Fenotipska varijabilnost korijenovog sustava pšenice (Triticum aesitivum L.)

Jelčić, Bernardica

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:202209

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

FENOTIPSKA VARIJABILNOST KORIJENOVOG SUSTAVA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.)

DIPLOMSKI RAD

Bernardica Jelčić

Zagreb, prosinac 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ: AGROEKOLOGIJA

FENOTIPSKA VARIJABILNOST KORIJENOVOG SUSTAVA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.)

DIPLOMSKI RAD

Bernardica Jelčić

Mentor: doc. dr. sc. Boris Lazarević

Zagreb, prosinac 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Bernardica Jelčić**, JMBAG **0178092483,** izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

FENOTIPSKA VARIJABILNOST KORIJENOVOG SUSTAVA PŠENICE (*Triticum aestivum* L.)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovog diplomskog rada
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, primjereno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnoga ili stručnog studija
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je pregledalo Povjerenstvo i odobrio mentor
- da sam upoznata s odredbama Etičkoga kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (čl. 19.).

U Zagrebu, _____ _____

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Bernardice Jelčić, JMBAG 0178092483,** ocijenjen je i obranjen dana _____, ocjenom _____, pred Stručnim povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Boris Lazarević (mentor) _____
2. Doc. dr. sc. Toni Safner (član) _____
3. Prof. dr. sc. Hrvoje Šarčević (član) _____

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Bernardice Jelčić**, naslova:

Fenotipska varijabilnost korijenovog sustava pšenice (*Triticum aestivum* L.)

Fenotipske karakteristike korijenovog sustava imaju važnu ulogu u adaptaciji biljaka na nepovoljne okolišne uvjete. Istraživanje fenotipskih karakteristika omogućuje opis ideotipova korijena za poboljšano usvajanje vode i hranjiva, dok se primjenom molekularnih biljega stvara mogućnost lociranja gena koji kontroliraju određene fenotipske karakteristike korijena.

Cilj rada bio je analizirati fenotipske karakteristike korijenovog sustava pšenice te analizom polimorfizma jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism;* SNP) provesti kartiranje pridruživanjem kako bi se pronašle regije u genomu pšenice koje kontroliraju određene fenotipske karakteristike korijena.

Pokus je postavljen u *pouch* sustavima. Klijanci 56 genotipova i oplemenjivačkih linija pšenice uzgajani su u Magnavaca hranjivoj otopini (pH = 4,0) tijekom pet dana. Fenotipske karakteristike korijenovog sustava određivane su pomoću WinRhizo Pro softvera analizom fotografija korijenovog sustava nastalih petog dana nakon presađivanja. Analizirane su sljedeće fenotipske karakteristike: širina i dubina korijena, kut grananja korijena, ukupna duljina te ukupna površina korijena. DNA je ekstrahirana iz osušenog i usitnjenog lisnog materijala uz pomoć komercijalnog kita "*peqGOLD plant DNA mini kit*". Analiza polimorfizma jednog nukleotida provedena je novorazvijenim 15k SNP-čipom koji sadrži 13 006 funkcionalnih SNP biljega. Za potrebe analize genoma pšenice korišteno je ukupno 10 649 biljega za koje je postojala informacija o poziciji unutar genoma (kromosom i pozicija lokusa).

Utvrđena je značajna fenotipska varijabilnost između korijena klijanaca korištenih genotipova pšenice. Također, pronađeni su potencijalni ideotipovi korijena za poboljšano usvajanje vode i dušika, odnosno fosfora. Nadalje, pomoću analize polimorfizma jednog nukleotida (SNP) detektirani su signifikantni QTL-ovi za sve četiri analizirane karakteristike korijena. Sukladno tome, na području genoma pšenice pronađene su potencijalne regije koje sadrže jedan ili više gena jakog efekta koji kontroliraju mjerene fenotipske karakteristike korijena.

Ključne riječi: pšenica (*Triticum aestivum* L.), fenotipske karakteristike korijena, fenotipska varijabilnost, polimorfizam jednog nukleotida (SNP), lokusi kvantitativnih svojstava (QTL)

Summary

Of Master's thesis entitled:

Phenotypic variability of wheat root system (*Triticum aestivum* L.)

Root phenes play an important role in plant adaptation to unfavourable environmental conditions. In fact, investigation of root traits gives an opportunity to describe root system ideotypes for enhanced water and nutrient acquisition. What is more, usage of molecular markers gives the opportunity to identify genetic loci associated with the respective root phenes.

The main aim of this study was to analyse wheat seedlings root phenes and, by performing single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, to conduct an association mapping in order to identify wheat genome regions which control expression of particular root phenes.

Seedlings of 56 wheat genotypes and inbred lines were grown in Magnavaca's nutrient solution (pH = 4,0) for five days. Plants were grown in pouch systems. Root phenes were analysed five days after planting using WinRhizo Pro software. Analysed root phenes included: root system width and depth, root growth angle, total root lenght and total root area. DNA was extracted from dried-mashed leaf material of respective genotypes and inbred lines using "*peqGOLD plant DNA mini kit*" commercial kit. Single nucleotide polymorphism analysis was assisted by a newly developed 15k SNP chip containing 13 006 functional SNP markers. Regarding the wheat genome-wide analysis, 10 649 SNP markers (with determined position) were used.

Wheat seedlings root system showed significant phenotypic variability among genotypes. Moreover, potential root ideotypes for enhanced water and nitrogen, as well as phosphorus acquisition, were identified. What is more, significant QTLs for all analysed root phenes were identified by single nucleotide polymorphism analysis. In this regard, potential wheat genome regions containing one or few genes controlling particular root phenes were identified.

Key words: wheat (*Triticum aestivum* L.), root phenes, phenotypic variability, single nucleotide polymorphism (SNP), quantitative trait loci (QTL)

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Pregled literature 2

2.1. Genetska struktura pšenice 2

2.2. Razvoj i morfologija korijenovog sustava pšenice 2

2.3. Plastičnost arhitekture korijenovog sustava 3

2.4. Pregled ostalih selekcijskih programa pšenice 5

2.5. Detekcija lokusa kvantitativnih svojstava (QTL) 7

3. Cilj rada 11

4. Materijali i metode 12

4.1. Biljni materijal 12

4.2. Priprema sjemena 13

4.3. *Pouch* sustav 13

4.4. Uvjeti uzgoja 16

4.5. Eksperimentalni dizajn i izvođenje pokusa 16

4.6. Analize fotografija korijenovih sustava 17

4.7. Ekstrakcija DNA 17

4.8. Analiza SNP biljega 18

4.9. Statistička obrada podataka 18

5. Rezultati 20

5.1. Rezultati analize fenotipskih karakteristika korijena 20

5.2. Rezultati analize polimorfizma jednog nukleotida (SNP biljega) 24

6. Rasprava 28

6.1. Analiza fenotipskih karakteristika korijena pšenice 28

6.2. Analiza polimorfizma jednog nukleotida (SNP) 29

7. Zaključak 31

7. Popis literature 32

1. Uvod

Nedostatak vode te niska plodnost tla primarni su ograničavajući čimbenici poljoprivredne proizvodnje koji uzrokuju niske prinose te ugrožavaju sigurnost hrane u nerazvijenim zemljama. Nasuprot tomu, navodnjavanje i intenzivna gnojidba u razvijenim zemljama uzrok su onečišćenju okoliša i narušavanju prirodnih resursa neophodnih za poljoprivrednu proizvodnju. Budući da su usjevi pšenice, kao i ostalih kultiviranih vrsta, neprestano izloženi raznim abiotskim i biotskim stresnim čimbenicima, javlja se sve veća potreba za pronalaskom genotipova koje karakterizira efikasno usvajanje vode i hranjiva iz tla (Lynch, 1998; Vance i sur., 2003; Lynch, 2007).

Fenotipske karakteristike korijenovog sustava od iznimne su važnosti za prorastanje tla i usvajanje hranjiva iz otopine tla, zbog čega su usko povezane s produktivnošću biljaka kao i adaptacijom istih na nepovoljne okolišne uvjete (Manschadi i sur., 2008; Hamada i sur., 2012). Oplemenjivanje kultiviranih vrsta bazirano na fenotipizaciji korijenovog sustava u svrhu odabira povoljnih karakteristika korijena smatra se iznimno perspektivnom metodom za ublažavanje negativnog učinka okolišnih čimbenika na svjetsku poljoprivrednu proizvodnju (Zhu i sur., 2005). Tako se primjerice, provođenjem programa koji u fokus istraživanja stavljaju fenotipsku varijabilnost korijena pronalaze ideotipovi korijena koji pokazuju veću efikasnost u usvajanju vode i dušika (Lynch, 2013; Mi i sur., 2010) te fosfora (Ho i sur., 2005; Manske i sur., 2000).

Međutim, zbog fenotipske plastičnosti korijenovog sustava, te destruktivnosti metoda koje se koriste u uzorkovanju i analizi, fenotipizacija korijena predstavlja značajan izazov kod odabira ciljanih karakteristika (Beebe i sur., 2006). Također, održivo povećanje prinosa zahtijeva brz napredak u poboljšanju fenotipskih karakteristika koje karakteriziraju kompleksna genetska arhitektura te izražena interakcija s okolišnim čimbenicima (Qian i sur., 2017). Obzirom na činjenicu da se većina karakteristika koje snažno utječu na prinos nasljeđuje kvantitativno, u novije se vrijeme fokus selekcijskih programa stavlja na detekciju lokusa kvantitativnih svojstava (*quantitative trait loci*; QTL) te kartiranju gena koji služe u biljezima potpomognutoj selekciji (*marker assisted selection;* MAS) (Qian i sur., 2017; Watt i sur., 2013). Sukladno tome, smatra se da će kartiranje lokusa kvantitativnih svojstava za karakteristike korijenovog sustava i razvoj biljezima potpomognute selekcije biti od velike pomoći za razvoj oplemenjivačkih programa selekcije na poželjne karakteristike korijena za poboljšano usvajanje vode i hranjiva iz tla (Ren i sur., 2012).

2. Pregled literature

2.1. Genetska struktura pšenice

Obična ili krušna pšenica (*Triticum aestivum* L.) pripada redu *Poales,* porodici Poacea (trave), te potporodici *Pooideae* (Watson i Dallwitz, 1992). Prema genetskoj strukturi postoje tri osnovne skupine pšenice, a to su diploidna (2n = 14), tetraploidna (2n = 28) i heksaploidna (2n = 42) (Pospišil, 2010). Krušna pšenica pripada skupini aloheksaploida te sadrži kombinaciju genoma AABBDD, nastalu hibridizacijom tri diploidna pretka iz porodice trava. Donor A podgenoma, koji je osnovni podgenom krušne pšenice, kao i ostalih poliploidnih pšenica, je vrsta *Triticum urartu* L. Također, navedena je vrsta svojim karakteristikama ujedno i najsličnija suvremenoj krušnoj pšenici. Podgenom B naslijeđen je od vrste koja je srodna s *Aegilops speltoides* Tausch, dok je donor podgenoma D vrsta *Aegilops tauschii* Coss. (Dvořák i Zhang, 1992; Ling i sur., 2013).

Svaki je podgenom aloheksaploidne pšenice zastupljen sa po sedam kromosoma organiziranih u sedam homolognih grupa koje sadržavaju po tri homologna kromosoma, što znači da se u svakoj grupi nalazi po jedan kromosom iz svakog podgenoma (A, B i D) (Martinčić i Javor, 1996). Također, poznato je da se krušna pšenica tijekom mejoze ponaša kao diploidni organizam, ali je njezin genom sposoban tolerirati aneuplodiju zbog prisutnosti trostrukih gena (poliploidnosti) (Gupta i sur., 2008), što je karakteristika koja pšenici osigurava dobro zastupljenu genetsku osnovu za homeostazu i adaptibilnost pri raznim ekološkim uvjetima (Martinčić i Javor, 1996).

2.2. Razvoj i morfologija korijenovog sustava pšenice

Korijenov sustav pšenice je tipičan za monokotiledone, žiličast je te ga karakteriziraju brojni sitni korjenčići koji prorastaju veliku površinu uzgojnog medija u kojemu se nalaze (Miladinović i sur., 1974). Korijenov sustav monokotiledona čini primarno i seminalno korijenje koje se razvija tijekom embrionalne faze, te nodijalno koje se razvija tijekom postembrionalne faze (Hochholdinger i Zimmermann, 2009). Razvoj korijena započinje rastom primarnih korjenčića iz radikule. Nedugo zatim slijedi rast seminalnih korjenčića iz skuteluma (Setter i Carlton, 2000; Pospišil, 2010). Oni predstavljaju fino (0,5 mm) vlaknasto korijenje (Setter i Carlton, 2000) te, u usporedbi s nodijalnim, rastu ranije i dublje u tlo (Manschadi i sur., 2013). Ukoliko se klijanci slabije razvijaju, razvoj jednog ili oba para seminalnih korjenčića

može izostati. Međutim, kod klijanaca koji bilježe dobar razvoj, te čije je korijenje dosegnulo željenu duljinu, može doći i do razvoja šestog seminalnog korjenčića (Setter i Carlton, 2000).

