

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
*"Molekularne bioznanosti"***

Sonja Petrović, dipl.ing.

**GENETSKA RAZLIČITOST GERMLAZME
OZIME KRUŠNE PŠENICE
(*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*)**

Doktorski rad

Osijek, 2011.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilište u Dubrovniku
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
*"Molekularne bioznanosti"***

Sonja Petrović, dipl.ing.

**GENETSKA RAZLIČITOST GERMPLAZME
OZIME KRUŠNE PŠENICE
(*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*)**

**Doktorski rad predložen
Sveučilišnome Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne
doktorske studije
zbog stjecanja akademskoga stupnja
doktora molekularnih bioznanosti-modul biologija biljaka**

Osijek, 2011.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Hipoteza i ciljevi i istraživanja	3
2.1. Hipoteza	3
2.2. Ciljevi istraživanja	3
3. Pregled literature	4
3.1. Istraživanja genetske različitosti na temelju agronomsko-morfoloških svojstava	4
3.2. Istraživanja genetske različitosti na temelju sastava skladišnih bjelančevina zrna	6
3.3. Istraživanja varijabilnosti genotipova pšenice na temelju količine i sastava škroba	8
3.4. Istraživanja genetske različitosti na temelju uporabe molekularnih markera	10
3.5. Istraživanja genetske različitosti pomoću kombinacije agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera	13
3.6. Istraživanja postojanja genetske erozije	14
4. Materijal i metode	17
4.1. Biljni materijal	17
4.2. Metode istraživanja	18
4.2.1. Poljski pokus, uzgojne mjere i pedoklimatski uvjeti	18
4.2.1.1. Morfološka svojstva	21
4.2.1.2. Agronomska svojstva	23
4.2.2. Laboratorijski pokus	23
4.2.2.1. Mjerenja količine i sastava bjelančevina i škroba u zrnu pšenice	23
4.2.2.2. Određivanje sastava bjelančevina	23
4.2.2.3. Određivanje sastava škroba	25
4.2.3. Istraživanja genetske različitosti na razini DNA	26
4.2.3.1. Uzgoj klijanaca i izolacija genomska DNA	26
4.2.3.2. Metoda mikrosatelitnih markera	28
4.2.3.3. AFLP metoda	30
4.2.3.4. Elektroforeza	34
4.3. Statistička obrada podataka	35
4.3.1. Statistička obrada kvantitativnih agronomskih podataka	35
4.3.2. Statistička obrada morfoloških podataka	35
4.3.3. Statistička obrada molekularnih podataka	36
4.3.4. Utvrđivanje ispravnosti i podudarnosti matrica	38
5. Rezultati istraživanja	39
5.1. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju agronomskih podataka	39
5.1.1. Varijabilnost visine biljke	39
5.1.2. Varijabilnost broja biljaka po jedinici površine	42
5.1.3. Varijabilnost duljine klasa	45
5.1.4. Varijabilnost broja klasića po klasu	48
5.1.5. Varijabilnost broja zrna po klasu	51
5.1.6. Varijabilnost mase 1000 zrna	54
5.1.7. Varijabilnost hektolitarske mase	57
5.1.8. Varijabilnost uroda zrna	60
5.1.9. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju količine bjelančevina i škroba u zrnu pšenice	64
5.2. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju morfoloških podataka	66

5.3. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju molekularnih podataka	69
5.3.1. Različitost visokomolekularnih podjedinica glutenina pšenice	69
5.3.2. Različitost sadržaja škroba u zrnu pšenice	72
5.3.3. Procjena genetske različitosti na razini DNA	75
5.3.3.1. Procjena i izračun genetske udaljenosti ispitivanih genotipova pomoću mikrosatelita	75
5.3.3.2. Procjena i izračun genetske udaljenosti ispitivanih genotipova pomoću AFLP markera	79
5.4. Analiza molekularne varijance (AMOVA) s obzirom na hrvatske i strane sorte, oplemenjivačke programe te razdoblja priznavanja sorti	82
5.5. Usporedba rezultata provedenih analiza	83
6. Rasprava	84
6.1. Različitost ispitivanih genotipova pšenice na temelju agronomskih svojstava	84
6.2. Različitost na temelju morfoloških podataka	87
6.3. Genetska različitost na temelju molekularnih podataka	89
6.3.1. Genetska različitost visokomolekularnih podjedinica glutenina	89
6.3.2. Genetska različitost na temelju količine amiloze i amilopektina u zrnu	90
6.3.3. Genetska različitost na temelju mikrosatelita i AFLP markera	91
6.3.4. Analiza AMOVA	98
6.3.5. Korelacija između matrica morfoloških i molekularnih podataka	99
7. Zaključak	100
8. Literatura	100
9. Sažetak	117
10. Abstract	118
11. Prilozi	119
11.1. Prilog 1: Tablice LSD vrijednosti za ispitivana agronomska svojstva u vegetacijskoj 2007./2008. i 2008./2009.	119
11.2. Prilog 2: Matrica genetske sličnosti (RT_{ij}) na temelju morfoloških podataka	137
11.3. Prilog 3: Ishodišna matrica umnoženih alela mikrosatelita u parovima baza	140
11.4. Prilog 4: Matrica genetske udaljenosti (d_{ij}) na temelju mikrosatelitnih početnica	143
11.5. Prilog 5: Matrica genetske sličnosti (S_{ij}) na temelju kombinacije AFLP početnica	146
12. Životopis	149

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij *Molekularne bioznanosti*

Doktorski rad

GENETSKA RAZLIČITOST GERMLAZME OZIME KRUŠNE PŠENICE (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*)

SONJA PETROVIĆ

Trg Svetoga Trojstva 3

U radu su istraživana tri načina utvrđivanja genetske različitosti sorata ozime krušne pšenice. Ispitana je genetska različitost na temelju agronomskih podataka, morfoloških svojstava i molekularnih podataka. Ciljevi istraživanja bili su: 1. procijeniti različitost germplazme pšenice pomoću agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera, 2. istražiti postojanje genetske erozije unutar ispitivane germplazme ozime pšenice i 3. ispitati mogućnost korištenja kombinacije agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera u procjeni genetske različitosti u oplemenjivačke svrhe. U istraživanje je uključeno 40 sorata ozime krušne pšenice. Poljski pokus je postavljen po RBD u tri ponavljanja tijekom dvije vegetacijske godine. U analizu je uključeno 10 agronomskih i morfoloških podataka svojstava, analiziran je sastav HMW GS i škroba. Korišteno je 26 mikrosatelita i četiri kombinacije AFLP početnica. SSR i AFLP markeri pokazali su visok stupanj polimorfizma između ispitivanih genotipova te sposobnost razlikovanja vrlo srodnih genotipova. Molekularne metode su se pokazale učinkovitije za utvrđivanje genetske različitosti u odnosu na morfološka i agronomska svojstva.

Ključne riječi: AFLP/agronomska svojstva/genetska različitost/morfološka svojstva/pšenica/SSR

(149 stranica, 3 slika, 73 tablica, 6 grafikona, 161 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europske avenije 24

Mentor: prof.dr.sc. Sonja Marić

Ocjenjivači: prof.dr.sc. Tihana Teklić
prof.dr.sc. Hrvoje Fulgosi
prof.dr.sc. Milutin Bede
dr.sc. Tihomir Čupić

Rad prihvaćen: 02. ožujka 2011.

Rad obranjen: 10. ožujka 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, University Postgraduate
Interdisciplinary Doctoral Study *Molecular biosciences*

Doctoral Thesis

GENETIC DIVERSITY OF WINTER BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*)

SONJA PETROVIĆ

Trg Svetoga Trojstva 3

In this study three methods of genetic diversity estimation in winter wheat varieties were used. Diversity was analyzed based on agronomic and morphologic traits and molecular data. The main objectives of this study were: 1. to estimate genetic diversity of wheat germplasm using agronomic and morphologic traits and molecular markers, 2. to investigate the existence of genetic erosion within tested wheat germplasm, 3. to explore potential utilization of combination of agronomic, morphologic and molecular markers in plant breeding. Field trial was conducted during two vegetation years in three replications according to RBD using 40 winter bread wheat varieties. Ten traits were included in agronomic and morphologic analysis. Composition of HMW GS was evaluated as well as starch composition. For the SSR analysis 26 microsatellite primers were used, and for the AFLP analysis four primer combinations. SSR and AFLP markers showed efficient discrimination power between highly related genotypes. Significant correlation was found between two molecular methods which showed more accurate estimate of genetic diversity than by agronomic and morphologic data.

Key words: AFLP/agronomic traits/genetic diversity/morphologic traits/SSR/wheat

(149 pages, 3 figures, 73 tables, 6 graphs, 161 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Osijek City and University Library, Europske avenije 24

Supervisor: prof.dr.sc. Sonja Marić

Reviewers: prof.dr.sc. Tihana Teklić
izv.prof.dr.sc. Hrvoje Fulgosi
prof.dr.sc. Milutin Bede
dr.sc. Tihomir Čupić

Thesis accepted: March 2nd, 2011

Thesis defended: March 10th, 2011

Želim zahvaliti;

Zahvaljujem svom mentoru **prof.dr.sc. Sonji Marić** na nesebičnoj podršci, ukazanom povjerenju, strpljenju i vremenu koje mi je posvetila dajući mi savjete i smjernice tijekom izrade ovoga doktorskog rada. Hvala na prenesenom znanju i iskustvu koje će i nadalje usmjeravati moj istraživački rad.

Hvala mom **profesoru Milutinu Bedeu** koji me je uveo u svijet pšenice i oplemenjivanja, primio me za asistenta i prenio mi neprocjenjivo praktično znanje koje je bilo neophodno u izradi ovoga doktorskog rada i za daljnji rad u budućnosti.

Hvala **dr. Ildiko Karsai** iz Agricultural Research Institute of Hungarian Academy of Science u čijem sam laboratoriju obavila velik dio ispitivanja te na njenom povjerenju i pomoći.

Hvala **Andrijani Eđed, dipl.ing.** i **dr.sc. Tihomiru Čupiću** na konstruktivnim savjetima i nesebičnoj pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem se Poljoprivrednom institutu u Osijeku, posebno **prof.dr.sc. Georgu Drezneru** na ustupljenim površinama za poljski pokus, potrebnoj agrotehnici te na ustupanju uzoraka i pedigrea, također zahvaljujem **dr.sc. Krešimiru Dvojkoviću** i **dr.sc. Danijeli Horvat** na pomoći.

Zahvaljujem **prof.dr.sc. Tihani Teklić** i **izv.prof.dr.sc. Hrvoju Fulgosiju** na pregledu doktorskoga rada.

Zahvaljujem se **Ivici Ikiću, dipl.ing.** s Bc instituta za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d. Zagreb i **prof. Hermannu Buersmayeru** s IFA Tulln u Austriji na ustupljenim uzorcima.

Zahvaljujem se **prof.dr.sc. Dragi Šubariću** sa Prehrambeno tehnološkog fakulteta u Osijeku na korištenju laboratorija Katedre za ispitivanje ugljikohidrata, također se zahvaljujem **dr.sc. Đurđici Ačkar** i **Danijeli Paulik** na pomoći.

Hvala suradnicama na Katedri za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo **Željki Greger, dipl.ing.**, **Mari Šubarić** i **Mariji Guberac** na pomoći pri terenskom i laboratorijskom radu.

Moja najdublja i najveća zahvalnost na podršci i razumijevanju ide mojoj obitelji kojoj posvećujem ovaj doktorski rad.

Doktorski rad je izrađen u sklopu znanstvenoga projekta Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske „Identifikacija germplazme pšenice SSR markerima“ (079-0268) kojega je voditelj prof.dr.sc. Sonja Marić.

1. UVOD

Genetska različitost može se promatrati kroz varijabilnost unutar nukleotida, gena, kromosoma i cijeloga genoma nekog organizma. Zasniva se na složenim odnosima koji nastaju kroz varijancu između alela na pojedinom genskom lokusu, varijancu alela između nekoliko lokusa, između jedinki unutar populacije i između populacija (Smale, 1997.). Genetska različitost je osnova za daljnje genetsko poboljšanje kultiviranog bilja. Razvoj i očuvanje genetske različitosti omogućava pravilan odabir genetski različitih i divergentnih roditelja te u konačnici formiranje visokoprinosnih i visokokvalitetnih sorata i hibrida. Postojanje takvih divergentnih i genetski različitih roditelja ovisi o širini genetske osnove biljnog materijala. Intenzivna selekcija tijekom 20. stoljeća utjecala je na širinu genetske različitosti kulturnih vrsta. Tako Harlan (1970.) upozorava da genetska erozija zahtijeva hitnu akciju za očuvanjem biljnih genetskih resursa kako bi se osigurala sigurnost hrane u budućnosti. Zadnjih desetak godina provedena su brojna istraživanja genetske različitosti kultiviranog bilja s ciljem utvrđivanja stupnja erozije i gubitka alela uslijed dugogodišnje selekcije u oplemenjivačkim programima zobi (Fu i sur., 2003.), kukuruza (van Heerwaarden i sur., 2009.), soje (Hyten i sur., 2006.) i pšenice (Roussel i sur., 2005.; Hao i sur., 2006.; Balfourier i sur., 2007.). Jedna od posljedica genetske erozije je genetski pomak, koji za posljedicu ima tzv. genetsku ranjivost tj. osjetljivost na abiotske i biotske stresove. Borlaug (2007.) navodi da je oko 90% svjetske proizvodnje pšenice ugroženo pojavom virulentnog tipa hrđe stabljike (*Ug99*), obzirom da se gen *Sr31* (gen za otpornost na crnu žitnu hrđu pšenice, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) nalazi na translokaciji 1B/1R (Jin i sur., 2006.). Rezultati istraživanja genetske različitosti u pšenice su oprečni i dok jedan dio ukazuje na postojanje genetske erozije genoma pšenice (Fu i sur., 2009.), drugi dio nije utvrdio genetsku eroziju, štoviše u nekim oplemenjivačkim programima došlo je čak i do povećanja različitosti (Huang i sur., 2007.; White i sur., 2008.). Bez obzira na oprečne rezultate neophodna je stalna analiza genetske različitosti germplazme pšenice te njen neprestani razvoj. Kriteriji za procjenu genetske različitosti su različiti: morfološki, agronomski, gospodarski, podrijetlo, biokemijski i molekularni. Danas se intenzivno koriste molekularni markeri jer isključuju sve subjektivne procjene, odnosno u velikom broju studija koristi se kombinacija nekoliko kriterija kako bi procjena bila što preciznija (Gupta i sur., 1999.; Marić i sur., 2004.; Schulman, 2007.). U cilju povećanja genetske različitosti velika pažnja posvećuje se i očuvanju biljnih genetskih izvora

svih kultiviranih biljaka pohranjujući ih u banke gena. Mogućnost pretraživanja kroz kolekcije pšenice omogućava iskorištavanje varijabilnosti ove kulturne vrste s ciljem poboljšanja i stvaranja novih sorata koje će biti adaptabilnije na nove klimatske prilike i otpornije na bolesti. Upravo uz pomoć novih tehnologija potrebno je razviti strategiju o izolaciji (čuvanju) agronomsko poželjnih gena u gen bankama koristeći molekularnu populacijsku genetiku i biljni genetski potencijal divljih srodnika modernih sorti (Prada, 2009.). Unatoč dostupnosti velikim kolekcijama germplazme njihovo iskorištenje je ograničeno – učinkovit pristup genetskoj različitosti je još uvijek izazov. Glaszmann i sur. (2010.) podržavaju globalni pristup identifikaciji te predlažu zajednički set referentnog biljnog materijala kako bi bilo moguće pregledati germplazmu koristeći zajedničke resurse unutar znanstvene zajednice (R.E.A.D. – Represent existing diversity – Enter the whole collection – Assess phenotypic variation – Dissect trait-gene associations).

U Republici Hrvatskoj se u zadnjih 10 godina pristupilo analiziranju genetske različitosti i udaljenosti ozime pšenice na razini genomske DNA. Ispitivana je genetska divergentnost domaće germplazme (Marić i sur., 2004.) koristeći morfološka svojstva, podrijetlo i nasumično umnoženu polimorfnu DNA (RAPD-Random Amplified Polymorphic DNA). Provedena je i ocjena genetske različitosti domaće germplazme (Dvojković, 2009.) te usporedba sa stranom germplazmom pomoću mikrosatelitnih markera (SSR-Simple Sequence Repeats). Istraživanja ovoga tipa u Hrvatskoj na domaćoj i stranoj germplazmi pšenice potrebno je intenzivirati u budućnosti, kako bi se omogućio razvoj i izbor germplazme široke genetske varijabilnosti potrebne za stvaranje novih oplemenjivačkih populacija i novih sorata.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Ispitivana germplazma 40 sorti ozime pšenice pokazat će genetsku različitost svojstava te će na temelju toga biti moguće formiranje skupina različitih genotipova koji će činiti osnovu za križanje u novom ciklusu oplemenjivačkih programa.

2.2. Ciljevi istraživanja

1. procijeniti različitost germplazme ispitivanih sorti pšenice pomoću agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera
2. ispitati postojanje genetske erozije unutar germplazme ozime pšenice
3. ispitati mogućnost korištenja kombinacije agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera u cilju procjene genetske različitosti u oplemenjivačke svrhe

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Istraživanja genetske različitosti na temelju agronomsko-morfoloških svojstava

Prvi markeri korišteni u oplemenjivanju su morfološki markeri. Svojstva koja oni bilježe su lako uočljiva te najčešće kvalitativna (npr. boja cvijeta, prisutnost osja, oblik zrna, boja zrna, itd.), a korišteni su u svrhu ocjenjivanja, križanja i kontrole razdvajajućih generacija (Novoselović i sur., 2004.; Dvojković, 2005.) te praćenja oplemenjivačkog napretka tijekom godina (Bede, 1994.; Drezner, 1995.; Denčić i sur., 1997.). Danas se također koriste posebice kao opisni alat u gen bankama, zatim u izradi genskih karata i za lokalizaciju gena. Ocjenjivanje prema morfološkim svojstvima fenotipa opisano je u listama Međunarodnoga udruženja za zaštitu novih sorata bilja (UPOV-International Union for the Protection of new Varieties of Plants), a koriste se za ispitivanje različitosti, ujednačenosti i stabilnosti sorata (DUS-Distinctness, Uniformity and Stability) (Law i sur., 1998.; Jones i sur., 2003.; Rukavina i sur., 2008.).

Ispitivanje genetske različitosti na temelju 15 agronomsko-morfoloških pokazatelja obavili su DeLacy i sur. (2000.) na 465 pojedinačnih klasova krušne pšenice skupljenih na 24 različite lokacije u tri države Meksika. Navode da su podaci vrlo korisni oplemenjivačima i konzervatorima germplazme pšenice.

Jones i sur. (2003.) su evaluirali morfološka svojstva DUS testiranja i rezultate elektroforeze skladišnih bjelančevina zrna pšenice (glijadina i visokomolekularnih podjedinica glutenina (HMW GS)) referentne kolekcije sorata pšenice radi grupiranja podataka i usporedbe novih sorata sa onima u bazi podataka.

Genetski napredak agronomskih svojstava i kvalitete brašna i kruha između 30 tvrdih ozimih pšenica u Nebraski ispitivali su Fufa i sur. (2005.). Odabrali su sorte prema godinama priznavanja i zastupljenosti u proizvodnji od 1874. do 2000. godine. Utvrdili su da moderne sorte imaju veću masu zrna i broj zrna po klasu nego stare te da imaju poželjne gene koji sudjeluju u morfologiji i kontroli produktivnosti klasa. Rezultati su pokazali da genetska dobit za svojstvo uroda statistički opravdana u broju zrna ($r=0,62^{**}$) i u broju zrna po klasu ($r=0,52^{**}$). Suprotno tim rezultatima tijekom godina se u modernih sorata smanjila količina

bjelančevina u brašnu u odnosu na starije sorte, dok se sedimentacijska vrijednost povećala. Zaključuju da se oplemenjivanjem smanjila količina bjelančevina, ali su sorte su ipak zadržale svoju funkcionalnu kvalitetu.

Bede i sur. (2006.) su ispitivali genetsku različitost kombinacije križanja sa dva roditelja i njihovog potomstva. Različitost se ispitivala temeljem morfoloških (DUS) svojstava, agronomskih svojstava te koristeći parametre kvalitete brašna i kruha. U prvoj kombinaciji križanja (Soissons × Mura) najveća morfološka razlika je bila u datumu klasanja, a u potomstvu su dobiveni genotipovi koji su imali raniji datum klasanja od oba roditelja, što su autori pripisali transgresiji ovoga svojstva. S obzirom na ostala svojstva (voštanost prevlake lista zastavičara, zadnjeg internodija i rukavca lista zastavičara) u potomstvu su zamijećena intermedijarnost i parcijalna dominacija. S obzirom na agronomska svojstva i svojstva kvalitete izdvojen je genotip AG 284-04 koji je imao statistički visoko opravdano veći urod zrna u odnosu na oba roditelja, a prema ekstenzografskim i farinografskim pokazateljima je bio bolji od kvalitetnog roditelja (Mure).

De Vita i sur. (2007.) su analizirali oplemenjivački napredak (dobit od selekcije) temeljem različitih faza u oplemenjivačkom procesu. Analizirali su morfološko-fiziološka, agronomska te svojstva kvalitete durum pšenica u 20. stoljeću. U analizi su koristili 14 durum pšenica uzgajanih u Italiji od 1900. do 2000. godine. Poljski pokus trajao je dvije godine. Rezultate su pratili po godinama priznavanja sorata, interakciji s okolinom i agrotehničkim tretmanima. Ističu kako je introgresija *Rht* gena uvelike pridonosi smjeru selekcije sorata s nižom stabljikom, otpornih na polijeganje, te ranozrelih sorata koje su predstavljale osnovu za daljnji oplemenjivački rad. Zabilježili su veliki napredak u povećanju uroda i komponenata uroda te u svojstvima kvalitete zrna.

Opsežno istraživanje različitosti agronomskih svojstava, kvalitete zrna, brašna i kruha (ukupno 35) proveli su Bordes i sur. (2008.) uključivši 372 krušne sorte pšenice podrijetlom iz cijeloga svijeta. Najveći raspon fenotipske različitosti utvrđen je u lokalnim populacijama i starim sortama, znatno manje nego u modernim sortama. Istraživanjem su pokazali da postoji dovoljna varijabilnost u starim sortama i populacijama koje mogu služiti kao donori rijetkih alela eliminiranih modernim oplemenjivanjem. Naglašavaju da ovakva analiza ima veliki praktični značaj u stvaranju novih oplemenjivačkih programa, a uporabom

molekularnih markera istraživanje će se upotpuniti i upotrijebiti u svrhu asocijacijske genetike u oplemenjivanju.

Koristeći varijabilnost osam kvantitativnih svojstava analizirano je 70 lokalnih i egzotičnih genotipova pšenice koji su uzgajani u Pakistanu tijekom 2005./2006. godine. Ali i sur. (2008.) su procijenili razlike između genotipova koristeći genotipske (GCV) i fenotipske (PCV) koeficijente varijacije. Utvrdili su značajne razlike u svim svojstvima i između genotipova. Za svojstva uroda po biljci, broja produktivnih vlati po biljci te produktivnost biljke utvrđeni su vrlo visoki GCV i PCV. Koristeći klaster analizu ispitivani genotipovi svrstani su u četiri skupine. Izdvojili su genotipove iz prve skupine koji imaju vrlo visoki urod te se mogu upotrijebiti kao roditelji u hibridizaciji prilikom stvaranja novih sorata, te druge skupine u kojoj su genotipovi koji se mogu koristiti u svrhu oplemenjivanja na svojstva visine stabljike i mase 1000 zrna.

3.2. Istraživanja genetske različitosti na temelju sastava skladišnih bjelančevina zrna

Skladišne bjelančevine pšenice, posebno glutenini i glijadini su glavne komponente glutena koji je odgovoran za reološka i svojstva kruha u pšeničnog brašna, tj. za kvalitetu pšenice. (Gianibelli i sur., 2002.). Razlike između njih najčešće se utvrđuju putem elektroforeze. Glutenini čine 85% bjelančevina zrna pšenice, sastavljeni su od dvije glavne grupe polipeptidnih lanaca, visokomolekularnih (HMW) i niskomolekularnih (LMW) podjedinica (MacRitchie i Lafiandra, 1997.; Lásztity, 2002.).

Rezultati velikoga broja istraživanja su pokazali da su tri lokusa, koji kodiraju visokomolekularne podjedinice glutenina (HMW GS-High Molecular Weight Glutenin Subunits), vrlo polimorfna te da su bez utjecaja okoline. Najčešće se koriste prilikom razlikovanja i identificiranja sorata pšenice na pekarsku kvalitetu te se primjenjuju u gotovo svim oplemenjivačkim programima pšenice, kako u hrvatskim (Drezner, 1995.; Samobor i sur., 2005.; Horvat i sur., 2008.; Horvat i sur., 2009.) tako i u stranim (Oberforster i Werteker, 1995.; Bedő i sur., 1998.; Denčić, 2006.; Zhang i sur., 2009.). U novije vrijeme kvaliteta pšenice se ispituje u kombinaciji s molekularnim markerima (Gale, 2005.). Yang i sur. (2010.) su utvrdili kompoziciju i količinu HMW i LMW podjedinica glutenina u 224 kineske sorte

pšenice s alelnu specifičnim PCR markerima i metodom natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamid-gel elektroforeze (SDS PAGE-Sodium-dodecil-sulfat-polyacrilamid-gel electrophoresis).

Branlard i sur. (2001.) su evaluirali varijabilnost skladišnih bjelančevina i njihov utjecaj na kvalitetu pšenice. U istraživanje je bilo uključeno ukupno 162 sorte pšenice zastupljene na francuskoj ili europskoj sortnoj listi. Analizirana je alelna kompozicija na 12 glavnih lokusa skladišnih bjelančevina pri čemu su rezultati pokazali da je najveća varijabilnost zabilježena u nekoliko lokusa koji kodiraju bjelančevinu glijadin, a najmanja za lokuse glutenina (*Glu-A1* i *Glu-D3*).

Tohver (2007.) je utvrdio kompozicije visokomolekularnih podjedinica glutenina u 123 ozime i 106 jarih sorata pšenice podrijetlom iz sjeverne i središnje Europe. Na temelju dobivenih vrijednosti složena je baza podataka koja se koristi prilikom identifikacije sorata i kao pomoć oplemenjivačima u poboljšanju kvalitete i ubrzanju procesa selekcije.

Sultana i sur. (2007.) su analizirali 121 krušnu pšenicu i evaluirali varijabilnost alela HMW GS. Klaster analiza svrstala je sorte u 26 skupina. Rezultati su pokazali široku varijabilnost HMW GS na osnovu koje je sastavljena baza podataka.

Li i sur. (2009.) su ispitivali genetsku različitost i doprinos podjedinica glutenina u poboljšanju kvalitete pšenice u Kini. Odredili su kompozicije visoko i nisko molekularnih podjedinica između 390 starih populacija i 225 priznatih sorata koristeći SDS PAGE metodu. Ukupni broj alela bio je veći u starih populacija, ali je genetski disperzijski indeks bio manji nego u priznatih modernih sorata pšenice.

Genetsku varijabilnost skladišnih bjelančevina 119 argentinskih krušnih pšenica (1979.-2007.) ispitivali su Lerner i sur. (2009.). Analizirali su sastav HMW i LMW podjedinica glutenina te glijadina. U 90% ispitivanih sorata identificirane su visokomolekularne podjedinice glutenina koje su odgovorne za dobru kvalitetu brašna i kruha prema Glu1-ocjeni. Srednja vrijednost genetske različitosti (H_e) iznosila je 0,589. Najveća varijabilnost je utvrđena za lokus *Glu-B1*, a najmanja za lokus *Glu-D1*. Zaključili su da lokusi, korišteni u istraživanju, imaju vrlo veliku razlučivost prilikom utvrđivanja genetske različitosti između ispitivanih sorata pšenice.

Koristeći kombinaciju SDS PAGE i visokotlačne tekućinske kromatografije obrnutih faza (RP-HPLC-Reversed phase high-performance liquid chromatography) analize i uporabe molekularnih markera Liang i sur. (2010.) odredili su molekularnu karakterizaciju 273 pšenice CIMMYT-a (Centro de International de Mejoramiento de Maíz y Trigo). Odredili su sastav LMW GS, HMW GS i identificirali gene odgovorne za kvalitetu pšenice. Rezultati su pokazali da navedena germplazma pšenice pokazuje veliku varijabilnost za većinu parametara kvalitete te navode da iako je translokacija 1B/1R povezana s negativnim učinkom na kvalitetu brašna i kruha pšenice, određene *Glu-1/Glu3* alelne kombinacije kompenziraju taj učinak.

Kako bi predvidjeli kvalitetu krušne pšenice Oury i sur. (2010.) su analizirali 130 linija pšenice koje se trenutno koriste u francuskim oplemenjivačkim programima. Biljni materijal je analiziran tijekom dvije vegetacijske godine koristeći sve dostupne tehnološke testove kvalitete brašna, tijesta i kruha te regresijsku analizu. Identificirane su HMW i LMW podjedinice glutenina. Rezultati nisu omogućili zadovoljavajuće predviđanje većine parametara kvalitete uključujući rastezljivost. Jedino se pouzdanim pokazalo predviđanje parametra snage. Spomenuti autori navode da su podaci o gluteninu značajno poboljšali kvalitetu predikcije za modele koji su kao prediktore koristili količinu bjelančevina u zrnu, tvrdoću zrna, Pelchenke test i SDS sedimentaciju.

3.3. Istraživanja varijabilnosti genotipova pšenice na temelju količine i sastava škroba

Škrob je glavni skladišni polisaharid i zauzima najveći dio endosperma. Varijabilnost sastava škroba postoji između i unutar biljnih vrsta kao posljedica genetskih i okolišnih činitelja (Blazek, 2008.). Čine ga dva glukozna polimera, amiloza i amilopektin, koji predstavljaju otprilike 98-99% suhe tvari škrobnih zrnaca. U heksaploidnih pšenica omjer amiloze se kreće od 18 – 35%. Brojna istraživanja navode da je sinteza škroba u pšenici vrlo važna zbog njezine direktne povezanosti s urodom zrna te kvalitetom brašna i kruha (Rahman, 2000.; Burrell, 2003.; Eliason, 2003.). Istraživanja (Regina, 2000.) u smjeru oplemenjivanje pšenica s visokim sadržajem amiloze dovela su do izolacije novih gena koji su uključeni u sintezu škroba povezanih s visokim udjelom amiloze. Hu i sur. (2010.) navode da nedavne kliničke studije ukazuju da je amiloza vrlo važna u smanjenju glikemijskog utjecaja na hranu te da

nerazgranate molekule amiloze pridonose njenoj nutritivnoj vrijednosti. Moguće je izvršiti i klasifikaciju pšenica na meke i tvrde temeljem distribucije zrnaca škroba u zrnu i njihovog oblika (Singletary, 2000.) te odabrati one sorte koje imaju određenu kvalitetu škroba za posebne namjene (Ačkar i sur., 2010.).

Regina (2000.) je ispitivao utjecaj amiloze na funkcionalna i strukturalna svojstva škroba australskih pšenica. Navodi da položaj amiloze u odnosu na amilopektin nije posve razjašnjen, kao i uloga endogenih lipida u škrobu žitarica. Amiloza je glavna odrednica funkcionalnih svojstava i strukture škroba, a amilopektin, kao glavna komponenta škroba, ima značajan utjecaj na tehnološku i nutritivnu kvalitetu škroba.

Utjecaj okoliša na količinu škroba te omjer amiloze i amilopektina u pšenice analizirali su Labuschagne i sur. (2007.). U ispitivanje je uključeno 10 jarih sorata pšenice koje su uzgajane na tri različita područja. Rezultati su pokazali da je količina škroba bila pod značajnim utjecajem okoliša. Sadržaj škroba bio je u negativnoj korelaciji s volumenom kruha, sadržajem vlažnog glutena i sadržajem bjelancevina u brašnu, u sva tri područja. Omjer amiloze i amilopektina bio je konstantan s obzirom na područje uzgoja, ali nije nađena značajna korelacija s kvalitetom brašna i kruha. Zaključuju da izbor sorata i područja uzgoja utječe na količinu škroba te da sorte koje imaju visok sadržaj škroba ne moraju nužno imati i lošu kvalitetu brašna i kruha.

Corcuera i sur. (2007.) su analizirali sastav škroba pet najrasprostranjenijih sorata pšenice u Argentini tijekom tri godine te su ispitivali učinkovitost metoda koje se pri tom koriste. Rezultati su pokazali da se količina škroba kretala od 58% do 59,9%, a statistički opravdane razlike nisu utvrđene niti između godina za svaku sortu niti između sorata, dok su se kvalitativna svojstva škroba razlikovala. Zaključili su da se sadržaj škroba ne može modificirati okolišnim činiteljima jer nisu nađene statistički opravdane razlike tijekom tri godine unutar istoga genotipa.

Singh i sur. (2009.) su istraživali različitost strukture amilopektina te temperaturna i pastozna svojstva škroba Indijskih sorata i linija pšenice. Rezultati su pokazali se sastav amiloze kretao između 22% i 28%. Zaključili su da pastozna svojstva škroba ovise o koncentraciji škroba, omjeru amiloze/amilopektina i prisutnosti lipida koji stvaraju komplekse s amilozom.

Amilopektin pridonosi bubrenju škrobnih zrnaca i stvaranju tijesta, dok amiloza i lipidi inhibiraju taj proces.

3.4. Istraživanja genetske različitosti na temelju uporabe molekularnih markera

Molekularni markeri su korisni u identifikaciju različitosti, samostalno ili u kombinaciji s morfološkim i fiziološkim svojstvima. Molekularnih markera ima mnogo, ne ovise o uzorku i okolišnim činiteljima te omogućavaju identifikaciju u ranom razvojnom stadiju biljke. Jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR-Simple sequence Repats) - SSR markeri ili mikrosateliti su sveprisutni u biljaka (Powell i sur., 1996.), imaju vrlo visok stupanj polimorfizma i mogućnost razlikovanja vrlo srodnih genotipova (Morgante i Olivieri, 1993.; Plaschke i sur., 1995.). Izrađen je i veliki broj mikrosatelitnih mapa pšenice što ukazuje na njihovo često korištenje u genetici i oplemenjivanju pšenice (Röder i sur.,1998.; Stephenson i sur., 1998., Paillard i sur., 2003.; Gao i sur., 2004.; Somers i sur., 2004.).

Koristeći metodu polimorfizma dužine amplificiranih ulomaka (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism) Barrett i sur. (1998.) su procijenili genetsku različitost 54 sorte ozime i jare pšenice sjevernog Pacifika te dvije diploidne sorte. Koristili su 16 AFLP markera koji su proizveli 229 polimorfnih fragmenata. Srednja procjena genetske različitosti (GDE) ozimih pšenica i jarih pšenica je iznosio 0,58, dok je najmanji GDE bio unutar jarih pšenica (0,49). Klaster analiza, analiza glavnih komponenata (Principal Component Analysis - PCA) i analiza molekularne varijance (AMOVA) pokazale su da je genetska različitost između sorata bila hijerarhijska kako su se sorte smještale unutar skupina te prema načina uzgoja. Zaključili su da je AFLP metoda efikasna u pronalaženju genetske različitosti između sorata pšenice.

Kako bi evaluirali genetsku različitost 105 argentinskih sorata pšenice priznatih od 1932. do 1995. godine Manifesto i sur. (2001.) su koristili kombinaciju AFLP markera i mikrosatelita. Utvrdili su da nema statističkih razlika u genetskoj različitosti između privatnih i državnih oplemenjivačkih programa. Prosječna genetska različitost temeljena na mikrosatelitima bila je bila gotovo identična u četiri analizirana razdoblja, dok je genetska različitost temeljena na AFLP markerima potvrdila da nije došlo do smanjenja različitosti tijekom 60 godina, ali su utvrđene statistički visoko opravdane razlike između sorata priznatih 1970. i 1980. godine.

Ahmad (2002.) je analizirao 13 genotipova ozime pšenice sa 43 odabrana mikrosatelita. Otkriveno je 156 alelnih varijanti. PIC vrijednosti kretale su se od 0,10 (gwm264) do 0,89 (gwm471, gwm577). Utvrđen je širok raspon genomske udaljenosti između svih genotipova. Odabrani genotipovi će se koristiti u cilju oplemenjivanja za specifična svojstva i proširenje genetičke osnove.

Khlestkina i sur. (2002.) su koristeći četiri različite metode molekularnih markera: polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (RFPL-Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD, mjesta označenih sekvencama (STS-Sequence Tagged Site) i mikrosatelita mapirali gene pšenice za boju koleoptile (*Rc1*, *Rc2*, *Rc3*), boju glume (*Bg*, *Rg1*) i dlakavost glume (*Hg*). Tražeći potencijalni izvor genetske varijabilnosti u modernim programima oplemenjivanja pšenice u Sibiru Khlestkina i sur. (2004.) u ispitivanje su uvrstili 54 starih i novih sibirskih sorata jare pšenice. Sorte su analizirane setom od 22 mikrosatelita pri čemu je locirano 23 lokusa na 19 kromosoma. Rezultati su pokazali da nije došlo do smanjenja genetske različitosti te da su stare sibirске sorte jare pšenice vrlo vrijedan izvor varijabilnosti u oplemenjivanju pšenice.

McIntosh i sur. (2004.) su uveli jedinstveni način identifikacije žitarica. Koristili su granule-bound starch synthase 1 (GBSS 1) gen očuvan kroz evoluciju i domestikaciju. U ispitivanje su uvrstili rižu, pšenicu, ječam i kukuruz. Metodom pirosekvenciranja dokazali su polimorfizam unutar DNA fragmenata omogućavajući tako identifikaciju na razini vrste. Navode da se navedeni protokol može koristiti i u široj primjeni identifikacije biljnih vrsta i drugih porodica.

Roussel i sur. (2004.) su evaluirali molekularnu različitost 559 francuskih krušnih sorata pšenice, koje su uključivale stare populacije i priznate sorte uzgajane u razdoblju od 1800. do 2000. godine. Koristili su set od 41 mikrosatelita. Rezultati su pokazali smanjenje za 25% u broju alela prije i poslije 1970. godine. Isti autori (Roussel i sur. 2005.) su nastavili svoje istraživanje uključivši sorte pšenice podrijetlom iz 15 europskih zemalja. Uzorak se sastojao od 480 krušnih pšenica registriranih u razdoblju od 1840. do 2000. godine. Rezultati klaster analize 15 geografskih regija su razdvojeni u dvije skupine, a broj alela u odnosu na geografsko podrijetlo je najveći u španjolskih i portugalskih sorata, a najmanji u francuskih sorata pšenice.

You i sur. (2004) su procijenili minimalni broj mikrosatelitnih lokusa koji su potrebni za utvrđivanje genetske povezanosti sorata pšenice. Odabrali su 33 moderne sorte i 63 lokalne populacije. Koristili su 104 para mikrosatelitnih početnica. Veća genetska različitost je utvrđena u lokalnih populacija nego u modernih sorata, a najveće razlike su između te dvije skupine zabilježene su u D genomu. Rezultati su pokazali su dovoljna 73 polimorfna lokusa za prikaz genetske povezanosti između ispitivanih sorata sa 90% sigurnošću.

Jedno od najpsežnijih istraživanja genetske različitosti pšenice izveli su Chenyang i sur. (2006.) uvrstivši u istraživanje 1680 sorata kineske kolekcije pšenica u posljednjih 50 godina. Kolekcija je analizirana sa 78 mikrosatelita pri čemu je proizvedeno 1366 alela, od kojih je 1253 povezano sa 71 lokusom. Od 21 para kromosoma pšenice 7A, 3B i 2D pokazali su najveću različitost, dok su kromosomi 2A, 1B, 4D, 5D i 1D imali najmanju. Rezultati su također pokazali da je najveća udaljenost i različitost bila u 50-im godinama, dok je od 1960. utvrđeno postepeno smanjivanje. Autori zaključuju da genetička baza modernih sorata postaje sve uža te da bi njihovi rezultati trebali privući veću pažnju oplemenjivača.

Banayi i sur. (2006.) su analizirali 96 sorata pšenice priznatih u Mađarskoj koristeći 15 mikrosatelitnih markera pšenice na različitim krakovima kromosoma. Dobivena su 94 alela. Većina je sorata bila homozigotna na sve mikrosatelitne lokuse, osim 11 sorata koje su pokazale heterozigotnost na šest lokusa. Najveći stupanj heterozigotnosti imao je gwm312 (4,4%). Procijenili su da je potrebno samo osam mikrosatelita kako bi se uspješno mogle razlikovati 83 sorte. Mikrosateliti pokazuju visoki stupanj polimorfizma i mogu se efikasno koristiti prilikom identifikacije sorata.

Stępien i sur. (2007.) su utvrdili genetsku različitost 53 poljske ozime i jare pšenice koristeći 24 mikrosatelita. Proizvedeno je ukupno 166 alela (od tri do 13 alela po lokusu). Odabrali su četiri visokopolimorfna mikrosatelita (gwm186, gwm389, gwm459 i gwm577) koji su bili dovoljni za utvrđivanje različitosti između svih ispitivanih genotipova pšenice.

Ukupno 60 sorata ozime pšenice (HRWW-hard red winter wheat) priznate od 1900. do 2005. godine su korištene u istraživanju Prasad i sur. (2009.). Sorte su grupirane u šest dekadskih razdoblja na temelju godine priznavanja, zatim u osam različitih klasa na temelju različitih oplemenjivačkih programa tvrtki i pedigrea. Genetska različitost sorata ozime pšenice procijenjena je pomoću 62 para mikrosatelitnih markera. Utvrđen je ukupno 341 polimorfni

alel. Genska različitost varirala je od 0,03 za marker WMC477 do 0,86 za marker WMC707. Procijenjena genetska različitost iznosila je 0,62. Najveću srednja vrijednost broja alela (4,79), genetske različitosti (0,60) i PIC (0,63) su utvrdili za sorte priznate 1990-ih godina.

3.5. Istraživanja genetske različitosti pomoću kombinacije agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera

Kako bi se što učinkovitije odredila genetska različitost pšenice, najčešće se koristi kombinacija agronomsko-morfoloških svojstava sa molekularnim markerima. Tako su Law i sur. (1998.) ispitali mogućnost korištenja AFLP markera kako bi proizveli DNA profile za 55 sorata pšenice koje se uzgajaju na području Velike Britanije u posljednjih 60 godina. Dobivene rezultate usporedili su sa 14 morfoloških svojstava (prema UPOV-u). Kriterij različitosti zadovoljen je većim brojem polimorfnih fragmenata u odnosu na ocjenu danu DUS testom.

