaign, Illinois

-
106. Mohammadi, P.P., Moieni, A., Jalali-Javaran, M. (2007.): Colchicine induced embryogenesis and doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.) anther culture. *Iranian Journal of Biotechnology* 5 (3): 140-146
 107. Murigneux, A., Baud, S., Beckert, M. (1993.): Molecular and morphological evaluation of doubled-haploid lines in maize. 2. Comparison with single-seed-descent lines. *Theoretical and Applied Genetics* 87 (1): 278-287
 108. Nanda, D.K., Chase, S.S. (1966.): An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* 6: 213-215
 109. Nogler, G.A. (1984.): Gametophytic apomixis. In: *Embryology of angiosperms.* (ed: Johri, B.M.). Springer, Berlin, Germany: 475–518.
 110. Odiyo, O., Njoroge, K., Chemining'wa, G., Beyene, Y. (2014.): Performance and adaptability of doubled haploid maize testcross hybrids under drought stress and non-stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science* 4(8): 150-158
 111. Orton, T.J., Browers, M.A. (1985.): Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. '*italica*'). *Theoretical and Applied Genetics* 69 (5): 637-643
 112. Ottaviano, E., Sari-Gorla, M., Pe, E. (1982.): Male gametophytic selection in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 63: 249-254
 113. Paterson, A., Lander, E., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., Tanksley, S.D. (1988.): Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 225: 721-726
 114. Pehu, E. (1996.): The current status of knowledge on the cellular biology of potato. *Potato Research* 39: 429–435
 115. Penzar, I., Penzar, B. (2000.): *Agrometeorologija, Školska knjiga, Zagreb*
 116. Pereira, M.G., Lee, M. (1995.): Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theoretical and Applied Genetics* 90 (3-4): 380-388
 117. Pereira, M.G., Lee, M., Bramel-Cox, P., Woodman, W., Doebley, J., Whitkus, R. (1994.): Construction of an RFLP map in shorgum and comparative mapping in maize. *Genome* 37: 236-243

-
118. Pfahler, P.L. (1975.): Factors affecting male transmission in maize (*Zea mays* L.). In: Gamete Competition in Plants and Animals (ed: Mulcahy, D.L.). North Holland, Amsterdam
 119. Pogna, N.E., Marzetti, A. (1977.): Frequency of two tubes in *in vitro* germinated pollen grains. Maize Genetics Cooperation Newslett 51: 44
 120. Pollacsek, M. (1992.): Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. Agronomie, EDP Sciences 12 (3): 247-251
 121. Prasanna, B.M., Chaikam, V., Mahuku, G. (eds) (2012.): Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. CIMMYT, Mexico
 122. Prigge, V., Melchinger, A.E. (2011.): Production of haploids and doubled haploids in maize. U: Plant Cell Culture Protocols (ed: Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo, N.), 3rd edn. Humana Press – Springer Verlag, Totowa, New Jersey.
 123. Prigge, V., S´anchez, C., Dhillon, B.S., Schipprack, W., Araus, J.L., B´anziger, M., Melchinger, A.E. (2011.): Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. Crop Science 51: 1498-1506
 124. Prigge, V., Xu, X., Li, L., Babu, R., Chen, S., Atlin, G.N., Melchinger, A.E. (2012.): New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. Genetics 190: 781-793
 125. Qiu, F., Liang, Y., Li, Y., Liu, Y., Wang, L., Zheng, Y. (2014.): Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid induction in maize. Current Plant Biology 1: 83-90
 126. Raghu, B., Suresh, J., Kumar, S.S., Saidaiah, P. (2011.): Character association and path analysis in maize (*Zea mays* L.). Madras Agricultural Journal 98(1/3): 7-9
 127. Randolph, L.F., Fischer, H.E. (1939.): The occurrence of parthenogenetic diploids in tetraploid maize. In: Proceedings of National Academy of Sciences 25 (4): 161-164
 128. Ravi, M., Chan, S.W.L. (2010.): Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. Nature 464: 615-618
 129. Rhoades, M.M. (1942.): Preferential segregation in maize. Genetics 27: 395-407
 130. Riggs, T.J., Snape, J.W. (1977.): Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. Theoretical and Applied Genetics 49: 111-115