Nodijalno se korijenje razvija na području nižih internodija stabljike, u pravilu 1 – 2 cm iznad površine tla (Manschadi, 2013). Ovo je korijenje u pravilu deblje (> 1 mm) od seminalnog, iako se navedena razlika gubi prelaskom u dublje slojeva tla (Setter i Carlton, 2000). Nadalje, zajednička karakteristika embrionalnog i postembrionalnog korijenja je formiranje postranog (lateralnog) korijenja (Hochholdinger i Zimmermann, 2009). Također, mnogobrojno grananje primarnog, kao i sekundarnog korijenja, dovodi do razvoja korijenovih dlačica razmještenih duž korijena na udaljenosti 0,1 – 1,5 cm (Miladinović i sur., 1974).

Budući da vlati koje ne formiraju vlastiti korijenov sustav vrlo brzo propadaju, razvoj sekundarnog korijenovog sustava ima veliku važnost za ostvarenje visokih prinosa pšenice (Pospišil, 2010). Rast i razvoj korijenovog sustava pšenice odvija se sve do mliječne zriobe (Miladinović i sur., 1974), a mehanizmi rasta te konačan fenotip ovise o nizu ekoloških čimbenika. Franco i sur. (2011) navode sljedeće ekološke čimbenike koji negativno utječu na razvoj korijena: a) nedostatak vode ili visoka zasićenost tla vodom koja rezultira nedovoljnom opskrbljenošću zrakom te sprječava izmjenu plinova u interakciji korijen-rizosfera; b) nepovoljna pH reakcija tla; c) smanjena dostupnost hranjiva ili neravnomjerna raspodjela hranjiva u otopini tla; d) prisutnost toksičnih tvari u tlu; e) zbijenost tla; f) zaslanjenost tla; te g) previsoka ili preniska temperatura zraka, odnosno tla. Uzimajući u obzir navedene čimbenike, očigledno je da se korijenov sustav ne razvija uniformno, već je njegova arhitektura rezultat odgovora na uvjete kojima je tijekom razvoja izložen, čime pokazuje svojstvo fenotipske plastičnosti (Sultan, 2000).

2.3. Plastičnost arhitekture korijenovog sustava

Korijenov sustav pokazuje zamjetne varijacije u arhitekturi unutar biljnih vrsta, genotipova iste vrste, pa čak i unutar različitih dijelova istog korijenovog sustava (Lynch, 1995). Ove su varijacije specifične za određene uvjete te predstavljaju adaptaciju fenotipskih karakteristika korijena u svrhu adaptacije biljke na ekološke uvjete (Sultan, 2000). Zbog toga raznolikost i plastičnost arhitekture korijenovog sustava predstavljaju metodološki izazov i intrigantni aspekt funkcije morfologije biljaka (Lynch, 1995).

Arhitektura korijenovog sustava obuhvaća prostornu raspodjelu jedinica sustava unutar zadanog volumena tla. Karakteristike arhitekture korijena mogu se podijeliti na geometrijske

koje određuju oblik te karakteristike koje opisuju mehanizme grananja korijena, a važnost arhitekture leži u činjenici da su mnogi resursi u tlu neravnomjerno raspoređeni (Lynch, 1995; Manschadi i sur., 2013). Karakteristike korijenovog sustava od iznimne su važnosti za prorastanje tla i usvajanje hranjiva iz otopine tla, zbog čega su usko povezane s produktivnošću biljaka kao i adaptacijom biljaka na nepovoljne okolišne uvjete (Manschadi i sur., 2008; Hamada i sur., 2012).

Budući da su usjevi pšenice, kao i ostalih kultiviranih vrsta, neprestano izloženi raznim abiotskim i biotskim stresnim čimbenicima, javlja se sve veća potreba za pronalaskom genotipova adaptiranih na određene nepovoljne uvjete. Ta potreba zahtjeva upotrebu fenotipizacijskih tehnika u svrhu razvoja raznih selekcijskih programa. Provođenjem programa koji u fokus istraživanja stavljaju fenotipsku varijabilnost korijena, formiraju se ideotipovi korijena za učinkovito primanje vode i hranjiva, te u konačnici, za poboljšanu produktivnost usjeva u uvjetima specifičnih stresnih čimbenika.

Nedovoljna opskrba vodom smatra se jednim od najznačajnijih okolišnih stresora koji reducira produktivnost usjeva u najvećoj mjeri (Lambers i sur., 2008). Manschadi i sur. (2008) u svrhu pronalaska ideotipa korijena pšenice za učinkovitije usvajanje vode, predlažu selekciju na fenotipske karakteristike seminalnog korijenja. Autori tvrde da odabir na temelju kuta grananja korijena te broja seminalnih korjenčića može pomoći u identifikaciji genotipova pšenice s arhitekturom korijenovog sustava adaptiranom na sušne uvjete. Nadalje, ovi autori navode da tolerantni genotipovi razvijaju dublji korijenov sustav u usporedbi s onima koji su osjetljiviji na sušu. Također, za razliku od osjetljivijih genotipova koji pokazuju širi kut grananja seminalnog korijenja te plići korijenov sustav, tolerantni genotipovi razvijaju oštri (uži) kut grananja seminalnog korijenja te gušći korijenov sustav. Navedeni je opis ideotipa korijena pšenice za učinkovitije usvajanje vode u skladu s ostalom literaturom. Primjerice, Bayoumi i sur. (2008) također navode da se kod nedovoljne pristupačnosti vode korijen pšenice razvija dublje u tlo, dok Mishra i sur. (1999) dodaju da korijen izložen nedostatku vode u tlu pokazuje i izraženiju vertikalnu distribuciju.

Uzimajući u obzir smanjenu dostupnost hranjiva, Mi i sur. (2010) smatraju da ideotip korijenovog sustava za poboljšano usvajanje i iskorištavanje dušika kod kukuruza (*Zea mays*, L.) treba uključivati: a) dublje korijenje pojačane metaboličke aktivnosti koje ima sposobnost bržeg usvajanja dušika, obzirom na izuzetnu pokretljivost dušičnih spojeva u otopini tla; b) snažno lateralno grananje korijena u uvjetima dovoljne opskrbljenosti dušikom, čime korijen

pridonosi boljoj prostornoj raspodjeli dostupnog dušika u otopini tla; te c) izraženu reakciju u pogledu rasta lateralnog korijenja pri mjestimice visokim koncentracijama dušika, u svrhu iskorištenja neravnomjerno raspoređenog hranjiva, posebno u uvjetima njegova nedostatka.

Lynch (2011) navodi sljedeće morfološke adaptacije karakteristika korijena u svrhu boljeg usvajanja i iskorištenja fosfora: a) pliće grananje korijenovih osi (gotovo horizontalno u odnosu na površinu tla); b) pojačano stvaranje adventivnog korijenja; te c) veću razgranatost lateralnog korijenja. Ovaj je navod u skladu s ostalom literaturom te se kod genotipova pšenice (Manske i sur., 2000), kukuruza (*Zea mays* L.; Mollier i Pellerin, 1999), graha (*Phaseolus vulgaris* L.; Lynch, 1995; Ho i sur., 2005), soje (*Glycine max* Merr.; Lynch, 2011) te *Arabidopsis thaliana* Heynh. (Cruz-Ramírez i sur., 2009) utvrđuje povezanost fenotipskih karakteristika korijena s efikasnošću usvajanja fosfora, pri čemu se učinkovitijim pokazuju genotipovi plićeg, jače razgranatog korijena, šireg kuta grananja. Nadalje, Ho i sur. (2005) kod genotipova graha plićeg korijenja utvrđuju veću koncentraciju fosfora u suhoj tvari nadzemnog dijela biljke što ukazuje na veću gustoću lateralnog korijenja ovih genotipova u površinskom sloju uzgojnog medija. Osim navedenih karakteristika, *Arabidopsis thaliana* Heynh., pokazuje i povećanje broja te duljine korijenovih dlačica po jediničnoj dužini korijena (Cruz-Ramírez i sur., 2009).

2.4. Pregled ostalih selekcijskih programa pšenice

Zhu i sur. (2005) smatraju da fenotipizacija korijenovog sustava te oplemenjivanje u smjeru odabira povoljnih karakteristika korijenovog sustava ima veliki potencijal za ublažavanje negativnog učinka okolišnih čimbenika na svjetsku poljoprivrednu proizvodnju. Međutim, pregledom dosadašnjih istraživanja utvrđuje se drugačiji trend u oplemenjivanju. Budući da karakteristike korijenovog sustava pokazuju fenotipsku plastičnost, te uzimajući u obzir da su metode uzorkovanja korijena, koje uključuju izdvajanje korijena iz dijela tla kojeg prožimaju, destruktivne, fenotipizacija korijena predstavlja značajan izazov kod odabira ciljanih karakteristika (Beebe i sur., 2006). Unatoč tomu, Hochholdinger i Zimmermann (2009) smatraju da je fenotipizacija korijena pšenice za sve tipove korijena, osim nodijalnog, moguća već u početnoj fazi razvoja (dva tjedna nakon početka klijanja), što omogućuje *screening* velikog spektra fenotipskih varijacija. Također, Tuberosa (2012) navodi da postoje brojne metode koje omogućuju procjenu mase korijenovog sustava te njegovu distribuciju kroz profil uzgojnog medija. Međutim, isti autor dodaje da su spomenute metode radno i vremenski vrlo intenzivne te često destruktivne za tlo i korijenov sustav uzorkovanih biljaka, što rezultira

upitnom relevantnošću prikupljenih podataka. Nadalje, Manschadi i sur. (2008) tvrde da rastom korijena u dubinu tla te rastom nodijalnog korijenja i lateralnim grananjem, fenotipizacija korijenovog sustava postaje sve kompleksnija. Zbog navedenih ograničenja kod ovog tipa fenotipizacije, u fokusu dosadašnjih selekcijskih programa u pravilu se nalazi selekcija na ostale ekonomski važne karakteristike pšenice, čije je analiza manje kompleksna.

Kao što je ranije u radu navedeno, identifikacija te daljnji razvoj genotipova pšenice koje karakterizira povećana tolerantnost na sušne uvjete, a samim time i veći prinos u sušnim uvjetima, predstavlja važan kriterij selekcije. Geravandi i sur. (2011) u sklopu vegetacijskih pokusa provode analizu genotipova pšenice bazirajući se na fiziološke parametre, uključujući stabilnost stanične membrane, koncentraciju prolina u biljnom materijalu, relativni sadržaj vode u listovima, relativni gubitak vode te relativni sadržaj klorofila. Autori utvrđuju da su genotipovi pšenice sa stabilnijom staničnom membranom, većim sadržajem vode u listovima te višom koncentracijom klorofila tolerantniji na sušne uvjete. Kerepesi i Galiba (2000) provode analizu nedovoljne opskrbe vodom kod pšenice uzrokovane navodnjavanjem zaslanjenom vodom, što je čest problem na području Mediterana. Istraživanjem baziranim na analizi ukupnog sadržaja topljivih ugljikohidrata te koncentraciji glukoze, fruktoze, saharoze i fruktana u fotosintetski neaktivnom tkivu, autori kod tolerantnih genotipova utvrđuju značajnu akumulaciju ugljikohidrata, u najvećoj mjeri saharoze.

Tadesse i sur. (2015) provode analizu genotipova pšenice na kvalitetu zrna, uzimajući u obzir ukupnu visinu biljaka (cm), prinos zrna (kg/ha), masu zrna te sadržaj proteina u zrnu. Također, provode se programi selekcije na tolerantnost genotipova na najznačajnije bolesti lista pšenice, poput pepelnice (Huang i sur., 2002), smeđe pjegavosti lista (Adhikari i sur., 2004) te smeđe hrđe (Singh, 1993). Provedbom evaluacije termostabilnosti staničnih membrana tkiva listova bilježe se istraživanja tolerantnosti pšenice na visoke temperature (Blum i sur., 2001), dok Crook i Ennos (1994) morfološkim i mehaničkim mjerenjima stabljike analiziraju polijeganje stabljike kod ozime pšenice.

Budući da učinkovitost i pouzdanost oplemenjivačkih programa ovise o dostupnosti podataka o genetskoj varijabilnosti za ciljane karakteristike (Tuberosa, 2012), mnogi autori poput Manschadi i sur. (2008), Zhu i sur. (2005) te Hamada i sur., (2012) smatraju da je razvoj genetske selekcije na temelju specifičnih biljnih karakteristika perspektivniji od *screeninga* u poljskim pokusima (u tlu). Međutim, razumijevanje veze između genotipa i fenotipa napreduje vrlo sporo jer ograničenja koja postoje u fenotipizaciji biljaka umanjuju mogućnosti u

raščlanjivanju nasljednosti i genetske arhitekture kvantitativnih svojstava. Sukladno tome, za očekivati je da će budući pomaci u fenotipizaciji biti usmjereni na povećanje njihove preciznosti i piramidalizaciju informacija sa svih razina (CroP-BioDiv, 2016).