Kobiljski i sur. (2002.) su evaluirali ukupno 710 genotipova pšenice podrijetlom iz 38 zemalja (1993.-2000.). Bilježili su ukupno 54 agronomskih, morfoloških i fizioloških svojstava na polju i u kontroliranim uvjetima. Temeljem dobivenih rezultata odabrali su 96 genotipova s najvećom fenotipskom varijabilnošću. Koristili su set od 36 mikrosatelita koji su pokrili sva tri genoma i svih 42 kromosoma pšenice. Nađeno je 46 lokusa i 366 alela. Premali broj lokusa objašnjavaju zahtjevnom i kompleksnom statističkom obradom alela danog mikrosatelita koji se nije distribuirao među genotipovima i nedovoljnim brojem markera koji su trebali pokriti genom dug 3000 cM. Utvrdili su vrlo značajnu povezanost dvaju važnih svojstava - visine stabljike i ranozrelosti.

Cooke i Reeves (2003.) su razmotrili mogućnost uključivanja molekularnih markera u sam proces priznavanja novih sorata kulturnog bilja. Navode da je DUS i VCU ispitivanje i testiranje vrlo efikasno, ali da potencijalna korist od biokemijskih i molekularnih markera može pospješiti i ubrzati sam proces, a pored toga i dodatno zaštititi prava oplemenjivača. Ispitivanjem nekoliko potencijalnih markera (npr.WMS408) koji bi bili idealni prilikom DUS testa, zaključuju da bi se upotrebom mapiranih markera postigla dodatna korist u potvrdi agronomski značajnih svojstava u organskoj, „low input“ ili samoodrživoj proizvodnji.

Vieira i sur. (2007.) su kombinirali morfološke i molekularne markere kako bi procijenili genetsku udaljenost između genotipova pšenice i utvrdili povezanost između te dvije metode. Koristili su 19 genotipova ozime pšenice, 229 AFLP markera i 17 morfoloških svojstava. Zaključili su da kombinirana analiza nije efikasna i da bi se rezultati trebali promatrati odvojeno.

Noli i sur. (2008.) su uspoređivali morfološki i molekularni pristup koji se koristi prilikom registracije durum sorata pšenice pomoću mikrosatelita i AFLP markera u cilju njihove uporabe prilikom procjene različitosti. Koristili su 96 eksperimentalnih linija dobivenih od četiri kombinacije križanja, dva povratna križanja, uključujući i njihove roditeljske linije. Fenotipska karakterizacija procijenjena je pomoću 17 svojstava prema CPVO (Community Plant Variety Office) pravilniku, dok je genotipska izvršena pomoću 98 mikrosatelitnih markera i sedam kombinacija AFLP markera. Navode da se molekularni markeri trebaju koristiti kao komplementarni alat u utvrđivanju različitosti te da je set od 28 mikrosatelita (jedan po kromosomskom kraku) dovoljan za „pre-screening“ u identifikaciji jedinki koje se razlikuju na molekularnoj razini (≥ 13 polimorfizama). Time bi se smanjili troškovi testiranja genotipova na poljskim pokusima.

3.6. Istraživanja postojanja genetske erozije

Već duže vrijeme vlada zabrinutost da moderno oplemenjivanje bilja dovodi do smanjenja genetske različitosti kulturnog bilja. Velika pažnja posvećuje se očuvanju postojećih izvora varijabilnosti kulturnog bilja. Kultivirani genotipovi su direktan rezultat akumulacije povoljnih alela na mjestima gena, ključnih za kontrolu agronomski važnih svojstava, ali uzimajući u obzir velik broj lokusa koji sudjeluju u ekspresiji fenotipa takvih svojstava, malo je vjerojatno da moderni genotipovi u sebi sadrže one povoljne varijante svih alela za sva agronomska svojstva (Tanksley i McCouch, 1997.).

Moderne sorte su uniformnije od lokalnih populacija, a velike površine zasijane samo jednom sortom su potencijalno opasne zbog preosjetljivosti na štetnike i bolesti (Tripp i van der Heide, 1996.). Domestikacija također pridonosi tzv. "*bottleneck*" efektu u mnogih kulturnih biljaka (Reif i sur., 2005.). Haudry i sur. (2007.) su otkrili je domestikacija uzrokovala veliko smanjenje nukleotidne različitosti pšenice. Tako se najveći "*bottleneck*"

efekat javio u evoluciji durum pšenice. Osim na pšenici istraživanja su obavljena i na velikom broju kulturog bilja, zobi (Fu i sur., 2003.), kukuruzu (van Heerwaarden i sur., 2009.) i soji (Hayten i sur., 2006.).

Khlestkina i sur. (2004.) su koristeći mikrosatelitne markere analizirali 252 primke pšenice podrijetlom iz Austrije, Albanije, Indije i Nepala. Biljni materijal je sakupljen između 1920. i 1940. te ponovo između 1970. i 1990. godine. Ispitali su stabilnost ili gubitak genetske različitosti. Rezultati su pokazali da su otprilike dvije trećine alela zajedničkih u oba perioda, dok je jedna trećina prezentirana specifičnim alelima. Navode da podaci upućuju na to da se navedeni protok alela dogodio tijekom adaptacije tradicionalne prema modernoj poljoprivredi te da genetička različitost nije značajno dovedena u pitanje.

Donini i sur. (2005.) su ispitali utjecaj oplemenjivanja na genetsku različitost i eroziju krušne pšenice. U ispitivanje su uvrstili 55 starih i novih britanskih sorata krušne pšenice koristeći pritom 12 mikrosatelita i 14 DUS parametara. Sorte su podijelili u tri zasebna razdoblja i odredili alelne konstitucije za svako pojedino razdoblje. Rezultati su pokazali da iako se vidi pomak u frekvenciji alela niti jedan lokus nije pokazao neto gubitak u odnosu na ukupni broj alela između 1930-ih i 1990-ih godina. Nastale promjene pripisuju dinamičnom sustavu i toku alela tijekom domestikacije i oplemenjivanja, prilikom čega su neki aleli izgubljeni dok su neki novi uneseni u nove sorte. Mišljenja su da je tijekom zadnje dvije dekade 20. stoljeća zapravo došlo do povećanja različitosti.

Martos i sur. (2005.) su odredili filogenetsku povezanost 24 sorata durum pšenice koristeći AFLP markere. Utvrdili su visoku sličnost između starih španjolskih sortaa i kolekcije talijanskih sorata. Paralelno su ispitali pojavu genetske erozije uzrokovane modernim oplemenjivanjem, zaključili su da je, ako se uzmu u obzir sva razdoblja ispitivanja, sveukupna genetska različitost ostala nedirnuta.

Warbourton i sur. (2006.) su proveli istraživanja uvođenja divljih srodnika u oplemenjivanje krušne pšenice kako bi obnovili genetsku različitost. Navode uporabu divljih srodnika, materijala iz drugih oplemenjivačkih programa i sintetske pšenice u proširenju genetske osnove običnih krušnih pšenica. Koristeći mikrosatelite rezultati su pokazali da se udaljenost između nedavno stvorenih oplemenjivačkih linija CIMMYT-a i sorata pšenice iz razdoblja zelene revolucije nije značajno razlikovala od starih populacija. Zaključuju da se urod,

otpornost na abiotske stresove i kvaliteta nastavljaju povećavati ukazujući na to da zelena revolucija traje i danas.

Huang i sur. (2007.) su ispitivali genetsku eroziju zbog uporabe intenzivnih i modernih metoda oplemenjivanja pšenice. U istraživanje su uvrstili kolekciju od 511 široko rasprostranjenih i korištenih sorata pšenice sjeverne i središnje Europe od 1940. do 2000. godine. Koristili su 42 mikrosatelita pšenice. Rezultati pokazuju više kvalitativni nego kvantitativni pomak u različitosti. Promjene su se odnosile na kompoziciju i pojavljivanje alela, a ne u broju alela. Zaključuju da bez obzira što nije dokazana erozija u genetičkom poolu europskih pšenica, koncept unošenja neadaptiranih i divljih germplazmi treba biti uključen u svaki oplemenjivački program.

Fu i sur. (2009.) su proveli opsežno istraživanje različitosti 75 jarih sorata pšenice priznatih od 1845. do 2004. godine. Koristili su 320 mikrosatelita koji su pokrili cijeli genom pšenice. Identificirano je 2280 alela. Rezultati su pokazali da se redukcija alela dogodila gotovo u svakom dijelu genoma pšenice. Značajno smanjenje alela započelo je 1930-ih godina. Ukupno smanjenje alela iznosilo je 17%. Zaključuju da njihovi podaci dokazuju smanjenje genetske divergentnosti uzrokovano modernim oplemenjivanjem kanadskih pšenica. Ovakvo istraživanje nastavak je prethodnih istraživanja Fu i sur. (2006.) na genetskoj različitosti jare pšenice.

Genetsku različitost i smanjenje alelnog polimorfizma ispitivali su Ganeva i sur. (2010.). U ispitivanje su uključili 136 sorata durum pšenice i 14 polimorfni mikrosatelita. Rezultati su pokazali manju različitost u prirodnih populacija u odnosu na glavne centre domestikacije pšenice. Oplemenjivanje je prouzročilo značajno smanjenje alelnog polimorfizma, nestanak rijetkih alela i povećanje broja učestalih alela te frekvenciju dominantnih alela.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Biljni materijal

U istraživanje je uključeno 40 sorata heksaploidne krušne pšenice (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*). Odabir sorata obavljen je prema godini priznavanja u Republici Hrvatskoj, zastupljenosti u proizvodnji i području uzgoja (Tablica 1.a i 1.b).

Tablica 1.a Podrijetlo i godina priznavanja sorata ozime pšenice

Br.	Sorta	Godina	Podrijetlo	Pedigre
1.	U1	1936.	PIO	Carlotta strampeli/Marquis
2.	Bezostaja	1963.	Bivši SSSR	Skorospelka 2/Lutescens 17
3.	Libellula	1965.	Italija	Tevere/Giuliani//San Pastore
4.	Zlatna	1971.	Bc institut	Zg 414-57/Leonardo
5.	Osječka	1976.	PIO	Libellula/Bezostaja
6.	Osječka	1978.	PIO	Osk. 6.9-1-64/V-188-M
7.	Sana	1983.	Bc institut	Mura/CI 14123//Zg 2413-72
8.	Slavonija	1984.	PIO	Osječka 20/Osk.4.216-2-76
9.	Žitarka	1985.	PIO	Osk. 6.30-20/Slavonka/3/Eph. M68/Osk. 154-19/Kavkaz
10.	Soissons	1987.	Francuska	Iena/HN 35
11.	Adriana	1988.	Bc institut	ZG 1758-70/TpR-349
12.	Srpanjka	1989.	PIO	Osk. 4.50-1-77/Zg 2696
13.	Demetra	1991.	PIO	Osk. 4.216-2-76/Zg 2877-74
14.	BC Patria	1994.	Bc institut	Odesskaya-51/ZG-IPK-8210 /2/ GK-32-82
15.	Divana	1995.	Jošt	Favorit/5/Cipriz/4/J.Kwang/2/Atlas66/Comanc./3/Velvet
16.	Barbara	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
17.	Ludwig	1997.	Austrija	Ares/Farmer
18.	Super	1997.	PIO	GO 3135/Žitarka
19.	Golubica	1998.	PIO	Slavonija/Gemini
20.	Edison	2001.	Austrija	Agron/Regent//Capo

U Hrvatskoj je kreirana 31 sorta, od kojih su 25 Poljoprivrednog instituta iz Osijeka (PIO), pet sorata Bc instituta i jedna sorta oplemenjivačke kuće Jošt sjeme-istraživanja d.o.o., Križevci. U ispitivanje su uključene i sorte koje služe kao standardi pri priznavanju novih sorata ozime pšenice (Žitarka, Sana i Divana). Devet sorata su stranog podrijetla, od kojih je četiri sorte ustupio PIO, a pet sorata prof.dr. Hermann Buerstmayra sa IFA Tulln, Austrija.

Tablica 1.b Podrijetlo i godina priznavanja sorata ozime pšenice

Br.	Sorta	Godina	Podrijetlo	Pedigre
21.	Lucija	2001.	PIO	Srpanjka/Kutjevčanka
22.	Bastide	2002.	Francuska	Fertil / Arche
23.	BC Elvira	2002.	Bc institut	Bc 2377-79/MV-C2-33//Irena
24.	Alka	2003.	PIO	Osk. 5.140-22-91/Sana
25.	Antonius	2003.	Austrija	Pokal/Karat//Ekspert/Severin
26.	Janica	2003.	PIO	Osk. 5.36-9-91/Srpanjka
27.	Valerius	2003.	Austrija	Carolus//Monopol/Karat// Ekspert/Severin
28.	Eurofit	2005.	Austrija	Pegassos/Kontrasst
29.	Renata	2006.	PIO	Žitarka /2/Osk.7.5-4-82/KB160-86/3/Srpanjka
30.	Aida	2006.	PIO	Srpanjka/Rialto
31.	Pipi	2006.	PIO	Soissons/Osk. 6.83-5-91
32.	Katarina	2006.	PIO	Osk.5.B.4-1-94/Osk. 5.140-22-91
33.	Seka	2006.	PIO	Srpanjka/Demetra
34.	Lela	2006.	PIO	Srpanjka/Osk. 5.136-8-90
35.	Ilirija	2008.	PIO	Osk.14.294-16-95/Soissons
36.	Felix	2008.	PIO	Srpanjka/K160/86
37.	Zlata	2008.	PIO	Srpanjka/Demetra
38.	Andelka	2008.	PIO	Srpanjka/Demetra
39.	Mihaela	2008.	PIO	Srpanjka/Osk. 5.136-11-90
40.	Ružica	2008.	PIO	Osk. 5.36-9-91/Srpanjka//Brea

4.2. Metode istraživanja

4.2.1. Poljski pokus, uzgojne mjere i pedoklimatski uvjeti

Sve navedene sorte uključene su u poljski pokus na pokusnom polju Poljoprivrednoga instituta u Osijeku. Prema Romić i sur. (2006.) tip tla je humofluvisol černo zemni, srednje duboko oglejeni, nekarbonatan, praškasto glinasto ilovast, a kemijski sastav tla je bio sljedeći: pH 6,24/1M KCl, humus 2,73%, N 0,13%, 16,39 mg P₂O₅/100g tla, 32,41 mg K₂O/100 mg tla. Sorte su posijane po slučajnom blok rasporedu u tri ponavljanja s veličinom obračunske parcele od 6,5 m². Opažanja i mjerenja obavljena su tijekom dvije vegetacijske godine (2007./2008. i 2008./2009.).

Predkultura prve vegetacijske godine je bio kukuruz, a osnovna gnojidba obavljena je sa 50 kg/ha uree (46%N) i 150 kg/ha NPK 7:20:30. Startna gnojidba obavljena je sa 150 kg/ha NPK 7:20:30 prije sjetva 19.10.2007. Tijekom vegetacije obavljena je jedna prihrana 19.02.2008. sa 125 kg/ha KAN (27%N). Zaštita biljnog materijala obavljena je herbicidom Hussar 0,1 l/ha

(u fazi drugoga koljenca) i insekticidom Decis 0,3 l/ha 15.03.2008. radi suzbijanja žitnog balca (*Oulema* sp.) i lisnih uši (*Aphididae*). Žetva pokusnih parcela izvršena je 02.07.2008. godine kada je usjev bio u fazi pune zriobe.

Predkultura druge vegetacijske godine je bila soja, a osnovna gnojidba je obavljena sa 50 kg/ha uree (46%N) i 200 kg/ha NPK 7:20:30. Startna gnojidba obavljena je 200 kg/ha NPK 7:20:30 prije sjetve 31.10.2008. godine. Tijekom vegetacije obavljene su dvije prihrane, prva 24.02.2009. sa 130 kg/ha KAN (27%N), a druga 22.03.2009. sa 20 kg/ha KAN-a. Zaštita biljnog materijala obavljena je herbicidom Tena 1,5 kg/ha (u fazi dva do tri lista) i insekticidom Zagor 1 l/ha 15.03.2008. godine protiv lisnih uši (*Aphididae*). Žetva pokusnih parcela izvršena je 12.07.2009. godine kada je usjev bio u fazi pune zriobe.

Prema Köppenovoj klasifikaciji klime (Penzar i Penzar, 2000.) na području Osijeka, prevladava umjereno topla kišna klima označen formulom Cfb. Srednja temperatura najhladnijeg mjeseca u godini je između -3 i -18 °C, bez izrazito suhog razdoblja ili s karakterističnom zimskom suhoćom, dok je srednja temperatura najtoplijeg mjeseca u godini je najčešće viša od 10, a niža od 22 °C te uz mnogo kiše početkom ljeta, a u kasnom ljetu sa malo oborina. Klimatski podaci o srednjim mjesečnim temperaturama i oborinama za razdoblje od rujna 2007. do srpnja 2009. dobiveni su iz Meteorološke postaje Osijek.

Tablica 2. Srednje mjesečne temperature zraka (°C) i mjesečne količine oborina (mm) u Osijeku za prvu godinu pokusa (2007./2008.) te višegodišnji prosjek (1961.-2000.)

		Srednja mjesečna temperatura zraka u °C		Količina oborina po mjesecima u mm	
		Prosjek	1961./2000.	Prosjek	1961./2000.
2007.	Rujan	14,8	16,6	71,2	51,8
	Listopad	10,8	11,2	97,7	48,3
	Studeni	4,0	5,4	100,7	60,7
	Prosinac	0,1	0,9	42	54,4
2008.	Siječanj	1,4	-1,2	33,9	45,2
	Veljača	6,0	1,6	3,8	37,8
	Ožujak	7,8	6,1	76,1	42,2
	Travanj	12,6	11,3	50,6	54,1
	Svibanj	19,3	16,5	114,5	58,9
	Lipanj	22,0	19,4	88,9	83,5
	Srpanj	22,8	21,1	70,1	66,6

U prvoj godini poljskoga pokusa tijekom vegetacije pšenice prosječne srednje mjesečne temperature zraka nisu odstupale od višegodišnjega prosjeka (Tablica 2). dok su u siječnju i veljači te svibnju i lipnju 2008. bile više za 2 do 3°C.

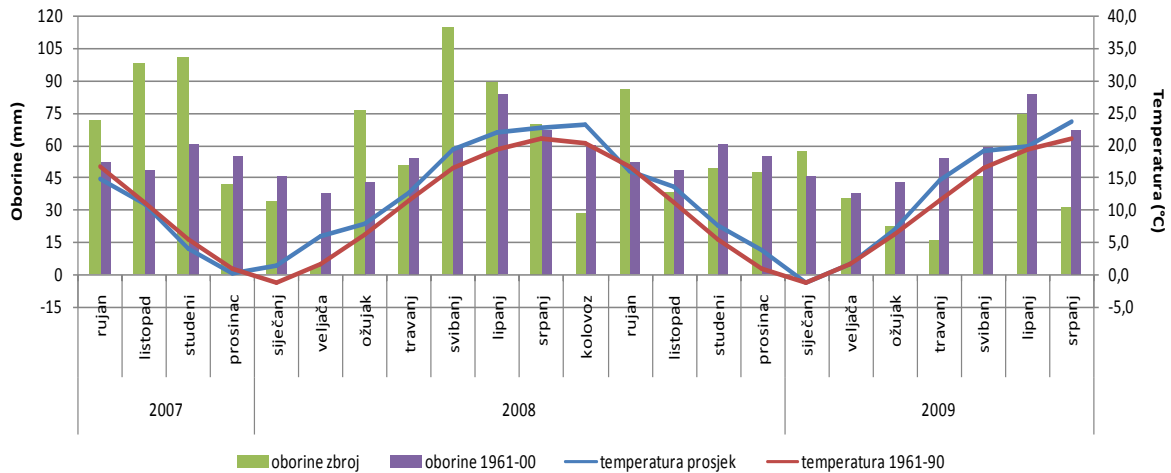
Tablica 3. Srednje mjesečne temperature zraka (°C) i mjesečne količine oborina (mm) u Osijeku za drugu godinu pokusa (2008./2009.) i višegodišnji prosjek (1961.-2000.)

		Srednja mjesečna temperatura zraka u °C		Količina oborina po mjesecima u mm	
		Prosjek	1961./2000.	Prosjek	1961./2000.
2008.	Rujan	15,9	16,6	85,4	51,8
	Listopad	13,6	11,2	38,2	48,3
	Studeni	7,5	5,4	48,6	60,7
	Prosinac	3,8	0,9	47,5	54,4
2009.	Siječanj	-1,4	-1,2	57,2	45,2
	Veljača	1,7	1,6	35,4	37,8
	Ožujak	6,9	6,1	22,1	42,2
	Travanj	14,6	11,3	15,7	54,1
	Svibanj	19,0	16,5	45,5	58,9
	Lipanj	19,7	19,4	73,9	83,5
	Srpanj	23,6	21,1	31	66,6

U drugoj godini pokusa tijekom vegetacije pšenice srednje mjesečne temperature zraka također nisu odstupale od višegodišnjega prosjeka osim u travnju i svibnju 2009., kada su prosječne srednje temperature zraka bila više za 2 °C (Tablica 3).

U prvoj godini poljskoga pokusa (2007./2008.) zabilježena je veća količina oborina u rujnu, listopadu i studenom 2007. (Grafikon 1) odnosno u sjetvi pšenice. Tijekom faze nicanja i ukorjenjivanja, slijedi nagli nedostatak oborina u veljači 2008. kada je palo samo 3,8 mm, dok je višegodišnji prosjek iznosio 37,8 mm. Veća količina oborina u svibnju, kada je palo 55,6 mm više oborina od višegodišnjeg prosjeka te uz temperaturu zraka višu za 2,8°C pogodovala je razvoju bolesti, takvi uvjeti uzrokom su i kasnijeg klananja pšenice. U drugoj godini poljskoga pokusa zabilježena je pak manja količina oborina tijekom ožujka i travnja, kada se pšenica nalazi u fenofazi vlatanja, te se zbog povećane transpiracijske površine nalazi u kritičnom razdoblju glede potrebe za vodom. Manja količina oborina u odnosu na višegodišnji prosjek zabilježena je i u mjesecu svibnju (45,5 mm).

Walterov klima dijagram za Osijek (3:1)



Grafikon 1. Klima-dijagram za razdoblje od 2007. do 2009. godine te 30 godišnji prosjek na lokaciji Osijek

4.2.1.1. Morfološka svojstva

Različitost sorata ispitivana je na temelju morfoloških svojstava (Tablica 4.) uključenih u listu deskriptora prema vodiču o različitosti, ujednačenosti i postojanosti sorata pšenice (DUS - D = Distinct, U = Uniform, S = Stable) Međunarodnog udruženja za zaštitu novih kultivara bilja (UPOV-International Union for the Protection of New varieties of Plants).

Ocjena svojstava obavljena je u poljskim pokusima tijekom dvije vegetacijske godine u sva tri ponavljanja u fazama razvitka biljaka kako je propisano vodičem. Na temelju dobivenih podataka izrađena je matrica za ispitivana morfološka svojstva na principu prisutnosti (1) ili odsutnosti (0) određenoga morfološkog svojstva. Radi lakšeg i preciznijeg mjerenja za svojstvo klasanja, sorte su podijeljene u pet skupina prema datumu klasanja: prvu od 01.05. do 04.05., drugu od 05.05. do 08.05., treću od 09.05. do 12.05., četvrtu od 13.05. do 16.05. i petu od 17.05. do 20.05. Na isti način, svrstavanjem genotipova u pet skupina, pristupljeno je utvrđivanju ocjene za svojstvo visine biljke i duljine klasa.

Tablica 4. Ispitivana morfološka svojstva i ocjene prema UPOV tehničkom vodiču za DUS ispitivanje ozime pšenice

Br.svojstva	Svojstvo	Ocjena	Opis
2.	Biljka: tip busanja	1	Erektum
		3	Semierektum
		5	Intermedijaran
		7	Semiprostratum
		9	Prostratum
5.	Vrijeme klasanja	1	Vrlo rano
		3	Rano
		5	Srednje
		7	Kasno
		9	Vrlo kasno
6.	List zastavičar: voštana prevlaka na rukavcu	1	Nema ili vrlo slaba
		3	Slaba
		5	Srednja
		7	Jaka
		9	Vrlo jaka
7.	Klas: voštanost	1	Nema ili vrlo slaba
		3	Slaba
		5	Srednja
		7	Jaka
		9	Vrlo jaka
9.	Biljka: visina	1	Vrlo kratka
		3	Kratka
		5	Srednja
		7	Duga
		9	Vrlo duga
12.	Klas: zbijenost	1	Vrlo rastresit
		3	Rastresit
		5	Srednje zbijen
		7	Zbijen
		9	Jako zbijen
14.	Klas: duljina	1	Vrlo kratak
		3	Kratak
		5	Srednji
		7	Dugi
		9	Vrlo dugi
15.	Osje ili produžetak pljevica: prisutnost	1	Oboje odsutno
		2	Pljevica prisutna
		3	Osje prisutno
16.	Klas: boja	1	Bijela
		2	Obojana
24.	Zrno: boja	1	Bijela
		2	Crvena

4.2.1.2. Agronomska svojstva

Tijekom dvije vegetacijske godine mjerena su sljedeća agronomska svojstva: visina biljke do klasa, duljina klasa i broj biljaka po jedinici površine (m^2) u fazi voštane zriobe. Za mjerenje broja klasića po klasu i broja zrna po klasu ručno su uzeti klasovi neposredno prije žetve. Za svako svojstvo (osim broja biljaka po jedinici površine) je mjereno na 25 slučajno odabranih biljaka iz srednjeg reda unutar svakoga ponavljanja. Tako je za svaku sortu izmjereno 75 biljaka što ukupno čini 24 000 pojedinačnih mjerenja. Određivanje hektolitara i vlage obavljena su nakon žetve na polju, a zatim je utvrđena masa 1000 zrna i procijenjen je urod zrna.

4.2.2. Laboratorijski pokus

4.2.2.1. Mjerenja količine i sastava bjelančevina i škroba u zrnu pšenice

Nakon žetve u obje vegetacijske godine poljskoga pokusa za svaki genotip (prosjeak tri ponavljanja) određena je količina bjelančevina i škroba pomoću uređaja Infratec™ 1241 Grain Analyzer-a (Foss Tecator AB, Švedska) za brzo testiranje parametara kvalitete zrna.

4.2.2.2. Određivanje sastava bjelančevina

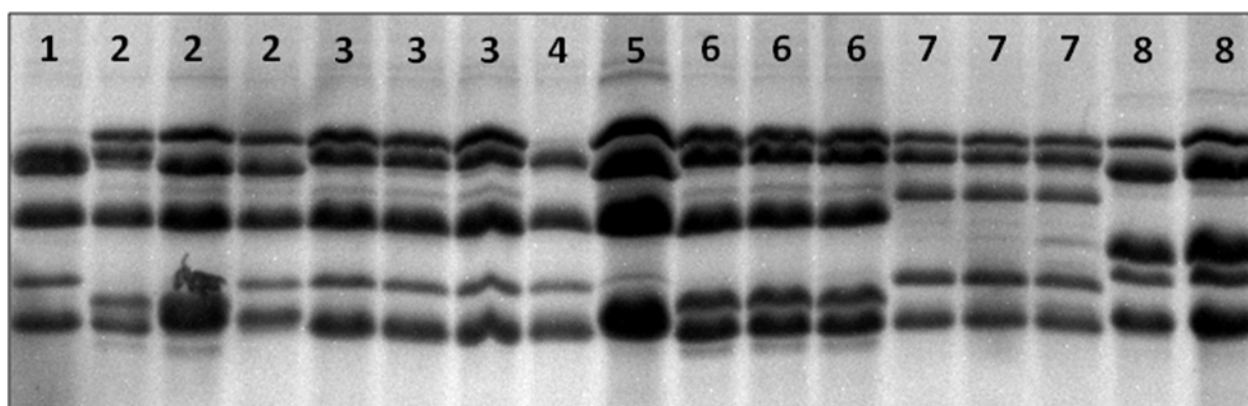
Sastav bjelančevina tj. visokomolekularnih jedinica glutenina (HMW-GS) određen je metodom natrij-dodecil-sulfat-poliakrilamid-gel elektroforeze (SDS-PAGE). Ispitivanje je provedeno u Laboratoriju za ispitivanje kvalitete Poljoprivrednoga instituta u Osijeku. Izolacija glutenina obavljena je iz 50 mg brašna 16 sorata pšenice koristeći SDS-PAGE pufer (2X stock pufer: 0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% Bromphenol Blue, pH 6,8). Elektroforeza je obavljena na uređaju Phast System (Pharmacia LKB) u sljedećim uvjetima: 40 min, 250 V, 10 mA, 15 °C i 120 Vh, koristeći PhastGel gradient 4-15 gelove (43 x 50 x 0,45). Gelovi su obojani koristeći 0.1% Coomassie Brilliant Blue R boju. Izračunavanje ocjena kvalitete - Glu-1 vrijednost (Tablica 5) obavljeno je prema Payne i Lawrence (1987.).

Tablica 5. Obilježavanje lokusa, alela i HMW podjedinica glutenina i odgovarajuća ocjena kvalitete

Lokus	Aleli	Podjedinice	Ocjena kvalitete*
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	3
	<i>b</i>	2*	3
	<i>c</i>	N	1
<i>Glu-B1</i>	<i>b</i>	7+8	3
	<i>c</i>	7+9	2
	<i>d</i>	6+8	1
	<i>e</i>	20	-
	<i>h</i>	14+15	-
	<i>i</i>	17+18	3
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	2
	<i>b</i>	3+12	2
	<i>d</i>	5+10	4

*odlično (4); dobro (3); slabo (2); loše (1)

Klasifikacija sorata prema HMW-GS određena je uspoređujući ih sa poznatim standardima (Chinese Spring i Glenlea) (Slika1). Podaci za ostale genotipove prikupljeni su iz literaturnih podataka (Horvat i sur., 2006.; 2008.; Bekes i sur., 2006. http://www.aaccnet.org/grainbin/gluten_gliadin.asp).



Slika 1. SDS-PAGE elektroforegram (sorte: Alka (1), Katarina (2), Barbara (3), Chinese Spring (4), Glenlea (5), Golubica (6), Zlatna Dolina (7) i Aida (8)); (foto original; S.Petrović)

4.2.2.3. Određivanje sastava škroba

Postupak je proveden u dvije faze. Sastav škroba odnosno udjel amiloze i amilopektina utvrđen je metodom Megazyme k-amyl 04/06 (Megazyme International Ireland, 2006.) pomoću istoimenog seta. Ispitivanje škroba provedeno je u laboratoriju Katedre za tehnologiju ugljikohidrata Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku.

Prva faza uključuje obradu škroba. Uzorci 40 sorata pšenice samljeveni su u fini prah te je izvagano, za dva ponavljanja, po 25 mg brašna. Uzorci brašna su stavljani u epruvete od 10 ml, nakon čega je dodano 1 ml DMSO (dimetil sulfoksid). Sadržaj epruvete je promiješan na vrtložnoj miješalici (vorteksu), zatim su epruvete grijane oko 15 minuta u vrućoj kupelji sve dok se uzorak nije potpuno rastopio. Slijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi pet minuta, nakon čega je u epruvete dodano 2 ml 96 %-tnog etanola uz miješanje na vorteksu. Zatim je dodano još 4 ml 96 %-tnog etanola, nakon čega se stvorio talog škroba, epruvete su stajale na sobnoj temperaturi 15 minuta. Epruvete su centrifugirane (2.000 *g*, 5 minuta), supernatant je odbačen, a epruvete su ocijeđene na filter papiru u trajanju od 10 minuta. Talogu škroba dodano je 2 ml DMSO, a nakon toga epruvete su stavljene u vruću kupelj na 15 minuta uz povremeno miješanje. Nakon kupelji dodano je 4 ml Con A otapala (konkanavalin A otopljen u natrij-acetatnom puferu), nakon miješanja sadržaj epruvete je profiltriran i prenesen u odmjerne tikvice volumena 25 ml te nadopunjen istim otapalom.

Druga faza temelji se na Con A taloženju amilopektina i određivanje amiloze. Druga faza je izvedena zajedno s trećom koja uključuje određivanje ukupnoga škroba. Dodan je 1 ml otopine iz odmernih tikvica u Eppendorf tubice volumena 2 ml i 0,50 ml Con A otopine uz miješanje. Tubice su inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi. Slijedilo je centrifugiranje na 14.000 *g* u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 20°C. Količina od 1 ml supernatanta prenesena je u kivete volumena 15 ml i dodano je 3 ml 100 mM natrij-acetat pufera (pH 4,5) uz miješanje. Slijedilo je zagrijavanje u vodenoj kupelji pet minuta (denaturiranje Con A). Zatim je dodano 0,1 ml enzimske smjese amiloglukozidaza/ α -amilaze, a kivete su inkubirane 30 minuta na 40°C. Slijedilo je centrifugiranje na 2.000 *g* u trajanju od pet minuta. Nakon toga je alikvotama od 1 ml dodano 4 ml GOPOD reagensa (smjesa glukoza oksidaze, peroksidaze i 4-aminoantipirina otopljene puferu (smjesa 1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7.4), *p*-hidroksibenzojevoj kiselini i natrijeva azida). Paralelno je na inkubaciju

stavljena slijepa proba (smjesa 0,1 natrij-acetat pufera i GOPOD reagensa) i kontrolni uzorak glukoze (0,1 ml standardne glukozne otopine (1mg/ml), 0,9 natrij-acetat pufera i GOPOD reagensa). Nakon inkubacije očitana je apsorbancija, na spektrofotometru Jenway 6300, na 510 nm svakog uzorka u odnosu na slijepu probu.

Za izračunavanje sadržaja amiloze korištena je sljedeća formula:

$$\text{amiloza\%} = \frac{\text{apsorbancija ConA supernatanta}}{\text{apsorbancija alikvota za ukupni škrob}} \times \frac{6,15^*}{9,2^*} \times \frac{100}{1}$$

*Pri čemu su 6,15 i 9,2 faktori razrjeđenja za Con A i ukupni škrob.

4.2.3. Istraživanja genetske različitosti na razini DNA

Istraživanja na DNA razini obavljena su u laboratoriju Odjela za istraživanje žitarica Poljoprivrednoga instituta mađarske akademije znanosti u Martonvásàru (Mađarska) u suradnji sa dr. Ildikó Karsai.

4.2.3.1. Uzgoj klijanaca i izolacija genomske DNA

Po sorti je uzgojeno 20 biljaka. Jedinke su uzgojene u stakleniku tijekom 20 dana gdje je temperatura održavana na 20°C, uz svjetlosni režim 12 sati osvjetljenja i 12 sati bez te uz zalijevanje svakih pet dana. Listovi biljaka prikupljeni su u fazi potpunog razvitka dva i početka razvoja trećega lista.

Izdvajanje DNA iz listova provedeno je na 40 sorata ozime pšenice prema cetil-trimetilamonij-bromid (CTAB) metodi (Doyle i Doyle, 1987.) modificirano prema Grljušić, (2003.). Oko 100 mg svježe odrezanih listova biljnoga materijala odvagano je i stavljeno u tarionike, koji su prethodno ohlađeni tekućim dušikom. Listovi su zatim prelivevi tekućim dušikom i samljeveni tučkom u fini prah. U svaki uzorak je zatim dodano 1000 µl 2% CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5M Na₂EDTA pH 8.0; 5M NaCl; 10% SDS), koji je prethodno ugrijan u vodenoj kupelji na 68°C. Sadržaj je izliven u pripremljene Eppendorf tubice koje su zatim vorteksirane i inkubirane u vodenoj kupelji 45 minuta uz povremeno okretanje rukom.

Nakon inkubacije tubice su stavljene u posudu s ledom, svakom uzorku je dodano 670 μ l SEVAG-a (kloroform/izoamilni alkohol 24:1), a zatim je svaki uzorak protresen pojedinačno i stavljen na stalak za mućkanje u trajanju od 30 minuta.

Slijedilo je centrifugiranje u trajanju od osam minuta na 14.000 okr/min i odvajanje tekuće od krute faze pipetiranjem u novi set tubica od dva mililitra, pri čemu je konačni volumen iznosio oko 750 μ l. Zatim je u tekuću fazu dodano 16 μ l RNAze, a uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi 30 minuta uz lagano ručno okretanje tubica. U tubice je zatim dodano 650 μ l 0,7 V hladnog izopropanola i ostavljene su stajati jedan sat. Tubice su centrifugirane u trajanju od jedne minute na 14.000 okr/min pri čemu se na dnu tubice pojavila bijela peleta. Nakon toga je izlivena tekuća faza i slijedilo je pranje pelete u 500 μ l 0,2 mM natrij acetat u 76% alkoholu u trajanju od 30 minuta. Tubice su kratko centrifugirane dvije minute na 14.000 okr/min, a tekuća faza je izlivena. Zatim je postupak pranja pelete ponovljen u trajanju od 10 minuta, nakon čega su uzorci ponovo centrifugirani jednu minutu na 14.000 okr/min.

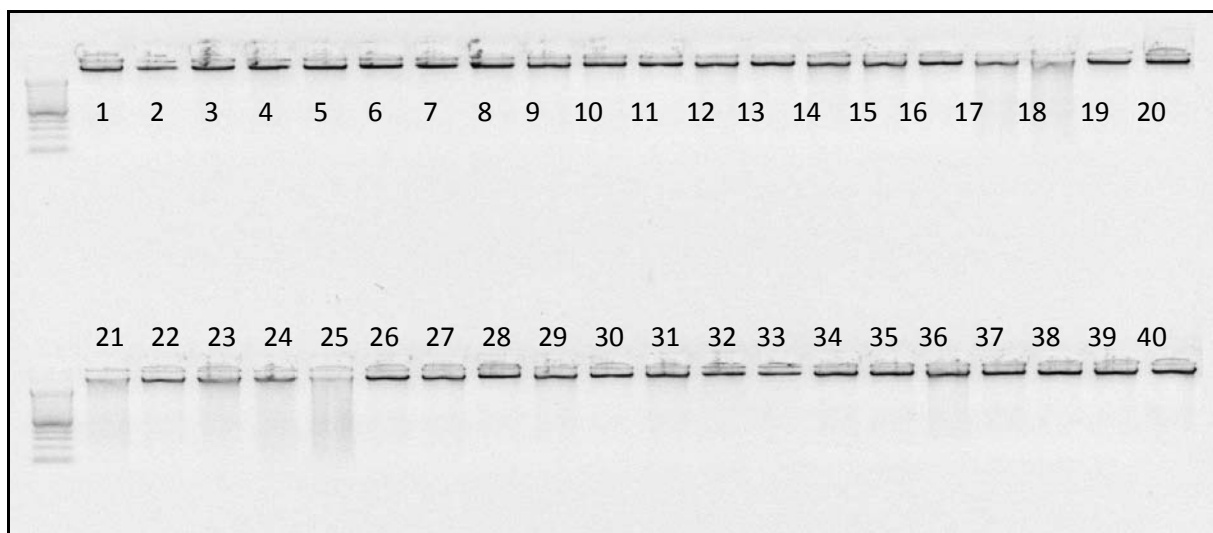
Nakon izlivanja tekuće faze pipetom je odstranjen višak etanola, a tubice su ostavljene otvorene u laminaru oko sat vremena. Nakon sušenja peletama je dodano 100 μ l 1 \times TE pufera, pri čemu su se pelete otopile. Slijedilo je kratko centrifugiranje i uzorci izolirane genomske DNA su pohranjeni na -20 °C.

Koncentracija DNA (Tablica 6) izmjerena je spektrofotometrom Thermo Scientific NanoDrop 2000 na sljedeći način. Od svakog uzorka je u pripremljene tubice odvojeno po 2 μ l izolirane DNA, prilikom mjerenja korištene su dvije kontrole TE pufer i voda.

Tablica 6. Koncentracije DNA, određene spektrofotometrom Thermo Scientific NanoDrop 2000® (uzorci od 1 do 40).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	990,8	361,4	652,8	1232,2	1611,4	762,8	706	641,3	640,6	1798,1
B	448,2	633,3	975,9	743,1	706,7	773,8	732,8	1097,1	733	892
C	655,6	1523,1	1127,2	685	1527	831,2	1401,3	1288,6	953,2	1289,2
D	1360,6	1357,7	1195,6	1493,4	1778,4	1180,7	1474,5	1081	965,5	1124,4

Nakon provedenih mjerenja za svaki uzorak je određena potrebna količina DNA i TE pufera da bi se dobili radni uzorci za PCR reakcije. Kvaliteta izdvojene DNA provjerena je elektroforezom uspoređujući ju s lambda-DNA (Slika 2).



Slika 2. Kvaliteta izdvojene genomske DNA u usporedbi sa λ -DNA (foto original; S.Petrović)

Za ispitivanje različitosti sorata na razini DNA korištene su dvije metode bazirane na lančanoj reakciji polimerazom (PCR-Polimerase Chain Reaction): metoda mikrosatelitnih markera i AFLP metoda.

4.2.3.2. Metoda mikrosatelitnih markera

Korištene su sekvence parova mikrosatelitnih početnica koje su kreirali Marion Röder i suradnici u Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Njemačka. Odabrane su prema literaturnim navodima Röder i sur. (1998.). Svojstva parova početnica za 19 mikrosatelitnih markera prikazani su u Tablici 7.

Odabirom parova mikrosatelitnih početnica nastojalo se da svi genomi i kromosomi pšenice budu ravnomjerno zastupljeni. Genomi A i D su obuhvaćeni sa devet, a genom B sa sedam mikrosatelitnih markera.