-
131. Röber, F.K. (1999.): Fortpflanzungsbiologische und genetische untersuchungen mit RFLP markern zur *in vivo* haploideninduktion bei mais. PhD dissertation, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany
 132. Röber, F.K., Gordillo, G.A., Geiger, H.H. (2005.): *In vivo* haploid induction in maize - Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275-283
 133. Rotarencu, V. (2000.): Segregation for the marker *ra1* gene in matroclinal haploids of maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 74: 13
 134. Rotarencu, V., Dicu, G., State, D., Fuia, S. (2010.): New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 84: 1-7
 135. Rotarencu, V., Eder, J. (2003.): Possible effect of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 77: 30
 136. Rotarencu, V., Kirtoca, I.H., Jacota, A.G. (2007.): Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 81: 11
 137. Rotarencu, V., Mihailov, M. (2002.): The use of haploid plants for evaluation of population genetic structure. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 76: 11-13
 138. Sarkar, K.R., Coe, E.H. (1966.): A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics* 54: 453-464
 139. Sarkar, K.R., Coe, E.H. (1971.): Origin of parthenogenetic diploids in maize and its implications for the production of homozygous lines. *Crop Science* 11: 543-544
 140. Sarkar, K.R., Pandey, A., Gayen, P., Mandan, J.K., Kumar, R., Sachan, J.K.S. (1994.): Stabilization of high haploid inducer lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 64-65
 141. Scanlon, M.J., Takaes, E.M. (2009.): Kernel biology. In: *Handbook of Maize: Its Biology* (eds: Bennetzen, J.L., Hake, S.). Springer Science and Business Media: 121-143
 142. Schmidt, W. (2003.): Hybridmaizzüchtung bei der KWS SAAT AG. U: Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Gumpenstein, Österreich, 25. – 27. studenog, str. 1-6
 143. Schneerman, M.C., Charbonneau, M., Weber, D.F. (2000.): A survey of *ig* containing materials. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 74: 92-93

-
144. Schnell, F.W. (1983.): Probleme der Elternwahl – Ein Überblick. U: Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter in Gumpenstein, Austria. 22. – 24. studenog. Verlag and Druck der Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft. Gumpenstein, Austria, str. 1-11
 145. Seitz, G. (2005.): The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proceedings of the 41st Annual Illinois Corn Breeders' School. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana-Champaign, Illinois
 146. Setter, T.L. (2012.): Analysis of constituents for phenotyping drought tolerance in crop improvement. *Frontiers in Phisiology* 3: 180
 147. Shatskaya, O.A. (2004.): Increase of induction frequency of matroclinous maize haploids under individual pollinator selection. *Collected articles of Krasnodar Scientific Research Institute of Agriculture – Evolution of Scientific Technology in Plant Growing, Vol 2: 322-331 (na ruskom)*
 148. Shatskaya, O.A. (2010.): Haploinductors isolation in maize: three cycles of selection on high frequency of induction of matroclinal haploids. *Agricultural Biology* 5: 79-86
 149. Shatskaya, O.A., Zabirowa, E.R., Shcherbak, V.S., Chumak, M.V. (1994.): Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 68: 51
 150. Sher, H., Iqbal, M., Khan, K., Yasir, M., Rahman, H. (2012.): Genetic analysis of maturity and flowering characteristics in maize (*Zea mays* L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(8): 621-626
 151. Smith, J.S.C., Hussain, T., Jones, E.S., Graham, G., Podlich, D., Wall, S., Williams, M. (2008.): Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol Breeding* 22: 51-59
 152. Smolkina, Y.V., Tyrnov, V.S. (2003.): Development of haploids of parthenogenetical maize lines in crosses $n \times 2n$ by different pollen delay terms. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 77: 65
 153. Snedecor, G.W., Cochran, W.G. (1989.): *Statistical Methods*, 8th Edition, Iowa State Univerisity Press
 154. Spitkó, T., Sági, L., Marton, L.C., Barnabás, B. (2006.): Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537-542