2.5. Detekcija lokusa kvantitativnih svojstava (QTL)

Istraživanja u području molekularnog oplemenjivanja krušne pšenice komplicirana su zbog tri usko povezana podgenoma te opsežnog genoma s više od 16 milijardi baznih parova uz visoku zastupljenost ponavljajućih DNA sljedova (> 80 %) (Gupta i sur., 2008). Procjenjuje se da svaki od tri podgenoma pšenice sadrži između 40 000 i 50 000 gena (Ganal i Röder, 2007). Poliploidnost i obilje ponavljajućih DNA sljedova čine analizu genetske varijacije te razvoj genetskih karata pšenice visoke gustoće kompleksnim pothvatima (Saintenac i sur., 2013). Također, korijenov sustav pšenice je gust i žiličast, što ga čini kompliciranim za mjerenje i selekciju od strane oplemenjivača (Ren i sur., 2012). Ovaj izazov čini selekciju potpomognutu genetskim biljezima (*marker assisted selection:* MAS) privlačnom alternativom klasičnoj fenotipskoj selekciji (Beebe i sur., 2006).

Cilj genetskim biljezima potpomognute selekcije je poboljšanje učinkovitosti i pouzdanosti selekcije u odnosu na konvencionalne metode oplemenjivanja bilja (Collard i sur., 2005). Polimorfizam jednog nukleotida (*single-nucleotide polymorphism*; SNP) je najčešći tip genetske varijacije kod eukariotskih genoma (Akhunov i sur., 2009), te se pojavljuje uslijed zamjene jednog od nukleotida nekim drugim nukleotidom. Biljezi SNP su dvoalelni, sadržavaju manje genetskih informacija od višealelnih mikrosatelitnih biljega, no pojavljuju se u puno većoj gustoći u genomu i imaju značajno nižu stopu pogreške pri genotipizaciji (Crop-BioDiv, 2016). Akhunov i sur. (2009) smatraju korištenje SNP biljega iznimno korisnim u svrhu genotipizacije poliploidne pšenice. U samim počecima, sekvenciranje nove generacije većim je dijelom korišteno u svrhu razvoja analize polimorfizma jednog nukleotida (Saintenac i sur., 2013), budući da podaci dobiveni fenotipizacijom visoke propusnosti, kod primjene SNP biljega visoke gustoće, imaju široku primjenu u detekciji lokusa kvantitativnih svojstava (*quantitative trait loci*; QTL) za karakteristike korijena (Wang i sur., 2014).

Područja unutar genoma koja sadrže gene povezane s određenim kvantitativnim svojstvima poznata su kao lokusi kvantitativnih svojstava (QTL) (Collard i sur., 2005). Detekcija lokusa kvantitativnih svojstava, bazirana na genetskim kartama velike gustoće te kartiranju pridruživanjem za karakteristike korijena, doprinosi poznavanju kompleksne genetske kontrole

regulacije rasta korijena (Ren i sur., 2012). Rezultati dobiveni detekcijom QTL-ova za pojedine karakteristike predstavljaju set informacija koji opisuje sve eksperimentalno potvrđene QTL-ove za određenu karakteristiku kod ispitivane vrste (Salvi i Tuberosa, 2015). Za svaki pronađeni QTL, navedena analiza pruža informaciju o njegovoj poziciji na genskoj karti izrađenoj na principu pridruživanja, identitet alela te genetički efekt u vidu širine i tipa (QTL-ovi jakog ili slabog efekta) (Salvi i Tuberosa, 2015). Nakon što se pojedini gen identificira i locira, moguće je raščlaniti fenotipsku varijabilnost za neku karakteristiku u komponente pripisive svakom pojedinom genu. To daje mogućnost da se svaki individualni biljeg „veže" za gen od interesa i zatim manipulira pojedinačno ili zajedno kroz njihovu piramidalizaciju u oplemenjivačkom programu (Novoselović, 2018). Zbog navedenih se razloga smatra da će kartiranje lokusa kvantitativnih svojstava za karakteristike korijenovog sustava i razvoj biljezima potpomognute selekcije biti od velike pomoći za razvoj oplemenjivačkih programa za selekciju na poželjne karakteristike korijena za poboljšano usvajanje vode i hranjiva iz tla (Ren i sur., 2012).

Kartiranje pridruživanjem uz pomoć detekcije QTL-ova za karakteristike od interesa do danas je provedeno na mnogim kultiviranim vrstama (Tadesse i sur., 2015). Neka se istraživanja, bazirana na detekciji QTL-ova za ciljane karakteristike korijenovog sustava, provode kod pšenice. Među njima, Ren i sur. (2012) pomoću *simple sequence repeat* (SSR) genetskih biljega identificiraju ukupno 22 QTL-a koji kontroliraju pet fenotipskih karakteristika seminalnog korijenja kineske ozime pšenice: 1) maksimalnu duljina korijena (jedan QTL slabog te jedan jakog efekta (*qMRL-2B*), koji je odgovoran za 68 % fenotipskih varijacija kod ove karakteristike korijena; 2) duljinu primarnog korijena (dva QTL-a slabog te jedan jakog efekta (*qPRL-2B1*), koji objašnjava 59 % varijacija; 3) duljinu lateralnog korijenja (pet QTL-ova slabog te jedan jakog efekta (*qLRL-6A*), koji objašnjava 30,5 % varijacija; 4) broj vrhova korijena, parametar koji reflektira lateralno grananje korijena (pet QTL-ova slabog te jedan jakog efekta (*qRN-6A*), koji objašnjava 24,5 % varijacija, te 5) ukupnu duljina korijena (četiri QTL-a slabog i jedan jakog efekta (*qTLR-2B*), koji je odgovoran za 20,3 % fenotipskih varijacija navedene karakteristike korijena. Detektirani su QTL-ovi raspoređeni na devet kromosoma te šest homolognih grupa kromosoma.

Hamada i sur. (2012) primjenom SSR biljega detektiraju jedan QTL za broj seminalnog korijenja klijanaca pšenice na kromosomu 5A (*qRN*) koji objašnjava 11,63 % varijacija te dva QTL-a za stopu dubine korijena (opseg korijena čiji je kut grananja > 45°), na kromosomima 1B (*qDRR-1*) i 5D (*qDRR-2*) (zajedno objašnjavaju 21,08 % varijacija). Također, na kromosomu 5D identificiraju QTL za stopu izduženosti korijena (*qER-1*) dok još jedan QTL za

istu fenotipsku karakteristiku identificiraju na kromosomu 7D (*qER-2*). Navedena dva QTL-a zajedno objašnjavaju 27,26 % varijacija. U sklopu iste analize, na kromosomima 1A i 2B, lociraju se još dva QTL-a za kut grananja korijena kao rezultat hidrotropizma (*qHR-1* i *qHR-2*) koja zajedno objašnjavaju 23,31 % varijacija. Prosječna udaljenost između pojedinih SSR biljega iznosi 9,5 cM.

Provodeći analizu korelacije fenotipskih karakteristika klijanaca pšenice s visinom zrele biljke, Bai i sur. (2013) identificiraju 31 QTL za karakteristike korijenovog sustava na povezanim grupama 2A, 2D, 3A, 3B, 4D, 5A, 5BS i 6A. Među njima, devet QTL-ova za duljinu korijena, devet za površinu korijena, 11 za volumen te dva za suhu tvar korijena. Autori utvrđuju usku povezanost između analiziranih karakteristika korijenovog sustava i visine zrele biljke, budući da neki geni kontroliraju i karakteristike korijena i visinu biljke. Nadalje, Atkinson i sur. (2015) analizirajući korelaciju visine zrele biljke te karakteristika korijenovog sustava klijanaca kod pšenice (poput ukupne duljine i broja seminalnog korijenja te maksimalne širine korijena), većinu QTL-ova za karakteristike korijena klijanaca lociraju na D podgenomu (24 QTL-a na četiri kromosoma), u odnosu na ostala dva podgenoma (šest QTL-ova na tri kromosoma). Na temelju navedenog, autori smatraju da D podgenom iskazuje izuzetno značajan doprinos kod razvoja korijenovog sustava klijanaca pšenice.

QTL analize s ciljem detekcije lokusa gena koji imaju utjecaj na fenotipske karakteristike korijena povezane s usvajanjem fosfora česta su tema istraživanja unutar ovog znanstvenog polja. Beebe i sur. (2006) primjenom kombinacije mikrosatelitskih biljega u sastavu *restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP), *randomly amplified polymorfic DNA* (RAPD) te *amplified fragment lenght polymorphism* (AFLP) biljega kod genotipova graha lociraju ukupno 26 QTL-ova u području 15 različitih genomskih regija, raspoređenih u devet povezanih grupa. Između ostalih, detektiraju četiri QTL-a za duljinu korijena (*Rfl4.1, Rfl7.1, Rfl8.1* i *Rfl8.2*), dva za specifičnu duljinu korijena (*Srl8.1* i *Srl10.1*), dva za duljinu bazalnog korijenja (*Brl3.1* i *Brl10.1*) te jedan za duljinu primarnog korijena kod graha (*Trl3.1*). Prosječna udaljenost između pojedinih biljega iznosi 7,2 cM. Nadalje, Wu i sur. (2017) pomoću *single-nucleotide polymorphism* (SNP) i SSR genetskih biljega lociraju 16 QTL-ova za ukupni promjer korijena pšenice, od kojih je sedam QTL-ova jakog efekta pronađeno isključivo u uvjetima nedostatka fosfora. Navedeni su QTL-ovi smješteni na kromosomima 1B, 1D, 2B, 3B, 3D i 7D te svaki objašnjava 11-14,5 % fenotipskih varijacija obzirom na ukupni promjer korijena. Prosječna udaljenost između primijenjenih biljega iznosi 0,148 cM. Nadalje, Zhu i sur. (2005) kod klijanaca kukuruza pri različitoj dostupnosti fosfora lociraju QTL-ove za sljedeće karakteristike

korijenovog sustava: 1) duljinu lateralnog korijenja kod smanjene dostupnosti fosfora (pet QTL-ova koji zajedno objašnjavaju 30 % fenotipskih varijacija); 2) duljinu lateralnog korijenja pri visokoj dostupnosti fosfora (pet QTL-ova koji zajedno objašnjavaju 45,6 % fenotipskih varijacija); 3) broj lateralnih korjenčića pri smanjenoj dostupnosti fosfora (jedan QTL) te 4) plastičnost broja lateralnih korjenčića (jedan QTL koji objašnjava 10,2 % fenotipskih varijacija za navedenu karakteristiku kod proučavane populacije kukuruza).

Na temelju dosadašnjeg razvoja i primjene ove metodologije, smatra se da će detekcija lokusa kvantitativnih svojstava kultiviranih biljaka utvrditi čitavu kolekciju genetički kartiranih lokusa i njihovih alelnih varijacija za koje se smatra da su povezane s dijelovima genoma pšenice koji kontroliraju pojedine fenotipske karakteristike korijena od posebnog interesa za poljoprivrednu proizvodnju (Salvi i Tuberosa, 2015; Beebe i sur., 2006).

3. Cilj rada

Cilj rada je analizirati fenotipske karakteristike korijenovog sustava pšenice te analizom polimorfizma jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism;* SNP) provesti kartiranje pridruživanjem kako bi se pronašle regije u genomu pšenice koje kontroliraju odabrane fenotipske karakteristike korijena.

4. Materijali i metode

4.1. Biljni materijal

U pokusima je korišteno 56 genotipova i oplemenjivačkih linija pšenice sa sortne liste Republike Hrvatske (Tablica 1), prethodno umnoženih na pokusnom polju Bc instituta (Slika 1).

Tablica 1. Korištene sorte i oplemenjivačke linije te oznake korištene u radu.