Tablica 7. Svojstva parova početnica mikrosatelitnih početnica

Mikrosatelit gwm*	Lokus	Lijeva početnica	Desna početnica	T _a (°C) **
gwm2_1	3A	CTGCAAGCCTGTGATCAACT	CATTCTCAAATGATCGAACA	50
gwm2_2	3D	CTGCAAGCCTGTGATCAACT	CATTCTCAAATGATCGAACA	50
gwm11	1B	GAATAGTCAGACATTTCTTGTG	GTGAATTGTGTCTTGTATGTCTCC	50
gwm55	6D	GCATCTGGTACACTAGCTGCC	TCATGGATGCATCACATCCT3	60
gwm68_1	5B	AGGCCAGAATCTGGGAATG	CAACCCTCTTAATTTTGTGGG	60
gwm68_2	7B	AGGCCAGAATCTGGGAATG	CAACCCTCTTAATTTTGTGGG	60
gwm121_1	5D	TCCTCTACAAACAAACACAC	CTCGCAACTAGAGGTGTATG	50
gwm121_2	7D	TCCTCTACAAACAAACACAC	CTCGCAACTAGAGGTGTATG	50
gwm135	1A	TGTCAACATCGTTTTGAAAAGG	ACACTGTCAACCTGGCAATG	60
gwm149	4B	CATTGTTTTCTGCCTCTAGCC	CTAGCATCGAACCTGAACAAG	55
gwm169	6A	ACCACTGCAGAGAACACATACG	GTGCTCTGCTCTAAGTGTGGG	60
gwm186	5A	GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG	CGCCTCTAGCGAGAGCTATG	60
gwm 257	2B	AGAGTGCATGGTGGGACC	CCAAGACGATGCTGAAGTCA	60
gwm 261	2D	CTCCCTGTACGCCTAAGGC	CTCGCGCTACTAGCCATTG	55
gwm311_1	2A	TCACGTGGAAGACGCTCC	CTACGTGCACCACCATTTTG	60
gwm311_2	2D	TCACGTGGAAGACGCTCC	CTACGTGCACCACCATTTTG	60
gwm458	1D	AATGGCAATTGGAAGACATAGC	TTCGCAATGTTGATTTGGC	60
gwm497_1	1A	GTAGTGAAGACAAGGGCATT	CCGAAAGTTGGGTGATATAC	55
gwm497_2	2A	GTAGTGAAGACAAGGGCATT	CCGAAAGTTGGGTGATATAC	55
gwm497_3	3D	GTAGTGAAGACAAGGGCATT	CCGAAAGTTGGGTGATATAC	55
gwm573_1	7A	AAGAGATAACATGCAAGAAA	TTCAAATATGTGGGAACTAC	50
gwm573_2	7B	AAGAGATAACATGCAAGAAA	TTCAAATATGTGGGAACT AC	50
gwm609	4D	GCGACATGACCATTTTGTG	GATATTAATCTCTCTATGTGTG	50
gwm610	4A	CTGCCTTCTCATGTTTTGT	AATGGCCAAAGGTTATGAAGG	60
gwm626	6B	GATCTAAAATGTTATTTCTCTC	TGACTATCAGCTAAACGTGT	50
gwm 642	1D	ACGGCGAGAAGGTGCTC	CATGAAAGGCAAGTTCGTCA	60

*gwm: Gatersleben Wheat Microsatellites

** T_a(°C) = temperatura nalijeganja početnica

Amplifikacija je obavljena prema protokolu Röder i sur. (1998.), koji je prilagođen je za LI-COR® Biosciences 4200 DNA Analyzer. Reakcijska smjesa sastojala se od amplifikacijskih reagensa, mikrosatelitnih početnica i genomske DNA, čije su koncentracije i volumeni navedeni u Tablici 8.

Tablica 8. Koncentracije i sastav reakcijske smjese za PCR amplifikaciju

Reakcijska smjesa	Koncentracija		Volumen po jednoj reakciji
	stock	final	
PCR pufer	10 ×	1 ×	1,5 µl
MgCl ₂	500 mM	1,5 mM	0,045 µl
dNTP mix (10×)	2 mM	0,2 mM	1,5 µl
M13-30 početnica *	10 µl	0,18 µl	0,27 µl
L-početnica	10 µl	0,2 µl	0,3 µl
D-početnica **	10 µl	0,02 µl	0,03 µl
Taq polimeraza	5 U/µl	0,05 U/µl	0,15 µl
Genomska DNA	10 ng/µl	2,66 µl	3,99 µl
dd H ₂ O	-	-	7,215 µl
Total			15 µl

* korištena je sljedeća sekvenca početnice M13-30 5'CCCAGTCACGACGTTG 3' označena fluorescentnom bojom IRDye® 700CW ili IRDye® 800CW na 5' kraju radi detekcije na LI-COR-u

** D-početnica obilježena je sa M13-30 sekvencom na kraju 5'

Za PCR reakciju korišten je uređaj GeneAmp® Thermocycler 9700 prema sljedećem programu: 1. korak je bio 5 minuta na 94°; 2. korak je pet ciklusa po 45 sekundi na 95°C, 5 minuta na 68°C (-2°C po ciklusu) i 1 minuta na 72°C; 3. korak je pet ciklusa po 45 sekundi na 95°C, 2 minuta na 58°C (-2°C po ciklusu) i 1 minuta na 72°C; 4. korak je 27 ciklusa po 45 sekundi na 95°C, 75 sekundi na 45°C i 1 minuta na 72°C i završni 5. korak je trajao 10 minuta na 72°C.

4.2.3.3. AFLP metoda

AFLP metodu je prvi puta je opisao Vos i sur. (1995.), patentirana je od strane Keygene (NL). Protokol za LI-COR® Biosciences 4200 DNA Analyzer prilagođen je prema dr. Lorenz Hartl, LBP-Freising, Njemačka. Metoda se sastoji od četiri faze. Prethodno se pripreme adapteri jednolančanih oligonukleotida (Tablica 9). Mse-oligonukleotid se razrijedi na koncentraciju od 500 µM, a Sse-oligonukleotid se razrijedi na koncentraciju od 50 µM.

Tablica 9. Adapteri jednolančanih oligonukleotida

Smjesa za Mse-adapter	
ADAMse1 (500 μM) (5'GAC GAT GAG TCC TGA G'3)	6 μl
ADAMse2 (500 μM) (5'TAC TCA GGA CTC AT'3)	6 μl
H₂O	48 μl
Ukupno	60 μl 50μM ADAMse

Smjesa za Sse-adapter	
ADASse1 (50 μM) (5'CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA'3)	6 μl
ADASse2 (50 μM) (5'TGT ACG CAG TCT AC'3)	6 μl
H₂O	48 μl
Ukupno	60 μl 5μM ADASse

Prva faza je digestija genomske DNA. Korištene su restrikcijske endonukleaze tipa II Sse 8371I i MseI. Restrikcijska smjesa (Tablica 10) je inkubirana na 37°C u trajanju od 90 minuta.

Tablica 10. Koncentracija i volumen smjese za restrikciju

Restrikcijska smjesa	Volumen za jednu reakciju
Genomske DNA	0,25 μg
Sse8387I	2,5 jedinica
MseI	2,5 jedinica
BSA	0,01 %
10× restrikcijski pufer za Sse8387I	2 μl (1×)
H₂O do ukupnog volumena od	20 μl

Druga faza je ligacija adaptera. Količina od 5 μl ligacijske smjese (Tablica 11) dodana je u svaku tubicu u kojoj se nalazi restrikcijska smjesa, nakon čega je sve inkubirano na 37°C u trajanju od 180 minuta. Nakon inkubacije je slijedila provjera produkata ligacije, 5 μl uzorka nanoseno je na 2% agarozni gel pri čemu se pojavio razmaz između 100 i 800 parova baza čime su se stvorili uvjeti za sljedeći korak. U preostalu ligacijsku smjesu (20 μl) dodano je 60 μl H₂O, nakon čega je sve dobro promiješano. Navedena smjesa služi kao predložak za predselektivnu amplifikaciju.

Tablica 11. Koncentracija i volumen smjese za ligaciju

Ligacijska smjesa	Volumen za jednu reakciju
ADASse (5 μM)	0,5 μl
ADAMse (50 μM)	0,5 μl
ATP (10 nM)	0,5 μl
10 \times restrikcijski pufer za Sse8387I	0,1 μl (1 \times)
T4 ligaza (1U/ μl)	1,0 μl
H ₂ O	2,0 μl
Ukupno	5,0 μl

Treća faza je predselektivna PCR amplifikacija bez odabranih nukleotida. U predselektivnoj smjesi (Tablica 12) odabrana početnica PreSse imala je sekvencu GTA GAC TGC GTA CAT GCA G, dok je početnica PreMse imala sekvencu GAT GAG TCC TGA GTA A. PCR amplifikacija odvijala se prema sljedećem programu: 1. korak je bio 2 minute na 72°; 2. korak je 20 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 60 sekundi na 60°C i 2 minute na 72°C.

Slijedila je provjera PCR produkata, 5 μl uzorka nanoseno je na 2% agarozni gel pri čemu se pojavio razmaz između 100 i 800 parova baza čime su se stvorili uvjeti za sljedeći korak. Preostala predselektivna PCR amplifikacijska smjesa (15 μl) se razrijedi sa 285 μl H₂O. Ovih 300 μl služi kao predložak za selektivnu PCR amplifikaciju.

Tablica 12. Koncentracije i volumen smjese za predselektivnu amplifikaciju

Predselektivna smjesa	Volumen za jednu reakciju
PreSse - početnica (10 μM)	0,6 μl
PreMse - početnica (10 μM)	0,6 μl
dNTP (10 mM)	0,4 μl
10 \times PCR pufer	2,0 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl
Taq-polimeraza (5U/ μl)	0,1 μl
Ligacijska DNA	5,0 μl
H ₂ O	10,7 μl
Ukupno	20,0 μl

Četvrta faza je selektivna PCR amplifikacija. U selekcijskoj smjesi (Tablica 13) korištena su četiri para početnica sa dva selektivna nukleotida u sljedećim kombinacijama:

Tablica 13. Koncentracije i volumen smjese za selektivnu amplifikaciju

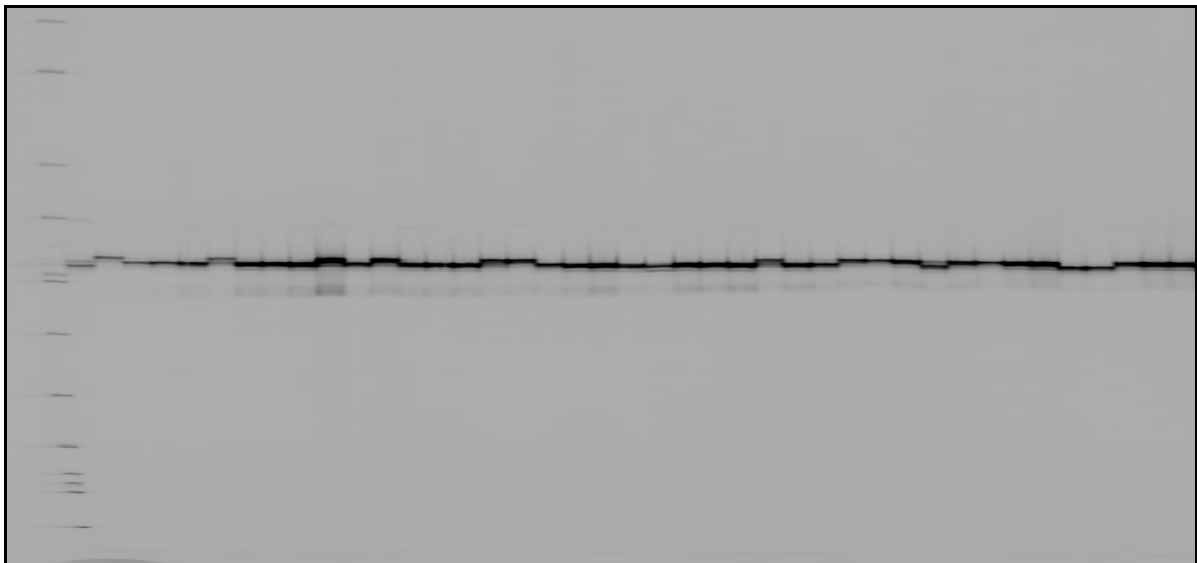
Selektivna smjesa	Volumen za jednu reakciju
Sse - početnica (10 μM) (sa dva selektivna nukleotida i IRD 700/800)	0,2 μ l
Mse - početnica (10 μM) (sa dva selektivna nukleotida)	0,6 μ l
dNTP (10 mM)	0,4 μ l
10\times PCR pufer	2,0 μ l
MgCl₂ (50 mM)	0,6 μ l
Taq-polimeraza (5U/μl)	0,1 μ l
Preamplificirana DNA	3,0 μ l
H₂O	13,1 μ l
Ukupno	20,0 μ l

U prvoj reakciji korišten je prvi par početnica, Sse početnica sekvence GAC TGC GTA CAT GCA GG TC koja je obilježena sa IRDye[®] 700CW i Mse početnica sekvence GAT GAG TCC TGA GTA A AT. U drugoj reakciji korišten je drugi par početnica, Sse obilježena IRDye[®] 800CW iste sekvence, ali sa nukleotidnim nastavkom GC te Mse početnica obilježena sa nukleotidnim nastavkom AT. U trećoj reakciji korišten je treći par, Sse početnica obilježena sa IRDye[®] 700CW i nukleotidnim nastavkom TC te Mse početnica obilježena sa nukleotidnim nastavkom GA. U posljednjoj reakciji korišten je četvrti par početnica, Sse obilježena sa IRDye[®] 800CW i nukleotidnim nastavkom GC i početnica Mse sa nukleotidnim nastavkom GA.

Amplifikacija je obavljena prema sljedećem programu na PCR uređaju GeneAmp[®] Thermocycler 9700: 1. korak je bio 2 minute na 94°; 2. korak je 10 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 63°C (-1°C po ciklusu do 54°C) i 2 minuta na 72°C i 3. korak je 23 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 54°C i 2 minute na 72°C.

4.2.3.4. Elektroforeza

Produkti SSR i AFLP amplifikacije su nanoseni na 6% poliakrilamidni gel koristeći LI-COR 4300 analyzer u 10× TBE (TRIS, borna kiselina, 0,5M Na₂EDTA) puferu. Gel je bio veličine 25 cm, debljine 0,25 mm, a za 6% akrilamid potrebno je bilo: 10,5 g uree, 25ml H₂O, 2,5 ml 10×TBE pufera, 3,6 ml 40% akrilamida, 250 μl DMSO (dimetil sulfoksid), 175 μl 10% APS (amonij persulfat) i 25 μl TEMED (tetrametil etilendiamine). Kao standardi za utvrđivanje duljine mikrosatelitnih početnica i korišteni su IRDye[®] 350CW, a za dužine AFLP fragmenata IRDye[®] 700CW i IRDye[®] 800CW obilježeni markeri. Za izradu binarne matrice podataka (postojanje fragmenta (1) ili nepostojanje fragmenta (0)) na temelju mikrosatelitne i AFLP analize obavljena je ocjena fotografija (Slika 3). Za mikrosatelite je korišten SAGA^{GT} genotyping software program ver 3.2. razvijen od strane LI-COR[®] Biosciences Saga unix 1.0 (Unix), a za AFLP analizu korišten je Kodak[®] 1D v.3.6.4 Scientific imaging system.



Slika 3. Mikrosatelit gwm251 na 40 genotipova pšenice. (foto original; S.Petrović)

4.3. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobivenih rezultata istraživanja obuhvaćala je obradu agronomskih, morfoloških i molekularnih podataka.

4.3.1. Statistička obrada kvantitativnih agronomskih podataka

Podatke za statističku obradu agronomskih svojstava činili su:

- a) Srednje vrijednosti sljedećih pojedinačnih mjerenja: visina biljke do klasa, duljina klasa, broj biljaka po m², broja klasića po klasu i broja zrna po klasu.
- b) Srednje vrijednosti cijele obračunske parcele sljedećih svojstava: masa 1000 zrna, hektolitarska masa, urod, količina bjelančevina i količina škroba u zrnu.

Dobivene vrijednosti su sistematizirane po godinama, izračunat je koeficijent varijabilnosti za svako svojstvo i po godinama kao relativni pokazatelj varijabilnosti analiziranih svojstava. Agronomska svojstva statistički su analizirana analizom varijance (ANOVA), a genotipovi su za svako svojstvo međusobno uspoređeni Fisher-ovim LSD testom (na razini p<0,05 i p<0,01), koristeći SAS Software 9.1.3 (2002.-2003.).

4.3.2. Statistička obrada morfoloških podataka

Osnovne podatke za statističku obradu činilo je 10 morfoloških svojstava: tip busanja, vrijeme klasanja, voštana prevlaka na rukavcu, voštanost klasa, visina biljka, zbijenost klasa, duljina klasa, prisutnost osja ili produžetak pljevica, boja klasa i boja zrna. Na osnovu dobivenih vrijednosti napravljena je standardizirana matrica na osnovu koje je izračunata genetska sličnost. Genetska sličnost je dobivena između svakog para genotipova *i* i *j* za morfološka marker svojstva koristeći Rogers i Tanimoto (RT) koeficijent (Rogers i Tanimoto, 1960.).

$$RT_{ij} = \frac{(n_{11} + n_{00})}{(n_{11} + n_{00} + 2(n_{01} + n_{10}))}$$

gdje je n_{11} = broj mjesta gdje je postojanje svojstva prisutno u oba genotipa, n_{00} = broj mjesta gdje nije prisutno svojstvo u oba genotipa i n_{01} ili n_{10} = broj mjesta na kojima se

genotipovi razlikuju. Sličnosti su izračunate koristeći NTSYS ver.2.2. programa (Rohlf, 2009.). Matrice dobivene na temelju morfoloških podataka korištene su za izradu UPGMA.

4.3.3. Statistička obrada molekularnih podataka

Podatke za obradu molekularnih podataka čine:

1. sastav visokomolekularnih podjedinica glutenina (HMW GS)
2. sastav škroba (količina amiloze i amilopektina te omjer amiloze i amilopektina)
3. mikrosatelitni markeri
4. AFLP markeri

1. SDS PAGE metodom utvrđene su HMW GS, izolirane iz 16 genotipova pšenice, podaci za ostale genotipove prikupljeni su iz literaturnih podataka (Horvat i sur., 2006.; Bekes i sur., 2006. http://www.aaccnet.org/grainbin/gluten_gliadin.asp). Izračunat je genetski varijacijski koeficijent prema Nei (1973.):

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

Prema postojanju alela na gluteninskom lokusu izrađena je binarna matrica na temelju koje je izračunata genetska sličnost prema Jaccard (1908.):

$$J = \frac{M_{11}}{M_{01} + M_{10} + M_{11}}$$

i izrađen je UPGMA dendogram.

2. Dobivene vrijednosti sastava škroba su sistematizirane prema količini amiloze i amilopektina po genotipovima te je izračunat koeficijent varijabilnosti. Dobivene postotne vrijednosti amiloze i amilopektina (Am/Amp) transformirane su u omjer. Dobiveni omjeri Am/Amp statistički su analizirani analizom varijance (ANOVA), genotipovi su međusobno uspoređeni Fisher-ovim LSD testom (na razini $p < 0,05$ i $p < 0,01$), koristeći SAS Software 9.1.3 (2002.-2003.).

3. Genetska različitost i polimorfnost mikrosatelitnih markera analizirana je na temelju ukupnog i prosječnog broja alela po markeru (N_a) te je procijenjen polimorfizam (PIC) za svaki mikrosatelitni lokus (Botstein i sur., 1980.):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^I \sum_{j=1}^{I-1} p_i^2 p_j^2$$

gdje su p_i i p_j učestalost i -tog i j -tog alela na lokusu s I ukupnim brojem alela u populaciji. Vrijednost PIC-a se koristi kao mjerilo alelne različitosti koja pokazuje vjerojatnost da će genotip potomstva biti korišten kako bi saznali od kojeg roditelja potječu pojedini aleli.

Genetska različitost (H_E) ili očekivana heterozigotnost (Nei, 1973.) procijenjena je za svaki mikrosatelitni marker koristeći formulu:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

gdje p_i predstavlja učestalost alela i , a I ukupni broj alela. Genetska različitost predstavlja vjerojatnost da su dva nasumično odabrana alela nakon jedne generacije slučajne oplodnje iz populacije međusobno različita. Navedeni parametri izračunati su koristeći program Powermarker (Liu, 2002.).

Binarne matrice alelnih frekvencija dobivene na temelju molekularnih podataka, korištene su za izračunavanje Rogers-ove udaljenosti (d_{ij}) (Rogers, 1972.):

$$d_{ij} = \frac{\sum_{s=1}^S \sqrt{\frac{1}{2} \sum_{g=1}^{m_s-1} (y_{isg} - y_{jsg})^2}}{S}$$

gdje su y_{isg} i y_{jsg} frekvencije alela g na marker lokusu s za varijetet i i j , a S je ukupan broj lokusa. Matrice udaljenosti su zatim korištene za izradu dendograma koristeći UPGMA metodu.

4. Za svaku kombinaciju AFLP markera utvrđen je broj polimorfnih fragmenata (np_i) te je procijenjen i polimorfizam (PIC) i genska različitost (He) za svaku kombinaciju. Binarne matrice su korištene za izračun koeficijenta genetske sličnosti (S_{ij}) prema Dice-u (1945.):

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

gdje je N_{ij} broj fragmenata prisutnih u oba genotipa i i j , N_i je broj fragmenata prisutan u genotipu i , a N_j je broj prisutan u genotipu j . Matrice na temelju sličnosti korištene za izradu dendograma koristeći UPGMA metodu.

Kombinirana matrice na osnovu molekularnih mikrosatelitnih i AFLP podataka (svi aleli su svedeni na binarnu matricu) korištena je za analizu molekularne varijance (AMOVA - Excoffier i sur., 1992.) kako bi se utvrdila genotipska varijanca između i unutar ispitivanih setova ozime pšenice. Za izračunavanje molekularne varijance korišten je program ARLEQUIN ver.2.0. (Schneider i sur., 2000.).

4.3.4. Utvrđivanje ispravnosti i podudarnosti matrica

Matrice udaljenosti na osnovu različitih tipova podataka o ispitivanim genotipovima su uspoređene kako bi se utvrdila razlika između dobivenih rezultata.

Usporedba je provedena koristeći Mantelov test značajnosti i podudarnosti matrica (Mantel, 1967.) prema formuli:

$$Z = \sum_{i>j}^n X_{ij}Y_{ij}$$

gdje su X_{ij} i Y_{ij} elementi ispod dijagonale matrica X i Y . Značajnost Z je bila određena uspoređivanjem vrijednosti Z sa raspodjelom vrijednosti Z nakon 1 000 permutacija.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju agronomskih podataka

Analizom varijance utvrđene su statistički opravdane razlike na razini od $p < 0,01$ za sva ispitivana agronomska svojstva između genotipova kroz dvije vegetacijske godine 2007./2008. i 2008./2009. te u dvogodišnjem prosjeku.

5.1.1. Varijabilnost visine biljke

Analizom rezultata mjerenja visine biljke u provedenom istraživanju utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,01$) između ispitivanih genotipova po godinama istraživanja i u dvogodišnjem prosjeku. Između ponavljanja nije bilo statistički značajnih razlika, dok je statistički opravdana međuzavisnost ($p < 0,01$) utvrđena između genotipa i godine (Tablica 14).

Tablica 14. Analiza varijance za svojstvo visine biljke

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavljanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip × godina	39	-	-	**

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

Prosječne vrijednosti visine biljke pšenice (Tablica 15) u 2008. godini varirale su od 64,92 cm (Srpanjka) do 153,32 cm (U1), a u 2009. od 60,47 cm (Srpanjka) do 132,47 cm (U1). U gotovo svih genotipova (osim Žitarke i Super Žitarke) izmjerena je viša stabljika u 2008., nego u 2009. godini. Genotip U1 imao je statistički visoko opravdano višu stabljiku u odnosu na sve ostale ispitivane genotipove u dvogodišnjem prosjeku (Tablica 16). Genotipovi Antonius i Ludwig slijede po visini sa 114,03 cm i 112,65 cm, između kojih nema statistički opravdane razlike, ali su statistički visoko značajno viši od ostalih 37 genotipova. U genotipovima: Bezostaja, Valerius, Divana, Edison, Eurofit i Ilirija visina stabljike varirala je od 108,69 do 103,47 cm te između njih nema statistički opravdane razlike. Visina stabljike je najviše varirala u genotipa Antonius (14,13%), a najmanje u genotipa Super Žitarka (0,88%). Koeficijent varijacije ovoga svojstva u 2008. godini bio je najviši (18,92%), a u 2009. je iznosio 17,13%.

Tablica 15. Prosječna visina biljke (cm) ispitivanih genotipova

Red. Br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	151,28	132,47	141,87
2.	Osječka crvenka	95,25	92,35	93,80
3.	Osječka 20	84,37	78,63	81,50
4.	Slavonija	84,04	76,40	80,22
5.	Žitarka	76,31	78,57	77,44
6.	Srpanjka	67,32	60,47	63,89
7.	Demetra	79,11	77,27	78,19
8.	Super žitarka	83,55	83,55	83,55
9.	Lucija	80,75	76,25	78,50
10.	Renata	74,99	68,33	71,66
11.	Aida	91,15	81,84	86,49
12.	Pipi	74,59	71,69	73,14
13.	Ilirija	105,16	101,79	103,47
14.	Felix	78,36	73,29	75,83
15.	Zlata	71,48	63,00	67,24
16.	Anđelka	74,24	72,23	73,23
17.	Mihaela	71,29	66,95	69,12
18.	Ružica	81,37	79,24	80,31
19.	Zlatna dolina	88,99	80,47	84,73
20.	Golubica	86,77	83,04	84,91
21.	Janica	85,95	78,25	82,10
22.	Barbara	87,96	84,98	86,47
23.	Katarina	79,19	73,03	76,11
24.	Alka	85,87	77,95	81,91
25.	Seka	77,41	74,17	75,79
26.	Lela	82,29	79,03	80,66
27.	Sana	91,33	84,81	88,07
28.	Adriana	91,24	82,53	86,89
29.	Divana	112,45	102,84	107,65
30.	Libellula	104,25	92,67	98,46
31.	Bezostaja	116,09	101,28	108,69
32.	BC Patria	93,95	89,19	91,57
33.	BC Elvira	90,12	80,04	85,08
34.	Soissons	88,05	83,49	85,77
35.	Valerius	116,04	101,19	108,61
36.	Antonius	120,20	105,09	112,65
37.	Bastide	80,60	80,64	80,62
38.	Edison	114,95	99,37	107,16
39.	Eurofit	107,31	104,52	105,91
40.	Ludwig	115,12	112,93	114,03
	CV%	18,92	17,13	18,44
	F_vrijednost	165,07	174,06	85,40
	LSD_0,05	3,691	3,027	2,449
	LSD_0,01	4,895	4,015	3,248

5.1.2. Varijabilnost broja biljaka po jedinici površine

U provedenom istraživanju utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,01$) između ispitivanih genotipova po godinama istraživanja i u dvogodišnjem prosjeku za svojstvo broja biljaka po jedinici površine (m^2), dok između ponavljanja nije bilo statistički opravnih razlika. Utvrđena je statistički opravdana međuzavisnost ($p < 0,01$) genotipa i godine (Tablica 17).

Tablica 17. Analiza varijance za svojstvo broja biljaka po jedinici površine (m^2)

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavlanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Broj biljaka po jedinici površine u 2008. godini kretao se od 209,67 (Alka) do 121,33 (Edison) biljaka/ m^2 . Ova dva genotipa imala su i u 2009. te u dvogodišnjem prosjeku najveći i najmanji broj biljaka po jedinici površine (Tablica 18). Koeficijent varijacije je bio manji u 2008. godini (13,63%) nego u 2009. kada je iznosio 14,44%.

Genotip Alka imao je statistički visoko opravdano veći broj biljaka/ m^2 u odnosu na 35 ispitivanih genotipova (Tablica 19). U odnosu na genotipove Adrianu (190,17) i Osječku crvenku (189,67) utvrđen je statistički opravdano veći broj biljaka/ m^2 , a u odnosu na genotipove Srpanjka (197,17) i Renata (196,00) nije bilo statistički opravdane razlike u broju biljaka po jedinici površine. Statistički visoko opravdano manji broj biljaka/ m^2 u odnosu na sve ispitivane genotipove utvrđen je u genotipa Edison. Slijede genotipovi Anđelka, BC Patria, Golubica, U1, Katarina, Eurofit i Mihaela između kojih nije bilo statistički opravnih razlika u broju biljaka po jedinici površine. S obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo broja biljaka po jedinici površine najviše je variralo u genotipa Seka (19,57%), a najmanje u genotipa Žitarka (3,99%).

Tablica 18. Prosječne vrijednosti broja biljaka po jedinici površine ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	153,00	126,67	139,83
2.	Osječka crvenka	202,33	177,00	189,67
3.	Osječka 20	163,67	153,67	158,67
4.	Slavonija	164,67	154,33	159,50
5.	Žitarka	178,00	173,33	175,67
6.	Srpanjka	209,33	184,67	197,17
7.	Demetra	199,00	166,67	182,83
8.	Super žitarka	182,00	152,33	167,17
9.	Lucija	195,33	158,00	176,67
10.	Renata	199,67	192,33	196,00
11.	Aida	166,00	147,00	156,50
12.	Pipi	184,33	166,33	175,33
13.	Ilirija	168,33	138,33	153,33
14.	Felix	165,67	131,33	148,50
15.	Zlata	202,33	142,00	172,17
16.	Anđelka	186,33	146,33	166,33
17.	Mihaela	155,00	129,67	142,33
18.	Ružica	132,33	133,33	132,83
19.	Zlatna dolina	153,33	136,33	144,83
20.	Golubica	160,67	118,33	139,50
21.	Janica	152,67	143,33	148,00
22.	Barbara	149,67	147,00	148,33
23.	Katarina	148,00	134,67	141,33
24.	Alka	209,67	197,33	203,33
25.	Seka	198,67	138,67	168,67
26.	Lela	159,33	148,00	153,67
27.	Sana	159,33	134,33	146,83
28.	Adriana	207,00	173,33	190,17
29.	Divana	159,00	129,67	144,33
30.	Libellula	168,67	146,33	157,50
31.	Bezostaja	162,00	139,33	150,67
32.	BC Patria	143,33	127,00	135,17
33.	BC Elvira	162,67	153,00	157,83
34.	Soissons	194,67	174,33	184,50
35.	Valerius	156,33	134,33	145,33
36.	Antonius	167,67	152,00	159,83
37.	Bastide	174,67	172,00	173,33
38.	Edison	121,33	113,00	117,17
39.	Eurofit	160,33	124,00	142,17
40.	Ludwig	182,33	136,33	159,33
	CV%	13,63	14,44	15,07
	F_vrijednost	11,48	13,52	9,85
	LSD_0,05	17,694	15,136	10,955
	LSD_0,01	23,466	20,075	14,529

5.1.3. Varijabilnost duljine klasa

Između ispitivanih genotipova u obje godine pokusa te u dvogodišnjem prosjeku za svojstvo duljine klasa utvrđene su statistički opravdane razlike na razini $p < 0,01$. Također je utvrđena opravdana međuzavosnost ($p < 0,01$) genotipa i godine, dok između ponavljanja statistički opravdane razlike nisu utvrđene (Tablica 20.).

Tablica 20. Analiza varijance za svojstvo duljine klasa

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavljjanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Duljina klasa u vegetacijskoj 2007./2008. kretala se od 10,34 cm (U1) do 6,40 cm (Mihaela). U svih genotipova tijekom vegetacijske 2008./2009. izmjereni su kraći klasovi nego u prvoj godini pokusa. U genotipova U1 i Antonius zabilježeni su najdulji klasovi (9,04 cm), dok je najkraći klas (5,8 cm) izmjeren u genotipova Libellula i Renata (Tablica 21). U dvogodišnjem prosjeku genotip U1 imao je najdulji klas (9,69 cm), dok je genotip Renata imao najkraći (6,11 cm). Koeficijent varijacije ovoga svojstva u 2008. godini iznosio je 12,70%, a u 2009. je iznosio 14,44%. U dvogodišnjem prosjeku bio je viši nego u prvoj godini poljskoga pokusa (13,24%).

Genotip U1 imao je statistički visoko opravdano dulji klas u odnosu na sve ispitivane genotipove u dvogodišnjem prosjeku (Tablica 22). Slijede ga genotipovi Antonius, BC Patria, Ludwig, Golubica i Edison, njihova duljina klasa kretala se od 9,13 do 8,76 cm i između njih nije bilo statistički opravdane razlike. Genotip Renata imao je statistički visoko opravdano kraći klas (6,11 cm) u odnosu na 33 ispitivana genotipa. U odnosu na genotipove Demetru, Luciju i Super Žitarku imao je statistički opravdano kraći klas, dok između genotipova Žitarke, Libellule i Mihaele nije bilo statistički opravdane razlike u duljini klasa. Obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo duljine klasa najviše je variralo u genotipa Edison (12,22%), a najmanje u genotipa Anđelka (1,78%).

Tablica 21. Prosječna duljina klasa (cm) ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	10,34	9,04	9,69
2.	Osječka crvenka	7,21	6,55	6,88
3.	Osječka 20	7,31	6,75	7,03
4.	Slavonija	7,12	6,36	6,74
5.	Žitarka	6,68	6,22	6,45
6.	Srpanjka	6,83	6,56	6,69
7.	Demetra	6,55	6,73	6,64
8.	Super žitarka	6,60	6,42	6,51
9.	Lucija	6,95	6,24	6,59
10.	Renata	6,41	5,80	6,11
11.	Aida	7,77	7,14	7,46
12.	Pipi	7,07	6,41	6,74
13.	Ilirija	7,69	7,20	7,45
14.	Felix	7,99	7,49	7,74
15.	Zlata	7,01	6,77	6,89
16.	Anđelka	6,77	6,72	6,75
17.	Mihaela	6,40	6,01	6,21
18.	Ružica	8,07	7,46	7,76
19.	Zlatna dolina	7,48	6,57	7,03
20.	Golubica	9,12	8,73	8,93
21.	Janica	8,13	7,69	7,91
22.	Barbara	7,35	6,49	6,92
23.	Katarina	8,20	7,88	8,04
24.	Alka	7,60	6,84	7,22
25.	Seka	7,57	6,65	7,11
26.	Lela	8,03	7,55	7,79
27.	Sana	7,89	7,97	7,93
28.	Adriana	8,33	7,35	7,84
29.	Divana	7,21	6,71	6,96
30.	Libellula	6,71	5,80	6,25
31.	Bezostaja	8,53	7,87	8,20
32.	BC Patria	9,36	8,67	9,01
33.	BC Elvira	7,56	7,03	7,29
34.	Soissons	8,17	7,41	7,79
35.	Valerius	8,36	7,85	8,11
36.	Antonius	9,22	9,04	9,13
37.	Bastide	8,11	7,76	7,93
38.	Edison	9,73	7,79	8,76
39.	Eurofit	8,47	8,44	8,45
40.	Ludwig	9,21	8,70	8,96
	CV%	12,70	12,74	13,24
	F_vrijednost	23,05	20,81	12,67
	LSD_0,05	0,547	0,534	0,383
	LSD_0,01	0,726	0,709	0,508

5.1.4. Varijabilnost broja klasića po klasu

Analizom rezultata mjerenja broja klasića po klasu u provedenom istraživanju utvrđene su statistički opravdane razlike na razini $p < 0,01$ između ispitivanih genotipova u obje godine, u dvogodišnjem prosjeku te u međuzavisnosti genotipa i godine. Između ponavljanja tijekom dvije vegetacijske godine i u dvogodišnjem prosjeku nisu utvrđene statistički opravdane razlike (Tablica 23).

Tablica 23. Analiza varijance za svojstvo broja klasića po klasu

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavlanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Broj klasića po klasu u prvoj godini pokusa kretao se od 23,75 (Edison) do 16,15 klasića (Ilirija). U drugoj godini pokusa zabilježen je manji broj klasića u svih ispitivanih genotipova (Tablica 24). Najveći broj klasića po klasu imao je genotip Antonius (19,65), a najmanji genotip Renata (14,41). U dvogodišnjem prosjeku u genotipa Edison utvrđen je najveći broj klasića po klasu (20,87), dok je Ilirija imala najmanji (15,76). Koeficijent varijacije ovoga svojstva u 2008. godini te dvogodišnjem prosjeku bio je podjednak i iznosio je 8,51% i 8,60%. dok je u 2009. godini bio najniži i iznosio je 6,71%.

Genotip Edison imao je statistički visoko opravdano veći broj klasića po klasu (Tablica 25) u odnosu na sve ispitivane genotipove (20,87). Slijede genotipovi Valerius (19,69), Antonius (19,60), Alka (19,48), Ludwig (19,47) i Seka (19,27) između kojih nije bilo statistički opravdanih razlika. Genotip Ilirija imao je statistički visoko opravdano manji broj klasića u klasu u odnosu na 34 ispitivana genotipa, statistički opravdano manji broj u odnosu na genotipove Osječka 20 i Soissons, a statistički se nije razlikovao od genotipova Žitarke, U1 i Renate. Obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo broja klasića po klasu najviše je variralo u genotipa Edison (15,29%), a najmanje u genotipa Barbara (1,48%).

Tablica 24. Prosječni broj klasića po klasu ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	16,63	15,60	16,11
2.	Osječka crvenka	17,52	16,60	17,06
3.	Osječka 20	16,81	15,99	16,40
4.	Slavonija	17,04	16,49	16,77
5.	Žitarka	16,97	15,56	16,27
6.	Srpanjka	17,83	16,43	17,13
7.	Demetra	16,63	17,70	17,16
8.	Super žitarka	17,31	16,24	16,77
9.	Lucija	18,44	17,19	17,81
10.	Renata	17,21	14,41	15,81
11.	Aida	18,13	17,35	17,74
12.	Pipi	17,36	16,08	16,72
13.	Ilirija	16,15	15,38	15,76
14.	Felix	17,25	16,29	16,77
15.	Zlata	17,25	16,61	16,93
16.	Anđelka	18,25	17,47	17,86
17.	Mihaela	17,88	16,85	17,37
18.	Ružica	18,67	17,31	17,99
19.	Zlatna dolina	18,80	17,80	18,30
20.	Golubica	19,16	17,11	18,13
21.	Janica	19,51	18,55	19,03
22.	Barbara	17,64	17,79	17,71
23.	Katarina	19,49	18,59	19,04
24.	Alka	20,52	18,44	19,48
25.	Seka	20,36	18,17	19,27
26.	Lela	19,65	17,29	18,47
27.	Sana	18,80	18,56	18,68
28.	Adriana	18,67	17,43	18,05
29.	Divana	17,61	16,14	16,88
30.	Libellula	18,20	16,12	17,16
31.	Bezostaja	17,95	17,31	17,63
32.	BC Patria	18,81	17,61	18,21
33.	BC Elvira	19,37	18,05	18,71
34.	Soissons	17,72	15,07	16,39
35.	Valerius	22,03	17,36	19,69
36.	Antonius	19,75	19,45	19,60
37.	Bastide	16,90	16,80	16,85
38.	Edison	23,75	18,00	20,87
39.	Eurofit	18,96	17,48	18,22
40.	Ludwig	20,23	18,71	19,47
	CV%	8,51	6,71	8,60
	F_vrijednost	30,44	19,22	17,09
	LSD_0,05	0,763	0,691	0,510
	LSD_0,01	1,013	0,917	0,677

5.1.5. Varijabilnost broja zrna po klasu

Analizom rezultata mjerenja broja zrna po klasu u provedenom istraživanju utvrđene su statistički opravdane razlike na razini $p < 0,01$ između ispitivanih genotipova kako po godinama istraživanja, tako i u dvogodišnjem prosjeku. U prosjeku dvije godine također je utvrđena statistički opravdana ($p < 0,01$) međuzavisnost godine i genotipa. Između ponavljanja tijekom dvije godine pokusa i u dvogodišnjem prosjeku nisu utvrđene statistički opravdane razlike (Tablica 26).

Tablica 26. Analiza varijance za svojstvo broja zrna po klasu

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavljanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Broj zrna po klasu kretao se od 57,25 (Janica) do 33,97 (U1) zrna u 2008. godini (Tablica 27). U 2009., zabilježen je manji broj zrna u svih ispitivanih genotipova, najveći broj zrna po klasu imao je genotip Bastide (53,15), a najmanji U1 (32,07). Koeficijent varijacije ovoga svojstva u 2008. godini iznosio je 8,51%, u 2009. je bio viši i iznosio je 11,85%, a u dvogodišnjem prosjeku iznosio je 12,76%.

U dvogodišnjem prosjeku genotipovi Bastide, Katarina i Janica imali su statistički visoko opravdano veći broj zrna po klasu u odnosu na sve ispitivane genotipove (Tablica 28). BC Patria i Eurofit su imali statistički visoko opravdano veći broj zrna po klasu u odnosu na 35 ispitivanih genotipova, dok između njih nije bilo statistički opravdanih razlika. Statistički visoko opravdano najmanji broj zrna po klasu utvrđen je u tri genotipa (U1, Divana i Renata), a između nisu utvrđene statistički opravdane razlike. Obzirom na dvogodišnji prosjek, svojstvo broja zrna po klasu najviše je variralo u genotipa Mihaela (10,05%), a najmanje u genotipa Ludwig (2,04%).

Tablica 27. Prosječni broj zrna po klasu ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	33,97	32,07	33,02
2.	Osječka crvenka	41,76	35,83	38,79
3.	Osječka 20	43,73	37,69	40,71
4.	Slavonija	43,49	40,29	41,89
5.	Žitarka	42,97	39,33	41,15
6.	Srpanjka	41,84	39,36	40,60
7.	Demetra	47,51	43,79	45,65
8.	Super žitarka	45,52	39,81	42,67
9.	Lucija	48,91	43,20	46,05
10.	Renata	36,61	32,67	34,64
11.	Aida	41,87	40,84	41,35
12.	Pipi	40,28	37,71	38,99
13.	Ilirija	41,04	38,71	39,87
14.	Felix	46,36	39,17	42,77
15.	Zlata	42,00	36,24	39,12
16.	Anđelka	47,20	40,57	43,89
17.	Mihaela	40,24	33,96	37,10
18.	Ružica	50,17	44,99	47,58
19.	Zlatna Dolina	44,80	42,51	43,65
20.	Golubica	49,59	42,83	46,21
21.	Janica	57,25	49,01	53,13
22.	Barbara	45,60	43,73	44,67
23.	Katarina	55,37	51,11	53,24
24.	Alka	43,20	39,13	41,17
25.	Seka	48,27	41,19	44,73
26.	Lela	44,15	42,67	43,41
27.	Sana	49,12	44,87	46,99
28.	Adriana	48,09	40,64	44,37
29.	Divana	34,97	32,60	33,79
30.	Libellula	44,65	40,80	42,73
31.	Bezostaja	43,68	40,87	42,27
32.	BC Patria	52,91	48,03	50,47
33.	BC Elvira	47,27	43,17	45,22
34.	Soissons	43,31	38,17	40,74
35.	Valerius	50,00	45,19	47,59
36.	Antonius	50,71	43,16	46,93
37.	Bastide	56,43	53,15	54,79
38.	Edison	51,43	44,91	48,17
39.	Eurofit	51,29	47,09	49,19
40.	Ludwig	48,91	47,24	48,07
	CV%	8,51	11,85	12,76
	F_vrijednost	24,32	30,54	18,93
	LSD_0,05	2,959	2,390	1,796
	LSD_0,01	3,925	3,169	2,382

5.1.6. Varijabilnost mase 1000 zrna

provedenom istraživanju za svojstvo mase 1000 zrna utvrđene su statistički opravdane razlike ($p < 0,01$) između ispitivanih genotipova tijekom dvije vegetacijske godine i u dvogodišnjem prosjeku. Također je utvrđena statistički opravdana ($p < 0,01$) međuzavisnost genotipa i godine, dok između ponavljanja u pokusu nije bilo statistički opravdanih razlika (Tablica 29).