-
155. Sprague, G.F., Russell, W.A., Penny, L.H. (1960.): Mutations affecting quantitative traits in the selfed progeny of double monoploid maize stocks. *Genetics* 45(7): 855–866
 156. Strigens, A., Schipprack, W., Reif, J.C., Melchinger, A.E. (2013.): Unlocking the genetic diversity of maize landraces with doubled haploids opens new avenues for breeding. *PLoS ONE* 8(2): e57234. doi:10.1371/journal.pone.0057234
 157. Testillano, P., Georgiev, S., Mogensen, H.L., Dumas, C., Risueno, M.C., Matthys-Rochon, E. (2004.): Spontaneous chromosome doubling results from nuclear fusion during *in vitro* maize induced microspore embryogenesis. *Chromosoma* 112: 342-349
 158. Thomson, D.L. (1953.): Combining ability of homozygous diploids of corn relative to lines derived by inbreeding. *Retrospective Theses and Dissertations, Iowa State University, Paper 13040*
 159. Tyrnov, V.S. (1997.): Producing of parthenogenetic forms of maize. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 71: 73
 160. Tyrnov, V.S., Zavalishina, A.N. (1984.): Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 276 (3): 735-738 (na ruskom)
 161. Utz, H.F. (1995.): *PLABSTAT Version M. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Selbstverlag Universität Hohenheim, Stuttgart, Njemačka*
 162. Vančetović, J. (2008.): An impact of environment on segregation ratio of qualitative traits in maize. *Genetika* 40 (2): 145-156
 163. Vanous, A.E. (2011.): Optimization of doubled haploid production in maize (*Zea mays* L.). *Graduate Theses and Dissertations, Iowa State University, Paper 11974*
 164. Wan, Y., Duncan, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F., Widholm, J.M. (1991.): The use of anti-microtubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 205-211
 165. Wan, Y., Petolino, J.F., Widholm, J.M. (1989.): Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 889-892
 166. Wan, Y., Duncan, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F., Widholm, J.M. (1991.): The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 81 (2): 205-211
-

-
167. Wang, G., He, Q.Q., Xu, Z.K., Song, R.T. (2012.): High segregation distortion in maize B73 x teosinte crosses. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 693-706
168. Wędzony M., Röber, F., Geiger, H.H. (2002.): Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: 7th International Congress on Sexual Plant Reproduction. Maria Curie-Skłodowska University Press, Lublin, Poland: 173
169. Wędzony, M., Forster, B.P., Žur, I., Golemiec, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., Gotębiowska, G. (2009.): Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (eds: Touraev, A., Forster, B.P., Jain, S.M.). Springer Science and Business Media: 1-34
170. Wei, J.J., Chen, M.X. (2006.): Primary study on the natural fertility of maize haploids. *Journal of Maize Science* 14 (2): 24-26
171. Wendel, J.F., Edwards, M.D., Stuber, C.W. (1987.): Evidence for multilocus genetic control of preferential fertilization in maize. *Heredity* 58: 297-302
172. Wilde, K., Burger, H., Prigge, V., Presterl, T., Schmidt, W., Ouzunova, M., Geiger, H.H. (2010.): Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding* 129: 181-185
173. Xu, X., Li, L., Dong, X., Jin, W., Melchinger, A.E., Chen, S. (2013.): Gametophytic and zygotic selection leads to segregation distortion through *in vivo* induction of a maternal haploid in maize. *Journal of Experimental Botany* 64 (4): 1083-1096
174. Xu, Y., Zhu, L., Xiao, J., Huang, N., McCouch, S.R. (1997.): Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled-haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 253: 535-545
175. Yamagishi, M., Takeuchi, Y., Tanaka, I., Kono, I., Murai, K., Yano, M. (2010.): Segregation distortion in F₂ and doubled haploid populations of temperate *japonica* rice. *Journal of Genetics* 89: 237-241
176. Yan, J.B., Tang, H., Huang, Y.Q., Zheng, Y.L., Li, J.S. (2003.): Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in maize F₂ population. *Yi Chuan Xue Bao* 30 (10): 913-918
-