Ime genotipa	Šifra	Ime genotipa	Šifra	Ime genotipa	Šifra
Natalija	P001	Bc Elvira	P061	Accroc	P095
Kuna	P004	Klaudija	P062	Solveig	P096
Desetka	P007	Karla	P065	Calisol	P099
Viktorija	P008	Bc Marina	P066	Tornado	P111
Simonida	P009	Lara	P067	Aztec	P113
Milijana	P013	Matea	P068	CCB Ingenio	P115
Sofru	P014	Alixan	P069	Barbara	P133
Sivka	P017	Olimpija	P070	Zvezdana	P137
Golubica	P022	Prima (NS)	P072	Sirtaki	P142
Žitarka	P027	Zlatna dolina	P076	Zlata	P161
Dragana	P038	U1-Osječka šišulja	P077	Superžitarka	P165
Vulkan	P039	Poncheau	P081	NS Rana	P178
Lucija	P040	Roazon	P082	Bc Renata	P179
Rebeka	P042	Bologna	P086	Nogal	P182
Autan	P043	Diamento	P087	Airbus	P184
Srpanjka	P047	SY Moisson	P088	Bc Tena	P193
Pesma	P053	Illico	P089	Dora	P195
Leuta	P055	Hystar	P093	Magdalena	P206
Ilinca	P058	Selehio	P094		



Slika 1. Umnažanje sjemena i oplemenjivačkih linija pšenice
(Fotografija: B. Lazarević)

4.2. Priprema sjemena

Sjeme pšenice prosijano je kroz niz sita kako bi se dobila ujednačena frakcija sjemena promjera 2,5-3,0 mm. Izdvojeno sjeme površinski je sterilizirano u 70 % (v/v) otopine etanola tijekom 30 sekundi, a zatim 5 % (v/v) otopine natrijevog hipoklorita tijekom 10 minuta. Nakon sterilizacije sjeme je tri puta ispirano pod mlazom destilirane vode. Sterilizirano i isprano sjeme naklijavano je u petrijevim posudicama između dva konstantno vlažna klijališna papira (Regular Weight Seed Germination Paper, SD3,5, Anchor Paper Company, St Paul, Mn, US). Ukupno je korišteno 50 sjemenki pojedinog genotipa, pri čemu je u svaku petrijevu posudicu položeno 10 sjemenki. Kako bi se ujednačilo klijanje, sjeme je inkubirano tijekom pet dana pri 4 ºC, a zatim je naklijavano tijekom 48 h pri 20 ºC. Tijekom perioda inkubacije i naklijavanja petrijeve zdjelice su postavljene vertikalno kako bi klica prilikom formiranja korijena bila okrenuta prema dolje.

4.3. *Pouch* sustav

Nakon perioda klijanja, ujednačeno razvijeni klijanci s korjenčićima duljine 5-10 mm (Slika 2) su presađeni na tzv. *pouch* sustav. Metodologija *pouch* sustava poznata je i pod nazivom *rhizoslides* (Le Marie i sur., 2014), a prvi put je razvijena u svrhu proučavanja korijena graha (Bonser i sur., 1996) te kukuruza (Hund i sur., 2009). Pojedinačni *pouch* okvir sastavljen je od

jedne ploče izrađene od ekstrudiranog akrilnog stakla („pleksiglas“) (dimenzija 400 × 250 × 3 mm; Prozirni namještaj d.o.o. Donja Zelina, Croatia), klijališnog papira jednakih dimenzija (Anchor Paper Company, St Paul, MN, US), te crne polythene folije također jednakih dimenzija (debljine 100 μm; MURAPLAST d.o.o., Kotoriba, Croatia) (Slika 3). Folija i klijališni papir pričvršćuju se za ploču od ekstrudiranog stakla pomoću kvačica koje se postavljaju na gornju te bočne strane okvira. Pri tome ploča od akrilnog stakla služi kao potporanj za klijališni papir i rastuću biljku (korijen), klijališni papir služi za kapilarni uspon hranjive otopine te konstantno vlaženje korijenovog sustava, dok crna folija služi kao pokrov koji sprečava prodiranje svjetlosti do korijenovog sustava.

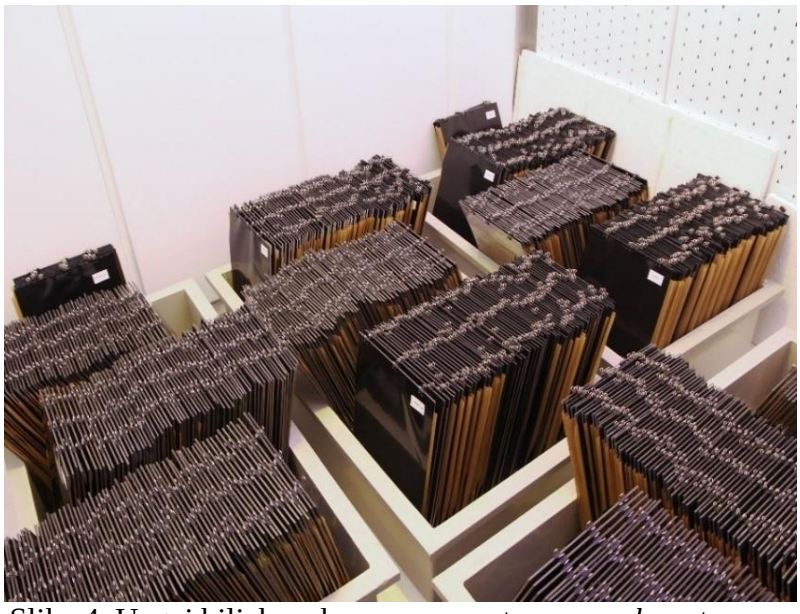


Slika 2. Ujednačeno razvijeni klijanci spremni za presađivanje
(Fotografija: B. Lazarević)



Slika 3. Presađivanje klijanaca na *pouch* sustav
(Fotografija: B. Lazarević)

Biljke presađene na *pouch* sustave postavljene u plastične kade volumena 100 L (dimenzija 100 x 50 x 20 cm) ispunjene s 15 L Magnavaca hranjive otopine (Magnavaca i sur., 1987) (Slika 4). Volumen od 15 L hranjive otopine dovoljan je da prekrije donji rub *pouch* sustava do visine od 3 cm te osigurava jednolično primanje otopine. Kemijski sastav Magnavaca hranjive otopine, nakon izračuna ionske aktivnosti pojedinog hranjiva u krajnjoj otopini pomoću GEOCHEM-EZ softvera (Shaff i sur., 2010) prikazan je tablicom 2.



Slika 4. Uzgoj biljaka u komorama rasta na *pouch* sustavu
(Fotografija: B. Lazarević)

Tablica 2. Kemijski sastav korištene Magnavaca hranjive otopine pri pH 4,0.

Soli	**µM L^{-1}**
Ca	3527
K	2354
Mg	855
NO_3-N	10857
NH_4-N	1300
P	45
S	587
B	25
Fe	77
Mn	9,1
Cu	0,63
Mo	0,83
Zn	2,29
Na	1,74
HEDTA	75
Cl	596

4.4. Uvjeti uzgoja

Biljke su uzgajane u komorama rasta na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, pri 300 µmol m^{-2} s^{-1} fotosintetski aktivne radijacije (PAR), 12/12 h, i 20/15 ºC duljine dan/noć te 75 % relativne vlažnosti zraka.

4.5. Eksperimentalni dizajn i izvođenje pokusa

Pokus je postavljen po potpuno slučajnom rasporedu. U pokusu je korišteno 56 genotipova pšenice, pri čemu je svaki zastupljen s 8 biljaka. Genotipovi su uzgajani u Magnavaca hranjivoj otopini.

Biljke su uzgajane tijekom pet (5) dana, a petog dana nakon presađivanja (DNP) je fotografirano korijenje pomoću Canon 70D fotoaparata i stativa Polaroid MP4+, te objektiva Canon EF 28 mm; f 2.8 pri f 8.0 te 1 EV ekspoziciji.

4.6. Analize fotografija korijenovih sustava

Fotografije korijenovih sustava analizirane su pomoću WinRhizo® softvera (WinRhizo 2015 Pro., Regent Instruments Canada Inc.). Pri tome su analizirane sljedeće fenotipske karakteristike korijena: širina, dubina, ukupna duljina, ukupna površina i kut grananja korijena.

4.7. Ekstrakcija DNA

Sakupljeni uzorci lista stavljeni su na sušenje u liofilizator (Christ beta 1–8 LD, SciQuip, Velika Britanija) na temperaturu od -20 °C. Proces sušenja trajao je 72 sata. Osušeni biljni materijal svakog uzorka odvagnut je u količini od 20 mg u Eppendorf tubice volumena 2,0 ml, a zajedno s biljnim materijalom stavljene su dvije čelične kuglice promjera 3 mm. Biljni materijal je usitnjen pomoću mlina (Retsch MM400, Retsch, Njemačka)

DNA je ekstrahirana iz osušenih i usitnjenih uzoraka uz pomoć komercijalnog kita "*peqGOLD plant DNA mini kit*" tvrtke Peqlab (Erlangen, Njemačka).

Postupak izolacije DNA *peqGOLD Plant DNA Mini kit*-a tvrtke Peqlab obavlja se u sljedećim koracima:

- Homogenizacija biljnog materijala
- Na 20 mg usitnjenog i osušenog biljnog materijala dodano je 400 µl lizirajućeg pufera "PL1" i 15 µl Rnaze A
- Smjesa je homogenizirana vorteksiranjem
- Tubice su stavljene na inkubaciju u vodenu kupelj na 65 °C tijekom 30 minuta uz povremeno mućkanje tuba
- U tubice se dodaje 100 µl lizirajućeg pufera "PL2" uz miješanje pipetiranjem
- Tubice se ponovo stavljaju na inkubaciju hlađenjem na ledu u trajanju od 5 minuta
- Slijedi centrifugiranje na maksimalnoj brzini (14 000 okretaja/min) u trajanju od 10 minuta
- Dobiveni supernatant (tekuća frakcija ostala nakon centrifugiranja) se prenosi na *Microfilter* membranu uz korištenje novih tuba za prikupljanje filtrirane frakcije
- Ponovo se centrifugira na 8000 okretaja/min u trajanju jedne minute

Vezanje DNA na *PerfectBind DNA* membranu

- Dodaje se pola volumena pufera za vezanje "*Binding buffer*" i miješa se pipetiranjem u novim tubicama u kojima se nalaze filtrirane frakcije
- Kompletni volumen tubica se prenosi na *PerfectBind* DNA membranu

- Ponovo se centrifugira na 8000 okretaja/min tijekom jedne minute
- Filtrirane se frakcije izlijevaju i premještaju na *PerfectBind* DNA membrane u novu tubicu

Pročišćavanje DNA

- U tubice se dodaje 650 µl pufera za ispiranje "*Wash Buffer*" kojem je dodano 1,5 volumena stopostotnog etanola
- Potom slijedi centrifugiranje na 8000 okretaja/min tijekom jedne minute u svrhu postizanja što bolje homogenizacije
- Prethodna dva koraka se ponavljaju
- *PerfectBind* DNA membrane se prosušuju centrifugiranjem pri 8000 okretaja/min u trajanju od dvije minute

Otapanje DNA

- *PerfectBind* DNA membrane se prebacuju u tubicu volumena 1,5 ml
- U tubice se dodaje 100 µl pufera za ispiranje "*Elution Buffer"* te se iste stavljaju na inkubaciju pri sobnoj temperaturi na dvije minute
- Slijedi centrifugiranje na 4500 okretaja/min tijekom jedne minute
- Prethodna dva koraka se ponavljaju

4.8. Analiza SNP biljega

Polimorfizam jednog nukleotida na odabranim genotipovima i oplemenjivačkim linijama pšenice analiziran je novorazvijenim 15k SNP-čipom tvrtke TraitGenetics (Gatersleben, Njemačka). Ovaj čip sadrži 13 006 funkcionalnih biljega koji omogućuju identifikaciju haplotipnih blokova pšenice sa prosječno dva biljega po haplotipu. Čip također sadrži i biljege za major gene (gene jakog efekta) bitnih oplemenjivačkih svojstava (svojstva kvalitete, fenološka svojstva i sl.).

4.9. Statistička obrada podataka

Utjecaj genotipa na analizirane karakteristike korijena (širinu, dubinu, kut grananja korijena, ukupnu duljinu te ukupnu površinu korijena) testiran je analizom varijance (ANOVA). Za analizu varijance te izradu grafičkih prikaza korišten je računalni paket R (R Development Core Team, 2008).

Raspodjele izmjerenih vrijednosti analiziranih fenotipskih karakteristika korijena po genotipovima i tretmanima prikazane su kutijastim dijagramima (eng. box and whiskers plot).

Box-plot se sastoji od pravokutnika (eng. box) koji prikazuje podatke od donjeg do gornjeg kvartila. Crta na pravokutniku označava medijan. Donje i gornje horizontalne linije (eng. whiskers) predstavljaju interkvartilni raspon. Sve se točke izvan te granice crtaju posebno i smatraju outlierima (vrijednosti koje odudaraju od ostalih).

Kartiranje pridruživanjem na razini genoma (*genome-wide association study;* GWAS), tj. analiza povezanosti QTL-a s genetskim biljezima, provedena je korištenjem svih SNP biljega za koje je postojala informacija o poziciji unutar genoma (kromosom i pozicija lokusa). Analizirane su četiri kvantitativne varijable (širina, dubina, ukupna duljina i ukupna površina korijena) te je za svaku varijablu korištena aritmetička sredina za svaki genotip. Analiza je napravljena u statističkom programu TASSEL 5.2.25 (Bradbury i sur., 2007) na temelju procjene učestalosti polimorfizma jednog nukleotida koristeći generalizirani linearni model (GLM) sa biljezima kao prediktorima i karakteristikama korijena kao ishodima. Procijenjena je vjerojatnost učinka svakog pojedinog SNP-a na sva analizirane karakteristike korijena. Sve p-vrijednosti su korigirane Bonferronijevom korekcijom (uz inicijalni prag značajnosti p vrijednosti = 0.05) zbog velikog broja višestrukih usporedbi.