Tablica 29. Analiza varijance i koeficijenti varijabilnosti za svojstvo mase 1000 zrna

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavljanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Prosječna masa 1000 zrna u ispitivanih genotipova u 2008. godini (Tablica 30) kretala se od 40,85 g (Adriana) do 53,1 g (Barbara). U 2009. godini prosječna masa 1000 zrna kretala se od 39,97 g u genotipa Adriana do 50,52 g u genotipa Barbara. Oba genotipa su i u dvogodišnjem prosjeku imali najmanju (Adriana) i najveću (Barbara) masu 1000 zrna. Koeficijent varijacije ovoga svojstva nije previše odstupao po godinama pokusa te je u 2008. iznosio 7,16%, a u 2009. 6,90%.

Genotipovi Barbara (51,81 g) i Ilirija (51,00 g) imali su statistički visoko opravdano veću masu 1000 zrna od svih ispitivanih genotipova (Tablica 31). Slijede ih genotipovi Pipi i Super Žitarka između kojih nema statistički opravdanih razlika. Genotip Adriana (40,41 g) imao je statistički opravdano manju masu 1000 zrna u odnosu na 29 ispitivanih genotipova, dok je u odnosu na genotipove Seku, Anđelku i Golubicu imao statistički opravdano manju masu 1000 zrna. Slijede genotipovi Zlatna Dolina, Katarina, Srpanjka, Osječka 20, Slavonija, Zlata i Demetra između kojih nije bilo statistički opravdanih razlika u ovom svojstvu. Obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo mase 1000 zrna najviše je variralo u genotipa Osječka Crvenka (8,27%), a najmanje u genotipa Antonius (1,18%).

Tablica 30. Prosječna masa 1000 zrna (g) ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	48,40	46,45	47,43
2.	Osječka crvenka	46,72	41,26	43,99
3.	Osječka 20	41,89	40,23	41,06
4.	Slavonija	41,77	40,35	41,06
5.	Žitarka	45,29	43,87	44,58
6.	Srpanjka	42,15	40,47	41,31
7.	Demetra	41,51	39,82	40,67
8.	Super Žitarka	49,11	47,93	48,52
9.	Lucija	44,13	42,10	43,11
10.	Renata	50,63	44,96	47,80
11.	Aida	43,83	40,49	42,16
12.	Pipi	50,81	47,84	49,33
13.	Ilirija	51,57	50,42	51,00
14.	Felix	47,59	44,88	46,24
15.	Zlata	42,20	39,43	40,82
16.	Anđelka	42,62	41,22	41,92
17.	Mihaela	48,63	46,39	47,51
18.	Ružica	44,76	43,25	44,00
19.	Zlatna Dolina	42,13	40,82	41,48
20.	Golubica	42,66	40,99	41,82
21.	Janica	43,12	41,51	42,32
22.	Barbara	53,10	50,52	51,81
23.	Katarina	42,40	40,52	41,46
24.	Alka	44,77	43,30	44,04
25.	Seka	42,61	41,35	41,98
26.	Lela	44,65	42,22	43,43
27.	Sana	47,43	45,02	46,23
28.	Adriana	40,85	39,97	40,41
29.	Divana	46,20	45,70	45,95
30.	Libellula	44,60	42,66	43,63
31.	Bezostaja	48,58	46,93	47,75
32.	BC Patria	49,23	45,88	47,56
33.	BC Elvira	47,86	45,13	46,49
34.	Soissons	45,29	41,50	43,40
35.	Valerius	43,59	41,43	42,51
36.	Antonius	43,91	44,20	44,06
37.	Bastide	45,18	42,17	43,68
38.	Edison	46,73	43,57	45,15
39.	Eurofit	46,57	43,37	44,97
40.	Ludwig	50,03	44,40	47,22
	CV%	7,16	6,90	7,48
	F_vrijednost	26,61	19,16	13,93
	LSD_0,05	1,695	1,807	1,227
	LSD_0,01	2,248	2,396	1,627

5.1.7. Varijabilnost hektolitarske mase

Analizom rezultata mjerenja hektolitarske mase u provedenom istraživanju utvrđene su statistički opravdane razlike na razini $p < 0,01$ između ispitivanih genotipova u obje godine pokusa. Utvrđeno je statistički opravdano međudjelovanje ($p < 0,01$) genotipa i godine te statistički opravdane razlike između genotipova u dvogodišnjem prosjeku, dok između ponavljanja statistički opravdanih razlika nije bilo (Tablica 32).

Tablica 32. Analiza varijance i koeficijenti varijabilnosti za svojstvo hektolitarske mase

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavljanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

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

Svojstvo hektolitarske mase, u odnosu na ostala mjerena svojstva, najmanje je variralo kako između genotipova, tako i po godinama pokusa te u dvogodišnjem prosjeku (Tablica 33). Najveća prosječna vrijednost hektolitarske mase u 2008. godini i dvogodišnjem prosjeku utvrđena je u genotipa Lela (87,13 kg/hl), dok je genotip Barbara (85,03 kg/hl) imao najveću hektolitarsku masu u 2009. godini. Genotip Bastide je u obje godine pokusa i u dvogodišnjem prosjeku imao najmanju hektolitarsku masu (78,52 kg/hl).

Genotip Lela imao je statistički visoko opravdano veću hektolitarsku masu u odnosu na 36 ispitivanih genotipova (Tablica 34), dok u odnosu na genotipove Valerius, Barbara i Antonius nije bilo statistički opravdanih razlika. Statistički visoko opravdano najmanju hektolitarsku masu u odnosu na sve ispitivane genotipove imao je genotip Bastide (78,52 kg/hl). Slijede genotipovi U1 i Sana između kojih nije bilo statistički opravdanih razlika. Obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo hektolitarske mase najviše je variralo u genotipa Libellula (3,43%), a najmanje u genotipa Eurofit (0,50%).

Tablica 33. Prosječna hektolitarska masa (kg/hl) ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	80,27	80,07	80,17
2.	Osječka crvenka	83,77	80,10	81,93
3.	Osječka 20	85,53	81,13	83,33
4.	Slavonija	84,40	81,80	83,10
5.	Žitarka	85,67	83,03	84,35
6.	Srpanjka	84,70	81,10	82,90
7.	Demetra	82,67	79,83	81,25
8.	Super žitarka	86,77	82,83	84,80
9.	Lucija	84,23	80,33	82,28
10.	Renata	84,77	81,77	83,27
11.	Aida	85,30	81,63	83,47
12.	Pipi	85,50	81,70	83,60
13.	Ilirija	85,60	83,70	84,65
14.	Felix	86,00	82,70	84,35
15.	Zlata	84,10	80,63	82,37
16.	Anđelka	82,53	80,97	81,75
17.	Mihaela	84,20	79,97	82,08
18.	Ružica	85,53	81,40	83,47
19.	Zlatna dolina	83,93	80,03	81,98
20.	Golubica	85,53	84,07	84,80
21.	Janica	85,47	81,87	83,67
22.	Barbara	86,23	85,03	85,63
23.	Katarina	84,53	82,13	83,33
24.	Alka	82,80	81,07	81,93
25.	Seka	83,13	80,00	81,57
26.	Lela	87,13	84,37	85,75
27.	Sana	81,93	79,67	80,80
28.	Adriana	82,17	80,70	81,43
29.	Divana	84,80	82,07	83,43
30.	Libellula	85,43	80,27	82,85
31.	Bezostaja	84,93	82,33	83,63
32.	BC Patria	83,93	80,40	82,17
33.	BC Elvira	82,83	79,03	80,93
34.	Soissons	83,67	81,57	82,62
35.	Valerius	86,57	84,70	85,63
36.	Antonius	86,03	84,90	85,47
37.	Bastide	79,77	77,27	78,52
38.	Edison	82,70	82,33	82,52
39.	Eurofit	84,10	83,53	83,82
40.	Ludwig	84,57	82,37	83,47
	CV%	2,03	2,17	2,66
	F_vrijednost	19,28	19,92	18,35
	LSD_0,05	1,028	1,051	0,714
	LSD_0,01	1,364	1,394	0,947

5.1.8. Varijabilnost uroda zrna

Za svojstvo uroda zrna utvrđene su statistički opravdane razlike na razini $p < 0,01$ između ispitivanih genotipova kako po godinama istraživanja, tako i u dvogodišnjem prosjeku, dok između ponavljanja nisu utvrđene statistički opravdane razlike. Također je utvrđena statistički opravdana ($p < 0,01$) međuzavisnost genotipa i godine u provedenom istraživanju (Tablica 35).

Tablica 35. Analiza varijance i koeficijenti varijabilnosti za svojstvo uroda zrna

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	2008.	2009.	2008./2009.
Genotip	39	**	**	**
Godina	1	-	-	**
Ponavlanje	2	n.s.	n.s.	n.s.
Genotip×godina	39	-	-	**

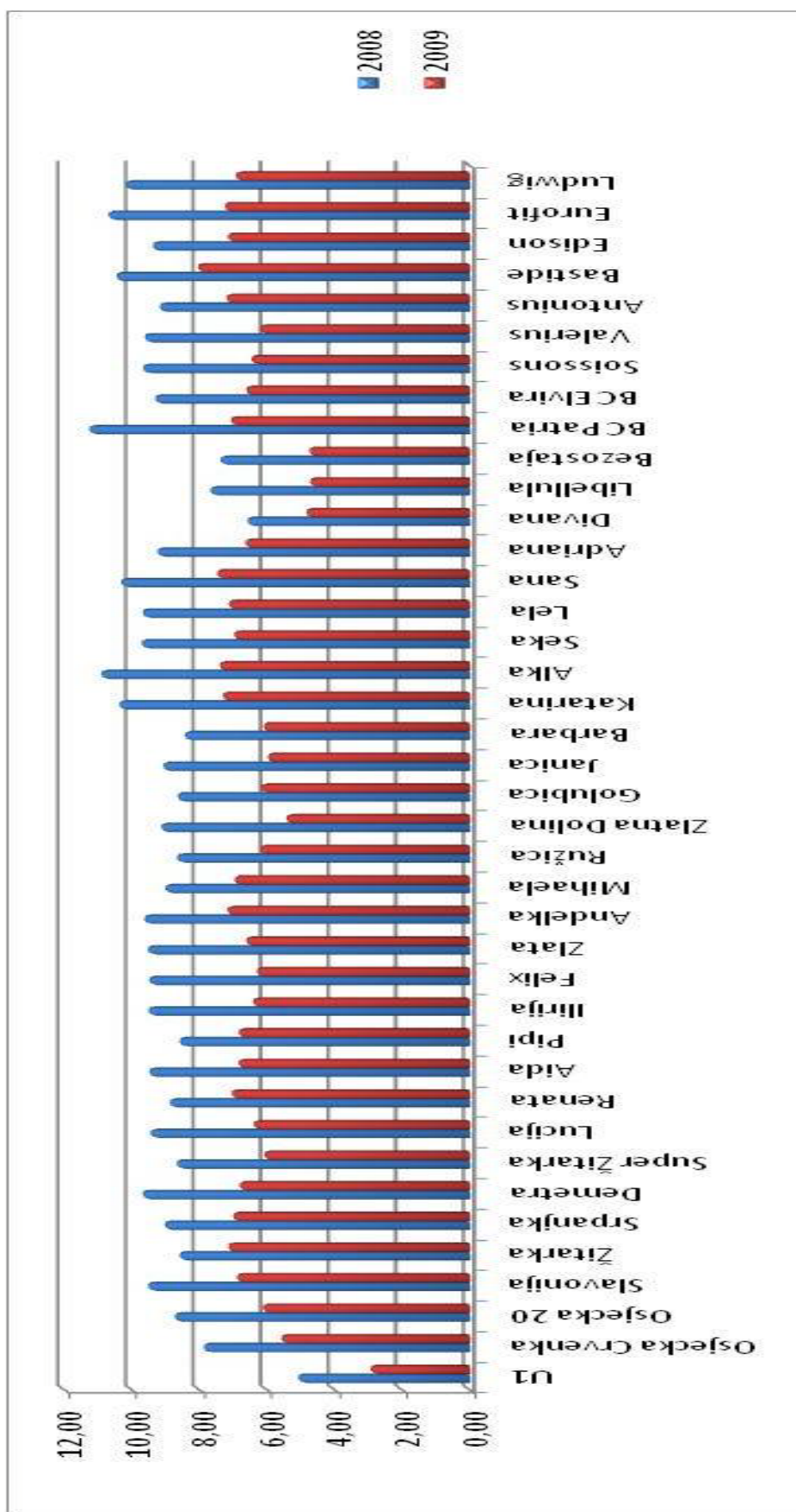
**=statistički značajno na razini $P < 0,01$; *=statistički značajno na razini $P < 0,05$; n.s.=nije statistički značajno

Urod zrna u 2008. (Tablica 36) kretao se od 11,23 t/ha koji je ostvario genotip BC Patria do 5,04 t/ha koji je ostvario genotip U1. U 2009. godini zabilježen je manji urod u svih ispitivanih genotipova, a kretao se od 8,01 t/ha (Bastide) do 2,90 t/ha (U1). Najmanji pad uroda od vegetacijske 2007./2008. do 2008./2009. zabilježen je u genotipa Žitarka te iznosi 1,44 t/ha, a najveći u genotipa BC Patria i iznosi 4,20 t/ha (Grafikon 2). Koeficijent varijacije ovoga svojstva u 2008. godini iznosio je 12,74%, u 2009. je bio veći i iznosio je 15,00%, a u dvogodišnjem prosjeku iznosio je 22,02%.

Statistički visoko opravdano veći urod u odnosu 34 ispitivana genotipa zabilježen je u genotipa Bastide (Tablica 37), dok u odnosu na genotipove BC Patria, Alka, Eurofit i Sanu nije bilo statistički opravdanih razlika. Genotip U1 imao je statistički visoko opravdano najmanji urod zrna od svih ispitivanih genotipova. Slijedi genotip Divana koji je imao statistički opravdano manji urod u odnosu na genotipove Bezostaju i Libelullu, dok između ta dva genotipa nije bilo statistički opravdane razlike. Obzirom na dvogodišnji prosjek svojstvo uroda zrna najviše je variralo u genotipa U1 (30,39%), a najmanje u genotipa Žitarka (10,32%).

Tablica 36. Prosječni urod zrna (t/ha) ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	2008.	2009.	2008./2009.
1.	U1	5,04	2,90	3,97
2.	Osječka crvenka	8,30	5,25	6,77
3.	Osječka 20	8,69	6,08	7,39
4.	Slavonija	9,48	6,48	7,98
5.	Žitarka	8,55	7,11	7,83
6.	Srpanjka	8,99	6,97	7,98
7.	Demetra	9,65	6,40	8,02
8.	Super žitarka	8,31	6,05	7,18
9.	Lucija	9,41	6,36	7,89
10.	Renata	8,84	7,01	7,92
11.	Aida	9,18	6,81	7,99
12.	Pipi	8,55	6,53	7,54
13.	Ilirija	8,98	6,38	7,68
14.	Felix	9,11	6,26	7,69
15.	Zlata	9,83	6,58	8,20
16.	Andelka	9,60	7,13	8,36
17.	Mihaela	8,85	6,54	7,70
18.	Ružica	8,63	6,16	7,40
19.	Zlatna dolina	9,10	5,39	7,24
20.	Golubica	8,61	6,14	7,38
21.	Janica	9,03	5,94	7,49
22.	Barbara	8,63	6,50	7,56
23.	Katarina	10,34	7,27	8,80
24.	Alka	10,75	7,36	9,06
25.	Seka	9,68	6,94	8,31
26.	Lela	9,65	7,10	8,37
27.	Sana	10,28	7,45	8,86
28.	Adriana	9,41	6,60	8,01
29.	Divana	6,35	4,73	5,54
30.	Libellula	7,38	5,06	6,22
31.	Bezostaja	7,60	4,71	6,15
32.	BC Patria	10,88	7,03	8,96
33.	BC Elvira	8,75	6,58	7,66
34.	Soissons	9,97	6,42	8,20
35.	Valerius	9,58	6,17	7,88
36.	Antonius	9,14	6,77	7,95
37.	Bastide	10,42	8,01	9,22
38.	Edison	9,34	7,12	8,23
39.	Eurofit	10,42	7,21	8,82
40.	Ludwig	9,80	7,23	8,52
	CV%	12,74	15,00	22,02
	F_vrijednost	12,42	16,81	20,54
	LSD_0,05	0,725	0,748	0,524
	LSD_0,01	0,961	0,992	0,695



Grafikon 2. Varijabilnost uroda (t/ha) 40 ispitivanih genotipova ozime pšenice

5.1.9. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju količine bjelančevina i škroba u zrnu pšenice

Analiza mjerenja količine bjelančevina u zrnu pšenice ispitivanih genotipova pokazala je da je količina bjelančevina u zrnu u 2008. godini je varirala od 10,1% (BC Patria) do 16,9% (U1), a koeficijent varijacije iznosio je 9,43%. U 2009. godini prosječna količina bjelančevina u zrnu kretala se od 11,4% u genotipa Sana do 16,4% u genotipa U1. Koeficijent varijacije iznosio je 8,32% (Tablica 38).

Obzirom na dvogodišnji prosjek u 17,5% ispitivanih genotipova količina bjelančevina kretala se od 11% do 12%, u 42,5% između 12 i 13%, u 35% genotipova između 13 i 15%, dok su samo dva genotipa, Divana i U1, (5%) imala količinu bjelančevina u rasponu od 15% do 17%.

Analiza rezultata mjerenja količine škroba (Tablica 38) ispitivanih genotipova pokazala je da se prosječna količina škroba u zrnu u 2008. godini kretala od 64,1% u genotipa Divane do 69,3% u genotipa Zlate, a koeficijent varijacije iznosio je 1,57%. U 2009. godini prosječna količina škroba se kretala od 61,6% (Divana) do 67,7% (Zlatna Dolina). Koeficijent varijacije iznosio je 2,19%.

Obzirom na dvogodišnji prosjek ispitivane genotipove možemo svrstati u četiri skupine. Tako su 62,5% genotipova imali količinu škroba od 65-66%, 30% genotipova 67-68%, a samo dva genotipa (5%) imali su količinu škroba od 63-64%. Genotip Divana imao je najmanju količinu škroba (62,9%).

Tablica 38. Količina bjelančevina i škroba u zrnu ispitivanih genotipova

Br.	genotip	2008.		2009.		Prosjek	
		bjelančevine	škrob	bjelančevine	škrob	bjelančevine	škrob
1	U1	16,9	65,4	15,8	62,6	16,4	64,0
2	Osječka Crvenka	13,4	68,1	16,5	65,4	15,0	66,8
3	Osječka 20	13,2	68,0	14,3	65,5	13,8	66,8
4	Slavonija	12,2	67,7	13,0	63,9	12,6	65,8
5	Žitarka	13,0	66,6	14,4	65,2	13,7	65,9
6	Srpanjka	12,2	68,9	12,3	65,1	12,3	67,0
7	Demetra	11,7	68,8	12,6	67,4	12,2	68,1
8	Super Žitarka	12,9	68,4	13,6	66,9	13,3	67,7
9	Lucija	11,6	69,0	12,6	66,4	12,1	67,7
10	Renata	12,3	68,4	13,5	63,2	12,9	65,8
11	Aida	12,0	68,1	13,3	62,7	12,7	65,4
12	Pipi	12,4	68,9	13,0	64,8	12,7	66,9
13	Ilirija	12,9	67,9	14,2	66,5	13,6	67,2
14	Felix	12,5	68,9	13,0	66,0	12,8	67,5
15	Zlata	11,2	69,3	12,4	65,8	11,8	67,6
16	Anđelka	12,1	68,8	12,7	66,8	12,4	67,8
17	Mihaela	12,5	68,4	12,7	65,1	12,6	66,8
18	Ružica	13,1	67,9	13,2	65,2	13,2	66,6
19	Zlatna Dolina	11,8	68,0	13,6	67,7	12,7	67,9
20	Golubica	13,0	67,8	13,3	65,1	13,2	66,5
21	Janica	12,6	67,3	13,2	64,5	12,9	65,9
22	Barbara	13,3	67,7	13,6	65,8	13,5	66,8
23	Katarina	11,7	68,6	12,5	65,7	12,1	67,2
24	Alka	11,4	68,3	11,5	65,8	11,5	67,1
25	Seka	12,1	69,0	12,5	66,0	12,3	67,5
26	Lela	12,6	67,3	13,6	64,6	13,1	66,0
27	Sana	11,4	67,6	11,4	64,2	11,4	65,9
28	Adriana	11,3	67,5	11,9	63,9	11,6	65,7
29	Divana	14,9	64,1	15,2	61,6	15,1	62,9
30	Libelula	13,3	68,2	13,6	65,3	13,5	66,8
31	Bezostaja	13,3	66,5	13,3	63,6	13,3	65,1
32	BC Patria	10,1	68,3	12,5	63,9	11,3	66,1
33	BC Elvira	10,7	66,3	12,35	66,0	11,5	66,2
34	Soissons	11,5	67,5	12,0	63,7	11,8	65,6
35	Valerius	12,7	67,8	13,9	64,8	13,3	66,3
36	Antonius	14,4	66,0	14,7	64,2	14,6	65,1
37	Bastide	11,5	67,9	13,15	62,0	12,3	65,0
38	Edison	13,6	66,6	15,1	63,2	14,4	64,9
39	Eurofit	12,5	67,1	12,6	65,8	12,6	66,5
40	Ludwig	12,6	67,5	12,4	63,8	12,5	65,7
	CV%	9,43	2,19	8,32	1,57	8,90	1,65

5.2 Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju morfoloških podataka

Analiza genotipova pšenice na temelju ocjena 10 morfoloških svojstava izdvojila je genotip U1 kao najudaljeniji i različitiji od ostalih ispitivanih genotipova. Svojstvo br. 16 (boja klasa) je bilo jednako za sve genotipove, većina je imala bijelu boju klasa, osim u genotipova Osječka Crvenka i Libellula koji su imali obojan klas u zriobi. Obzirom na svojstvo boje zrna (br. 24.) samo je sedam genotipova imalo bijelo zrno dok su ostala 33 genotipa imali crvenu boju zrna (Tablica 39).

Na temelju utvrđenih kvalitativnih vrijednosti izrađena je matrica, a na temelju nje je izračunat koeficijent Roger-Tanimotove sličnosti (RT_{ij}) između ispitivanih genotipova (Tablica 70, prilog 2). Na temelju matrice sličnosti izrađen je dendogram koristeći UPGMA metodu (Grafikon 3).

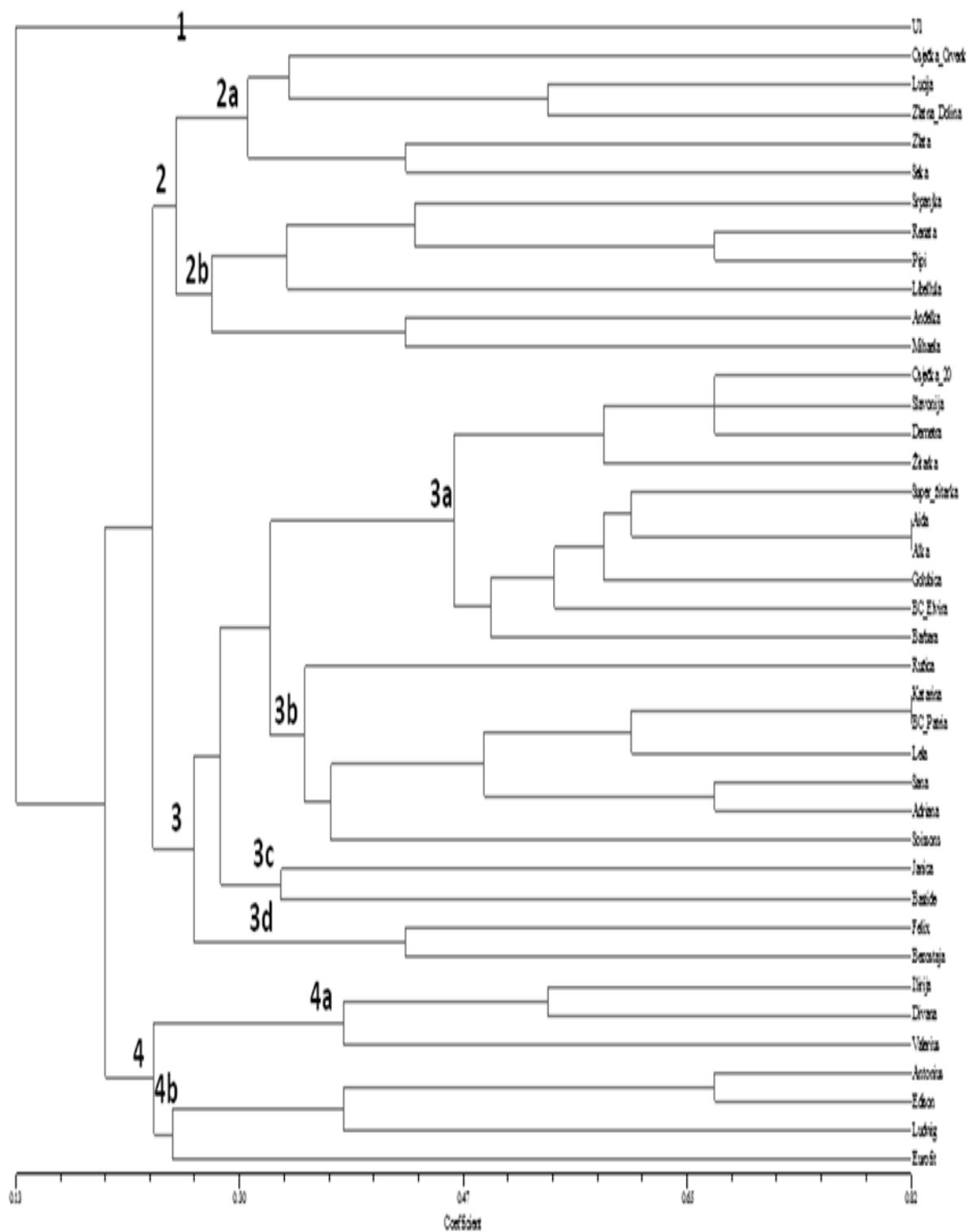
Prosječna sličnost (RT_{ij}) između svih ispitivanih genotipova iznosila je 0,26. Najveći koeficijent sličnosti ($RT_{ij}=0,82$) utvrđen je između genotipova Katarina i BC Patria te genotipova Alka i Aida. Prosječna sličnost (RT_{ij}) genotipa U1 u usporedbi sa svim ispitivanim genotipovima je najmanja i iznosi 0,13 što ga čini morfološki najrazličitijim genotipom.

Na dendogramu (Grafikon 3) genotipovi se mogu razdvojiti na četiri skupine. Genotip U1 se izdvaja kao posebna. Drugu skupinu čini 11 genotipova, koji se unutar te skupine mogu podijeliti na još dvije. Podskupinu 2a čine pet genotipova (Osječka Crvenka, Lucija, Zlatna Dolina, Zlata i Seka), dok podskupinu 2b čine šest genotipova (Srpanjka, Renata, Pipi, Libellula, Anđelka i Mihaela). Treću skupinu čini 21 genotip, koja se može podijeliti na još tri podskupine. Deset genotipova su svrstani u podskupinu 3a, od koji su Alka i Aida morfološki jednake. Podskupinu 3b čine šest genotipova, prvi je Soissons, a posljednji Katarina i BC Patria koje se morfološki ne razlikuju te genotip Ružica koji je pridružen toj podskupini. Unutar podskupine 3c su genotipovi Janica i Bastide, dok podskupinu 3d čine Felix i Bezostaja. U četvrtoj skupini izdvajaju se svi austrijski genotipovi (Eurofit, Ludwig, Edison, Antonius i Valerius) te dva hrvatska genotipa Divana i Ilirija.

Tablica 39. Matrica ispitivanih morfoloških svojstava sorata prema UPOV-oj klasifikaciji za DUS

Br.	Genotip	Ocjene prema UPOV-u*									
		2.	5.	6.	7.	9.	12.	14.	15.	16.	24.
1.	U1	2	6	3	3	9	1	2	9	1	1
2.	Osječka Crvenka	4	3	5	3	3	5	2	3	2	2
3.	Osječka 20	5	3	7	5	3	5	2	3	1	2
4.	Slavonija	2	3	7	5	3	5	2	1	1	2
5.	Žitarka	6	3	7	5	3	7	2	1	1	2
6.	Srpanjka	3	1	3	3	1	3	2	1	1	2
7.	Demetra	5	3	5	5	3	5	2	1	1	2
8.	Super Žitarka	3	4	7	5	3	5	2	1	1	2
9.	Lucija	3	1	5	3	3	7	2	1	1	1
10.	Renata	5	1	5	3	1	5	2	1	1	2
11.	Aida	3	5	7	5	3	5	2	3	1	2
12.	Pipi	5	4	5	3	1	5	3	1	1	2
13.	Ilirija	5	5	7	5	5	4	3	3	1	2
14.	Felix	5	3	9	9	1	5	2	5	1	2
15.	Zlata	5	2	7	3	1	5	2	3	1	1
16.	Anđelka	4	3	5	5	1	6	2	1	1	2
17.	Mihaela	2	2	4	5	1	7	2	1	1	2
18.	Ružica	4	2	4	6	3	4	2	5	1	2
19.	Zlatna Dolina	3	5	5	3	3	5	2	3	1	1
20.	Golubica	3	5	7	5	3	3	2	7	1	2
21.	Janica	3	3	6	6	3	5	1	5	1	2
22.	Barbara	3	4	6	5	3	7	2	3	1	2
23.	Katarina	4	4	5	4	3	5	2	5	1	2
24.	Alka	3	5	7	6	3	5	2	3	1	2
25.	Seka	4	3	4	3	1	6	2	3	1	1
26.	Lela	3	4	5	4	3	6	2	5	1	2
27.	Sana	4	4	7	7	3	5	2	5	1	2
28.	Adriana	4	4	7	5	3	5	2	5	1	1
29.	Divana	4	4	5	5	5	4	3	3	1	2
30.	Libelula	3	1	3	3	5	5	1	1	2	2
31.	Bezostaja	7	6	9	7	5	5	2	5	1	2
32.	BC Patria	4	4	5	4	3	5	2	7	1	2
33.	BC Elvira	5	5	7	5	3	7	2	3	1	2
34.	Soissons	5	4	1	1	3	4	3	5	1	2
35.	Valerius	7	8	7	5	5	7	3	5	1	2
36.	Antonius	5	9	4	4	5	3	3	7	1	2
37.	Bastide	9	6	7	7	3	7	1	5	1	2
38.	Edison	5	9	6	4	5	5	3	7	1	2
39.	Eurofit	4	9	5	4	5	4	2	5	1	1
40.	Ludwig	5	9	5	7	7	5	2	7	1	2

* 2. Biljka: tip busanja, 5. Vrijeme klasanja, 6. List zastavičar: voštana prevlaka na rukavcu, 7. Klas: voštanost, 9. Biljka: visina, 12. Klas: zbijenost, 14. Klas: duljina, 14. Osje ili produžetak pljevica: prisutnost, 16. Klas: boja i 24. Zrno: boja



Grafikon 3. Dendrogram UPGMA za 40 genotipova na temelju matrice genetske sličnosti morfoloških podataka.

5.3. Procjena različitosti ispitivanih genotipova na temelju molekularnih podataka

5.3.1. Različito visokomolekularnih podjedinica glutenina pšenice

Analizom sastava i udjela visokomolekularnih (HMW) podjedinica glutenina (GS) ispitivanih genotipova (35) pšenice utvrđeno je da je nulti alel (N) bio najčešća podjedinica glutenina na *Glu-A1* lokusu, ukupno 13 genotipova ili 37,14%. U 12 genotipova utvrđena je podjedinica 2* (34,29%), a u 10 genotipova utvrđena je podjedinica 1 (28,57%). Na lokusu *Glu-B1* najčešće GS su bile 7+9 (14 ili 40 %), slijedile su 7+8 s frekvencijom od 37,1%, u četiri genotipa su utvrđene GC 6+8 (11,4%), dva genotipa su imala GS 17+18, po jedan genotip je nosio GS 14+15 (U1) te GS 20 (Libellula). Na *Glu-D1* lokusu najzastupljenija je bila GS 2+12, ukupno 18 genotipova ili 51,43%, slijedile su GS 5+10 sa 16 genotipova (45,7%), dok je GS 3+12 imao samo genotip Bastide (Tablica 40).

Genotipovi s najvećim brojem bodova (10) su Aida, Pipi, Ilirija, Felix, Katarina i Soissons, slijede genotipovi s devet bodova Demetra, Seka, Bezostaja, Divana, BC Patria, Antonius, Edison i Eurofit. Genotip U1 ostvario je ocjenu 5, a genotip Sana je ostvarila najmanji broj bodova (4).

Na temelju matrice HMW GS izračunat je genetski varijacijski index H_e za svaki lokus (Tablica 41). Prosječna genetska različitost (H_e) unutar svih ispitivanih genotipova iznosila je 0,31, za lokus *Glu-A1* je bila najveća i iznosila 0,44, za lokus *Glu-B1* je bila najmanja (0,23), dok je za lokus *Glu-D1* iznosila 0,35.

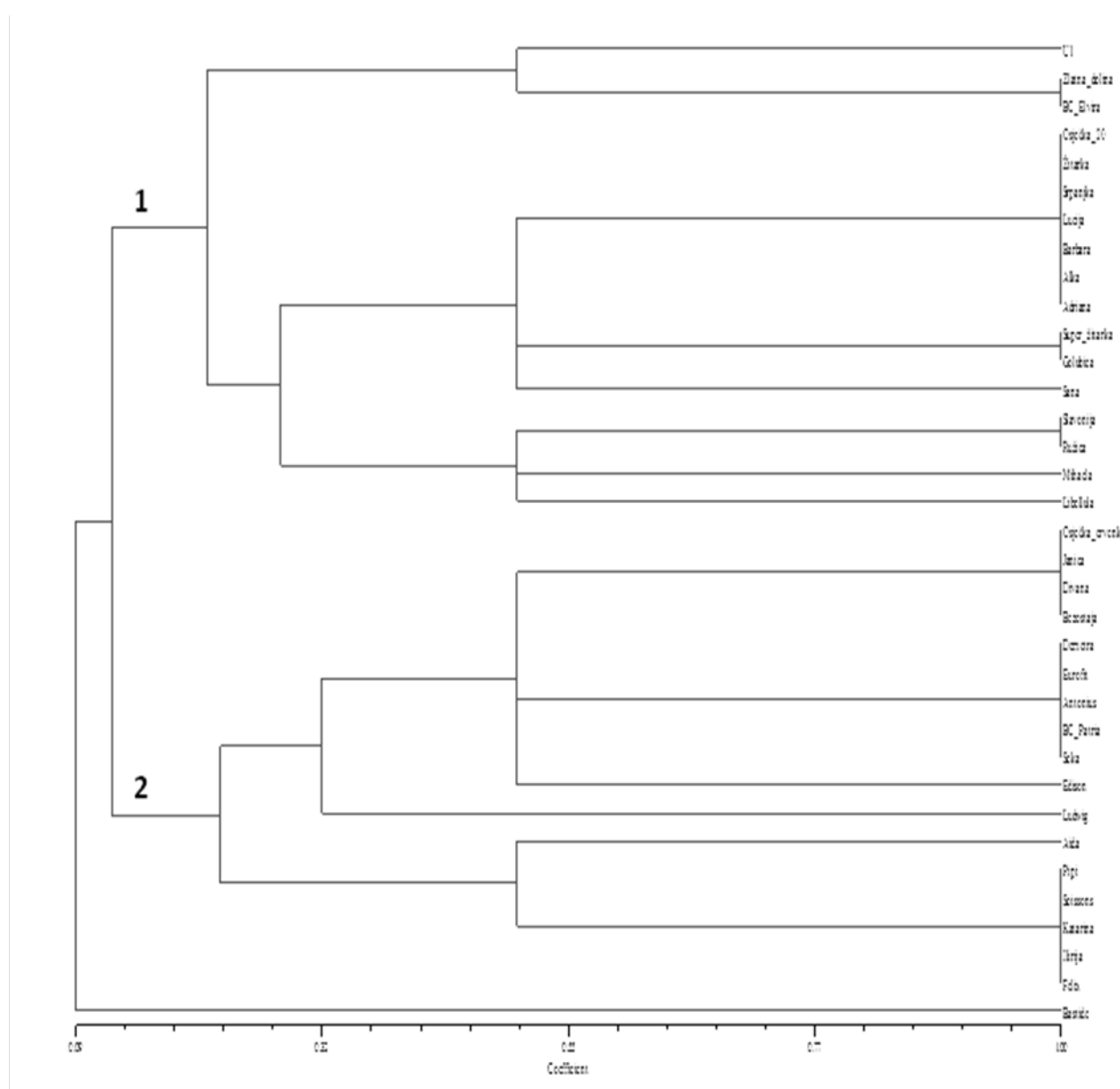
Klaster analiza obavljena je pomoću koeficijenta sličnosti te je na temelju matrice izrađen dendrogram pomoću UPGMA (Grafikon 4). Ispitivani genotipovi grupirali su se prema *Glu-D1* lokusu: prvu skupinu predstavlja ukupno 18 genotipova sa podjedinicama glutenina 2+12, a drugu 17 genotipova sa podjedinicama glutenina 5+10. Posebno se izdvojio genotip Bastide koji je jedini imao podjedinicu glutenina 3+12 na *Glu-D1* lokusu.

Tablica 40. Varijabilnost sastava i udjela HMW podjedinica glutenina genotipova pšenice

Visokomolekularne podjedinice glutenina				
Genotip	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	Glu 1 – bodovi
U1	2*	14+15	2+12	5
Osječka Crvenka	N	7+9	5+10	7
Osječka 20	N	7+8	2+12	6
Slavonija	1	7+9	2+12	5
Žitarka	1	7+8	2+12	8
Srpanjka	N	7+8	2+12	6
Demetra	1	7+9	5+10	9
Super Žitarka	N	7+9	2+12	5
Lucija	N	7+8	2+12	6
Aida	2*	17+18	5+10	10
Pipi	2*	7+8	5+10	10
Ilirija	2*	7+8	5+10	10
Felix	2*	7+8	5+10	10
Mihaela	1	7+8	2+12	8
Ružica	1	7+9	2+12	7
Zlatna Dolina	2*	6+8	2+12	6
Golubica	N	7+9	2+12	5
Janica	N	7+9	2+12	5
Barbara	N	7+8	2+12	6
Katarina	2*	7+8	5+10	10
Alka	N	7+8	2+12	6
Seka	1	7+9	5+10	9
Sana	N	6+8	2+12	4
Adriana	N	7+8	2+12	6
Divana	2*	7+9	5+10	9
Libellula	1	20	2+12	6
Bezostaja	2*	7+9	5+10	9
BC Patria	1	7+9	5+10	9
BC Elvira	2*	6+8	2+12	6
Soissons	2*	7+8	5+10	10
Antonius	1	7+9	5+10	9
Bastide	N	17+18	3+12	6
Edison	2*	7+9	5+10	9
Eurofit	1	7+9	5+10	9
Ludwig	N	6+8	5+10	6

Tablica 41. Frekvencije HMW podjedinica glutenina (GS) u ispitivanim genotipovima i genetska različitost (H_e)

<i>Glu-A1</i> ($H_e=0,44$)			<i>Glu-B1</i> ($H_e=0,23$)			<i>Glu-D1</i> ($H_e=0,35$)		
Podjedinica	Alel	Frekv. %	Podjedinica	Alel	Frekv. %	Podjedinica	Alel	Frekv. %
1	<i>a</i>	28,6	7+8	<i>b</i>	37,1	2+12	<i>a</i>	51,4
2*	<i>b</i>	34,3	7+9	<i>c</i>	40,0	3+12	<i>b</i>	2,8
N	<i>c</i>	37,1	6+8	<i>d</i>	11,4	5+10	<i>d</i>	45,7
			20	<i>e</i>	2,8			
			14+15	<i>h</i>	2,8			
			17+18	<i>i</i>	5,7			



Grafikon 4. Dendrogram na temelju matrice genetske udaljenosti sastava HMW podjedinica glutenina.

5.3.2. Različnost sadržaja škroba u zrnu pšenice

U provedenom istraživanju utvrđene su statistički visoko opravdane razlike ($p < 0,01$) između ispitivanih genotipova za svojstvo sastava škroba u zrnu pšenice (Tablica 42).

Korišteni su transformirani podaci za količinu amiloze i amilopektina prilikom izračunavanja ANOVA-e.

Tablica 42. Analiza varijance omjera amiloze i amilopektina u zrnu pšenice ispitivanih genotipova

Izvor variranja	Stupnjevi slobode	F vrijednost	Pr>F
Genotip	39	374,88	**
Ponavljanje	3	0,66	n.s.

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

Najmanji omjer amiloze i amilopektina (Am/Amp) utvrđen je u genotipa Bezostaja (0,06), a najveći omjer Am/Amp utvrđen je u genotipa Srpanjke (1,00) (Tablica 43). Prosječna vrijednost količine amiloze za sve genotipove iznosila je 20,73%, dok je za amilopektin iznosila 79,27%. Koeficijent varijacije omjera Am/Amp iznosio je 6,94%.

Statistički visoko opravdano najveći omjer, odnosno najveći sadržaj amiloze i najmanji sadržaj amilopektina u odnosu na sve ispitivane genotipove, utvrđen je u sorte Srpanjka (Tablica 44). Slijede genotipovi Demetra i Slavonija između kojih nije bilo statistički opravdane razlike. Genotip Bezostaja imao je statistički visoko opravdano najmanji omjer, odnosno najmanji sadržaj amiloze i najveći sadržaj amilopektina u odnosu na 38 ispitivanih genotipova. U odnosu na genotipove Super Žitarka i Valerius nisu postojale statistički opravdane razlike. Većina genotipova (22) je imala sadržaj amiloze u rasponu od 15% do 35%.