-
177. Yousuf, M., Saleem, M. (2001.): Correlation analysis of S1 families of maize for grain yield and its components. *International Journal of Agriculture and Biology* 3(4): 387-388
 178. Zabirova, E.R., Chumak, M.V. (2009.): Use of haploid method for maize lines production. In: *Proceedings of 44rd Croatian and 4rd International Symposium on Agriculture*: 111
 179. Zabirova, E.R., Chumak, M.V., Shatskaya, O.A., Scherbak, V.S. (1996.): Technology of the mass accelerated production of homozygous lines. *Kukuruza i sorgo* 4: 17-19 (na ruskom)
 180. Zabirova, E.R., Shatskaya, O.A. (1999.): Efektivnost metoda gaploidii pri sozdanii elitnih linij kukuruza. U: *Genetika, selekcija i tehnologija vozdelivanija kukuruza, Krasnodar* (na ruskom)
 181. Zaninović, K., Gajić-Čapka, M., Perčec Tadić, M. i sur. (2008.): *Klimatski atlas Hrvatske / Climate atlas of Croatia 1961–1990., 1971–2000*. Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 200 str.
 182. Zhang, L.Y., Wang, S.Q., Li, H.H., Deng, Q.M., Zheng, A.P., Li, S.C., Li, P., Li, Z.L., Wang, J.K. (2010.): Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1071-1082
 183. Zhang, Z., Qiu, F., Liu, Y., Ma, K., Li, Z., Xu, S. (2008.): Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports* 27: 1851-1860
 184. Zhao, X., Xu, X., Xie, H., Chen, S., Jin, W. (2013.): Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiology* 163(2): 721–731
 185. Ziyomo, C., Bernardo, R. (2013.): Drought tolerance in maize: Indirect selection through secondary traits versus genomwide selection. *Crop Science* 53: 1269-127

7. SAŽETAK

U radu je procijenjena pogodnost metode indukcije haploida *in vivo* za uporabu u oplemenjivanju i selekciji kukuruza. Ciljevi istraživanja bili su: 1. utvrditi postojanje razlika u strukturi svojstava i varijabilnosti između dihaploidnih linija i biljaka F₂ generacije, kao i nepravilnosti u omjeru razdvajanja kod dihaploida, 2. ocijeniti pogodnost dihaploidne metode dobivanja linija kukuruza za uporabu u oplemenjivanju kukuruza i 3. ispitati mogućnost prijenosa segmenata genoma induktora u genom haploida tijekom *in vivo* indukcije haploida. Kao početni materijal za indukciju haploida odabrano je 11 jednostrukih hibrida kukuruza koji obuhvaćaju elitnu germplazmu Poljoprivrednog instituta Osijek. Indukcija je napravljena pomoću induktora ZMK, a udvostručenje kromosoma metodom injektiranja otopine kolhicina. Odabrane su 3 populacije haploida i F₂ generacije iz istog početnog materijala za komparativnu analizu. U analizu, na osnovi agronomskih i morfoloških podataka, uključeno je 10 svojstava, a molekularna analiza pomoću SNP markera napravljena je na dihaploidnim linijama iz 3 odabrane populacije, njihovim roditeljskim inbred linijama i induktoru haploida. Ispitani genotipovi razlikovali su se po prosječnoj frekvenciji induciranih haploida, ali su se prosječne relativne frekvencije haploida kretale u rasponu karakterističnom za induktor ZMK te je kod svih ispitanih genotipova preciznost ekspresije markera *R-nj* bila vrlo visoka. Za sva ispitana svojstva utvrđene su značajne razlike između dihaploidnih linija te je bilo moguće izdvojiti linije poboljšane za određeno svojstvo u odnosu na roditeljske inbred linije. Varijabilnost agronomskih i morfoloških svojstava bila je manja u populacijama dihaploidnih linija u odnosu na F₂ generaciju za sva svojstva osim intervala između polinacije i svilanja, dok su odstupanja od očekivanog omjera razdvajanja utvrđena u sve tri populacije dihaploidnih linija, a posebno u populaciji Os 2703. Segmenati kromosoma induktora pronađeni su u vrlo niskom postotku kod većine dihaploidnih linija.