5. Rezultati

5.1. Rezultati analize fenotipskih karakteristika korijena

Za potrebe ovog rada, korišteni su podaci dobiveni fotografiranjem korijenja biljaka petog dana nakon presađivanja, te je analizirano ukupno 448 fotografija korijenovog sustava (osam uzoraka za svaki od 56 genotipova).

Rezultati analize varijance (ANOVA-e) između genotipova u mjerenim fenotipskim karakteristikama korijena (širini, dubini, kutu grananja, ukupnoj duljini te ukupnoj površini korijena) prikazani su tablicom 3.

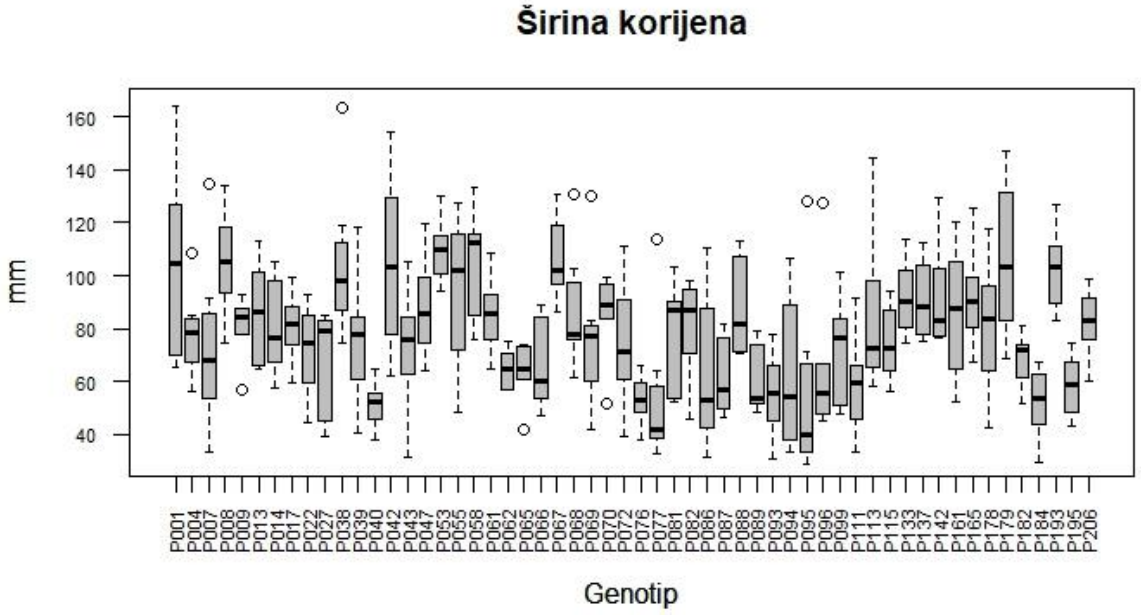
Tablica 3. Rezultati analize varijance (ANOVA-e) za učinak genotipa na mjerene fenotipske karakteristike korijena.

Izvor varijabilnosti	n-1	Širina	Dubina	Kut grananja	Ukupna duljina	Ukupna površina
Genotip	55	***	***	***	***	***

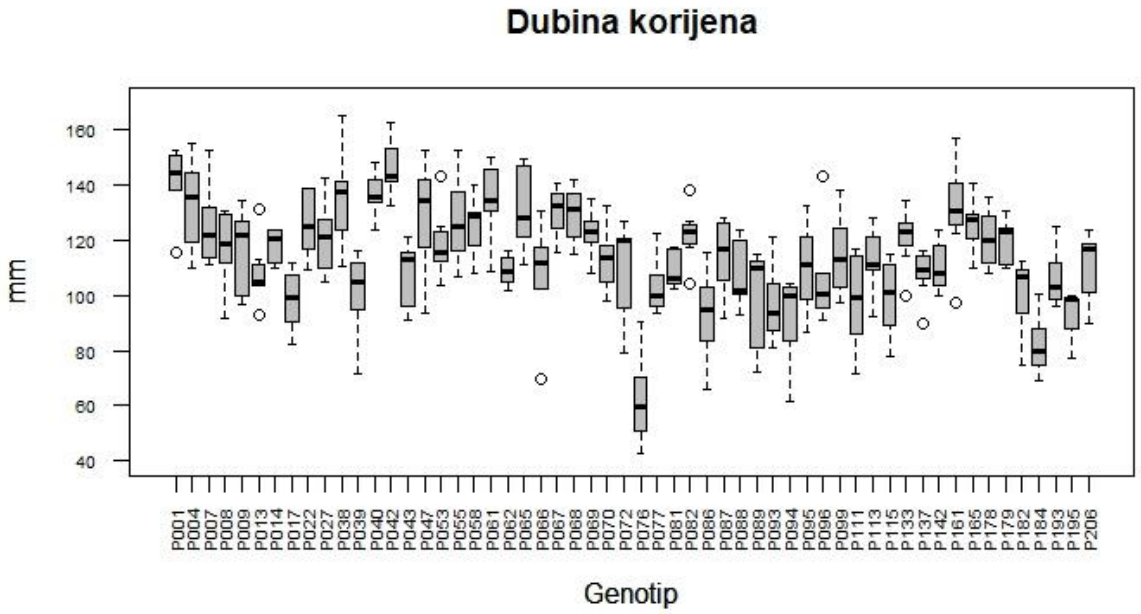
n-1: broj stupnjeva slobode izvora varijabilnosti; p: vjerojatnost prihvaćanja nulte hipoteze da izvor varijabilnosti nema utjecaja na analiziranu karakteristiku; Razina signifikantnosti: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, n.s. nije signifikantno.

Rezultati ANOVA-e ukazuju da postoji statistički značajan učinak ($p \leq 0,001$) genotipova na sve mjerene karakteristike.

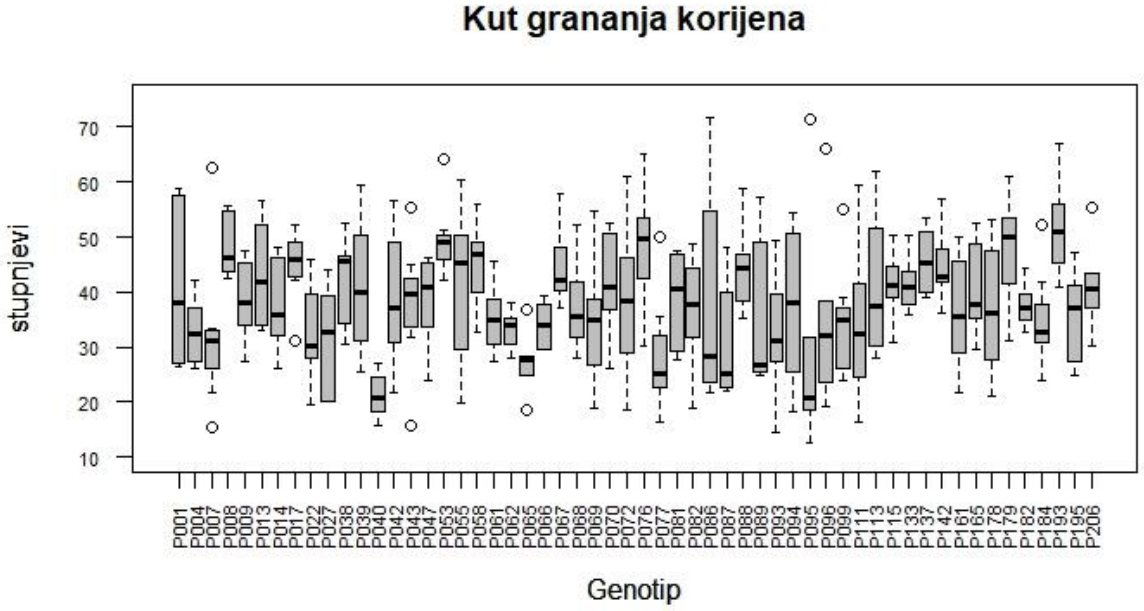
Raspodjela izmjera fenotipskih karakteristika korijena po genotipovima prikazana je grafikonima 1 – 5:



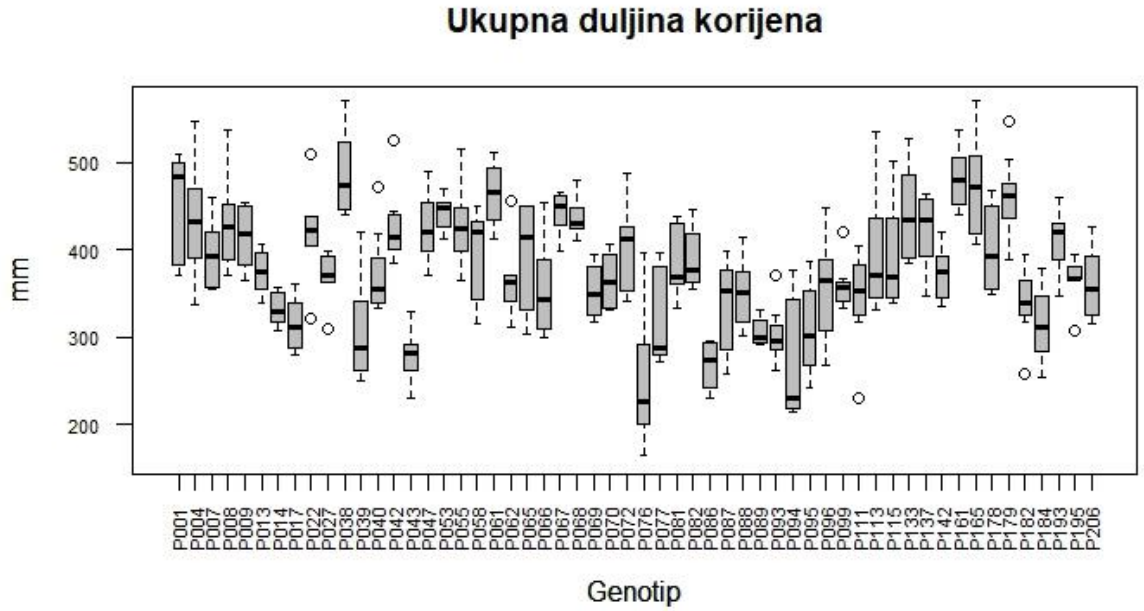
Grafikon 1. Raspodjela izmjera širine korijena po genotipovima.



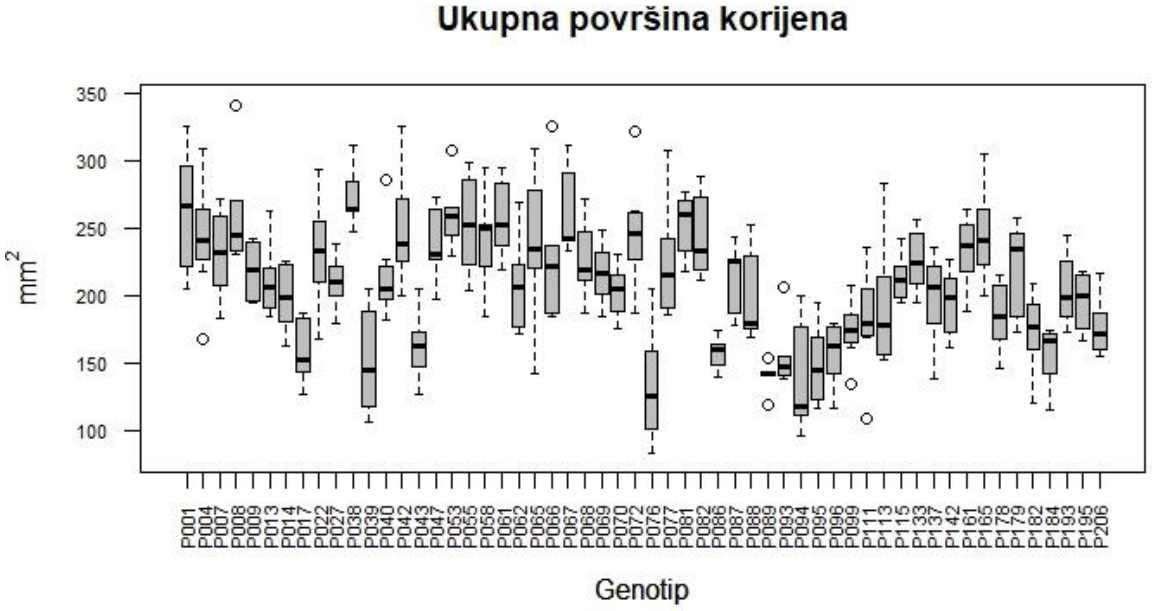
Grafikon 2. Raspodjela izmjera dubine korijena po genotipovima.



Grafikon 3. Raspodjela izmjera kuta grananja korijena po genotipovima.



Grafikon 4. Raspodjela izmjera ukupne duljine korijena po genotipovima.