Tablica 43. Količina i omjer amiloze i amilopektina u zrnu pšenice ispitivanih genotipova

Red. br.	Genotip	%amiloze	%amilopektina	Omjer Am/Amp
1.	U1	9,52	90,48	0,11
2.	Osječka Crvenka	15,55	84,45	0,18
3.	Osječka 20	26,20	73,80	0,36
4.	Slavonija	45,92	54,08	0,85
5.	Žitarka	42,74	57,26	0,75
6.	Srpanjka	50,02	49,98	1,00
7.	Demetra	46,39	53,61	0,87
8.	Super Žitarka	8,26	91,74	0,09
9.	Lucija	22,59	77,41	0,29
10.	Renata	17,18	82,82	0,21
11.	Aida	28,22	71,78	0,39
12.	Pipi	23,53	76,47	0,31
13.	Ilirija	20,99	79,01	0,27
14.	Felix	18,89	81,11	0,24
15.	Zlata	14,15	85,85	0,17
16.	Anđelka	25,23	74,77	0,35
17.	Mihaela	23,72	76,28	0,31
18.	Ružica	28,80	71,20	0,41
19.	Zlatna Dolina	13,88	86,12	0,16
20.	Golubica	13,16	86,84	0,15
21.	Janica	14,58	85,42	0,17
22.	Barbara	16,67	83,33	0,20
23.	Katarina	13,49	86,51	0,16
24.	Alka	13,49	86,51	0,16
25.	Seka	10,93	89,07	0,13
26.	Lela	14,35	85,65	0,17
27.	Sana	15,94	84,06	0,19
28.	Adriana	15,01	84,99	0,18
29.	Divana	19,37	80,63	0,24
30.	Libellula	18,74	81,26	0,23
31.	Bezostaja	5,63	94,37	0,06
32.	BC Patria	27,27	72,73	0,38
33.	BC Elvira	26,43	73,57	0,36
34.	Soissons	12,72	87,28	0,15
35.	Valerius	7,56	92,44	0,08
36.	Antonius	10,40	89,60	0,12
37.	Bastide	18,96	81,04	0,24
38.	Edison	29,49	70,51	0,42
39.	Eurofit	24,23	75,77	0,33
40.	Ludwig	16,75	83,25	0,20
			CV%	6,94
			F_vrijednost	374,88
			LSD_0,05	0,0304
			LSD_0,01	0,0402

5.3.3. Procjena genetske različitosti na razini DNA

5.3.3.1. Procjena i izračun genetske udaljenosti ispitivanih genotipova pomoću mikrosatelita

Na temelju obavljene molekularne analize genetske različitosti ispitivanih genotipova ozime pšenice umnoženo je ukupno 108 različitih alela koristeći set od 26 mikrosatelitnih markera. Amplificirano je ukupno 1022 umnožena proizvoda ili 98,27%, od ukupno 1040, a u 18 slučajeva zabilježena je neuspjela amplifikacija (1,73%). Ishodišna matrica umnoženih alela u parovima baza ispitivanih genotipova prikazana je u tablici 71 (prilog 2).

Mikrosateliti gwm2, gwm68, gwm121, gwm311 i gwm573 su se amplificirali na dva nevezana lokusa, gwm497 na tri, a ostali su bili specifični za pojedini lokus. Polimorfnost mikrosatelitnih markera i genetska različitost analizirana je koristeći broj alela (N_a), gensku različitost (H_e) i polimorfizam (PIC). Broj alela po mikrosatelitu kretao se od dva (gwm311_1) do 11 (gwm609), a prosječni broj iznosio je 3,88 alela. Najveća genska različitost ($H_e=0,81$) kao i najveći PIC (0,79) utvrđeni su mikrosatelitom gwm609, a najmanja genska različitost ($H_e=0,26$) i najmanji PIC (0,22) mikrosatelitom gwm311_1. Prosječna genska različitost unutar ispitivanih genotipova iznosila je 0,57, a polimorfizam 0,50 (Tablica 45).

Između ostalih mikrosatelitnih početnica u istraživanju je korišten i mikrosatelit gwm261 kojim su umnoženi aleli na lokusu Xgwm261 koji je udaljen 0,6 cM od lokusa gena *Rht8*. Alel duljine 192 parova baza (pb) utvrđen je za ukupno 28 ispitivanih genotipova, od kojih su 26 hrvatskih te od stranih talijanski genotip Libellula i ruski Bezostaja. U šest sorata je utvrđen alel duljine 174 pb, od kojih su tri hrvatske (Aida, Ilirija i Felix), dvije austrijske (Edison i Ludwig) te francuski genotip Soissons. Alel od 165 pb utvrđen je u četiri sorte (U1, Osječka 20, Bastide i Eurofit), dok je jedinstveni alel od 196 pb utvrđen u dva austrijska genotipa (Valerius i Antonius).

Ishodišna matrica korištena je za izračun matrice genetske udaljenosti koristeći Rogers-ovu udaljenost (Tablica 72, prilog 2). Prosječna genetska udaljenost (d_{ij}) između svih ispitivanih genotipova iznosila je 0,66. Najmanja udaljenost utvrđena je između genotipova Super Žitarka i Barbara ($d_{ij}=0,21$), dok je najveća udaljenost utvrđena između genotipova Zlatna

Dolina i Lela ($d_{ij}=0,98$). Na temelju matrice genetske udaljenosti između svih ispitivanih genotipova pomoću UPGMA metode izrađen je dendrogram (Grafikon 5).

Tablica 45. Mjesto lokusa na kromosomima pšenice, broj alela (N_a), genska različitost (H_e) i polimorfizam (PIC) za 26 mikrosatelitnih markera

Mikrosatelitni marker	Lokus	N_a	H_e	PIC
gwm2_1	3A	3	0,405	0,368
gwm2_2	3D	3	0,591	0,522
gwm11	1B	6	0,694	0,632
gwm55	6D	2	0,495	0,372
gwm68_1	5B	3	0,620	0,548
gwm68_2	7B	4	0,622	0,551
gwm121_1	5D	2	0,495	0,372
gwm121_2	7D	3	0,646	0,574
gwm135	1A	4	0,706	0,649
gwm149	4B	5	0,411	0,381
gwm169	6A	6	0,723	0,677
gwm186	5A	4	0,716	0,662
gwm257	2B	3	0,509	0,402
gwm261	2D	4	0,475	0,440
gwm311_1	2A	2	0,255	0,222
gwm311_2	2D	3	0,304	0,282
gwm458	1D	3	0,646	0,571
gwm497_1	1A	4	0,638	0,564
gwm497_2	2A	6	0,711	0,657
gwm497_3	3D	2	0,469	0,359
gwm573_1	7A	3	0,659	0,585
gwm573_2	7B	5	0,565	0,519
gwm609	4D	11	0,814	0,787
gwm610	4A	3	0,624	0,553
gwm626	6B	4	0,444	0,365
gwm642	1D	3	0,541	0,455
	Prosjek	3,88	0,568	0,503

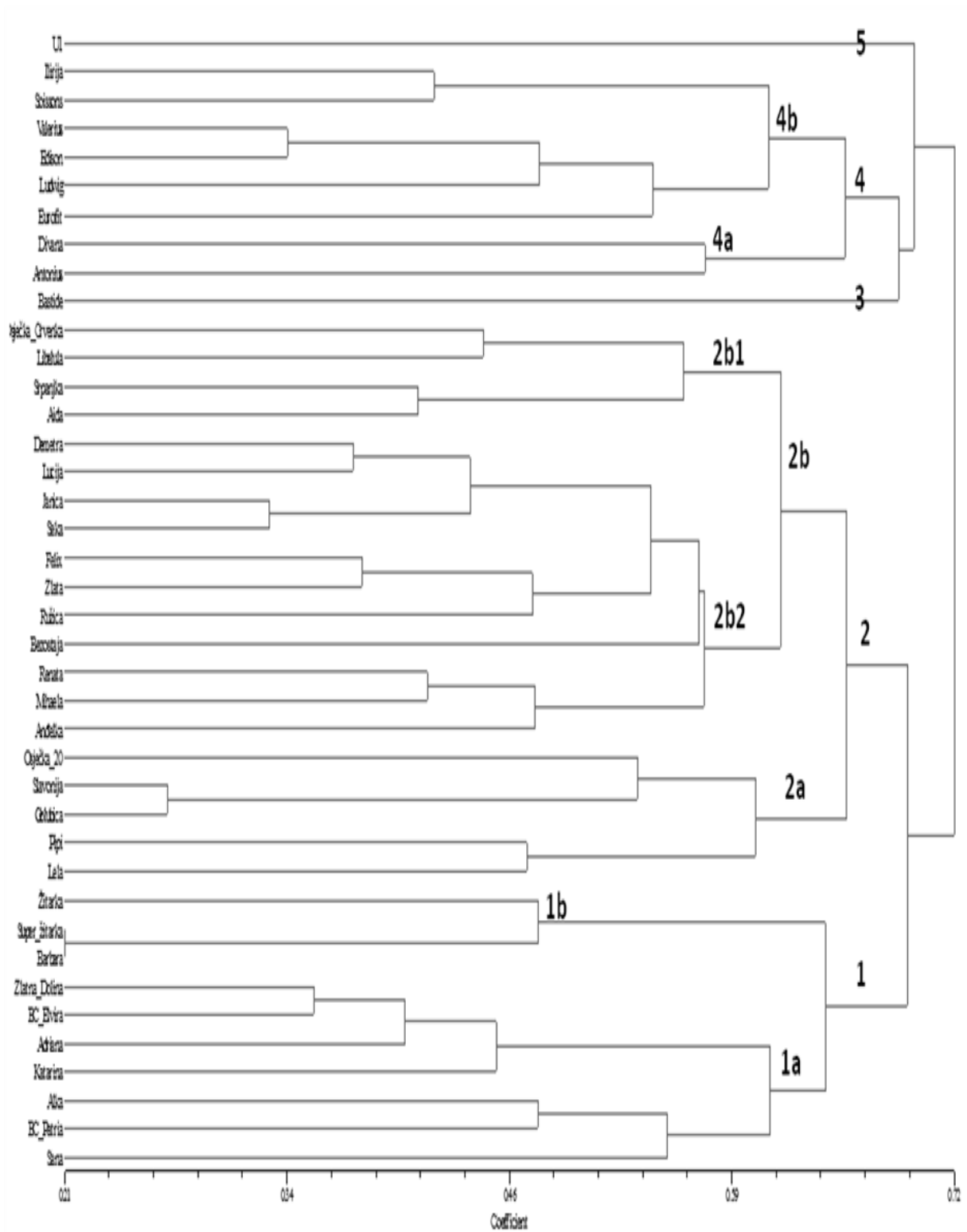
Prema prikazanom dendrogramu sve genotipove je bilo moguće razlikovati. Najmanje udaljenosti utvrđene su, osim za gore navedene Super Žitarku i Barbaru, između Slavonije i Golubice ($d_{ij}=0,27$). Ispitivane genotipove možemo svrstati u pet skupina. Prvu skupinu čini 10 genotipova koji su razvrstani u dvije podskupine. U podskupinu 1a svrstano je sedam

genotipova, od kojih su pet podrijetlom iz BC instituta te dva genotipa Poljoprivrednog instituta u Osijeku (Alka i Katarina). Podskupinu 1b čine tri genotipa Žitarka, Super Žitarka i Barbara. U drugu skupinu svrstano je ukupno 20 genotipova u dvije podskupine. Podskupinu 2a čine pet genotipova Osječka 20, Slavonija, Golubica, Pipi i Lela. Podskupinu 2b možemo podijeliti na dva dijela. Prvi koju čini 11 genotipova, od koji je Lela prvi, a posljednji Demetra te drugi dio koji čine četiri genotipa (Aida, Srpanjka, Libellula i Osječka Crvenka). Treću skupinu čini genotip Bastide. U četvrtu skupinu svrstano je osam genotipova u dvije podskupine, od kojih dva Divana i Antonius pripadaju podskupini 4a, a skupini 4b pripadaju četiri austrijska (Eurofit, Ludwig, Edison i Valerius), jedan francuski (Soissons) i jedan hrvatski genotip (Ilirija). Genotip U1 pripada posljednjoj petoj skupini.

U Tablici 46. prikazan je broj mikrosatelitnih alela u 40 ispitivanih genotipova podijeljenih u tri različita razdoblja prema godinama priznavanja. Također je prikazan broj izgubljenih i novootkrivenih alela u odnosu na razdoblje od 1936. do 1980. godine. Ukupan broj izgubljenih alela za razdoblje od 1981. do 1999. je četiri, dok je za razdoblje od 2000. do 2008. veći i iznosi šest alela. U drugom razdoblju zabilježen je porast novih alela za devet, dok je u trećem razdoblju također zabilježen rast i to za 10 alela, tako je ukupno veći broj novih nego izgubljenih alela (9) s obzirom na prvo razdoblje priznavanja genotipova.

Tablica 46. Broj mikrosatelitnih alela u 40 ispitivanih genotipova prema razdobljima oplemenjivanja

Razdoblje oplemenjivanja	Broj genotipova	Broj alela		
		Ukupno	Izgubljeni	Novi
1. 1936. – 1980.	6	74	-	-
2. 1981. – 1999.	13	78	4	9
3. 2000. – 2008.	20	79	6	10



Grafikon 5. UPGMA dendrogram za 40 genotipova temeljem matrice genetske udaljenosti (d_{ij}).

5.3.3.2. Procjena i izračun genetske udaljenosti ispitivanih genotipova pomoću AFLP markera

Pomoću četiri kombinacije AFLP početnica proizvedeno je ukupno 108 polimorfnih fragmenata. Najviše polimorfnih fragmenata je proizvedeno kombinacijom SseTC/MseGA (33), a najmanje SseTC/MseAT (20) (Tablica 47).

Tablica 47. Odabrane kombinacije početnica za AFLP analizu, broj polimorfnih fragmenata i PIC

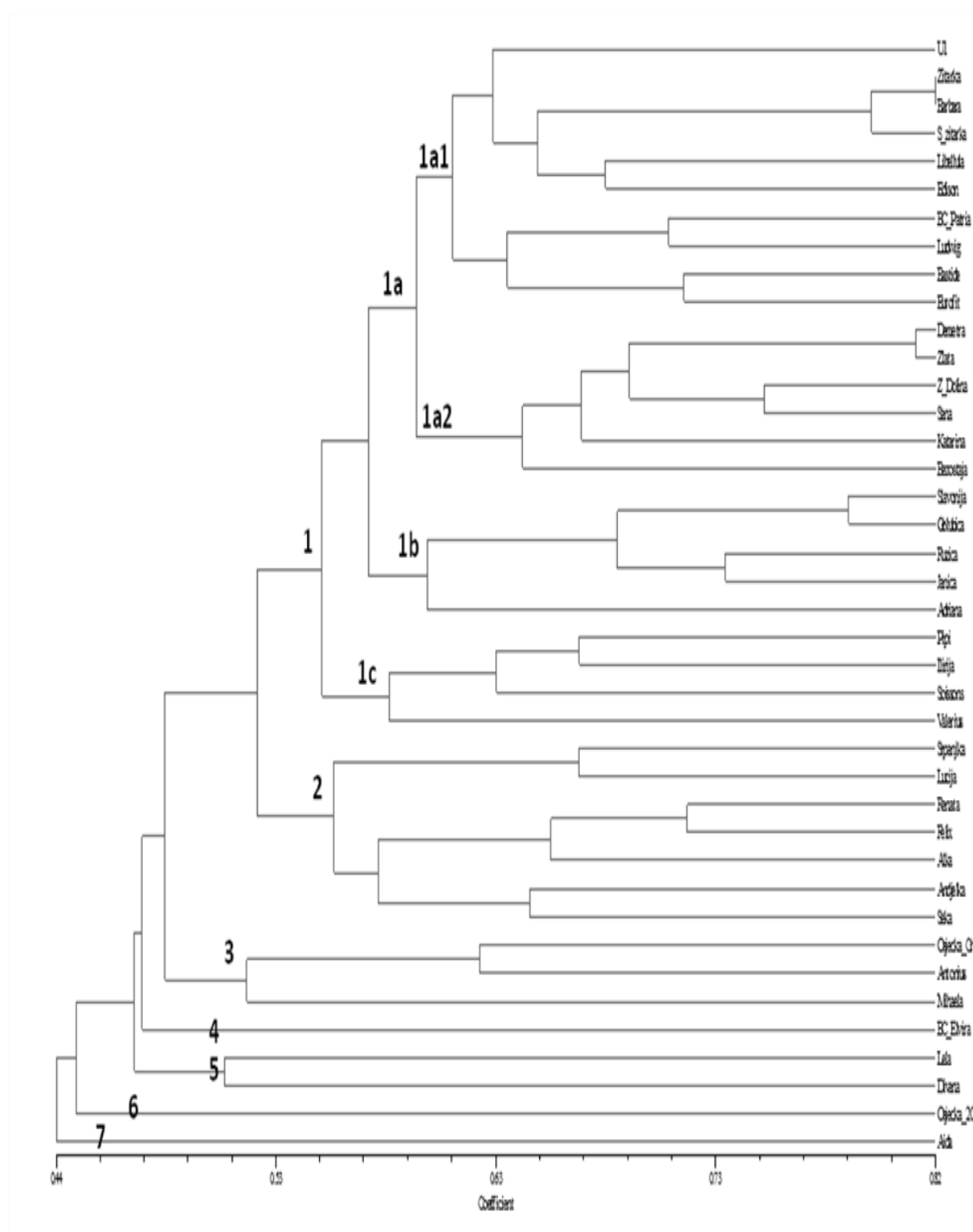
Kombinacija AFLP početnica	Broj polimorfnih fragmenata (np_i)	Broj specifičnih fragmenata	PIC	H_e
SseTC/MseAT	20	1	0,34	0,44
SseGC/MseAT	29	4	0,33	0,42
SseTC/MseGA	33	3	0,35	0,45
SseGC/MseGA	26	5	0,34	0,43

Broj polimorfnih fragmenata se kretao od 20 do 33, sa prosječnom vrijednosti od 27 po kombinaciji početnica. Najveći PIC (0,34) utvrđen je za kombinaciju početnica SseTC/MseGA, najmanji od 0,33 za SseGC/MseAT, dok je prosječna vrijednost polimorfizma iznosila 0,34.

Za neke ispitivane genotipove utvrđeni su specifični AFLP fragmenti. Tako je kombinacijom SseGC/MseAT utvrđen specifični AFLP fragment duljine 215 parova baza (pb) u pet genotipova (Žitarka, Super Žitarka, Barbara, Katarina i Soissons). Trećom kombinacijom SseTC/MseGA utvrđen je specifični fragment duljine 530 pb u osam genotipova (Žitarka, Super Žitarka, Felix, Barbara, BC Patria, Valerius, Edison i Ludwig). Specifični fragment duljine 186 pb utvrđen četvrtom kombinacijom AFLP početnica (SseGC/MseGA) pojavio se samo u pet genotipova (Žitarka, Super Žitarka, Barbara, Mihaela i Edison), a fragment duljine 348 pb u osam genotipova (Demetra, Aida, Zlata, Katarina, Alka, Adriana, Valerius i Edison).

Ishodišna binarna matrica iskorištena je za izračun genetske sličnosti pomoću Dice koeficijenta (S_{ij}) između ispitivanih genotipova (Tablica 73, prilog 2). Prosječna sličnost (S_{ij}) između ispitivanih genotipova iznosila je 0,54. Najveći koeficijent genetske sličnosti (S_{ij})

utvrđen je za genotipove Žitarka i Barbara i iznosio je 0,82, a najmanji za genotipove Aida i Osječka 20 ($S_{ij}=0,20$). Na temelju matrice genetske sličnosti između svih ispitivanih genotipova pomoću UPGMA metode izrađen je dendrogram (Grafikon 6).



Grafikon 6. UPGMA dendrogram za 40 genotipova temeljem matrice genetske sličnosti (S_{ij}).

Prema prikazanom dendogramu sve genotipove je bilo moguće razlikovati. Najveći koeficijenti sličnosti utvrđeni su, osim za gore navedene Žitarku i Barbaru, između Super Žitarke i Barbare, te Zlate i Demetre ($S_{ij}=0,81$). Ispitivane genotipove možemo svrstati u šest skupina. Prvu skupinu čine 33 genotipa koji su međusobno najbliži i razvrstani su u četiri podskupine. U podskupinu 1a svrstano je 16 genotipova, podijeljenih na još dvije podskupine 1a1 i 1a2. U podskupini 1a1 su Žitarka, Barbara i Super Žitarka između kojih prosječna sličnost (S_{ij}) iznosi 0,81, zatim genotipovi Libellula i Edison te pridruženi genotip U1, zatim slijede tri austrijska genotipa (Ludwig, Bastide i Eurofit) i genotipa BC instituta (BC Patria). U podskupinu 1a2 svrstano je tri genotipa Poljoprivrednog instituta u Osijeku (Demetra, Zlata i Katarina), dva genotipa BC instituta (Zlatna Dolina i Sana) i genotip Bezostaja. Podskupinu 1b čini pet genotipova, Slavonija i Golubica, između kojih prosječna sličnost (S_{ij}) iznosi 0,78, zatim genotipovi Ružica i Janica te kao pridruženi član Adriana. U podskupinu 1c svrstano je četiri genotipa, među kojima su Pipi, Ilirija i Soissons te pridruženi genotip Valerius. U drugu skupinu svrstano je sedam genotipova Poljoprivrednog instituta u Osijeku, od kojih je prvi Srpanjka, a posljednji Seka. U trećoj skupini su tri genotipa: Osječka Crvenka, Antonius i Mihaela, četvrtu skupinu čini zasebni član BC Elvira. Petu skupinu čine Lela i Divana, a kao posebne grupe (šesta i sedma) izdvojili su se genotipovi Osječka 20 i Aida.

5.4. Analiza molekularne varijance (AMOVA) s obzirom na hrvatske i strane sorte, oplemenjivačke programe te razdoblja priznavanja sorti

Kombinirana matrica molekularnih podataka na temelju sličnosti (S_{ij}) korištena je za provedbu AMOVA-e.

Analizom molekularne varijance provedenom s obzirom na različitost između hrvatskih i stranih sorata (Tablica 48) u ukupnoj molekularnoj varijanci utvrđena je visoko značajna vrijednost udjela varijabilnosti od 4,59% između hrvatskih (HR) i stranih (S) sorata. Najveći udio ukupne molekularne varijabilnosti (95,41%) utvrđen je unutar hrvatskih i stranih sorata.

Tablica 48. Rezultati analize AMOVA-e između i unutar hrvatskih i stranih sorata

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Komponente varijance	% udio varijabilnosti	ϕ_{ST}	P (ϕ)
Između HR i S sorata	1	0,0119	4,59	0,0459	<0,001
Unutar HR i S sorata	38	0,248	95,41		

Analizom molekularne varijance, provedenom s obzirom na različitost između oplemenjivačkih programa u Hrvatskoj i stranih sorata (Tablica 49) u ukupnoj molekularnoj varijanci, utvrđena je visoko značajna vrijednost udjela varijabilnosti od 6,78% između oplemenjivačkih programa Poljoprivrednog instituta u Osijeku, BC instituta i stranih (S) sorata. Najveći udio ukupne molekularne varijabilnosti (93,22%) utvrđen je između sorata unutar oplemenjivačkih programa.

Tablica 49. Rezultati analize AMOVA-e između i unutar oplemenjivačkih programa u Hrvatskoj i stranih sorata

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Komponente varijance	% udio varijabilnosti	ϕ_{ST}	P (ϕ)
Između programa	2	0,01769	6,78	0,0678	<0,001
Unutar programa	37	0,2432	93,22		

Analiza molekularne varijance provedena između i unutar četiri razdoblja priznavanja ispitivanih sorata pokazala je da najveći udio (98,42%) varijabilnosti molekularne varijance uzrokom razlika između sorata unutar razdoblja priznavanja. Najmanji udio varijabilnosti od samo 1,58% uzrokom je razlika između razdoblja te nije značajan (Tablica 50).

Tablica 50. Rezultati analize AMOVA-e između i unutar razdoblja priznavanja ispitivanih genotipova

Izvori varijabilnosti	Stupnjevi slobode	Komponente varijance	% udio varijabilnosti	ϕ_{ST}	P (ϕ)
Između razdoblja	3	0,0040	1,58	0,0158	0,1701
Unutar razdoblja	27	0,2495	98,42		

5.5. Usporedba rezultata provedenih analiza

Mantelovim testom ispitano je postojanje korelacija između matrica dobivenih na temelju različitih podataka: morfoloških svojstava, mikrosatelita (SSR metoda) i AFLP metode (Tablica 51).

Tablica 51. Rezultati Mantelovog testa (ispod dijagonale) i opravdanosti (iznad dijagonale)

	Morfološka svojstva	SSR metoda	AFLP metoda
Morfološka svojstva	-	0,033	0,232
SSR metoda	0,0914	-	0,01
AFLP metoda	0,0553	0,191	-

Mantelov test je pokazao statistički opravdanu korelaciju između SSR i AFLP matrice sličnosti za ispitivane genotipove, iako je koeficijent korelacije bio vrlo slab ($r=0,191$). Između matrice morfoloških podataka i molekularnih podataka nije postojala korelacija.

6. RASPRAVA

6.1. Različitost ispitivanih genotipova pšenice na temelju agronomskih svojstava

Agronomska svojstva su nezaobilazan dio testiranja genotipova i novostvorenih sorata u svim oplemenjivačkim programima. Predstavljaju, uz morfološka svojstva, osnovni kriterij prilikom odabira najrazličitijih i najudaljenijih sorata za križanja u klasičnom oplemenjivanju. Velik dio istraživanja je kao cilj oplemenjivanja pšenice, prema konceptu gena, postavio postizanje visokog i stabilnog uroda te visoke kvalitete novostvorenih sorata (Borojević, 1990.; Bede i sur., 1990.; Bede, 1994.; Drezner, 1995.; Oberforster i Werteker, 1995.; Denčić i sur., 1997., Denčić, 2006.). Tijekom zadnjih 100 godina oplemenjivači pšenice u Europi i ostalim dijelovima Svijeta radili su na povećanju uroda pšenice snižavajući visinu stabljike, povećavajući time otpornost na polijeganje u uvjetima intenzivne poljoprivrede. Skraćenje stabljike je najveća promjena koja je napravljena u oplemenjivanju pšenice tj. promjena žetvenog indeksa sa oko 0,30 na oko 0,45 što je rezultiralo povećanjem genetskog potencijala za urod zrna. Trend smanjenja visine bio je značajan korak i u domaćim oplemenjivačkim programima u stvaranju polupatuljastih genotipova visine oko 70 cm (Bede, 1994.). Visina biljke je kvantitativno svojstvo pod utjecajem *Rht* major gena i velikog broja minor gena koji su raspoređeni po svim kromosomima pšenice (Chebotar i sur., 2001.). Utjecaj visine stabljike u oplemenjivanju bilja može se gledati s aspekta otpornosti na polijeganje i povećanja ukupne biomase. Visoke biljke su vrlo osjetljive na polijeganje te imaju tanku i nedovoljno čvrstu građu stabljike što na kraju dovodi do osipanja zrna, a time i do smanjenja uroda posebice u uvjetima velike količine hraniva u tlu. Sniženje visine stabljike ne dovodi samo do povećanja otpornosti na polijeganje (Worland i Snape, 2000.) nego do stvaranja učinkovitije biljke koja svoje asimilate preusmjerava na produkciju zrna, a ne u stabljiku, čime se povećava žetveni indeks. U ispitivanim genotipovima ovo svojstvo uzrokom je velike varijabilnosti između njih, što ukazuje na različite pravce u oplemenjivanju i različite roditeljske parove prilikom križanja. S obzirom na godine priznavanja i podrijetlo pojedinog genotipa vidljivo je smanjenje stabljike u prosjeku oko 70 cm od 1936. ($U_1=141,9$ cm) do 2008. godine ($Zlata=67,2$ cm) godine. Samo osam genotipova imalo je stabljiku višu od 100 cm, takve genotipove možemo svrstati u ekstenzivne koji su prilagođeni određenim agroekološkim uvjetima, većinom iz Austrije i Rusije. S druge strane genotipovi koji su srednje visine do 90 cm ili niže većinom su prilagođeni intenzivnim uvjetima proizvodnje.

Klimatske prilike tijekom dvije godine pokusa imale su vrlo velik utjecaj na sva ispitivana agronomska svojstva u gotovo svih genotipova. Nedostatak oborina i više temperature u 2009. godini utjecao je na velike razlike u urodu zrna i komponentama uroda u gotovo svih ispitivanih genotipova. Uvjeti suše posebno su bili naglašeni tijekom ožujka i travnja kada se pšenica nalazi u fenofazi vlatanja (IV., V., VI. i VII. etapa organogeneze) koja je presudna u razvoju broja klasića, broja cvjetova i njihove fertilnosti, nedostatak oborina i visoke temperature utječu na značajan pad uroda (Ozturk i Aydin, 2004.). Koeficijent varijacije, u dvogodišnjem prosjeku, bio je najveći upravo za svojstvo uroda. Svi ispitivani genotipovi imali su manji urod zrna i manji broj zrna po klasu u vegetacijskoj 2008./2009. dok su u 2007./2008., koja je bila klimatski puno povoljnija za uzgoj pšenice, zabilježeni veći urodi zrna, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Drezner i sur. (2010.). U povoljnim uvjetima ostvari se 50% fertilnih vlata po biljci, a u uvjetima stresa stvaranje klasova je mnogo manje što je rezultat interakcije genotipa i okolina (Acevedo, 2002.). Obzirom na komponente uroda genotip Bastide je u dvogodišnjem prosjeku ostvario najveći urod zrna i broj zrna po klasu i najmanju hektolitarsku masu u dvogodišnjem prosjeku. Rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su proveli Sabo i sur. (2002.) gdje je utvrđena pozitivna korelacija uroda zrna sa brojem zrna po klasu, dok istraživanja Slafer i sur. (1996.) pokazuju da povećanje broja zrna u klasu ne mora rezultirati povećanjem uroda iz razloga što su zrna često manje mase. Istraživanja Guberac i sur. (2008.) su također utvrdili da je svojstvo broja klasića po klasu u negativnoj korelaciji koja je imala direktan negativni učinak na urod zrna. Naime produkcija klasa je komponenta uroda obrnuto proporcionalna broju klasova po biljci, a produkt je broja klasića u klasu, cvjetova u klasiću i mase zrna. Genotip BC Patria je ostvario drugi najveći urod u dvogodišnjem prosjeku, četvrti najveći broj klasića na klasu, ali treći najmanji broj biljaka po jedinici površine što se slaže sa istraživanjima Barić i sur. (2008.).

Genetska osnova povećanja uroda povezana je s nekoliko major gena onih koji utječu na visinu biljke (*Rht*), odgovor biljke na fotoperiod (*Ppd*) i tip uzgoja (*Vrn*), a budućnost napretka u genetskom potencijalu uroda, posebno u uvjetima stresa, leži u eksploataciji izvora genetske različitosti unutar prirodnih populacija i divljih srodnika (Skvornik i sur. 2001.; Kato i sur., 2000.). Nedavna dostignuća u istraživanju uroda pšenice imaju potencijal da ubrzaju genetsku dobit u pšenice, poboljšavajući učinkovitost fotosinteze, produktivnost klasa, optimizirajući „source:sink“ ravnotežu i koristeći molekularnu tehnologiju te

konvencionalni pristup oplemenjivanju za uvrštavanje divljih srodnika roda *Triticum*, kako bi se proširio „pool“ gena (Reynolds i sur., 2009.). Obzirom na provedeno istraživanje i nove spoznaje možemo zaključiti da genotipovi imaju različitu sposobnost kompenzacije pojedinih komponenata uroda, koja je rezultat genotipa, okoline i njihove međusobne interakcije. Stoga, svaki genotip ozime pšenice ima specifičnu i različitu strukturu uroda zrna, obzirom na udio komponenti u stvaranju uroda.

Količina bjelančevina u zrnu pšenice uvelike ovise o genotipskim i okolišnim činiteljima, a varijabilnost sadržaja i količine bjelančevina značajno modificira kvalitetu brašna i kruha. Navedeno svojstvo je još jedno od dijagnostičkih agronomskih svojstava koje svrstava genotipove prema kvaliteti. Dok su pšenične bjelančevine glutena smatrane kao glavni činitelj u određivanju kvalitete pšenice kroz nekoliko desetaka godina, uloga škroba je bila znatno manje istraživana, smatrano je da je škrob samo „punjenje“ u endospermu pšenice. Namirnice od pšenice prehranjuju milijune ljudi diljem Svijeta upravo zbog vrlo vrijednog izvora ugljikohidrata tj. škroba (Singletary, 2000.). Još davne 1941. Harris i Stibbitt su upozorili kako istraživanja na škrobu nisu dobila na značajnosti te kako čak 70% zrna pšenice otpada na škrob i da se očekuje da ima ulogu u kvaliteti brašna i kruha te da ovisi o varijabilnosti sastava škroba, o genotipu i o okolini, prema Rahman i sur. (2000.). Količina bjelančevina i škroba u zrnu ispitivanih genotipova se razlikovala u odnosu na dvije godine zbog prethodno navedenih klimatskih uvjeta tijekom 2009. godine. Količina bjelančevina se povećala u gotovo svih genotipova dok se količina škroba smanjila. Zbog male količine padalina i visoke temperature količina škroba u svih genotipova je bila manja. Slične rezultate dobili su i Labuschagne i sur. (2007.) koji su utvrdili da je na količinu škroba u zrnu pšenice značajno utjecalo povećanje temperature zraka te je utvrđena i značajna pozitivna korelacija sa veličinom i težinom zrna. Chinnusamy i Khanna-Chopra (2003.) su utvrdili znatno manju aktivnost enzima škrobne sintetaze, koja je vrlo osjetljiva na visoke temperature te je odgovorna za sintezu škroba i izravno utječe na smanjenje mase zrna, a time i na urod pšenice. Istraživanja Ozturk i Aydin (2004.) pokazuju da se istovremeno povećava količina dušika u zrnu, a time i količina bjelančevina što je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja.

Dobiveni rezultati pokazuju postojanje različitosti između ispitivanih genotipova kao i mogućnost odabira udaljenih genotipova za buduća križanja. Pet sorata (Bastide, BC Patria, Alka, Eurofit i Sana) s najboljim urodom podrijetlom je iz različitih oplemenjivačkih centara i iz tri različite zemlje. Francuska, austrijska sorta te sorte BC instituta i Poljoprivrednoga instituta u Osijeku postigle su odlične rezultate uroda zrna uvjetima istočne Slavonije i pokazale postojanje široke adaptabilnosti. Navedene sorte imaju različit pedigree, divergentne su po svom podrijetlu te bi mogle poslužiti kao roditeljske komponente za križanja u budućim oplemenjivačkim programima.

6.2. Različitost na temelju morfoloških podataka

Oplemenjivački programi temelje se na odabiru genetski različitih roditelja za križanja. Različitost roditeljskih komponenti određuje se na temelju morfoloških podataka. Primjena morfoloških podataka neizostavna je prilikom stvaranja genskih karata te u svrhu nadzora početne populacije i razdvajajućih generacija. Veliki broj istraživača navode nezaobilaznu primjenu morfoloških svojstava u svrhu zaštite oplemenjivačkih prava te ispitivanja različitosti, ujednačenosti i postojanosti sorti (DUS) prilikom priznavanja novih sorata. Posebno se naglašava potreba njihovog kombiniranja s molekularnim markerima (Jones i sur., 2003.; Cooke i sur. 2003.; Šatović, 1999.) u cilju što preciznije ocjene genetske različitosti i zaštite oplemenjivačkih prava.

U provedenom istraživanju zabilježena je relativno mala prosječna sličnost između ispitivanih genotipova što upućuje na veliku morfološku varijabilnost između njih. Slične rezultate dobili su Marić i sur. (2004.) i Salem i sur. (2008.) gdje je utvrđena relativno velika udaljenost između ispitivanih genotipova, a primjenom UPGMA metode sve genotipove je bilo moguće razlikovati. Potpuno suprotne rezultate dobili su Maccaferri i sur. (2007.) koji su utvrdili prosječnu sličnost između genotipova u iznosu od 0,73, a samo vrlo udaljene linije su se uspjele izdvojiti na temelju fenotipa. Genetska različitost ispitivanih genotipova na temelju morfoloških podataka pokazala je grupiranje prema podrijetlu i tipu sorte za koju je postojao određeni oplemenjivački cilj u vrijeme kada je ona stvarana. Stara sorta, Osječka šišulja ili U1 iz 1936. godine se prema očekivanju morfološki posve izdvojila od svih ispitivanih genotipova sa najmanjom prosječnom sličnosti u odnosu na sve ispitivane genotipove ($RT_{ij}=0,13$). Sorta

se do početka šezdesetih godina sijala na preko 50.000 ha. U uvjetima uzgoja s malim količinama gnojiva i normama sjetve od 450 do 550 zrna/m², visina od 140 cm nije bila ograničavajući čimbenik u proizvodnji (Drezner, 1995.).

U posebnu skupinu izdvojile su se hrvatske sorte, deset sorata PIO (Osječka 20, Slavonija, Demetra, Žitarka, Super Žitarka, Aida, Alka, Golubica i Barbara) i jedna sorta BC instituta (BC Elvira). Sorte pripadaju konceptu prinostnih sorata niske do srednje visoke stabljike, dobre kvalitete i otpornosti na polijeganje (Bede, 1994.; Drezner, 1995.). Svrstavanje ovih sorata može se povezati i sa pedigreeom genotipova. Osječka 20 je jedan od roditelja sorte Slavonija, dok je Slavonija jedan od roditelja sorte Golubica, a sorta Žitarka je jedan od roditelja prilikom stvaranja sorata Super Žitarka i Barbara. Sve sorte pripadaju ranim do srednje ranim sortama, koje imaju srednju do srednje jaku voštanu prevlaku klasa i rukavca zadnjeg internodija. Tako se sorta Žitarka prema svojim morfološkim i agronomskim svojstvima izdvaja među ostalim sortama kao vrlo adaptabilna sorta, koja se u razdoblju od 1991. do 1993. godine sijala na 40% površina (Drezner, 1995.), a i danas zauzima velik dio površina u Hrvatskoj, dok je u Sloveniji najraširenija sorta (Drezner i sur., 2010.).

Posebnu skupinu čine i pet hrvatskih genotipova (Srpanjka, Renata, Pipi, Anđelka i Mihaela) te talijanska sorta Libellula. Navedene sorte pripadaju izrazito ranim i ranim sortama te se može reći da je upravo svojstvo datuma klasanja utjecalo na razvrstavanje navedenih sorata pored pedigreea. Sorta Srpanjka se kao jedan od roditelja nalazi u genotipovima Mihaela, Renata i Anđelka, a sorta Libellula korištena je u križanjima za stvaranje sorte Srpanjka.

Sve austrijske sorte su se izdvojile i predstavljaju tip sorte stvarane za ekstenzivnu proizvodnju, visoke stabljike i kasnijeg datuma klasanja. Antonius i Ludwig su iz oplemenjivačkog programa u Probstdorfu (Austrija) stvarani za područje Panonske regije, Ludwig kao širokoadaptabilna sorta dobre kvalitete za organsku poljoprivredu, a Antonius kao visokokvalitetna sorta, otporna na zimu. Navedene sorte nastale su iz posebno osmišljenog oplemenjivačkoga programa za organsku poljoprivredu, gdje upravo specifična morfološka svojstva odnosno njihova kombinacija omogućava uspješnu selekciju genotipova (Löschenberger i sur., 2008.).

Kao jedan od glavnih preduvjeta za molekularni „screening“ genetske različitosti je utvrđivanje fenotipske varijabilnosti pomoću agronomskih i morfoloških svojstava (Kobiljski i

sur., 2002.). U provedenom istraživanju utvrđena je vrlo mala sličnost tj. velika različitost morfoloških svojstava između ispitivanih genotipova. Na temelju nevedenih rezultata različitost ispitivanih genotipova ispitana je i uporabom molekularnih markera (mikrosateliti i AFLP).

6.3. Genetska različitost na temelju molekularnih podataka

6.3.1. Genetska različitost visokomolekularnih podjedinica glutenina

Količina i kvaliteta bjelančevina u zrnju glavni su činitelji u selekciji sorata odgovarajuće pekarske kvalitete. Rezervne bjelančevine zrna pšenice, gluteni, odgovorni su za jedinstvena viskozno-elastična i kohezivna svojstva tijesta pšenice (Gianibelli i sur., 2002.). Mogu se podijeliti na dvije skupine: glijadine i glutenine. Utjecaj količine glijadina i glutenina na reološka svojstva tijesta, volumen i strukturu kruha može znatno varirati što ovisi o genotipu i o okolišnim uvjetima. Glijadini su tako odgovorni za rastezljivost i manje ovisni o okolišnim uvjetima, dok su glutenini odgovorni za čvrstoću i elastičnost tijesta i osjetljivi na promjene u okolišu i proizvodnji (Branlard i sur., 2001.; Lásztity, 2002.; Triboi i sur., 2000.).

Glutenini se dijele na visokomolekularne (HMW) i niskomolekularne (LMW) podjedinice (GS). Veliki broj istraživanja dokazao je važnost i vrlo velik utjecaj HMW podjedinica glutenina, posebno onih kontroliranih od strane D genoma (*Glu-D1a* i *Glu-D1d*). Genotipovi koji imaju HMW GS 2+12 (*a*) imaju slabi gluten, dok je jak gluten karakterističan za sorte u kojih su utvrđene HMW GS 5+10 (*d*) (Tanaka i sur., 2003.; Horvat i sur., 2006.; Tohver, 2007.). U ispitivanim genotipovima kombinacije alela, koje se povezuju sa vrlo dobrom kvalitetom brašna i kruha *bbd*, *bcd*, *acd* i *bid* (Lerner i sur., 2009.) utvrđene su u 40% genotipova što se može iskoristiti za daljnja istraživanja u smjeru poboljšanja kvalitete brašna i kruha.

Dobivena različitost visokomolekularnih podjedinica glutenina između ispitivanih genotipova omogućila je grubu podjelu sorata na temelju *Glu-D1a* (2+12) i *Glu-D1d* (5+10) lokusa, bez obzira na podrijetlo genotipa, isti način grupiranja zabilježen je i u istraživanjima Jošt i sur. (1995.) i Sultana i sur. (2007.).

HMW GS dobivene za genotipove Divana i Bezostaja (2*, 7+9 i 5+10) zabilježene su i u istraživanjima Jošt i sur. (1995.) i prema katalogu HMW podjedinica glutenina Bekes i sur.

(2006.), dok su Horvat i sur. (2006.) za navedene sorte na *Glu-A1* lokusu utvrdili nulti alel (N). U provedenom istraživanju također je utvrđen veći postotak (40%) podjedinica glutenina N od GS 2* što se može pripisati većoj genetskoj različitosti na *Glu-A1* lokusu i tome što je frekvencija nultog alela više zastupljena u onih genotipova koju su priznati od 1936. do 1998. godine (ukupno njih devet). Nulti alel je i u drugim istraživanjima bio najčešći alel u heksaploidnim pšenicama (Payne i Lawrence, 1983.). Rezultati ovoga istraživanja su u skladu sa istraživanjima Branlard i sur. (2003.) te Izadi-Drabandi i sur. (2010.) koji navode da je većinom u „starijih“ sorata utvrđena veća frekvencija nultoga alela (69,5%). U istraživanjima Sultana i sur. (2007.) utvrđena je dominacija nultoga alela (60%) samo u prirodnih populacija, dok je u modernih sorata potpuno zamijenjen *Glu-A1b* alelom. Isti autor navodi da su oplemenjivači, u nastojanju da stvore što kvalitetnije sorte, doveli do erozije (nestanka) nultoga alela u populaciji novih sorata. Dominacija *Glu-A1b* alela (63,9%) i *Glu-Dd* alela (94,1%) zabilježena je i u istraživanjima Lerner i sur. (2009.) koji su u analizu uključili 119 genotipova ozime pšenice.