Ključne riječi: kukuruz, *in vivo* indukcija haploida, induktor haploida, dihaploidne linije, F₂ generacija, SNP analiza

8. SUMMARY

Morphological and molecular comparative analysis of doubled haploid and F₂ inbred lines in maize selection

In this study advantages of *in vivo* haploid induction method are estimated for applying in breeding and selection of maize. The main objectives of the study were: 1. to detect if there were differences in structure of traits and variability between doubled haploid lines and F₂ generation plants, as well as irregularities in segregation ratio in doubled haploids, 2. to evaluate suitability of creating maize lines by doubled haploid method for usage in maize breeding and 3. to estimate the possibility of transferring genome segments of inducer to genome of haploids during the *in vivo* haploid induction. As a donor material, we selected 11 single crossed maize hybrids that contained elite germplasm of Agricultural Institute Osijek. The haploid induction was performed by inducer ZMK, and doubling of chromosomes by colchicine injection method. For the comparative analysis, 3 populations of both haploids and F₂ generations were chosen from the same starting material. Based on agronomic and morphologic data, 10 traits were involved in analysis, and molecular analysis using SNP markers was performed on doubled haploid lines from 3 chosen populations, their parental inbred lines and haploid inducer. There were differences among tested genotypes in average frequencies of induced haploids, but average relative frequencies of haploids were in the range which is typical for inducer ZMK, and the accuracy of *R-nj* marker expression was very high in all tested genotypes. For all tested traits, significant differences were found among doubled haploid lines and it was possible to isolate lines improved for specific trait in comparison with parental inbred lines. Variability of agronomic and morphologic traits was lower in doubled haploid lines in comparison with F₂ generation for all traits except for an interval between pollination and silking, while deviations from expected segregation ratio were estimated for all of three populations of doubled haploid lines, particularly for the population Os 2703. Segments of inducer chromosomes were found in a very low percentage, in the most of doubled haploid lines.

Key words: maize, *in vivo* haploid induction, haploid inducer, doubled haploid lines, F₂ generation. SNP analysis.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. rujna 1985. godine u Osijeku. Osnovnu školu te srednju, Isusovačku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti, završila sam u Osijeku. Godine 2004. upisala sam Poljoprivredni fakultet u Osijeku, smjer Ratarstvo, na kojemu sam diplomirala 11. prosinca 2009. godine s temom "Uloga sorte u otpornosti pšenice i ječma prema suši", pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlade Kovačevića, te stekla zvanje diplomiranog inženjera poljoprivrede ratarskog smjera. Sveučilišni poslijediplomski studij „Poljoprivredne znanosti“, smjer „Oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo“ upisala sam 2009./2010. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. Od 13. siječnja 2010. godine zaposlena sam na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku kukuruza Poljoprivrednog instituta Osijek na radnom mjestu stručnog suradnika – tehnologa, a od 1. listopada 2010. godine do danas zaposlena sam na suradničkom radnom mjestu znanstvene novakinje u zvanju asistentice. Tijekom svog dosadašnjeg rada bila sam na kraćem stručnom usavršavanju u Rusiji u tvrtci „Kuban seed“ gdje sam pod vodstvom dr. sc. Elmire Zabirova savladala metodu *in vivo* indukcije haploida kukuruza i udvostručenja kromosoma pomoću kolhicina, te na „Iowa State University“ u Amesu, Sjedinjene Američke Države, gdje sam pod vodstvom prof. dr. sc. Thomasa Lübberstedta i dr. sc. Ursule Frei radila na umnoženju dihaploidnih linija kukuruza umjerenog i tropskog pojasa te sudjelovala na programu oplemenjivanja s ciljem razvoja novog induktora haploida. Godine 2015. završila sam tečaj prof. dr. sc. Rexa Bernarda: „Breeding Plants using Genomics, Phenomics and Agronomics“ na BOKU (University of Natural Resources and Life Sciences) u Beču, a 2016. tečaj „Advancements in Plant Breeding, Trial Design and Analysis“ u organizaciji UC Davis Plant Breeding Academy i Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad. Suradnik sam na istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost „Genetika i fiziologija tolerancije na višestruki stres kod kukuruza“, voditelja doc. dr. sc. Domagoja Šimića, te sam bila uključena u rad na znanstvenom projektu „Stvaranje i poboljšavanje populacija, linija i hibrida kukuruza“, voditelja dr. sc. Ivana Brkića. Sudjelovala sam na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Kao koautor objavila sam dva A1, tri A2 i tri A3 rada. Član sam EUCARPIA-e.