Grafikon 5. Raspodjela izmjera ukupne površine korijena po genotipovima.

Prosječno najširi korijen imaju genotipovi Bc Renata (P179; 105,67 mm) i Ilinca (P058; 103,34 mm), dok najmanju širinu korijena razvijaju genotipovi Accroc (P095; 52,24 mm) i U1-Osječka šišulja (P077; 54,59 mm; grafikon 1).

Najveću prosječnu dubinu korijena pokazuju genotipovi Rebeka (P042; 146,93 mm) i Natalija (P001; 141,17 mm), a prosječno najplići korijen razvijaju Zlatna dolina (P076; 62,07 mm) i Airbus (P184; 82,20 mm; grafikon 2).

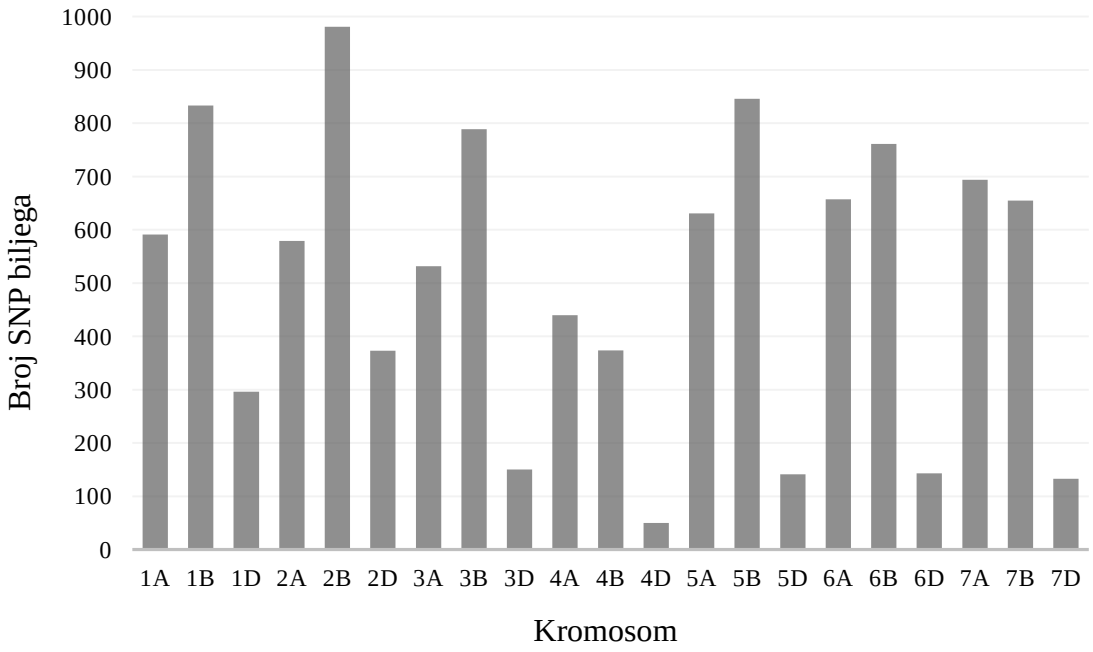
Prosječno najširi kut grananja korijena imaju genotipovi Bc Tena (P193; 51,62°) i Zlatna dolina (P076; 48,10°), dok najuži kut grananja pokazuju Lucija (P040; 21,32°) i Accroc (P095; 28,19°; grafikon 3)

Najveću ukupnu duljinu, obzirom na prosjek izmjerenih vrijednosti, razvijaju genotipovi Zlata (P161; 481,41 mm) i Superžitarka (P165; 476,25 mm), dok najmanju ukupnu duljinu pokazuju Zlatna dolina (P076; 253,25 mm) i Selehio (P094; 268,65 mm; grafikon 4).

Najveću ukupnu površinu korijena između istraživanih genotipova pokazuju genotipovi Natalija (P001; 263,28 mm^2) i Rebeka (P042; 250,65 mm^2), dok prosječno najmanju površinu imaju genotipovi Zlatna dolina (P076; 133,54 mm^2) i Airbus (P184; 154,38 mm^2; grafikon 5).

5.2. Rezultati analize polimorfizma jednog nukleotida (SNP biljega)

Grafikonom 6 prikazan je broj SNP biljega po pojedinim kromosomima genoma pšenice. Ukupan broj korištenih biljega na razini genoma iznosi 10 649. Najveći broj biljega nalazi se unutar podgenoma B (5239), najmanji unutar podgenoma D (1286) dok je podgenom A zastupljen s 4124 SNP biljega.



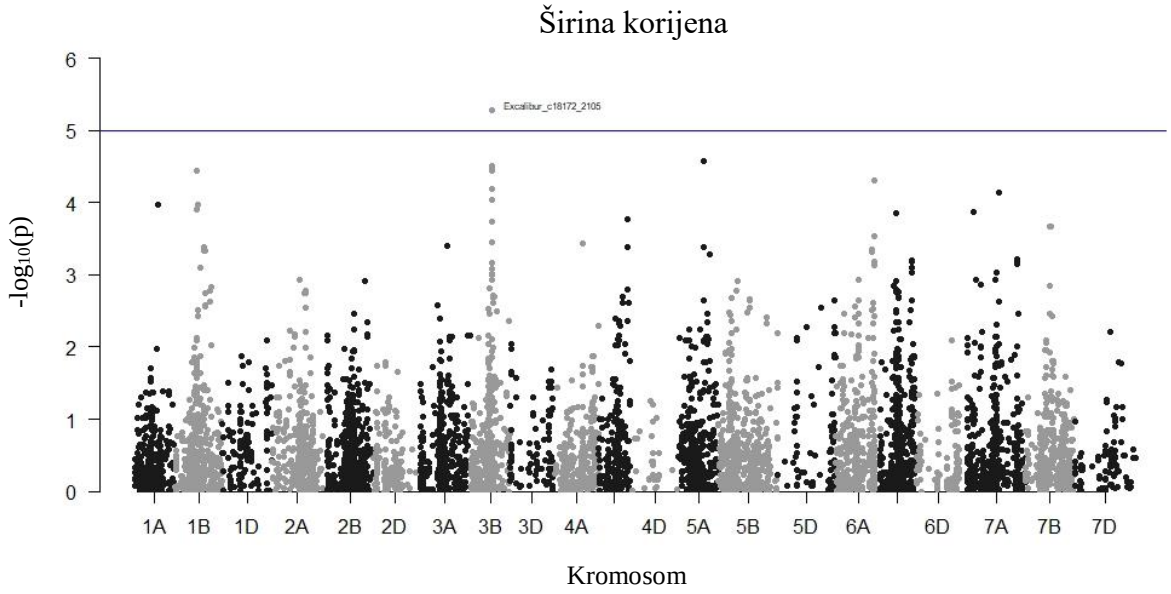
Grafikon 6. Broj SNP biljega po pojedinim kromosomima genoma pšenice.

Raspodjela izračunatih p vrijednosti ($-\log_{10}(p)$) na razini genoma pšenice za sve korištene SNP biljege za širinu (Grafikon 7), dubinu (Grafikon 8), ukupnu duljinu (Grafikon 9) te ukupnu površinu korijena (Grafikon 10) prikazana je u nastavku. Najnižu p vrijednost (najveću značajnost) za utjecaj na širinu korijena ($p < 0{,}00001$) imao je SNP biljeg Excalibur_c18172_2105 ($5{,}184 \times 10^{-6}$; kromosom 3B, pozicija 80; grafikon 7).

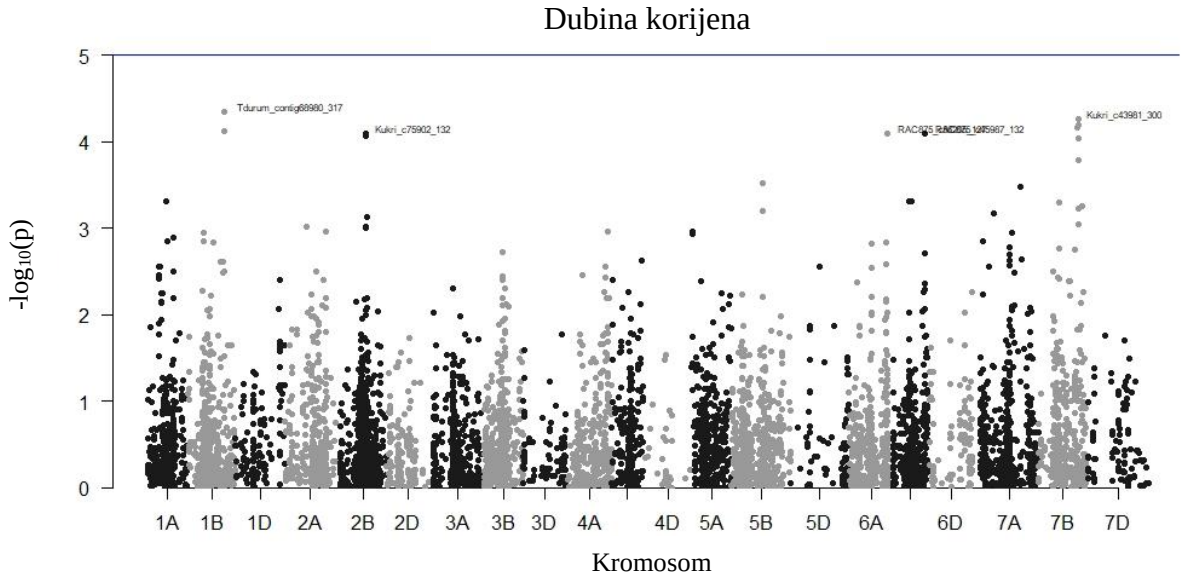
Najniže p vrijednosti (najveće značajnosti) za utjecaj na dubinu korijena ($p < 0{,}0001$) imali su SNP biljezi Excalibur_c22205_573 ($7{,}611 \times 10^{-5}$; kromosom 1B, pozicija 135), Tdurum_contig68980_317 ($4{,}487 \times 10^{-5}$; kromosom 1B, pozicija 135), RFL_Contig5898_807 ($6{,}804 \times 10^{-5}$; kromosom 7B, pozicija 143), BS00040283_51 ($6{,}362 \times 10^{-5}$; kromosom 7B, pozicija 145) te Kukri_c43981_300 ($5{,}453 \times 10^{-5}$; kromosom 7B, pozicija 145; grafikon 8).

Na grafikonu 9 istaknuti su sljedeći SNP biljezi koji su imali najniže p vrijednosti ($p < 0,00001$) za utjecaj na ukupnu duljinu korijena: BS00067878_51 ($2,041 \times 10^{-6}$; kromosom 2B, pozicija 153), RAC875_c56205_127 ($3,735 \times 10^{-6}$; kromosom 6A, pozicija 141), RAC875_c45987_132 ($3,735 \times 10^{-6}$; kromosom 6B, pozicija 114) te Ra_c39588_830 ($3,911 \times 10^{-6}$; kromosom 6B, pozicija 114).

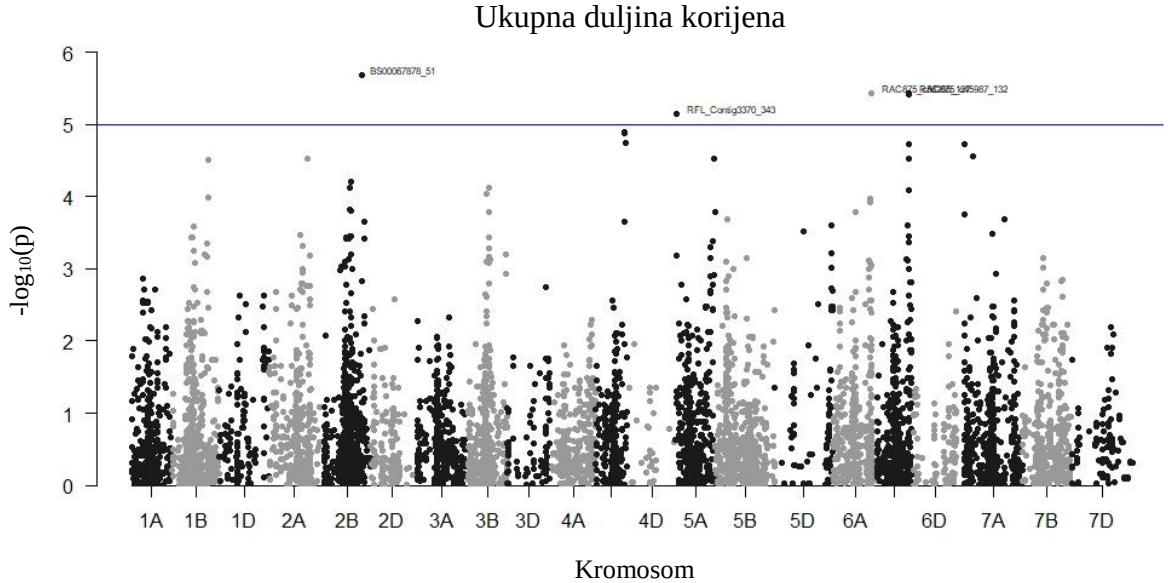
Najnižu p vrijednost ($p < 0,0001$) za utjecaj na ukupnu površinu korijena imali su SNP biljezi BS00067878_51 ($8,704 \times 10^{-5}$; kromosom 2B, pozicija 153), Kukri_c2955_281 ($1,3565 \times 10^{-5}$; kromosom 5B, pozicija 116), BobWhite_rep_c51132_85 ($1,195 \times 10^{-5}$; kromosom 6A, pozicija 137) te Ra_c39588_830 ($9,214 \times 10^{-5}$; kromosom 6B, pozicija 114; grafikon 10).