Dobiveni rezultati su pokazali veliku različitost germplazme pšenice na temelju sastava glutenina. U daljnja istraživanja različitosti sorata pšenice na temelju HMW GS trebalo bi uvrstiti veći broj sorata te prirodnih populacija zbog identifikacije HMW GS, LMW GS i lokusa glijadina u cilju stvaranja baze podataka te implementacije specifičnih molekularnih markera (Gale, 2005.; Yang i sur., 2010.). Dobiveni podaci bili bi temelj za stvaranje početne populacije u oplemenjivačkim programima s ciljem stvaranja sorata pšenice za različite namjene (kruh, pecivo, keksi).

6.3.2. Genetska različitost na temelju količine amiloze i amilopektina u zrnu

Kako je prethodno navedeno sadržaju i sastavu škroba u pšenice nije se u prošlosti pridavala dovoljna pažnja. Preokret se dogodio kad je otkriveno da su upravo kvaliteta škroba, *waxy* aleli u pšenice i sadržaj amiloze, primarno odgovorni za kvalitetu japanskih rezanaca („noodles“) (Yamamori i sur., 1992.; Nakamura i sur., 1993.; Miura i Tanii, 1994.). Sukladno takvim istraživanjima utvrđena je i povezanost HMW podjedinica glutenina, *Glu-D1d*, sa čvrstoćom tijesta kuhanih rezanaca i u sorata u kojima je sadržaj bjelančevina bio vrlo nizak (Yanaka i sur., 2007.).

Glavna komponenta pšeničnog brašna je škrob, zauzimajući 65-70% suhe tvari zrna. Sastavljen je od dvije vrste glukoznih polimera: pretežno linearne α -1,4 amiloze i razgranatog α -1,4 i α -1,6 amilopektina. Heksaploidne pšenice većinom sadrže od 15% do 35% amiloze. Različitost strukture amiloze i amilopektina upravo je funkcionalno važna te se očituje se u čitavom nizu primjena od hrane do industrije (Burrell, 2003.).

U provedenom istraživanju utvrđene su vrlo velike razlike između ispitivanih genotipova na temelju količine amiloze i amilopektina. Tako se mogu izdvojiti sorte koje imaju oko 50% amiloze (Srpanjka) do sorata koje imaju svega 5% amiloze (Bezostaja). Većina ispitivanih genotipova (22) pripada rasponu od 15 do 35% amiloze što je u skladu sa istraživanjima Labuschagne i sur. (2007.), dok su u istraživanjima Corcuera i sur. (2007.) izdvojili sorte pšenice sa 41% amiloze što je za 5% više od maksimalne vrijednosti te sorte s više od 70% amilopektina. Ovi rezultati su u skladu sa provedenim istraživanjem jer su se izdvojile sorte kao što je Srpanjka, Demetra, Slavonija i Žitarka s više od 40% amiloze, odnosno U1, Super Žitarka, Bezostaja i Valerius sa više od 90% amilopektina. Potencijal sorte s velikim udjelom amiloze (>40%) predstavlja alternativu petrokemijskim izvorima u proizvodnji plastike kao i dijetetskih vlakana koja su neophodna u zdravoj prehrani (Regina, 2000.).

Navedeni rezultati mogu se iskoristiti u svrhu stvaranja novih sorata s velikim ili malim udjelom amiloze i amilopektina u cilju dobivanja novih sorata za različite namjene od prehrambene do tekstilne industrije.

Potrebno je izvršiti daljnja istraživanja u smjeru utvrđivanja kvalitete kruha i brašna kombinirajući pritom rezultate sastava HMW GS i količine amiloze i amilopektina.

6.3.3. Genetska različitost na temelju mikrosatelita i AFLP markera

Kao što je prethodno navedeno utvrđena je varijabilnost između ispitivanih genotipova na temelju agronomskih i morfoloških svojstava. Utvrđivanje genetske različitosti sorata ili oplemenjivačkih linija je nužno za kvalitetan izbor roditeljskih parova za križanja. Moderno oplemenjivanje može dovesti do smanjene genetske različitosti koja se ogleda kroz manju frekvenciju ili gubitak pojedinih alela. Smanjena genetska različitost može voditi ka istoj reakciji različitih sorata na abiotske ili biotske stresne činitelje, a time i ugroziti

poljoprivrednu proizvodnju (Manifesto i sur., 2001.; Martos i sur., 2005.; Fu i sur., 2009.). Danas se intenzivno koriste molekularni markeri u svrhu utvrđivanja genetske različitosti jer isključuju subjektivne procjene, kao u morfoloških svojstava i ne ovise o vanjskim utjecajima. Različite tehnike molekularnih markera su korištene u svrhu procjene genetske različitosti i odnosa između genotipova (Barett i Kidwell, 1998.; Marić i sur., 2004.; Noli i sur., 2008.; Prasad i sur., 2009.).

U provedenom istraživanju koristeći 26 mikrosatelitnih početnica utvrđeno je ukupno 108 različitih alela u 40 ispitivanih genotipova, od 2 do 11 po lokusu, što je prosječno po mikrosatelitu iznosilo 3,8, a prosječna vrijednost PIC je iznosila 0,50. Slične rezultate utvrdili su Ahmad (2002.) na 13 genotipova sa 43 mikrosatelitna markera uz prosječan broj alela od 3,0 i prosječne vrijednosti PIC od 0,52 te Christiansen i sur. (2002.) na 75 genotipova koristeći 47 mikrosatelitnih markera uz prosječan broj alela po lokusu od 3,6. Navedene vrijednosti su uglavnom manje od rezultata koje su utvrdili Khlestkina i sur. (2004.) na 54 genotipa sa 22 mikrosatelita (prosječan broj alela 6,6, PIC=0,70), Landjeva i sur. (2006.) na 91 genotipu sa 19 mikrosatelita (prosječan broj alela 6,8, PIC=0,51), Stępien i sur. (2007.) na 53 genotipa sa 24 mikrosatelitna markera uz prosječan broj alela od 7,2. Stępien i sur. (2007.) također navode da je kvaliteta biljnog materijala glavni činitelj koji utječe na broj alela po lokusu te da je taj broj veći ukoliko se koristi sjeme iz gen banaka. Prosječna genska različitost (H_e) u provedenom istraživanju iznosila je 0,57 što je u skladu sa istraživanjima Dresigacker i sur. (2004.) na 68 linija iz CIMMYT-a, a malo veća od 0,56 utvrđene između 134 genotipa durum pšenica (Maccaferri i sur., 2007.). Uglavnom veće vrijednosti utvrdilo je više autora: Rousell i sur. (2005.) na 480 genotipova sa 39 mikrosatelitnih markera, prosječni broj alela po lokusu iznosio je 16,7, uz $H_e = 0,65$; Stodart i sur. (2005.) na 44 prirodnih populacija koristeći 63 mikrosatelitne početnice (prosječni broj alela 10,29, uz $H_e = 0,69$) i drugi.

U provedenom istraživanju ispitivane su promjene u broju alela u odnosu na razdoblja priznavanja sorti. Zabilježeno je povećanje ukupnog broja alela u ispitivanim genotipovima, a koji su priznati u razdoblju od 2000. do 2008. (20), u odnosu na genotipove priznate od 1936. do 1980. godine. Iako je broj izgubljenih alela najveći u razdoblju od 2000. do 2008. (6), u istom je razdoblju dobiveno i 10 novih alela. Na temelju toga može se zaključiti da u novim sortama nije došlo do smanjenja broja alela uslijed oplemenjivanja. Fu i sur. (2009.) utvrdili

su smanjenje od 17% ukupne varijabilnosti zabilježene mikrosatelitima unutar 20 novih sorata jare pšenice nakon 1930. godine i navode da je to zbog zatvorenog oplemenjivačkoga programa u Kanadi, za razliku od europskih oplemenjivačkih programa u kojima je zabilježen porast genetske različitosti. Promjene u broju alela u odnosu na razdoblje oplemenjivanja mogu se objasniti različitim ciljevima u oplemenjivanju pšenice, korištenjem novih roditelja te tako unošenjem novih alela u križanja. Daljnja istraživanja treba usmjeriti ka utvrđivanju povezanosti izgubljenih alela s nekim važnim svojstvima za pšenicu kao što su otpornost na bolesti, zimu ili količinu bjelančevina u zrnu.

U provedenom istraživanju je između 26 mikrosatelitnih markera korišten i gwm261. Mikrosatelit gwm261 je smješten na lokusu *Xgwm261* (Röder i sur., 1998.), 0,6 cM udaljen od *Rht8* gena na 2DS kromosomu koji može uključivati i *Ppd1* gen za neosjetljivost na fotoperiod (Korzun i sur., 1998.). Za ukupno 28 ispitivanih genotipova utvrđen je alel duljine 192 pb, među kojima su Libellula, Bezostaja i Zlatna Dolina, šest genotipova za koje je zabilježen alel od 174 pb, među kojima je i Soissons što je u skladu s prethodnim rezultatima Worland i sur. (1998.) i Dvojković i sur. (2010.). Za ukupno 26 hrvatskih genotipova zabilježen je alel duljine 192 pb. Navedeni dijagnostički alel za *Rht8* te za *Ppd1* vodi podrijetlo od japanske sorte Akakomugi, koju je u oplemenjivački program unio Nazareno Strampeli te od ruskih sorata Bezostaja, Kavkaz i Aurora (Worland i sur., 1998.; Borojević i Borojević, 2005.; Zheleva i sur., 2006.). Navedene talijanske i ruske sorte nalaze se u pedigreima mnogih hrvatskih kultivara za koje je utvrđen alel duljine 192 pb. Worland i sur. (1998.) navodi da je razlog vrlo male učestalosti gena osjetljivih na fotoperiod, *Rht1* (*Rht-B1b*) i *Rht2* (*Rht-D1b*), u odnosu na *Rht8* gen, u germplazmi jugoistočne Europe, zbog negativnog učinka interakcija tih gena s pojavom visokih temperatura u vrijeme stvaranja gametofita pšenice čime je produktivnost klasa smanjena. Većina oplemenjivača jugoistočne Europe je selekcijom upravo izabirala adaptirane genotipove sa *Ppd1/Rht8*, koji su imali svojstvo niže stabljike i ranozrelosti čime bi povećali fertilitet klasića. Veliki broj autora (Korzun i sur., 1998.; Worland i sur., 1998.; Chebotar i sur., 2001.; Zhang i sur., 2006.), navode da alel od 192 pb na *Rht8* genu utječe na snižavanje stabljike za 7 do 10 cm, dok *Ppd1* gen djeluje plejotropno na ranije klasanje i sazrijevanje pšenice za oko sedam dana te također snižava stabljiku za 10 cm. Navedeni rezultati se slažu sa provedenim istraživanjem, budući da sorte Srpanjka, Zlata i Mihaela imaju prosječnu visinu stabljike od 65 cm i pripadaju skupini vrlo ranih sorata, ali bi

se trebalo u nastavku istraživanja utvrditi i postojanje *Ppd1* gena. U šest sorata utvrđen je alel dužine 174 pb na lokusu *Xgwm261*, tri hrvatske sorte (Ilirija, Aida i Felix), dvije austrijske (Edison i Ludwig) te u francuske sorte Soissons koji je jedan od roditelja sorte Ilirija. Navedeni alel koji je povezan sa genom za osjetljivost na fotoperiodizam (*Ppd1*) prevladava u francuskim, njemačkim te sortama Ujedinjenog Kraljevstva, a unesen je u oplemenjivačke programe preko japanske sorte Norin 10 (Worland i sur., 1998.; Zheleva i sur., 2006.). Alel sa 165 pb je utvrđen u samo četiri sorte: U1, Osječka 20, Bastide i Eurofit što je u skladu sa rezultatima istraživanja Dvojković i sur. (2010.). Sorte U1 i Eurofit imaju prosječnu visinu stabljike preko 100 cm što je u skladu sa rezultatima Korzun i sur. (1998.) koji su utvrdili da navedeni alel ima utjecaj na povećanje visine stabljike. Navedeni alel je podrijetlom također od japanske sorte Saitama 27 te prevladava u germplazmi CIMMYT-a (Worland i sur., 1998.).

Genetske udaljenosti (d_{ij}) između genotipova u provedenom istraživanju kretale su se od 0,21 do 0,98. Prosječna genetska udaljenost (d_{ij}) iznosila je 0,66. Uglavnom slične rezultate genetske udaljenosti utvrdili su i drugi autori primjenom mikrosatelitnih markera. Ahmad i sur. (2002.) su utvrdili genetsku sličnost (S_{ij}) 13 genotipova od 0,30 do 0,90 (što odgovara genetskoj udaljenosti od 0,10 do 0,70), genetska udaljenost (GD_{NEI}) od 0,61 između 91 genotipa pšenice utvrđena je u istraživanju Landjeva i sur. (2006.), Christiansen i sur. (2002.) utvrdili su genetsku udaljenost (GD_{NEIUB}) između 75 skandinavskih pšenica u iznosu od 0,51, genetska sličnost (S_{ij}) u rasponu od 0,90 do 0 utvrđena je između 105 argentinskih genotipova (Manifesto i sur., 2001.), a u istraživanju Khlestkina i sur. (2004.) utvrđene su genetske sličnosti (S_{ij}) u rasponu od 0,19 do 0,96 između 54 genotipa jare pšenice.

UPGMA metodom su se uspješno mogli razlikovati svi ispitivani genotipovi. Prvu skupinu čine 10 sorata, koje se dijele na dvije podskupine. Svrstavanje pet sorata BC instituta (Zlatna Dolina, Sana, Adriana, BC Patria i BC Elvira) i dvije sorte PIO (Katarina i Alka) u 1a podskupinu i tri sorte PIO (Žitarka, Super Žitarka i Barbara) u 1b podskupinu se može objasniti genetskom osnovom roditelja u križanjima. Sve sorte BC instituta su u jednom skupu te su vjerojatno prilikom križanja korišteni roditelji koji dijele određenu genetsku osnovu s navedenim sortama, dok je sorta Alka svrstana u navedenu podskupinu jer je nastala križanjem osječke linija Osk. 5.140-229-91 (koja je podrijetlom srodna sorti Srpanjka, prema Dvojković, 2009.) i sorte Sana. Genetska osnova sorte Žitarka bila je ključna u formiranju 1b podskupine jer je

jedan od roditelja u sortama Super Žitarka i Barbara, koje dolaze iz iste kombinacije križanja (GO 3135/Žitarka). Slične rezultate je dobio je i Dvojković (2009.). Drugu skupinu čini ukupno 20 sorata. Posebno se odvaja podskupina 2a koju čine sorte Osječka 20, Slavonija i Golubica koje su međusobno povezane genetskom osnovom, budući da se Osječka 20 nalazi kao roditelj u sorti Slavonija, a sorta Golubica dolazi iz kombinacije križanja Slavonija/Gemini. Sorte Pipi i Lela pripadaju istoj podskupini iako bi se sorta Pipi trebala svrstati u 4b skupinu zajedno sa sortom Ilirija jer joj je jedan od roditelja Soissons, dok se sorta Lela trebala svrstati u skupinu 2b jer je nastala iz križanja Srpanjka/Osk. 5.136-8-90. Pojedini autori objašnjavaju da smjerom i intenzitetom selekcije može doći do značajnijeg odstupanja od pretpostavke da potomci dijele 50% genetske osnove sa roditeljima, budući da oplemenjivač modificira selekciju tako što mijenja frekvenciju određenih alela u korist jednoga od roditelja (Corbellini i sur., 2002.; Zhang i sur., 2002.). You i sur. (2004.) navodi da je potrebno 550 mikrosatelitnih markera (73 lokusa) kako bi se izradio pouzdan dendogram koji bi otkrio sve genetske odnose između sorata različite genetske osnove i različitoga geografskog podrijetla.

Na grupiranje 2b podskupine najviše su utjecale sorte Srpanjka te Libellula i Bezostaja. Sorte Anđelka, Zlata i Seka nastale su iz kombinacije križanja Srpanjka/Demetra, dok su Mihaela, Renata, Ružica, Felix, Janica, Lucija i Aida u svojim pedigreima imali genetsku osnovu Srpanjke. Demetra i Srpanjka dijele roditelja ZG 2696, dok su Libellula i Bezostaja roditelji sorte Osječka Crvenka. U četvrtu skupinu su svrstane sve strane sorte te sorta Divana koja je po svojoj genetskoj osnovi udaljenija od ostalih hrvatskih sorata, dok je Soissons svrstan uz sortu Ilirija, vjerojatno jer je korišten kao jedan od roditelja prilikom križanja. U1 čini posljednju petu skupinu i potpuno se izdvaja od svih ostalih genotipova, što je u skladu sa rezultatima Dvojković (2009.).

Razlučivanje genotipova male genetske udaljenosti (Super Žitarka i Barbara) potvrđuje pravilan odabir DNA uzoraka i visok polimorfizam korištenih mikrosatelita za analizu genetske različitosti srodnih jedinki što je u skladu sa rezultatima Morgante i Olivieri (1993.), Plaschke i sur. (1995.) i Banayi i sur. (2006.).

Četiri kombinacije AFLP početnica korištenih u ovome istraživanju proizvele su ukupno 108 polimorfnih fragmenata u 40 ispitivanih genotipova. Prosječno je utvrđeno 27 polimorfni alela po kombinaciji i prosječnom vrijednosti PIC od 0,34. Slične rezultate utvrdili su

Manifesto i sur. (2001.) koristeći četiri kombinacije AFLP početnica na 105 argentinskih pšenica sa 18 polimorfni fragmenata po kombinaciji i vrijednosti PIC od 0,30, Martos i sur. (2005.) na 24 durum sorte pšenice koristeći 14 kombinacija AFLP sa ukupno 13 polimorfni fragmenata po kombinaciji i prosječnom vrijednosti PIC od 0,34, Maccaferri i sur. (2007.) na 58 durum pšenica koristeći 16 kombinacija AFLP početnica (prosječan broj polimorfni fragmenata od 14,4, PIC=0,31). Uglavnom veće vrijednosti broja polimorfni fragmenata i vrijednosti PIC utvrdili su Stodart i sur. (2005.) na 44 prirodne populacije pšenica koristeći 16 AFLP kombinacija početnica (133 polimorfna fragmenta po AFLP početnici, PIC=0,35), Corbellini i sur. (2002.) na 40 sorata pšenice koristeći pet kombinacija AFLP početnica sa 40 polimorfni fragmenata po početnici, Vieri i sur. (2007.) na 19 pšenica koristeći šest kombinacija AFLP početnica (44 polimorfni fragmenata po početnici, PIC=0,36) i drugi.

U provedenom istraživanju utvrđeni su specifični polimorfni fragmenti koji su se pojavljivali samo u određenim genotipovima. U tri kombinacije AFLP početnica fragmenti duljine 215 (SseGC/MseAT), 530 (SseTC/MseGA) i 186 (SseGC/MseGA) parova baza bili su specifični za tri sorte Žitarka, Super Žitarka i Barbara. Navedene kombinacije se mogu koristiti u svrhu identifikacije ovih sorata. Specifični fragmenti mogu biti vrlo učinkoviti u identificiranju vrlo sličnih linija ili sorata (Maccaferri i sur., 2007.)

Između 40 ispitivanih genotipova utvrđena je prosječna genetska sličnost (S_{ij}) od 0,54, kretala se od 0,21 do 0,82. Vrlo slične rezultate su utvrdili i Barrett i sur. (1998.) između 43 jarih i ozimih sorata pšenice s prosječnom vrijednosti genetske udaljenosti (GDE) od 0,54 (što odgovara 0,54 genetskoj sličnosti (S_{ij}) od 0,56), Manifesto i sur. (2001.) su utvrdili prosječnu genetsku sličnost (S_{ij}) od 0,55 u rasponu od 0,24 do 0,91 između 105 argentinskih sorata pšenice, Maccaferri i sur. (2007.) su utvrdili genetsku sličnost (S_{ij}) koja se kretala od 0,29 do 0,99 između 58 durum sorata pšenice.

UPGMA metodom je bilo moguće razlikovati sve ispitivane genotipove. Svrstavanje genotipova se razlikovalo od dendograma izrađenog na temelju genetske udaljenosti utvrđene mikrosatelitnim markerima. Hrvatske sorta Aida i Osječka 20 su se izdvojile kao najudaljenije (šesta i sedma skupina), a prosječna genetska sličnost u odnosu na ostale sorte iznosila je 0,44, što je manja sličnost nego prosjek između svih ostalih sorata ($S_{ij}=0,54$). Petu skupinu čine sorte Lela i Divana, a tri hrvatske i jedna austrijska sorta (Antonius) svrstale su

se u treću skupinu, dok se sorta BC Elvira izdvojila kao posebna skupina (4). Na svrstavanje sorata u drugu skupinu najviše je utjecala sorta Srpanjka. Sorte Lucija, Renata, Felix, Anđelka, Alka i Seka u svojoj genetskoj osnovi imaju upravo sortu Srpanjka kao jednoga od roditelja. Sorta Alka koja je nastala iz križanja Osk. 5.140-22-91/Sana, a linija Osk. 5.140-22-91 je prema podrijetlu srodan sorti Srpanjka (Dvojković, 2009.) se u dendogramu prema mikrosatelitnim markerima svrstala u skupinu u kojoj je sorta Sana.

Većina genotipova prve skupine dijele zajedničke pretke prema matrici genetske sličnosti (S_{ij}). Podskupinu 1c čine dvije sorte PIO, Pipi i Ilirija te francuska sorta Soissons koji je jedan od roditelja u obje sorte, a kao pridruženi član svrstala se austrijska sorta Valerius koja bi se trebala nalaziti u trećoj skupini jer dijeli zajedničku genetsku osnovu sa sortom Antonius. Sličan način svrstavanja slijedi i u podskupinama 1b i 1a. Tako zajedničke genetske osnove u podskupini 1b dijele Slavonija i Golubica što se podudara sa dendogramom prema mikrosatelitnim markerima i rezultatima Marić i sur. (2004) koji su utvrdili veliku sličnost između te dvije sorte u samo nekoliko polimorfnih RAPD fragmenata. Zajedničku osnovu u istoj skupini dijele Janica i Ružica koje za jednoga od roditelja imaju Srpanjku, dok je sorta BC instituta Adriana pridruženi član ove podskupine. 1a2 podskupinu čine sorte Zlata i Demetra, Zlata je nastala križanjem sorte Srpanjka i Demetra. Zatim slijede Zlatna Dolina i Sana, obje sorte BC instituta, te sorte Katarina i Bezostaja. U 1a1 podskupini se nalaze Žitarka, Barbara i Super Žitarka koje su se i prema metodi mikrosatelita svrstale u istu skupinu kao međusobno slične. Navedene sorte su i prema specifičnim polimorfnim fragmentima AFLP početnica odvojene od ostalih sorata kao genetski srodne što je u skladu sa podacima o pedigreu. No nije poznato jesu li su ti „anonimni“ fragmenti povezani sa lokusima koji utječu na svojstvo od interesa (Barett i Kidwell, 1998.). Sorta U1 se svrstala u 1a1 skupinu, kao pridruženi član, iako je u prethodno navedenim rezultatima, prema morfološkim i mikrosatelitnim početnicama, svrstana kao potpuno izdvojeni genotip i skupina.

AFLP početnice su po svom karakteru monogeniski dominantni markeri, pa navedene sorte nisu svrstane prema pedigreu među skupine kojima bi trebale biti sličnije vjerojatno zbog nedovoljne pokrivenosti genoma pšenice koristeći ove četiri kombinacije AFLP početnica. Mikrosatelitne početnice koje su po svom karakteru kodominantni markeri omogućile su bolju i veću razlučivost između ispitivanih genotipova, svrstavajući ih prema podrijetlu i

pedigreu. Slična odstupanja u istraživanju utvrdili su i Manifesto i sur. (2001.), te Stodard i sur. (2005.), koji navodi da su odstupanja upravo povezana s razlikama između ta dva tipa markera. Mikrosatelitne početnice učinkovitije su utvrđivanju strukture populacije, dok su AFLP markeri bolje prilagođeni u otkrivanju genetskih odnosa na individualnoj razini (Neigel i sur., 1997.; Schut i sur., 1997.; Stodard i sur., 2005.). S druge strane istraživanja Roy i sur. (2004.) navode vrlo visoku učinkovitost AFLP markera u odnosu na morfološka svojstva i mikrosatelitne markere te da korištenje različitih kombinacija markera daje različite procjene genetske različitosti.

AFLP početnice su uspjele utvrditi genetsku različitost između ispitivanih genotipova razvrstavajući ih na temelju individualnog doprinosa svakom genetskom skupu.

6.3.4. Analiza AMOVA

Provedena analiza AMOVA procijenila je varijabilnost unutar i između ispitivanih genotipova te unutar i između oplemenjivačkih programa. Udio varijabilnosti u ukupnoj molekularnoj varijanci između hrvatske i strane germplazme iznosio je 4,59% i bio je visoko opravdan ($p < 0,001$). Najveći udio ukupne varijabilnosti utvrđen je unutar hrvatske i strane germplazme u provedenom istraživanju (95,41%). Slični omjer varijabilnosti u ukupnoj molekularnoj varijanci utvrđen je i između oplemenjivačkih programa Poljoprivrednoga instituta u Osijeku, BC instituta i stranih sorata (6,78%, $p < 0,001$), dok je najveći dio varijabilnosti nastao zbog razlika između sorata unutar oplemenjivačkih programa (93,22%). Između četiri razdoblja oplemenjivanja nisu utvrđene statistički opravdane razlike, manji dio ukupne varijabilnosti odnosio se na razlike između razdoblja (1,58%, $p < 0,1701$), dok je veći dio varijabilnosti uzrokom razlike između sorata unutar razdoblja priznavanja.

Veća varijabilnost između sorata unutar oplemenjivačkih programa rezultat je intenzivnog oplemenjivačkog rada u svakom od oplemenjivačkih programa koji su iskoristili genetski različite i udaljene genotipove, što je potvrdila i AMOVA između hrvatskih i stranih oplemenjivačkih programa. Manji udio varijabilnosti između oplemenjivačkih programa i između razdoblja priznavanja proističe iz činjenice da su razmjennom germplazme ponekad korišteni roditelji iste genetske osnove za križanja prilikom stvaranja novih sorti, a i iz činjenice da su te sorte uzgajane u sličnim agroekološkim uvjetima. Velik broj istraživanja je

dobio slične rezultate procjenjujući varijabilnost unutar jarih i ozimih sorata, oplemenjivačkih programa, geografskih regija, razdoblja priznavanja, lokalnih populacija i modernih sorata (Barett i Kidwell, 1998.; Christiansen i sur., 2002.; Roussel i sur., 2004.; Dreisigacker i sur., 2004.; Dvojković, 2009.; Prasad i sur., 2009.).

Ovi rezultati potvrđuju da je značajna količina genetske različitosti ugrađena u ispitivane hrvatske i strane genotipove u provedenom istraživanju. Brižnim odabirom roditelja omogućit će se rekombinacija utvrđene različitosti, koja se može povećati i koristiti za križanja, odnosno stvaranje nove i šire genetske osnove unutar novih oplemenjivačkih programa.

6.3.5. Korelacija između matrica morfoloških i molekularnih podataka

Mantelovim testom usporedbe različitih matrica genetske sličnosti nisu utvrđene korelacije između morfoloških svojstava i molekularnih podataka. Utvrđena je vrlo slaba korelacija ($r=0,191$) između SSR i AFLP metode, ali je statistički opravdana ($p<0,01$). Korelacije između genetske različitosti između SSR i AFLP metode molekularnih markera utvrdili su i Manifesto i sur. (2001.) ($r=0,27$, $p<0,001$). Opravdanost korelacija pokazuje da se informacije dobivene temeljem molekularnih markera djelomično odražavaju u rodoslovlju ispitivanih genotipova te da se dvije metode međusobno nadopunjuju. Visoki koeficijent korelacije ($r=0,81$) između mikrosatelitnih i AFLP markera utvrdili su Maccaferri i sur. (2007.) koji objašnjavaju dobrom pokrivenošću cijelog genoma pšenice molekularnim markerima. Razlike između morfoloških i molekularnih metoda ispitivanja genetske različitosti nastaju zbog pristranih i okolišno uvjetovanih fenotipskih svojstava te mogućih nepouzdatih podataka o pedigreu. Slabu povezanost morfoloških i molekularnih podataka utvrdili su Schut i sur. (1997.), Manifesto i sur. (2001.), Marić i sur. (2004.), Maccaferri i sur. (2007.) i Čupić i sur. (2009.).

Različitost na temelju SSR i AFLP metoda se pokazala kao vrlo učinkovita u procjeni genetske različitosti u ispitivanih sorata. Rezultati upućuju na to da je u ovim genotipovima sadržana velika genetska udaljenost i različitost što su preduvjeti za stvaranje novih sorata, pažljivim odabirom roditelja za križanja.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja genetske različitosti germplazme ozime pšenice može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđena je značajna varijabilnost u agronomskim svojstvima između svih ispitivanih genotipova te je moguće izdvojiti adaptabilne visokorodne sorte (Bastide, BC Patria, Alka, Eurofit i Sana).
2. Utvrđena je velika udaljenost između ispitivanih genotipova na temelju morfoloških podataka.
3. Sastav visokomolekularnih podjedinica glutenina pokazao je veliku varijabilnost između ispitivanih genotipova.
4. Analiza količina amiloze i amilopektina utvrdila je statistički visoko opravdane razlike između ispitivanih genotipova te izdvojila genotipove sa ekstremno niskim sadržajem amiloze (U1, Super Žitarka, Bezostaja i Valerius) i ekstremno visokim sadržajem amilopektina (Srpanjka, Demetra, Slavonija i Žitarka).
5. Procjena različitosti na temelju različitih metoda utvrdila opravdanost korištenja SSR i AFLP metode između kojih je utvrđena značajna korelacija.
6. S obzirom na analizirane podatke kombinacija agronomsko-morfoloških i molekularnih podataka može dovesti do uspješnog izbora genetski različitih i divergentnih roditelja za križanja u budućim oplemenjivačkim programima.

8. LITERATURA

1. Acevedo E, Silva P, Silva H (2002) Wheat Growth and Physiology U: Curtis BC, Rajaram S i Gómez Macpherson H (ed.) Bread wheat improvement and production. FAO, Roma, Italy, 1-47. <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e06.htm>
2. Ačkar Đ, Babić J, Šubarić D, Kopjar M, Miličević B (2010) Isolation of starch from two wheat varieties and their modification with epichlorohydrin. Carbohydrate polymers 81(1): 76-82
3. Ahmad M (2002) Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats. Genome 45: 646-651
4. Ali Y, Atta BM, Akhter J, Monneveux P, Lateef Z (2008) Genetic variability, association and diversity studies in wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm. Pak J. Bot., 40(5): 2087-2097
5. Balfourier F, Roussel V, Strelchenko P, Exbrayat-Vinson F, Sourdille P, Boutet G, Koenig J, Ravel C, Mitrofanova O, Beckert M, Charmet G (2007) A worldwide core collection arrayed in a 384-well plate. Theor. Appl. Genet. 114: 1265-1275
6. Banayi J Szucs P, Karsai I, Meszaros K, Kuti C, Lang L, Bedo Z (2006) Cultivar identification by molecular markers. Cereal Res. Commun. 34 (2-3): 865-870
7. Barić M, Jurman M, Habuš Jerčić I, Kereša S, Šarčević H (2008) Procjena strukture uroda zrna sorti i linija ozime pšenice. Sjeminarstvo 25 (2): 91-101
8. Barrett BA, Kidwell KK (1998) AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop Sci. 38: 1261-1271
9. Barrett BA, Kidwell KK, Fox PN (1998) Comparison of AFLP-based on pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop Sci. 38 (5): 1261-1271
10. Bede M (1994) Novi trendovi u oplemenjivanju pšenice. Sjeminarstvo 11(1-2): 5-13

11. Bede M, Petrovic S (2006) Genetska varijabilnost roditelja-uvjet uspješnom oplemenjivanju pšenice. Sjeminarstvo 23(1): 5-11
12. Bedő Z, Vida G, Láng L, Karsai I (1998) Breeding for breadmaking quality using old Hungarian varieties. Euphytica 100: 179-182
13. Bekes F, Cavanagh CR, Martinov S, Bushuk W, Wrigley CW (2006) The gluten composition of wheat varieties and genotypes, part II. Composition table for the HMW subunits of glutenin. http://www.aaccnet.org/grainbin/gluten_gliadin.asp
14. Blazek J (2008) Role of amylose in structure-function relationship in starches from Australian wheat varieties. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture, Food and Natural Resources. The University of Sydney. Australia
15. Bordes J, Branlard G, Outy EX, Charmet G, Balfourier F (2008) Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in worldwide core collection. Journal of Cereal Science 48: 569-579
16. Borlaug NE (2007) Sixty-two years of fighting hunger: personal recollections. Euphytica 157: 287-297
17. Borojević S (1990) Genetski napredak u povećanju prinosa pšenice. Savremena poljoprivreda 38(1-2): 25-47
18. Borojević K, Borojević K (2005) Historic role of the variety Akakomugi in Sothern and Central European wheat breeding programs. Breeding Science 55: 253-256
19. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-333
20. Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, Lagoutte F, Gourdon J (2001) Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. Euphytica 119: 59-67
21. Branlard G, Dardevet M, Amiour N, Igrejas G (2003) Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omegagliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Genet. Resour. Crop Evol. 50: 669-679

22. Burrell MM (2003) Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *Journal of Experimental Botany* 54(382): 451-456
23. Chebotar SV, Korzun VN, Sivolap YM (2001) Allele distribution at locus WMS261 marking the dwarfing gene *Rht8* in common wheat cultivars of Southern Ukraine. *Russian Journal of Genetics* 37(8): 894-898
24. Chenyang H, Wang L, Zhang X, You G, Dong Y, Jia J, Liu X, Shang X, Liu S, Cao Y (2006) Genetic diversity in Chinese modern wheat varieties revealed by microsatellite markers. *Science in China: Series C Life Sciences* 49(3): 218-226
25. Chinnusamy V, Khanna-Chopra R (2003) Effect of heat stress on grain starch content in diploid, tetraploid and hexaploid wheat species. *J. Agronomy & Crop Science* 189: 242-249
26. Christiansen MJ, Andersen SB, Ortiz R (2002) Diversity changes in intensively bred wheat germplasm during the 20th century. *Molecular breeding* 9: 1-11
27. Cooke RJ, Reeves JC (2003) Plant genetic resources and molecular markers: variety registration in a new era. *Plant Genetic Resources* 1(2-3): 81-87
28. Corbellini M, Perenzin M, Accerbi M, Vaccino P, Borghi B (2002) Genetic diversity in bread wheat, as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationships to hybrid performance. *Euphytica* 123: 273-285
29. Corcuera V, Salmoral EM, Salerno JC, Krisman CR (2007) Starch molecular fractionation of bread wheat varieties. *Agriscientia* 24(1): 11-18
30. Čupić T, Tucak m, Popović S, Bolarić S, Grljušić S, Kozumplik V (2009) Genetic diversity of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes assessed by pedigree, morphological and molecular data. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7(3-4): 343-348
31. DeLacy IH, Skvomand B, Huerta J (2000) Characterization of Mexican wheat landraces using agronomically useful attributes. *Genet. Resour. Crop Evol.* 47: 591-602
32. Denčić S, Pržulj N, Milovanović M, Protić R, Simović M, Simović M, Stojanović Ž, Perović D (1997) Genetski resursi strnih žita. *Savremena poljoprivreda* 46 (1-2): 87-98

33. Denčić S (2006) Genetika i oplemenjivanje strnih žita. Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 42 (2): 377-394
34. De Vita P, Destri Nicosia OL, Nigro F, Platani C, Riefolo C, Di Fonzo N, Cattivelli L (2007) Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *Europ. J. Agronomy* 26: 39-53
35. Dice, LR (1945) Measures and amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302
36. Donini P, Law JR, Koebner RMD, Reeves JC, Cooke RJ (2005) The impact of breeding on genetic diversity and erosion in bread wheat. *Plant Genetic Resources* 3(3): 391-399
37. Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
38. Dreisigacker S, Zhang P, Warburton ML, Skovmand B, Hoisington D, Melchinger AE (2004) Genetic diversity among and within CIMMYT wheat landrace accessions investigated with SSR's and implications for plant genetic resources management. *Crop Sci.* 45: 653–661
39. Drezner G (1995) Oplemenjivanje pšenice na Poljoprivrednom institutu Osijek. *Sjemenarstvo* 12(1): 13-38
40. Drezner G, Dvojković K, Guberac V, Marić S, Novoselović D, Horvat D, Španić V., Šimenić J, Primorac J (2010) Novi genotipovi pšenice – procjena uroda i kakvoće u više okolina. Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma, Opatija, Hrvatska, 15. -19. veljače 2010: 399-403
41. Dvojković K (2005) Genetska analiza kvantitativnih svojstava u biparentalnim i recipročnim križancima ozime pšenice. Magistarski rad. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
42. Dvojković K (2009) Genetska raznolikost hrvatskih kultivara pšenice. Doktorska disertacija, Osijek.

43. Dvojković K, Šatović Z, Drezner G, Somers DJ, Lalić A, Novoselović D, Horvat D, Marić S, Šarčević H (2010) Allelic variability of Croatian wheat cultivars at the microsatellite locus *Xgwm261*. *Poljoprivreda* 16(1): 32-37
44. Eliason AC (2003) Starch structure and bread quality. U: Cauvain SP (ed.) *Bread making, improving quality*. <http://books.google.com/books>: 145-167
45. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
46. Fu YB, Peterson GW, Scoles G, Rosnagel B, Schoen DJ, Richards KW (2003) Allelic diversity changes in 96 Canadian oat cultivars released from 1886 to 2001. *Crop Sci.* 43: 1989-1995
47. Fu YB, Peterson GW, Yu JK, Gao L, Jia J, Richards KW (2006) Impact of plat breeding on genetic diversity of the Canadian hard red spring wheat germplasm as revealed by EST-derived SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1239-1247
48. Fu YB, Somers DJ (2009) Genome wide reduction of genetic diversity in wheat breeding. *Crop Sci.* 49: 161-168
49. Fufa H, Beazinger PS, Beecher BS, Graybosch RA, Eskridge KM (2005.) Genetic improvement trends in agronomic performances and end-use quality characteristics among hard red winter wheat cultivars in Nebraska. *Euphytica* 144: 187-198
50. Gale KR (2005) Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat. *Journal of Cereal Science* 41: 181-192
51. Ganeva G, Korzun V, Landjeva S, Popova Z, Christov NK (2010) Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57(2): 273-285
52. Gao LF, Jing RL, Huo NX, Li Y, Li XP, Zhou RH, Chang XP, Tang JF, Ma ZY, Jia JZ (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1392-1400

53. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW (2002): Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Endosperm Proteins. *Cereal Chemistry* 78 (6): 635-646
54. Guberac V, Marić S, Drezner G, Petrović S, Dvojković K, Brandić V (2008) Interrelationships of important agronomic traits and kernel yield in winter wheat. 11th IWGS Proceedings, Sydney University Press, Sydney, 1-4
55. Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B (1999) Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant breeding* 118: 369-390
56. Glaszmann JC, Kilian B, Upadhyaya HD, Varshney RK (2010) Accessing genetic diversity for crop improvement. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 13: 167-173
57. Grljušić S (2003) Genetska varijabilnost kultivara crvene djeteline (*Trifolium pratense* L.) nakon selekcije u brdsko-planinskim uvjetima. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb
58. Hao C, Wang L, Zhang X, You G, Dong Y, Jia J, Liu X, Shang X, Liu S, Cao Y (2006) Genetic diversity in Chinese modern wheat varieties revealed by microsatellite markers. *Sci. China C Life Sci.* 49: 218–226
59. Harlan JR (1970) Evolution of cultivated plants.
http://www2.bioversityinternational.org/publications/Web_version
60. Haudry A, Cenci A, Ravel C, Batallion T, Brunel D, Poncet C, Hochu I, Poirier S, Santoni S, Glemin S, David J (2007) Grinding up wheat: A massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol. Biol. Evol.* 24(7): 1506-1517
61. Horvat D, Drezner G, Jurković Z, Šimić G, Magdić D, Dvojković K (2006) The importance of high-molecular-weight glutenin subunits for wheat quality evaluation. *Poljoprivreda* 12(1): 53-57
62. Horvat D, Drezner G, Šimić G, Mijić A, Magdić D (2008) Quality of wheat cultivars created at the Agricultural Institute Osijek in relation to high molecular weight glutenin subunits (HMW – GS) composition. *Periodicum biologorum* 110(3): 263-268

63. Horvat D, Kurtanjek Ž, Drezner G, Šimić G, Magdić D (2009) Effects of HMM glutenin subunits on wheat quality attributes. *Food Technol. Biotechnol.* 43(3): 253-259
64. Hu G, Burton C, Yang C (2010) Efficient measurement of amylose content in cereal grains. *Journal of cereal Science* 51: 35-40
65. Huang XQ, Wolf M, Ganai MW, Orford S, Koebner RMD, Röder M (2007) Did modern plant breeding lead to genetic erosion in European winter wheat varieties? *Crop Sci.* 47: 343-349
66. Hyten DL, Song Q, Zhu Y, Choi IY, Nelson RL, Costa JM, Specht JE, Schoemaker RC, Cregan PB (2006) Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *PNAS* 103(45): 16666-16671
67. Izadi-Darbandi A, YazdiSamadi B, Shanejat-Boushehri AA, Mohammadi M (2010) allelic variation in *Glu-1* and *Glu-3* loci of historical and modern Iranian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Genetics* 89(2): 193-199
68. Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223-270
69. Jin Y, Singh RP (2006) Resistance in U.S. wheat to recent African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31*. *Plant Dis.* 40(4): 476-480
70. Jones H, Jarman RJ, Austin L, White J, Cook RJ (2003) The management of variety testing reference collection in distinctness, uniformity and stability testing of wheat. *Euphytica* 132: 175-184
71. Jošt M, Fišter R, Skenderija M, Mrazović B (1995) Genetic basis of breadmaking quality of Croatian wheat cultivars. *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 33(2-3): 103-109
72. Kato K, Miura H, Sawada S (2000) Mapping QTLs and controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1114-1121
73. Khlestkina EK, Pestsova EG, Salina E, Röder MS, Arbuzova VS, Koval SF, Börner A (2002) Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS and SSR markers. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7: 795-802

74. Khlestkina EK, Huang XQ, Quenum FJB, Chebotar S, Röder MS, Börner A (2004) Genetic diversity in cultivated plants – loss or stability? *Theor. Appl. Genet.* 108: 1466-1472
75. Khlestkina EK, Röder MS, Efremova TT, Börner A, Shumny VK (2004) The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. *Plant Breeding* 123: 122-127
76. Kobiljski B, Quarrie S, Denčić S, Kirby J, Ivegeš M (2002) Genetic diversity of the Novi Sad wheat core collection revealed by microsatellites. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7: 685-694
77. Korzun V, Röder MS, Ganai MW, Worland AJ, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 1104-1109
78. Labuschagne MT, Geleta N, Osthoff G (2007) The influence of environment on starch content and amylose to amylopectin ratio in wheat. *Starch/Stärke* 59: 234-238
79. Landjeva S, Kozun V, Ganeva G (2006) Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925-2003 using microsatellites. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 1605-1614
80. Lásztity R (2002): Prediction of wheat quality-success and doubts. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46 (1-2): 39-49
81. Law JR, Donini P, Koebner RMD, Reeves JC, Cooke RJ (1998) DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified length polymorphism. *Euphytica* 102: 335-342
82. Lerner SE, Kolman MA, Rogers WJ (2009) Quality and endosperm storage protein variation in Argentinean grown bread wheat. I. Allelic diversity and discrimination between cultivars. *Journal of Cereal Science* 49: 337-345
83. Li Y, Huang C, Sui X, Fan Q, Li G, Chu X (2009) Genetic variation of wheat glutenin subunits between landraces and varieties and their contributions to wheat quality improvement. *Euphytica* 169: 159-168

84. Liang D, Tang J, Peña RJ, Singh R, He X, Shen X, Yao D, Xia X, He Z (2010) Characterisation of CIMMYT bread wheats for high and low molecular weight glutenin subunits and other quality-related genes with SDS-PAGE, RP-HPLC and molecular markers. *Euphytica* 172: 235-250
85. Liu J (2002) POWERMARKER – A powerful software for marker data analysis. North Carolina State University, Bioinformatics Research Center, Raleigh, NC (<http://powermarker.net>)
86. Löschenberger F, Fleck A, Grausgruber H, Hetzendorfer H, Hof G, Lafferty J, Marn M, Neumayer A, Pfaffinger G, Birschtzky J (2008) Breeding for organic agriculture: the example of winter wheat in Austria. *Euphytica* 163 (3): 469-480
87. Maccaferri M, Stefanelli, Rotondo F, Tuberosa R, Sanguineti MC (2007) Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome* 50: 373-384
88. MacRitchie F, Lafiandra D (1997) Structure – function relationships of wheat proteins. U: Srinivasan D, Paraf A (ed.) *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker, New York, 293-324. <http://books.google.com>
89. Manifesto MM, Schlatter AR, Hopp HE, Suarez EY, Dubcovsky J (2001) Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci.* 41: 682-690
90. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220
91. Marić S, Bolaric S, Martinčić J, Pejić I, Kozumplik V (2004) Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breeding* 123: 366-369
92. Martos V, Royo C, Rharrabti Y, Garcia del Moral LF (2005) Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain through the 20th century. *Field Crops Research* 91: 107-116

93. McIntosh SR, Pacey-Miller T, Henry RJ (2004) A universal protocol for identification of cereals. *Journal of Cereal Science* 41: 37-46
94. Miura H, Tanii S (1994) Endosperm starch properties in several wheat cultivars preferred Japanese noodles. *Euphytica* 72: 171-175
95. Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3(1): 01-08
96. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S (1993) Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochemical genetics* 31 (1/2): 75-86
97. Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of national Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323
98. Niegel JE (1997) A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Syst.* 28: 105-28
99. Noli E, Teriaca MS, Sanguineti MC, Conti S (2008) Utilization of SSR and AFLP markers for the assessment of distinctness in durum wheat. *Mol. Breeding* 22: 301-313.
100. Novoselovic D, Baric M, Drezner G, Gunjaca J, Lalic A (2004) Quantitative inheritance of some wheat plant traits. *Genetics and Molecular Biology* 27(1): 92-98
101. Oberforster M, Werteker M (1995) Wheat breeding and breadmaking quality in Austria. *Sjemenarstvo* 12 (6): 413-425
102. Oury FX, Chiron H, Faye A, Gardet O, Giraud A, Heumez E, Rolland B, Rousset M, Trotter M, Charmet G, Branlard G (2010) The prediction of wheat quality: joint use of the phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits. *Euphytica* 171: 87-109
103. Ozturk A, Aydin F (2004) Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. *J. Agronomy & Crop Science* 190: 93-99

104. Paillard S, Schnurbusch, Wienzeler M, Messmer M, Sourdille P, Abderhalden O, Kler B, Schachermayr G (2003) An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 1235-1242
105. Payne I, Lawrence GJ (1987) Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11(1): 29-35
106. Penzar I, Penzar B (2000) *Agrometeorologija. Školska knjiga, Zagreb*, 155 – 165
107. Plaschke J, Ganai MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91:1001-1007
108. Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1(7): 215-222
109. Prada D (2009) Molecular population genetics and agronomic alleles in seed banks: searching for a needle in a haystack? *Journal of Experimental Botany* 60 (9): 2541-2552
110. Prasad B, Babar MA, Xu XY, Bai GH, Klatt AR (2009) Genetic diversity in the U.S. hard red winter wheat cultivars as revealed by microsatellite markers. *Crop & Pasture Science* 60: 16-24
111. Rahman S, Li Z, Batey I, Cochrane MO, Appels R, Morell M (2000) Genetic alteration of starch functionality in wheat. *Journal of Cereal Science* 31: 91-110
112. Regina A (2000) Genetic variation of starch in *Triticum* species. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture. University of Sydney. Australia
113. Reif JC, Zhang P, Dreisigacker S, Warbourton ML, van Ginkel D, Hoisington M, Bohn M, Melchinger AE (2005) Trends in genetic diversity during the history of wheat domestication and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 110: 859-864
114. Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer A, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, Angus WJ (2009) Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60(7): 1899-1918

115. Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023
116. Rogers JS (1972) Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genet. VII. Univ. Texas Publ. 7213*: 145-153
117. Rogers DG, Tanimoto TT (1960) A computer program for classifying plants. *Science* 132: 1115-1118
118. Rohf FJ (2009) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy System, ver. 2.21c. Exeter Software, Setauket, New York, USA
119. Roussel V, Koenig J, Beckert M, Balfourier F (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 108: 920-930
120. Roussel V, Leisova L, Exbrayat F, Stehno Z, Balfourier F (2005) SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000. *Theor. Appl. Genet.* 111: 162-170
121. Roy JK, Lakshmikumaran MS, Balyan HS, Gupta PK (2004) AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. *Biochemical Genetics* 42(1/2): 43-59
122. Rukavina I, Ore Jurić R, Varnica I (2008) DUS ispitivanje novih sorti ozime pšenice u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2000. do 2008. godine. *Zbornik radova 43. hrvatskog i 3. međunarodnog simpozija agronoma u Opatiji.* 269-272
123. Sabo M, Bede M, Hardi ŽU (2002) Variability of grain yield of some winter wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Rostlinná výroba* 48 (5): 230-235
124. SAGA^{GT} genotyping software program ver 3.2. LI-COR® Biosciences Saga unix 1.0
125. Salem KFM, El-Zanaty AM, Esmail RM (2008) Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World Journal of Agricultural Science* 4(5): 538-544

126. Samobor V, Vukobratović M, Ivanek-Martinčić M, Jošt M (2005) Oplemenjivanje pšenice na visoku pekarsku kakvoću. *Sjemenarstvo* 22 (1-2): 5-11
127. SAS Institute (2003) *SAS/STAT User's Guide, Version 9.1.3*. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA
128. Schulman AH (2007) Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158 (3): 313-321
129. Schut JW, Qi X, Stam (1997) Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1161-1168
130. Schneider S, Roesseli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver.2.0.a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva Switzerland.
131. Singh N, Singh S, Isono N, Noda T, Singh AM (2009) Diversity in amylopectin structure, thermal and pasting properties of starches from wheat varieties/lines. *Internat. J.Biol. Macromol.* 45: 298-304
132. Singletary GW (2000) Starch synthesis and grain filling in wheat. U: Gupta AK i Kaur N (ed.) *Carbohydrate Reserves in Plants – Synthesis and Regulation*. Elsevier Science B.V., 79-105
133. Skovmand B, Reynolds MP, Delacy IH (2001) Searching genetic resources for physiological traits with potential for increasing yield. U: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JI i McNab A (ed.) *Application of Physiology in Wheat Breeding*. D.F., CIMMYT, 17-28
134. Slafer, GA, Calderini DF, Miralles DJ (1996): Yield components and compensation in wheat: opportunities for further increasing yield potential. U: Reynolds, MP, Rajaram S, McNab, A (ed.) *Increasing yield potential in wheat: breaking the barriers*. Mexico, DF, CIMMYT, 101-133. <http://books.google.com/books>
135. Smale M (1997) The green revolution and wheat genetic diversity: some unfounded assumptions. *World development* 25(8): 1257-1269

136. Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor. Appl. Genet. 109: 1105-1114
137. Stephenson P, Bryan, Kirby J, Collins A, Devos K, Busso C, Gale M (1998) Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. Theor. Appl. Genet. 97: 946-949
138. Stępien Ł, Mohler V, Bocianowski J, Koczyk G (2007) Assessing genetic diversity of Polish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 1499-1506
139. Stodart BJ, Mackay M, Raman H (2005.) AFLP and SSR analysis of genetic diversity among landraces of bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) from different geographic regions. Australian Journal of Agricultural Research 56: 691-697
140. Sultana T, Ghafoor A, Ashraf M (2007) Genetic variability in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Pakistan based on polymorphism for high molecular weight glutenin subunits. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 1159-1165
141. Šatović Z (1999) Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. Sjemenarstvo 16(1-2): 73-95
142. Tanaka H, Nakata N, Osawa M, Tomita M, Tsujimoto H, Yasamuro Y (2003) Positive effect of the high-molecular-weight glutenin allele, Glu-D1d, on the bread-making quality of common wheat. Plant Breeding 122: 279-280
143. Tanksley SD, McCouch SR (1997) Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. Science 277: 1063-1066
144. Tohver M (2007) High molecular weight (HMW) glutenin subunit composition of some Nordic and Middle European wheats. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 67-81
145. Triboi E, Abad A, Michelena A, Lloveras J, Ollier JL, Daniel C (2000) Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: 1. quantitative and qualitative variation of storage proteins. European Journal of Agronomy 13: 47-64
146. Tripp R, Van der Heide W (1996) The erosion of crop genetic diversity: challenges, strategies and uncertainties. ODI Natural Resource Perspectives 7: 1-10

147. Van Heerwaarden J, Hellin J, Visser RF, van Eeuwijk FA (2009) estimating erosion in modernized smallholder agriculture. *Theor. Appl. Genet.* 119: 875-888
148. Vieira EA, de Carvalho FIF, Bertan I, Kopp MM, Zimmer PD, Benin G, da Silva JAG, Hartwig I, Malone G, de Oliveira AC (2007) Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genet. Mol. Biol.* 30(2): 392-399
149. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Le T, Hornes M, Jerina F, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414
150. Warburton ML, Crossa J, Franco J, Kazi M, Trethowan R, Rajaram S, Pfeiffer W, Zhang P, Dreisigacker S, van Ginkel M (2006) Bringing wild relatives back into the family: recovering genetic diversity in CIMMYT improved wheat germplasm. *Euphytica* 149: 289-301
151. White J, Law JR, MacKay I, Chalmers KJ, Smith JSC, Kilian A, Powell W (2008) The genetic diversity of UK, US and Australian cultivars of *Triticum aestivum* measured by DArT markers and considered by genome. *Theor. Appl. Genet.* 116 (3): 439-453
152. Worland AJ, Korzun V, Röder M, Ganai MW, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1110-1120
153. Worland T, Snape JW (2000) Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement. U: Bonjean AP, Angus WJ (ed.) *World wheat book*. Lavoisier publishing, Paris, France. 59-100
154. Yamamori M, Nakamura T, Kuroda A (1992) Variations in the content of starch-granule bound protein among several Japanese cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 64: 215-219

155. Yanaka M, Takata K, Ikeda TM, Ishikawa N (2007) Effect of the high-molecular-weight glutenin allele, *Glu-D1d*, on the noodle quality of common wheat. *Breeding Science* 57: 243-248
156. Yang FP, Wang LH, Wang JW, He XY, Zhang XK, Shang XW, Yang WX, Xia XC, He ZH (2010) Characterization of high- and low-molecular-weight glutenin subunit genes in Chinese winter wheat cultivars and advanced lines using allele-specific markers and SDS-PAGE. *Crop & Pasture Science* 61: 84-91
157. You GX, Zhang XY, Wang LF (2004) An estimation of the minimum number of SSR loci needed to reveal genetic relationships in wheat varieties: Information from 96 random accessions with maximized genetic diversity. *Molecular Breeding* 14: 397-406
158. Zhang PP, Ma HX, Yao JB, He ZH (2009) Effect of allelic variation and expression quantity at *Glu-1* loci on size distribution of glutenin polymer in common wheat. *Acta Agronomica Sinica* 35(9): 1606-1612
159. Zhang X, Yang S, Zhou Y, He Z, Xia X (2006) Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1b* and *RHT8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica* 152: 109-116
160. Zhang XY, Li CW, Wang LF, Wang HM, You GX, Dong YS (2002) An estimation of the minimum number of SSR loci needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement. *Theor. Appl. Genet.* 106: 112-117
161. Zheleva D, Todorovska E, Jacquemin JM, Atanassov a, Christov N, Panayotov I, Tsenov N (2006) Allele distribution at microsatellite locus *Xgwm261* marking the dwarfing gene *Rht8* in hexaploid wheat from Bulgarian and Belgian gene bank collections and its application in breeding programs. *Biotechnol. & biotechnol. Eq.* 20 (2): 45-56

9. SAŽETAK

U radu su istraživana tri načina utvrđivanja genetske različitosti sorata ozime krušne pšenice. Ispitana je genetska različitost na temelju agronomskih podataka, morfoloških svojstava i molekularnih podataka. Ciljevi istraživanja bili su: 1. procijeniti različitost germplazme pšenice pomoću agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera, 2. istražiti postojanje genetske erozije unutar ispitivane germplazme ozime pšenice i 3. ispitati mogućnost korištenja kombinacije agronomsko-morfoloških svojstava i molekularnih markera u procjeni genetske različitosti u oplemenjivačke svrhe. U istraživanje je uključeno 40 sorata ozime pšenice podrijetlom iz Hrvatske, Austrije, Francuske, Italije i Rusije. Poljski pokus je postavljen po slučajnom blok rasporedu u tri ponavljanja tijekom dvije vegetacijske godine (07./08., 08./09.). U analizu, na temelju agronomskih i morfoloških podataka, uključeno je po 10 svojstava. Sastav visokomolekularnih podjedinica glutenina (HMW GS) je utvrđen za 16 genotipova, a za ostale podaci su dobiveni na temelju literaturnih podataka. Analiza sastava škroba temeljila se na izdvajanju amiloze i amilopektina te njihove količine i omjera. Za SSR analizu korišteno je 26 mikrosatelita, a za AFLP su korištene četiri kombinacije početnica. Statističke analize navedenih podataka provedene su pomoću SAS Software 9.1.3, NTSYS ver.2.2., Arlequin ver.2.0. i Powermarker ver.3.25. Analizom varijance (ANOVA) utvrđene su statistički visoko opravdane razlike ($p < 0,001$) između svih genotipova za sva ispitivana agronomska svojstva te za količinu amiloze i amilopektina. Utvrđena je velika varijabilnost HMW GS između ispitivanih genotipova. Procijenjena je genetska udaljenost na temelju morfoloških i molekularnih podataka. Obavljene su analize skupina na temelju kojih su sastavljeni dendogrami, a na temelju genetske udaljenosti molekularnih podataka obavljena je analiza molekularne varijance (AMOVA). Unutar i između ispitivanih genotipova utvrđena je genetska različitost za morfološke i molekularne podatke. Mikrosatelitni i AFLP markeri pokazali su visok stupanj polimorfizma između ispitivanih genotipova te sposobnost razlikovanja vrlo srodnih genotipova. Utvrđena je značajna korelacija između dvije molekularne metode, koje su se pokazale učinkovitije u utvrđivanju genetske različitosti u odnosu na agronomska i morfološka svojstva.

Ključne riječi: pšenica, genetska različitost, agronomska svojstva, morfološka svojstva, SSR, AFLP

10. ABSTRACT

In this study three methods of genetic diversity estimation in winter wheat varieties were used. Diversity was analyzed based on agronomic and morphologic traits and molecular data.

The main objectives of this study were: 1. to estimate genetic diversity of wheat germplasm using agronomic and morphologic traits and molecular markers, 2. to investigate the existence of genetic erosion within tested wheat germplasm, 3. to explore potential utilization of combination of agronomic, morphologic and molecular markers in plant breeding. Forty winter bread wheat varieties were used originating from Croatia, Austria, France, Italy and Russia. Field trial was conducted during two vegetation years (2007/2008, 2008/2009) in three replications according to randomized block design. Ten traits were included in agronomic and morphologic analysis. Composition of high molecular weight glutenin subunits (HMW GS) was evaluated for 16 varieties, for the rest literature data was used. Starch composition analysis was based on amylose and amylopectin isolation, their quantity and ratio. For the SSR analysis 26 microsatellite primers were used, and for the AFLP analysis four primer combinations. Statistical analysis was performed using SAS Software 9.1.3, NTSYS ver.2.2., Arlequin ver2.0. and Powermarker ver.3.25. Analyzed varieties displayed highly significant differences ($p < 0,001$) for all agronomic traits and for amylose/amylopectin ratio. High variability of HMW GS was found among varieties. Estimation of genetic diversity based on morphologic and molecular data were used to construct dendograms. AMOVA was used to evaluate variability based on molecular data. Genetic diversity was estimated among and within morphologic and molecular data. SSR and AFLP markers showed efficient discrimination power between highly related genotypes. Significant correlation was found between two molecular methods which showed more accurate estimate of genetic diversity than by agronomic and morphologic data.

Key words: wheat, genetic diversity, agronomic traits, morphologic traits, SSR, AFLP.

11. PRILOZI

11.1. Prilog 1

Tablice LSD vrijednosti za ispitivana agronomska svojstva u vegetacijskoj 2007./2008.

Tablica 54. Rezultati LSD testa za visinu biljke

Tablica 55. Rezultati LSD testa za broj biljaka po jedinici površine

Tablica 56. Rezultati LSD testa za duljinu klasa

Tablica 57. Rezultati LSD testa za broj klasića po klasu

Tablica 58. Rezultati LSD testa za broj zrna po klasu

Tablica 59. Rezultati LSD testa za masu 1000 zrna

Tablica 60. Rezultati LSD testa za hektolitarsku masu

Tablica 61. Rezultati LSD testa za urod zrna

Tablice LSD vrijednosti za ispitivana agronomska svojstva u vegetacijskoj 2008./2009.

Tablica 62. Rezultati LSD testa za visinu biljke

Tablica 63. Rezultati LSD testa za broj biljaka po jedinici površine

Tablica 64. Rezultati LSD testa za duljinu klasa

Tablica 65. Rezultati LSD testa za broj klasića po klasu

Tablica 66. Rezultati LSD testa broj zrna po klasu

Tablica 67. Rezultati LSD testa za masu 1000 zrna

Tablica 68. Rezultati LSD testa za hektolitarsku masu

Tablica 69. Rezultati LSD testa za urod zrna

Tablica 64. Rezultati LSD testa za duljinu klasa u 2008./2009.

	9,04	9,04	8,73	8,70	8,67	8,44	7,97	7,88	7,87	7,85	7,79	7,76	7,69	7,55	7,49	7,46	7,41	7,35	7,20	7,14	7,03	6,84	6,77	6,75	6,73	6,72	6,71	6,65	6,57	6,56	6,55	6,49	6,42	6,41	6,36	6,24	6,22	6,01	5,80	5,80	5,80		
	1	36	20	40	32	39	27	23	31	35	38	37	21	26	14	18	34	28	13	11	33	24	15	3	7	16	29	25	19	6	2	22	8	12	4	9	5	17	10	30			
5.80	10	3,24	3,24	2,93	2,90	2,87	2,64	2,17	2,08	2,07	2,05	1,99	1,96	1,89	1,75	1,69	1,66	1,61	1,55	1,40	1,34	1,23	1,04	0,97	0,95	0,93	0,92	0,91	0,85	0,77	0,76	0,75	0,69	0,62	0,61	0,56	0,44	0,42	0,21	0,00	0,00		
5.80	30	3,24	3,24	2,93	2,90	2,87	2,64	2,17	2,08	2,07	2,05	1,99	1,96	1,89	1,75	1,69	1,66	1,61	1,55	1,40	1,34	1,23	1,04	0,97	0,95	0,93	0,92	0,91	0,85	0,77	0,76	0,75	0,69	0,62	0,61	0,56	0,44	0,42	0,21	0,00	0,00		
6.01	17	3,03	3,03	2,72	2,69	2,66	2,43	1,96	1,87	1,86	1,84	1,75	1,68	1,54	1,48	1,45	1,40	1,34	1,19	1,13	1,02	0,83	0,76	0,74	0,72	0,71	0,70	0,64	0,56	0,55	0,54	0,48	0,41	0,40	0,35	0,23	0,21	0,00	0,00	0,00			
6.22	5	2,82	2,82	2,51	2,48	2,45	2,22	1,75	1,66	1,65	1,63	1,57	1,54	1,47	1,33	1,27	1,24	1,19	1,13	0,98	0,82	0,81	0,62	0,55	0,53	0,51	0,50	0,49	0,43	0,35	0,34	0,33	0,27	0,20	0,19	0,14	0,02	0,00	0,00				
6.24	9	2,80	2,80	2,49	2,46	2,43	2,20	1,73	1,64	1,63	1,61	1,55	1,52	1,45	1,31	1,25	1,22	1,17	1,11	0,96	0,90	0,79	0,60	0,53	0,51	0,49	0,48	0,47	0,41	0,33	0,32	0,31	0,25	0,18	0,17	0,12	0,00	0,00	0,00				
6.36	4	2,68	2,68	2,37	2,34	2,31	2,08	1,61	1,52	1,51	1,49	1,43	1,40	1,33	1,19	1,13	1,10	1,05	0,99	0,84	0,78	0,67	0,48	0,41	0,39	0,37	0,36	0,35	0,29	0,21	0,20	0,19	0,13	0,06	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00				
6.41	12	2,63	2,63	2,32	2,29	2,26	2,03	1,56	1,47	1,46	1,44	1,38	1,35	1,28	1,14	1,08	1,05	1,00	0,94	0,79	0,73	0,62	0,43	0,36	0,34	0,32	0,31	0,30	0,24	0,16	0,15	0,14	0,08	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
6.42	8	2,62	2,62	2,31	2,28	2,25	2,02	1,55	1,46	1,45	1,43	1,37	1,34	1,27	1,13	1,07	1,04	0,99	0,93	0,78	0,72	0,61	0,42	0,35	0,33	0,31	0,30	0,29	0,23	0,15	0,14	0,13	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				
6.49	22	2,55	2,55	2,24	2,21	2,18	1,95	1,48	1,39	1,38	1,36	1,30	1,27	1,20	1,06	1,00	0,97	0,92	0,86	0,71	0,65	0,54	0,35	0,28	0,26	0,24	0,23	0,22	0,16	0,08	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
6.55	2	2,49	2,49	2,18	2,15	2,12	1,89	1,42	1,33	1,32	1,30	1,24	1,21	1,14	1,00	0,94	0,91	0,86	0,80	0,65	0,59	0,48	0,29	0,22	0,20	0,18	0,17	0,16	0,10	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
6.56	6	2,48	2,48	2,17	2,14	2,11	1,88	1,41	1,32	1,31	1,29	1,23	1,20	1,13	0,99	0,93	0,90	0,85	0,79	0,64	0,58	0,47	0,28	0,21	0,19	0,17	0,16	0,15	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
6.57	19	2,47	2,47	2,16	2,13	2,10	1,87	1,40	1,31	1,30	1,28	1,22	1,19	1,12	0,98	0,92	0,89	0,84	0,78	0,63	0,57	0,46	0,27	0,20	0,18	0,16	0,15	0,14	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
6.65	25	2,39	2,39	2,08	2,05	2,02	1,79	1,32	1,23	1,22	1,20	1,14	1,11	1,04	0,90	0,84	0,81	0,76	0,70	0,55	0,49	0,38	0,19	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
6.72	16	2,32	2,32	2,01	1,98	1,95	1,72	1,25	1,16	1,15	1,13	1,07	1,04	0,97	0,83	0,77	0,74	0,69	0,63	0,48	0,42	0,31	0,12	0,05	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
6.73	7	2,31	2,31	2,00	1,97	1,94	1,71	1,24	1,15	1,14	1,12	1,06	1,03	0,96	0,82	0,76	0,73	0,68	0,62	0,47	0,41	0,30	0,11	0,04	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.75	3	2,29	2,29	1,98	1,95	1,92	1,69	1,22	1,13	1,12	1,10	1,04	1,01	0,94	0,80	0,74	0,71	0,66	0,60	0,45	0,39	0,28	0,09	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.77	15	2,27	2,27	1,96	1,93	1,90	1,67	1,20	1,11	1,10	1,08	1,02	0,99	0,92	0,78	0,72	0,69	0,64	0,58	0,43	0,37	0,26	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6.84	24	2,20	2,20	1,89	1,86	1,83	1,60	1,13	1,04	1,03	1,01	0,95	0,92	0,85	0,71	0,65	0,62	0,57	0,51	0,36	0,30	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7.03	33	2,01	2,01	1,70	1,67	1,64	1,41	0,94	0,85	0,84	0,82	0,76	0,73	0,66	0,52	0,46	0,43	0,38	0,32	0,27	0,21	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7.14	11	1,90	1,90	1,59	1,56	1,53	1,30	0,83	0,74	0,73	0,71	0,65	0,62	0,55	0,41	0,35	0,32	0,27	0,21	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.20	13	1,84	1,84	1,53	1,50	1,47	1,24	0,77	0,68	0,67	0,65	0,59	0,56	0,49	0,35	0,29	0,26	0,21	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.35	28	1,69	1,69	1,38	1,35	1,32	1,09	0,62	0,53	0,52	0,50	0,44	0,41	0,34	0,20	0,14	0,11	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.41	34	1,63	1,63	1,32	1,29	1,26	1,03	0,56	0,47	0,46	0,44	0,38	0,35	0,28	0,14	0,08	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.46	18	1,58	1,58	1,27	1,24	1,21	0,98	0,51	0,42	0,41	0,39	0,33	0,30	0,23	0,09	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.49	14	1,55	1,55	1,24	1,21	1,18	0,95	0,48	0,39	0,38	0,36	0,30	0,27	0,20	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.55	26	1,49	1,49	1,18	1,15	1,12	0,89	0,42	0,33	0,32	0,30	0,24	0,21	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.69	21	1,35	1,35	1,04	1,01	0,98	0,75	0,28	0,19	0,18	0,16	0,10	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.76	37	1,28	1,28	0,97	0,94	0,91	0,68	0,21	0,12	0,11	0,09	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.79	38	1,25	1,25	0,94	0,91	0,88	0,65	0,18	0,09	0,08	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.85	35	1,19	1,19	0,88	0,85	0,82	0,59	0,12	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
7.87	31	1,17	1,17	0,86	0,83	0,80	0,57	0,10</																																			

Tablica 65. Rezultati LSD testa za broj klasica po klasi u 2008./2009.

	19,45	18,71	18,59	18,56	18,55	18,44	18,17	18,05	18,00	17,80	17,79	17,70	17,61	17,48	17,47	17,43	17,36	17,35	17,31	17,29	17,19	17,11	16,85	16,80	16,61	16,60	16,49	16,43	16,29	16,24	16,14	16,12	16,08	15,99	15,60	15,56	15,38	15,07	14,41	
	36	40	23	27	21	24	25	33	38	19	22	7	32	39	16	28	35	11	18	31	26	9	20	17	37	15	2	4	6	14	8	29	30	12	3	1	5	13	34	10
14,41	5,04	4,30	4,18	4,15	4,14	4,03	3,76	3,64	3,59	3,39	3,38	2,69	3,20	3,07	3,06	3,02	2,95	2,94	2,90	2,88	2,78	2,70	2,44	2,39	2,20	2,19	2,08	2,02	1,88	1,83	1,73	1,71	1,67	1,58	1,19	1,15	0,97	0,66	0,00	
15,07	3,4	3,38	3,64	3,52	3,49	3,48	3,37	3,10	2,98	2,93	2,73	2,72	2,63	2,54	2,41	2,40	2,36	2,29	2,28	2,24	2,22	2,12	2,04	1,78	1,73	1,54	1,53	1,42	1,36	1,22	1,17	1,07	1,05	1,01	0,92	0,53	0,49	0,31	0,00	
15,38	3,33	3,21	3,18	3,17	3,16	3,06	2,79	2,67	2,62	2,42	2,41	2,32	2,23	2,10	2,09	2,05	1,98	1,97	1,93	1,93	1,91	1,81	1,73	1,47	1,42	1,23	1,22	1,11	1,05	0,91	0,86	0,76	0,74	0,70	0,61	0,22	0,18	0,00		
15,56	3,89	3,15	3,03	3,00	2,99	2,88	2,61	2,49	2,44	2,24	2,23	2,14	2,05	1,92	1,91	1,87	1,80	1,79	1,75	1,75	1,73	1,63	1,55	1,29	1,24	1,05	1,04	0,93	0,87	0,73	0,68	0,58	0,56	0,52	0,43	0,04	0,00			
15,60	3,85	3,11	2,99	2,96	2,95	2,84	2,57	2,45	2,40	2,20	2,19	2,10	2,01	1,88	1,87	1,83	1,76	1,75	1,71	1,71	1,69	1,59	1,51	1,25	1,20	1,01	1,00	0,89	0,83	0,69	0,64	0,54	0,52	0,48	0,39	0,00				
15,99	3	3,46	2,72	2,60	2,57	2,56	2,45	2,18	2,06	2,01	1,81	1,80	1,71	1,62	1,49	1,48	1,44	1,37	1,36	1,32	1,32	1,30	1,12	0,86	0,81	0,62	0,61	0,50	0,44	0,30	0,25	0,15	0,13	0,09	0,00					
16,08	3,37	2,63	2,51	2,48	2,47	2,36	2,09	1,97	1,92	1,72	1,71	1,62	1,53	1,40	1,39	1,35	1,28	1,27	1,23	1,23	1,21	1,11	1,03	0,77	0,72	0,53	0,52	0,41	0,35	0,21	0,16	0,06	0,04	0,00						
16,12	3,33	2,59	2,47	2,44	2,43	2,32	2,05	1,93	1,88	1,68	1,67	1,58	1,49	1,36	1,33	1,29	1,22	1,21	1,17	1,17	1,15	1,05	0,97	0,71	0,66	0,47	0,46	0,37	0,31	0,17	0,12	0,02	0,00							
16,14	2,9	3,21	2,47	2,35	2,32	2,31	2,20	1,93	1,81	1,76	1,56	1,55	1,46	1,37	1,24	1,23	1,19	1,12	1,11	1,07	1,05	0,95	0,87	0,61	0,56	0,37	0,36	0,25	0,19	0,05	0,00									
16,24	8	3,2	2,47	2,35	2,32	2,31	2,20	1,93	1,81	1,76	1,56	1,55	1,46	1,37	1,24	1,23	1,19	1,12	1,11	1,07	1,05	0,95	0,87	0,61	0,56	0,37	0,36	0,25	0,19	0,05	0,00									
16,29	1,4	3,16	2,42	2,30	2,27	2,26	2,15	1,88	1,76	1,71	1,51	1,50	1,41	1,32	1,19	1,14	1,07	1,06	1,02	1,02	1,00	0,90	0,82	0,56	0,51	0,32	0,31	0,20	0,14	0,00										
16,43	6	3,02	2,28	2,16	2,13	2,12	2,01	1,74	1,62	1,57	1,37	1,36	1,27	1,18	1,05	1,04	1,00	0,93	0,92	0,88	0,86	0,76	0,68	0,42	0,37	0,18	0,17	0,06	0,00											
16,49	4	2,96	2,22	2,10	2,07	2,06	1,95	1,68	1,56	1,51	1,31	1,30	1,21	1,12	0,99	0,98	0,94	0,87	0,86	0,82	0,80	0,70	0,62	0,36	0,31	0,12	0,11	0,00												
16,60	2	2,85	2,11	1,99	1,96	1,95	1,84	1,57	1,45	1,40	1,20	1,19	1,10	1,01	0,88	0,87	0,83	0,76	0,75	0,71	0,69	0,59	0,51	0,25	0,20	0,01	0,00													
16,61	15	2,84	2,10	1,98	1,95	1,94	1,83	1,56	1,44	1,39	1,19	1,18	1,09	1,00	0,87	0,86	0,82	0,75	0,74	0,70	0,70	0,68	0,58	0,50	0,24	0,19	0,00													
16,80	37	2,65	1,91	1,79	1,76	1,75	1,64	1,37	1,25	1,20	1,00	0,99	0,90	0,81	0,68	0,67	0,63	0,56	0,55	0,51	0,49	0,39	0,31	0,05	0,00															
16,85	17	2,60	1,86	1,74	1,71	1,70	1,59	1,32	1,20	1,15	0,95	0,94	0,85	0,76	0,63	0,62	0,58	0,51	0,50	0,46	0,44	0,34	0,26	0,00																
17,11	20	2,34	1,60	1,48	1,45	1,44	1,33	1,06	0,94	0,89	0,69	0,68	0,59	0,50	0,37	0,36	0,32	0,25	0,24	0,20	0,20	0,18	0,08	0,00																
17,19	9	2,26	1,52	1,40	1,37	1,36	1,25	0,98	0,86	0,81	0,61	0,60	0,51	0,42	0,29	0,28	0,24	0,17	0,16	0,12	0,10	0,00																		
17,29	26	2,16	1,42	1,30	1,27	1,26	1,15	0,88	0,76	0,71	0,51	0,50	0,41	0,32	0,19	0,18	0,14	0,07	0,06	0,02	0,02	0,00																		
17,31	31	2,14	1,40	1,28	1,25	1,24	1,13	0,86	0,74	0,69	0,49	0,48	0,39	0,30	0,17	0,16	0,12	0,05	0,04	0,00																				
17,31	18	2,14	1,40	1,28	1,25	1,24	1,13	0,86	0,74	0,69	0,49	0,48	0,39	0,30	0,17	0,16	0,12	0,05	0,04	0,00																				
17,35	11	2,10	1,36	1,24	1,21	1,20	1,09	0,82	0,70	0,65	0,45	0,44	0,35	0,26	0,13	0,12	0,08	0,01	0,00																					
17,36	35	2,09	1,35	1,23	1,20	1,19	1,08	0,81	0,69	0,64	0,44	0,43	0,34	0,25	0,12	0,11	0,07	0,00																						
17,43	28	2,02	1,28	1,16	1,13	1,12	1,01	0,74	0,62	0,57	0,37	0,36	0,27	0,18	0,05	0,04	0,00																							
17,47	16	1,98	1,24	1,12	1,09	1,08	0,97	0,70	0,58	0,53	0,33	0,32	0,23	0,14	0,01	0,00																								
17,48	39	1,97	1,23	1,11	1,08	1,07	0,96	0,69	0,57	0,52	0,32	0,31	0,22	0,13	0,00																									
17,61	32	1,84	1,10	0,98	0,95	0,94	0,83	0,56	0,44	0,39	0,19	0,18	0,09	0,00																										
17,70	7	1,75	1,01	0,89	0,86	0,85	0,74	0,47	0,35	0,30	0,10	0,09	0,00																											
17,79	22	1,66	0,92	0,80	0,77	0,76	0,65	0,38	0,26	0,21	0,01	0,00																												
18,00	38	1,45	0,71	0,59	0,56	0,55	0,44	0,17	0,05	0,00																														
18,05	33	1,40	0,66	0,54	0,51	0,50	0,39	0,12	0,00																															
18,17	25	1,28	0,54	0,42	0,39	0,38	0,27	0,00																																
18,44	24	1,01	0,27	0,15	0,12	0,11	0,00																																	
18,55	21	0,90	0,16	0,04	0,01	0,00																																		
18,56	27	0,89	0,15	0,03	0,00																																			
18,59	23	0,86	0,12	0,00																																				
18,71	40	0,74	0,00																																					
19,45	36	0,00																																						

F test = 19,22**

LSD_{0,05} = 0,691

LSD_{0,01} = 0,917

visoko opravdane razlike p<0,01

opravdane razlike p<0,05

Legenda:

- 1 U1
- 2 Osjecka crvenka
- 3 Osjecka_20
- 4 Slavonska
- 5 Žitarka
- 6 Leila
- 7 Demetra
- 8 Super_žitarka
- 9 Lucija
- 10 Renata
- 11 Aida
- 12 Pipi
- 13 Ilirija
- 14 Felix
- 15 Valerius
- 16 Anđelka
- 17 Mihaela
- 18 Ružica
- 19 Zlatna_dolina
- 20 Golubica

Tablica 68. Rezultati LSD testa za hektolitarsku masu u 2008./2009.