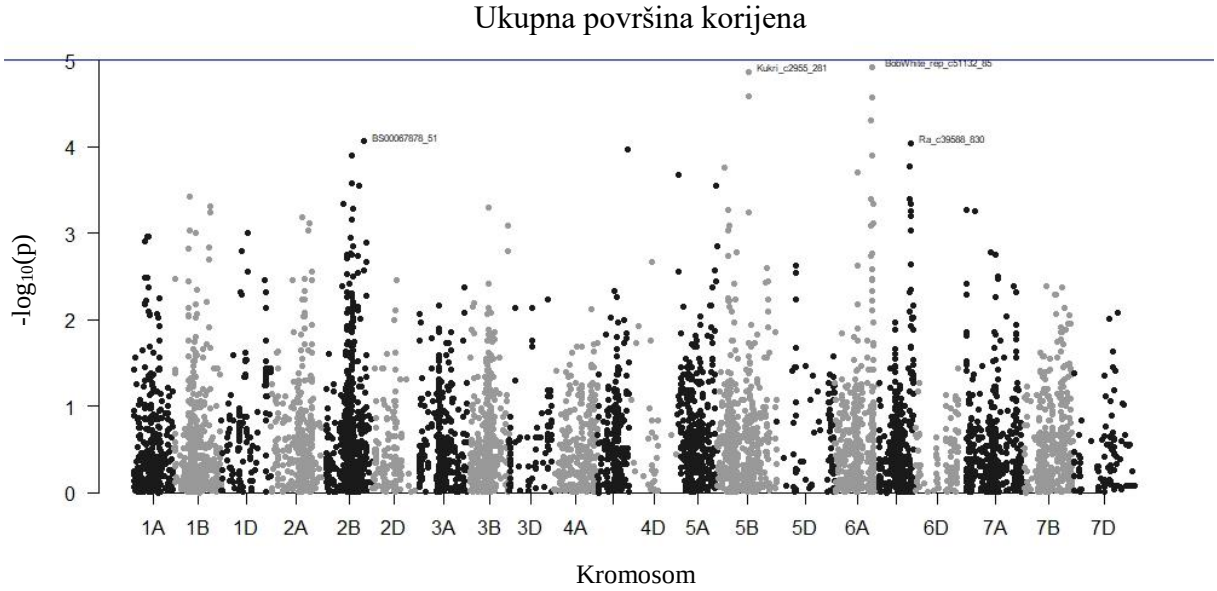
Grafikon 7. Raspodjela izračunatih p vrijednosti (-log10(p)) na razini genoma pšenice za sve korištene SNP biljege za širinu korijena. Istaknut je biljeg s visoko signifikantnom p vrijednošću ($p < 0,00001$).



Grafikon 8. Raspodjela izračunatih p vrijednosti (-log10(p)) na razini genoma pšenice za sve korištene SNP biljege za dubinu korijena. Istaknuti su biljezi s visoko signifikantnim p vrijednostima ($p < 0,0001$).



Grafikon 9. Raspodjela izračunatih p vrijednosti (-log10(p)) na razini genoma pšenice za sve korištene SNP biljege za ukupnu duljinu korijena. Istaknuti su biljezi s visoko signifikantnim p vrijednostima ($p < 0,00001$).



Grafikon 10. Raspodjela izračunatih p vrijednosti (-log10(p)) na razini genoma pšenice za sve korištene SNP biljege za ukupnu površinu korijena. Istaknuti su biljezi s visoko signifikantnim p vrijednostima ($p < 0,0001$).

6. Rasprava

6.1. Analiza fenotipskih karakteristika korijena pšenice

Karakteristike korijenovog sustava od iznimne su važnosti za prorastanje tla i usvajanje hranjiva iz otopine tla, zbog čega su usko povezane s produktivnošću biljaka, kao i adaptacijom biljaka na nepovoljne okolišne uvjete (Manschadi i sur., 2008; Hamada i sur., 2012). Kako tvrde Tuberosa (2012) te Manschadi i sur. (2008), postoje značajne razlike u karakteristikama korijena između različitih genotipova važnih poljoprivrednih kultura, poput razlika u kutu grananja seminalnog korijenja pšenice (Hamada i sur., 2012), duljini lateralnog korijenja kukuruza (Zhu i sur., 2005) te duljini primarnog korijena graha (Beebe i sur., 2006).

Navedeno potvrđuje i ovaj rad te se analizom varijance (Tablica 3) utvrđuje statistički značajan učinak genotipova na fenotipske karakteristike korijena klijanaca pšenice. Tako primjerice, genotipovi Natalija (P001) i Rebeka (P042) razvijaju prosječno najdublje (Grafikon 2) i površinom najveće korijenje (Grafikon 5), dok genotip Zlatna dolina (P076) razvija prosječno najplići (Grafikon 2), najkraći (Grafikon 4) te površinom najmanji korijenov sustav (Grafikon 5). Ovi rezultati su u skladu s Atkinson i sur. (2015) čiji rezultati također upućuju na statistički značajan učinak genotipova na fenotipske karakteristike korijena.

Lynch (2013) ukazuje na poseban problem jednogodišnjih poljoprivrednih kultura u obliku vremena utrošenog na razvoj korijenovog sustava, tijekom kojeg mnogi zemljišni resursi postaju slabo pristupačni biljci zbog njihovog ispiranja ili vezivanja na adsorpcijski kompleks tla. Prema istom autoru, kao i prema Manschadi i sur. (2008) i Bayoumi i sur. (2012), ideotipovi korijena kukuruza i pšenice koji pokazuju veću efikasnost u usvajanju dušika i vode podrazumijevaju uži kut grananja te izraženi rast korijena u dubinu. Lynch (2013) dodaje obrazloženje ove hipoteze koje se bazira na činjenici da je dostupnost vode i dušika tijekom vegetacijskog razdoblja veća u dubljim slojevima tla, što je slučaj za većinu poljoprivrednih površina. Obzirom na rani stadij klijanaca te izostanak analize efikasnosti primanja hranjiva i vode, nije moguće sa sigurnošću tvrditi da su navodi ovih autora potvrđeni ovim pokusom. Međutim, obzirom na mjerene karakteristike korijena, potencijalnim genotipom s većom efikasnošću primanja dušika i vode može se smatrati genotip Lucija (P040), zbog prosječno užeg kuta grananja (Grafikon 3) te relativno dubokog korijena (Grafikon 2).

Nadalje, Lynch (2011; 2013) te Ho i sur. (2005) utvrđuju povezanost fenotipskih karakteristika korijenovog sustava s efikasnošću usvajanja fosfora kod pšenice te nekih drugih važnih poljoprivrednih kultura. Tako Lynch (2011; 2013) navodi da ideotipove korijenovog

sustava za poboljšano usvajanje fosfora treba karakterizirati šire korijenje uz pliće grananje korijenove osi. Također, Ho i sur. (2005) dodaju da genotipovi graha plićeg korijenja imaju veću koncentraciju fosfora u suhoj tvari nadzemnog dijela biljke. Navedene su teze višestruko potvrđene (Manske i sur., 2000; Mollier i Pellerin, 1999). Rezultati ovog pokusa ukazuju da genotipovi šireg korijenovog sustava: Bc Renata (P179) i Ilnica (P058) posjeduju i širi kut grananja korijena (Grafikoni 1 i 3). Obzirom na utvrđeno, navedeni se genotipovi pšenice smatraju potencijalnim genotipovima za efikasno usvajanje fosfora.

Ograničavajući čimbenik ovog načina fenotipizacije korijenovog sustava pšenice jest to što je pokus proveden u kontroliranim uvjetima, te se radi o umjetnom mediju (*pouch* sustav) koji se razlikuje od stvarnih uvjeta tla, te na kraju što su fenotipske karakteristike utvrđivane u vrlo ranoj fazi (pet dana nakon presađivanja). Tako primjerice, Bai i sur. (2013) ne nalaze podudarnost karakteristika korijena kod biljaka uzgojenih u kontroliranim uvjetima s visinom biljaka uzgojenih u tlu. Unatoč tome, Watt i sur. (2013) utvrđuju signifikantnu pozitivnu korelaciju nekih fenotipskih karakteristika korijenovog sustava pšenice u ranim razvojnim fazama između biljaka uzgajanih u kontroliranim uvjetima u pouchevima te biljaka uzgajanih u tlu u poljskim uvjetima, dok je u usporedbi s kasnijim razvojnim fazama (cvatnja) pozitivna korelacija ipak izostala. Kao moguće razloge takvog ishoda, autori navode varijabilnost okolišnih čimbenika tijekom vegetacijskog razdoblja kroz profil tla. Ovi rezultati ukazuju na potrebu da se, unatoč preprekama u vidu kompleksnosti korijenovog sustava te interakcije biljke s okolišnim čimbenicima, istraživanje provedeno ovim radom ponovi te obuhvati i kasnije razvojne faze biljaka, kao i njihov razvoj u stvarnim uvjetima tla.

6.2. Analiza polimorfizma jednog nukleotida (SNP)

Područja unutar genoma koja sadrže gene povezane s određenim kvantitativnim svojstvima poznata su kao lokusi kvantitativnih svojstava (Collard i sur., 2005). Ren i sur. (2012) smatraju da njihova detekcija, bazirana na genskim kartama velike gustoće te kartiranju pridruživanjem za karakteristike korijena, doprinosi poznavanju kompleksne genetske kontrole regulacije rasta korijena. Navedeno je potvrđeno za fenotipske karakteristike korijena pšenice te Ren i sur. (2012) pronalaze dva QTL-a za maksimalnu duljina korijena, tri za duljinu primarnog korijena te pet QTL-ova koji kontroliraju fenotipske varijacije u ukupnoj duljini korijena između genotipova. Bai i sur. (2013) pronalaze devet QTL-ova za duljinu korijena i devet za površinu korijena, dok Hamada i sur. (2012) lociraju dva QTL-a za kut grananja korijena. Moguće objašnjenje detekcije većeg broja QTL-ova za istu karakteristiku leži u činjenici da je genetska

regulacija kvantitativnih karakteristika, poput fenotipskih karakteristika korijenovog sustava, kontrolirana od strane velikog broja gena (QTL-ova) slabijeg učinka.

Analizom polimorfizma jednog nukleotida u sklopu ovog rada pronađeni su lokusi kvantitativnih karakteristika koji uključuju jedan signifikatni QTL ($p < 0,00001$) za širinu korijena (Grafikon 7) te četiri za ukupnu duljinu korijena (Grafikon 9). Nadalje, na razini signifikantnosti $p < 0,0001$ pronađena su četiri QTL-a za dubinu (Grafikon 8) te isti broj za ukupnu površinu korijena (Grafikon 10). Ovi rezultati potvrđuju tezu da podaci dobiveni genotipizacijom visoke propusnosti, kod primjene SNP biljega visoke gustoće, imaju primjenu u detekciji lokusa kvantitativnih karakteristika korijena (Wang i sur., 2014).

Nadalje, većina signifikatnih QTL-ova za sve četiri analizirane karakteristike smještena je unutar podgenoma B (85 %; Grafikoni 7 – 10), dok je utjecaj D podgenoma u potpunosti izostao, što stvara pretpostavku da je utjecaj D podgenoma na fenotipske karakteristike korijena kod analiziranih klijanaca pšenice zanemariv. Ova je pretpostavka u suprotnosti s Atkinson i sur. (2015), obzirom da autori smatraju da postoji velika vjerojatnost da se baš unutar podgenoma D nalazi gen jakog efekta koji utječe na regulaciju arhitekture korijenovog sustava klijanaca.

Razmatrajući četiri signifikantna QTL-a za dubinu korijena (Grafikon 8), vidljivo je da su dva detektirana na istoj poziciji na kromosomu 1B, dok druga dva dijele poziciju na kromosomu 7B. Također, od četiri pronađena signifikantna QTL-a za ukupnu duljinu korijena (Grafikon 9), dva su detektirana na istoj poziciju unutar kromosoma 6B. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da se unutar navedenih regija nalazi jedan ili više gena jakog efekta koji utječu na regulaciju fenotipske varijabilnosti u dubini odnosno ukupnoj duljini korijena kod klijanaca pšenice.