	85,03	84,90	84,70	84,37	84,07	83,70	83,53	83,03	82,83	82,70	82,37	82,33	82,33	82,33	82,07	81,87	81,80	81,77	81,70	81,63	81,57	81,40	81,13	81,10	81,07	80,97	80,70	80,63	80,40	80,33	80,27	80,10	80,07	80,03	80,00	79,97	79,83	79,67	79,03	77,27
	22	36	35	26	20	13	39	5	8	14	40	31	38	23	29	21	4	10	12	11	34	18	3	6	24	16	28	15	32	9	30	2	1	19	25	17	7	27	33	37
77,27	37	7,76	6,43	7,10	6,80	6,43	6,26	5,76	5,56	5,43	5,10	5,06	5,06	4,86	4,80	4,60	4,53	4,50	4,43	4,36	4,30	4,13	3,86	3,83	3,80	3,70	3,43	3,36	3,13	3,06	3,00	2,83	2,80	2,76	2,73	2,70	2,56	2,40	1,76	0,00
79,03	33	6,00	5,87	5,67	5,34	5,04	4,67	4,50	4,00	3,80	3,67	3,34	3,30	3,30	3,10	3,04	2,77	2,74	2,67	2,60	2,54	2,37	2,10	2,07	2,04	1,94	1,67	1,60	1,37	1,30	1,24	1,07	1,04	1,00	0,97	0,94	0,80	0,64	0,00	
79,67	27	5,36	5,23	5,03	4,70	4,40	4,03	3,86	3,36	3,16	3,03	2,70	2,66	2,66	2,46	2,20	2,13	2,10	2,03	1,96	1,90	1,73	1,46	1,43	1,40	1,30	1,03	0,96	0,73	0,66	0,60	0,43	0,40	0,36	0,33	0,30	0,16	0,00		
79,83	7	5,20	5,07	4,87	4,54	4,24	3,87	3,70	3,20	3,00	2,87	2,54	2,50	2,50	2,30	2,24	2,04	1,97	1,94	1,87	1,80	1,74	1,57	1,30	1,27	1,24	1,14	0,87	0,80	0,57	0,50	0,44	0,27	0,24	0,20	0,17	0,14	0,00		
79,97	17	5,06	4,93	4,73	4,40	4,10	3,73	3,56	3,06	2,86	2,73	2,40	2,36	2,36	2,16	2,10	1,90	1,83	1,80	1,73	1,66	1,60	1,43	1,16	1,13	1,10	1,00	0,73	0,66	0,43	0,36	0,30	0,13	0,10	0,06	0,03	0,00			
80,00	25	5,03	4,90	4,70	4,37	4,07	3,70	3,53	3,03	2,83	2,70	2,37	2,33	2,33	2,13	2,07	1,87	1,80	1,77	1,70	1,63	1,57	1,40	1,13	1,10	1,07	0,97	0,70	0,63	0,40	0,33	0,27	0,10	0,07	0,03	0,00				
80,03	19	5,00	4,87	4,67	4,34	4,04	3,67	3,50	3,00	2,80	2,67	2,34	2,30	2,30	2,10	2,04	1,84	1,77	1,74	1,67	1,60	1,54	1,37	1,10	1,07	1,04	0,94	0,67	0,60	0,37	0,30	0,24	0,07	0,04	0,00					
80,07	1	4,96	4,83	4,63	4,30	4,00	3,63	3,46	2,96	2,76	2,63	2,30	2,26	2,26	2,06	2,00	1,80	1,73	1,70	1,63	1,56	1,50	1,33	1,06	1,03	1,00	0,90	0,63	0,56	0,33	0,26	0,20	0,03	0,00						
80,10	2	4,93	4,80	4,60	4,27	3,97	3,60	3,43	2,93	2,73	2,60	2,27	2,23	2,23	2,03	1,97	1,77	1,70	1,67	1,60	1,53	1,47	1,30	1,03	1,00	0,97	0,87	0,60	0,53	0,30	0,23	0,17	0,00							
80,27	30	4,76	4,63	4,43	4,10	3,80	3,43	3,26	2,76	2,56	2,43	2,10	2,06	2,06	1,86	1,80	1,60	1,53	1,50	1,43	1,36	1,30	1,13	0,86	0,83	0,80	0,70	0,43	0,36	0,13	0,06	0,00								
80,33	9	4,70	4,57	4,37	4,04	3,74	3,37	3,20	2,70	2,50	2,37	2,04	2,00	2,00	1,80	1,74	1,54	1,47	1,44	1,37	1,30	1,24	1,07	0,80	0,77	0,74	0,64	0,37	0,30	0,07	0,00									
80,40	32	4,63	4,50	4,30	3,97	3,67	3,30	3,13	2,63	2,43	2,30	1,97	1,93	1,93	1,73	1,67	1,47	1,40	1,37	1,30	1,23	1,17	1,00	0,73	0,70	0,67	0,57	0,30	0,23	0,00										
80,63	15	4,40	4,27	4,07	3,74	3,44	3,07	2,90	2,40	2,20	2,07	1,74	1,70	1,70	1,50	1,44	1,24	1,17	1,14	1,07	1,00	0,94	0,77	0,50	0,47	0,44	0,34	0,07	0,00											
80,70	28	4,33	4,20	4,00	3,67	3,37	3,00	2,83	2,33	2,13	2,00	1,67	1,63	1,63	1,43	1,37	1,17	1,10	1,07	1,00	0,93	0,87	0,70	0,43	0,40	0,37	0,27	0,00												
80,97	16	4,06	3,93	3,73	3,40	3,10	2,73	2,56	2,06	1,86	1,73	1,40	1,36	1,36	1,16	1,10	0,90	0,83	0,80	0,73	0,66	0,60	0,43	0,16	0,13	0,10	0,00													
81,07	24	3,96	3,83	3,63	3,30	3,00	2,63	2,46	1,96	1,76	1,63	1,30	1,26	1,26	1,06	1,00	0,80	0,73	0,70	0,63	0,56	0,50	0,33	0,06	0,03	0,00														
81,10	6	3,93	3,80	3,60	3,27	2,97	2,60	2,43	1,93	1,73	1,60	1,27	1,23	1,23	1,03	0,97	0,77	0,70	0,67	0,60	0,53	0,47	0,30	0,03	0,00															
81,13	3	3,90	3,77	3,57	3,24	2,94	2,57	2,40	1,90	1,70	1,57	1,24	1,20	1,20	1,00	0,94	0,74	0,67	0,64	0,57	0,50	0,44	0,27	0,00																
81,40	18	3,63	3,50	3,30	2,97	2,67	2,30	2,13	1,63	1,43	1,30	0,97	0,93	0,93	0,73	0,67	0,47	0,40	0,37	0,30	0,23	0,17	0,00																	
81,57	34	3,46	3,33	3,13	2,80	2,50	2,13	1,96	1,46	1,26	1,13	0,80	0,76	0,76	0,56	0,50	0,30	0,23	0,20	0,13	0,06	0,00																		
81,63	11	3,40	3,27	3,07	2,74	2,44	2,07	1,90	1,40	1,20	1,07	0,74	0,70	0,70	0,50	0,44	0,24	0,17	0,14	0,07	0,00																			
81,77	10	3,26	3,13	2,93	2,60	2,30	1,93	1,76	1,26	1,06	0,93	0,60	0,56	0,56	0,36	0,30	0,10	0,03	0,00																					
81,80	4	3,23	3,10	2,90	2,57	2,27	1,90	1,73	1,23	1,03	0,90	0,57	0,53	0,53	0,33	0,27	0,07	0,00																						
81,87	21	3,16	3,03	2,83	2,50	2,20	1,83	1,66	1,16	0,96	0,83	0,50	0,46	0,46	0,26	0,20	0,00																							
82,07	29	2,96	2,83	2,63	2,30	2,00	1,63	1,46	0,96	0,76	0,63	0,30	0,26	0,26	0,06	0,00																								
82,13	23	2,90	2,77	2,57	2,24	1,94	1,57	1,40	0,90	0,70	0,57	0,24	0,20	0,20	0,00																									
82,33	31	2,70	2,57	2,37	2,04	1,74	1,37	1,20	0,70	0,50	0,37	0,04	0,00	0,00																										
82,33	38	2,70	2,57	2,37	2,04	1,74	1,37	1,20	0,70	0,50	0,37	0,04	0,00																											
82,37	40	2,66	2,53	2,33	2,00	1,70	1,33	1,16	0,66	0,46	0,33	0,00																												
82,70	14	2,33	2,20	2,00	1,67	1,37	1,00	0,83	0,33	0,13	0,00																													
82,83	8	2,20	2,07	1,87	1,54	1,24	0,87	0,70	0,20	0,00																														
83,03	5	2,00	1,87	1,67	1,34	1,04	0,67	0,50	0,00																															
83,53	39	1,50	1,37	1,17	0,84	0,54	0,17	0,00																																
83,70	13	1,33	1,20	1,00	0,67	0,37	0,00																																	
84,07	20	0,96	0,83	0,63	0,30	0,00																																		
84,37	26	0,66	0,53	0,33	0,00																																			
84,70	35	0,33	0,20	0,00																																				
84,90	36	0,13	0,00																																					
85,03	22	0,00																																						

 visoko opravdane razlike p<0,01
 opravdane razlike p<0,05

F test = 19,92**
LSD₀₀₅ = 1,051
LSD₀₀₁ = 1,394

1 UI	21 Janica
2 Osjecka_crvenka	22 Barbara
3 Osjecka_20	23 Katarina
4 Slavonija	24 Alka
5 Žitarka	25 Seka
6 Srpanjka	26 Lela
7 Demetra	27 Sama
8 Super_žitarka	28 Adriana
9 Lucija	29 Divana
10 Renata	30 Libellula
11 Aida	31 Bezostaja
12 Pipi	32 BC_Patna
13 Ilirija	33 BC_Elvira
14 Felix	34 Soissons
15 Zlata	35 Valerius
16 Anđelka	36 Antonius
17 Mihaela	37 Bastide
18 Ružica	38 Edison
19 Zlatna_dolina	39 Eurofit
20 Golubica	40 Ludwig

11.2. Prilog 2

Tablica 70. Matrica genetske sličnosti (RT_{ij}) na temelju morfoloških podataka

Tablica 70. Matrica genetske sličnosti (RT_{ij}) na temelju morfoloških podataka

br. Genotip	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1 U1	1,00																				
2 Osječka Crvenka	0,11	1,00																			
3 Osječka 20	0,11	0,43	1,00																		
4 Slavonsija	0,18	0,33	0,67	1,00																	
5 Žitarka	0,11	0,25	0,54	0,67	1,00																
6 Sranjka	0,25	0,18	0,18	0,25	0,25	1,00															
7 Demetra	0,11	0,43	0,67	0,67	0,54	0,25	1,00														
8 Super Žitarka	0,11	0,25	0,54	0,67	0,54	0,33	0,54	1,00													
9 Lucija	0,25	0,25	0,18	0,25	0,33	0,43	0,33	0,33	1,00												
10 Renata	0,18	0,33	0,33	0,33	0,25	0,54	0,54	0,33	0,43	1,00											
11 Aida	0,11	0,33	0,67	0,54	0,43	0,25	0,43	0,67	0,25	0,25	1,00										
12 Pipi	0,11	0,25	0,25	0,25	0,18	0,33	0,43	0,33	0,33	0,25	0,67	1,00									
13 Ilirija	0,05	0,11	0,43	0,25	0,25	0,11	0,25	0,25	0,05	0,18	0,43	0,25	1,00								
14 Felix	0,11	0,25	0,43	0,33	0,25	0,18	0,25	0,43	0,25	0,11	0,43	0,25	0,33	1,00							
15 Zlata	0,25	0,25	0,43	0,25	0,18	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,43	0,33	0,25	0,33	1,00						
16 Anđelka	0,11	0,33	0,33	0,43	0,43	0,33	0,54	0,33	0,25	0,43	0,25	0,33	0,18	0,33	0,18	1,00					
17 Mihaela	0,18	0,11	0,25	0,43	0,43	0,33	0,33	0,33	0,25	0,33	0,25	0,25	0,18	0,25	0,43	1,00					
18 Ružica	0,11	0,25	0,25	0,25	0,25	0,18	0,25	0,25	0,18	0,18	0,25	0,11	0,18	0,25	0,18	0,25	1,00				
19 Zlatna Dolina	0,25	0,43	0,33	0,25	0,18	0,25	0,33	0,33	0,54	0,33	0,54	0,25	0,18	0,18	0,43	0,18	0,11	1,00			
20 Golubica	0,11	0,18	0,43	0,43	0,43	0,33	0,33	0,54	0,25	0,18	0,67	0,11	0,33	0,18	0,25	0,25	0,25	0,33	1,00		
21 Janica	0,05	0,25	0,33	0,33	0,25	0,18	0,33	0,33	0,18	0,18	0,33	0,18	0,11	0,33	0,11	0,18	0,11	0,33	0,25	0,25	
22 Barbara	0,11	0,25	0,43	0,33	0,43	0,25	0,33	0,54	0,33	0,18	0,54	0,18	0,25	0,18	0,18	0,25	0,33	0,25	0,33	0,43	
23 Katarina	0,11	0,43	0,33	0,33	0,33	0,25	0,18	0,43	0,25	0,33	0,33	0,33	0,11	0,33	0,18	0,33	0,18	0,43	0,33	0,25	
24 Alka	0,11	0,33	0,54	0,43	0,33	0,25	0,33	0,54	0,25	0,25	0,82	0,18	0,33	0,25	0,33	0,18	0,18	0,33	0,54	0,54	
25 Seka	0,25	0,33	0,25	0,18	0,18	0,25	0,18	0,11	0,25	0,25	0,18	0,18	0,11	0,25	0,43	0,43	0,25	0,25	0,33	0,11	
26 Lela	0,11	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,33	0,43	0,33	0,25	0,33	0,25	0,11	0,25	0,11	0,33	0,18	0,33	0,33	0,33	
27 Sana	0,11	0,33	0,43	0,43	0,33	0,18	0,33	0,54	0,18	0,25	0,43	0,25	0,18	0,33	0,25	0,25	0,18	0,43	0,25	0,33	
28 Adriana	0,18	0,25	0,43	0,43	0,33	0,11	0,33	0,54	0,25	0,18	0,43	0,18	0,18	0,25	0,33	0,25	0,18	0,33	0,33	0,33	
29 Divana	0,05	0,25	0,25	0,18	0,18	0,11	0,25	0,25	0,11	0,18	0,25	0,33	0,54	0,11	0,11	0,33	0,18	0,25	0,18	0,18	
30 Libelula	0,11	0,25	0,11	0,18	0,11	0,43	0,18	0,25	0,25	0,33	0,18	0,25	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,05	0,18	0,11	
31 Bezostaja	0,18	0,18	0,25	0,25	0,18	0,18	0,25	0,25	0,11	0,25	0,25	0,18	0,18	0,43	0,18	0,18	0,18	0,25	0,18	0,18	
32 BC Patria	0,11	0,43	0,33	0,33	0,25	0,18	0,43	0,43	0,25	0,33	0,33	0,33	0,11	0,25	0,18	0,33	0,18	0,33	0,33	0,33	
33 BC Elvira	0,11	0,25	0,67	0,43	0,54	0,18	0,43	0,43	0,25	0,25	0,67	0,18	0,54	0,25	0,33	0,25	0,33	0,25	0,33	0,54	
34 Soissons	0,05	0,18	0,33	0,25	0,18	0,11	0,33	0,33	0,11	0,25	0,25	0,43	0,25	0,33	0,18	0,11	0,11	0,25	0,18	0,18	
35 Valerius	0,05	0,05	0,25	0,25	0,33	0,11	0,18	0,25	0,11	0,11	0,11	0,18	0,18	0,43	0,18	0,11	0,18	0,25	0,18	0,05	
36 Antonius	0,05	0,05	0,18	0,11	0,11	0,18	0,18	0,11	0,05	0,18	0,11	0,25	0,33	0,18	0,11	0,11	0,18	0,18	0,05	0,25	
37 Bastide	0,11	0,11	0,25	0,25	0,33	0,11	0,18	0,25	0,18	0,11	0,25	0,11	0,18	0,25	0,11	0,18	0,25	0,11	0,18	0,25	
38 Edison	0,05	0,11	0,25	0,18	0,11	0,11	0,25	0,18	0,05	0,25	0,18	0,33	0,25	0,18	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,18	
39 Eurofit	0,18	0,18	0,11	0,11	0,11	0,11	0,18	0,11	0,25	0,18	0,11	0,18	0,18	0,18	0,18	0,25	0,11	0,33	0,25	0,11	
40 Ludwig	0,11	0,25	0,33	0,25	0,18	0,18	0,43	0,25	0,18	0,43	0,25	0,33	0,18	0,33	0,25	0,25	0,18	0,18	0,25	0,25	

Tablica 70. Matrica genetske sličnosti (RT_{ij}) na temelju morfoloških podataka - nastavak

br. Genotip	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21 Janica	1,00																			
22 Barbara	0,33	1,00																		
23 Katarina	0,33	0,33	1,00																	
24 Alka	0,43	0,43	0,33	1,00																
25 Seka	0,11	0,18	0,18	0,18	1,00															
26 Lela	0,33	0,43	0,67	0,33	0,18	1,00														
27 Sana	0,33	0,33	0,67	0,43	0,18	0,43	1,00													
28 Adriana	0,25	0,33	0,54	0,33	0,25	0,33	0,67	1,00												
29 Divana	0,11	0,33	0,33	0,18	0,18	0,25	0,25	0,25	1,00											
30 Libelula	0,25	0,11	0,11	0,18	0,05	0,11	0,11	0,05	0,11	1,00										
31 Bezostaja	0,25	0,18	0,33	0,25	0,11	0,25	0,43	0,25	0,18	0,18	1,00									
32 BC Patria	0,25	0,33	0,82	0,33	0,18	0,54	0,54	0,43	0,33	0,11	0,25	1,00								
33 BC Elvira	0,18	0,54	0,25	0,54	0,18	0,25	0,33	0,33	0,25	0,05	0,18	0,25	1,00							
34 Soissons	0,33	0,25	0,43	0,25	0,05	0,33	0,43	0,33	0,25	0,11	0,25	0,33	0,25	1,00						
35 Valerius	0,18	0,25	0,18	0,18	0,05	0,18	0,25	0,25	0,33	0,11	0,33	0,11	0,33	0,25	1,00					
36 Antonius	0,11	0,11	0,18	0,11	0,11	0,18	0,11	0,05	0,25	0,11	0,18	0,25	0,18	0,25	0,25	1,00				
37 Bastide	0,33	0,25	0,25	0,25	0,05	0,25	0,43	0,25	0,11	0,11	0,33	0,18	0,33	0,25	0,33	0,11	1,00			
38 Edison	0,25	0,18	0,25	0,18	0,05	0,18	0,18	0,11	0,25	0,18	0,25	0,33	0,18	0,33	0,25	0,67	0,11	1,00		
39 Eurofit	0,11	0,11	0,43	0,11	0,25	0,33	0,25	0,33	0,33	0,05	0,25	0,33	0,11	0,11	0,18	0,25	0,11	0,25	1,00	
40 Ludwig	0,18	0,18	0,33	0,25	0,11	0,25	0,33	0,18	0,18	0,11	0,33	0,43	0,25	0,25	0,11	0,33	0,18	0,43	0,25	1,00

11.3. Prilog 3

Tablica 71. Ishodišna matrica umnoženih alela mikrosatelita u parovima baza

- u tablicu su uključeni 40 sorata ozime pšenice na temelju 26 mikrosatelita
- u dužinu alela u parovima baza uključeno je i 19 nukleotida početnice M13

Tablica 71. Ishodišna matrica umnoženih alela mikrosatelita u parovima baza

Br.	Genotip	mikrosatelitni marker												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	U1	gwm2_1	gwm2_2	gwm11	gwm55	gwm68_1	gwm68_2	gwm121_1	gwm121_2	gwm135	gwm149	gwm169	gwm186	gwm257
2	Osječka Crvenka	135	235	213	148		205/200	120	145	155	168	218	145	211
3	Osječka 20	145	248	208	153	175	194	120	155	202	168	240	137	215
4	Osječka 20	135	235	213	153	175		122	155	155	168		139	213
5	Slavonija	150	237	208	153	175		120	155	195	168	240	139	213
6	Žitarka	145	248	208	153	172		120	155	202	168	209	139	213
7	Žitarka	135	235	213	148	175	194	122	150	153	168	240	137	215
8	Srpanjka	135	235	208	148	175	200	122	155	202	181		125	213
9	Demetra	135	237	210	153	175		122	155	202	177	209	139	213
10	Super Žitarka	135	237	208	148	175	194	122	150	202	168	240	137	213
11	Renata	150	248	213	148	175		122	150	153	168	202	139	215
12	Aida	135	235	208	148	175	194	120	145	155	168	240	137	213
13	Pipi	135	235	208	148	175		120	155	202	168	240	137	215
14	Ilirija	135	235	210	153	175	200	120	145	155	168	202	145	213
15	Felix	135	235	210	148	175		120	150	202	168	240	139	213
16	Zlata	135	235	210	148	175		120	150	202	168	202	137	213
17	Anđelka	135	235	210	148	175		122	155	202	181	240	137	215
18	Mihaela	150	248	210	148	172	200	122	155	155	168	240	139	215
19	Ružica	135	235	210	148	175		120	155	155	168	212	125	213
20	Zlatna Dolina	135	235	213	153	172	200	122	155	155	177/181	209	125	213
21	Golubica	135	235	210	153	175	194	120	155	195	168	240	125	213
22	Janica	135	235	208	148	175		120	150	153	168	202	125	213
23	Barbara	135	237	210	153	175		122	155	202	177	202	139	213
24	Katarina	135	237	213	148	172	200	120	150	155	177/181	202	137	213
25	Alka	135	235	213	153	172	200	122	155	153	168	240	125	213
26	Seka	150	235	208	148	175	200	120	150	153	168	240	139	213
27	Lela	135	235	208/213	148	175		120	150	153	168	240	125	213
28	Sana	135	235	208/210	153	172		122	155	153	168	209	125	213
29	Adriana	135	237	210	153	172	200	120	145	155	177/181	209	145	213
30	Divana	145	248	213	148	175	194	122	150	202	168	202	125	215
31	Libelula	135	235	213	153	175		120	155	155	168	240	137	215
32	Bezostaja	135	235	210	153	172	194	120	150	202	168	218	137	215
33	BC Patria	135	237	210	148	172	200	120	155	195	168	202	125	213
34	BC Elvira	135	237	213	153	172	200	122	155	155	177/181	202	137	215
35	Soissons	135	235	213	148	172	200	122	145	155	168	209	125	215
36	Valerius	135	235	210	148	172		120	145	153	168	202	139	215
37	Antonius	150	248	208	153	172		122	145	202	168	209	139	215
38	Bastide	145	237	210	148	172		120	145	153	168	240	139	213
39	Edison	150	248	213	153	172		122	145	153	168	202	139	213
40	Eurofit	135	237	213	153	175	200	120	145	202	181	202	139	215
41	Ludwig	135	237	208	148	175	200	120	145	153	168	202	145	215

Tablica 71. Ishodišna matrica umnoženih alela mikrosatelita u parovima baza (nastavak).

Br.	Genotip	mikrosatelitni marker													
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1	U1	gwm261	gwm311_1	gwm311_2	gwm458	gwm497_1	gwm497_2	gwm497_3	gwm573_1	gwm573_2	gwm609	gwm610	gwm626	gwm642	
2	Osječka Crvenka	184	135	130	128	160	137	115	115	229	117	185	120	215	
3	Osječka 20	211	135	175	130	170	137/143	115	197	226	119/129	180	120	215	
4	Slavonija	211	135	130	130	160	137	115	197	231	125	185	147	204	
5	Žitarka	211	135	134	134	170	137	115	197	231	123/125	183	147	204	
6	Srpanjka	211	135	128	128	170	137	115	197	226	122	180	120	204	
7	Demetra	211	135	130	130	170	150	115	195	231	122	180	120	215	
8	Super Žitarka	211	135	130	130	170	150	115	195	231	119/129	183	120	215	
9	Lucija	211	135	130	130	170	143	115	195	226	122	180	147	204	
10	Renata	211	135	128	128	170	143	115	195	231	125/129	183	120/147	215	
11	Aida	193	135	168	134	170	137	115	195	231	122	180	120	215	
12	Pipi	211	135	175	134	137	137	115	195	231	129	185	147	215	
13	Ilirija	193	135	134	134	137	137	115	197	231	123	183	147	215	
14	Felix	193	135	130	128	160/170	137	115	195	229	122	185	120	215	
15	Zlata	211	135	130	130	170	137	115	197	229	122	180	120	215	
16	Anđelka	211	135	128	128	170	150	115	197	231	129	183	120	215	
17	Mihaela	211	135	128	128	170	137	115	195	229	123	183	120	215	
18	Ružica	211	135	128	128	170	137	115	195	229	122	183	120	204	
19	Zlatna Dolina	211	135	130	130	160	150	115	197	231	119/129	185	120	198	
20	Golubica	211	135	175	130	160	137	115	197	231	125	183	147	204	
21	Janica	211	135	130	130	137	137	115	197	231	122	183	120	204	
22	Barbara	211	135	130	130	170	137	115	197	226	123	180	120/147	198	
23	Katarina	211	135	134	134	137/150	137/150	115	197	231	119	180	120	204	
24	Alka	211	135	128	128	170	143	115	197	231	123	180	120	198	
25	Seka	211	135	130	130	170	150	115	197	231	129	183	120	215	
26	Lela	211	135	175	128	170	137	115	195	231	125	183	147	204	
27	Sana	211	135	168	128	170	137	115	197	223/231	129	185	120	204	
28	Adriana	211	135	134	134	160	150	115	197	231	119/129	185	120	204	
29	Divana	211	135	128	128	160	137	115	197	223	119/129	183	147	215	
30	Libetula	211	135	128	128	137	143	115	197	226	125	185	120	204	
31	Bezostaja	211	135	130	130	150	137/143	115	195	223	129	183	120/147	215	
32	BC Patria	211	135	128	128	170	137/143	115	195	231	117/122	180	120	215	
33	BC Elvira	211	135	134	134	137	150	115	197	231	119/129	185	120	204	
34	Soissons	193	135	134	134	137	137	115	197	231	125	180	147	215	
35	Valerius	215	135	128	128	160	137	115	197	231	123	183	120	215	
36	Antonius	215	135	130	130	160	150	115	195	229	119	183	147	215	
37	Bastide	184	135	134	134	160	150	115	195	229	123	183	120	204	
38	Edison	193	135	128	128	160	137	115	197	231	120	183	120	215	
39	Eurofit	184	135	128	128	160	137	115	197	229	119/129	183	120	215	
40	Ludwig	193	135	168	128	128	137	115	197	231	125	183	120	215	

11.4. Prilog 4

Tablica 72. Matrica genetske udaljenosti (d_{ij}) na temelju mikrosatelitnih početnica

Tablica 72. Matrica genetske udaljenosti (d_{ij}) na temelju mikrosatelitnih početnica

br.	Genotip	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	UI	0,00																				
2	Osječka Crvenka	0,83	0,00																			
3	Osječka 20	0,67	0,91	0,00																		
4	Slavonija	0,85	0,64	0,53	0,00																	
5	Žitarka	0,88	0,45	0,74	0,57	0,00																
6	Srpanjka	0,72	0,46	0,73	0,76	0,71	0,00															
7	Demetra	0,74	0,69	0,75	0,67	0,75	0,71	0,00														
8	Super Žitarka	0,94	0,70	0,52	0,54	0,43	0,71	0,69	0,00													
9	Lucija	0,73	0,46	0,81	0,55	0,71	0,50	0,37	0,68	0,00												
10	Renata	0,77	0,65	0,78	0,71	0,77	0,43	0,74	0,78	0,54	0,00											
11	Aida	0,65	0,65	0,70	0,79	0,69	0,41	0,74	0,81	0,57	0,77	0,00										
12	Pipi	0,75	0,56	0,67	0,65	0,70	0,61	0,60	0,80	0,53	0,63	0,59	0,00									
13	Ilirija	0,64	0,85	0,64	0,70	0,76	0,79	0,75	0,77	0,77	0,79	0,56	0,68	0,00								
14	Felix	0,60	0,67	0,72	0,72	0,67	0,57	0,66	0,68	0,58	0,62	0,52	0,56	0,64	0,00							
15	Zlata	0,64	0,61	0,69	0,73	0,60	0,45	0,56	0,51	0,48	0,61	0,45	0,60	0,63	0,38	0,00						
16	Anđelka	0,80	0,57	0,76	0,77	0,82	0,46	0,43	0,68	0,52	0,50	0,64	0,49	0,72	0,54	0,48	0,00					
17	Mihaela	0,75	0,62	0,78	0,72	0,72	0,57	0,66	0,73	0,62	0,42	0,69	0,72	0,68	0,54	0,63	0,46	0,00				
18	Ružica	0,71	0,75	0,73	0,66	0,63	0,67	0,56	0,63	0,68	0,67	0,65	0,67	0,64	0,44	0,51	0,54	0,54	0,00			
19	Zlatna Dolina	0,68	0,78	0,57	0,72	0,71	0,70	0,48	0,60	0,68	0,83	0,78	0,85	0,74	0,80	0,74	0,73	0,73	0,65	0,00		
20	Golubica	0,79	0,68	0,54	0,54	0,60	0,59	0,49	0,67	0,51	0,56	0,64	0,64	0,56	0,63	0,64	0,68	0,75	0,49	0,62	0,00	
21	Janica	0,70	0,77	0,64	0,54	0,60	0,59	0,49	0,67	0,69	0,82	0,68	0,64	0,63	0,53	0,37	0,61	0,76	0,37	0,66	0,48	0,00
22	Barbara	0,89	0,65	0,63	0,64	0,53	0,71	0,64	0,21	0,63	0,70	0,78	0,85	0,72	0,68	0,45	0,63	0,62	0,66	0,55	0,68	0,61
23	Katarina	0,79	0,77	0,76	0,76	0,68	0,66	0,72	0,69	0,66	0,74	0,61	0,76	0,68	0,79	0,57	0,76	0,77	0,68	0,66	0,50	0,74
24	Alka	0,80	0,62	0,65	0,69	0,64	0,41	0,63	0,68	0,70	0,60	0,64	0,80	0,69	0,70	0,66	0,63	0,54	0,65	0,39	0,57	0,57
25	Seka	0,70	0,72	0,71	0,63	0,74	0,49	0,37	0,79	0,39	0,50	0,62	0,61	0,61	0,62	0,51	0,42	0,59	0,62	0,60	0,57	0,61
26	Lela	0,93	0,71	0,59	0,47	0,76	0,59	0,75	0,74	0,64	0,46	0,74	0,47	0,84	0,64	0,71	0,64	0,56	0,67	0,98	0,61	0,61
27	Sana	0,84	0,79	0,61	0,76	0,64	0,69	0,62	0,67	0,80	0,74	0,77	0,76	0,76	0,71	0,73	0,62	0,73	0,61	0,46	0,61	0,66
28	Adriana	0,69	0,77	0,71	0,68	0,67	0,82	0,64	0,63	0,68	0,89	0,69	0,83	0,52	0,77	0,76	0,77	0,79	0,64	0,45	0,66	0,66
29	Divana	0,73	0,54	0,88	0,77	0,77	0,59	0,66	0,83	0,54	0,46	0,88	0,69	0,74	0,70	0,69	0,64	0,62	0,72	0,78	0,70	0,70
30	Libelula	0,67	0,45	0,51	0,57	0,65	0,48	0,80	0,72	0,71	0,63	0,67	0,55	0,74	0,61	0,63	0,54	0,63	0,53	0,61	0,53	0,53
31	Bezostaja	0,64	0,56	0,84	0,73	0,70	0,59	0,59	0,74	0,51	0,63	0,75	0,58	0,65	0,59	0,47	0,50	0,63	0,67	0,72	0,59	0,59
32	BC_Patria	0,74	0,58	0,85	0,63	0,65	0,56	0,65	0,67	0,63	0,63	0,67	0,76	0,60	0,64	0,52	0,67	0,63	0,56	0,67	0,53	0,53
33	BC_Elvira	0,77	0,67	0,67	0,74	0,68	0,64	0,70	0,64	0,67	0,71	0,77	0,73	0,73	0,90	0,78	0,67	0,71	0,75	0,35	0,77	0,77
34	Soussons	0,64	0,82	0,62	0,83	0,78	0,61	0,73	0,80	0,80	0,72	0,56	0,60	0,42	0,71	0,71	0,70	0,71	0,71	0,67	0,69	0,69
35	Valerius	0,63	0,73	0,81	0,74	0,79	0,59	0,71	0,89	0,70	0,49	0,68	0,75	0,49	0,55	0,59	0,52	0,48	0,65	0,83	0,73	0,73
36	Antonius	0,78	0,62	0,78	0,56	0,63	0,83	0,69	0,68	0,60	0,65	0,94	0,74	0,74	0,73	0,79	0,80	0,58	0,88	0,76	0,75	0,75
37	Bastide	0,70	0,81	0,77	0,64	0,59	0,77	0,76	0,81	0,65	0,67	0,62	0,80	0,66	0,60	0,74	0,77	0,54	0,62	0,85	0,73	0,73
38	Edison	0,76	0,73	0,70	0,64	0,69	0,65	0,77	0,83	0,70	0,44	0,75	0,95	0,51	0,64	0,74	0,73	0,54	0,80	0,73	0,78	0,78
39	Eurofit	0,67	0,69	0,79	0,79	0,78	0,71	0,67	0,77	0,74	0,55	0,85	0,78	0,65	0,62	0,68	0,55	0,69	0,74	0,84	0,80	0,80
40	Ludwig	0,71	0,70	0,83	0,74	0,90	0,68	0,69	0,97	0,60	0,57	0,60	0,72	0,56	0,70	0,72	0,65	0,70	0,78	0,94	0,84	0,84

Tablica 72. Matrica genetske udaljenosti (d_{ij}) na temelju mikrosatelitnih početnica (nastavak).

br.	Genotip	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
21	Janica	0,00																				
22	Barbara	0,67	0,00																			
23	Katarina	0,60	0,69	0,00																		
24	Alka	0,61	0,52	0,63	0,00																	
25	Seka	0,33	0,73	0,71	0,50	0,00																
26	Lela	0,53	0,84	0,78	0,74	0,62	0,00															
27	Sena	0,60	0,72	0,80	0,48	0,56	0,78	0,00														
28	Adriana	0,73	0,63	0,49	0,71	0,74	0,91	0,60	0,00													
29	Divana	0,67	0,83	0,71	0,75	0,64	0,69	0,82	0,89	0,00												
30	Libetula	0,63	0,72	0,68	0,53	0,72	0,60	0,60	0,65	0,76	0,00											
31	Bezostaja	0,60	0,69	0,78	0,74	0,58	0,76	0,65	0,76	0,61	0,62	0,00										
32	BC_Patira	0,60	0,56	0,62	0,48	0,58	0,83	0,63	0,57	0,68	0,63	0,70	0,00									
33	BC_Elvira	0,76	0,59	0,38	0,64	0,83	0,88	0,58	0,36	0,72	0,50	0,70	0,68	0,00								
34	Soissons	0,65	0,91	0,64	0,67	0,59	0,76	0,79	0,78	0,61	0,65	0,78	0,68	0,73	0,00							
35	Valerius	0,54	0,73	0,79	0,64	0,57	0,64	0,64	0,77	0,62	0,70	0,59	0,61	0,74	0,64	0,00						
36	Antonius	0,81	0,78	0,92	0,88	0,75	0,72	0,84	0,87	0,58	0,87	0,61	0,89	0,77	0,69	0,57	0,00					
37	Bastide	0,61	0,76	0,66	0,67	0,61	0,64	0,73	0,66	0,83	0,77	0,79	0,77	0,74	0,82	0,51	0,70	0,00				
38	Edison	0,63	0,68	0,79	0,54	0,62	0,77	0,64	0,79	0,63	0,74	0,73	0,66	0,69	0,67	0,34	0,50	0,57	0,00			
39	Eurofit	0,76	0,66	0,83	0,79	0,77	0,83	0,86	0,72	0,63	0,68	0,62	0,68	0,70	0,76	0,54	0,67	0,69	0,56	0,00		
40	Ludwig	0,56	0,86	0,85	0,81	0,60	0,59	0,74	0,74	0,70	0,72	0,77	0,64	0,79	0,62	0,42	0,78	0,70	0,54	0,54	0,00	

11.5. Prilog 5

Tablica 73. Matrica genetske sličnosti (S_{ij}) na temelju kombinacije AFLP početnica

Tablica 73. Matrica genetske sličnosti (S_{ij}) na temelju kombinacije AFLP početnica

br. Genotip	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 U1	1,00																			
2 Osječka Crvenka	0,53	1,00																		
3 Osječka 20	0,54	0,36	1,00																	
4 Slavonija	0,58	0,54	0,64	1,00																
5 Žitarka	0,71	0,60	0,56	0,63	1,00															
6 Srpanjka	0,37	0,49	0,24	0,49	0,42	1,00														
7 Demetra	0,52	0,43	0,38	0,62	0,57	0,49	1,00													
8 Super Žitarka	0,55	0,44	0,67	0,70	0,78	0,36	0,50	1,00												
9 Lucija	0,54	0,58	0,47	0,60	0,59	0,67	0,53	0,45	1,00											
10 Renata	0,50	0,54	0,41	0,51	0,63	0,59	0,56	0,31	0,49	1,00										
11 Aida	0,36	0,33	0,20	0,35	0,37	0,49	0,60	0,31	0,48	0,48	1,00									
12 Pipi	0,64	0,47	0,64	0,71	0,59	0,37	0,48	0,67	0,46	0,45	0,27	1,00								
13 Ilirija	0,55	0,50	0,45	0,60	0,62	0,44	0,48	0,53	0,60	0,55	0,33	0,67	1,00							
14 Felix	0,42	0,51	0,34	0,45	0,57	0,58	0,62	0,81	0,47	0,59	0,57	0,58	0,48	1,00						
15 Zlata	0,53	0,48	0,35	0,60	0,59	0,62	0,55	0,66	0,47	0,54	0,67	0,44	0,45	0,62	1,00					
16 Anđelka	0,42	0,36	0,36	0,46	0,50	0,50	0,48	0,45	0,38	0,44	0,57	0,47	0,39	0,46	0,58	1,00				
17 Mihaela	0,51	0,54	0,32	0,30	0,53	0,48	0,60	0,71	0,55	0,53	0,54	0,61	0,60	0,50	0,67	0,47	1,00			
18 Ružica	0,42	0,55	0,45	0,63	0,53	0,60	0,44	0,55	0,52	0,63	0,45	0,53	0,49	0,46	0,47	0,53	0,41	1,00		
19 Zlatna Dolina	0,68	0,57	0,49	0,66	0,67	0,38	0,71	0,60	0,64	0,59	0,43	0,61	0,60	0,55	0,62	0,51	0,41	0,71	1,00	
20 Golubica	0,60	0,50	0,53	0,78	0,62	0,50	0,60	0,61	0,64	0,59	0,40	0,66	0,56	0,55	0,63	0,54	0,47	0,73	0,58	1,00
21 Janica	0,54	0,53	0,44	0,66	0,63	0,58	0,60	0,53	0,65	0,59	0,49	0,51	0,62	0,51	0,63	0,54	0,47	0,73	0,58	0,73
22 Barbara	0,68	0,59	0,60	0,68	0,82	0,45	0,58	0,81	0,60	0,63	0,39	0,66	0,59	0,61	0,59	0,52	0,56	0,51	0,73	0,65
23 Katarina	0,65	0,54	0,43	0,57	0,61	0,50	0,62	0,50	0,59	0,63	0,45	0,54	0,49	0,58	0,67	0,43	0,56	0,45	0,69	0,62
24 Alka	0,39	0,43	0,45	0,58	0,46	0,53	0,56	0,47	0,54	0,68	0,48	0,49	0,49	0,63	0,65	0,61	0,46	0,57	0,50	0,58
25 Seka	0,44	0,37	0,41	0,55	0,45	0,53	0,65	0,46	0,55	0,55	0,41	0,51	0,56	0,45	0,57	0,65	0,44	0,54	0,49	0,57
26 Lela	0,45	0,44	0,46	0,47	0,55	0,50	0,45	0,59	0,50	0,53	0,44	0,48	0,48	0,47	0,48	0,44	0,48	0,48	0,50	0,50
27 Sana	0,55	0,48	0,41	0,57	0,63	0,46	0,69	0,53	0,56	0,64	0,50	0,52	0,57	0,55	0,70	0,55	0,57	0,55	0,75	0,59
28 Adrijana	0,58	0,47	0,39	0,59	0,56	0,44	0,60	0,49	0,57	0,61	0,52	0,56	0,60	0,55	0,57	0,56	0,46	0,54	0,66	0,67
29 Divana	0,52	0,44	0,43	0,51	0,55	0,40	0,53	0,53	0,49	0,40	0,43	0,47	0,43	0,41	0,49	0,39	0,44	0,47	0,64	0,53
30 Libelula	0,67	0,65	0,42	0,67	0,71	0,45	0,59	0,55	0,60	0,60	0,42	0,62	0,62	0,55	0,52	0,50	0,45	0,53	0,64	0,61
31 Bezostaja	0,61	0,53	0,55	0,72	0,63	0,52	0,62	0,65	0,60	0,49	0,44	0,53	0,56	0,53	0,63	0,50	0,46	0,58	0,68	0,65
32 BC_Patria	0,63	0,58	0,50	0,60	0,66	0,45	0,57	0,60	0,63	0,51	0,44	0,56	0,55	0,57	0,61	0,53	0,49	0,51	0,67	0,61
33 BC_Elvira	0,60	0,43	0,45	0,55	0,60	0,31	0,49	0,53	0,47	0,43	0,35	0,51	0,49	0,38	0,47	0,33	0,41	0,38	0,63	0,50
34 Soissons	0,53	0,54	0,40	0,47	0,55	0,45	0,45	0,47	0,50	0,48	0,55	0,62	0,60	0,55	0,48	0,51	0,52	0,51	0,60	0,56
35 Valerius	0,51	0,48	0,37	0,52	0,58	0,42	0,50	0,65	0,47	0,53	0,43	0,65	0,62	0,57	0,49	0,55	0,46	0,49	0,52	0,53
36 Antonius	0,47	0,62	0,36	0,45	0,51	0,42	0,43	0,38	0,50	0,48	0,44	0,45	0,45	0,45	0,46	0,36	0,50	0,43	0,56	0,48
37 Bastide	0,64	0,49	0,43	0,54	0,59	0,46	0,57	0,52	0,59	0,56	0,54	0,50	0,55	0,51	0,59	0,63	0,43	0,46	0,66	0,57
38 Edison	0,54	0,55	0,38	0,56	0,68	0,45	0,58	0,64	0,48	0,50	0,45	0,55	0,54	0,58	0,63	0,50	0,45	0,48	0,65	0,53
39 Eurofit	0,62	0,44	0,46	0,57	0,56	0,45	0,57	0,56	0,51	0,48	0,53	0,57	0,65	0,47	0,51	0,58	0,45	0,52	0,61	0,57
40 Ludwig	0,57	0,53	0,42	0,53	0,63	0,52	0,60	0,59	0,62	0,70	0,51	0,55	0,50	0,65	0,58	0,54	0,49	0,52	0,65	0,58

Tablica 73. Matrica genetske sličnosti (S_{ij}) na temelju kombinacije AFLP početnica (nastavak).

br. Genotip	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21 Janica	1,00																			
22 Barbara	0,62	1,00																		
23 Katarina	0,55	0,63	1,00																	
24 Alka	0,54	0,51	0,58	1,00																
25 Seka	0,64	0,53	0,49	0,58	1,00															
26 Lela	0,49	0,59	0,52	0,37	0,33	1,00														
27 Sana	0,61	0,63	0,68	0,70	0,53	0,42	1,00													
28 Adriana	0,60	0,58	0,61	0,64	0,55	0,40	0,68	1,00												
29 Divana	0,49	0,60	0,41	0,33	0,41	0,51	0,46	0,41	1,00											
30 Libelula	0,56	0,66	0,56	0,53	0,48	0,41	0,62	0,56	0,44	1,00										
31 Bezostaja	0,61	0,66	0,65	0,52	0,49	0,58	0,64	0,50	0,62	0,54	1,00									
32 BC_Patria	0,55	0,69	0,53	0,51	0,48	0,39	0,68	0,64	0,56	0,65	0,65	1,00								
33 BC_Elvira	0,44	0,51	0,60	0,38	0,38	0,44	0,54	0,45	0,45	0,54	0,55	0,42	1,00							
34 Soissons	0,51	0,55	0,56	0,48	0,56	0,38	0,55	0,58	0,42	0,57	0,50	0,58	0,44	1,00						
35 Valerius	0,43	0,66	0,49	0,43	0,48	0,46	0,51	0,54	0,51	0,55	0,57	0,62	0,41	0,59	1,00					
36 Antonius	0,39	0,47	0,52	0,37	0,32	0,37	0,53	0,46	0,34	0,62	0,48	0,61	0,49	0,55	0,53	1,00				
37 Bastide	0,55	0,65	0,52	0,52	0,43	0,48	0,62	0,61	0,55	0,64	0,59	0,67	0,49	0,58	0,54	0,48	1,00			
38 Edison	0,54	0,65	0,53	0,54	0,45	0,45	0,61	0,50	0,50	0,68	0,61	0,64	0,57	0,55	0,63	0,56	0,61	1,00		
39 Eurofit	0,58	0,60	0,51	0,50	0,48	0,47	0,58	0,57	0,53	0,58	0,62	0,67	0,41	0,65	0,58	0,47	0,71	0,58	1,00	
40 Ludwig	0,53	0,65	0,58	0,52	0,45	0,45	0,68	0,58	0,54	0,63	0,58	0,71	0,55	0,55	0,61	0,62	0,64	0,61	0,57	1,00

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. siječnja 1977. godine u Osijeku. Osnovnu školu završila sam 1991., a Prirodoslovnu matematičku gimnaziju 1995. godine u Osijeku. Godine 1999. upisujem Poljoprivredni fakultet u Osijeku, smjer ratarstvo. Diplomirala sam 05. svibnja 2005. godine. Od 01. travnja 2002. do 31. kolovoza 2005. zaposlena sam u tvrtki Agrigenetics d.o.o. u Osijeku kao suradnik. Godine 2004. pohađala sam metodološki tečaj iz biologije i medicine „DNA i RNA iz biljaka“ na Institutu Ruđer Bošković. Od 01. rujna 2005. do danas radim na Poljoprivrednom fakultetu kao asistent na predmetu Genetika na Katedri za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Godine 2006. upisala sam interdisciplinarni doktorski studij "Molekularne bioznanosti". Suradnik sam na znanstvenom projektu Ministarstva znanosti obrazovanja i športa "Identifikacija germplazme pšenice SSR markerima" kojega je voditeljica prof.dr.sc. Sonja Marić te na bilateralnom projektu „Assessing genetic and phenotypic diversity in wheat breeding materials adapted to the environmental conditions of the Carpathian Basin“ sa Poljoprivrednim institutom iz Martonvására (Agricultural Research Institute Of The Hungarian Academy Of Science). Tijekom 2008. i 2009. godine bila sam suradnik na bilateralnom projektu „Microsatellite markers in wheat breeding“ sa Institute for Biotechnology in Plant Production, Department IFA-Tulln, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna u Austriji. U sklopu TEMPUS projekta od 04. siječnja do 09. veljače 2006. boravila sam na BOKU (University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna) Beč – Sveučilišni Odjel za poljoprivrednu biotehnologiju – Zavod za biljnu biotehnologiju. Tijekom boravka, bila sam uključena u rad Laboratorija za SSR markere. Od svibnja 2007. godine uključena sam u rad COST akcije FA0604 „TritiGen“, radna grupa 1. „Tools for Assessing, Harvesting and Applying Genetic Diversity“. Godine 2008. dobila sam stipendiju Nacionalne zaklade za znanost, visoko školstvo i tehnologijski razvoj Republike Hrvatske, u sklopu koje sam provela tri mjeseca (od 11. veljače do 11. svibnja 2008.) na Poljoprivrednom institutu u Martonvásáru, Mađarska. Sudjelovala sam na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova agronoma, genetičara i prehrambenih tehnologa. Bila sam voditelj jednoga završnog rada. Kao autor i koautor objavila sam šest a1 i dva a2 rada. Član sam Hrvatskoga agronomskog društva i EUCARPIA-e. Udana sam i majka dvoje djece.