7. Zaključak

Analizom fenotipskih karakteristika korijenovog sustava klijanaca pšenice utvrđena je značajna fenotipska varijabilnost između korištenih genotipova pšenice. Također, pronađeni su potencijalni ideotipovi korijena koji podrazumijevaju poboljšano usvajanje vode i dušika odnosno fosfora. Međutim, obzirom na rani stadij klijanaca te uzgoj u kontroliranim uvjetima, ove rezultate bi bilo vlo korisno potvrditi u kasnijim fazama rasta te u stvarnim uvjetima (u tlu). Nadalje, pomoću analize polimorfizma jednog nukleotida detektirani su signifikantni QTL-ovi za sve četiri analizirane karakteristike korijena. Odnosno, pronađene su potencijalne regije koje sadrže jedan ili više gena jakog efekta koji kontroliraju mjerene fenotipske karakteristike. Sukladno tome, podaci ovog istraživanja mogu imati široku primjenu u oplemenjivačkim programima fokusiranima na karakteristike korijenovog sustava klijanaca pšenice.

Na temelju navedenog te obzirom na izloženost kultiviranih biljaka velikom broju abiotskih i biotskih čimbenika tijekom vegetacijskog razdoblja, analiza fenotipskih karakteristika korijenovog sustava pšenice od iznimne je važnosti za odabir ideotipova korijena adaptiranih na određene nepovoljne uvjete. Sukladno tome, stvara se potreba za bržom i jednostavnijom fenotipizacijom korijenovog sustava te inderdisciplinarnim pristupom koji podrazumijeva daljnji razvoj i implementiranje primjene genetskim biljezima potpomognute selekcije u sve veći opseg programa oplemenjivanja bilja.

7. Popis literature

1. Adhikari T. B., Anderson J. M., Goodwin S. B. (2003). Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 93: 1158-1164.
2. Akhunov E., Nicolet C., Dvorak J. (2009). Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. Theor Appl Genet 119: 507-517.
3. Atkinson J. A., Wingen L. U., Griffiths M., Pound M. P., Gaju Oorbessy, Foulkes M. J., Le Gouis J., Griffiths S., Bennett M. J., King J., Wells D. M. (2015). Phenotyping pipeline reveals major seedlings root growth QTL in hexaploid wheat. Journal of Experimental Botany 66 (8): 2283-2292.
4. Bai C., Liang Y., Hawkesford M. J. (2013). Identification of QTLs associated with seedling root traits and their correlation with plant height in wheat. Journal of Experimental Botany 64 (6): 1745-1753.
5. Bayoumi T. Y., Eid M. H., Metwali E. M. (2008). Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. African Journal of Biotechnology 7 (14): 2341-2352.
6. Beebe S. E., Rojas-Pierce M., Yan X., Blair M. W., Pedraza F., Muñoz F., Tohme J., Lynch J. P. (2006). Quantitative trait loci for root architecture traits correlated with phosphorus acquisition in common bean. Crop Sci. 46: 413-423.
7. Blum A., Klueva N., Nguyen H. T. (2001). Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. Euphytica 117: 117-123.
8. Bonser A. M., Lynch J., Snapp S. (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in Phaseolus vulgaris. New Phytologist 132: 281–288.
9. Bradbury P. J., Zhang Z., Kroon D. E., Casstevens T. M., Ramdoss Y., Buckler E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Genetics and population analysis. Bioinformatics Applications Note 23 (19): 2633-2635.
10. Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G. L. A., D'Amore R. i sur. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. Nature 491:705-710.

11. Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142: 169-196.
12. Crook M. J., Ennos A. R. (1994). Stem and root characteristics associated with lodging resistance in four winter wheat cultivars. Journal of Agricultural Science, Cambridge University Press 123: 164-174.
13. Cruz-Ramírez A., Calderón-Vázquez C., Herrera-Estrella L. (2009). Effect of nutrient availability on root system development. U: Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development (Beeckman, T. Ur.). John Wiley & Sons, Inc. 288-324.
14. Dvořák J., Znang H. K. (1992). Reconstruction of the phylogeny of the genus Triticum from variation in repeated nucleotide sequences. Theor. Appl. Genet. 84: 419-429.
15. FAOSTAT (2018). FAO Statistic Division, Production/Yield quantities of wheat in world + (Total). 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> Pristupljeno 11. siječnja 2018.
16. Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. Journal of Experimental Botany 61 (12): 3211-3222.
17. Franco J. A., Bañón S., Vicente M. J., Miralles J., Martínez-Sánchez J. J. (2011). Root development in horticultural plants grown under abiotic stress conditions-a review. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 86 (6): 543-556.
18. Geravandi M., Farshadfar E., Kahrizi D. (2011). Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes. Russian Journal of Plant Physiology 58 (1): 69-75.
19. Gupta P. K., Mir R. R., Mohan A., Kumar J. (2008). Wheat genomics: Present status and future prospects. International Journal of Plant Genomics. Vol. 2008. Article ID 896451, 36 pages.
20. Hamada A., Nitta M., Nasuda S., Kato K., Fujita M., Matsunaka H., Okumoto Y. (2012). Novel QTLs for growth angle of seminal roots in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Soil 354: 395-405.
21. Ho M. D., Rosas J. C., Brown, K. M., Lynch J. P. (2005). Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. Functional Plant Biology 32: 737-748.
22. Hochholdinger F., Zimmermann R. (2009). Molecular and genetic dissection of cereal root system development. U: Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development (Beeckman, T., Ur.). John Wiley & Sons, Inc. 175-191.

23. Horst W. J., Waschkies C. (1987). Phosphatversorgung von Sommerweizen (*Triticum aestivum* L.) in Mischkultur mit Weißer Lupine (*Lupus albus* L.). Z. Pflanzernähr. Bodenk. 150: 1-8.
24. Huang X. Q., Wang L. X., Xu M. X., Röder M. S. (2002). Microsatellite mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm5e* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 106: 585-865.
25. Hund A., Trachsel S., Stamp P. (2009). Growth of axile and lateral roots of maiz: I development of phenotyping platform. Plant and Soil, 325: 335-349.
26. Iglesias-García R., Prats E., Fondevilla S., Šatović Z., Rubiales D. (2015). Quantitative trait loci associated to drought adaptation in Pea (Pisum sativum L.). Plant Mol Bio Rep.
27. Kerepesi I., Galiba G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40: 482-487.
28. Lambers, H., Chapin, F. S., Pons, T. L. (2008). Plant physiological ecology. 2nd ed. New York. Springer.
29. Le Marié C., Kirchgessner N., Marschall D., Walter A., Hund A. (2014). Rhizoslides: paper-based growth system for non-destructive, high throughput phenotyping of root development by means of image analysis. Plant methods, 10: 1-13.
30. Ling H. -Q., Zhao S., Liu D., Wang J., Sun H., Zhang C. i sur. (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu.* Nature, 496: 87-90.
31. Lynch J. P. (1995). Root architecture and plant productivity. Update on root biology. Plant Physiol. 109: 7-13.
32. Lynch J. P. (1998). Root architecture and phosphorus acquisition efficiency in common bean. Radical Biology: Advances and Perspectives on the Function of Plant Roots. American Society of Plant Physiologists.
33. Lynch J. P. (2007). Roots of the Second Green Revolution. Australian Journal of Botany 55: 493-512.
34. Lynch J. P. (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. Plant Physiology 156: 1041-1049.
35. Lynch J. P. (2013). Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. Annals of Botany 112: 347-357.
36. Magnavaca R., Gardner C. O., Clark R. B. (1987). Evaluation of inbred maize lines for aluminium tolerance in nutrient solution. U: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. (Nijhoff M., Ur.). Dordrecht, The Netherlands, pp. 255-265.

37. Manschadi A. M., Christopher J., deVoil P., Hammer G. L. (2006). The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. Functional Plant Biology 33: 823-837.
38. Manschadi A. M., Hammer G. L., Christopher J. T., deVoil P. (2008). Genotypic variation in seedling root architectural traits and implications for drought adaptation in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Soil 303: 115-129.
39. Manschadi A. M., Manske G. G. B., Vlek P. L. G. (2013). Root architecture and resource acquisition: U: Wheat as a model plant. (Eshel A. i Beeckman T., Ur.). Plant Roots: The Hidden Half. Chapter 22. Taylor & Francis Group, LLC.
40. Manske G. G. B., Ortiz-Monasterio J. I., Van Ginkel M., Gonzáles R. M., Rajaram S., Molina E., Vlek P. L. G. (2000). Traits associted with improved P-uptake efficiency in CIMMYT's semidwarf spring bread wheat grown on an acid Andisol in Mexico. Plant and Soil 221: 189-204.
41. Marschner H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. Pland and Soil 134: 1-20.
42. Martinčić J., Javor P. (1996). Pšenica (*Triticum aestivum* L.). U: Oplemenjivanje bilja. (Martinčić J., Kozumplik V., Ur.): 117-155.
43. Mi G. H., Chen F. J., Wu Q. P., Lai N. W., Yuan L. X., Zhang F. S. (2010). Ideotype root architecture for efficient nitrogen aquisition by maize in intensive cropping systems. Sci China Life Sci, 53: 1369-1373.
44. Miladinović N., Ćirić B., Jovanović D. (1974). Visokorodne sorte pšenice. Beograd. pp. 30-52.
45. Novoselović D. (2018). Razvoj QTL pomoću molekularnih markera za svojstva kvalitete pšenice. Poljoprivredni institut Osijek; Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa: Znanstveni projekti. <http://zprojekti.mzos.hr/public/c-prikaz_det.asp?psid=0&ID=349>. Pristupljeno 10. kolovoza 2018.
46. Mishra H. S., Rathore T. R., Tomar V. S. (1999). Root growth, water potential and yield of irrigated wheat. Irrig Sci 18: 117-123.
47. Mollier A., Pellerin S. (1999). Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. Journal of Experimental Botany 50 (333): 487-497.
48. Pospišil A. (2010). Ratarstvo I. dio., Zrinski d.d. Čakovec, ISBN: 978-953-155-114-4, pp. 7-35.

49. Qian L., Hickey L. T., Stahl A., Werner C. R., Hayes B., Snowdon R. J., Voss-Fels K. P. (2017). Exploring and harnessing haplotype diversity to improve yield stabilty in crops. Front. Plant. Sci. 8: 1534.
50. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>. Pristupljeno 25. listopada 2018.
51. Ren Y., He X., Liu D., Li J., Zhao X., Li B., Tong Y., Zhang A., Li Z. (2012). Major quantitative trait loci for seminal root morphology of wheat seedlings. Mol Breeding 30: 139-148.
52. Saintenac C., Jiang D., Wang S., Akhunov E. (2013). Sequence-based mapping of the polyploid wheat genome. G3: Genes/Genomes/Genetics. 3 (7): 1105-1114.
53. Salvi S., Tuberosa R. (2015). The crop QTLome comes of age. Current Opinion in Biotechnology. 32:179-185.
54. Setter T. L., Carlton G. (2000). Germination, vegetative and reproductive growth. U: The wheat book: principles and practice. (Anderson W. K. i Garlinge J. R., Ur.) Department of Agriculture and Food, Western Australia, Perth. Bulletin 4443. pp. 37-54.
55. Shaff J. E., Schultz B. A., Craft E. J., Clark R. T., Kochian L. V. (2010). GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. Plant and Soil 330: 207-214.
56. Singh, R. P. (1993). Resistance to leaf rust in 26 Mexican wheat cultivars. Crop Science 33 (3): 633-637.
57. Sultan S. E. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. Trends in Plant Science-Review 5 (12): 537-542.
58. Tadesse W., Ogbonnaya F. C., Jighly A., Sanchez-Garcia M., Sohail Q., Rajaram S., Baum M. (2015). Genome-wide association mapping in yield and grain quality traits in winter wheat genotypes. PloS ONE 10 (10).
59. Tuberosa R. (2012). Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. Frontiers in Physiology. Vol. 3., 347: 8-33.
60. Vance C. P., Uhde-Stone C., Allan D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist 157: 423-447.

61. Wang S., Wong D., Forrest K., Allen A., Chao S. (...) Hayden M., Akhunov E. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90000 single nucleotide polymorphism array. Plant Biotechnology Journal 12: 787-796.
62. Watson L., Dallwitz M.J. (1992). The grass genera of the world: C.A.B. International, Wallingford.
63. Watt M., Moosavi S., Cunningham S. C., Kirkegaard J. A., Rebetzke G. J., Richards R. A. (2013). A rapid, controlled-environment seedling root screen for wheat correlates well with rooting depths at vegetative, but not reproductive, stages at two field sites. Annals of Botany 112: 447-455.
64. Zhu J., Kaeppler S. M., Lynch J. P. (2005). Mapping of QTL controlling root hair lenght in maize (Zea mays L.) under phosphorus deficiency. Plant and Soil. 270: 299-310.
65. Znanstveni centar izvrsnosti za bioraznolikost i molekularno oplemenjivanje bilja (CroP-BioDiv), http://biodiv.iptpo.hr/hr/fenotipizacija/. Pristupljeno 29. siječnja 2018.